

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
División Regional de Ciencia Animal**



**“Estudio serológico de *Mycoplasma bovis* en becerras
Holstein lactantes por la técnica de ELISA”**

Por

RIGOBERTO LOPEZ JOSE

TESIS

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Febrero de 2012

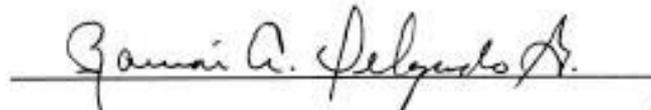
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

TESIS

**“Estudio serológico de *Mycoplasma bovis* en becerras
Holstein lactantes por la técnica de ELISA”**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL



M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE
ANIMAL**



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO

Torreón, Coahuila, México

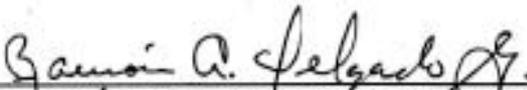
Febrero de 2012

**“Estudio serológico de *Mycoplasma bovis* en becerras
Holstein lactantes por la técnica de ELISA”**

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ
PARTICULAR DE ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

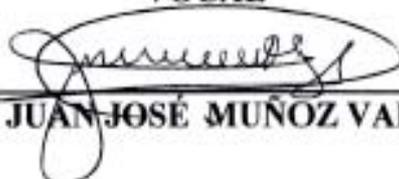
PRESIDENTE


M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

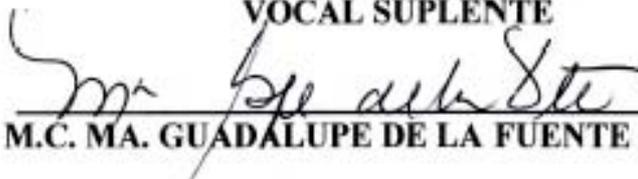
VOCAL


M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL


M.C. JUAN JOSÉ MUÑOZ VARELA

VOCAL SUPLENTE


M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

Torreón, Coahuila, México

Febrero de 2012

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi Alma Mater por abrirme sus puertas y por hacer realidad mi sueño.

Son muchas las personas especiales a las que quiero agradecer, su amistad, su apoyo, ánimo y compañía en esta etapa de mi vida. Algunas están aún conmigo, otras se han ido pero siguen y seguirán en mis recuerdos. Sin importar en donde quiera que estén, o si algún día llegan a leer estas líneas a todos ellos quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado. Gracias por todas sus enseñanzas. Voy a enlistar a algunas de esas personas especiales: a mi compañera de tesis Citlali Avendaño Tejeda por todo su apoyo desde el principio de nuestra investigación; a mis compañeros del grupo "A" que de alguna forma convivimos durante cinco años, Carlos, Yahir, Edwin, Claudia, Brenda, Marlem, Fernando, Raúl, Jorge Míreles, Jorge Bravo, Abigail. A mis amigos Oscar Quintero Cortes, Oscar Hernández Alvarado "el carnalini", Juan de Dios Hernández López, Elio Mauricio Melgar Ramos, Andrés Sánchez Hernández, José Alfredo Sandoval Luna, Alejandra Cardiel Pineda Iván moreno Bautista Sandro de la Cruz Martínez, Pericles Cazares Mendoza, Cristian Francisco Domínguez Bautista, José Alberto Gutiérrez López "el Paisita".

Quiero agradecer también a mi asesor de Tesis el M.C.V Ramón Alfredo Delgado por todas sus sugerencias para la elaboración del presente trabajo. También agradecer al M.V.Z. J. Guadalupe Rodríguez Martínez, M.V.Z. Juan José Muñoz Varela, M.V.Z. Ma. Guadalupe de la Fuente Salcido, por dedicar su tiempo en la revisión de la tesis.

Y sabiendo que existe una forma de agradecer toda una vida llena de buenos actos, por todo ello.

!!!GRACIAS!!!

Dedicatorias

Dedico mi trabajo a mis padres Constantino López López y Herminia José Pedro. A mis hermanos Enrique Martín, Salustia, Vicente, Ismael, Florencio, Cesar Constantino y Oscar Omar; a mis sobrinos Mari Carmen, Enrique Gandhi, Carlos Isaac, y a mi cuñada Tea.

A todos ustedes también les agradezco por todo su apoyo, su afecto, gracias por sus ejemplos y que ojalá la familia siga unida como lo hemos hecho hasta ahora.

INDICE

INDICE DE CUADROS	I
INDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	III
1 INTRODUCCION.....	1
2 REVISION DE LA LITERATURA.....	2
2.1 Historia.....	2
2.2 Taxonomía	2
2.3 Características generales de los micoplasmas	3
2.4 Enfermedades en los animales	4
2.5 Propiedades biológicas de <i>Mycoplasma bovis</i>	5
2.6 Hábitat.....	8
2.7 Epidemiología de la infección por <i>Mycoplasma bovis</i>	8
2.7.1 El reservorio y la fuente de infección	9
2.8 Importancia económica	10
2.9 Transmisión de la enfermedad	11
2.10 El diagnóstico de <i>Mycoplasma bovis</i>	12
2.11 Técnicas de diagnóstico.....	13
2.11.1 Técnica de ELISA y PCR	13
2.12 Asociación con otros patógenos	14
2.13 Patogenia y factores de virulencia	15
2.14 Signos clínicos y alteraciones patológicas asociadas a la infección por <i>Mycoplasma bovis</i>	17
2.14.1 Signos clínicos	17
2.14.2 Lesiones	18
2.15 Enfermedades del aparato respiratorio	21
2.16 Neumonía producida por <i>Mycoplasma bovis</i>	21
2.17 Mastitis producida por <i>Mycoplasma bovis</i>	24
2.18 Artritis asociada a <i>Mycoplasma bovis</i>	25
2.19 Aislamiento y cultivo de <i>Mycoplasma bovis</i>	27
2.20 Tratamiento	28

2.21	Medidas preventivas y control.....	28
3	JUSTIFICACION	30
4	OBJETIVOS	31
	a) Objetivos generales	31
	b) Objetivos específicos	31
5	HIPOTESIS	31
6	MATERIALES Y METODOS	32
	6.1 Marco de referencia.....	32
	6.2 Toma de muestras.....	34
	6.3 Técnica de ELISA.....	34
	6.3.1 Presentación.....	34
	6.3.2 Principios del test	34
	6.4 Materiales y reactivos.....	36
	6.5 Precauciones de uso	36
	6.6 Procedimiento.....	37
	6.7 Cálculo de resultados	39
	6.8 Criterios de validación	39
	6.9 Interpretación	39
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
8	CONCLUSIONES	42
9	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43

INDICE DE CUADROS	
Cuadro 1. Familias y géneros de la clase <i>mollicutes</i>	3
Cuadro 2. Propiedades comparativas de dos <i>micoplasmas</i> del ganado más importantes.....	6
Cuadro 3. <i>Micoplasmas</i> importantes del ganado adulto.	9
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Corte transversal de una microcolonia de micoplasma en agar, en el que se aprecia el crecimiento en superficie y en profundidad.	4
Figura 2. Neumonía por <i>Mycoplasma bovis</i>	19
Figura 3. Bronconeumonía caseonecrotica con formación de secuestro.	20
Figura 4. Lesiones en pulmón de un ternero desafiado con <i>Mycoplasma bovis</i> ...	20
Figura 5. Secreción nasal inducida por desafío experimental de un ternero con <i>Mycoplasma bovis</i>	22
Figura 6. Enfermedad en un ternero 17 días después del desafío con <i>Mycoplasma bovis</i>	23
Figura 7. Pleuritis fibrinosa masiva en un ternero desafiado con <i>Mycoplasma bovis</i>	23
Figura 8. Agrandamiento de los ganglios linfáticos supramamarios en una vaca con mastitis causadas por <i>Mycoplasma bovis</i>	25
Figura 9. Artritis en un ternero infectado.	25
Figura 10. La artritis frecuentemente se desarrolla en las compras de animales después de un mes de introducción al hato.	26
Figura 11. Comarca Lagunera de Durango	31
Figura 12. Comarca Lagunera de Coahuila	32

ABREVIATURAS

ADNr: ADN ribosomal

β -lactámicos: betalactámicos

BAL: lavado broncoalveolar

G + C: Guanina + Citocina

BRDC: Complejo de la enfermedad respiratoria bovina

ERB: Enfermedad respiratoria bovina

IA: Inseminación artificial

IHQ: inmunohistoquímica

nm: nanometros

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa

PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

PMN: Polimorfonucleares

PNCB: Pleuroneumonía Contagiosa Bovina

PvsA: Proteínas variables de superficie "A"

Pvs: Proteínas variables de superficie

subsp.: subespecie

UBRD: enfermedad respiratoria bovina indiferenciada

RESUMEN

La micoplasmosis es una enfermedad que produce manifestaciones clínicas diversas dentro de las cuales se encuentran la otitis media y neumonía. El agente causal en becerras, *Mycoplasma bovis* se ha reportado como causante de infecciones que producen neumonía y otitis al mismo tiempo, a pesar de este dato, son escasos los reportes en becerros que asocian a las dos entidades juntas. La finalidad del presente trabajo de investigación es informar sobre estudios serológicos en hatos lecheros que presentaron otitis y neumonía por *M. bovis* en becerras Holstein de la Comarca Lagunera. En este estudio se analizaron ocho hatos lecheros con problemas de otitis y neumonía en becerras de 4 a 50 días de edad. Se tomaron muestras de sueros de becerras aparentemente sanas y de becerras enfermas con infección mixta. La identificación de anticuerpos específicos contra *M. bovis* con ELISA fue de 52.38% positivas de becerras aparentemente sanas, y 84.21% de becerras clínicamente enfermas con otitis y neumonía. Se describen los estudios y se discute la problemática de las infecciones en becerras debido a *M. bovis*.

Palabras clave: *Mycoplasma bovis*, becerras Holstein, otitis media, neumonía, serología.

I. INTRODUCCION

Los micoplasmas son organismos caracterizados morfológicamente por la falta de pared celular y por su capacidad de adhesión a las superficies mucosas de los tractos respiratorio y urogenital, además de la glándula mamaria, articulaciones y el oído medio, donde desarrollan su poder patógeno.

Las micoplasmosis son los típicos ejemplos de enfermedades multifactoriales, en las que factores tales como la existencia de infecciones intercurrentes, la constitución genética del individuo, el manejo, las condiciones climáticas y la edad entre otras, juegan un papel determinante en el inicio y desarrollo de la enfermedad. El poder patógeno de las diferentes especies de micoplasmas es muy variable, pudiéndose distinguir entre micoplasmas responsables de producir diversas patologías calificadas como micoplasmosis mayores, como la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (PNCB) causada por *Mycoplasma mycoides* subespecie (subsp.) *mycoides colonia pequeña*, y la enfermedad respiratoria bovina (ERB) causada por *Mycoplasma bovis*.

En becerros la enfermedad comúnmente se manifiesta con neumonías, artritis y otitis, sin embargo son escasos los reportes que indiquen la presencia de lesiones mixtas como por ejemplo otitis y neumonía. Por tal motivo la finalidad de la presente investigación es reportar infecciones por *M. bovis* que causen cuadros con estos dos trastornos patológicos.

2. REVISION DE LA LITERATURA

2.1 Historia

El primer micoplasma fue aislado en 1898 por **Nocard y Roux** en animales con pleuroneumonía bovina contagiosa (**Carreazo, 2003**). Dos años después, Dujardin y Beaumetz describieron las características morfológicas de sus colonias con aspecto de “huevo frito” (**Delgadillo, 1998**).

M. bovis fue aislado por primera vez en 1961 en los EE.UU. a partir de un caso grave de la mastitis en el ganado bovino (**Hale et al., 1962**). Posteriormente, parece haberse extendido a través de los movimientos de animales en todo el mundo a muchos países, incluido Israel (1964), España (1967), Australia (1970), Francia (1974), resto de Gran Bretaña (1974), Checoslovaquia (1975), Alemania (1977), Dinamarca (1981), Suiza (1983), Marruecos (1988), Corea del Sur (1989), Brasil (1989), Irlanda del Norte (1993), República de Irlanda (1994), Chile (2000; 2002), Sur de África (2005) y la República Checa (2007) (**Nicholas et al., 2008**).

