

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**AISLAMIENTO DE *Mycoplasma* spp. EN LECHE DE
VACAS DE UN ESTABLO LECHERO EN EL MUNICIPIO DE
MATAMOROS COAHUILA**

POR

JUAN MANUEL BARCO RIVERA

TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

MAYO DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**AISLAMIENTO DE *Mycoplasma* spp. EN LECHE DE
VACAS DE UN ESTABLO LECHERO EN EL MUNICIPIO DE
MATAMOROS COAHUILA**

TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR

JUAN MANUEL BARCO RIVERA

ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

MAYO DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

**AISLAMIENTO DE *Mycoplasma* spp. EN LECHE DE
VACAS DE UN ESTABLO LECHERO EN EL MUNICIPIO DE
MATAMOROS COAHUILA**

Tesis Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**

M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN
REGIONAL
CIENCIA ANIMAL

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

MAYO DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

**AISLAMIENTO DE *Mycoplasma* spp. EN LECHE DE
VACAS DE UN ESTABLO LECHERO EN EL MUNICIPIO DE
MATAMOROS COAHUILA**

TESIS APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR

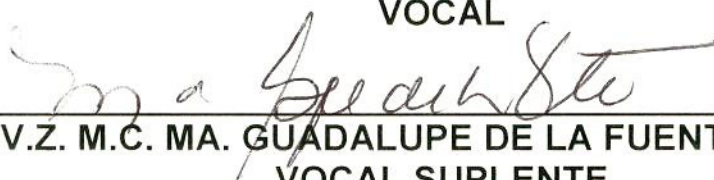


**M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE**



**M.V.Z. JOSE GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL**

**M.V.Z. M.C. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
VOCAL**



**M.V.Z. M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO
VOCAL SUPLENTE**

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

MAYO DE 2010

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo y más sincero agradecimiento al M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ, por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo, gracias no solo por ser un excelente profesor de principios y virtudes intrínsecas, sino por ser una persona íntegra digna de admiración que infunde respeto hacia los demás, por cada clase, por cada plática, por cada uno de sus consejos y opiniones.

Al M.V.Z. M.C. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por su apoyo y colaboración tanto para la realización del trabajo de campo como de laboratorio.

A mis maestros asesores: M.V.Z. JOSE GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, M.V.Z. M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO que con su apreciable ayuda logre finalizar este trabajo que representa el final de una etapa y el inicio de una vida profesional.

Al M.V.Z. Israel García Martínez y M.V.Z Gonzalo de la Torre Barraza por permitir y dar su apoyo para la realización del trabajo de campo.

Sin faltar agradecer a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Regional Laguna por su cobijo a lo largo de toda mi carrera.

ALMA TERRA MATER

DEDICATORIA

Dedicado con todo el amor y respeto a mi madre.

A mi padre y a cada uno de mis hermanos y hermanas, por su apoyo y confianza.

A la memoria de mi abuelita por haber inculcado el cuidado y respeto hacia los animales.

A ti Dalia que con tu amor y cariño me das impulso para seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Historia.....	2
2.2 Clasificación taxonómica	3
2.3 Etiología.....	3
2.4 Características morfológicas.....	5
2.5 Epidemiología	8
2.6 Transmisión	9
2.7 Manifestaciones clínicas.....	9
2.8 Diagnóstico	11
2.9 Tratamiento.....	13
2.10 Prevención y control	13
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS.....	14
V. OBJETIVOS.....	15
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1 Lugar de estudio	15
6.2 Toma de muestras	15
6.3 Material de laboratorio	16
6.3.1 Para la toma de muestras:	16
6.3.2 Para el procesamiento de las muestras:	16
6.3.3 Medio de cultivo:	16
6.4 Procesamiento de las muestras.....	16
6.5 Técnica	18
VII. RESULTADOS.....	19
VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	21
IX. REFERENCIAS	23
X. GLOSARIO	25

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1 Colonias características de Mycoplasmas “huevo frito”,	7
Figura 2 Múltiples colonias pequeñas	7
Figura 3 Típicas colonias de <i>Mycoplasma</i>	8
Figura 4 Llenado de cada tubo de ensaye	17
Figura 5 Tubos de ensaye con el precipitado de cada muestra.	17
Figura 6 División de cada caja petri	18
Figura 7 Siembra de las muestras	19
Figura 8 Porcentaje de muestras positivas y negativas.	20
Figura 9 Resultados obtenidos en los medios.....	20

RESUMEN

La micoplasmosis es una enfermedad que cursa con diversas formas de manifestaciones clínicas en el ganado lechero, siendo la mastitis una de las principales, la cual causa pérdidas económicas considerables en la producción lechera. Por tal motivo, la finalidad del presente estudio fue determinar la frecuencia de *Mycoplasma* spp, en vacas de un establo en el municipio de Matamoros en el estado de Coahuila. Se analizaron 140 muestras de leche de vacas sanas y con mastitis clínica y subclínica, el procesamiento de las muestras fue hecho con la leche que fue tomada después del despunte para la ordeña, y almacenada a una temperatura entre 3 y 7 °C. Las muestras fueron cultivadas en un medio de cultivo sólido, específico para el aislamiento de *Mycoplasma* spp y la interpretación de los resultados se basó en las características morfológicas típicas de las colonias de *Mycoplasma* spp observadas mediante microscopio estereoscópico. Los resultados encontrados fueron de 42 (30%) aislamientos *Mycoplasma* spp.

Palabras clave: *Mycoplasma bovis*, mastitis bovina, micoplasmosis

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad común en los hatos lecheros, esta infección puede ser difícil de tratar, ya que es causada por diferentes agentes patógenos bacterianos o fúngicos afectando a animales expuestos, principalmente animales inmunocomprometidos (Grohn *et al.*, 2004; Kirk y Mellenberger, 1994; Owens y Nipper, 2008; Swanson *et al.*, 2004).

La mastitis puede ser muy perjudicial ya que aumenta el nivel de células somáticas en la leche afectando tanto la producción de leche y la calidad del procesamiento de sus derivados, la rentabilidad de un rebaño lechero disminuye, ya que una vaca con mastitis produce menos leche, además la que produce no se vende, en ocasiones es mejor desechar al animal que tratarlo cuando no recupera su potencial de producción completo. La detección temprana es fundamental para prevenir el contagio de la enfermedad a otros animales del hato (Baird *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2005; Grohn *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2004).

