



23  
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**COMPARACION DE TRES TECNICAS PARA EL  
DIAGNOSTICO DE MASTITIS CAUSADA  
POR *Mycoplasma bovis***

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A:  
**LAURA HERNANDEZ ANDRADE**

Director de Tesis:  
MVZ. MARCELO PEREZ DOMINGUEZ



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de comparar la prueba de hemaglutinación pasiva, inhibición de crecimiento e inhibición de película como métodos para el diagnóstico serológico de mastitis causada por Mycoplasma bovis.

Se obtuvieron muestras de sangre y de leche estéril de 57 vacas de un hato con problemas de mastitis por micoplasma tanto en período seco como en lactación. Con el suero sanguíneo se hicieron las pruebas de estudio y se intentó hacer el aislamiento en las muestras de leche. Se obtuvieron 9 aislamientos de micoplasma en período seco y 7 en lactación. El micoplasma en todos los casos fue Mycoplasma bovis. Se encontró que los títulos de hemaglutinación pasiva en animales infectados se incrementan a diferencia de los títulos de los animales control. En las otras dos pruebas se observaron resultados similares. Como control se obtuvieron muestras de 40 vacas de otro hato sin historia de mastitis por micoplasma.

Parece ser que las tres pruebas funcionan a nivel de hato, siendo la más sensible y específica la de inhibición de crecimiento. El diagnóstico temprano de este tipo de infecciones permite la aplicación de medidas de control adecuadas; evitando pérdidas que pueden ser graves a la economía ganadera.

## INDICE

RESUMEN .....	i
<b>CAPITULO I INTRODUCCION</b>	
A.1 Mastitis .....	1
A.2 Antecedentes de mastitis por micoplasma .....	1
A.3 Efectos económicos .....	2
B.1 Características de los micoplasmas .....	3
B.2 Clasificación de los micoplasmas .....	4
B.3 Metabolismo y pruebas bioquímicas para identificación de micoplasmas .....	4
C.1 Origen y Transmisión .....	5
C.2 Patogenia .....	6
C.3 Lesiones y cuadro clínico .....	7
D.1 Respuesta inmune producida por micoplasma .....	9
E.1 Pruebas de diagnóstico .....	10
E.2 Inhibición de película .....	10
E.3 Inhibición de crecimiento .....	11
E.4 Hemaglutinación pasiva .....	11
<b>CAPITULO II OBJETIVOS E HIPOTESIS .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPITULO III MATERIAL Y METODOS</b>	
A. Muestras .....	15
B. Medios de cultivo .....	15
C. Cultivos de leche .....	17

D. Identificación de micoplasmas aislados a partir de leche. ....	17
E. Prueba de dependencia de esteroides .....	18
F. Producción de antígeno .....	18
G. Producción de antisueros .....	19
H. Programa de inmunización .....	19
I. Determinación de proteína del antígeno .....	20
J. Pruebas de diagnóstico .....	22
<b>CAPITULO IV RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPITULO V DISCUSION .....</b>	<b>38</b>
<b>CAPITULO VI CONCLUSIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>42</b>

## CAPITULO I

### I N T R O D U C C I O N

#### A.1 MASTITIS

La inflamación de la glándula mamaria, comunmente conocida como mastitis, es considerada una enfermedad compleja por su etiología, patogénesis, secuela y tratamiento (48). La mastitis puede ser producida por diferentes factores tales como: mal funcionamiento de la máquina de ordeño y falta de higiene que favorezca la penetración de microorganismos patógenos; sin embargo, estos agentes no solo deben entrar a la glándula mamaria, sino que deben ser capaces de sobrevivir y multiplicarse en número suficiente para producir daño. Entre los causantes más comunes se incluyen: Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae; coliformes (principalmente E. coli y Klebsiella pneumoniae); otros agentes etiológicos menos frecuentes incluyen nocardias, levaduras y micoplasmas (37).

