

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO Y CULTIVO DE
MYCOPLASMA BOVIS EN VACAS LECHERAS CON
MASTITIS”.**

POR:

ROSEY GARCIA PINTO

MONOGRAFIA

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

JUNIO DEL 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



MONOGRAFIA

**“DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO Y CULTIVO DE
MYCOPLASMA BOVIS EN VACAS LECHERAS CON
MASTITIS”.**

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR:

ROSEY GARCIA PINTO

ASESOR:

MVZ. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

JUNIO DEL 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO Y CULTIVO DE
MYCOPLASMA BOVIS EN VACAS LECHERAS CON
MASTITIS”.**

MONOGRAFIA APROBADO POR EL:

PRESIDENTE DEL JURADO


MVZ. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES

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


MC. JOSE LUIS FCO. SANDOVAL LLIAS



**COORDINACION DE LA DIVISION
REGIONAL
CIENCIA ANIMAL**

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO.

JUNIO DEL 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

POR:


ROSEY GARCIA PINTO

**“DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO Y CULTIVO DE
MYCOPLASMA BOVIS EN VACAS LECHERAS CON
MASTITIS”.**

**MONOGRAFIA, APROVADA POR EL JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**



MVZ. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES
PRESIDENTE



MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS
VOCAL



MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO
VOCAL



MVZ. SILVESTRE MORENO ÁVALOS
VOCAL SUPLENTE

DEDICATORIAS.

A MIS PADRES:

Borís García Tovar.

y

Gloría Pinto Pérez.

A MIS HERMANOS:

Evangélica García Pinto.

Horacio García Pinto.

Leticia García Pinto.

Rebeca García Pinto.

Jane García Pinto.

Lourdes García Pinto.

Eliécer García Pinto.

Justo Jordán García Pinto.

Borís Reynol García Pinto.

A MIS ABUELOS:

Horacio García.

Rebeca Tovar.

Víctor Manuel Pinto.

Clara Luz Pérez.

AGRADECIMIENTOS

A Díos. Gracias dador de vida y sustancia única vital por mi futuro encuentro con lo anhelado, por brindarme las bendiciones recibidas, por escucharme, por liberarme de las interferencias creadas por mi, por entender lo que valgo y lo que busco, por quietarme internamente y lograr reflexionar en plenitud y confianza, hoy te amo y te venero señor todo poderoso.

A mis Padres:

Borís García Pinto y Gloria Pinto Pérez.

Escultores de mi espíritu, sus vidas son guías de mi vida. El amor que me han dado es mi fuerza y mi alegría. Les debo más que mucho, les debo todo. *A mi madre* que cuando tomaba el camino para la universidad, se le rodaban sus lágrimas sobre sus mejillas, lagrimas tan valiosas que me hacían recordar que mis padres siempre esperaban mi regreso, con abrazos, me decía se fuerte y mantente firme, con gran amor que solo una madre puede dar. Son los mejores padres del universo, gracias por todo.

A mis Hermanos:

Evangélica García Pinto, Horacio García Pinto, Leticia García Pinto, Rebeca García Pinto, Jane García Pinto, Lourdes García Pinto, Eliécer García Pinto, Justo Jordán García Pinto, Borís Reynol García Pinto.

Por apoyarme siempre en todo momento, en cual quier momento, a pesar de las diferencias, disgustos que pasamos, es de lo más normal entre hermanos, siempre me apoyaron y lo siguen haciendo, "Gracias queridos hermanos, espero en dios siempre estemos unidos".

A mis Abuelos: Horacio García y Rebeca Tovar.

Víctor Manuel Pinto y Clara Luz Pérez.

Por haber formado parte de mi vida, pilares, por haberme heredado esa genética que corre por mis venas, de quien soy ahora, gracias queridos abuelos.

A la NARRO:

"Mi Alma Terra Mater", donde pase cinco años tan cortos, maravillosos de la carrera, donde me abrió las puertas de riquísimas experiencias de aprendizaje, eres única narro.

A la ciudad de Torreón Coahuila de Zaragoza México:

Por dejarme establecerme en ella para realizar mi carrera profesional en la UAAAN - UL.

A mis Primos:

Ernesto, Gabriela, Noe; Ramírez García.

Yesenia, Ricardo, yareni, brisceida; García González.

Leonel, Henry; Mérida García.

Eric Mauricio Trejo García.

Gloria Belén, Celeste Inés, Maria de Lourdes, José Manuel; Pimentel García.

José jordán, Renato, Emiliano; Canales García.

Jordán, Regina Itzel; García Meza.

Arlet García Penagos.

Ciro, Pavel; García García.

Ricardo Pinto, Cristóbal Rodas, Hugo Rodas.

Gracias a cada uno de ustedes por su apoyo incondicional, por sus consejos, por esas platicas largas en momentos cuando lo necesitaba, Gracias por estar presentes en mi vida, "Dios los bendiga".

Amigos:

Ángel Ruiz (SC_18), Luis (gallero), Mario, Luís Julián, Juanito, Juan Roberto, Áscary, Miguel, Florentino, Jorge (winie), Zacatecas, Nelson, Zaid, Darwin, Rudi, Ramiro, Fernando, Esteban, Los Chihuas.

Edna, Anayanki, Maira, Ara, Nadia, Corine, Blanca, Perla, Vania, besi, Cesi, Karina, Diana, Karen, Maritere, Monze, Claudia.

Quien conocía anteriormente y por conocer en el trayecto de la universidad, gracias por su amistad, momentos de convivencia y compañía, mis mejores deseos.

Al Dr. Francisco Carrillo Morales:

Asesor principal de este trabajo de monografía, quien conocí en el trayecto de la carrera y gracias a el ya esta realizada con el objetivo principal; Titulo de Medico Veterinario Zotecnista.

QFB. Margarita Mendoza Ramos:

Por sus consejos tan oportunos en algunos de los momentos más difíciles en el trayecto universitario, por brindarme su apoyo y confianza.

Dr. Agustín Cabral Martell:

Quien fue uno de los profesores que siempre confiaron en mí y siempre dispuesto para brindarme su apoyo incondicional, a pesar de poco tiempo de conocerlo.

MVZ. Carlos Ramírez Fernández:

Quien despertó mi interés por la carrera, arriesgar al 100% en las practicas, por sus extraordinarias clases, siempre con mucho interés, como solo el lo sabe hacer.

G R A C I A S

ÍNDICE

Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Índice	IV
Índice de cuadros y figuras	VI
Titulo	VII
Resumen	VIII
Introducción	1
Objetivo	3
Antecedentes	4
Aspectos generales de Mycoplasmosis	5
Microbiología	5
Características generales	7
Mastitis causada por Mycoplasma	8
Cepas de Mycoplasma	11
Especies de Mycoplasma	11
Reseña Histórica	12
Presentación de Cuadros Clínicos	13
Epidemiología	15
Patogenia	18
Diagnostico	19
Tratamiento	19
Impacto Económico	20
Pruebas Diagnosticas de Mastitis	22
Cultivo Microbiológico	23
Aislamiento de Mycoplasma Bovis	24
Pruebas bacteriológicas	24
Conteo de Células Somáticas por Microscópia Directa	25
Método de detección de Mastitis Bovina	25
Método Somaticell	26
Reducción de nuevas infecciones, factores que intervienen	26
Consideraciones para el Control de Mastitis	29
Procedimientos para el Diagnostico de Mastitis Bovina	31
Colección de Leche	31

Cloro en Leche	31
Determinación del Ph en Leche	32
Determinación de Albúmina serica en Lehe	32
Conductividad eléctrica	32
Determinación de número de células somáticas	33
Prueba de California para Mastitis (CMT)	34
Procedimiento para la prueba de CMT	34
Prueba de de Wisconsin para determinar Mastitis (WMT)	36
Estudio del Hato	37
Antisépticos para pezones	37
Antecedentes por Mastitis Por Mycoplasma	38
Conclusión	52
Literatura citada	53

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura. Sección trasversal de la infección Pulmonar	9
Figura. Infección en articulaciones	10
Figura 1. Procedimiento de siembra, incubación e identificación	24
Cuadro 1. Estadística mensual de mastitis	30
Tabla 1. Interpretación de las pruebas para mastitis	34
Tabla 1. Relación en milímetros de la columna con el número de células/ml	37

**“Diagnostico Microbiológico y Cultivo de Mycoplasma
Bovis en Vacas Lecheras con Mastitis”**

RESUMEN

La mastitis por *Mycoplasma bovis* se caracteriza por presentación de cuadros clínicos severos que generalmente afectan a más de una glándula mamaria, con pérdida cuantiosa en la producción de leche, casos que son resistentes a los tratamientos. La infección puede ser introducida al hato por un animal infectado, o aparecer como consecuencia de la infección en glándula mamaria a través del equipo de ordeño; después se puede propagar por medio del personal de ordeña, las pezoneras de las ordeñadoras mecánicas y por soluciones que usualmente se emplean para el lavado de las ubres. Las épocas o condiciones frías y húmedas aumentan la incidencia de la infección, ya que los Mycoplasmas pueden sobrevivir más tiempo en esas condiciones. Bedolla, C. C. (4) 2005.

Los *Mycoplasmas*, son considerados como bacterias incompletas que carecen de pared celular, son pleomórficos observándose generalmente de forma esférica o filamentosa, tamaño menor a las 500 milimicrómetro, son aeróbios, su desarrollo se da bien en leche aún con presencia de elevadas cantidades de leucocitos.

El objetivo de esta Monografía es mostrar la importancia que tiene el aislamiento y diagnóstico de *M. Bovis* que carece de tratamiento específico y describir las características más importantes de mastitis por *Mycoplasma* en las unidades de producción pecuaria, sobre la base de estudios realizados en diversas partes del mundo y en México. Los síntomas clínicos, diagnóstico, epidemiología, y un plan de acción son presentados.

Palabras claves: Mastitis, *Mycoplasma bovis*, diagnóstico, microbiológico

INTRODUCCION

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que se produce como respuesta al daño causado por diferentes agentes agresores, microorganismos y sus toxinas, productos químicos, traumas, temperaturas extremas, etc. La gran mayoría de los casos de mastitis se debe a la penetración de microorganismos, generalmente bacterias. *Andresen s Hans., 2001.*

La mastitis bovina está considerada como una de las enfermedades más complejas y costosas de las que afectan a la industria láctea. Su complejidad se debe a los numerosos y variados agentes patógenos que pueden causarla, la variedad y magnitud de la respuesta que puede producirse en el animal infectado, los múltiples factores que influyen en su ocurrencia y los resultados encontrados en las medidas de control.

Aunque su erradicación es prácticamente imposible, algunos programas de control permiten reducirla a niveles aceptables. En los países desarrollados la rentabilidad de las explotaciones lecheras depende del mantenimiento de bajos niveles de mastitis y la producción de leche de buena calidad, a fin de evitar penalizaciones y acceder a los pagos de incentivos por calidad de leche.

Los excelentes niveles de producción y calidad de la leche logrados en algunos países, se relacionan con: 1) El reconocimiento de la importancia de la mastitis como factor que limita la producción de leche y por tanto, la rentabilidad de las fincas lecheras; 2) La aplicación de programas de control de mastitis y producción de leche de calidad; 3) El desarrollo de políticas lecheras coherentes y bien definidas; 4) El establecimiento de sistemas de vigilancia de mastitis y calidad de leche, basados en métodos de diagnósticos, como el cultivo bacteriológico y el recuento de células somáticas en leche, usados para cumplir los programas de incentivos y penalizaciones. *Andresen s Hans., 2001.*

La mastitis bovina es una enfermedad de distribución mundial y ha sido catalogada como la más costosa de todas las enfermedades que afectan al ganado lechero. En los Estados Unidos se ha estimado que los productores de leche pierden dos billones de dólares anuales debido a la mastitis y en México, diferentes estimaciones, apuntan también a pérdidas millonarias. El tremendo impacto económico de la mastitis se deriva de la reducción en la producción de leche, el descarte de la leche no comerciable, los costos de los reemplazos, costo de servicios veterinarios y tratamientos, labor extra, depreciación en los animales. Adicionalmente, la mastitis causa alteraciones en la composición láctea que tienen un impacto negativo en el rendimiento de la leche y en la calidad y vida útil de los productos derivados. *Fox, L. K, et al., 2005.*

OBJETIVO

El objetivo del siguiente trabajo fue aportar información relacionada acerca de las pruebas que se realiza para el Diagnostico y Cultivo de "Mycoplasma Bovis" lo mas oportuno posible en las Unidades de Producción Pecuaria.

Realizando una comparación de la efectividad de la prueba que se emplea, en un Establo de la Comarca Lagunera, en donde se emplearon 205 vacas sospechosas de M. Bovis, con la prueba de Agar Mycoplasma, resultando positivas 105 vacas de la explotación. Mismas que fueron eliminadas.

ANTECEDENTES

Especies, Subespecies y Serovares.

Se han identificado más de 130 especies, subespecies y serovares de bacterias causantes de la enfermedad; sin embargo, más del 75% de los casos se deben a microorganismos GRAM Positivos, particularmente especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La infección comienza con la presencia de microorganismos patógenos en el extremo del pezón, la penetración de los mismos a través del canal y su establecimiento final en la glándula mamaria. Una vez allí, invaden y producen daño en el tejido glandular cuya consecuencia directa es una disminución en la producción de leche. La enfermedad tiene dos formas básicas de presentación: clínica y subclínica que, por lo general, no son más que fases del proceso inflamatorio. *Andresen S, H., 2001.*

En la forma clínica se presentan evidentes signos de inflamación como tumefacción, rubor, dolor, cambios notables en la secreción y eventualmente, signos sistémicos como fiebre, pérdida del apetito y depresión. La forma subclínica se caracteriza por la existencia de inflamación sin los signos macroscópicos que permiten reconocerla, por lo que generalmente pasa desapercibida, a pesar de ser 20 a 50 veces más frecuente que la forma clínica. En Venezuela, todos los estudios señalan una alta prevalencia de mastitis subclínica, que afecta a más del 25% de los cuartos y más del 50% de los animales, mientras que la prevalencia de casos clínicos generalmente es menor al 3%. *Medina, R.J., 2002.*

Desde el punto de vista epidemiológico, los patógenos causantes de la mastitis se han clasificado en los siguientes tres grupos, de acuerdo a su origen y forma de transmisión en el rebaño:

- Patógenos Contagiosos; *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, y *Corynebacterium bovis*.
- Patógenos Ambientales; *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Arcanobacterium pyogenes*,
- Patógenos Oportunistas; *Staphylococcus hycus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus intermedius* y muchas otras especies de estafilococos, que forman parte de la flora normal de piel. *Belloda, C.C., Castañeda, V.H. 2003.*,

ASPECTOS GENERALES DE MYCOPLASMOSIS.