Uno de los agentes etiológicos causantes de mastitis es *Mycoplasma bovis* el cual puede producir una patología muy devastadora para un hato lechero, debido a que: 1) Es una enfermedad altamente contagiosa, 2) El tratamiento con antibióticos es ineficaz, 3) Los signos clínicos persisten por periodos variables de tiempo, 4) Las vacas con mastitis subclínica con frecuencia propagan la infección a otras vacas y pueden afectar al organismo durante meses o años (Sickles *et al.*, 2000).

El origen y la propagación de la infección en los brotes no están completamente aclarados, se sabe que la mastitis por *Mycoplasma* se disemina fácilmente de vaca a vaca durante el ordeño. Una forma importante por la que comienza este problema en un hato es por introducción de vacas que eliminan *Mycoplasma* (Butler *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2003).

La infección intramamaria por *Mycoplasma* del ganado lechero es una condición grave que puede resultar en la disminución de la cantidad de leche, la mastitis es predispuesta por una interacción entre el agente causal (bacterias) el hospedero (vaca) y el medio ambiente. El medio ambiente influye en la exposición del hato a los microorganismos y la capacidad de la vaca a resistir a la infección (Baird *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2005; Rosenbusch *et al.*, 2005).

En la Comarca Lagunera es bien sabido que la mastitis en ganado lechero debido a micoplasmosis bovina, está muy difundida entre los hatos y de acuerdo a su epidemiología se difunde rápidamente entre ganado infectado y sano, de acuerdo a estos conocimientos básicos, y sabiendo que en hato de estudio conviven animales positivos a tuberculosis bovina, brucelosis y micoplasmosis, la finalidad de la presente investigación es conocer el impacto de la enfermedad sobre animales sanos comparados con animales con mastitis clínica o subclínica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Historia

En el año de 1898 Nocard y Roux describieron a los micoplasmas, demostrando que la pleuroneumonía en ganado vacuno era causada por organismos que pasan filtros que retenían bacterias. En 1962 se demostró que el agente etiológico de la neumonía atípica primaria era un *Mycoplasma* (*Mycoplasma pneumoniae*) (Rivera *et al.*, 2001)

En el año de 1963 se observaron los primeros casos de mastitis por micoplasmas en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). A partir de 1970 y hasta el momento, muchos hatos de diferentes estados de EUA han diagnosticado mastitis por *Mycoplasma bovis*. También otros países como Francia, Gran Bretaña, Italia, Canadá e Israel han aislado *Mycoplasma bovis* de sus hatos lecheros con mastitis clínicas y subclínicas (Cerdá *et al.*, 2000).

2.2 Clasificación taxonómica

El término “*Mycoplasma*”, del griego “mykes” (hongo) y de “plasma” (formado), se acuña en 1950, y reemplaza la antigua terminología (PPLO, Pleuropneumonia-like organisms, en inglés). La alusión a un hongo como el patrón de crecimiento en el nombre de *Mycoplasma* pasa a describir solo el crecimiento de *Mycoplasma mycoides*, pero el término fue adoptado y ha persistido hasta nuestros días. En La década de los 60’s, los micoplasmas fueron catalogados como miembros de una clase denominada Mollicutes, que se derivan de las palabras en latín que significa “mollis” (suave) y cutis (piel). Las denominaciones actuales de taxonomía incluidas en la clase Mollicutes comprenden 4 órdenes, 5 familias, 8 géneros y alrededor de 200 especies conocidas que se han detectado en humanos, animales vertebrados, artrópodos y plantas (Quiroz, 2000; Waites *et al.*, 2005; Waites y Talkington, 2004).

Tabla 1 Clasificación Taxonómica

Reino:	Bacteria
División:	Firmicutes
Clase:	Mollicutes
Orden:	Mycoplasmatales
Familia:	Mycoplasmataceae
Género:	Mycoplasma

(Quinn *et al.*, 2002)

2.3 Etiología

Los micoplasmas son la forma más simple de organismos auto-replicantes. Son microorganismos pleomórficos, carecen de pared celular, y se conectan directamente a la célula del hospedero para obtener los nutrientes esenciales, miden de 200 a 500 nm, crecen en medios sólidos y líquidos, y utilizan glucosa como fuente de energía (Kirk y Mellenberger, 1994; Núñez *et al.*, 2008).

La falta de una pared celular rígida en todos los miembros de la clase Mollicutes les impide la tinción de Gram, confiere pleomorfismo en sus células y los hace muy susceptibles a la deshidratación, lo que lo limita a una existencia parasitaria como huésped en células eucariotas (Waites *et al.*, 2005).

Los miembros de la clase Mollicutes se caracterizan por su pequeño genoma que consiste en un único cromosoma circular, y la falta una pared celular permanente. Los estudios de las secuencias 16SrRNA sugieren que los micoplasmas se relacionan más estrechamente el subgrupo de eubacterias Gram Positivas que incluyen los bacilos, estreptococos y lactobacilos (Waites y Talkington, 2004).

Mycoplasma bovis es un habitante común del tracto respiratorio superior e inferior en el ganado sano. En ganado bovino es posible aislar varias especies de *Mycoplasma*, de ellas, *Mycoplasma alkalences*, *M. bovis*, *M. californicum* y *M. canadense* provocan mastitis, artritis, neumonías, otitis y problemas reproductivos, entre otras manifestaciones. Sin embargo, *M. bovis* es el principal agente que causa mastitis (Gagea *et al.*, 2006; Núñez *et al.*, 2008)

Mycoplasma bovis es el agente etiológico más importante de la micoplasmosis bovina en varios países, es el responsable de los brotes de mastitis terapia-resistentes sobre todo en los rebaños lecheros más grandes, es también reconocido como un agente causal de neumonías, bronconeumonias, artritis, poliartritis crónica, tenosinovitis, infecciones del oído medio, abscesos en la piel y genitales, e infecciones de las vías que incluyen ooforitis, salpingitis, endometritis, además de aborto y seminovesiculitis (Cai *et al.*, 2005; Cerdá *et al.*, 2000; Gagea *et al.*, 2006; Kirk y Mellenberger, 1994; Rosenbusch *et al.*, 2005; Sachse *et al.*, 2000; Saeman, 1994; Solís, 2010).

Mycoplasma bovis tiene la capacidad de someterse a una variación antigénica por alteraciones fenotípicas de la superficie inmunodominante de las lipoproteínas y

modula la respuesta inmune del hospedero. Además *Mycoplasma bovis* puede adherirse, invadir y sobrevivir en las células epiteliales e inflamatorias. Estas características pueden facilitar la persistencia de *Mycoplasma bovis* en enfermedades crónicas en cara a una respuesta inmune y una terapia prolongada con antibióticos (Gagea *et al.*, 2006).