#### A. 2 ANTECEDENTES DE MASTITIS POR MICOPLASMA

La mastitis causada por micoplasma ha sido reportada en Europa (1, 7, 33, 47), Australia (22), Israel (4), Nueva Zelanda (39), Estados Unidos (39, 41, 55) y en otros lugares del mundo.

El primer aislamiento de micoplasma a partir de leche fue realizado por Alstrom en 1955. Posteriormente se reporto en Inglaterra (25).

A partir de 1960 son numerosas las publicaciones de brotes de mastitis por micoplasma (4, 22, 23, 26, 32).

La mastitis por micoplasma es producida principalmente por Mycoplasma bovis inicialmente llamado Mycoplasma agalactiae subs. bovis o Mycoplasma bovimastitidis (10), pero también se han reportado otras especies como Mycoplasma bovigenitalium (23), Mycoplasma canadense (32), Mycoplasma alkalencens (39). El género Acholeplasma se ha encontrado involucrado también en brotes de mastitis, siendo la principal especie Acholeplasma laidlawii (23).

### A. 3 EFECTOS ECONOMICOS

La mastitis es la enfermedad más común del ganado bovino - lechero y la que produce mayores pérdidas económicas; los casos agudos de mastitis producida por micoplasma originan pérdidas repentinas hasta de un 90% en la producción láctea. Se ha reportado que algunas vacas producen leche aparentemente normal después de tres a cuatro semanas del brote, pero posteriormente la producción permanece muy reducida (26). Se encontró que la producción se reduce durante ocho a doce semanas cuando la infección era en la etapa temprana de lactación, pero cuando el brote era después, la vaca se secaba (54).

Pérdidas económicas menos considerables son producidas por otras bacterias causantes de mastitis, la producción láctea se reduce en un 12 a 15% por período de lactación (49).

Otras causas de pérdidas económicas son: el costo de los

medicamentos para el tratamiento, desecho de los animales y baja en la producción láctea y de los subproductos (11).

## B.1 CARACTERISTICAS DE LOS MICOPLASMAS

Los micoplasmas son procariotes altamente pleomórficos, variando de estructuras esféricas las cuales miden de 125 nm a delgados filamentos ramificados de diámetro uniforme y una longitud de pocos nm a 150 nm. Por medio de observaciones en el microscopio electrónico se ha encontrado que los micoplasmas tienen una estructura extremadamente simple, y esto confirma el concepto de que son los organismos mas simples y primitivos capaces de crecer autónomamente. Los micoplasmas están constituidos por una membrana trilaminar, en contraste con las bacterias no tienen pared celular, ésta es una característica que explica su inestabilidad morfológica -tendencia a penetrar dentro del medio sólido, es resistente a antibióticos que interfieren con la síntesis de pared celular, son susceptibles a lisarse por detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos. Son anaerobios facultativos, algunos crecen mejor aeróbicamente, algunas cepas requieren DNA. La temperatura óptima para el crecimiento es de 36 a 38°C y después de tres a cuatro días de incubación algunas colonias medirán 0.5 a 1.0 nm de diámetro con un centro amarillo y opaco el cual penetra en el medio y es rodeado por una periferia delgada y transparente dando la apariencia de un huevo frito (14).



## B.2 CLASIFICACION DE LOS MICOPLASMAS

Una clasificación de éstos microorganismos indican que el orden consiste de mas de 45 especies pertenecientes a Mycoplasmas y Acholeplasmas. Este grupo incluye características que no están asociadas con otras bacterias o virus. La mayoría de las características de las especies de micoplasma difieren de los virus en que crecen en medio artificial en ausencia de células vivas y que también crecen en cultivos celulares (14).

El Subcomité en Taxonomía de Micoplasmatales en 1966 - propuso que los micoplasmas no deben ser incluidos con la clase de bacterias (14).

Los micoplasmas han sido separados de las bacterias y se les ha asignado una clase llamada Mollicutes, la cual consta de tres familias: I Micoplasmatacea género Mycoplasma y Ureaplasma; familia II Acholeplasmatacea, género Acholeplasma y familia III Spiroplasmatacea, género Spiroplasma (14).