La Mycoplasmosis es una enfermedad infecciosa que afecta a varias especies animales. Es causada por microorganismos del género *Mycoplasma*, que pertenece a la clase Mollicutes, orden Mycoplasmatales y familia Mycoplasmatacea. Los Mycoplasmas son microorganismos pleomórficos, carecen de pared celular, miden de 200 a 500 micrómetros, crecen en medios sólidos y líquidos, y utilizan glucosa como fuente de energía. 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. *Byrne, W., B. Markey, R. McCormack., J., et al. 2005.*

Microbiología.

Los Mycoplasmas no están clasificados como virus ni bacterias, sino como organismos intermedios. Que van en tamaño de 0,2 micrómetros a 1, son los más pequeños organismos vivos capaces de auto-replicación. Los Mycoplasmas se agrupan en virtud de la clase Mollicutes, en el sentido de "soft la piel". Este nombre es en referencia al hecho de mycoplasmas que no tienen la capacidad genética para producir una pared celular, componente de la mayoría de las bacterias. Sin una sola pared para proporcionar una estructura

rígida, Mycoplasmas pleiomorphic-se pueden fácilmente cambiar de forma y pueden aparecer en forma de pera o circular. La falta de una pared celular también ayuda a explicar, las infecciones por Mycoplasma por qué no responden bien a la terapia antibiótica. *Byrne, W., B. Markey, R. McCormack., J., et al. 2005.*

Comúnmente utiliza los beta-lactámicos, tales como las penicilinas al interferir con la formación de la pared celular. La falta de una pared celular niega la eficacia de esas drogas. Otro factor importante que contribuye a la resistencia a los medicamentos comunes para la mayoría de las infecciones de Mycoplasma es la capacidad del organismo para cambiar su superficie proteínas. Normalmente, el sistema inmunológico desarrolla anticuerpos dirigidos contra determinados proteínas en la superficie del organismo. Si estas proteínas se alteran, los nuevos anticuerpos deben ser producidos. Los Mycoplasmas se encuentran en todas partes en el medio ambiente y han sido cultivadas de los seres humanos, en alimentos, animales, las plantas y el suelo. Hasta la fecha, se ha detectado diferentes especies de Mycoplasma; Para ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, pollos, pavos, perros, gatos, caballos, y los roedores. *Citti, C., A, Lischewski, K., et al.2000.*

En ganado bovino es posible aislar varias especies de *Mycoplasma*, de ellas, *Mycoplasma alkalences*, *M. bovis genitalum*, *M. bovis*, *M. californicum* y *M. canadense* provocan mastitis, artritis, neumonías, otitis y problemas reproductivos, entre otras manifestaciones. *Andresen S, H. 2001*

El nombre mollicutes se deriva del latín mollis (suave) y cutes (piel), y todas estas bacterias hacen carecer de una pared celular, la genética y la capacidad de sintetizar peptidoglycanos. El nombre de "Mycoplasmas" se ha denotado comúnmente todos los miembros de esta clase. A pesar de la falta de una pared celular, Mycoplasma y parientes han sido clasificados en el filo *Firmicutes* que consta de bacterias Gram-positivas como *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* basado en la 16S rRNA gen análisis.

Los miembros de Mollicutes cultivadas actualmente están organizados en cuatro órdenes: *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*, *Entomoplasmatales* y *Mycoplasmatales*. El orden Mycoplasmatales contiene una sola familia, Mycoplasmataceae, que contiene dos géneros: Mycoplasma y Ureaplasma.

Históricamente, la descripción de una bacteria que carecen de una pared celular fue suficiente para clasificar al género Mycoplasma y, como tal, es la más antigua y más grande del género de la clase con cerca de la mitad de especies (107 válidamente descritas). Limita por lo general a cada una de las especies acogidas y con muchos anfitriones albergar a más de una especie, algunos patógenos y algunos comensales. *Correa, M.G.P., y Marín, J.M. 2002.*

Características Generales.

En estudios posteriores, muchas de estas especies se consideran filogenéticamente distribuidos entre por lo menos tres órdenes. Un criterio para limitar la inclusión dentro del género Mycoplasma es que el organismo tiene un huésped vertebrado. De hecho, el tipo de especies, *M. Mycoides*, junto con otras importantes especies de Mycoplasmas como *M. Capricolum*, es evolutivamente más estrechamente relacionado con el género *Spiroplasma* en la orden Entomoplasmatales que a los demás miembros del género Mycoplasma. Esta y otras discrepancias probablemente siguen sin resolverse debido a la extrema confusión que el cambio pueda generar entre los médicos y las comunidades agrícolas.

El resto de especies del género Mycoplasma se dividen en dos grupos taxonómicos, hominis pneumoniae y sobre la base de secuencias de genes 16S rRNA. El grupo hominis contiene grupos filogenéticos de *M. Bovis*, *M. Pulmonis*, y *M. Hominis*, entre otros. El grupo pneumoniae contiene los grupos de *M. Muris*, *M. Fastidiosum*, *U. Urealyticum*, en la actualidad un cultivo *haemotrophic mollicutes*, a que se refiere oficiosamente como *haemoplasmas* (recientemente transferido de los géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon*, y el *M. Pneumoniae* clúster. Este grupo contiene las especies (y probablemente

la de costumbre o acogida) *M. Alvi* (bovina), *M. Amphoriforme* (humanos), *M. Gallisepticum* (aviar), *M. Genitalium* (humanos), *M. Imitans* (aviar), *M. Pirum* (incierto / humanos), *M. Testudinis* (tortugas), y *M. Pneumoniae* (humanos). La mayoría, si no todas estas especies comparten algunas características únicas de otra que incluye un archivo adjunto de organélos, homólogos de la *M. Pneumoniae*. Ariznabarreta, A. et al., 2002, Báez, G. J. J. 2002. Bedolla, C. C. 2005).

MASTITIS CAUSADA POR MYCOPLASMA.

Mycoplasma bovis ha sido descrito como el agente etiológico de mastitis, artritis, neumonías e infertilidad en ganado bovino. A su vez, esta especie ha sido la más frecuentemente aislada entre los Mycoplasmas productores de mastitis bovinas. McAuliffe Let. et al, 2004.

La mastitis por Mycoplasmas está caracterizada por signos clínicos severos, que pueden involucrar desde uno a todos los cuartos de la glándula mamaria y por la resistencia a los antibióticos convencionales. En otros casos, los animales infectados pueden permanecer como reservorios asintomático. 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 Mycoplasmas pueden alcanzar la glándula mamaria por vía hematógena. Miranda mre, López, rm, Oviedo vg. Et al. 1993.

Mycoplasma Bovis se refiere, según Taylor en el 2001, Myco= se refiere al estudio de los organismos que se clasifican como hongos. Plasma= se refiere al echo de que carece de una pared celular, si no que tiene un liquido como estructura de su membrana. Bovis= al animal que infecta.

Esta clasificado según, Ramel 2008 y Cree 2002, en el siguiente orden:

Reino: Bacterias

Phylum: Firmicutes

Clase: Mollicutes

Orden: Mycoplasmatales
Familia: Mycoplasmataceae
Género: Mycoplasma

El árbol filogenético se basa principalmente en los rasgos de una bacteria. Esta clasificada como debajo de las bacterias Gram Positivas a pesar de que carece de una pared celular, esto se debe a una porción de peptidoglycanos en las tres capas de la membrana que rodea la célula. *Taylor en el 2001.*

M. bovis habita en una gran variedad de lugares, en los animales, en el sustrato, medio ambiente, puede provocar un amplia variedad de efectos múltiples en áreas del cuerpo ejemplo en los pulmones (neumonía): en terneros a una edad muy temprana, resultando mayor tasa de mortalidad, por estertores fácilmente es diseminado a otros animales, la bacteria se trasmite por en el aire.

Sección trasversal de la infección pulmonar.



En un ternero se encuentra una infección en las articulaciones (artritis) por *M. Bovis*, por consecuencia de toma de leche contaminada, una vez establecida la infección tiene la capacidad de viajar a diversas partes del cuerpo. Desarrolla hinchazón de la articulación y dolor para el animal. La artritis puede propagarse a un solo conjunto en el animal o varias articulaciones, que afectan en gran medida la capacidad del animal para moverse. *Brishard, S. (2003).*



Una vez establecida la infección en la vaca afectada, tiene la necesidad de nutrirse de las células, infecta tracto respiratorio, tiene más afinidad a áreas que tienen un alto contenido de colesterol. El colesterol es utilizado por este, para crear esteroides, componente esencial de mantenimiento de la membrana. *Ramel 2008.*

Mycoplasma Bovis se clasifica como el más pequeño de los organismos de 0,2 a 0,8 micrómetros que puede reproducirse por fisión binaria “forma de reproducción en la mayoría de las bacterias para crear nuevas crías”. Esta consiste en la replicación de su DNA de la bacteria, se lleva a cabo la segregación cromosómica, viene la separación y formación completa de la bacteria. *Mayer 2008.*

Los *Mycoplasmas*, en general, son muy eficientes microorganismos y por ello se han adaptado a diferentes tipos de tejidos. Es capaz de infectar a muchos animales, debido a características. Falta de una Pared Celular Activa: solo contiene tres capas de membrana plasmática, que permite que pueda modificarse en su estructura. Las formas en que las podemos encontrar es en pera, huevo frito, filamentosa. Cambio de Proteínas en la superficie de la célula: como resultado el sistema inmunológico de la vaca no reacciona y es incapaz de producir anticuerpos contra a la bacteria. Actualmente los antibióticos que se utilizan hoy en día son ineficaces debido a que estos fármacos específicamente van dirigidos a atacar la pared celular de las bacterias. *Taylor 2001., Cree 2002.*

Las mastitis causadas por mycoplasmas son controladas principalmente mediante la identificación y reemplazo de los animales infectados del rodeo, por lo que es de suma importancia la detección temprana de los mismos. *Abdullah Al., Fadl EA., 2006.*

Para tal fin, *el método de diagnóstico más utilizado es el aislamiento a partir de muestras de tanque o de los cuartos mamarios de los animales sospechosos. Morin, D. E., 2004.*

En el año 1963 se observaron los primeros casos de mastitis por Mycoplasmas en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). A partir de 1970 y hasta el momento, muchos tambos de diferentes estados de EUA han diagnosticado mastitis por *M. bovis*. También otros países como Francia, Gran Bretaña, Italia, Canadá e Israel han aislado *M. bovis* de sus rodeos lecheros con mastitis clínicas y subclínicas. *Morin, D. E., 2004., McAuliffe Let. et al., 2004*

Cepas de *Mycoplasmas*

Son varias las cepas de *Mycoplasmas* capaces de producir mastitis, entre las que se mencionan: *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *M. alkalescens*, *M. canadense*, *M. californicum*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. dispar*, *M. laidlawii*, *Ureaplasma*. Considerándose entre los más agresivos el *M. Bovis*. *Kauf, A, et al., 2000.*

Especies de *Mycoplasmas*

Hay varias especies de *Mycoplasmas* que colonizan en diferentes sitios en los bovinos, principalmente razas lecheras. Algunas de ellas se consideran patógenas, mientras que otras son presentes en la flora normal. Las enfermedades causadas por *Mycoplasmas* en el ganado por lo general se subestiman de gran importancia. Haciendo caso omiso de *Mycoplasma mycoides* subsp y otras especies de *Mycoplasma* causan problemas respiratorios y reproductivos y otras enfermedades. Entre estos *Mycoplasmas*, *M. Bovis* es el más importante en Europa y América del Norte. Este organismo

es una causa importante de neumonía bovina, mastitis (*Byrne et al., 2005*), artritis, abortos, y trastornos reproductivos y la reducción de la fecundidad in Vitro. En raras ocasiones puede ser aislado de otras enfermedades, tales como la otitis, abscesos meníngeos. Los gastos de *M. Bovis* a la mastitis se estima que son mucho más elevados (\$ 108 millones), (*Rosengarten y Citti, 1999*).

También otros países como Francia, Gran Bretaña, Italia, Canadá e Israel han aislado *M. bovis* de sus hatos lecheros con mastitis clínicas y subclínicas. En la República Mexicana, si bien son frecuentes los brotes de mastitis clínicas y subclínicas refractarias a los tratamientos convencionales, poco se ha informado hasta el momento de aislamientos de Mycoplasmas como agentes responsables de los mismos, *Bedolla, C. C. 2005*.

RESEÑA HISTÓRICA.

Mycoplasma bovis fue aislado por primera vez en los EE.UU. de la leche de una vaca con mastitis en 1961 (*Hale et al. 1962*). En primer lugar, se obtuvo el nombre *Mycoplasma bovimastitidis* entonces *Mycoplasma agalactiae* subsp. *M. Bovis*, a causa de los cuadros clínicos similares a la agalactia contagiosa del ganado ovino causado por *M. Agalactiae*. Más tarde, tras el examen del 16S ribosomal RNA fue elevada a la categoría de especies Rango y recibió el nombre de *Mycoplasma bovis*. *Rosengarten, R., and C. Citti. 1999*.

Al principio *Mycoplasma bovis* fue clasificada como una pleuroneumonía-como organismo (PPLO). La primera verdadera muestra de la bacteria se encontró en 1898 en el Instituto Pasteur (*Taylor 2001*).

En el año 1963 se observaron los primeros casos de mastitis por *Mycoplasma* en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). A partir de 1970 y hasta el momento, en muchos tambos de diferentes estados de EUA han diagnosticado mastitis por *M. bovis*. Antecedentes de mastitis por *Mycoplasma*, sólo en las últimas décadas en que los productores han reconocido las intratables formas de la neumonía, la artritis, y mastitis causada por diversas

especies de *Mycoplasma*. El primer caso de *Mycoplasma*, fue por mastitis y se produjo en Inglaterra en 1960. Un año más tarde, en 1961, el primer brote en los Estados Unidos se produjo en Connecticut, seguido de varios casos en Nueva York. California documenta por primera vez su primer caso de mastitis por *Mycoplasma* en 1964. Hoy en día, la enfermedad es prevalente en todas las principales regiones lecheras de los Estados Unidos, especialmente California, Nueva York, Pennsylvania, Florida, Arizona, Idaho, y Washington. Las estadísticas actuales, estiman que el 1% a 4% de todos los casos están presentes EE.UU. *González, R. M., et al., 1992*

En México, *Ávila T. S, et al., 1993*, Informaron sobre el aislamiento de *Mycoplasma* spp en un hato lechero ubicado en el Estado de México. Describieron un brote de mastitis causado por *M. bovis* en un hato lechero del mismo estado; observaron prevelecia de *M. bovis* mayor a 50% en bovinos en el trópico de México; Castro en el 2008, Informa del aislamiento de *M. spp* proteolítico de un brote de mastitis en un hato lechero en Tizayuca, Hidalgo, México.

Infante, M, et al., en 1999, reportan el aislamiento de *Mycoplasma* canadense en el estado de Jalisco.