El *Mycoplasma mycoides* se supone erradicado de Norteamérica, sin embargo, se encuentra otra especie llamada *Mycoplasma bovis*, también presente en nuestro país, poseen dos tipos de colonias, las grandes que no son patógenas para los bovinos y las pequeñas que son las que causan la enfermedad. Los micoplasmas son bastante sensibles al ambiente, el calor, la desecación y a los desinfectantes comunes (Quiroz, 2000).

Se sabe que los micoplasmas que causan comúnmente mastitis en vacas lecheras son *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum*, *M. canadense* y *M. alkalenscens* además de otros. De estos *M. bovis* es por mucho el causante más importante de mastitis (Kirk y Mellenberger, 1994).

2.4 Características morfológicas

Dado que las células de *Mycoplasma* son delimitadas por solo una membrana celular plástica, su forma dominante es una esfera. Sin embargo, muchos Mollicutes exhiben una variedad de entidades morfológicas, incluyendo células en forma de pera, células en forma de jarra con un extremo terminal, filamentos de diferentes longitudes y filamentos helicoidales. La capacidad de mantener su forma con la ausencia de una pared celular rígida indica desde hace tiempo un citoesqueleto en los micoplasmas (Razin *et al.*, 1998).

El crecimiento de estos organismos en el laboratorio requiere de medios especializados y condiciones atmosféricas. La preparación del medio es un proceso tedioso y prolongado. Las colonias requieren típicamente de 5 a 10 días

para desarrollarse y son pequeñas y difíciles de ver. Estas dificultades a menudo retrasan los esfuerzos de diagnóstico y manejo de este tipo de mastitis, aumentando el impacto de un brote en el hato (Baird *et al.*, 1999; Owens y Nipper, 2008).

Los micoplasmas difieren de la mayoría de las bacterias que causan mastitis por tener necesidades únicas de crecimiento como en medios de cultivo enriquecidos con proteínas animales, un esteroide y una fuente de ADN o de un nucleótido de adenina. Los medios sólidos o líquidos comerciales para micoplasmas (con frecuencia, infusiones de corazón) se encuentran suplementados con suero equino (20%) y extracto de levadura que aportan aminoácidos y vitaminas. Además emplean penicilina para inhibir las bacterias Gram positivas y acetato de talio para inhibir a las bacterias Gram negativas y hongos. (Kirk y Mellenberger, 1994; Owens y Nipper, 2008; Sickles *et al.*, 2000).

Las pequeñas colonias de los micoplasmas tienen forma típica de "*huevo frito*", si bien visible bajo el microscopio, son muy difíciles de enumerar. (Oravcova *et al.*, 2009).

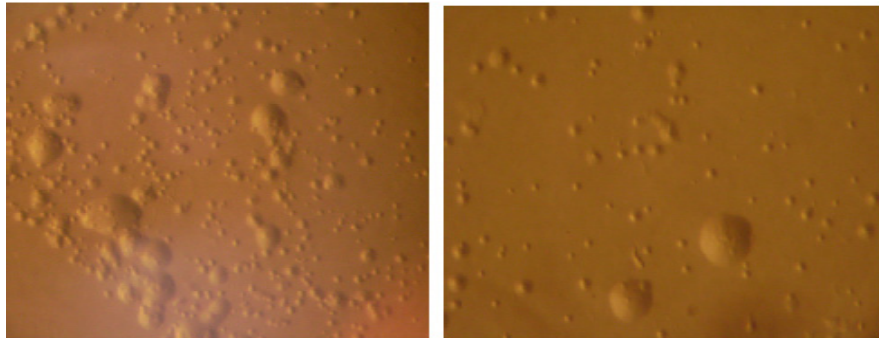


Figura 1. Colonias características de Mycoplasmas con aspecto de “huevo frito”. Crecimiento en cultivo Agar SP-4. Ampliación X40 (Rivera *et al.*, 2009).

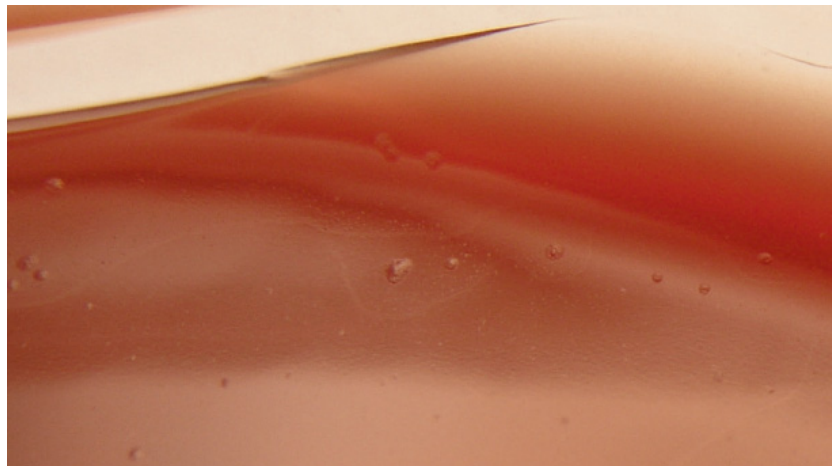


Figura 2. Múltiples colonias pequeñas con apariencia de huevo frito sobre una placa de agar sangre en cultivo de líquido pleural (Muldrew y Edberg, 2009).

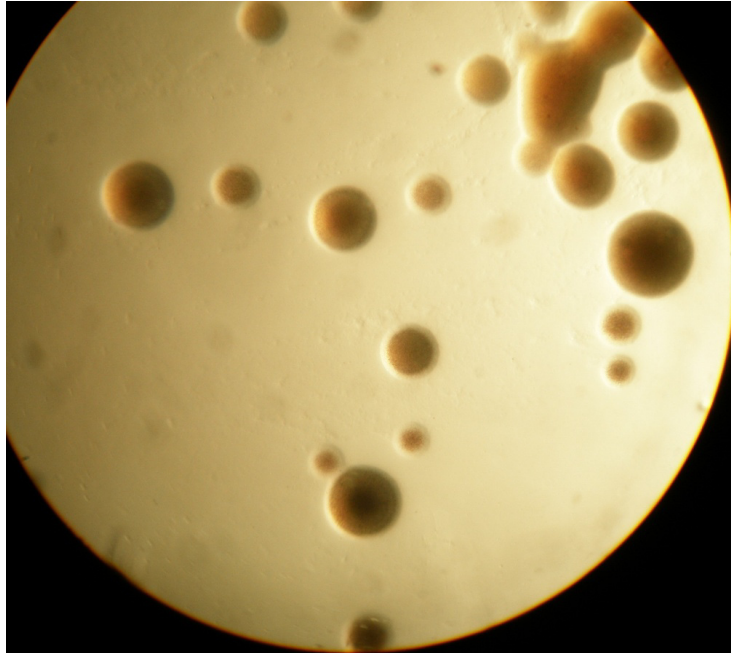


Figura 3. Típicas colonias de *Mycoplasma* spp en un medio de Agar Mycoplasma después de 5 días de cultivo observadas con un microscopio estereoscópico a 10X (fotografía obtenida en los resultados de este trabajo).