## B.3 METABOLISMO Y PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACION DE MICOPLASMAS

Las pruebas bioquímicas obligatorias que ha señalado el Subcomité en Taxonomía de Mycoplasmatales son: degradación de la glucosa y la arginina, ya que la mayoría de los micoplasmas las utilizan como fuente de energía. Otras pruebas designadas son:

- 1.- Dependencia de esteroides: Esta prueba diferencia el género Acholeplasma del género Mycoplasma. El polianetol sulfonato de sodio "Liquoid" al 5% y

la digitonina al 1.5% reaccionan con los esteroides evitando que el género Mycoplasma los pueda utilizar, por lo que ya no pueden crecer, diferenciando así entre Mycoplasma y Acholeplasma.

- 2.- Fermentación de la glucosa. Esta característica es generalmente constante para las especies fermentadoras y es detectada por una reacción ácida en medio líquido.
- 3.- Hidrólisis de la arginina. Algunos micoplasmas obtienen su fuente de energía a partir de aminoácidos como la arginina; estas especies no fermentan glucosa.
- 4.- "Película y Manchas". Se refiere a la formación de una película cristalina por ciertas especies de micoplasma en un medio apropiado, se ha sugerido que la película contiene colesterol y fosfolípidos; algunas veces hay producción de manchas oscuras en el agar, si el medio es sólido. La película puede ser observada a simple vista, como una capa en la superficie del agar y no debe ser confundida con el crecimiento abundante de micoplasma (14).

#### C.1 ORIGEN Y TRANSMISION

El origen y la propagación de la infección en los brotes no está bien esclarecida. Se sabe que la mastitis por micoplasma se disemina fácilmente de vaca a vaca. Una forma importante por la que comienza este problema en un hato es la introducción de una vaca que excreta micoplasma (58).

Existen muchos vectores para estos microorganismos, incluyendo el medio ambiente, tierra, equipo de ordeña, las manos de los ordeñadores, agua de lavado, etc; sin embargo el principal vector es la leche contaminada de glándulas previamente infectadas.

En estudios realizados se ha demostrado que M. bovis puede sobrevivir uno o dos días en la madera y en el acero inoxidable, en estiércol 37 días, en agua a 20°C sobrevive 18 días y a temperatura ambiente 23 días.

El contagio puede ser de un cuarto a otro, usualmente en el mismo lado ya sea izquierdo o derecho (11).

Las vacas pueden ser susceptibles a la infección en cualquier edad y en período seco o de lactación. La mayoría de los reportes no especifican la etapa en que se encuentran los animales afectados o aclaran que solamente las vacas en estado de lactación están involucradas, pero se ha encontrado que vacas secas pueden estar afectadas y pueden ser un punto importante del brote (11). Se cree que la enfermedad en las vacas secas es menos severa que en los animales lactantes, pero puede persistir durante más tiempo.

El brote en un hato puede ser drástico; otras veces es lento e incidioso. La rapidez de la propagación puede estar relacionada con diferencias de cepas, pero es más probable que este relacionada a prácticas de manejo (19).

## C.2 PATOGENIA

Se ha observado que los micoplasmas están presentes en la

glándula mamaria en todos los estados de la enfermedad y se ha postulado un factor soluble en la patogénesis. Se ha sugerido un factor hemolítico - producido por M. bovis, este factor produce una hemolisina soluble para eritrocitos de bovino (11).

La infección probablemente ocurra siguiendo la vía del - conducto glandular, la propagación de la enfermedad a otros cuartos de la ubre y ocasionalmente a las articulaciones sugiere que puede ocurrir una invasión general (9).

### C. 3 LESIONES Y CUADRO CLINICO

Se debe sospechar de mastitis por micoplasma cuando se presenten los siguientes signos:

- 1.- Casos de mastitis purulenta que sean resistentes al tratamiento; sin embargo las vacas continúan comiendo y no parecen estar enfermas.
- 2.- Casos de mastitis que involucren más de un cuarto.
- 3.- Marcada pérdida de producción en vacas afectadas (11).