Entre las mastitis causadas por los *Mycoplasmas*, *M. Bovis* es el más frecuente, además se le encuentra en mucosas y en secreciones de los tractos respiratorio y urogenital. *Mycoplasma bovis* ha sido descrito como el agente etiológico de mastitis, artritis, neumonías e infertilidad en ganado bovino. A su vez, esta especie ha sido la más frecuentemente aislada entre los *Mycoplasmas* productores de mastitis bovinas. *Lee KH, et al. 2008*.

Presentación de cuadros clínicos.

La mastitis por *Mycoplasma* se caracteriza por presentación de cuadros clínicos severos que generalmente afectan a más de una glándula mamaria, con pérdida cuantiosa en la producción de leche, casos que son resistentes a los tratamientos. La infección puede ser introducida al hato por un animal

infectado, o aparecer como consecuencia de la infección en glándula mamaria a través del equipo de ordeño; después se puede propagar por medio de los ordeñadores, las pezoneras de las ordeñadoras mecánicas y por soluciones que usualmente se emplean para el lavado de las ubres. Las épocas o condiciones frías y húmedas aumentan la incidencia de la infección, ya que los *Mycoplasmas* pueden sobrevivir más tiempo en esas condiciones. *Bedolla, C. C. (4) 2005.*

Los signos clínicos de mastitis aparecen días después de la infección, la cual puede darse en cualquier fase de lactancia; el antecedente es una mastitis aguda en uno o más cuartos, que a la palpación se perciben calientes, hinchados, edematosos o duros, las secreciones varían en su aspecto. *Adkinson, R. W., R. H. Gough., et al. 2005.*

Por lo regular, la primera secreción puede ser acuosa y tener “copos” de un material arenoso. *Bannerman, D., et al. 2006.*

Transcurridos varios días, las secreciones se pueden convertir en un exudado purulento. Si la enfermedad progresa, los conductos galactóforos desarrollan metaplasia escamosa, y algunos conductos y acinis se llenan de exudado granulomatoso. *Bedolla, C. C. 2005.*

La mastitis aguda por *M. bovis* se disemina en un periodo corto, la producción de leche disminuye drásticamente, salvo en los casos subclínicos. Tradicionalmente, el único método de diagnóstico de rutina ha sido el aislamiento e identificación de *M. bovis*, que requiere de dos a diez días. *Abdullah Al., Fadi EA., 2006 y Adkinson, R. W., R. H. Gough., et al. 2005.*

En la actualidad existen otras técnicas de diagnóstico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación *in situ*. Así mismo, hay técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar antígenos y anticuerpos contra *M. bovis*. 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. *Bannerman,*

D. D., A. Chockalingam., et al. 2005 y Bannerman, D. D., M. J. Paape., et al. 2004.

La prueba detecta anticuerpos de los 13 a los 720 días pos infección. La especificidad no revela reactividad cruzada con sueros hiperinmunes de otras especies de *Mycoplasma*, excepto una pequeña reacción con *Mycoplasma arginini*. *Bannerman, D. D., M. J. Paape. 2005*

Con reactivos comerciales de ELISA para detectar anticuerpos en contra de otras especies de *Mycoplasma*, se ha observado sensibilidad de 96% y especificidad de 98%. El diagnóstico de mastitis asociada con *M. bovis* representa un problema, ya que por lo regular suele realizarse sólo hasta después de haber descartado otras etiologías; además, el tiempo que transcurre para ello hace que generalmente cuando se determina la causa, ya existen signos clínicos y lesiones graves, por lo que resulta más complicado y costoso su tratamiento. Por esta razón, es necesario buscar alternativas de diagnóstico que identifiquen la infección en casos de mastitis subclínicas, de manera fácil, rápida y económica. Por lo anterior, se buscó evaluar una prueba de ELISA indirecta, para determinar su efectividad en el diagnóstico de mastitis subclínica asociada con *M. bovis*. *Bedolla, C. C., y Castañeda, V. H. 2003.*

EPIDEMIOLOGÍA

En la epidemiología de este padecimiento es importante tener en mente que el microorganismo podrá establecerse en vías respiratorias o en el aparato reproductor, persistir por meses y alcanzar a la ubre por vía sistémica para manifestarse con cuadros clínicos de mastitis como agente primario o secundario. La mastitis causada por *Mycoplasma* es un problema mundial. *Fox et al., 2005.* Entre las diferentes especies de *Mycoplasmas* que infectan a los bovinos, *Mycoplasma bovis* es el patógeno más común y causa de la mastitis. La prevalencia de *Mycoplasma* inducida por la mastitis se considera subestimado debido a su largo período de incubación antes de la aparición de síntomas clínicos y su persistencia después del cese de los signos clínicos,

ambas de las cuales dificultan su identificación como el agente causal en un determinado caso de mastitis. *Jasper, 1981.*

Según lo más reciente de estudios en 2002 del Sistema Nacional de Control de Sanidad Animal Lechero (USDA), el 7,9% de los productos lácteos de muestras de tanque de leche fue positivo a las pruebas de *Mycoplasma bovis* representa el 86% de las muestras positivas (*USDA-APHIS, 2002*).

El porcentaje más alto (9,4%) en las industrias lácteas de pruebas positivas para *Mycoplasma* se encontraban en las regiones occidentales de los Estados Unidos. La distribución de *Mycoplasma* no se limita a esta región, sin embargo, debido a las muestras positivas se recuperaron de un 76% de los encuestados. Debido a que los rebaños en esta encuesta fueron incluidos en la muestra sólo una vez, la prevalencia de *Mycoplasma* fue probablemente subestimados. *Mycoplasma bovis*, causa pérdidas económicas considerables para la industria láctea, la mastitis por *Mycoplasma Bovis* da resultados en la disminución de la producción de leche, la disminución de la calidad de la leche, las pérdidas económicas se han estimado a 450 dólares enfocadas en la leche, pérdidas de valor por sí solo, a causa de mastitis clínica causada por *Mycoplasma*. Porque no son eficaces los antibióticos o vacunas que han sido aprobados para el tratamiento o prevención de infecciones intramamarias, causada por *M. bovis*, el sacrificio se recomienda para controlar la enfermedad, sin embargo, esto se traduce en considerables costos de reposición de animales al productor. *Nash, D. L., Roger., et al.2003.*

Mycoplasma es un patógeno altamente contagioso que puede propagarse de vaca a vaca por las manos de ordeñadores y fómites, tales como la leche, jergas en la sala de ordeño etc. La naturaleza contagiosa de este agente patógeno se observa por su alta prevalencia en rebaños con un historial de mastitis con *M. Bovis*. En una vaca infectada, *Mycoplasma* se pueden propagar vía hematogena a varios sitios. Además de la glándula mamaria, *M. bovis*, coloniza a otros sitios, para inducir artritis, neumonía y trastornos genitales en el ganado. *Nash, D. L., Roger et al., 2003.*

El establecimiento de la infección se rige, en parte, por la naturaleza de la respuesta que tiene el microorganismo al momento de invadir el organismo. Es bien sabido que *Escherichia coli* causa infecciones intramamarias, sigue un curso clínico en comparación con la de *Staphylococcus aureus* o *M. Bovis*. La infección por *E. coli* Intramamaria es de carácter agudo y, en general, se controla a pocos días. Por el contrario, las infecciones por *Staph. Aureus* o *M. bovis* es a menudo menos grave, pero los resultados en una infección crónica que puede persistir durante la vida del animal afectando su vida productiva. Otros investigadores han establecido que el diferencial de la respuesta inflamatoria suscitó durante *E. coli* y *Staph. Aureus* por la Infección intramamaria, corresponde con la resolución de la infección, *Riollet et al., 2000; Bannerman et al., 2004.*

En comparación con *Staph. Aureus*, la Intramamaria por *E. coli* provoca una respuesta aguda de citoquinas inflamatorias y el aumento de la activación del complemento. Cabe destacar, en particular, *Staph. Aureus* causa Infecciones que se caracteriza por la total ausencia de producción de IL-8, o factor de necrosis tumoral (TNF), y la disminución global de la respuesta inflamatoria característica de *Staph. Aureus*, la Infección intramamaria se correlaciona con su capacidad para persistir en la glándula. Estos datos indican que hay patógenos que dependen de la variabilidad en el país del tipo de respuesta inmune innata a infección intramamaria. *Bannerman., etal.2004.*

La capacidad de reconocer por motivos compartidos a diversos agentes patógenos permite al sistema inmune innato, responder a una multitud de agentes patógenos. Estos patógenos muestran diversos patrones moleculares asociados, que incluyen la membrana celular de bacterias y componentes de la pared de LPS, como el peptidoglicano, ácido lipoteichoico, y la activación de macrófagos-lipopeptide 2 kDa (Aderem y Ulevitch, 2000). Lipopolisacárido, un componente altamente proinflamatorias de todas las bacterias gram-negativas incluyendo *E. coli*, es reconocido por Toll-like receptor (TLR). Dentro de la pared celular del *Staphilcoco. Aureus* y otras bacterias, y lipopeptides dentro de la membrana celular de *Mycoplasma*, son reconocidos por TLR-2 en correlación con TLR-1 o TLR-6, . Por lo tanto, la capacidad de reconocer los

elementos conservados expresados por una serie de bacterias permite al sistema inmune innato de responder a un gran número de bacterias con sólo un limitado repertorio de elementos de reconocimiento. *Todhunter D, Smith Lk, Hogan S., 2003. E. H., R. D. Shank., et al. 2004.*

Nishiguchi et al., 2001; Seya y Matsumoto, 2002. En relación con otros importantes patógenos de mastitis, se sabe poco sobre la naturaleza de la respuesta inmune innata intramamaria a la infección por *M. bovis*. Debido a *M. Bovis* se establece como una infección crónica similar a *Staphilococo aureus*, y como immunoestimulador que contiene componentes que activan el mismo receptor inmune similares a los componentes que se encuentran en el *Staphilcoco aureus*, esto da la hipótesis de que la respuesta inflamatoria provocados por *M. Bovis*, se asemejan a la evocada por *Staphilcoco. Aureus*.

PATOGENIA

El microorganismo se aloja en la vaca donde puede establecerse y posteriormente progresar vía sistémica afectando al aparato respiratorio, reproductor, ubre, articulaciones, etc., o bien ser trasladado directamente a la glándula mamaria por el meato del pezón durante las diferentes actividades realizadas por el hombre con la vaca en ordeño. En la glándula mamaria afectada el microorganismo es responsable de la presentación de necrosis tisular muy pequeña. *Djabri B., Barielle, et a., 2003.*

Los microorganismos pueden invadir el canal del pezón por distintas vías: (1) Entre ordeños las bacterias pueden avanzar por el canal del pezón por multiplicación, (2) pueden ingresar por la presión física ejercida sobre la punta del pezón cuando la vaca se mueve, (3) durante el ordeño mecánico pueden ser impulsados hacia el canal del pezón o desde el mismo hacia el interior de la cisterna del pezón, por los impactos que causan las fluctuaciones de vacío contra el orificio del pezón y (4) durante la aplicación de un antibiótico pueden ser empujados físicamente a través del canal del pezón por la inserción completa de la cánula. *Philpot y Nickerson, 2000.*

La invasión microbiana de la glándula mamaria ocurre siempre siguiendo la vía del conducto del pezón y a primera vista, el desarrollo de la inflamación después de la infección se antoja como un fenómeno natural. Sin embargo, la aparición de la mastitis es más compleja de lo que este concepto puede indicar y quizás resulte más satisfactorio explicarla en términos de tres etapas: invasión, infección e inflamación.

Etapa de invasión.- Es aquella en la que el microorganismo pasa del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el interior de la cisterna del pezón.

Etapa de infección.- Este es el momento en que los microorganismos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario; se establece una población bacteriana que se disemina por toda la glándula, dependiendo de la patogenicidad del microorganismo.

Etapa de inflamación.- Todo lo anterior deriva en una inflamación (mastitis) y aumenta notablemente la cuenta leucocitaria en la leche ordeñada. *Carrión, G. M. 2002.*

Diagnostico.

Con base al análisis de la eficiencia con que se realizan las prácticas de manejo durante el ordeño, la anamnesis comprendida en la historia clínica, cuadro sintomático , examen microscópico de un frotis de leche teñido con la técnica de Giemsa, Wright-Leishman, o estudio con anticuerpos fluorescentes en busca del agente etiológico, se funda el diagnóstico presuncional, que sumado al resultado del cultivo bacteriológico de las muestras de leches para el aislamiento e identificación del *Mycoplasma*, así como los resultados de los estudios epidemiológicos realizados en el hato y pronóstico de la problemática, se establece el diagnóstico. *Auldish MJ, Hubble IB. 2001.*

Tratamiento.

Los análisis de susceptibilidad *in vitro*, reportan que el microorganismo es sensible a: eritromicina, kanamicina, cloromicetina, tetraciclinas, norfloxacin, tiamulina, lincomicina y tilosina. Sin embargo, no es recomendado

el tratamiento en estos cuadros clínicos de mastitis, ya que en primer lugar el riesgo de difusión del microorganismo en el hato es muy elevado; en segundo lugar, muchas vacas de las que se curan aparentemente quedan como portadoras o crónicas. *Hillerton, J. E., 2002.*

IMPACTO ECONOMICO

La mastitis bovina es una enfermedad de distribución mundial y ha sido catalogada como la más costosa de todas las enfermedades que afectan al ganado lechero. En los Estados Unidos se ha estimado que los productores de leche pierden 2 billones de dólares anuales debido a la mastitis y en México, diferentes estimaciones, apuntan también a pérdidas millonarias. El tremendo impacto económico de la mastitis se deriva de la reducción en la producción de leche, el descarte de la leche no comerciable, los costos de los reemplazos, costo de servicios veterinarios y tratamientos, labor extra, depreciación en los animales. Adicionalmente, la mastitis causa alteraciones en la composición láctea que tienen un impacto negativo en el rendimiento de la leche y en la calidad y vida útil de los productos derivados.

Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera mundial: La mastitis bovina esta considerada como la enfermedad que más pérdidas económicas ocasiona a los productores lecheros, pues su presencia en los establos se refleja en gastos excesivos en medicamentos para el productor y una disminución en los ingresos por decremento de la producción, que generalmente deberían percibirse dentro de la explotación. *Medina, 2002.*

La mastitis junto a los trastornos de la fertilidad, constituye la causa más importante de la falta de rentabilidad de una explotación. Amplios estudios, realizados en los países productores de leche como son: Israel, Francia, Estados Unidos de América, entre otros, han mostrado que un 50% de todas las vacas padecen mastitis, que, principalmente, son de tipo subclínico. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad pueden agruparse de la siguiente manera: Disminución de la producción, descarte de leche, costo de

medicamentos, honorarios veterinarios, trabajo extra, pérdida de potencial genético. *Hillerton, J. E., 2002.*

La mastitis continua siendo la enfermedad más prevalente y costosa de los bovinos lecheros en la mayor parte del mundo. Las vacas lecheras comparten su ambiente con microorganismos y es inevitable que algunos de ellos entren a la glándula mamaria y causen mastitis. *Todar, K. (2005).*

Sin embargo se menciona que los costos de mastitis en Estados Unidos son de alrededor de 107 a 180 dólares por vaca y en total las pérdidas anuales de la mastitis han sido estimadas entre 1.5 a 2 billones de dólares americanos *Kehrli et al., 1994; Nash et al., 2003; Biesenkamp-Uhe et al., 2007*, un 11% de la producción de leche americana total.