2.5 Epidemiología

El *M. bovis* se encuentra en casi todo el mundo, aunque algunos países como Australia y Sudáfrica ya lo han erradicado. El control y erradicación es difícil debido al largo periodo de latencia que presentan los micoplasmas, siendo necesario un largo periodo de cuarentena y vigilancia para poder declarar a un hato libre de la enfermedad. Tiene una morbilidad del 90% y una mortalidad del 50%. En México se presenta sobre todo en ganado lechero (Quiroz, 2000).

Frecuentemente la historia de los hatos afectados incluye la reciente introducción de nuevos animales, un brote previo de enfermedades respiratorias y/o animales con articulaciones inflamadas. Vacas de todas las edades en cualquiera etapa de la lactancia son susceptibles, pero parece que animales en la etapa temprana de la lactación sufren con más severidad debido a la presencia de edema de la glándula mamaria (Saeman, 1994).

2.6 Transmisión

La transmisión es por contacto con animales infectados y se produce por inhalación de gotas. Aproximadamente el 50% de los bovinos expuestos desarrollan signos clínicos después de un período de incubación variable (Currin *et al.*, 2009).

Naturalmente, las infecciones se han atribuido a la transmisión directa de *Mycoplasma bovis* cuando se desprenden de un animal infectado a la glándula mamaria, o las vías respiratorias o del tracto genital de un animal susceptible (Byrne *et al.*, 2005).

En un estudio de campo de las infecciones por *Mycoplasma bovis* en terneros y vacas, donde los terneros eran descendientes de vacas con mastitis, las infecciones se produjeron en las vías respiratorias superiores de los terneros, como lo demuestra el aislamiento de *Mycoplasma* spp. y la producción de anticuerpos contra el agente (Fox *et al.*, 2008).

A pesar de que *Mycoplasma bovis* puede vivir en el ambiente por períodos cortos de tiempo, la propagación de la enfermedad por la contaminación de los establos, comederos, camiones, etc, no es un medio importante de transmisión (Currin *et al.*, 2009).

2.7 Manifestaciones clínicas.

La mastitis por *Mycoplasma* se caracteriza por una disminución repentina de la producción y calidad de la leche, la infección no responde al tratamiento antibiótico y se puede propagar rápidamente a través del hato causando signos clínicos en más de un 20% del hato, mientras que los portadores subclínicos expulsan micoplasmas en la leche (Butler *et al.*, 2000).

Mycoplasma spp puede dañar el tejido secretor produciendo fibrosis y abscesos con paredes fibrosas anchas en la ubre, y crecimiento de los ganglios linfáticos supramamarios (Saeman, 1994).

La mastitis por *Mycoplasma* está caracterizada por signos clínicos severos, que pueden involucrar desde uno a todos los cuartos de la glándula mamaria y por la resistencia a las terapias antibióticas convencionales. Como en otras mastitis contagiosas, la diseminación entre los animales puede producirse por fómites como las manos del operador, las pezoneras de la ordeñadora, o por vía respiratoria. En este último caso, los micoplasmas pueden alcanzar la glándula mamaria por vía hematógica (Cerdá *et al.*, 2000).

Las señales clásicas de la mastitis por *Mycoplasma* incluyen aumento de la incidencia de los casos que son resistentes a la terapia, casos clínicos que involucran múltiples cuartos al mismo tiempo, una rápida caída en la producción de leche, y vacas con síntomas sistémicos tales como baja alimentación y fiebre, leche anormal que a menudo es marrón, con un sedimento escamoso o fluido seroso. Algunas muestras de leche cuando se dejan reposar puede parecer que tienen arena o aspecto granular (Kirk y Mellenberger, 1994; Owens y Nipper, 2008).

En trastornos respiratorios, el animal comienza con fiebre de 40 °C y una caída brusca de la producción de leche, anorexia, atonía ruminal, tos, bradicardia y depresión; el animal se aparta, no se mueve y permanece con las patas abiertas, el lomo arqueado y la cabeza extendida. Presentan dolor a la percusión torácica. A la auscultación se presentan roces pleurales ocasionados por la inflamación aguda, sin murmullo vesicular y con ruidos de líquidos y estertores húmedos. Los secuestros del *Mycoplasma* en pulmón, suelen estar en focos necróticos, que por estrés pueden romperse y generar toxemia con lo que el 50% de los animales muere en pocos días (hasta 3 semanas) (Quiroz, 2000).

2.8 Diagnóstico

El aislamiento de los micoplasmas a partir de las muestras clínicas no confirma necesariamente su responsabilidad etiológica, ya que algunos micoplasmas de significación clínica cuestionable se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza. En aquellas zonas en las que las enfermedades por micoplasmas son endémicas, las características clínicas pueden hacer sospechar la presencia de un *Mycoplasma* patógeno determinado (Butler *et al.*, 2000).

Esta enfermedad podría estar presente sin hacerse aparente, y puede tardar en manifestarse clínicamente en el ganado, pero ante algún estrés provocado tal vez por cambios nutricionales, clima extremoso, vacunaciones masivas, entre otros, puede presentarse clínicamente y dar inicio al brote que deberá de ser diagnosticado y manejado adecuadamente por lo que es necesario contar con técnicas de diagnóstico capaces de identificar al género y la especie de los microorganismos causales, para tomar medidas adecuadas y lograr su control (Hernández *et al.*, 2003; Kirk y Mellenberger, 1994; Martínez *et al.*, 2004; Solís, 2010).