La mastitis por micoplasma en algunas ocasiones puede ser subclínica, algunas veces sin un alto conteo celular o signos y puede presentarse en forma ligera o severa. La enfermedad es descrita como una mastitis de presentación súbita con una marcada disminución en la producción láctea, edema de la ubre y elevación de la temperatura (51).

En animales en período de lactación, hay inflamación de la ubre, caída rápida en la producción de leche y secreción netamente anormal en uno o más cuartos glandulares. Las vacas en período seco muestran ligera inflamación en la ubre. Generalmente no se observan reacciones fébriles; sin embargo en animales infectados experimentalmente se comprueba fiebre hasta de 41°C en el tercer o cuarto día después de la inoculación, al mismo tiempo que aparecen cambios en la ubre, la temperatura se normaliza en 24 a 96 horas (40).

En una pequeña proporción de animales con mastitis o sin ella se nota artritis en rodilla y menudillos; las articulaciones afectadas están tumefactas (9).

La secreción de glándulas afectadas es variable aunque en ocasiones sus características pueden ser indicativas de mastitis por micoplasma.

La leche es aparentemente normal, la cual en reposo rápidamente se separa en un sedimento grumoso y un sobrenadante más o menos claro; algunas veces las partículas se adhieren a las paredes del tubo (11). Posteriormente la secreción se hace más escasa, parece calostro o queso blando coagulado en suero claro; pocos días después la secreción es francamente purulenta o con aspecto de cuajada, pero no se observan coágulos firmes voluminosos (19).

La ubre de las vacas muestra, a veces después de la infección micoplásmica, considerables alteraciones inflamatorias de apreciación tanto mi--

microscópica como macroscópica que dependen del serotipo actuante. Cuando la infección es debida a Mycoplasma bovis son características una galactoforitis proliferativa y una mastitis purulenta de curso crónico, pero si el germen infectante es M. bovigenitalium no se observa hiperplasia ni destrucción del epitelio de los conductos lactíferos (19).

Investigaciones realizadas por Molen indican que el cuadro patológico difiere con el curso de la infección. En la etapa aguda hay inflamación y exudado, posteriormente, la mastitis se presenta con una reacción intersticial con eosinófilos, incluyendo células plasmáticas y linfocitos; en el estado crónico hay fibroplasia alrededor de los ductos.

La producción experimental de la enfermedad causa algo de necrosis tisular en la glándula mamaria, recuperándose micoplasmas en muchos tejidos, incluyendo sangre, órganos viscerales, tracto respiratorio, tracto reproductor y articulaciones artríticas.

#### D.1 RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA POR MICOPLASMA

Como no tienen pared celular los micoplasmas exhiben poca antigenicidad, a esto se debe que en infecciones naturales por micoplasmas - den origen a bajos títulos de anticuerpos. La respuesta inmune es predominantemente humoral como en las infecciones bacterianas, siendo los anticuerpos tipo IgM e IgA los primeros que aparecen seguidos por IgG; sin embargo muchos micoplasmas parecen estimular una respuesta de inmunidad celular - (56).

Así parece ser que los micoplasmas no son extremadamente inmunogénicos o que en el proceso infección-inmunidad, tienen la capacidad de interferir con los mecanismos celulares que reconocen el antígeno (56).

La principal clase de inmunoglobulinas en los bovinos es la IgG, de la que existen dos subclases: IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> que difieren ligeramente

en sus cadenas pesadas y están casi en igual concentración en la sangre (45).

## E.1 PRUEBAS DE DIAGNOSTICO

Debido a las dificultades del cultivo de micoplasma y a que los signos clínicos son bastante inespecíficos, se han tratado de establecer técnicas serológicas para que el diagnóstico sea más rápido y así poder evitar la propagación de la infección.