Mucho de los costos se le atribuye a la reducida producción de leche, la leche descartada, los reemplazos de vaca/año, los costos obvios para los tratamientos médicos veterinarios; actualmente las pérdidas ocasionadas por ambos tipos de mastitis clínica y subclínica pueden ascender a 20% de la producción potencial *Kehrli et al., 1994.*

La mastitis, particularmente subclínica y crónica, es la más persistente y más amplia del grupo de enfermedades de importancia por la higiene de la leche en el ganado lechero, *Ariznabarreta et al., 2002.* La mastitis subclínica ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido al reducido rendimiento de leche, y multas a causa de los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche. En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el Ordenador. *Kauf, A, et al., 2007.*

Es imperativo para los granjeros lecheros y sus asesores veterinarios enfocar su principal atención al control de la mastitis subclínica debido a que:

- (1) es 15 a 40 veces más prevalente que la mastitis clínica;
- (2) usualmente precede a la mastitis clínica.
- (3) es de duración prolongada.
- (4) es más difícil de detectar debido a la naturaleza oculta de la enfermedad.
- (5) reduce significativamente la producción láctea.
- (6) afecta adversamente la composición de la leche y
- (7) constituye un reservorio de patógenos causantes de mastitis que pueden diseminarse a otras vacas en el hato. *Kauf, A, et al., 2007.*

PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MASTITIS

La inflamación de la glándula mamaria involucra una serie de cambios en la composición de la leche, que sirven de base para las muchas pruebas de diagnóstico que se han desarrollado. Uno de los cambios más precoces es el aumento en el número de células somáticas que normalmente es menor a 200.000 cél/ml y que durante el proceso inflamatorio supera las 500.000 cél/ml. Este incremento es la base de muchos métodos de diagnóstico entre los cuales se encuentran el Recuento de Células Somáticas, la Prueba para Mastitis de California (CMT) y la Prueba para Mastitis de Wisconsin (WMT).

La prueba para CMT es una prueba de campo, económica, sencilla y rápida, que detecta con buena sensibilidad y especificidad el estado de salud de la ubre, mediante una estimación gruesa del contenido de células somáticas. Se basa en la gelificación que tiene lugar cuando el ADN es liberado de las células somáticas presentes en la leche por la acción de un detergente aniónico como el alkyl-aril-sulfonato de sodio; por tanto, a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación. En la Comarca Lagunera, la prueba ha sido evaluada y ampliamente recomendada como una herramienta útil en los programas de control y vigilancia de mastitis, especialmente cuando se aplica y registra cada mes. Su principal desventaja es la subjetividad implícita en la lectura de los resultados. *Scaramelli AM. 1999.*

El Recuento de Células Somáticas (RCS) es el método aceptado para el diagnóstico de la mastitis a nivel de cuartos afectados, así como para la vigilancia de la situación de la mastitis en las fincas y es uno de los principales parámetros para evaluar la calidad de la leche producida. Ofrece una serie de ventajas sobre los métodos anteriores, entre ellas: el procedimiento puede automatizarse, puede aplicarse sobre muestras preservadas y es mucho más preciso, objetivo y repetitivo.

Las principales desventajas son el alto costo de los equipos, la necesidad de constante revisión técnica y el requerimiento de personal entrenado, lo que obliga a centralizar los servicios; como consecuencia, otra desventaja es que resulta difícil el acceso inmediato a los resultados. *González Z. 2002.*

CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Es la única prueba que permite identificar los agentes causales presentes en la finca, así como los cuartos y animales infectados. Esta información permite diseñar o modificar programas de control, identificar los factores predisponentes, establecer la dinámica epidemiológica en la finca, evaluar la efectividad de las medidas de control y orientar la estrategia terapéutica. Las mayores desventajas del cultivo son su laboriosidad, tiempo que se requiere, requerimiento de personal entrenado y elevado costo.

Las muestras de leche de cuartos individuales o muestras compuestas de los cuatro cuartos, pueden obtenerse en cualquier momento, pero se recomienda hacerlo inmediatamente antes o después del ordeño. Deben muestrearse el mayor número posible de cuartos mamarios y animales que resulten positivos (mayor a 2 ó 3 +) a alguna prueba indirecta como el CMT, siguiendo los pasos indicados en el Cuadro 1. Todos los casos clínicos deben ser sistemáticamente cultivados. *Aderem, A., 2000.*

Aislamiento de Mycoplasma Bovis.

Oliver, S. P., 2000. Reporta un método para el aislamiento e identificación de M. bovis. Se tomaron 10 ml de leche de cada cuarto que resultó positivo a la prueba Wisconsin modificada en vacas lecheras.

La toma de muestra se realizó con tubos de ensaye estériles y se conservaron entre 2 y 4 °C. *Harmon.R.1990.*

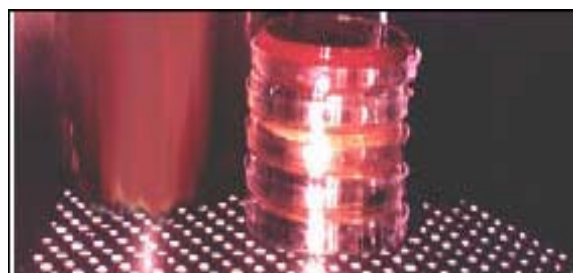
Las muestras se sembraron en el medio líquido de Friis modificado y se realizaron diluciones de 1.10 a 1.100 se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% a 10% de CO₂.

La identificación de la especie de Mycoplasma se realizó mediante la prueba de Digitonina. *Tully J.G.1983*, para diferenciarla de Acholeplasma, además se realizó la identificación serológica con la prueba de inhibición de crecimiento con antisueros de M. bovis, M. bovigeltalun y Acholeplasma laidlawii.

Pruebas Bacteriológicas.

Los cultivos en laboratorio son necesarios para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y para distinguir los animales sanos de aquellos que presentan un caso subclínico. La fidelidad de los resultados de laboratorio depende de los cuidados sanitarios que se tengan durante la toma de muestras y su manipulación posterior (*Pérez et al., 1982*).

Figura 1. Procedimiento de siembra, incubación e identificación.





Al extraer muestras se deben descartar dos o tres chorros de leche y se deben asegurar que las tetas estén bien limpias y que se han frotado los extremos de las mismas durante algunos segundos con un algodón húmedo con 70% de alcohol, antes y después de recoger las muestras en un recipiente esterilizado se deben congelar hasta entregarlas al laboratorio. Los procedimientos bacteriológicos son esenciales para la selección de los agentes terapéuticos que tienen especificidad para el germen presente. *Pérez et al., 1982.*

Conteo de Células Somáticas por Microscopia Directa.

El recuento microscópico directo de células somáticas de la leche denominado también, método óptico, si bien es de referencia, actualmente es de poca utilidad. *Aguado, J. A. 2001.*

Métodos de Detección de la Mastitis Bovina.

Cuando se trata de un gran número de muestras y se debe trabajar con una metodología más rápida. Sin embargo, a un mantiene su utilidad para los trabajos de investigación *Ceron-Muñoz., et al. 2002.*

El método tradicional de recuento de células somáticas es el “recuento directo” por microscopio utilizando un agrandamiento de 500x. Es un ensayo cuantitativo de laboratorio por el cual se examinan bajo el microscopio utilizando frotis teñidos de leche problema y se cuenta el número de células somática. Los tanques de leche a granel con más de un millón de células por mililitro de leche, sugieren que por lo menos el 40% de las vacas de la explotación tienen mastitis (*Carrión, 2001*).

Los recuentos de menos de un cuarto de millón, indican que no más del 10% de las vacas están clasificadas bajo el número 2 de la escala de calificación en la prueba de California. Este método es más preciso, pero también el que consume más tiempo y requiere además equipo costoso. En la Federación Internacional de leche existe una descripción del método "A": Se coloca la leche en una placa de vidrio y una persona cuenta las células visibles en el microscopio. Sin embargo, es difícil que una persona alcance a contar más de 10 muestras por hora (*Carrión, 2001*). Es por eso que los procedimientos directos de recuentos por microscopio deben considerarse anticuados, ya que no pueden utilizarse para analizar un gran número de muestras en poco tiempo y con alta precisión (*Carrión, 2001*).

Método Somaticell.

El somaticell puede ser utilizado para analizar la leche proveniente de una o muchas vacas, se puede utilizar para el diagnóstico de la mastitis subclínica, o para realizar el programa de manejo de todo el hato durante un mes. En el caso de las muestras individuales de leche, se determina la probabilidad de la presencia de mastitis, también se analiza en la leche de tanque, la calidad de leche del hato, con ello se puede estimar el porcentaje de animales con infección de la glándula mamaria. Se utiliza un Kit con un procedimiento similar al de la prueba de Wisconsin. *Auldist, M.J. y I.B. Hubble., 2007.*

Reducción de Nuevas Infecciones, Factores que intervienen:

1. Confort de la vaca. Limpieza del medio ambiente; sobre todo de los corrales

2. Nutrición:

Vitamina E (1000-1200 UI/día vacas secas; 700 UI/día vacas en producción).

Vitamina A (180,000 UI/día vacas en producción; 70,000-80,000 UI/día vacas Secas).

Beta-caroteno [300 mg/día desde (- 30 días) hasta (+70 días) en relación al parto].

Selenio (6 mg/día vacas producción:

3 mg/día vacas secas).

Zinc (1200-1500 mg/día vacas producción; 300 mg/día vacas secas). Como Zn metionina.

Cromo (10 mg/día por vaca).

3. Procedimientos de ordeño: higiénicos y correctos.
4. Mantenimiento de la máquina de ordeño.
5. Selladores pre y post-ordeño.
6. Tratamiento de secado.
7. Vacunaciones.

Reducción del tiempo de infección se obtiene mediante:

1. Tratamiento de casos clínicos durante la lactancia.
2. Eliminación de vacas crónicamente infectadas.
3. Estimulación del sistema inmune (vacunaciones, nutrición).
Auldist, M.J. y I.B. Hubble., 2007.

Programa técnico general de control hace 30 años en Inglaterra. Sentaron las bases de un programa de control que se sigue empleando hasta hoy día con pequeños cambios. El programa, ya mejorado, es el siguiente:

1. Examen del hato (que incluye su historia clínica) y diagnóstico situación.
2. Examen de la sala de ordeño y rutina de ordeño, higiene general, calidad del agua, instalaciones.
3. Fijar medidas correctivas en instalaciones y manejo donde fuese necesario.
4. Fijar los procedimientos de mantenimiento del sistema de ordeño.
5. Fijar el correcto procedimiento de ordeño y saneamiento del equipo:

Uso del disco en cada ordeño para eliminar y examinar los 3 primeros chorros de leche:

Las ubres deben estar limpias y secas al momento del ordeño.

Aplicar el "sellado" preordeno durante 30" y luego secar bien los pezones.

Ordeño rápido (4 a 5 minutos en promedio).

Aplicar el "sellado" post-ordeño.

6. Fijar el orden de ordeño de las vacas.

-Es difícil compatibilizar otros requerimientos administrativos de orden de ordeño de los lotes del ganado (producción, reproducción) con los requerimientos óptimos para el control de la mastitis, de modo que la administración deberá fijar las prioridades del caso.

-Dentro de lo posible separar las vacas por edades a fin de ordeñar primero las vacas de 1er parto y luego las demás. Para el mejor control de mastitis:

-Primero se ordeñan las vacas negativas al CMT.

. -En segundo lugar las vacas con mastitis subclínica leve.

. -En tercer lugar las vacas con mastitis subclínica de alto riesgo.

-En cuarto lugar las vacas con mastitis clínica. Es preferible que estas vacas sean ordeñadas aparte con una unidad de ordeño especial.

7. Eliminar las vacas problema:

Vacas con 3 ó más problemas de mastitis clínica en la misma campaña.

Vacas viejas con resultados persistentes a la prueba CMT (o altos RCS).

Vacas con cultivo bacteriológico persistente (3 cultivos con 7 a 15 días de intervalo).

8. Establecer el programa de tratamiento de los casos clínicos.

9. Establecer el sistema de secado y el tratamiento de secado.

10. Establecer las normas de registro, estadística y monitoreo permanente del programa de control.

La Prueba del CMT debe hacerse normalmente cada 30 días. En establos con problemas de mastitis suele ser necesario hacer el CMT cada 15 días, para la redistribución de los lotes.

Se debe incluir el cultivo de:

- Muestras periódicas de leche de tanque.

- Muestras de cuartos con mastitis clínica.

- Muestras periódicas de cuartos con historia de infección con *Staphylococcus aureus*. *Douglas, L., Fenwick, S. G., et al. 2000.*

Es importante vigilar la estricta aplicación de la rutina de ordeño, comenzando con la eliminación de los tres primeros chorros de leche (para

eliminar la carga bacteriana acumulada en la cisterna del pezón). Para presellado y sellado de los pezones se recomienda usar yodóforos a 5,000 y 10,000 ppm, respectivamente, siempre que cumplan con las pruebas de efectividad llevadas a cabo en un laboratorio competente. También se puede usar hipoclorito de sodio (lejía) a 40,000 ppm. El producto no debe contener más de 0.5% de hidróxido de sodio, determinado por análisis químico, para evitar rajaduras en los pezones. Una recomendación importante es sumergir $\frac{3}{4}$ del pezón en la solución desinfectante. *González Z. 2002.*

Hay un producto en el mercado americano y europeo, a base de ácido cloroso, que es un “sellador de barrera”, muy recomendable para el sellado pos ordeño (Uddergold). De preferencia no usar selladores con “protectores de piel”; en todo caso, no deben contener ni alantoina ni propilenglicol. Muchos selladores contienen glicerina; su uso es cuestionable porque la glicerina reduce su eficacia. Parecería que la lanolina es el protector que menos afecta la eficacia de los selladores. Es importante observar que, en el sellado post ordeño, el desinfectante permanezca fijado sobre la piel de los pezones de un ordeño hasta el siguiente. Limpieza de los flancos y ubre de las vacas. Baño y rasqueteo periódico de las vacas en ordeño. *Heringstad, B., et al., 2000.*

CONSIDERACIONES PARA EL CONTROL DE MASTITIS

Se debe tratar de rutina las vacas positivas a la prueba de CMT. Todos los casos de mastitis clínica deben tratarse de inmediato. La mayoría de los casos de mastitis subclínica no deben tratarse durante la lactancia, sino al momento de la seca; salvo que el hato tenga una alta prevalencia de infecciones por *Streptococcus agalactiae*, en cuyo caso sí existe una justificación económica para hacerlo.