Mycoplasma spp debe sospecharse en hatos en donde hay varias vacas con mastitis clínica en más de un cuarto pero que continúan comiendo y tienen poca evidencia de la enfermedad sistémicamente. Los casos no responden al tratamiento y generalmente las vacas afectadas muestran una marcada disminución en la producción de leche o cesan de lactar. Sin embargo, *Mycoplasma* spp puede ser aislada en hatos con vacas de alta producción que no demuestran los signos clásicos. Casos subclínicos con signos intermitentes de mastitis clásica, no son raros. Las vacas infectadas pueden tener un alto nivel de células somáticas y eliminar organismos por períodos variables (Saeman, 1994). El diagnóstico de la micoplasmosis se basa en la historia y los signos clínicos, en las lesiones y la histopatología. La prueba de fijación del complemento y la de

ELISA dan resultados confiables. Hay laboratorios de diagnóstico que aíslan micoplasmas a partir de la leche de vacas con mastitis, permitiendo identificar a las vacas para su aislamiento o segregación rápida del hato (Quiroz, 2000).

Las muestras para el examen de laboratorio, que deben recogerse lo antes posible, han de mantenerse refrigeradas y trasladarse al laboratorio dentro de las primeras 48 horas. Como muestras adecuadas podemos mencionar los raspados de mucosa, los exudados traqueales, los aspirados, las zonas de neumonía, la leche y los fluidos de las cavidades corporales o de las articulaciones. El medio para *Mycoplasma*, una vez inoculado, se incuba en aerobiosis o con un 10% de CO₂, en una atmósfera húmeda a 37 °C hasta por 14 días (Quinn *et al.*, 2002).

El método de análisis de rutina utilizados por los laboratorios de diagnóstico para la identificación de *Mycoplasma* spp en muestras clínicas o tanques de leche es basado en el cultivo microbiológico en medios selectivos enriquecidos que incluyen antibióticos, en cámaras anaeróbicas húmedas (5-10% de CO₂) por 5 a 7 días. Sin embargo, este método representa un largo y complicado proceso, ya que los micoplasmas crecen muy lentamente. Además, estos análisis deben complementarse con la identificación de especies bioquímicas o por pruebas de inmunofluorescencia, haciendo de este un procedimiento costoso. Métodos alternativos basados en la amplificación del ADN para la detección directa de este agente patógeno en la leche de los animales o en los líquidos se han diseñado para superar este problema. Hay varios métodos que identifican *M. bovis* por PCR. Algunos de estos métodos se basan en la amplificación del gen 16S rRNA. Sin embargo, las secuencias de genes 16S rRNA de *M. agalactiae* y *M. bovis* comparten 99,8% de similitud, afectando a la especificidad de los métodos basados en la amplificación de este gen. Otras estrategias de diagnóstico se basa en la amplificación de secuencias desconocidas o genes específicos (Oravcova *et al.*, 2009).

2.9 Tratamiento

No hay un tratamiento efectivo, por lo cual generalmente la infección no responde al tratamiento antibiótico (Quinn *et al.*, 2002). Debido a esto no es recomendable tratar animales con micoplasmosis, a pesar de que puede haber respuesta a ciertos antibióticos en la presentación respiratoria como la tilosina, altas dosis de tiamulina o la combinación de doxiciclina y minociclina (tetraciclinas micronizadas), o lincomicina combinada con espectinomicina (Currin *et al.*, 2009; Quiroz, 2000).

2.10 Prevención y control

La enfermedad puede ser controlada identificando a los animales infectados mediante muestreo y cultivo de la leche de todas las vacas del hato, seguido de la segregación y/o eliminación de los animales infectados. Además de implementar medidas sanitarias rígidas, se debe tener mucho cuidado cuando se adquieran animales de reemplazo. Algunas veces la enfermedad aparece de repente en hatos que previamente no estaban infectados y sin introducir reemplazos. Se sabe que las micoplasmas son residentes frecuentes en el tracto respiratorio de vacas aparentemente normales y puede ocurrir la transferencia de los microorganismos de los pulmones a la glándula mamaria (Quiroz, 2000).

Algunos brotes de mastitis por micoplasmas se han asociado con problemas respiratorios en becerras, vaquillas y en vacas en establos pobremente ventilados. Becerras jóvenes alimentadas con leche de vacas con ubres infectadas con *Mycoplasma* spp son susceptibles de tener infecciones respiratorias que pueden persistir por varios meses. Un hato sospechoso de tener mastitis por *Mycoplasma*, basado en la historia y los signos clínicos, deberá cultivarse con el objeto de establecer la naturaleza de la infección. Infecciones por *Mycoplasma* pueden complicarse con infecciones de bacterias comunes que pueden presentarse al mismo tiempo (Saeman, 1994).

El uso de prácticas adecuadas de manejo puede reducir la exposición a bacterias y aumentar la resistencia a la mastitis. El uso de prácticas de control de la mastitis contagiosa y el mantenimiento regular de la máquina de ordeño son comúnmente asociados en el bajo conteo de células somáticas en la leche (Rodrigues *et al.*, 2005).

Debido a que la micoplasmosis puede ser clínica, subclínica o crónica las pruebas para detección rutinaria en los tanques de almacenamiento de la leche son útiles para detectar la presencia de micoplasmas (Baird *et al.*, 1999).

Se deberá considerar positivo a *Mycoplasma* para toda su vida a una vaca que haya dado positivo en una muestra de leche (Butler *et al.*, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los antecedentes descritos y tomando en cuenta que el establo de estudio, es un hato lechero compuesto de ganado infectado de tuberculosis, brucelosis y micoplasmosis provenientes de ocho hatos de la Comarca Lagunera y considerando que no todos los animales fueron trasladados por micoplasmosis, la finalidad de la presente investigación es conocer el impacto de la enfermedad sobre animales sanos comparados con animales con mastitis clínica o subclínica.

IV. HIPÓTESIS

Las muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y clínica y muestras de leche sin mastitis muestreadas en un establo del municipio de Matamoros, Coahuila, presentan *Mycoplasma spp*

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General:

Aislar *Mycoplasma* spp a partir de leche de animales sanos y con mastitis subclínica y clínica.

V.2 Objetivos específicos:

1. Identificar vacas con mastitis clínica y subclínica y realizar estudios microbiológicos para el aislamiento de *Mycoplasma* spp a partir de leche.
2. Realizar estudios microbiológicos para el aislamiento de *Mycoplasma* spp a partir de leche de vacas aparentemente sanas de mastitis.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Lugar de estudio

Las muestras de leche se obtuvieron de un establo localizado en el municipio de Matamoros, del estado de Coahuila, al cual llegan animales enfermos de tuberculosis, brucelosis y micoplasmosis, de ocho establos de la Comarca Lagunera, localizados en los municipios de Torreón, Matamoros y Francisco I. Madero. El estudio microbiológico se realizó en el laboratorio de bacteriología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Regional Laguna, utilizando medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Mycoplasma* spp.