Debido a su similitud serológica y bioquímica con el patógeno *M. agalactiae* de los pequeños rumiantes, fue originalmente llamado *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma bovimastitidis subsp. bovis*, que se individualizó a continuación, como *M. bovis* mediante el análisis de 16S ARN ribosomal, que reveló ocho nucleótidos diferentes en comparación con *Mycoplasma agalactiae* (**Mattsson et al., 1994**).

2.2 Taxonomía

Micoplasma es la denominación de un grupo de microorganismos que difieren de las bacterias por su tamaño pequeño y por no poseer pared celular y que se encuentran incluidos dentro de la clase *Mollicutes*, término derivado del Latín *mollis* = suave o fino y *cutes* = piel, que significa “piel blanda o suave” (**Nicolet, 1996**).

Pertenecen a la clase *Mollicutes*, al Orden *Micoplasmatales*, Familia *Mycoplasmataceae* que engloba dos géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*.

Filogenéticamente su origen se encuentra cercano a las bacterias Gram positivas **(Woese et al., 1980; Weisburg et al., 1989)**.

Actualmente han sido descritas más de 100 especies aisladas de los más diversos hospedadores. No obstante, este es un número muy dinámico y en constante crecimiento, bien sea por el descubrimiento de nuevas especies, o por la reclasificación de otras ya descritas pero clasificadas erróneamente **(Johansson et al., 1998)**.

Cuadro 1. Familias y géneros de la clase *mollicutes* (Miles 1992).

Familia/género	Especies reconocidas	Mol % G+C	Tamaño del genoma(Kbp)*	Requerimiento de esteroides
<i>Mycoplasmataceae</i>				
<i>Mycoplasma</i>	>80	22-41	0.6-1.3	+
<i>Ureaplasma</i>	5	27-36	0.7-0.9	+
<i>Acholeplasmataceae</i>				
<i>Acholeplasma</i>	10	26-36	1.5-1.7	-
<i>Anaeroplasmataceae</i>				
<i>Anaeroplasma</i>	4	26-34	1-7	+
<i>Asteroplasma</i>	1	40	1-7	-
<i>Spiroplasmataceae</i>				
<i>Spiroplasma</i>	10 [†]	25-31	1-6	+

* Weisburg et al., (1989); Neimark y Lange (1990). [†] Los espiroplasmas recientemente se han dividido en 23 grupos, cada uno de ellos puede ser equivalente a una o más especies.

2.3 Características generales de los micoplasmas

Los *Mollicutes* son procariontes de bacterias gram positivas linaje que evolucionaron a partir de *Clostridium* como las bacterias por eliminación del gen. El género *micoplasma* cuenta con la más pequeña autoreplicante forma de vida e incluye más de 100 especies **(Caswell y Archambault, 2007)**.

Los micoplasmas son microorganismos pleomórficos, carecen de pared celular, miden de 200 a 500 nm, crecen en medios sólidos y líquidos, y utilizan glucosa como fuente de energía **(Nuñez et al., 2008)**.

Mantienen algunas características de estos, como un contenido G+C muy bajo, que está entre 24-33%, nunca superior a los 40% de *Mycoplasma*

pneumoniae. Poseen un diminuto número de genes que limita la cantidad de proteínas que son capaces de sintetizar, además de vías metabólicas y enzimáticas (**Razin et al., 1998**).

Aunque no posean pared celular en muchas especies se pueden observar elementos de cito-esqueleto, pudiendo algunos incluso ser móviles. Su célula contiene el mínimo de organelas para su crecimiento y replicación: membrana citoplasmática, ribosomas y una cadena doble de ADN circular (**Razin, 1978**).

El metabolismo de estos microorganismos está influido por la ausencia de la pared celular así como por su estilo de vida parasitario/comensal. Sus vías de obtención de energía suelen estar muy conservadas y son una característica que puede ayudar a su identificación, puesto que están más o menos conservadas en cada grupo. Son aerobios o anaerobios facultativos y requieren colesterol y/o otros esteroides para crecimiento, lo que se consigue por medio de la incorporación de suero en el medio de cultivo. Sus colonias en medio sólido crecen en profundidad, presentando la mayoría de las especies las típicas colonias en “huevo frito” (**Razin, 1978**).

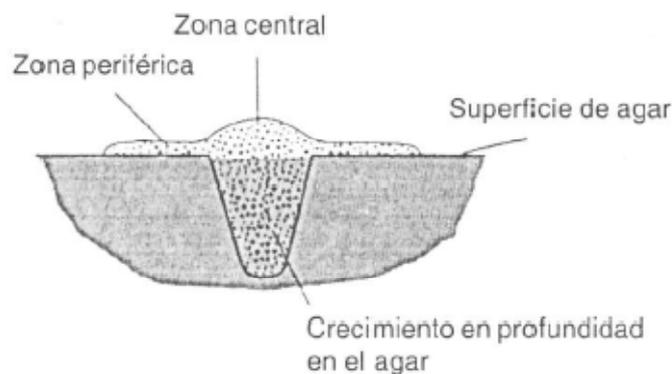


Figura 1. Corte transversal de una microcolonia de micoplasma en agar, en el que se aprecia el crecimiento en superficie y en profundidad (**Quinn et al, 2002**).

2.4 Enfermedades en los animales

Entre los micoplasmas bovinos reconocidos en los EE.UU., Canadá y

Europa, *Mycoplasma bovis* se destaca como el más invasivo y destructivo **(Adegboye et al., 1995)**. *Mycoplasma bovis* es una causa importante de neumonía, otitis media y artritis en terneros lecheros pequeños, y hay una necesidad crítica para mejorar las estrategias de prevención para este patógeno **(Brank et al., 1999; Maunsell et al, 2009)**.

En los EE: UU.; los micoplasmas están asociados con el complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRDC), y en otras partes del mundo que están asociados con neumonía crónica y el síndrome de poliartritis **(Nicholás y Ayling 2003; Caswell y Archambault, 2007)**. La artritis por *M. bovis* rara vez ocurre en terneros lecheros, algo más común de observar en terneros de engorda jóvenes **(Jasper, 1987)**.

2.5 Propiedades biológicas de *Mycoplasma bovis*

Al igual que todos los *Mollicutes*, *M. bovis* es pequeño, pleomórfico, con un bajo contenido de G + C (23 - 40% mol) del genoma y la falta permanente de una pared celular **(Johansson y Pettersson, 2002)**. Tiene un tamaño de genoma de 1.080 kpb estimado por PFGE, pero el genoma completo de la cepa de *M. bovis* (PG45) fue secuenciado a través de una colaboración entre la Universidad de Missouri y el Instituto JC Venter **(Nicholas et al., 2008)**.

La capacidad de estos organismos con esa información genética limitada y una sola membrana expuesta a prevalecer dentro del anfitrión parece depender de sistemas de conmutación genética que les permite sustituir rápidamente los antígenos de superficie, para cambiar de abrigo antigénico a otro y cambiar sus propiedades adhesivas **(Yogev et al., 1994)**.

La mayoría de los micoplasmas son anaerobios facultativos y algunos crecen en condiciones óptimas en una atmósfera con un 5-10% de CO₂. En el rumen del ganado bovino y ovino pueden encontrarse *micoplasmas* anaerobios no patógenos **(Quinn et al., 2002)**.

M. bovis fue elevado al rango de especie y dio su nombre actual en 1976 **(Askaa y Erno, 1976)**. *M. bovis* es bioquímicamente similar a *M. agalactiae*, ya que no fermenta glucosa ni hidroliza arginina, pero en lugar de

utilizar los ácidos orgánicos, lactato y piruvato para su fuente de energía para el crecimiento (**Miles et al., 1988; Cai et al., 2005**).

Sin embargo, a pesar del hecho de que los dos micoplasmas causan distintas enfermedades en animales diferentes y tienen un valor de reasociación ADN-ADN de sólo el 40%, muestran una similitud 16S ARNr muy cerca del 99,8% (**Nicholas et al., 2008**).

Cuadro 2. Propiedades comparativas de dos micoplasmas del ganado más importantes (**Nicholas et al., 2008**).

Propiedades	<i>M. mycoides subsp. mycoides SC</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
Enfermedades	Perineumonía contagiosa bovina en el ganado, de vez en cuando la artritis en los becerros	Neumonía en una ternera, mastitis, artritis, el aborto, la queratoconjuntivitis
Distribución	África subsahariana, probablemente en algunas partes de Oriente Medio, Asia Central	Todo el mundo
Huésped	Ganado, cabras (ovejas)	Ganado
Lesiones histopatológicas	Pleuroneumonía fibrinosa con necrosis	Neumonía intersticial, bronquitis linfocítica, bronconeumonía catarral
Signos clínicos	Pocos signos, dificultad respiratoria evidente después del ejercicio.	Dificultad respiratoria, mastitis, artritis.
Diagnostico	Aislamiento, serología, PCR, Sacrificio	Serología, aislamiento, PCR
Tratamiento	La recomendación de la quimioterapia está contraindicada porque el estado de portador ha sido reportado (FAO, 2007).	Quimioterapia
Control	Vacunación, control de movimiento, sacrificio.	Manejo, por ejemplo, mejorar la ventilación, reducción de la densidad de población. Algunas vacunas autógenas disponible en EE.UU. y Reino Unido.

Los micoplasmas son generalmente considerados como altamente susceptibles a diversos factores ambientales tales como la alta temperatura, sequedad, etc. A pesar de esto *M. bovis* puede sobrevivir fuera del ambiente del anfitrión a 4 ° C aproximadamente durante 2 meses en las esponjas y la leche, durante 20 días en madera y durante 17 días en el agua. A 20 ° C, la caída de la supervivencia de los períodos de una o dos semanas y a 37 ° C una semana. En el semen congelado sigue siendo el agente infeccioso durante años **(Pfützner, 1984)**.

El mecanismo de esta improbable la supervivencia en un ambiente hostil, dada su falta de pared celular, era desconocido hasta **McAuliffe et al. (2006)** demostraron que los micoplasmas podría producir un biopelícula que la faculta con una mayor resistencia. Es, sin embargo, es poco probable que el medio ambiente es una importante fuente de infección en comparación con el que suponen los animales infectados **(Nicholas et al., 2008)**.

Mycoplasma bovis suele ser sensible a los desinfectantes de uso común, aunque los materiales biológicos (descargas de leche, etc.) pueden reducir su eficacia. Formol y ácido peracético han demostrado ser muy eficaces para propósitos de desinfección. Iodóforos también son eficaces. Esto permite su uso para pezones. Desafortunadamente desinfectar los materiales sobre la base de hipocloritos es inadecuado para este fin, debido a las altas concentraciones y largos periodos de exposición necesaria para obtener la eficacia adecuada. Esto puede ser un problema, ya que estos compuestos se utilizan ampliamente en la desinfección de maquinas de ordeño **(Jasper et al., 1976, Pfützner et al., 1983)**.

Otras propiedades biológicas de los micoplasmas que han sido implicados como determinantes de virulencia son: 1). Competencia por el consumo de nutrientes o precursores biocinéticas lo que altera la función y el mantenimiento del huésped; 2). Existencia de capas o estructuras de material pseudocapsular y superficie densa en electrones, que incrementa la

integridad de la superficie micoplásmica y le confiere propiedades inmunorreguladoras; 3). Variación antigénica y de la fase de alta frecuencia, que determina la diversidad de superficie y posiblemente evite las defensas inmunes del huésped; 4). Secreción o introducción de enzimas micoplásmicas, como fosfolipasas ATPasas, hemolisinas, proteasas y nucleasas, en el ambiente celular del huésped, que conduce a una alteración tisular localizada, así como desorganización y aberraciones cromosómicas; y 5). Alojamiento intracelular, que a través del secuestro de micoplasmas, establece estados crónicos o latentes, y evade mecanismos inmunes micoplasmicidas y farmacoterapias selectivas **(Carreazo, 2003)**.

2.6 Hábitat

En general los micoplasmas están diseminados en toda la naturaleza pudiendo habitar en mamíferos, aves, reptiles, peces, artrópodos y plantas ya sea como comensales, patógenos u oportunistas **(Razin, 1978; Weisburg et al., 1989)**.

Los micoplasmas patógenos tienen una fuerte afinidad por las superficies mucosas y una preferencia específica por los tractos respiratorio y urogenital, las glándulas mamarias, las membranas serosas y las articulaciones **(Razin et al., 1998; Shahriar y Clark 2003)**.