Una variedad de pruebas serológicas han sido usadas para el diagnóstico de enfermedades producidas por micoplasma entre las que se encuentran: fijación de complemento (59), inhibición de película (28), hemaglutinación indirecta (17, 18, 29, 59), inhibición de película (57). Otras pruebas que no han sido ampliamente usadas son: aglutinación en látex (38), inmunodifusión (36, 38).

## E.2 INHIBICION DE PELICULA

Se encontró que ciertas especies de micoplasmas durante incubación prolongada, producían depósitos característicos y una película en la superficie del cultivo (28). Mycoplasma bovis es una de las especies que usualmente produce película y se ha encontrado que la formación de película puede ser inhibida por suero de ganado infectado en forma natural y que esta inhibición es independiente de algún efecto en el crecimiento de los -

microorganismos (53). La inhibición de película es considerada como una prueba de utilidad en el diagnóstico, encontrándose que la actividad inhibidora de película persiste durante seis a doce meses en algunos casos. Se ha encontrado buena correlación entre la presencia de Mycoplasma bovis en un hato y la inhibición de película (57).

### E.3 INHIBICION DE CRECIMIENTO

La inhibición de crecimiento es una prueba que está determinada por la habilidad de un antisuero para inhibir a los micoplasmas y se ha encontrado que no hay reacción cruzada de antígenos. Es una de las pruebas serológicas mas específicas y ha sido utilizada para la identificación de especies de micoplasma (20).

En infecciones experimentales, se ha observado que al doceavo día aparece una inhibición de crecimiento de 3 mm y se incrementa a 3.5 mm en el catorceavo día, permaneciendo así hasta el final del experimento (día 22) (54).

### E.4 HEMAGLUTINACION PASIVA

La aglutinación pasiva se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígenos o a las partículas inertes que son portadoras de antígenos solubles (30).

Hay una variedad de antígenos solubles que pueden adsorberse de manera pasiva o acoplarse químicamente a los eritrocitos u otras



partículas inertes. Muchos antígenos se acoplan de manera espontánea a los eritrocitos (15). Entre las ventajas de emplear eritrocitos para recubrirlos con antígeno, está su disponibilidad inmediata y su posibilidad de almacenamiento cuando los eritrocitos son tratados con formol o glutaraldehído (3, 8, 52). Se han utilizado diferentes sustancias para unir las proteínas a los eritrocitos. Se encontró que las proteínas pueden ser adsorbidas con ácido tánico a los eritrocitos y así ser aglutinados por anticuerpos.

Se ha reportado un método en el que se emplean cationes metálicos para enlazar proteínas a glóbulos rojos, encontrando que el más útil era el cromo (24).

Se ha tratado de encontrar el antígeno de Mycoplasma bovis más adecuado para ser usado en la prueba de hemaglutinación pasiva, probándose antígenos completos, suspensiones de microorganismos sónicos (34) etcétera.

La hemaglutinación pasiva se ha utilizado con frecuencia para demostrar anticuerpos en las infecciones producidas por micoplasma en el hombre y en los animales. Se han probado diferentes métodos para la prueba, usándose eritrocitos tanizados frescos o formalinizados, se encontró que se obtenían mejores resultados y una mayor sensibilidad con eritrocitos frescos tanizados que con eritrocitos tanizados y formalinizados. La desventaja con los eritrocitos frescos tanizados es que no pueden ser almacenados por más

de diez días (43) ya que puede ocurrir hemólisis.

Igualmente la prueba se ha usado para detección de anticuerpos contra varias especies de micoplasmas por ejemplo Mycoplasma pneumoniae (27), Mycoplasma mycoides (21), Mycoplasma hyosynoviae (59). La prueba fue utilizada para Mycoplasma bovis (18) y se encontró que es una prueba sensible y reproducible.

Se han detectado altos títulos en animales infectados, comparados con los animales no infectados. El título sin embargo no es una guía segura de infección, ya que algunos animales con títulos altos pueden estar recuperándose y por otro lado, animales recientemente infectados pueden no mostrar títulos (39).