6.2 Toma de muestras

Se recolectaron 140 muestras de leche de vacas de las cuales 27 presentaron mastitis clínica, 48 mastitis subclínica y 65 de animales sanos, de cada una de ellas se tomaron muestras de todos los cuartos.

Las muestras se almacenaron en recipientes de plástico estériles de 100 mL de capacidad, durante la ordeña, después del despunte y antes de empezar a ordeñar, los recipientes se identificaron con el número del arete del animal, después se colocaron en una hielera y se transportaron al laboratorio en donde se pusieron en refrigeración a una temperatura de 3 a 7 °C.

6.3 Material de laboratorio

6.3.1 Para la toma de muestras:

Recipientes de plástico estériles de 100 mL, guantes de látex, cubre bocas, cinta adhesiva y marcador permanente.

6.3.2 Para el procesamiento de las muestras:

Recipientes de plástico con muestras de leche, pipetas, marcadores y cinta adhesiva para etiquetar las muestras, tubos de ensayo estériles de 10 mL para centrifugar la leche, mechero *Bunsen*, cajas de Petri, asa de alambre punta redonda, estufa bacteriológica a 37 °C, estereoscopio y autoclave.

6.3.3 Medio de cultivo:

Agar Mycoplasma

6.4 Procesamiento de las muestras

Se centrifugaron 7 mL de leche utilizando una pipeta estéril, en un tubo de ensayo estéril a 2500 rpm por 5 minutos, después se decantó el sobrenadante y se tomó el precipitado de cada muestra para proceder a cultivar.



Figura 4. Preparación de la leche en tubos de ensayo para centrifugar.



Figura 5. Tubos de ensayo con leche precipitada lista para cultivo.

Para el cultivo de las muestras de leche, se utilizaron cajas de Petri con Agar *Mycoplasma*, cada caja de Petri se dividió en 8 fracciones, las que se identificaron conforme al número de muestra.

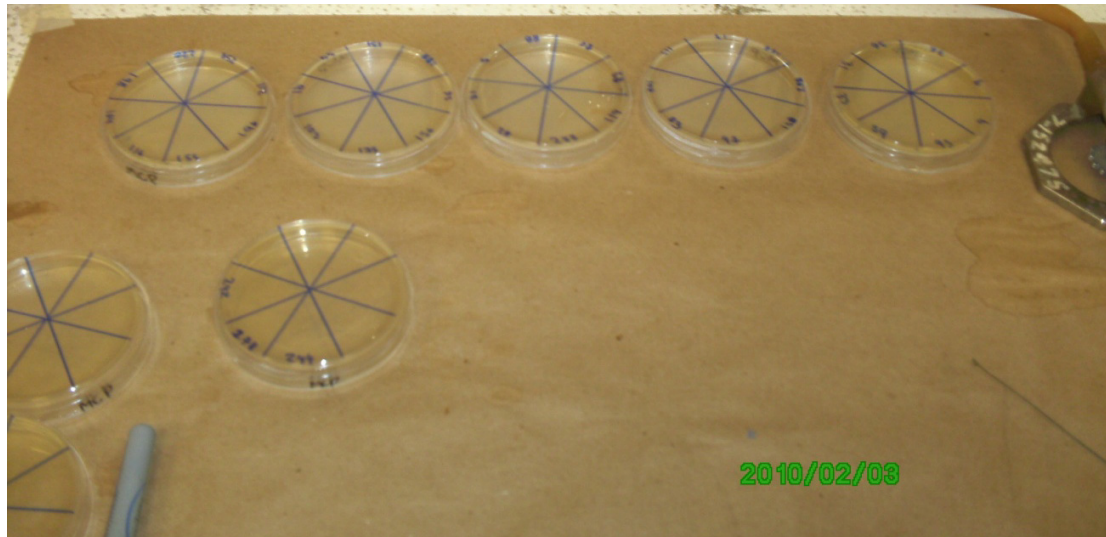


Figura 6. División en fracciones de cada caja de Petri para el cultivo de las muestras de leche.

6.5 Técnica

Se tomó con el asa estéril el precipitado de cada muestra, se sembró en el agar *Mycoplasma*, las cajas sembradas se sellaron con cinta adhesiva, para evitar la deshidratación del medio, y se colocaron los medios ya cultivados en la estufa bacteriológica a una temperatura de 37.0 °C, para después observarlos con el microscopio estereoscópico.



Figura 7. Siembra de las muestras en los medios de cultivo de Agar Mycoplasma.

VII. RESULTADOS

Se trabajaron un total de 140 muestras, las cuales fueron recolectadas en el mes de enero de un establo lechero de Matamoros, Coahuila. De estas 27 fueron de mastitis clínica, 48 de mastitis subclínica y 65 de animales sanos. Se procesaron en el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Regional Laguna y se cultivaron en un medio específico de Agar *Mycoplasma*. Se revisaron los medios cada 24 horas después del cultivo, durante diez días, observándose crecimiento a partir del tercer día de cultivo. Se observó crecimiento de las colonias características en 42 (30%) muestras. De las 42 muestras positivas 34 (80.95%) correspondieron a vacas con mastitis y 8 (19.05%) a leche de animales sanos.

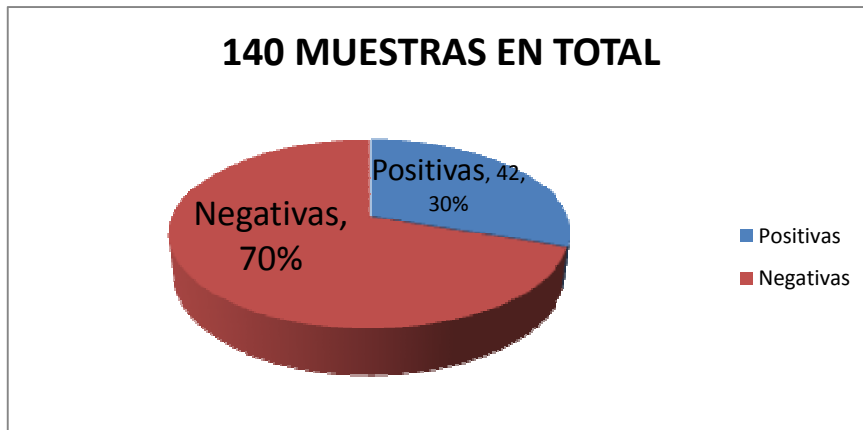


Figura 8. Porcentaje de muestras positivas y negativas, al aislamiento de *Mycoplasma* spp.