2.7 Epidemiología de la infección por *Mycoplasma bovis*

En el ganado vacuno, *M. bovis* es la mayoría de las especies patógenas en el tracto respiratorio en los países libres de pleuroneumonía contagiosa bovina y se encuentra en todo el mundo **(Thomas et al., 2003a)**. De hecho, *M. bovis* es en gran parte aislado de las vías respiratorias del ganado bovino, rara vez en pequeños rumiantes **(Pfützner y Sachse, 1996)**, conejo **(Boucher et al., 1999)** y humanos **(Madoff et al., 1979)**.

Cuadro 3. Micoplasmas importantes del ganado adulto (Nicholas *et al.*, 2006)

Micoplasma	Enfermedad	Distribución
<i>M. bovis</i>	La neumonía, mastitis, artritis, otitis, meningitis, aborto	Mundial
<i>M. mycoides</i> SC	Perineumonía contagiosa bovina	Africa
<i>M. dispar</i>	Pleuroneumonía	Europa, América del Norte
<i>M. canis</i>	Neumonía	Europa, América del Norte
<i>M. californicum</i>	Mastitis, neumonía	Europa, EE.UU.
<i>M. bovis genitalium</i>	Endometritis, infertilidad, anomalías en el semen	Europa, África del Norte, EE.UU.
<i>Ureaplasma</i> spp	Vulvitis granular, endometritis, neumonía	Mundial
<i>M. alkalescens</i>	Desconocido, posiblemente neumonía	Europa, América del Norte
<i>M. canadense</i>	Desconocido	Europa, América del Norte
<i>M. bovirhinis</i>	Probablemente inofensivos, pueden exacerbar la neumonía	Mundial
<i>M. bovoculi</i>	Queratoconjuntivitis infecciosa	Europa, América del Norte
<i>M. alvi</i>	Desconocido	Europa, América del Norte
<i>M. verecundum</i>	Desconocido	Europa, América del Norte
<i>M. bovis</i> grupo 7	Mastitis / artritis	Australia, Suiza

2.7.1 El reservorio y la fuente de infección

La infección es generalmente introducida a *Mycoplasma bovis* en rebaños libres de terneros clínicamente sanos o ganado joven derramando *M. bovis*. Su aparición en algunas granjas con enfermedad respiratoria baja, puede dar lugar a una mayor morbilidad y mortalidad. Vacas infectadas liberan *Mycoplasma bovis* a través de las vías respiratorias, durante muchos meses e incluso años, actúan como reservorios de la infección. Los animales se infectan a través de las vías respiratorias, el canal del pezón o en el tracto genital, la inseminación artificial con semen infectado es otra ruta común (Nicholas y Ayling, 2003; Tenk, 2005).

Vacas clínicamente sanas también liberan *Mycoplasma bovis* a través de la leche. El tracto genital de los dos animales machos y hembras también pueden ser fuentes de infección. Además, las personas infectadas con micoplasma pueden sufrir de una enfermedad respiratoria grave, lo que sugiere que las personas que trabajan con el ganado pueden ser portadores activos **(Tenk, 2005)**.

Una vez establecidos en un rebaño, la mastitis en la producción de ganado lechero, el organismo persiste y puede llegar a ser endémica **(Jasper 1987; Garg, 2009)**. La mayoría de la transmisión de una infección por micoplasma en los rebaños de ordeño se produce en el tiempo a través de fómites tales como máquinas de ordeño, pezoneras y manos de los ordeñadores **(Jasper 1982; Gabinaitiene et al., 2011a)**. Teniendo en cuenta la resistencia relativa alta de los micoplasmas, bajo ciertas condiciones ambientales partículas de polvo contaminadas, la basura, las herramientas y la ropa de los empleados no pueden ser ignoradas en la difusión de la infección **(Tenk, 2005)**.

2.8 Importancia económica

Mycoplasma bovis es un importante problema de salud del ganado en todo el mundo. Que inflige pérdidas financieras considerables en los hatos de carne y es la causa más común de mortalidad en el ganado lechero, produciendo una variedad de enfermedades clínicas **(Clothier et al., 2010; Gabinaitiene et al., 2011b)**.

Los costos de la enfermedad por micoplasma incluyen una producción reducida, los medicamentos y la mano de obra para el tratamiento, mortandad y las pérdidas por sacrificio, la aplicación de medidas de diagnóstico y control, y una parte del costo de las medidas - no-patógenas-preventivas específicas **(Maunsell et al., 2011)**.

La importancia económica de *M. bovis* no pueden ser medidos con precisión en la actualidad, debido a los signos clínicos no son específicos, algunas formas de las lesiones pulmonares no son fáciles de distinguir de los causados por otras bacterias, y estrategias efectivas de *M. bovis*

específicos preventivos o terapéuticos no están disponibles (**Caswell et al., 2010**).

2.9 Transmisión de la enfermedad

Los terneros jóvenes pueden adquirir *M. bovis* por la ingestión de leche contaminada o, probablemente, por la transmisión directa o indirecta de los terneros que arrojan *M. bovis* en las secreciones nasales, la infección aerógena es causada por inhalación de las pequeñas gotas de aerosoles, que son liberadas por la tos de los animales infectados producidos durante bronconeumonía. Después de la aparición de la enfermedad respiratoria la infección se propaga rápidamente en el hato (**Tenk, 2005; Maunsell et al., 2009**).

Por lo tanto, la introducción de animales infectados latentes es un medio de transmisión entre granjas. Movimientos más frecuentes entre los rebaños de animales y de los países representan un riesgo adicional significativo (**Thomas et al, 2003a**).

Durante las últimas décadas se ha extendido a numerosos países con el transporte. El semen infectado ha sido sospechoso de ser un medio de difusión nacional e internacional de estos organismos. *Mycoplasma bovis* en el semen pueden sobrevivir algunos tratamientos con antibióticos, los diluyentes de semen y el almacenamiento de congelación de pajuelas de IA (**Jasper, 1987; Tenk, 2005**).

El tracto genital masculino se infecta por el medio ambiente contaminado o por contacto directo de otros animales derramando *M. bovis*. El organismo puede llegar a los órganos genitales internos intracanaliculares del prepucio. De esta manera puede causar orquitis, vesiculitis, disminución de la calidad del semen y, por consiguiente derramamiento en el semen (**Kreusel et al., 1989**).

El moco nasal de otros terneros o vacas afectadas es un factor importante en la propagación horizontal de *M. bovis*. El organismo sigue siendo infeccioso en el tracto respiratorio y puede transmitirse a la siguiente generación. Un estudio de campo demostró que después de la aparición de *M. bovis* en el fluido nasal de los terneros jóvenes que anteriormente se habían infectado a

partir de leche con mastitis de sus madres se había extendido rápidamente entre los animales jóvenes de diferentes edades. La infección causa también títulos elevados de anticuerpos. Más tarde, durante la gestación de novillas *M. bovis* "Desaparecidos", no puedan ser aislados de muestras clínicas. Más tarde, después del parto el agente infeccioso puede ser recuperado a partir de muestras diferentes, como el líquido amniótico, el endometrio de los animales sacrificados y los fetos, etc., lo que sugiere la difusión hematogena y la extensión vertical de la infección a los fetos y crías a través de los órganos genitales. Aparentemente *M. bovis* sigue siendo virulento lo largo de este ciclo de transmisión, aunque una enfermedad clínica no siempre se puede ver. (Pfützner y Sachse, 1996).

2.10 El diagnóstico de *Mycoplasma bovis*

El diagnóstico rápido de la infección por *M. bovis* es importante para la prevención y el control efectivo de la enfermedad, pero el diagnóstico por el cultivo es a la vez lento y complejo ya que requiere medios y condiciones especiales y de 3-10 días para que *M. bovis* produzca colonias visibles, aunque existen las pruebas de detección molecular que pueden acelerar el diagnóstico y permitir una mejor evaluación de la prevalencia (Cai *et al.*, 2005; Nuñez *et al.*, 2008; Nicholas *et al.*, 2008; Clothier *et al.*, 2010).

La rápida detección de los animales que hayan estado en contacto con el patógeno es un paso crucial que requiere métodos de diagnóstico sensible y específico (Brank *et al.*, 1999).

En la actualidad existen otras técnicas de diagnóstico: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), hibridación in situ. Asimismo, hay técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar antígenos y anticuerpos contra *M. bovis* (Nuñez *et al.*, 2008).

2.11 Técnicas de diagnóstico

2.11.1 Técnica de ELISA y PCR

Las pruebas de ELISA son útiles métodos de diagnóstico, pero sólo con fines de detección **(Pfützner y Sachse, 1996)**. Hay pruebas disponibles en el mercado con antígenos mixtos con el fin de minimizar las reacciones de falsos negativos debido a la variabilidad antigénica de *Mycoplasma bovis* **(Le Grand et al., 2002)**. Las pruebas ELISA realizado a partir de leche también se puede aplicar en el examen de los brotes de mastitis **(Byrne et al, 2000)**.

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 **(Sacase et al., 1993; Le Grand et al., 2002)**. Existen paquetes comerciales de la técnica de ELISA que utilizan antígenos de proteínas variables de superficie (PVS), en particular la proteína variable de superficie "A" (PVSA), que es específica para toda infección provocada por *M. Bovis* **(Brank et al., 1999)**. La prueba detecta anticuerpos de los 13 a los 720 días postinfección. La especificidad no revela reactividad cruzada con sueros hiperinmunes de otras especies de micoplasma, excepto una pequeña reacción con *mycoplasma arginini* **(Le Grand et al., 1999)**. Con reactivos comerciales de ELISA para detectar anticuerpos en contra de otras especies de micoplasma, se ha observado sensibilidad de 96% y especificidad de 98% **(Nava, 1987)**.

La identificación mediante PCR es altamente sensible, específica y rápida; sin embargo, se requiere de equipo y de personal especializado, además de que el costo por muestra es más elevado **(Barajas et al, 1993)**, por lo que las condiciones que presentan los laboratorios de diagnósticos en el país permiten instrumentar con mayor facilidad la prueba de ELISA **(Nuñez et al., 2008)**.

Los métodos serológicos, el uso de antiespecie antisuero policlonal de conejo en las pruebas de inhibición del crecimiento y pruebas fluorescentes siguen siendo

los métodos más utilizados para la identificación de muchos micoplasmas, pero las pruebas moleculares están ayudando a reducir el número de pruebas serológicas necesarias y acelerar en gran medida el diagnóstico. No es práctico para un laboratorio de pruebas de PCR para cada una de las 102 especies de *Mycoplasma*, y secuenciación del ADN ribosomal 16S (ADNr) sigue siendo caro, y los métodos tradicionales por lo tanto, se siguen utilizando. Sin embargo, se prevé que en un futuro próximo la tecnología molecular futura se utilizará no sólo para identificar especies de *Mycoplasma*, sino también para detectar sin la necesidad del cultivo (McAuliffe et al., 2003).

2.12 Asociación con otros patógenos

Mycoplasma bovis juega un papel importante que predispone a las enfermedades respiratorias en el ganado y se encuentra a menudo con otros patógenos bacterianos, tales como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* y los virus respiratorios: *Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV)*, el virus *Parainfluenza 3 (PI3)*, *Virus del Herpes Bovino 1 (BHV1)*, *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)* y *Virus de la Enfermedad Viral Bovina (DVB)*, pero a menudo es el único agente patógeno y, en ocasiones causa una alta mortalidad (Ayling et al., 2004; Nicholas et al., 2008).

En la mayoría de los casos, los desenlaces fatales se deben precisamente a la coinfección con estos patógenos y una vez establecida en un hato de terneras de ganado lechero, la infección frecuentemente toma un curso prolongado y crónico y se dificulta su control (García et al., 2006).

La mayoría de las veces dos o más de estos patógenos (*M. haemolytica* serotipo A, *P. multocida* e *H. somni*) pueden ser aislados de los pulmones neumónicos implicados con mayor frecuencia en la neumonía enzoótica de la ternera. *Arcanobacterium pyogenes* se aísla con frecuencia de abscesos pulmonares en los casos de neumonía crónica. Por lo general estas bacterias se limitan a las vías respiratorias superiores, y se encuentran en

las criptas de las amígdalas son difíciles de aislar de ganado sano **(Nicholas et al., 2008)**.

Además, las infecciones mixtas se pueden producir en el ganado, y muchos micoplasmas pueden estar presentes como parte de la flora normal. Por lo tanto, cada especie de *micoplasma* potencialmente involucrados debe ser investigada individualmente con métodos dedicados bioquímicos, inmunológicos o moleculares **(Alberti, 2006)**.