La decisión para tratar estas vacas debe estar basada en el aislamiento y tipificación del agente causal y no en los resultados del CMT o el RCS. Es sabido que en Estados Unidos sólo el 60% de las vacas con recuentos altos en células somáticas están infectadas con gérmenes causantes de mastitis. Por otro lado, está demostrado que el tratamiento de vacas con infecciones

distintas al *Streptococcus agalactiae* no mejora su producción por el resto de la lactancia.

Otro hecho, que muchas veces se desconoce, es que existe un ritmo normal de recuperación espontánea de las infecciones subclínicas de mastitis del ordeño del 25 al 30%, de tal manera que, a lo largo de sucesivos controles con CMT o RCS, es posible observar que muchos cuartos se normalizan mientras que otros nuevos resultan positivos. *González Z. 2002*

Cuadro 1. Estadística mensual de mastitis (un caso real)

Vacas en ordeño	146		
Total de cuartos	584		
1) Mastitis subclínica (MSC)			
Cuartos negativos	432 x 0 =	0	
Cuartos con trazas	39 x 1 =	39	
Cuartos 1 + MSC	42 x 2 =	84	
Cuartos 2 + MSC	32 x 3 =	96	
Cuartos 3 + MSC	32 x 4 =	128 → suma 347	
Cuartos evaluados	577		
Cuartos con MSC	106	(42+32+32)	18.4
(meta < 12 %)			
Cuartos Alto Riesgo	64	(32+32)	11.1
(meta < 6 %)			
Índice CMT (meta < 0.4)			0.6
2) Mastitis Clínica (Casuística / N° vacas en ordeño)			
Casos día del CMT		2	
(meta < 1.0%)			1.4
Nuevos casos / mes N° Noviembre		15	
(meta < 5.0%)			10.3
3) Cuartos perdidos (Casuística / N° total de cuartos de vacas en ordeño)			
Total	5		
(meta < 0.5%)			0.85

La aplicación correcta de un programa de control de mastitis puede permitir que se logre niveles cada vez más bajos en el RCS o en los controles con CMT.

El objetivo de toda empresa ganadera eficiente es alcanzar un nivel de 100,000 células somáticas por ml de leche. Probablemente no sea conveniente bajar de este nivel ya que la presencia de un determinado número de células en la leche (y la ubre) es necesaria para la defensa de la vaca contra la mastitis. *Aguado, J. A. 2001.*

PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNOSTICO DE MASTITIS BOVINA.

La exploración física de la ubre se hace aplicando los métodos de:
Inspección. Consiste en ver y observar, empleando el sentido de la vista. Puede llevarse a cabo en dos formas:

- Inmediata. Es decir a simple vista.
- Mediata. Empleando equipos de iluminación, radiología.

Palpación: La palpación se hace utilizando el tacto. Puede ser inmediata en la que se emplea el tacto al tocar o hacer presión, o mediata mediante cateterismo valiéndonos de una sonda o cánula o de un bisturí de campana.

Percusión. Procedimiento exploratorio que se realiza produciendo golpes, mas o menos ligeros, en la glándula mamaria, como un auxiliar en la identificación de abscesos, quistes, estenosis de ductos, enfisema, etc.

Auscultación. Es escuchar aplicando el oído. Habiendo gas entre piel y tejido celular subcutáneo al palpar la glándula, podemos escuchar por medio del sentido auditivo la crepitación que acusa la presencia del gas.

Olfacción. Este es un procedimiento de exploración que nos permite percibir por medio del sentido del olfato a la ubre, así como a las muestras de leche que ocasionalmente tienen olores característicos, que sugieren alteraciones y etiologías específicas. *Elizondo, 2004.*

Colección de Muestras de Leche.

La muestra de leche es obtenida para hacer diferentes pruebas relacionadas a mastitis: subclínica, clínica y composición de la misma, por lo tanto, la muestra se toma durante el ordeño de la vaca, dependiendo el momento, según el propósito perseguido con la muestra se pueden realizar las siguientes pruebas:

Cloro en leche.

En la leche la relación lactosa- cloro es influenciada por:
Estado lactacional. En casos de mastitis el contenido de cloro en la leche tiende a incrementarse en proporción a la lactosa, lo que ocasiona en la leche

un sabor ligeramente salado. Un método confiable para determinar el contenido de cloro en leche es el potenciómetro, que consiste en cuantificar los iones cloro usando electrodos específicos.

Determinación de PH en leche.

El Ph identificado en calostro es de 6.4, en tanto que en la leche es de 6.5 -6.8, cantidad que a media lactación es de 6.6 - 6.7, y al final es de 6.8 o mayor. También se ha considerado que la leche que proviene de glándulas mamarias afectadas por mastitis el Ph es alcalina (6.9) lo que se atribuye a la disminución de la lactosa e incremento de sales que pasan de sangre a la leche. Para determinar el Ph en la leche podemos emplear: Púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, potenciómetros, escala de valoración en papel indicador de Ph. *Auldish, M.J. y I.B. Hubble. 1998.*

Determinación de albúmina sérica en leche.

Uno de los primeros cambios en vacas con mastitis fue la presencia de albúmina sanguínea en leche, atribuida al aumento de permeabilidad capilar en el proceso inflamatorio. *Garza, et al., (1974)*, encontraron que los valores de albúmina sérica en la leche fueron proporcionales a la gravedad de la inflamación de la glándula mamaria.

Para determinar la tasa de albúmina sérica en la leche se sugiere llenar con este líquido aproximadamente tres cuartas partes de un tubo de microhematocrito; enseguida se sella con fuego el lado del tubo que contiene leche y se centrifuga a 12000 x G durante 5 minutos. A continuación se rompe el tubo abajo de la separación grasa-leche y con la leche descremada se procede a la determinación de albúmina sérica. Se considera que la leche proviene de animales positivos a mastitis cuando contiene más de 0.20 mg/ml. *Yañez, 1980.*

Conductividad eléctrica.

La secreción láctea de una glándula mamaria con mastitis tiene una alta conductividad eléctrica por el elevado contenido electrolítico, especialmente en iones de sodio y cloro; lo que se presenta como uno de los primeros signos en la mastitis, siendo esto un elemento útil en el diagnóstico, considerando que

niveles superiores a 6.9 m/cm^2 entre $20\text{-}30^\circ \text{ C}$ son anormales. *Auldist, M.J. y I.B. Hubble. 1998.*

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS SOMÁTICAS.

Esta prueba se puede realizar de una forma directa o indirecta: Examen microscópico y cálculo del número de células Colocar laminilla con frotis sobre platina del microscopio, usando el objetivo calibrado.

Enfocar.

El campo a estudiar, contando el número de células presentes y anotar el total de células observadas, repetir la actividad recorriendo los campos con un seguimiento al patrón dibujado por la sutura mattress (cenefa). Al alcanzar aproximadamente 50 células, es sugerible cambiar de zona de observación.

Calcular.

El número de células, lo que hacemos considerando todo campo estudiado y sacando el promedio de células por campo, resultado que se multiplica por el factor microscópico lo que resultará en el número de células por mililitro.

Ejemplo: 35 campos estudiados, con 70 células

$70/35 = 2.0$ células por campo

$2.0 \times 300 \times 300 = 600,600/\text{ml}$ células

Células/ml = 600,600

El CNM (numero de células por mililitro); ha propuesto una reducción progresiva del límite máximo de células somáticas en la leche del tanque de almacenamiento de 750,000 a 600,000, de 600,000 a 500,000 y de 500,000 a 400,000 en un periodo de 4 años.

Para entrar en vigor, esta propuesta tendría que ser aprobada por la Conferencia Interestatal de Mercaderes de Leche y por la Administración Federal de Drogas y Alimentos, lo cual no ha ocurrido hasta el presente. Los Estados Unidos de América es el país que mantiene el nivel máximo más

óptimo para los RCS, por lo cual se espera que en un futuro cercano adopte medidas regulatorias más estrictas para mantener la competitividad comercial de productos lácteos. *Aguado, J. A. 2001. Conteos somáticos en leche. Nueva estrategia bacteriológica en leche. (Citado en: febrero 22 de 2005).*

PRUEBA DE CALIFORNIA PARA DETERMINACIÓN DE MASTITIS (CMT)

En las infecciones por bacterias, de los vasos localizados en el área afectada escapan leucocitos, siendo generalmente ésta, una respuesta celular proporcional a la severidad de la infección, menciona que las cuentas de células somáticas mayores a 500,000/ml indican mastitis subclínica. La prueba de CMT, identifica la presencia de ácido desoxirribonucleico de las células somáticas en la leche. *Manual de Clínica de Bovinos, enero del 2006.*

Procedimiento para la prueba de CMT.

Para hacer la prueba de CMT, se toma el instrumento (paleta para CMT) por el mango dirigido hacia la cola de la vaca, se descartan los dos primeros chorros de leche de cada pezón y seguidamente se colectan en cada una de las charolas de plástico (debiendo estar la superficie bien pulida y uniforme), 2 ml de leche de cada glándula y se anexan a cada uno de los compartimientos la misma cantidad del reactivo de California, cuidando que la proporción de reactivo a leche sea de inmediato, se mezclen con la leche y el reactivo mediante un movimiento rotatorio suave, haciendo la lectura de la reacción alrededor de los 7 segundos, momento en que alcanza el pico la reacción.

Tabla 1. Interpretación de las pruebas para mastitis

Símbolo	Interpretación	Reacción	Núm.de células/ml
-	Negativa	Sin evidencia	0 a 200,000
T	Traza	Precipitación leve	150,000 – 500,000
1	Positivo leve	Sin formación de gel, mezcla espesa	400,000-1,500,000
2	Positiva	Mezcla espesa cierta formación del gel	800,000-5,000,000

3	Positiva fuerte	El gel causa formación de una superficie convexa	> 5,000,000
+	Leche alcalina	Fuerte color morado	Actividad secretora reducida
++	Leche ácida	Color amarillo	pH 5.2, fermentación de lactosa por bacterias

Tomado de microbiological procedures for the Diagnostico of Bovino Mastitis. National Mastitis Council, 1998.

Son múltiples las aplicaciones de esta prueba, a continuación se enumeran algunas de éstas:

1. Identificación de vacas con mastitis subclínica en las glándulas mamarias.
2. Determinar la frecuencia de vacas con mastitis subclínica en el hato.
3. Conocer a las vacas candidatas a padecer infecciones latentes.
4. Identificar vacas de elevada producción que se encuentran en alto riesgo de presentar cuadros clínicos de mastitis.
5. Determinar con buena aproximación el número de células somáticas en leche.
6. Predecir el grado de irritación prevalente en las glándulas afectadas.
7. Permite percatarnos del estado de salud que guardan las ubres ordeñadas en el hato.
8. Esta prueba puede contribuir con signos útiles para la elaboración del cuadro clínico al buscar un diagnóstico y pronóstico en brotes de mastitis.
9. Sugerirnos la clase del microorganismo causante del daño glandular.
10. Es un instrumento útil en el monitoreo del comportamiento del programa de control de mastitis establecido para el hato.
11. Predecir las posibles pérdidas en producción de leche según el grado de irritación y número de células somáticas en leche. *Manual de Clínica de Bovinos, enero del 2006.*

PRUEBA DE WISCONSIN PARA DETERMINAR MASTITIS (WMT)

Se basa en la viscosidad de la mezcla del reactivo de California que ha sido diluido 1:1 con agua destilada y que se combina con la leche.

Material. Tubo de plástico calibrado de 12.5 x 125 mm, que tiene lateralmente un orificio para entrada de aire de 65 mm, y tapa para la boca del tubo que en el centro presenta un orificio de 1.15 mm.

Gradilla con capacidad de sujetar a los tubos.

Jeringa calibrada en ml.

Reloj con segundero.

Reactivo de California diluido con agua destilada 1:1

Muestra de leche.

Métodos.

La leche en cantidad de 2 ml, se agrega en el tubo de plástico al que previamente se le han incorporado la misma cantidad del reactivo ya diluido y posteriormente se coloca el tapón del tubo.

Las muestras son agitadas por 10 segundos, con movimientos lentos y repetidos hacia el frente y abajo hasta que los tubos quedan casi en posición horizontal, evitando la salida del producto por el orificio lateral, pero con la agitación procuramos la adecuada mezcla de la leche y el reactivo en el tiempo determinado.

Dejar reposar los tubos en posición vertical por 20 a 30 segundos.

La rejilla es tomada e invertida, quedando el tapón del tubo hacia el suelo por un tiempo de 15 segundos.

Posteriormente, la rejilla conteniendo las muestras se regresa a su posición original y se deja reposar por 2-3 minutos permitiendo un adecuado escurrido.

Proceder a la lectura de la columna de líquido remanente. Una columna inferior a 10 mm, indica conteo celular menor a 500,000 células/ml de leche; 20 mm corresponderán entre 500,000 a 900,000 células/ml de leche; y más de 20 mm indican cuentas mayores a 1, 000,000. Menciona para este método, la siguiente relación en milímetros de la columna con el número de células/ml.

Manual de Clínica de Bovinos., enero del 2006.

Tabla 2

Mililitros	Células/ml	
5	0	75,000
10	75,000	190,000
15	190,000	350,000
20	350,000	570,000
25	570,000	830,000
30	830,000	1,200,000
>30	>1,500,000	

Manual de Clínica de Bovinos, enero del 2006.

Estudio de Hato.

En el estudio para el diagnóstico integral del hato comprendemos las siguientes áreas:

- 1.- Identificación del modelo de explotación.
- 2.- localización según la región ecológica y microclima.
- 3.- Modelos de instalaciones, mantenimiento y condición sanitaria.
- 4.- Actividades de manejo desarrolladas durante ordeño.
- 5.- Composición del grupo de vacas y condición de las glándulas mamarias.
- 6.- Estudios bacteriológicos y de susceptibilidad a quimioterapéuticos.
- 7.- Calidad de leche producida.
- 8.- Manejo y condición de vacas secas.
- 9.- Manejo de ganado en tratamiento por mastitis.
- 10.- Quimioterapéuticos y su uso en otras actividades sanitarias.
- 11.- Capacidad y eficiencia del equipo para ordeño.
- 12.- Diagnóstico integral.

Manual de Clínica de Bovinos, enero del 2006.

Antisépticos para Pezones.