La interpretación de los resultados se basó en las características morfológicas típicas de las colonias de *Mycoplasma*, con aspecto de “huevo frito”, realizadas mediante la observación por medio del microscopio estereoscópico.

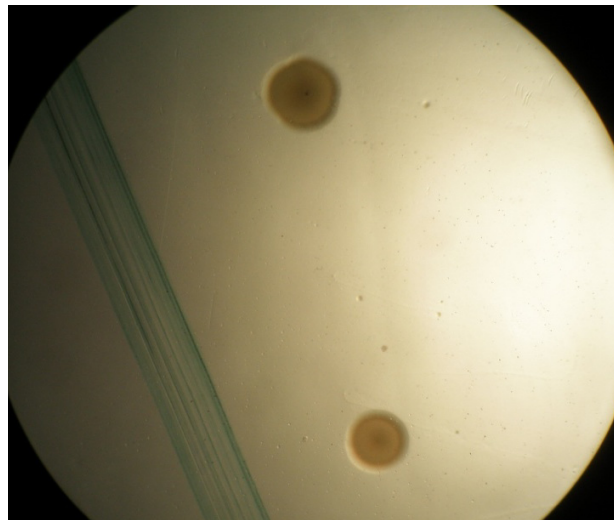


Figura 9. Resultados obtenidos en los medios de cultivo con Agar *Mycoplasma* observados con el microscopio estereoscópico.

El crecimiento de los mycoplasmas se observó a partir del tercer día de cultivo, encontrándose las características más claras en el cuarto y quinto día de cultivo, a

partir de aquí las muestras positivas permanecieron 5 días en la estufa bacteriológica y se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4 a 7 °C. Las muestras sin crecimiento se incubaron por 10 días, para ser diagnosticadas como negativas y posteriormente se guardaron en refrigeración.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La mastitis por *Mycoplasma* spp se caracteriza por una disminución repentina de la producción y calidad de la leche, también porque la infección no responde a un tratamiento antibiótico específico y su propagación se puede dar de forma muy rápida (Butler *et al.* 2000). Es importante identificar en animales sospechosos la presencia de micoplasmas en un corto periodo de tiempo y tratar de disminuir la propagación, para esto son esenciales métodos de diagnóstico específicos para *Mycoplasma* spp. El uso de cultivos de medios selectivos para micoplasma resulta un método simple para su identificación, además de económico es rápido para evidenciar la presencia de micoplasmas en un hato, por tal motivo se utilizó en el presente trabajo. De acuerdo a diversos investigadores, las colonias requieren de 5 a 10 días para desarrollarse (Baird, *et al.* 1999; Owens y Nipper 2008), en nuestro estudio se empezaron a observar crecimientos desde el día 3 y a ser muy evidentes a partir del cuarto y quinto día.

El aislamiento de los micoplasmas a partir de las muestras clínicas no confirma necesariamente su responsabilidad etiológica como lo mencionan Butler *et al.* (2000) pero si da un criterio para realizar acciones de control. A pesar de esta aseveración, en el hato estudiado, con animales confirmados que presentaron mastitis debido a *Mycoplasma* spp, se observó una tendencia a infectar animales aparentemente sanos y sin manifestación de mastitis, de esta manera se comprueba la diseminación rápida entre los animales de un hato y su transmisión puede causar grandes pérdidas económicas si no se realizan medidas sanitarias para su control.

Algo similar mencionan Hernández *et al.* (2003), que la enfermedad puede estar presente sin hacerse aparente, y puede tardar en manifestarse clínicamente, lo que confirma Saeman (1994) quien propone que *Mycoplasma spp* puede ser aislada de hatos con vacas de alta producción que no demuestran signos clásicos ya que el medio ambiente y la capacidad de la vaca influye para resistir la infección.

De acuerdo a los resultados obtenidos, entre animales sanos y con mastitis, se puede apreciar que no todos los animales con mastitis presentan eliminación de micoplasmas en leche y que pocos animales sanos presentan la eliminación de micoplasmas en la leche, probablemente debido a una infección latente por el contacto con animales infectados.

La técnica de cultivo resulta un método de diagnóstico convincente para la identificación de micoplasmas, ya que esta técnica es mencionada por varios autores con resultados favorables. Esta misma técnica es empleada en laboratorios de diagnóstico en donde se aíslan micoplasmas a partir de muestras de leche de vacas con y sin mastitis, permitiendo identificar a las vacas para su aislamiento o segregación rápida del hato, o se puede realizar el cultivo a partir de leche de tanque. Otras pruebas específicas como la de fijación del complemento y la de ELISA dan resultados confiables pero son muy costosas.

De acuerdo a las características morfológicas de las colonias que crecieron a partir del cultivo de leche, se emitió un diagnóstico positivo que correspondió a *Mycoplasma spp*, como lo indican diversos investigadores (Butler *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2003; Kirk y Mellenberger, 1994; Núñez *et al.*, 2008; Oravcova *et al.*, 2009; Quiroz, 2000).

El método de cultivo de muestras resulta un trabajo simple, para identificar el género *Mycoplasma*, pero a su vez es un proceso tardado que no permite la identificación de la especie, para ello se tienen que realizar pruebas más específicas, como análisis inmunoabsorbentes, fijación de complemento y pruebas moleculares, entre otras.