Los efectos de otros agentes patógenos, tales como gusano pulmonar y otros parásitos no deben pasarse por alto **(Nicholas et al., 2008)**.

2.13 Patogenia y factores de virulencia

Varias características importantes de la biología de los micoplasmas son de importancia clínica: el pequeño tamaño de su genoma confiere una confianza en el animal huésped para varias necesidades metabólicas, la presencia de una membrana celular, pero la ausencia de una pared celular hace a los micoplasmas insensibles a los β -lactámicos, y debido a una supervivencia limitada en el medio ambiente, la transmisión se considera que es principalmente por contacto directo con animales infectados **(Razin et al., 1998)**.

Mycoplasma bovis sobrevive varios días en el medio ambiente, pero esto no es considerado como una importante fuente de infección **(Caswell et al., 2010)**. Sin embargo, la mayoría de las infecciones por *Mycoplasma bovis* en el ganado de engorda se cree que se adquiere por el contacto con las secreciones nasales de terneros infectados, y hay pruebas limitadas que el estrés o el transporte realzan el vertimiento de *Mycoplasma bovis* en secreciones nasales **(Caswell y Archambault, 2007)**.

Mycoplasma bovis es capaz de adherirse a las células huésped, evadir la respuesta inmune, e hiriendo a los tejidos del huésped, y algunos de los factores de virulencia responsables de estos procesos son conocidos. *M. bovis* pueden adherirse a las células epiteliales traqueobronquiales de la especie bovina,

lo que probablemente facilita la colonización de los pulmones (**Caswell et al., 2010**).

Las lipoproteínas variables de superficie son los mejor caracterizados factores de virulencia de *Mycoplasma bovis*. Son una familia de antígenos de superficie inmunodominantes que contribuyen a la variabilidad fenotípica de las bacterias, juegan un papel importante en la adherencia de bacterias a las células huésped y la evasión de la unión de los anticuerpos, y proporcionar un modelo fascinante para entender la regulación de la expresión de proteínas en las bacterias. En *Mycoplasma bovis*, cinco proteínas PVS han sido identificados: PvsA, PvsB, PvsC, PvsF y PvsO (**Sachse et al., 2000**).

La adhesión de *Mycoplasma bovis* a las células huésped se debe en parte mediados por proteínas variables de superficie (Pvs), una familia de lipoproteínas en la superficie bacteriana, y las proteínas relacionadas, incluyendo pMB67 y p26 (**Sachse et al., 1996; Thomas et al., 2003b**).

Un sistema genético complejo determina cuales de las cinco Pvs es expresado o no en un momento dado, y modifica el tamaño y la antigenicidad de la proteína expresada. Los patrones resultantes de Pvs en la superficie de la bacteria probablemente permiten que *M. bovis* se adapte a diferentes condiciones en el microambiente del anfitrión y se adhieren de diferentes formas a la célula anfitriona (**Sachse et al., 2000; Lysnyansky et al., 2001**).

Las Pvs representan los componentes que principalmente provocan las especies bovina respuesta inmune humoral en el ganado después de la infección natural o experimental con *M. bovis*, independientemente de las manifestaciones clínicas, la ubicación geográfica y el origen del agente, el modo de infección, y la historia del animal (**Brank et al., 1999**).

La infección provoca una respuesta inmune fuerte, y la evasión de las defensas inmunitarias es necesaria para *M. bovis* para colonizar crónicamente al pulmón y diseminarse a las articulaciones. Después de la infección natural, los terneros desarrollan el IgM e IgG específico en suero, y mayores niveles de IgA en la nariz y los fluidos pulmonares (**Boothby, 1966-1988**).

IgM específico de *Mycoplasma bovis* es detectable por 7 días y máximo de 14 días después de la infección experimental, pero los títulos totales de anticuerpos séricos específicos seguirán aumentando durante 63 días después de la infección (**Vanden y Rosenbusch, 2003**).

A diferencia de *Mycoplasma dispar* que se localiza en la superficie de las células epiteliales *M. bovis* es capaz de invadir el epitelio traqueo bronquial y se multiplican allí. Esto ha sido demostrado tanto por estudios in vitro de los anillos traqueales e in vivo en forma natural y animales infectados experimentalmente (**Howard et al., 1987**).

Mycoplasma bovis penetra a través del epitelio respiratorio en el espacio intracelular (**Howard et al., 1987, Rodríguez et al., 1996a**), esto permite a los *micoplasmas* una larga persistencia, y para evadir el sistema inmune del huésped en las infecciones crónicas (**Rodríguez et al., 1996a**).

M. bovis es capaz de cambiar rápidamente su estructura antigénica de encendido y apagado de las lipoproteínas de cierta superficie. Esta dinámica hipervariabilidad antigénica causa problemas importantes en las aplicaciones de ciertas pruebas de diagnóstico y producción de vacunas (**Behrens et al., 1994**). Este tipo de extrema variabilidad se observa entre los aislamientos de diferentes procesos patológicos o lugares (**Behrens et al., 1994; Poumarat et al., 1994**).

2.14 Signos clínicos y alteraciones patológicas asociadas a la infección por *Mycoplasma bovis*.

2.14.1 Signos clínicos

Los signos de la infección no son específicos. De acuerdo con las observaciones de Stipkovits y col (2000) los signos de infección, como fiebre, depresión, pérdida de apetito, bomboventilación, disnea, secreción nasal y tos seca, se reconoce ya en el 5 ° día de edad por terneros recién nacidos. La enfermedad se propaga rápidamente por todo el rebaño, que se puede

ver por el aumento rápido del número de animales con signos clínicos. Estos signos no se alivian con la administración de los clásicos compuestos antibacterianos, como la penicilina o gentamicina **(Tenk, 2005)**. Algunos observadores también consideran los ojos llorosos oreja caída y la artritis como características principales en esta enfermedad **(Nicholas et al., 2008)**.

Se cree generalmente que los indicadores más sensibles y específicos de bronconeumonía son la depresión, la falta de llenado ruminal, fiebre (generalmente más de 40 ° C/104 ° F), y la ausencia de signos atribuibles a otros sistemas del cuerpo de las vías respiratorias **(Caswell et al., 2010)**.

Neumonía crónica y polisinovitis causada por *M. bovis* se ha convertido en un problema creciente en el ganado vacuno de engorda en el norte de América, que se caracteriza por la falta de respuesta al tratamiento con antibióticos y frecuentes enfermedades respiratorias recurrentes **(Gagea et al., 2006a)**.

2.14.2 Lesiones

Bronconeumonía crónica caseonecrotica con o sin la artritis es la lesión que es más fiable que se sabe por *M. bovis*. Por lo general, las lesiones se distribuyen en las áreas craneoventral del pulmón, con preservación relativa de los aspectos caudal y dorsal de los lóbulos caudales. Las lesiones suelen ser bilaterales, y varían mucho en su medida del 20% al 90% del tejido pulmonar total **(Caswell et al., 2010)**.

La evidencia de que *M. bovis* causa bronconeumonía caseonecrotica es convincente: *M. bovis* se pueden identificar en casi todos los pulmones con este tipo de lesiones, el antígeno de *M. bovis* está estrechamente relacionado con la lesión caseonecrotica, siendo visible en el borde de dicha focos mediante inmunohistoquímica **(Gagea et al., 2006a)**.

López y col. (1986) describieron las lesiones pulmonares característicos de *Mycoplasma bovis* infección tan severa hiperplasia linfoide peribronquial con exudación leve de los neutrófilos y macrófagos en las partes craneoventral de los pulmones **(Tenk, 2005)**.

Las lesiones producidas por *Mycoplasma bovis* solo se han descrito como áreas focales de necrosis coagulativa rodeadas por las células mononucleares y

bronquiolitis supurativa con diferentes grados de hiperplasia linforreticular (**Adegboye et al., 1995**).

En casos graves, estos focos forman nódulos que son visibles desde la superficie pleural, lesiones más leves sólo se detectan cuando una sección de corte de pulmón se examina. Focos de este tipo suelen ser redondas, se fusionan, bien delimitados, blancos, y varían de identificar a varios centímetros de diámetro. La característica principal es la naturaleza friable caseosa de las lesiones, el contenido es seco y quebradizo cuando es manipulado con un cuchillo (**Caswell et al., 2010**).

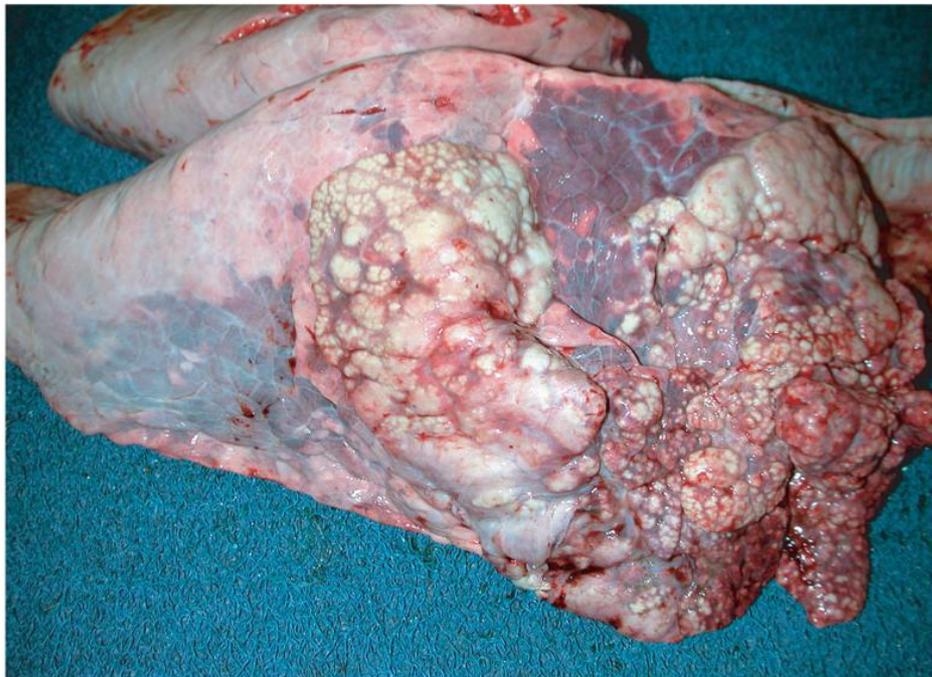


Figura 2. Neumonía por *Mycoplasma bovis*. Los nódulos blancos multifocales están presentes en las áreas craneoventral del pulmón, y el tejido intermedio en estas áreas es atelectásico y enrojecido (**Gagea et al., 2006a**).

Figura 3. Bronconeumonía caseonecrotica con formación de secuestro (Caswell *et al.*, 2010)

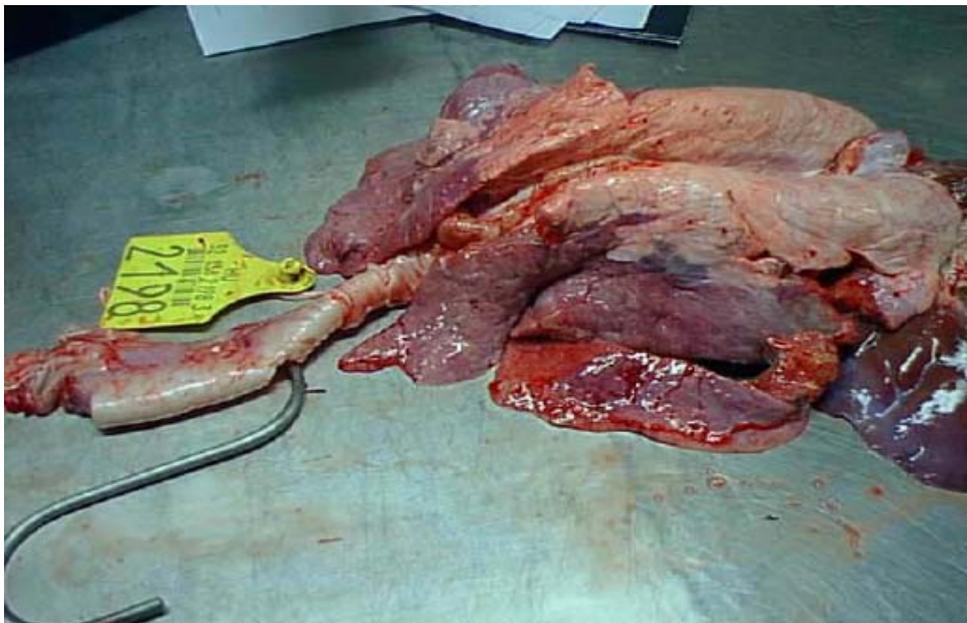


Figura 4. Lesiones en pulmón de ternero desafiado con *M. bovis* (Tenk, 2005).