Etimológicamente el término antiséptico proviene de anti=contra y sepsis=putrefacción. Los antisépticos son agentes químicos que al aplicarse tópicamente sobre el tejido vivo, podrán evitar la reproducción de los

microorganismos existentes, afectar el metabolismo de éstos o matarlos y entonces se dice que la acción es germicida., reportan que después del ordeño la inmersión de los pezones en antisépticos representó una práctica importante en el control de mastitis. *Andresen s Hans., 2001.*

En los establos localizados en el altiplano de México el uso de los antisépticos posterior al ordeño en la actualidad es una práctica común. Sin embargo, tenemos conocimiento de situaciones que han causado alarma entre los propietarios de explotaciones motivadas al observar irritaciones severas en los pezones de los animales y consecuentemente dificultad para que el ganado acepte normalmente la práctica de ordeño. Este hecho se refleja de inmediato en el decremento importante en la producción de leche. Con el uso de antisépticos pocos conocidos o probados, se corre el riesgo no solamente de dañar los pezones, sino que el producto no tenga la capacidad inhibitoria necesaria para evitar el desarrollo *in vitro* de los microorganismos. *Manual de Clínica de Bovinos, enero del 2006.*

ANTECEDENTES DE MASTITIS POR MYCOPLASMA.

Tolboom RK, et al., en 2008, de Dierenkliniek Deventer en Holanda reportan en su estudio las características más importantes de mastitis por Mycoplasma en las explotaciones lecheras, se describen sobre la base de dos estudios realizados, reportan los síntomas clínicos, diagnóstico, epidemiología, y un plan de acción. En los rebaños investigados, Mastitis por Mycoplasma se caracteriza por múltiples sectores afectados que no responde al tratamiento con antibióticos y / o agentes antiinflamatorios. Lo más sorprendente fueron un sedimento de arena de color marrón, y el arroz, como la estructura de la leche de los animales afectados. Los síntomas clínicos que diferían en los dos rebaños afectados. El diagnóstico se basa en la investigación bacteriológica de muestras de leche y de líquido sinovial tomadas de las vacas infectadas.

Los animales fueron sacrificados inmediatamente, y los rebaños fueron monitoreados mediante repetidas pruebas de muestras de leche a granel. Se llegó a la conclusión de que la consecuencia de mayor tamaño de los rebaños

de ganado vacuno en los Países Bajos es una mastitis subclínica. La Mastitis por *Mycoplasma* clínica puede ser diagnosticada con más frecuencia que en el pasado. Para esta caso de mastitis, los agricultores y los veterinarios aconsejan la elaboración de un plan de acción conjunto, la incorporación de aspectos tales como el diagnóstico a nivel de vaca, directo sacrificio de los animales afectados, la higiene durante el ordeño, incluyendo postordeño desinfección del pezón, y la rutina el seguimiento de la leche a granel, leche cruda no debe administrarse a los terneros etc. *Tijdschr Diergeneeskd. 2008.*

Olde Riekerink RG et al., en el año del 2006, en Atlantic Veterinary College de University of Prince Edward Island reportan la Prevalencia de patógenos en mastitis contagiosa en el tanque de leche en Prince Edward Island. En donde el objetivo de este estudio fue 1) estimar la prevalencia de los agentes patógenos de 45 rebaños con mastitis contagiosa en leche a granel en las explotaciones lecheras, 2) determinar la asociación entre la leche a granel y los resultados de los medios de cultivos de leche a granel y de células somáticas (BMSCC), Y 3) investigar la de leche a granel en repetidos cultivos. Tres muestras de leche a granel se obtuvieron a intervalos semanales de todos los hatos lecheros y fueron cultivadas mediante métodos de laboratorio de rutina.

La prevaecía acumulativa de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, y *Mycoplasma* spp. (*M. bovis* y *M. alkalescens*) fue del 74%, 1,6% y 1,9%, respectivamente. Lotes de leche de células somáticas de *S. aureus* de rebaños positivos fue superior a la negativa de los rebaños. Acuerdo de *S. aureus* el aislamiento entre 3 pruebas consecutivas fue moderada ($\kappa = 0,46$). *Mycoplasma bovis* y *M. alkalescens*, en leche a granel se reporta por primera vez en Prince Edward Island, en Canadá desde 1972. *Can Vet J. 2006 Jun; 47(6):567-72.*

Nicholas R A, y Ayling R D. En el Reino unido, en el 2003, hacen una descripción en su artículo sobre el diagnóstico y control de *Mycoplasma bovis* que es uno de los principales patógenos que causa enfermedades respiratorias, mastitis y artritis en el ganado. Se encuentra en todo el mundo y

se ha extendido a nuevos ámbitos, entre ellos Irlanda y partes de América del sur, en la última década. En Europa, es responsable de al menos un cuarto a un tercio de neumonía del ternero, si bien esto puede ser una estimación por el menor número de laboratorios para un seguimiento regular de Mycoplasmas.

Al igual que todos los mollicutes, *M. bovis* es de por sí refractario a ciertos grupos de antibióticos, ya que no poseen una pared celular; además, se está acumulando evidencia de que las cepas de *M. bovis* se están volviendo resistentes a los antibióticos, incluyendo la tetraciclina, tilmicosina y espectinomicina, que tradicionalmente es utilizado para su control. No hay vacunas actualmente disponibles para el control de las infecciones por *M. bovis*. *Res Vet Sci. 2003 Apr; 74(2):105-12.*

McAuliffe L, et al., en 2004. En el Reino Unido, reportan un análisis epidemiológico molecular de cepas de Mycoplasma bovis en muestra de dos cepas genéticamente distintas. Mycoplasma bovis es un patógeno importante de interés veterinario que causa neumonía, artritis, mastitis en animales infectados. En este trabajo se investigó la diversidad genética de 53 aislamientos recogidos en el Reino Unido entre 1996 y 2002 con análisis de técnicas de electroforesis (PFGE), amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP), y amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD). Además, la influencia de la variable de proteínas de superficie (VSP) en los perfiles generados con técnicas de caracterización molecular.

En Ambos análisis AFLP y RAPD los aislados separados en dos grupos distintos, pero PFGE mostró menos congruencia con las otras técnicas. No había una clara relación entre el origen geográfico o el año de aislamiento y los perfiles elaborados. Se observó, que no existe correlación entre VSP y perfiles de cualquiera de las técnicas de tipificación molecular. Se propone que RAPD y AFLP son herramientas valiosas para la caracterización molecular de *M. bovis*. *J Clin Microbiol. 2004 Oct; 42(10):4556-65.*

Kusiluka LJ, et al., en el 2000. Del Departamento de Microbiología Veterinaria, de la universidad de Frederiksberg, Dinamarca, realizaron, un

estudio sobre la prevalencia de Mycoplasmas en neumonías en pulmones de bovinos, presentado con fines de diagnóstico en el Laboratorio Veterinario danés de Copenhague Dinamarca.

Entre los 50 casos examinados 43 (86,0%) se comprobó que estaban infectados con Mycoplasma. La prevalencia por Mycoplasma y Ureaplasma spp. Fue de (72,0%), M. dispar (48,0%) y M. bovis (24,0%). Otros Mycoplasmas como M. bovirhinis (20,0%) y M. bovis genitalium (6,0%). Entre los pulmones infectados por múltiples especies predominantes fueron las infecciones (76,7%) de una sola especie, con el (23,3%) con M. dispar-Ureaplasma (25,6%), M. bovis-Ureaplasma (18,6%) y M. dispar-M. bovirhinis-Ureaplasma (11,6%) siendo las combinaciones más frecuentes, de acuerdo a los informes. Parece que existe una creciente prevalencia de M. bovis (24,0%) en comparación con informes anteriores (0.6- 2.0%), lo cual pone una atención especial a Mycoplasma.

Con la prueba de electroforesis de gel (PFGE), se realizó análisis de campo de 11 cepas de M. bovis a partir de 9 de diferentes granjas puesto de manifiesto diferentes perfiles, excepto para 2 cepas que se recuperaron de la misma explotación. Debido a Mycoplasma pertenecientes a M. mycoides durante el estudio, parece que la población de ganado Danés es aún libre de este grupo de Mycoplasma, a pesar de su presencia en algunos otros países europeos. *Acta Vet Scand. 2000; 41(2):139-46. El aumento de Mycoplasma Bovis en ganado Danés.*

Kauf AC, et al., del laboratorio funcional bovino, USDA,, Beltsville, EE.UU. En el año 2007, realizan un estudio para caracterizar la respuesta inmune innata, local y sistémica de las vacas lecheras por Mycoplasma bovis. Un patógeno de creciente preocupación para la industria lechera. Diez vacas Holstein fueron infectadas por infusión en un cuarto con M. bovis y estudiado a los diez días. En la fase aguda la síntesis de proteínas, refleja el primer parámetro de la respuesta sistémica a la infección, la que se indujo en 108 horas, la infección demuestra aumento de las concentraciones circulantes de lipopolisacárido la proteína de unión y el suero amiloide A, transitoria. Se observó neutropenia de 84 a 168 horas pos infección, mientras que un estado

constante de linfopenia y trombocitopenia se observó a partir de 84 horas hasta el final del estudio.

Las células somáticas de la leche inicialmente aumentaron en 66 horas de la infección por *M. bovis*, se mantuvo elevado, en relación con el control (tiempo 0) de las concentraciones, durante el resto del estudio. El aumento de las concentraciones en leche, reflejan un aumento de la permeabilidad del epitelio mamario barrera endotelial, lo cual fue evidente dentro de 78 horas de la infección y se mantuvieron a partir de 90 horas, hasta el final del estudio. Las concentraciones en leche de varias de citoquinas, incluyendo IFN-gamma, IL-1beta, de IL-10, IL-12, factor de crecimiento tumoral-alfa, y factor de necrosis tumoral-alfa, se elevan en respuesta a la infección durante un período de varios días, mientras que el aumento en la leche de IL-8, fueron de una duración más limitada.

La activación del complemento, se refleja por el aumento de las concentraciones en leche de complemento factor 5 bis, también fue observado durante varios días. A pesar de la indicación de estos cambios que se han observado en las vacas, montando una respuesta inflamatoria prolongada a una infección intramamaria de *M. bovis*, en donde todos los sectores sigue siendo infectados a lo largo del estudio con la persistencia de altas concentraciones de esta bacteria. De este modo, una sostenida respuesta inflamatoria no es suficiente para erradicar *M. bovis* de la glándula mamaria y puede reflejar la continua lucha de la acogida a este agente patógeno. *J Dairy Sci. 2007 Jul; 90(7):3336-48.*

Núñez D.C, et al., en el 2008 realizan un estudio de detección y aislamiento de mastitis bovina subclínica por *Mycoplasma* mediante ELISA indirecta. El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de una prueba de ELISA en suero para el diagnóstico de la mastitis bovina subclínica causada por *Mycoplasma bovis*, teniendo como prueba de referencia el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de leche. Se obtuvieron 225 muestras de Sangre y de leche provenientes de hatos del Estado de México, Coahuila e Hidalgo, todos en México. Ciento treinta y nueve muestras (61.8%) resultaron

positivas a mastitis subclínica mediante la prueba de Wisconsin, y de ellas sólo en seis se aisló *M. bovis*.

A través de la prueba de ELISA, 72 muestras resultaron positivas (32.0%). Todos los animales con aislamiento positivos también fueron positivos a la prueba de ELISA. Con un punto de corte mayor o igual a 100, se obtuvo sensibilidad de 83.3% y especificidad de 83.56%, aunque el valor predictivo (VP) (+) se asoció con baja prevaencia. La técnica de ELISA podría ser utilizada como prueba tamiz para la detección de mastitis asociada con *M. bovis*, particularmente en hatos con frecuencias elevadas (> a 10%), esto con el fin de mejorar un valor predictivo positivo, lo que permitiría establecer mejores diagnósticos en casos donde las pruebas más comunes no dan un resultado concreto, sobre todo si se considera que la prueba de ELISA es práctica, rápida y económica. *Veterinaria México, ISSN 0301-5092, 2008.*

Field, T. R, Ward., et al. 2003. Del Laboratorio de Microbiología y enfermedades infecciosas, de la Escuela de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Thessaloniki, Grecia. Reportan en el año 2007 el aislamiento de *Mycoplasma bovis* detectado en 18 de 219 (8,2%), muestras de leche recogidas de casos de mastitis clínica bovina en el norte de Grecia entre noviembre de 1997 y marzo de 1999. Los casos ocurrieron en 2 de 37 (5,4%) rebaños examinados. El microorganismo se aisló de muestras de leche a granel de los dos hatos positivos, pero no fue aislado de 111 muestras recogidas de leche de las vacas clínicamente sanas de los 37 rebaños. Los aislamientos fueron identificados como *M. bovis* por análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Otros microorganismos también fueron aislados del *M. bovis* de muestras positivas. Todas las vacas positivas a *M. bovis* fueron importadas a Grecia procedentes de otros países europeos. *Vet J. 2007 Jan; 173(1):215-8.*

Roy JP, et al., Junio del 2008. Del Département de Ciencias Clínicas, de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Montréal, Québec. Reportan un primer informe de una infección intramamaria causada por *Mycoplasma bovigenitalium* a la séptima semana de edad en terneros

holstein. El ternero fue presentado inicialmente con un peso teniendo cojera en la extremidad posterior izquierda. El examen clínico reveló no sólo una artritis séptica de los tarsos, sino también una infección que afecta a la parte trasera derecha de la glándula mamaria. La fuente de *M. bovigenitalium* no se ha encontrado, pero la explicación más probable es propagación de la infección del tarso izquierdo.

Este caso demuestra que la mastitis por *Mycoplasma* puede ocurrir en pre-destete de terneros, lo cual podría desempeñar un papel en la epidemiología de la mastitis por *Mycoplasma* en vacas lecheras. *Vet J.* 2008 Jun; 176(3):403-4.

Pfützner H, y D. Schimmel .Realizan estudios de mastitis bovina por *Mycoplasma*, con ensayo de diversos medios de cultivo y métodos de cultivo para el aislamiento de *Mycoplasma* de muestras de leche. Los Medium-I caldo, Medio-B caldo, caldo y Weissensee *Mycoplasma* caldo así como Medium-I agar, Mediano B-agar, agar LMR fueron probados y utilizados para su aplicabilidad para el cultivo de *Mycoplasma* de muestras de leche, utilizando técnicas directas e indirectas. No es información fiable sobre la incidencia de *Mycoplasma* su uso en combinación con la técnica de cultivo indirecta se recomienda para el diagnóstico de rutina. *Arch Exp Veterinarmed.* 1979; 33(3):419-28.

Cerdá R, y Xavier J, de La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. En el año 2000, Reportan el primer informe en la República de Argentina de el aislamiento de *Mycoplasma bovis* durante un brote de mastitis bovina en una granja lechera en la provincia de Buenos Aires. Varias especies de *Mycoplasmas* producen diversas enfermedades en diferentes especies animales y *M. bovis* ha sido descrito como una causa de mastitis, artritis, neumonía y la infertilidad en el ganado. Por otra parte, esta especie ha sido el más frecuentemente aislado agente de la producción de mastitis bovina.