IX. REFERENCIAS

- Baird, S. C., J. Carman, R. P. Dinsmore, R. L. Walker, y J. K. Collins. 1999. Detection y identificación de *mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 11: 432-435.
- Butler, J. A., S. A. Sickles, C. J. Johanns, y R. F. Rosenbusch. 2000. Pasteurization of discard *mycoplasma* mastitic milk used to feed calves: Thermal effects on various *mycoplasma*. J Dairy Sci 83: 2285-2288.
- Byrne, W. *et al.* 2005. Persistence of *mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. Vet Rec 156: 767-771.
- Cai, H. Y., P. Bell-Rogers, L. Parker, y J. F. Prescott. 2005. Development of a real-time pcr for detection of *mycoplasma bovis* in bovine milk y lung samples. J Vet Diagn Invest 17: 537-545.
- Cerdá, R., J. Xavier, P. Sansalone, R. D. L. Sota, y R. Rosenbush. 2000. Aislamiento de *mycoplasma bovis* a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la provincia de buenos aires. Primera comunicación en la república argentina. Revista Latinoamericana de Microbiología 42: 7-11.
- Currin, J. F., N. Currin, y W. D. Whittier. 2009. *Mycoplasma* in beef cattle Virginia Cooperative Extension No. 400-304. p 1-4.
- Fox, L. K., F. J. Muller, M. L. Wedam, C. S. Schneider, y M. K. Biddle. 2008. Clinical mycoplasma bovis mastitis in prepubertal heifers on 2 dairy herds. Can Vet J 49: 1110-1112.
- Gagea, M. I. *et al.* 2006. Naturally occurring *mycoplasma bovis*-associated pneumonia y polyarthritis in feedlot beef calves. J Vet Diagn Invest 18: 29-40.
- Grohn, Y. T. *et al.* 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. J Dairy Sci 87: 3358-3374.
- Hernández, L. A., O. C. L., P. R. G., y T. G. V. 2003. Perfiles electroforéticos de mycoplasmas aislados de mastitis bovina XXVII Congreso Nacional de Buiatría 2003.
- Kirk, J., y R. Mellenberger. 1994. Mastitis control program for *mycoplasma* mastitis un dairy cows Compend Contin Educ Pract Vet. No. 16. p 541-551.
- Martínez, F. I., G. H. F. Gutierrez, y J. L. Chávez. 2004. Identificación de *mycoplasma spp* en leche bovina con una prueba de inmunoperoxidasa. Vet Méx 35: 101-107.

- Muldrew, K. L., y S. C. Edberg. 2009. Growth of adenocarcinoma on routine microbiological media inoculated with fluid from a pleural effusion in an 82-year-old female. *J Clin Microbiol* 47: 1255-1258.
- Núñez, C., E. Morales Salinas, J. J. Martínez Maya, y L. Hernández A. 2008. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante elisa indirecta y aislamiento. *Vet Méx* 39: 161-171.
- Núñez D, C., E. Morales Salinas, J. J. Martínez Maya, y L. Hernández A. 2008. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante elisa indirecta y aislamiento. *Vet Méx* 39: 161-171.
- Oravcova, K., L. Lopez-Enriquez, D. Rodriguez-Lazaro, y M. Hernández. 2009. *Mycoplasma agalactiae* p40 gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time pcr: Assessment of analytical performance y in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J Clin Microbiol* 47: 445-450.
- Owens, W. E., y W. A. Nipper. 2008. Case study: Development of a *mycoplasma* mastitis control program in louisiana. *The Professional Animal Scientist* 24: 103-106.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly, y F. C. Leonard. 2002. *Veterinary microbiology y microbial disease*. Blackwell Science ed.
- Quiroz, M. Á. 2000. *Micoplasmosis FMV-UNAM*.
- Razin, S., D. Yogev, y Y. Naot. 1998. Molecular biology y pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1094-1156.
- Rivera, A., E. Rivera, S. Giono, C. Gil, y I. Cedillo. 2009. Cell cultures contaminations by mycoplasmas. *African Journal of Microbiology Research* 3: 637-640.
- Rivera, J. A., M. L. C. Ramírez, y M. V. Benítez. 2001. Mycoplasmas y su importancia médica. *Rev. BioMed* 12: 262-271.
- Rodrigues, A. C., D. Z. Caraviello, y P. L. Ruegg. 2005. Management of Wisconsin dairy herds enrolled in milk quality teams. *J Dairy Sci* 88: 2660-2671.
- Rosenbusch, R. F. *et al.* 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the united states from 2002 to 2003. *J Vet Diagn Invest* 17: 436-441.
- Sachse, K. *et al.* 2000. Epitope mapping of immunogenic y adhesive structures in repetitive domains of *mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun* 68: 680-687.
- Saeman, A. 1994. A practical look at contagious mastitis NMC publication.
- Sickles, S. A., J. Kruze, y R. N. Gonzalez. 2000. Detection of *mycoplasma bovis* in bulk tank milk samples from herds in southern Chile. *Archivos de medicina veterinaria* 32: 235-240.
- Solís, J. A. A. 2010. Mycoplasma en el ganado lechero • Conferencia Internacional del Ganado Lechero. www.cigal.biz, Hotel Hilton Guadalajara Jalisco, México.
- Swanson, K. *et al.* 2004. Expression of a beta-defensin mrna, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun* 72: 7311-7314.
- Waites, K. B., B. Katz, y R. L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas y ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 18: 757-789.

Waites, K. B., y D. F. Talkington. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* y its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 17: 697-728, table of contents.

X. GLOSARIO

ADENINA: Base purínica que es componente de los ácidos nucleicos, ADN y ARN.

ATONÍA: Ausencia anormal de tono o tensión muscular. Donde lo menciona?

CITOESQUELETO: Es un entramado tridimensional de proteínas que provee el soporte interno para las células, ancla las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de movimiento celular y en su división.

ESTEROL: Gran subgrupo de esteroides que contienen un grupo OH en la posición 3 y una cadena lateral alifática ramificada de ocho o más átomos de carbono en la posición 17.

EUBACTERIA: género de bacterias en forma de bastoncillo, anaerobias gramnegativas, que se encuentran en el suelo y el agua.

FOMITES: Material inerte, como la ropa de cama, que puede transportar organismos patógenos.

HEMATOGÉNO: Originado en o transportado por la sangre.

INMUNOFLUORESCENCIA: Técnica utilizada para identificar rápidamente un antígeno, exponiéndolo a anticuerpos conocidos, marcados con fluoresceína, y observo la característica reacción de precipitación antígeno-anticuerpo.

MASTITIS: Trastorno inflamatorio de las mamas, producido habitualmente por una infección estreptocócica o estafilocócica.

MOLLICUTES: Grupo inusual de bacterias que se distinguen porque carecen de pared celular.

NUCLEÓTIDO: Cualquiera de los compuestos en los que se desdobra un ácido nucleico por acción de las nucleasas. Un nucleótido consta de un grupo fosfato, una pentosa y una base nitrogenada.

OOFORITIS: Trastorno inflamatorio de uno o ambos ovarios, habitualmente asociado a salpingitis.

PLEOMORFISMO: habilidad de algunas bacterias para cambiar de forma o de existir en un número extremo de formas morfológicas cambiantes.

SEMINOVESICULITIS: Inflamación de las vesículas seminales.