En algunos casos, las lesiones caseonecroticas de la infección por *M. bovis* puede evolucionar a partir de las lesiones que fueron iniciadas por *Manheimia haemolytica* (Caswell *et al.*, 2010).

2.15 Enfermedades del aparato respiratorio

Una variedad de virus, bacterias típicas, y los micoplasmas están asociados con la neumonía de los terneros alojados, y estos agentes probablemente interactúan para producir lesiones más graves que las que se producen por una sola entidad **(Howard, 1983)**.

Enfermedad del tracto respiratorio de bovinos es una enfermedad compleja multifactorial y ha sido uno de los problemas más graves debido a su alta mortalidad y pérdidas económicas en los terneros **(Hanaa et al., 2010)**.

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

Mycoplasma bovis es un agente causal importante de neumonías en bovinos de muchas partes del mundo, histológicamente causa bronconeumonía supurativa con hiperplasia linfoideperibronquiolar y focos de necrosis por coagulación, rodeados de macrófagos, neutrófilos y células plasmáticas y polimorfonucleares (PMN) **(Adegboye et al., 1995)**. También se ha aislado del tracto respiratorio de la cabra donde causa neumonías **(Da Masa et al., 1992)**.

2.16 Neumonía producida por *Mycoplasma bovis*

Neumonía del ternero sigue siendo un problema significativo para la industria ganadera, tanto en términos económicos y de bienestar, y su control sigue siendo un tema de vital importancia para los veterinarios y los agricultores **(Gibbs, 2001)**.

Se caracteriza por ser más invasivo y destructivo que otros micoplasmas aislados de casos de neumonía enzoótica bovina, afecta generalmente terneros de 1-3 meses, usualmente requiere además de la interacción de otros organismos bacterianos y víricos que participan en la neumonía enzoótica y factores medioambientales para causar la enfermedad clínica **(Dungworth, 1993)**.

El agente se localiza en relación a la superficie del epitelio de bronquiolos y vías respiratorias terminales. Las vías respiratorias pierden el epitelio, se produce un infiltrado inflamatorio necrótico intraluminal que finalmente acaba implicando el parénquima pulmonar. Es posible localizar *M. bovis* en tejido pulmonar utilizando la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), el cual se observa especialmente en la periferia de los centros de necrosis (Adegboye *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1996 b).

En el caso de las cabras se ha aislado del tracto respiratorio, donde causa bronquiolitis catarral o neumonía broncointersticial leve, subaguda a crónica con hiperplasia linfoide peribronquiolar. Aunque el aislamiento de *M. bovis* no es frecuente en las cabras, la leche bovina se usa frecuentemente como suplemento en la alimentación de cabritos, lo que provee una oportunidad para la colonización de la boca, orofaringe, tráquea y posteriormente pulmón (Da Massa *et al.*, 1992).



Figura 5. Secreción nasal inducida por desafío experimental del ternero *con M. bovis* (Tenk, 2005).



Figura 6. Ternera enferma 17 días después del desafío con *M. bovis* (Tenk, 2005).

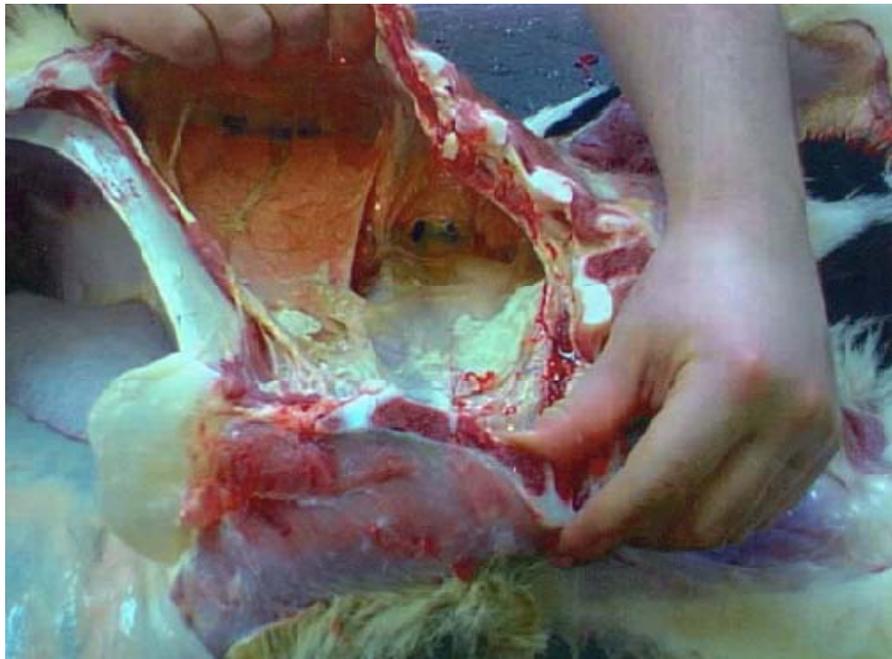


Figura 7. Pleuritis fibrinosa masiva en un ternero desafiado con *M. bovis* (Tenk, 2005).

2.17 Mastitis producida por *Mycoplasma bovis*

El origen y la propagación de la infección en los brotes no están completamente aclarados, se sabe que la mastitis por *micoplasma* se disemina de vaca a vaca proveniente de animales que transportan al germen **(Hernández y Jaramillo 1994; Fox et al., 2005)**.

Los casos de mastitis por micoplasma suelen tener las siguientes características. Que no responden a los antibióticos y medicamentos anti-inflamatorios y hay una disminución de la producción de leche en las vacas recuperadas **(Nicholas et al., 2008)**

La infección ocurre durante el ordeño y las vacas portadoras pueden introducir infecciones en rebaños no infectados. El sistema respiratorio es a menudo involucrado así como el aparato reproductor **(Jasper, 1987)**.

La ubre se infecta a través del canal del pezón. Además de la barrera de protección débil de la canal del pezón otros factores, por lo general contribuyen a la infección, tales como la alta densidad de población y las malas condiciones de higiene o alimentación. El proceso de ordeño hace posible a los micoplasmas a invadir el canal del pezón. Debido a los factores mencionados contribuyen a la mastitis por *M. bovis* sea más frecuente en los rebaños lecheros grandes **(Thomas et al., 1981)**.

Las vacas afectadas por mastitis por *Mycoplasma bovis* arrojan un gran número de *micoplasmas* (105 a 108 UFC / ml), pero significativo, el derramamiento por lo general se produce antes de que los signos clínicos aparezcan (103-106 UFC / ml). De esta manera los derramadores sanos no identificados son los más peligrosos en la difusión del organismo. Tomando estos hechos en cuenta las superficies de las máquinas de ordeño, trapos de limpieza, las manos de los ordeñadores y el reflujo de la leche de las vacas vecinas desempeñan un papel importante en la transmisión de *M. bovis*. Rara vez la transmisión de *M. bovis* también se produce por la aplicación inadecuada intracisternal de medicamentos anti-mastitis **(Pfützner y Sachse, 1996)**.

Figura 8. Agrandamiento de los ganglios linfáticos supramamarios en una vaca con mastitis causada por *Mycoplasma bovis* (Burgt *et al.*, 2008)

La buena noticia es que la infección por micoplasma en un hato puede ser erradicada. El cultivo de todos los casos de mastitis clínica y de las muestras mensuales de leche de tanque, debe proporcionar un alerta precoz de las infecciones nuevas o pérdidas con el fin de evitar brotes graves de nuevo en rebaños o zonas donde la mastitis por micoplasma ha sido un problema (Jasper, 1987).

2.18 Artritis asociada a *Mycoplasma bovis*

La artritis asociada con la infección por *M. bovis* puede ser una secuela a cualquiera de la forma respiratoria o mastitis de la enfermedad (Pfützner, 1990).

Figura 9. Artritis en un ternero infectado (Tenk, 2005).

Las articulaciones de los terneros se ven afectadas por la propagación hematógica de los micoplasmas. Esto ocurre generalmente cuando la tasa de neumonía por micoplasma es alta entre los terneros o mastitis en las vacas es la alta, y el patógeno se derrama en un elevado número (Romváry *et al.*, 1977).



Figura 10. La artritis frecuentemente se desarrolla en las compras de animales después de un mes de introducción al hato (Nicholas *et al.*, 2008).

2.19 Aislamiento y cultivo de *Mycoplasma bovis*

Además, el aislamiento de *M. bovis* de los pulmones puede ser difícil, particularmente en animales con infección crónica por el tratamiento con antibióticos, autólisis, o la contaminación bacteriana grave puede inhibir el aislamiento **(Cai et al., 2005)**. Para su crecimiento se utilizan medios adicionados de proteínas y complejos nutrimentales, también se utiliza penicilina y acetato de talio como inhibidores de bacterias contaminantes **(Quinn et al., 2002; Nuñez et al., 2008)**.

Mycoplasma bovis se puede recuperar de muestras nasales o lavado broncoalveolar (BAL) de líquido de muchos en situación de riesgo, pero también de terneros sanos. Este hecho complica cualquier intento de asociar la infección con una forma particular de la enfermedad, porque la mera presencia de *M. bovis* en una muestra clínica no indica que está causando la enfermedad observada. En cambio, las observaciones que sugieren que el *M. bovis* causa una forma particular de neumonía incluyen: (1) demostrar los mismos síntomas clínicos y las lesiones en terneros desafiados experimentalmente, (2) aislamiento de *M. bovis* y falta de aislamiento de otros patógenos de origen natural de los casos que no había recibido tratamiento con antibióticos, (3) encontrando una prevalencia diferente de la infección en terneros con y sin la condición de la enfermedad, y (4) la asociación de la concentración o ubicación microscópica del agente infeccioso con la lesión característica **(Caswell et al., 2010)**.

Hay informes en los que señalan el aislamiento de *M. bovis* a partir de lesiones cerebrales y de corazón de los bovinos que manifiestan signos neurológicos y otitis en el Reino Unido e Irlanda sugieren un papel aún mayor en la enfermedad de lo que se pensaba por lo tanto se sugiere que se incluya *M. bovis* en su lista de posibles diagnósticos diferenciales en casos similares **(Ayling et al., 2005)**.

2.20 Tratamiento

El diagnóstico efectivo de *M. bovis* puede ser útil en la selección de medicamentos antimicrobianos que pueden ayudar en el control de la enfermedad. Sin embargo, durante los últimos diez años la evidencia se ha acumulado que *M. bovis* se está volviendo resistente a los medicamentos antimicrobianos, como las tetraciclinas, espectinomicina y tilmicosina, que previamente han sido eficaces **(Ayling et al., 2000 (a); Thomas et al., 2003)**.

A menudo, los terneros son tratados inicialmente como un caso de rutina de *Enfermedad Respiratoria Bovina Indiferenciada (UBRD)* pero no responden o sufren recaídas repetidas, momento en que uno comienza a sospechar de la participación de *Mycoplasma bovis*. Muchos casos de UBRD parecen responder a la terapia sino que desarrollan cojera con o sin reaparición del componente respiratorio de la enfermedad. La cojera generalmente se puede atribuir a la hinchazón y el dolor en una o más articulaciones, generalmente la rodilla, corvejón, el carpo o el codo. Otras articulaciones afectadas, como la cadera, pueden no ser evidentes hasta la necropsia **(Caswell et al., 2010)**.

2.21 Medidas preventivas y control

Como el tratamiento no es satisfactorio. En el caso de la mastitis el control depende de aislamiento de los animales infectados. A veces, se puede aconsejar el sacrificio **(Jasper, 1987; Nicholas et al., 2006)**. En casos de neumonía, una vez infectados, sobre todo en distintas edades, se hace extremadamente difícil de eliminar del organismo, y al no haber una vacuna eficaz para *M. bovis*, su control depende de una mezcla de prácticas agrícolas de cría habituales, tales como la reducción de la carga ganadera, mejora la ventilación, la quimioterapia y la separación de diferentes grupos de edad puede aliviar la enfermedad **(Ayling et al., 2000; Ayling et al., 2006)**. Como recomendación general La leche no pasteurizada no se debe alimentar a los terneros. Detección a través de cultivo de bacterias y/o serología de los animales recién adquiridos podrían contribuir a evitar que *M. bovis* entre en un hato negativo **(Gevaert, 2010)**.