El objetivo del estudio que reportan fue aislar y tipificar cepas de *Mycoplasma* de un brote de mastitis clínica en una granja lechera de la

Provincia de Buenos Aires. De total de 279 muestras que fueron estudiadas, 276 muestras de leche de vacas con mastitis clínica que no responden a terapia antibiótica, 1 tanque de leche y 2 hisopos prepucio de los toros). Las cepas aisladas de Mycoplasma (n = 12) se caracterizan en este estudio por análisis bioquímicos, estudios serológicos y análisis electroforético de los perfiles de proteínas (SDS-PAGE). Sobre la base de estos estudios, las cepas aisladas fueron identificadas como Mycoplasma bovis. Este es el primer informe del aislamiento de este microorganismo en la república de Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000 Jan-Mar; 42(1):7-11.

Infante Martínez F, y Aguado J, Eduard Jasper D. De la División de Graduados, UAM Agronomía y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, México. En 1999. Reportan un Brote de mastitis debido a Mycoplasma californicum y Mycoplasma canadense en un hato lechero comercial en el estado de Jalisco, México, con 282 vacas en lactancia de repente comenzó a tener un problema con mastitis clínica atípica, se mostraron 28 casos graves de mastitis purulenta, con glándulas mamarias hinchadas, duras, pero sin signos sistémicos de la enfermedad. Los casos no son sensibles a los antibióticos. La evidencia sugiere que el mal funcionamiento de máquinas de ordeño y otras prácticas de gestión pueden haber contribuido a propagar la infección y aumentar el número de casos clínicos.

El cultivo de la leche de las vacas afectadas y tanque de leche resultaron con colonias de Mycoplasma que fueron identificados como Mycoplasma californicum y Mycoplasma canadense. Este es el primer informe y el aislamiento de estos Mycoplasma en México y América Latina. Las 28 vacas positivas fueron sacrificadas y segregadas, sin embargo, el propietario al no seguir las recomendaciones para aplicar otras medidas preventivas, las pérdidas fueron mucho mayores y 177 vacas fueron sacrificadas. *Rev Latinoam Microbiol.* 1999 Jul-Sep; 41(3):117-20.

Byrne WJ, et al., De La Central Veterinaria del Laboratorio, Dublín, Irlanda. En el año 2000. Utilizan una prueba de ELISA indirecto para detectar anticuerpos frente a Mycoplasma bovis en muestras de leche recogidas en una

finca con mastitis por *M. Bovis*. Los anticuerpos fueron detectados en muestras de nueve vacas que habían desarrollado, mastitis por *M. Bovis*. El resultado vacas positivas, a la prueba de anticuerpos bovis. Estos resultados indican el potencial valor de ELISA indirecta para la detección de las vacas que han ido surgiendo recientemente, *M. Bovis* con mastitis durante las primeras fases de un brote. *Vet Rec. 2000 Mar 25; 146(13):368-9.*

Castro-Alonso A, Rodríguez F, et al., en el 2008, del Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, en Arucas, Gran Canaria, España. Realizaron un estudio para correlacionar el curso clínico de la mastitis por *Mycoplasma* con su respuesta inmune, en glándulas mamarias, de 15 cabras en lactancia fueron inoculando con 10 (10) unidades formadoras de colonias (UFC) de *Mycoplasma agalactiae* (M.A). Antes de sacrificar los animales en 5, 15 o 45 días pos inoculación (dpi), los títulos de anticuerpos en la sangre de (M.A) y en la leche las colonias (M.A) y el conteo de células somáticas fueron controlados.

Las colonias de (M.A) en la glándula mamaria y el CCS en la leche aumentó a más de 10 (12) UFC / ml en 5dpi. Durante este período, una respuesta inmune innata se encontró la participación de los neutrófilos y los macrófagos se observó, que el antígeno (M.A) apareció en el epitelio acinar degenerado. Desde 7dpi, una respuesta de anticuerpos específicos coincidió con la reducción de *Mycoplasma* viable en la leche. La respuesta inmune humoral es limitada; de 37dpi, todos los animales resultado negativo para anti-M.A y alrededor de 10 (8) UFC / ml. Los resultados indican una pronta respuesta inmune a la inoculación (M.A) incapaz de controlar la invasión de *Mycoplasma*. La consiguiente respuesta humoral, a pesar de la reducción de la carga de *Mycoplasma*, conduce a la persistencia crónica de la infección. *Res Vet Sci. 12 Agosto 2008.*

González RN. En 2003, del Departamento de Población de Medicina y Ciencias de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Cornell, Ithaca, NY, EE.UU. En su artículo., mastitis *Mycoplasma* I, en vacas lecheras nos dan una serie de indicaciones que se deben tener en cuenta, debido a que es una enfermedad de persistencia muy contagiosa que puede

causar graves problemas económicos en los rebaños afectados. La compra de novillas y vacas es con frecuencia el origen de los brotes de mastitis Mycoplasma I, anteriormente los hatos estaban libres de Mycoplasma. Al comprar vacas y novillas deben ser puestas en cuarentena y la prueba de mastitis Mycoplasma I antes de la admisión regular del hato.

La detección de Mycoplasma en las vacas infectadas por el cultivo de la leche es sencilla, aunque hay problemas de sensibilidad para su detección en muestras de leche, que son inherentes a la naturaleza de la enfermedad y los procedimientos de laboratorio.

Después de la detección de las vacas infectadas, la mejor manera de proteger el rebaño es el cultivo de todas las vacas en el hato, las vacas con mastitis clínica, y todas las novillas y vacas después del parto y antes de entrar en el hato de ordeño. El control de mastitis por Mycoplasma requiere pruebas y el sacrificio de las vacas positivas si es posible. Cuando un gran número de vacas están infectadas, con estricta segregación adecuada de gestión es una opción, sin embargo, los animales en este grupo nunca debe volver a entrar en el rebaño libre de Mycoplasma. El funcionamiento del equipo de ordeño y procedimientos de ordeño deben ser evaluados cuidadosamente y cualquier defecto corregido.

No hay tratamiento. Y la vacunación no ha demostrado ser eficaz para prevenir, o disminuir la incidencia, o mejorar los signos clínicos de mastitis Mycoplasma I. Con los residuos de la leche no se deberían alimentar a los terneros sin pasteurización. M bovis puede causar otras patologías en los animales de diferentes edades en una granja, incluida la neumonía, la artritis, e infecciones del oído. La supervivencia de Mycoplasmas en los distintos microambientes del establo debe investigarse más a fondo por su impacto sobre la epidemiología de la enfermedad. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003 Mar; 19 (1):199-22.

Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF. Del Laboratorio de Sanidad Animal, Laboratorio de la División de Servicios, Departamento de Patología, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá. En el 2005 desarrollan un tiempo

real de reacción en cadena de polimerasa (PCR), en el ensayo se utilizaron sondas de hibridación en un "LightCycler" la plataforma fue desarrollada para la detección de *Mycoplasma bovis* a partir de mastitis bovina de leche y neumónica en los tejidos del pulmón. El límite de detección fue 550 unidades formadoras de colonias (UFC) / ml de leche y 650 mg UFC/25 de tejido pulmonar.

Un grupo de *Mycoplasma bovis* y de otros de bacterias de origen bovino fueron probados y sólo cepas de *M. bovis* fueron positivas, con un pico de fusión de 66,6°C. *Mycoplasma agalactiae* también fue positiva y podría ser distinguido debido a que tuvo un pico de fusión de 63,1°C. En las pruebas de validación de muestras clínicas, la relativa sensibilidad y especificidad fue del 100% y 99,3% para las leches y el 96,6% y 100% para el tejido pulmonar. El uso de *M. bovis* a traves de PCR en tiempo real, el cultivo de *M. bovis* fue positivo, las muestras de leche se estima que contiene entre 5×10^4 (4) y $7,7 \times 10^8$ (8) UFC / ml y el cultivo de *M. bovis* positivo entre el 1 de pulmones $\times 10^3$ (3) y 1×10^9 (9) UFC/25 mg.

El Aislamiento, confirmado con la prueba de PCR en tiempo real y una colonia prueba de anticuerpos fluorescentes, puso de manifiesto que en el rebaño, la proporción de muestras positivas para el aislamiento de *M. bovis* en muestras de leche con mastitis presentado al Laboratorio de Salud Animal, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá, fue del 2,4% (5 / 201). Llegamos a la conclusión de que esta sonda basada en PCR en tiempo real es un ensayo sensible, específico y rápido método para identificar la infección por *M. bovis* en los animales bovinos de leche y neumónica pulmones. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2005, Vol 17, Issue 6, 537-545*

Wilson DJ, et al., en el 2007, Departamento de Ciencia Animal, Lechería y Veterinaria, de la Universidad de Utah, USA. Reportan y describen una inusual historia en el caso de nueve vacas lecheras en un hato de primera lactancia con hinchazón en la extremidad anterior y cojera. Mastitis, artritis e Infección por *Mycoplasma* fueron diagnosticados. Los hallazgos clínicos, como Hinchazón de los conjuntos carpiano, edema difuso subcutáneo de las

articulaciones carpiana y metacarpofalangeal, cojera en la extremidad anterior se puso de manifiesto en nueve vacas de primera lactancia, vacas de 7 a 21 días después del parto.

Las Pruebas de diagnóstico revelaron que 3 de 3 muestras de leche de tanque al azar resultaron con mastitis clínica, 2 muestras de líquido obtenido a partir de las articulaciones artríticas, y muestras de los pulmones y el bazo de una vaca que había muerto arrojo resultados positivos para *Mycoplasma* spp. El análisis de la secuencia de ácidos nucleicos por el uso de un ensayo de PCR en el conjunto de fluidos y tejidos del pulmón confirmaron la infección por *Mycoplasma bovis*.

Las vacas afectadas fueron tratadas con la administración IM de flunixin meglumina y dexametasona durante 3 días. Todas las vacas no respondieron al tratamiento (3 vacas murieron y los otros 6 fueron sacrificadas). La relevancia clínica por *Mycoplasma* puede causar infecciones inusuales al principio de los signos clínicos o de una historia atípica.

Se sugiere que cuando el ganado lechero, incluidos los que residen en recintos cerrados, que presenten cojera, inflamación de la articulación metacarpofalangeal carpiano u otras articulaciones y edema de la porción distal de la pierna, o poliartritis, la infección por *Mycoplasma* spp deben ser investigada. El retraso en el diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma* en ganado vacuno lechero puede dar lugar a importantes pérdidas financieras y el establecimiento subclínico y crónico de vacas portadoras. *J Am Vet Med Assoc.* 2007.

Ghazaei C et al., del Departamento de Medicina Veterinaria, Mohaghegh Institución, de la Universidad de Ardabili, Irán. En el 2006 reportan casos de mastitis por *Mycoplasma* en vacas lecheras en la región de Moghan Ardabil Estado, Irán. Casos de mastitis bovina debido a *Mycoplasma bovis* se diagnosticaron en Ardabil Estado, Irán. La investigación se llevó a cabo con el objetivo de establecer el alcance de las infecciones por *Mycoplasma* en vacas lecheras en el Estado de Ardabil. Se obtuvieron Muestras de leche a partir de 80 vacas con mastitis clínica fueron cultivadas en el laboratorio para detectar la presencia de *Mycoplasma*. Del mismo modo, 48 muestras a granel-tanque de

leche fueron examinadas para detectar la presencia de Mycoplasma. Un caldo de Hayflick modificado fue utilizado para aislar a los Mycoplasma e inmunoperoxidasa una prueba utilizada para la identificación de especies de los aislados. Mycoplasma bovis fue aislado a partir de 39 muestras (48,75%) de mastitis clínica y de 48 muestras del tanque de leche. Esto indicó que las infecciones por Mycoplasma en la ubre son más frecuentes en vacas lecheras en el estado de Aradabili. Previo a otros estudios realizados. *J S Afr Vet Assoc.* 2006 Dec; 77(4):222-3.

Infante F, et al., de la División de Estudios de Postgrado, UAM Agronomía y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Reynosa, México. En el 2002. Realizan un estudio con el objetivo de evaluar la mejora del ensayo inmunobinding (IBT), utilizando anticuerpos monoclonales para identificar Mycoplasma bovis infectados naturalmente en la leche. La IBT y la mejora de IBT son muy específicos y tuvo una sensibilidad inmunológica de 5×10^3 unidades formadoras de colonias por mililitro. Los resultados de los 2 métodos de acuerdo a las 130 muestras analizadas de leche. Sin embargo, la IBT requiere 158 min, mientras que la mejora de IBT requiere sólo 110 min. Además, la mejora de IBT utiliza pequeñas cantidades de anticuerpos y conjugados. *Can J Vet Res.* 2002 Oct; 66(4):282-4.

Byrne WJ, et al., en el año 2000 del Laboratorio Central de Investigación Veterinario de Dublín Irlanda, realizaron una prueba de ELISA indirecta para detectar anticuerpos frente a Mycoplasma bovis en muestras de leche recogidas en una granja de vacas con mastitis por M.bovis. Los anticuerpos fueron detectados en muestras de nueve vacas que habían desarrollado mastitis clínica por M bovis. Leche de sólo tres vacas dieron positivo en las pruebas de anticuerpos a M bovis. Estos resultados indican el valor potencial de la prueba de ELISA indirecta para la detección de vacas con infección reciente de mastitis con M. bovis durante las primeras fases de un brote. *Vet Rec.* 2000; 146 (13):368-9.

Lee KH, et al., Del Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Taiwán, N ° 1, Sec. 4, Roosevelt Road, Taipei City, Taiwán.

Desarrollaron de un nuevo biochip para la detección rápida y múltiple de siete agentes patógenos que causan mastitis en muestras de leche de bovinas.

De manera eficiente a prevenir y tratar la mastitis bovina y minimizar su efecto sobre la industria láctea, una prueba específica sensible y rápida es necesaria para la identificación de los patógenos causantes de mastitis. En este estudio, un biochip capaz de detectar 7 agentes patógenos de especies comunes que causan mastitis, incluidos *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus* spp. *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y, dentro de 6 horas se desarrolló. La técnica se basa en la amplificación de ADN de genes específicos de los patógenos blanco y consta de 4 etapas básicas: extracción de ADN de bacterias, reacción en cadena de polimerasa, hibridación de ADN, y la reacción calorimétrica.

Para examinar la exactitud y la especificidad de este biochip, una prueba preliminar con un cuarto al azar 82 muestras de leche fueron analizados y comparados con los resultados de los métodos microbiológicos convencionales realizadas simultáneamente. Los resultados de todos sino 1 muestra analizada por el biochip estaban de acuerdo con los analizados por la bacteriología. El biochip podría ser un posible instrumento para el diagnóstico rápido para patógenos que causan mastitis en la leche y el suministro de información para un tratamiento más eficaz para curar la mastitis. *J Vet Diagn Invest.* 2008 Jul;20(4):463-71.