Mycoplasma bovis asociada con la enfermedad también es importante desde el punto de vista del bienestar animal, ya que a menudo resulta en crías

que están sujetos a una enfermedad grave, para la cual el productor o el veterinario sólo puede proporcionar un alivio limitado; dado que la enfermedad se asocia a menudo crónica y mala respuesta al tratamiento. Por tanto, existe una gran necesidad de desarrollar mejores estrategias de prevención y tratamiento de *Mycoplasma bovis* asociada a la enfermedad (**Maunsell et al., 2009; Maunsell et al., 2011**).

Los ensayos que evalúan la presencia de anticuerpos anti-*M. bovis* anticuerpos circulantes ofrecen una alternativa mejor, ya que pueden identificar a los animales que han sido infectados en un rebaño grande incluso en la ausencia de organismos de vertimiento (**Brank, 1999**).

3. JUSTIFICACIÓN.

La finalidad de la presente investigación es dar a conocer de una manera amplia, la importancia de la micoplasmosis, en donde se encuentra y como llega a convertirse en un problema de importancia clínica y económica, tomando en cuenta los conocimientos más actualizados de la misma, lo cual ayudará a desarrollar medidas efectivas para la prevención y el control.

Debe ser tomada en cuenta como causa importante de daño a la salud en establos lecheros grandes donde causa mastitis, neumonía, otitis media y artritis pero más específicos en corrales de engorda donde se cree que este agente causa mayores problemas de salud de tipo respiratorio; tener a la mano conocimientos que nos permitan un mayor control y esto reside en la prevención ya que los tratamientos con antimicrobianos y el incansable trabajo por el desarrollo de una vacuna eficaz contra todas las cepas de *Mycoplasma bovis* a la fecha no son efectivos

La enfermedad, en primer lugar es difícil de diagnosticar y en segundo lugar difícil de eliminar, beneficia tanto a los profesionales y ganaderos de la Comarca Lagunera tanto de bovinos de leche como de carne, acciones como la toma muestras sanguíneas, para saber si su hato a tenido contacto con el microorganismo y entender las relaciones básicas que predisponen a problemas de enfermedades clínicas en los hatos, lo cual es muy útil cuando se piensa como prevenir, controlar o erradicar un problema específico como lo es *M. bovis*. Además, se deberán examinar a detalle las ventajas e inconvenientes de los métodos de diagnóstico utilizados actualmente para esta enfermedad.

4. OBJETIVOS

a) Objetivo General

Identificar anticuerpos contra *Mycoplasma bovis* en becerras Holstein, sanas y enfermas de neumonía y otitis.

Específico

Utilizar un Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas para identificar anticuerpos en muestras de suero de becerras Holstein lactantes, sanas y con diagnóstico clínico de neumonía y otitis.

5. HIPOTESIS

Las becerras Holstein de hatos lecheros de la Comarca Lagunera, sanas y con signos clínicos de otitis y neumonía, presentan anticuerpos contra *Mycoplasma bovis*.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Marco de Referencia

La Comarca Lagunera conforma la novena área metropolitana de México; está localizada al norte-centro de México, entre el suroeste de Coahuila y el noreste de Durango. Debe su nombre a los cuerpos de agua, es decir, a las anteriormente existentes trece lagunas en el área, entre las que estaba la Laguna de Mayrán, la más grande de Latinoamérica, que se alimentaba por dos ríos, el Nazas y el Aguanaval, hasta antes de la construcción de las presas Lázaro Cárdenas y Francisco Zarco, que en la actualidad regulan su afluente por lo que las lagunas han desaparecido. (Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Comarca_Lagunera consultado el 18 de noviembre 2011).

La Laguna está conformada por dieciséis municipios, 11 del estado de Durango y 5 del estado de Coahuila, encabezando por su importancia el de Gómez palacio y Lerdo en Durango y San Pedro de las Colonias y Francisco I. Madero en Coahuila.

(Fuente: <http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php> consultado 30 de Enero 2012)

Comarca Lagunera de Durango
1.- Gómez Palacio.
2.- Lerdo.
3.- Tlahualilo de Zaragoza.
4.- Mapimí.
5.- San Pedro del Gallo.
6.- San Luis Cordero.
7.- Rodeo.
8.- Nazas.
9.- Cuencamé de Ceniceros.
10.- General Simón Bolívar.
11.- San Juan de Guadalupe.

Figura 11. Comarca lagunera de Durango.

Comarca Lagunera de Coahuila

- 1.- Torreón.
- 2.- Matamoros.
- 3.- San Pedro de las Colonias.
- 4.- Francisco I. Madero.
- 5.- Viesca.

Figura 12. Comarca lagunera de Coahuila

(Fuente: <http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php> consultado 30 de enero 2012).

Esta Región que se localiza, en llanuras y planicies a una altura promedio de 1,100 metros sobre el nivel del mar (msnm), circundadas por cadenas montañosas con altitudes de 2,800 a 3,700 msnm, cuenta predominantemente con zonas áridas y semiáridas, donde por razones climatológicas y orográficas se tiene de manera permanente un problema de baja o reducida disponibilidad de agua; en la cual el río Nazas juega el importante papel de abastecer de agua para el riego de las tierras y al no tener lluvias de temporal, por las características de la región, el afluente lagunero se vuelve clave para sus habitantes. (Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Comarca_Lagunera consultado el 18 de noviembre 2011).

La Comarca Lagunera es famosa por generar bienes de gran trascendencia, como lo fueron en su momento la producción de algodón y la uva. Actualmente La Laguna es principal cuenca lechera del país, así como sus productos ganaderos de reconocida calidad. (Fuente: <http://www.elsiglodetorreon.com.mx/lacomarca/p70> consultado el 18 de noviembre 2011).

6.2. Toma de muestras

El muestreo se llevó a cabo por conveniencia en 8 hatos lecheros de la Comarca Lagunera, ya que se consideraron solo hatos con trastornos clínicos de neumonía y otitis media en becerras lactantes. Las becerras tuvieron de 4 a 50

días de edad con un promedio de 30 días. Los hatos presentaron una población promedio de 175 becerras en jaulas.

Se tomaron 40 muestras de sangre sin anticoagulante, 21 de becerras aparentemente sanas y 19 de becerras clínicamente enfermas de neumonía y otitis, las muestras se transportaron en refrigeración a la Unidad de Diagnóstico. Se separó el suero centrifugando a 2500 rpm por 10 minutos y se conservó entre 2 a 4 °C hasta su estudio. Se practicó la técnica de ELISA indirecta para la identificación de anticuerpos específicos contra *M. bovis*, utilizando un paquete comercial (Biovet), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, que a continuación se describen.

6.3. Técnica de ELISA

6.3.1. Presentación. Esta es la prueba inmunoenzimática para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) en suero bovino. Los estudios epidemiológicos han revelado las propiedades de los patógenos de *M. bovis* en el ganado. *M. bovis* es uno de patógenos responsables de la mastitis en la vaca y la neumopatía en los becerros. *M. bovis* también está implicado en el aborto. El diagnóstico serológico 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.

6.3.2. Principios del test. Las muestras de suero bovino son diluidas e incubadas en pocillos recubiertos con antígenos (Ags) de *M. bovis*. Los anticuerpos (Acs) específicos a *M. bovis* en muestras de suero positivo se unen a los Ags en los pozos. Después de varios lavados y de eliminar sustancias no unidas el conjugado se le añaden Acs de la especie bovina. Después de la incubación, el exceso de este conjugado se elimina por un segundo lavado y es revelado con la adición 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 se lee la densidad óptica. Una muestra negativa una reacción débil (amarillo pálido). Todos los tonos de amarillo entre claro y oscuro representan distintos grados de positividad.

6.4. Materiales y reactivos:

- Agua purificada o destilada
- Micropipetas individuales de canales múltiples
- Gradilla de tubos
- Puntas de un solo uso
- Microplaca lavadora para ELISA
- Matraz (500ml) para la dilución sencilla.
- Espectrofotómetro Lector de ELISA
- Placa de microtitulación recubiertas con Ags de M. bovis, de 96-pocillos
- Control positivo listo para su uso (3 ml)
- Control negativo listo para su uso (3ml)
- Conjugado listo para su uso (12 ml)
- Solución de lavado concentrada* (10X) (75 ml)
- Sustrato listo para su uso (15 ml)
- Solución de paro listo para su uso (7.5ml)

* Se pueden formar cristales cuando la solución de lavado se mantiene a 4 ± 2 ° C. Esto no afectará a la eficacia del producto. Para utilizar esta solución, basta con tener a temperatura ambiente y los cristales se disolverán.

- **Microplaca:** Microplaca de 96 pocillos (12 tiras de 8 pocillos). Las columnas impares (1,3,5,7,9,11) están sensibilizadas por el antígeno recombinante y las columnas pares (2,4,6,8,10,12) por un patrón.
- **Solución de lavado:** Solución de lavado concentrado 10 veces (10X). La solución cristaliza espontáneamente en frío. En caso de utilizar parcialmente la solución, mantener el frasco a $21 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ de modo que desaparezcan todos los cristales, mezclar bien la

solución y extraer el volumen necesario. Diluir a 10 veces la solución amortiguadora en agua destilada o desmineralizada.

- **Conjugado:** Conjugado anti-inmunoglobulinas de bovino ligada a la peroxidasa (proteína G ligada a peroxidasa de rábano). Esta lista para su uso.
- **Suero positivo:** Suero positivo a *M. bovis*.
- **Suero negativo:** Suero negativo a *M. bovis*.
- **Solución de TMB monocomponente:** Cromógeno TMB (tetrametilbenzidina). Este reactivo se conserva entre +2°C y +8°C al abrigo de la luz. Esta listo para su uso.

Solución de interrupción: Solución de paro.

6.5. Precauciones de uso

- Esta prueba sólo puede ser utilizada para un diagnóstico “*in vitro*”. Es de uso exclusivamente veterinario.
- Los reactivos se deben conservar entre 2 y 8 °C. El suero positivo debe conservarse a -20 °C después de la reconstitución. Los reactivos no están garantizados si la fecha de caducidad ya ha pasado y/o no se han conservado en las condiciones descritas en este documento.
- La solución de lavado y la solución amortiguadora de dilución concentrados pueden ser almacenados a temperatura ambiente. Después de diluir, estas soluciones tienen una estabilidad de 6 semanas entre 2 y 8 °C.
- Las tiras de pocillos no utilizadas deben almacenarse en un sobre de aluminio, procurando que la bolsa de desecante esté bien seca y cierre herméticamente el sobre. Si estas precauciones se respetan, se preservará la actividad de las tiras de pocillos hasta la fecha de caducidad del kit.
- No utilizar reactivos que provengan de otros kits.
- Es importante velar por la calidad del agua utilizada para preparar las diversas soluciones del kit. Así mismo, no se debe utilizar agua que pueda contener agentes oxidantes (hipoclorito sódico) o sales de metales pesados, puesto que pueden reaccionar con el cromógeno.

- Descartar las soluciones contaminadas por bacterias u hongos.
- La solución de interrupción contiene ácido fosfórico 1 M. Manipular este producto con precaución.
 - Los materiales usados en este Kit deben ser considerados infecciosos. Por lo que todos los materiales deben ser descontaminados antes de ser desechados.
 - No mezclar los reactivos en diferentes lotes
 - Mantener los reactivos a temperatura $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y llevar a temperatura ambiente antes de usarla.

- Para garantizar la fiabilidad de los resultados, es importante seguir el protocolo. Se deberá respetar el tiempo y las temperaturas de incubación así como la precisión de los volúmenes y las diluciones.
 - No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
 - La sensibilidad y la especificidad de la prueba no se garantiza si los procedimientos no se llevaron correctamente.
 - No se recomienda poner la prueba con más de 6 bandas.
 - No exponer el sustrato o a algún agente oxidante. Siempre mantenga en el recipiente de plástico. Esta solución puede causar irritación en los ojos.

6.6. Procedimiento

a. Preparación de la solución de lavado

Después de la homogenización de la solución de lavado concentrada (que no se evidencien cristales) se diluyó 1/10 con agua destilada y se almacenó a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

b. Procedimiento para preparación de muestras y controles

Las muestras y controles se analizaron por duplicado.

Se diluyeron las muestras del suero bovino en la solución de lavado (1X) 1/20 utilizando una punta nueva para cada muestra. Se mezcló adecuadamente antes de ser distribuida en los pozos.

c. Procedimiento de la prueba

Los reactivos se pusieron a temperatura ambiente y se mezclaron manualmente antes de usarse.

1. Se hizo una representación esquemática de la placa con la distribución de los controles y las muestras.
2. Se depositaron 200 μ L del control positivo listo para su uso en los pocillos A1 y A2.
3. Se depositaron 200 μ L del control negativo listo para su uso en los pocillos B1 y B2.
4. Se depositaron 200 μ L de las muestras diluidas en los pocillos C1/C2, D1/D2, E1/E2, sucesivamente.
5. Se incubaron a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.
6. Se lavaron los pocillos cada uno 3 veces con 300 μ L de solución de lavado. Se tiró todo el contenido de la placa después del último lavado, y se secó la placa golpeando suavemente contra papel absorbente.
7. Se depositaron 100 μ L del conjugado listo para su uso por cada pocillo.
8. Se incubaron a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
9. Se lavaron los pocillos cada uno 3 veces con 300 μ L de solución de lavado. Se tiró todo el contenido de la placa después del último lavado, y se secó la placa golpeando suavemente contra papel absorbente.
10. Se depositaron 100 μ L de sustrato listo para su uso en cada pocillos.
11. Se Incubaron a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, en un lugar oscuro.
12. Se depositaron 50 μ L de solución de paro listo para su uso en cada pocillo.
13. Se midió la densidad óptica (OD) a 450 nm, antes de 15 minutos después de la adición de la solución de paro.

6.7. Cálculo de resultados

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

$$\frac{Me_{DO M}}{Me_{DO P}} = \text{Relación} = (S/P)$$

6.8. 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 0,300.
- La absorbancia media obtenida para el control positivo debe ser mayor o igual a 1,000.

6.9. Interpretación

- Si la proporción de la muestra es inferior a 0,300, se considera negativo
- Si la proporción de la muestra es mayor o igual 0,300, se considera positivo a la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma bovis*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los micoplasmas se asocian con algunas de las enfermedades económicamente más importantes y graves del ganado bovino (**Nicholás y Ayling 2003, Gagea et al., 2006 b**).

Uno de los micoplasmas patógenos más frecuentemente identificados en el ganado es *Mycoplasma bovis*, un comensal la vía aérea superior que no está en todas partes, pero se aísla a partir de muestras nasales de los terneros enfermos y no enfermos (Nicholás y Ayling 2003, Maunsell y Donovan 2009).

La técnica de ELISA para la identificación de anticuerpos específicos contra *Mycoplasma bovis* mostraron en este estudio 11/21 (52.38%) positivas, de las becerras aparentemente sanas, y 16/19 (84.21%) de las becerras clínicamente enfermas.

Los anticuerpos maternos pueden dar lugar a altos niveles de anticuerpos en terneros jóvenes, lo que normalmente disminuye durante los primeros meses de edad (**Maunsell y Donovan 2009**), por lo tanto puede haber anticuerpos en becerros lactantes. Es posible que en nuestro estudio, los resultados que muestran que alrededor del 50% son seropositivas, sean de origen materno.

En caso de los terneros lecheros, hay datos limitados sobre la prevalencia de *M. bovis*. En un estudio publicado hace 30 años, la prevalencia de *M. bovis* nasal en terneros lecheros de California, de hasta 8 meses de edad fue de 34% en los rebaños con *M. bovis* asociada con la enfermedad y el 6% en terneros no enfermos (**Benett y Jasper 1977**).

La detección de anticuerpos de *M. bovis* puede tener una aplicación importante epidemiológica y clínica, ya que puede ayudar a identificar los animales que han sido infectados en un rebaño grande, incluso en ausencia de identificación de los agentes patógenos (**Gabinaitiene et al., 2011**).

Estudios serológico y bacteriológicos de la cavidad nasal han mostrado que a los 110 días de edad, los becerros son más susceptibles a ser portadores de *M. bovis*. Esta propuesta está de acuerdo con las investigaciones de **Arcangioli et al., (2008)**, quienes encontraron que el 79% de los terneros clínicamente sanos eran portadores de *M. bovis*. El Ganado portador de *M. bovis* excreta micoplasmas en el medio ambiente con la secreción nasal durante meses o incluso años (**Gabinaitiene et al., 2011**). Por lo que la concentración de inmunoglobulinas séricas se mantiene elevada de algunos meses o años después de la infección por *M. bovis* (**Nicholas y Ayling 2003**), no obstante en el trabajo realizado en la Comarca Lagunera, encontramos alrededor del 84% de los becerros enfermos que fueron serológicamente positivos a *M. bovis*, este comportamiento nos puede indicar que los animales realmente estaban infectados por éste agente.

Le Grand y col., (2002) evaluaron la prevalencia de infección por *M. bovis* en Francia utilizando la técnica de ELISA, el estudio incluyó 824 hatos seleccionados al azar en 8 condados franceses y un total de 32,197 animales de más de un año de edad, su resultados concluyeron que la proporción de los rebaños que

contienen al menos un animal infectado oscilaron entre 28 a 90% dependiendo del condado. Estos resultados contrastan con los informes de **Nicholas y Ayling 2003** de que *M. bovis* es reportado en todo el mundo, y a menudo ocurren en 20 a 30 por ciento del ganado neumónico.

Hanzlicek et al., (2011) llevaron a cabo un estudio para determinar la prevalencia de portadores sanos de micoplasmas por medio de estudios serológicos y analizaron la seroconversión. Se muestrearon exudados nasales y suero los días 0, 10, 42. Los resultados mostraron que el día 0, el 90.4% de los terneros fueron positivos a los cultivos de mollicutes en exudados nasales. La prevalencia de *M. bovis* fue de 26.6% en el día 0 y el 98.42% en el día 42. El porcentaje de terneros seropositivos a *M. bovis* aumento durante el estudio, lo que indica la exposición seguida de una respuesta inmunológica en el organismo. Aunque las asociaciones con los resultados de salud no fueron identificadas, la seroconversión a *M. bovis* se asocio con una disminución de la tasa de aumento de peso durante el periodo de estudio.

La detección de micoplasmas en el moco nasal de los terneros enfermos y sanos puede indicar el papel de estas bacterias oportunistas. La relación huésped-parásito de los micoplasmas es un tema complejo, especialmente en las terneras, en la que el proceso de la enfermedad en las vías respiratorias no se entiende bien (**Marques et al., 2007**).

Estudios recientes indican que casi todos los terneros de vacas enfermas se infectan con el *M. bovis* (**Maunsell et al., 2009**). Varios estudios han investigado la prevalencia de la micoplasmosis, y *M. bovis* en las poblaciones de cría en los periodos de muestreo simple, pero muy pocos han explorado la asociación entre la prevalencia de estos organismos y la seroconversión en los terneros individuales en múltiples periodos de tiempo (**Yates et al., 1983, Marques et al., 2007**).

8. CONCLUSIONES

La micoplasmosis está presente en becerras lactantes de 4 a 50 días de edad, sanas y con enfermedades asociadas a neumonía y otitis.

La micoplasmosis en becerras lactantes se comporta de igual manera que en otros países, de acuerdo a las prevalencias reportadas por otros investigadores y en este reporte.

La técnica de ELISA es una herramienta muy útil y rápida para identificar *Mycoplasma bovis* en becerras lactantes, clínicamente enfermas de otitis y neumonía.

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 de *micoplasma* y por lo tanto indica que la bacteria ha estado presente en el hato.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adegboye, D.S., Halbur, P.G., Cavanaugh, D.L., Werdin, R.E., Chase, C.C.L, Miskimins, D.W. y Rosenbusch, R.F. (1995). Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis*-associated lung abscesses in calves. *J Vet Diagn Invest.* 7: 333-337.
2. Alberti A, Addis MF, Chessa B, et al. (2006) Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis, *J Vet Diagn Invest.*18:41–51.
3. Arcangioli MA, Duet A, Meyer G, Dernburg A, Bezille P, Poumarat F, Le Grand D (2008) The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Vet J* 177: 89-93.
4. Ayling, R. D., Baker, S. E., Peek, M. L., Simon, A. J., y Nicholas, R. A. (2000). Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Record*, 146, 745-747
5. Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., Wessells, J., Hogg, R. y Byrne W. (2005) Isolation of *Mycoplasma bovis* from the brain tissue of calves. *Veterinary Record*, 156, 391–392.
6. 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.
7. Barajas RJA, Riemann HP, Franti CE.(1993) Application of enzyme linked immunosorbent assay for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of Mexico. *Rev Sci Tech Off Epiz*;12:717-732.
8. Bennett, R. H. y Jasper, D. E. (1980). Bovine mycoplasmal mastitis from intramammary inoculations of small numbers of *Mycoplasma bovis*: local and systemic antibody response. *Am. J. Vet. Res.* 41, 889-892.
9. Behrens, A., Heller, M., Kirchhoff, H., Yogev, D., and Rosengarten, R. (1994). A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* 62, 5075-5084.
10. Bocklisch, H., Pfützner, H., Martin, J., Templin, G., y Kreusel, S. (1986). [*Mycoplasma bovis* abortion of cows following experimental infection]. *Arch. Exp. Veterinärmed.* 40, 48-55.
11. Boothby JT. (1966-1988) Dissertation Abstracts International B: Sciences and Engineering. Immunologic responses to *Mycoplasma bovis*. Ann Arbor: *University Microfilms*,44(1):49.

12. Boucher S., Blanchard A., Kemp I. (1999). Premières données sur l'isolement, l'identification et le pouvoir pathogène de deux souches de mycoplasmes (*Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma arginini*) isolés de poumons de lapins. 8e Journées de Recherche Cunicole Française, 21-24.
13. Blood, D.C., Radostitis, O.M. y Henderson, J.A. (1988). Enfermedades causadas por especies de *Mycoplasma*. *Medicina Veterinaria*. 756-771.
14. Brank M, Grand DL, Poumarat F, Bezille P, Rosengarten R, y Citti C. (1999). Development of a recombinant antigen of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*; 6:861-867.
15. Burgt Guda Van Der, Main William, Ayling Roger (2008). Bovine mastitis caused by *Mycoplasma bovis*, *Veterinary Record*, 163:666
16. Byrne W. J., Ball J. H., N. Brice, R. McCormack y S.E. Baker. (2000) Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Veterinary Record*, 146: 368-369.
17. Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF (2005). Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J Vet Diagn Invest*;17: 537-545.
18. Carreazo Pariasca Jimmy (2003). Pathophysiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections, *Paediatrica*, volumen 5, número 2, 101
19. Caswell, Jeff. L. y Archambault, M. (2007). *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Reviews* 8, 161-186
20. Caswell, Jeff L., Bateman Ken G., Hugh Y. Cai Ken Y., Castillo Alcalá Fernanda. (2010). *Mycoplasma bovis* in Respiratory Disease of Feedlot Cattle. *Vet. Clin. Food Anim.*, 26,365-379
21. Clothier Kristin A., Jordan Dianna M., Thompson Curtis J., Kinyon Joann M., Frana Timothy S., Strait Erin L., (2010). *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance, *J Vet Diagn Invest* 22:956-960
22. Delgadillo M. (1998). Infección por *Mycoplasma pneumoniae*. Estudio en 46 Pacientes pediátricos en el hospital La Victoria (Bogotá). *PEDIATRIA*, Volumen 33 N° 1, [http:// www.encolombia.com/infeccion_pediatria33-1.htm](http://www.encolombia.com/infeccion_pediatria33-1.htm) (Consulta: 27 junio 2011).
23. Da Massa, A.J., Wakenell, P.S. y Brooks, D.L. (1992). Mycoplasmas of goats and sheep. Review Article. *J Vet Diagn Invest*. 4: 101-113.