CONCLUSIONES.

Hoy en día en la Comarca Lagunera siendo la región más productiva de leche en México, ningún establo esta inmune a la posibilidad de contraer Mastitis por Mycoplasma y las circunstancias que permiten que esto pase pueden variar, esto se debe a la “importación de vacas” que vienen contaminadas de países extranjeros. En un establo lechero de la comarca lagunera, de 205 vacas sospechosas de M. bovis, se eliminaron 110 positivas en un tiempo de tres meses. Las pruebas bacteriológicas utilizadas fueron: Antibiograma, Coagulases, Agar sangre, Agar Mycoplasma. Donde la mas especifica fue “Agar Mycoplasma” por LALA. La mayoría de las vacas provenientes del norte de EE.UU y Europa.

LITERATURA CITADA

Abdullah Al-HA, y Fadl EA, del Laboratorio de Sanidad Animal, Al-Marai empresa lechera, PO Box 8524, 11492 Riad, Arabia Saudita, en el año 2006, reportan mastitis por *Mycoplasma* en los rebaños de ganado lechero en Arabia Saudita. *Vet Rec.* 2006 Jul 15; 159 (3) :88-9.

Adkinson, R. W., R. H. Gough, R. Graham, and A. Yilmaz. Cambios propuestos en tanque de células somáticas 84:370-374.2001.

Aderem, A., and R. J. Ulevitch. 2000. Receptores altos en la inducción de la respuesta inmune innata. 406:782–787.

Andresen s Hans.; Mastitis: Prevención y Control, en Perú 2001; Págs.: 55-64 <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>.

Aguado, J. A. 2001. Conteos somáticos en leche. Nueva en leche. E-campo homepage: <http://www.e-campo.display.php/uuid>. (Citado en: febrero 22 de 2005).

Andresen S, H. mastitis: Prevención y Control *Rev Inv Vet Perú* 2001; 12 (2): 55.

Avila t, s, Gasque g r, Cano c p, Baños ca, Fuentes h v. Frecuencia anual demastitis clínica y sus costos en una explotación del Valle de México. *Memorias del XVIII Congreso Nacional de Buiatría*; 1993 noviembre 11-13; México, D.F. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1993: 239-244.

Acta Vet Scand. 2000; 41(2):139-46.

Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. 2002. Calidad Microbiológica y Conteo de Células Somáticas de Leche de Oveja, con especial referencia a *Estafilococos*. *J. Dairy Sci.* 85:1370-1375.

Auldish MJ, Hubble IB. Efectos de la mastitis en la leche cruda y productos lácteos.. 53:28-36. 1998.

Auldish, M.J. y I.B. Hubble. 1998. Efectos de la mastitis en la leche cruda y productos lácteos. *Aust. J. Dairy Tech.*.. 53: 28-36. Citados por Curbelo R., 2007.

Brishard, S. (2003). *Mycoplasma Enfermedades de los bovinos*. <Http://addl.purdue.edu/newletters>. Accedido 21 de marzo de 2008.

Báez, G. J. J. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. 40-4.

- Bannerman, D. D., M. J. Paape, W. R. Hare y J. C. Hope. 2004. Caracterización de la respuesta inmune innata bovina causa infección intramamario por *Klebsiella pneumoniae*. *J. Dairy Sci.* 87:2420–2432.
- Bedolla, C. C. 2005. "Problemática de la mastitis en Michoacán". Curso Internacional Teórico Práctico. "Avances en el diagnóstico y control de la mastitis bovina. FMVZUMSNH.
- .Bedolla, C. C., y Castañeda, V. H. 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. Cuatro vientos. N° 38. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp. 27-29. "Problemática de la mastitis en Michoacán". Curso Internacional Teórico Práctico. "Avances en el diagnóstico y control de la mastitis bovina. FMVZUMSNH
- Biesenkamp-Uhe, C., Li, Y., Hehnen, H. R., Sachse, K. y Kaltenboeck, B. 2007. Therapeutic *Chlamydomyces abortus* and *C. pecorum* Vaccination Transiently Reduces Bovine Mastitis Associated with *Chlamydomyces* Infection. *Infection and Immunity*. Vol. 75 (2): 870-877.
- Byrne, W., B. Markey, R. McCormack, J. Egan, H. Ball, and K. Sachse. 2005. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Vet. Rec.* 156:767–771.
- Carrión, G. M. 2002. Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán. pp. 6-20, 55.
- Ceron-Muñoz, M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz-Berrocal, M., Jurado-Gómez, H. 2002. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85:2885-2889.
- Correa, M. G. P., y Marin, J. M. 2002. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology*. 85:125-132.
- Citti, C., A. Lischewski, K. Siebert-Gulle, and R. Rosengarten. 2000. Limitation of pulsed field gel electrophoresis analysis for the typing of *Mycoplasma bovis*, p. 46-49. In J. B. Poveda, A. Fernandez, K.-E. Johansson, and J. Frey (ed.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 5. European Commission, Brussels, Belgium.
- Cree, JL, (2002). *Mycoplasma Mastitis: Hechos que cada productor debe saber*. Jersey Journal, 1-4.
- Cerdá R, y Xavier J, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 2000, Reporta Mastitis por *M. Bovis* en una granja lechera, buenos Aires Argentina.

Castro-Alonso A, Rodríguez F, et al., en el 2008, Estudio del Curso Clínico de Mastitis por *M. Bovis* en cabras, Departamento de Patología Vet, Facultad veterinaria, Arucas, Gran Canaria, España. *Res Vet Sci.* 12 Agosto 2008.

Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF. Laboratorio de Sanidad Animal, Departamento de Patología, Desarrollan un tiempo real de reacción en cadena de Polimerasa, universidad de Guelph, Ontario Canadá. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005, Vol 17, Issue 6, 537-545.

Djabri, B., Barielle, N., Beaudreau, F., Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.*

Douglas, L., Fenwick, S. G., Pfeiffer, D. U., Williamson, N. B., Holmes, C. W. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology.* 75: 7- 41.

Elizondo, 2004, *propedéutica Clínica Veterinaria*, UAAAN-UL, Torreón, Coahuila México, pp 8-10.

Field, T. R., Ward, P. N., Pedersen, L. H., James, A. y Leigh, J. A. 2003. The Hyaluronic Acid Capsule of *Streptococcus uberis* Is Not Required for the Development of Infection and Clinical Mastitis. *Infection and Immunity.* 71(1):132-139.

Fox, L. K., J. H. Kirk, and A. Britten. 2005. *Mycoplasma mastitis: A review of transmission and control.* *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health* 52:153–160.

González, R. M., P. M. Sears y R. A. Merrill. 1992. Mastitis due to mycoplasma in the state of New York, during the period of 1972 -1990. *Cornell Vet.* 82:29. GRAY DM, SCHALM OW. The mastitis variable in milk yield as estimated by the California Mastitis Test. *Am J Vet Res.* 1962;23:541.

González Z. 2002. *Utilidad del Recuento electrónico de células somáticas en leche de tanque para estimar calidad de leche y prevaencia de mastitis en cuatro fincas de los estados Aragua y Falcón. Tesis de Maestría. Postgrado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Pp. 134.*

GARZA RJ, RIOS ME, ARRIOLA J. Proteínas plasmáticas sanguíneas en la leche de vacas con mastitis. *Not Med Vet* 1974; 74: 391.

Ghazaei C et al., Departamento de Medicina Veterinaria, Mohaghegh, Universidad de Ardabili, Irán. Reporte de casos de mastitis por *Mycoplasma*. *J S Afr Vet Assoc.* 2006 Dec; 77(4):222-3.

Heringstad, B., Klemetsdal, G., Ruane, J. 2000. Effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly.* 29 (1): 18-31. 23. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science.* 64:95-106.

.Hillerton, J. E. y Kliem, K. E. 2002. *Effective Treatment of Streptococcus uberis Clinical Mastitis to Minimize the Use of Antibiotics*. *J. Dairy Sci.* 85:1009-1014.

Harmon. R., Eberthart R J., Jasper D E., Langluis DE., Wilson R A. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine mastitis*. 3da Ed. Virginia (USA). National Mastitis Council. 1990.

Infante Martínez F, y Aguado J, Eduard-Jasper D. *Mastitis outbreak due to Mycoplasma californicum and Mycoplasma canadense in a commercial dairyherd in the state of Jalisco, México*. *Rev Lat Am Microbiol.* 1999 Jul-Sep;41(3):117-20.

J Clin Microbiol. 2004 Oct; 42(10):4556-65.

Jasper, D. E. 1981. *Bovine mycoplasmal mastitis*. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*25: 121-157.

Kehrli, M. E. and D. E. Shuster. 1994. *Factors affecting milk somatic cells and Their Moore, K. 2001. Lysostaphin expresion in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice*. *Nature Biotechnology.* 19:66-70.

Kauf, A, et al., 2007. *Innate Immune Response to Intramammary Mycoplasma bovis Infection*. *J. Dairy Sci.* 90:3336–3348

Kusiluka LJ, et al., en el 2000. *Departamento de Microbiología Veterinaria, Universidad de Frederiksberg. Laboratorio Veterinario danés de Copenhagen Dinamarca.*

Lee KH, et al., Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Taiwán, N ° 1, Sec. 4, Roosevelt Road, Taipei City, Taiwán. *Desarrollaron un nuevo biochip para la detección rápida de agentes que causan mastitis en muestras de leche de bovinas*. *J Vet Diagn Invest.* 2008 Jul;20(4):463-71.

McAuliffe L, B Kokotovic, Ayling RD, Nicholas RA. *Análisis epidemiológico molecular de cepas de Mycoplasma bovis del Reino Unido en muestra de dos cepas genéticamente distintas*. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct; 42 (10) :4556-65.

Nicholas, R. A., and R. D. Ayling. 2003. *Mycoplasma bovis: Disease, diagnosis, and control*. *Res. Vet. Sci.* 74:105–112.

Medina, R. J. 2002. *Prevalencia e identificación de agentes etiológicos Causantes de mastitis en el Municipio de Vista Hermosa, Michoacán. (Tesis de licenciatura)*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México 39-41 y 83.

Miranda mre, Lopez rm. Garcia so, Oviedo bj. *Bacterias asociadas a as mastitis bovina, estudio recapitulativo*. *Memorias del XVIII Congreso Nacional de Buiatría; 1993 noviembre 11-13; México, D.F.*

Manual de Clínica de Bovinos, Departamento Ciencias Médico Veterinarias, UAAAN – UL, pp 82, enero del 2006.

Mayer, G. (2007, 5 de abril). *Microbiología e Inmunología en línea*. Obtenido 10 de abril de 2008, de <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/myco.htm>.

Núñez D.C, et al., en el 2008, *Estudio de detección y aislamiento de mastitis bovina subclínica por Mycoplasma mediante ELISA indirecta.*

Nash, D. L., Rogers, G.W., Cooper, J. B., Hargrove, G.L., Keown, J. F. 2003. *Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score, Udder Type Traits, Productive Life, and Protein Yield. J Dairy Sci.; 86:2684-2695.*

Oliver, S. P., Schrick, F. N. 2000. *Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. Animal Reproduction Science. 58:241-251.*

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT, Keefe GP. *Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. Can Vet J. 2006 Jun;47(6):567-72.*

Pfutzner H. 1984. *Die Mycoplasma bovis infection des rindes. Mh. Vet. Med. 9: 217-220.*

Philpot WN, Nickerson SN. *Mastitis: Counter Attack. Babson Bros. Co., Naperville, IL. 150 pp. 2000.*

PEREZ DM, CASTILLO RF, CAMPOS RV, MURILLO SE. *Análisis de la leche métodos físico-químicos para el diagnóstico de la mastitis subclínica. Fascículo, técnica y productos Agropecuarios Texcoco.1982.*

Rev Latinoam Microbiol. 2000 Jan-Mar; 42(1):7-11.

Rev Latinoam Microbiol. 1999 Jul-Sep; 41(3):117-20.

Res Vet Sci. 12 Agosto 2008.

Vet Rec. 2000 Mar 25; 146(13):368-9.

Roy JP, et al. Junio del 2008. *Départemento de Ciencias Clínicas, Facultad de Medicina Vétérinaria, Universidad de Montréal, Québec. Reportan de infección intramamaria causada por Mycoplasma bovis genitalium. Res Vet Sci. 2008Apr; 74(2):105-12.*

Rosengarten, R., and C. Citti. 1999. *The role of ruminant mycoplasma insystemic infection, p. 14-17. In L. Stipkovits, R. Rosengarten, and J. Frey (ed.), Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, vol. 3: European Commission, Brussels, Belgium.*

Ramel, Gordón. *Procariotas*. 15 de abril de 2008. Web de la Tierra y la vida. 23 de abril de 2008 <<http://www.earthlife.net/prokaryotes/>>.

Scaramelli AM. *Mastitis Bovina: Aspectos relativos al diagnóstico a través de Métodos Indirectos y el Cultivo Microbiológico*. Trabajo de ascenso. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Cuerpos I. Pp 213. 1999.

Seya, T., and M. Matsumoto. 2002. A lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:901–906.

Shim, E. H., R. D. Shanks, and D. E. Morin. 2004. Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2702-2708.

Tolly J. C. Test for digitonin sensitivity and sterol requirement, in: Razin S. Tully S.G. Editors. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press. 1983: 355-362.

Todar, K. (2005). *Mastitis por Mycoplasma y pérdidas ocasionadas*. Obtenido 3 de abril de 2008, de <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/prokaryotes.html>.

Todhunter D, Smith Lk, Hogan Sj. Growth of gram negative bacteria in dry cow secretion. *J Dairy Sci* 1990; 73:363-372. Universidad de Caldas; IV Seminario Internacional en Reproducción y Metabolismo en Bovinos con Énfasis en Sanidad Mamaria; agosto 28 y 29 de 2003. Wikipedia La Célula Somática.

Tijdschr Diergeneeskd. 2008 Feb 1; 133 (3):96-101. *Mycoplasma mastitis* en vacas lecheras.

Tolboom RK, Dierenkliniek Deventer; 2008, En Holanda reportan en su estudio de Mastitis por *Mycoplasma* en granjas Lechera. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2008.

Taylor, L. (enero, 2001). -Stealth mycoplasmas patógenos. [Http://rain-tree.com/myco.htm](http://rain-tree.com/myco.htm). Accedido 21 de marzo de 2008.

USDA-APHIS, 2002

Veterinaria México, ISSN 0301-5092, 2008 Vol. 39, Nº. 2, pags. 161-171.

Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2003 Mar; 19 (1):199-22.

Wilson DJ, et al., 2007, Departamento de Ciencia Animal, Lechería y Veterinaria, Universidad de Utah, USA. Reporte de un caso de *M. Bovis* en vacas lecheras. *J Am Vet Med Assoc.* 2007.