24. Dungworth, D.L. (1993). The Respiratory System. In Pathology of Domestic Animals. (Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. eds.). Fourth Edition. Academic Press, Inc. U.S.A. Vol II, Chapter 6, pp. 539- 699.
25. Fox L. K., Kirk J. H. y Britten A. (2005). Mycoplasma Mastitis: A Review of Transmission and Control, *J. Vet. Med. B* 52, 153–160
26. Gabinaitiene A., Siugzdaite J., Zilinskas H. (2011 a). Laboratory diagnosis of mycoplasma infection in young cattle, *Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 14, No. 1, 87-93*
27. Gabinaitiene A., Siugzdaite J., Zilinskas H., R. Siugzda R., Petkevicius S., (2011 b). *Mycoplasma bovis* and bacterial pathogens in the bovine respiratory tract, *Veterinary Medicine, 56, (1): 28–34*
28. Gagea , M.I., Bateman, K.G., Shamahan, R.A., van Dreumel, T., McEwen, B.J., Carmen, S., Archambault, M. and Caswell, J.L. (2006 a). Naturally occurring *Mycoplasma bovis* associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 18, 29–40.
29. Gagea, M.I ., Bateman, K. G., Van Dreumel, T., Mcewen, B. J., Carman, S., Archambault, M., Shanahan, R. A. & Caswell, J. L. (2006b) Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 18-28
30. García Luján Concepción, Castro Barraza Fernando y Martínez Romero Aurora (2006). Mastitis and Others Diseases Caused by *Mycoplasma* spp., *En Agrofaz*, Vol. 6, Num. 2 Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Ciencias Químicas. Ave. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia. Gómez Palacio Dgo., México, Agosto 2006.
31. Garg N.G., (2009). Mycoplasmas of zoonotic significance, College of Veterinary Sciences C.C.S. *Haryana Agricultural University* Hisar-125 004, Haryana, India.
32. Gevaert Dominique, (2010). THE EPIDEMIOLOGY OF MYCOPLASMA BOVIS MASTITIS, *Bayer, Diegem, Belgium*.
33. Gibbs Alison (2001). Practical approach to the control of pneumonia in housed calves, *In Practice*, 23: 32-39
34. Hanaa, A. Ghoneim*, Naglaa, I. Hassan, Hanaa, A. Elhalawany y A.M.Nabih (2010). Mixed Infection of Bovine Viral Diarrhea Virus, *Mycoplasma Species* and Mannheimia Haemolytica in Calves Showed

Chronic Pneumonia with Reference to the Histopathological Findings of the Affected Lungs, *Journal of American Science*;6(11)

35. Hale, H.H., Helmboldt, C.F., Plastridge, W.N., Stula, E.F. (1962) Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinarian* 52, 582–591.
36. Hanzlicek G. A., White B. J., Renter D. G., Anderson D. E., Larson R. L., (2011). Associations between the prevalence of Mollicutes and *Mycoplasma bovis* and health and performance in stocker calves. *Veterinary Record*.; 168, 21
37. Hernández, Andrade Laura, Jaramillo Meza Laura, (1995). Comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico de mastitis por mycoplasma bovis, *Vet. Méx.*, 26 (4).
38. Herrmann, R., (1992). Genome Structure and Organization. In: *Mycoplasma Molecular Biology and Pathogenicity. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, pp: 157-168.
39. Howard C.J.(1983). *Mycoplasmas* and Bovine Respiratory Disease: Studies Related to Pathogenicity and the Immune Response-A Selective Review, *The yale journal of biology and medicine*, 56 , 789-797
40. Howard, C.J., Thomas, L.H. y Parsons, K.R., (1987). Immune response of cattle to respiratory mycoplasmas. *Vet Immunopathol.* 17: 401-412.
41. Jasper D.E., Dellinger J.D. & Hakanson H.D., (1976). - Effectiveness of certain teat dips and sanitizers *in vitro* and on teat skin against *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. *Cornell Vet.*, 66, 164-171.
42. Jasper D.E., (1982): The role of mycoplasma in bovine mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181: 158–162.
43. Jasper D.E., (1987). Bovine mastitis due to mycoplasma, *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 6 (3), 801-807.
44. Johansson, K.E., Heldtander, M.U., Pettersson, B., (1998). Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods Mol. Biol.* 104:145-65.
45. Johansson Karl- Erik y Bertil Pettersson, (2002). Taxonomy of *Mollicutes* Chapter 1 in *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, Edited by Razin and Herrmann, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

46. Kreusel, S., Bocklisch, H., Pfützner, H., Brys, A., Leirer, R., and Ziegenhals, U., (1989).[Experimental infections of bulls with *Mycoplasma* (M.) *bovis* and *M. bovis genitalium*]. *Arch. Exp. Veterinärmed.* 43, 705-712.
47. Madoff, S., B.Q. Pixley, R.A. Del Giudice and Jr. R.C. Moellering, (1979). Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *J. Clin. Microbiol.*, 9: 709-711.
48. Maunsell F.P., Donovan GA, Risco C, Brown MB, (2009). Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine* 27: 2781-2788.
49. Maunsell, F. P. & Donovan, G. A. (2009) *Mycoplasma bovis* infections in young calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **25**, 139-77, vii
50. Maunsell F.P., Woolums A.R., Francoz D., Rosenbusch R.F., Step D.L., Wilson D.J., Y Janzen E.D., (2011). *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle, *J Vet Intern Med*;25:772–783
51. Mattsson J.G., Guss B., Johansson K-E., (1994). The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16 S rRNA gene. *FEMS Microbiol.Lett.*, 115, 325- 328.
52. Marques, L. M., Buzinhani, M., Oliveira, R. C., Yamaguti, M., Ferreira, J. B., Neto, R. L. & Timenetsky, J. (2007) Prevalence of *mycoplasmas* in the respiratory tracts of calves in Brazil. *Veterinary Record* **161**, 699-700.
53. McAuliffe, L., Ellis, R.J., Ayling, R.J., Nicholas, R.A.J., (2003) Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S rDNA PCR and DGGE fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4844-4847
54. Miles, R.J., (1992). Catabolism in Mollicutes, *Journal of General Microbiology* 138, 1 773-1 783.
55. Miles, R.J., Wadher, B.J., Henderson, C.L. y Mohan, K., (1988). Increased growth yields of *Mycoplasma* species in the presence of pyruvate. *Letters in Applied Microbiology* 7, 149– 151.
56. Nava NE. (1987). Análisis serológico de granjas porcinas tecnificadas ubicadas en tres estados de la República Mexicana con respecto a *Mycoplasma hyopneumoniae* (tesis de licenciatura.). Estado de México (México): *Universidad Autónoma del Estado de México*.
57. Nicholas Robin, Ayling Roger y McAuliffe Laura, (2008). Chapter 10 Bovine Respiratory Disease in *MYCOPLASMA DISEASES OF RUMINANTS*, © *CAB International*, pp 147-183

58. Nicholas RAJ, Ayling RD., (2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*74:105–112, 2003.
59. Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., Woodger, N., Wessells, M. E. y Houlihan, M.G.,(2006). *Mycoplasmas* in adult cattle: Bugs worth bothering about?, *Irish Veterinary Journal*, Volume 59 (10) : October, 2006
60. Nicolet, J., (1996). Animal mycoplasmoses: a general introduction. *Rev Sci Tech OffInt Epiz.* 15(4), 1233-1240.
61. Núñez D, Cesar, Morales Salinas Elizabeth, Martinez Maya José Juan, Hernandez A. Laura , (2008). Detection of subclinical bovine mastitis caused by mycoplasmosis by indirect ELISA test and isolation, *Vet. Méx.*, 39 (2).
62. Le Grand D, Poumarat F, Bezille P., (1999). Assessment of a serological ELISA test for screening of *Mycoplasma bovis* infection within livestock. *FEMS Microbiol*; 173:103-110.
63. Le Grand D., Calavas D, Brank M, Citti C, Rosentgarten R, Bezille P.,(2002) Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Veterinary Record.*; 150:268-273.
64. Lysnyansky I, Ron Y, Sachse K., (2001) Intrachromosomal recombination within then vsp locus of *Mycoplasma bovis* generates a chimeric variable surface lipoprotein antigen, *Infect Immun.*;69(6):3703–12
65. Pützner H., Scherwa B. y Trübner S. (1983). Empfind lichkeit von *Mycoplasma bovis* gegenü berim Euterbereiche ingesetzten Desinfektions mitteln. *Arch. exp. VetMed.*,37, 485-489.
66. Pützner, H., (1984) . [The tenacity of *Mycoplasma bovis*] *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* [A] 258, 38-41.
67. Pützner, H. y D. Schimmel, (1985). *Mycoplasma bovis* isolation in the offspring of cows with M. bovis mastitis and its epizootiological significance. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 32: 265-279.
68. Pützner, H., (1990). Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt fur Bakteriologie Supplement* 20, 394–399.
69. Pützner H, y Sachse K., (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech*;15:1477–1494.
70. Poumarat, F., Solsona, M., and Boldini, M., (1994). Genomic, protein and antigenic variability of *mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*40, 305-321.

71. Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J.C., Leonard F.C., Maghrie D., (2002).Capitulo 33 *Mycoplasmas* en Microbiología y enfermedades Infecciosas Veterinarias, Edición española de la primera edición original inglesa Veterinary Microbiología and Macrobia Disease, 1 ed. Blackwell Publishing Ltd. Osney Mead Oxford OX2 0EL, UK , Acribia, S.A. Zaragoza,España., pp 225-233
72. Razin, S., (1978). *The mycoplasmas*. Microbiol. Rev. 42(2): 414-470.
73. Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., (1989). Molecular biology and pathogenicity of *mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4):1094-156.
74. Rodriguez, F., Bryson, D. G., Ball, H. J., and Forster, F., (1996). Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. *J. Comp. Pathol.* 115, 151-162.
75. Rodríguez, F., Kennedy, S., Bryson, T.D., Fernandez, A., Rodriguez, J.L. and Ball, H.J., (1996b).An immunohistochemical method of detecting *Mycoplasma* species antigens by use of monoclonal antibodies on paraffin sections of pneumonic bovine and caprine lungs. *J Vet Med.* 43(7): 429-38.
76. Romváry, J., Rózsa, J., Stipkovits, L., y Mészáros, J., (1977). Incidence of diseases due to *Mycoplasma bovis* in a cattle herd. I. Pneumo-arthritis syndrome in calves. *Acta Vet. Hung.* 27, 29-37.
77. Sacase K, Pfützner H, Hotzem H.,(1993). Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev Sci Tech OffEpiz;* 12:571-580.
78. Sachse K, Grajetzki C, Rosengarten R, (1996). Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralbl Bakteriol*,284(1):80–92
79. Sachse K, Helbig JH, Lysnyansky I, (2000). Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun.*,68(2):680–7.
80. Shahriar Farshid y Clark G. Edward, (2003).*Mycoplasma bovis*-associated disease: new syndromes and emerging problems, *Can Vet*, August/September 2003;Volume 3 Issue 7.
81. Stipkovits, L., P. Ripley, J. Varga and V. Palfi, (2000).Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. *Acta Vet. Hung.*, 48: 387-395.

82. Tenk M., (2005). Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Doctoral Thesis, Szent Istvan University, Postgraduate school of Veterinary Science, Budapest, p 70.
83. Thomas, C. B., Willeberg, P., and Jasper, D. E. (1981). Case-control study of bovine mycoplasmal mastitis in California. *Am. J. Vet. Res.* 42, 511-515.
84. Thomas, C.B., P. Van Ess, L.J. Wolfgram, J. Riebe, P. Sharp and R.D. Schultz, (1991). Adherence to bovine neutrophils and suppression of neutrophil chemiluminescence by *Mycoplasma bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 27: 365-381.
85. Thomas, A.(a), (2003a). Maini J. , Linden A., *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles, *Ann. Méd. Vét.*, 147, 23-39
86. Thomas A., Sachse K, Farnir F., (2003b). Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *MicrobPathog*;34(3):141–8.
87. Vanden Bush TJ, Rosenbusch RF. (2003). Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Vet. Immunopathol.* ;94(1):23–33.
88. Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., Maniloff, F., Woese, C.R., (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171(12):6455-67.
89. Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B., (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77(1):494-8.
90. Yates, W. D., Kingscote, B. F., Bradley, J. A. & Mitchell, D. (1983) the relationship of serology and nasal microbiology to pulmonary lesions in feedlot cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47, 375-378
91. Yogev David, Menaker Dimitry, Strutzberg Katrin, Levisohn Sharon, Kirchhoff Helga, Heinz Hinz-Karl, y Rosengarten Renate, (1994). a surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *mycoplasma gallisepticum* and *mycoplasma bovis*, *Infection and Immunity*, Nov. 1994, Vol. 62, No. 11, p. 4962-4968.