## CAPITULO II

### H I P O T E S I S

El diagnóstico de mastitis en animales infectados con Mycoplasma bovis, es más fácil efectuarlo a través de pruebas serológicas que llevar a cabo el aislamiento.

### O B J E T I V O S

- 1.- Comparación de las pruebas de inhibición de crecimiento, inhibición de película y hemaglutinación pasiva en el diagnóstico de mastitis bovina por micoplasma.
- 2.- Establecimiento de una técnica bacteriológica para el aislamiento de micoplasma en leche.
- 3.- Obtención de antisueros contra Mycoplasma bovis.

## CAPITULO III

### MATERIAL Y METODOS

#### A. MUESTRAS

Se tomaron muestras de sangre y leche en condiciones de esterilidad de los cuatro cuartos de 57 vacas Holstein, pertenecientes al rancho La Pria localizado en Texcoco, Estado de México, el sistema de ordeño es manual. Las muestras se tomaron en período seco y posteriormente en lactación.

Como ható control se tomaron muestras de 40 vacas Holstein pertenecientes a la Granja Silvita localizada en Texcoco, Estado de México, en el que el ordeño es mecánico. Estos animales no tenían historia de mastitis por micoplasma, confirmado por los resultados negativos obtenidos en el cultivo de la leche.

#### B. MEDIOS DE CULTIVO

Medio líquido de Friis empleado para el aislamiento de micoplasma.

Caldo PPLO	5.0 g
Caldo infusión cerebro corazón	5.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Glucosa	10.0 g

Sol. Balanceada de Hanks	304 ml
Rojo de fenol 0.1%	8 ml
Agua destilada	500 ml

Se mezclan los componentes y se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

Se enfria el medio a una temperatura de 45-50°C y en forma aséptica se adiciona el suero estéril de caballo y el antibiótico, se distribuye en tubos de 13 X 100 a razón de 3 ml.

Medio sólido de Friis:

Se prepara en forma similar al medio líquido pero se le adicionan 10 g de agar noble.

Sol. Balanceada de Hanks

Sol. Stock A

NaCl	80.0 g
KCl	4.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1.0 g
Agua destilada	400 ml
CaCl <sub>2</sub>	1.4 g
Aforar a	500 ml

Sol. Stock B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.5 g
Agua destilada	400 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g
Aforar a	500 ml

Se mezclan 25 ml de la solución stock A con agua destilada y después se agrega 25 ml de la solución stock B y se afora a 500 ml.

### C. CULTIVOS DE LECHE

Se toman 100  $\mu$ l de leche y se siembran en 3 ml de medio Friis, se hacen diluciones 1:10 y 1:100 con el medio Friis, se incuban a 37°C y se examinan diariamente. A los siete días se siembran en medio sólido de Friis incubándose a 37°C en condiciones de velobiosis y humedad. El crecimiento de las colonias se observa con el microscopio esteroscópico a magnificación de 25 X.

### D. IDENTIFICACION DE MICOPLASMAS AISLADOS DE LECHE

La identificación se llevó a cabo por el método de inhibición de crecimiento (20), probándose con antisueros conocidos de especies involucradas en problemas de mastitis.

#### Procedimiento:

De un cultivo en medio líquido de Friis de 48 horas de las cepas a identificar, se tomó 1 ml que fue distribuido uniformemente con un hisopo en placas de Friis, se colocaron discos de papel filtro impregnados con 20  $\mu$ l de antisucro, se incubo a 37°C en condiciones de humedad y velobiosis, se observó la zona de inhibición a las 72 horas. Como control se uso una cepa conocida de Mycoplasma bovis 201.

### E. PRUEBA DE DEPENDENCIA DE ESTEROLES

Esta prueba diferencia entre el género Mycoplasma y Acholeplasma.

La digitonina reacciona con los esteroides que tienen un grupo hidróxilo en el carbono 3 de la configuración  $\beta$ . El complejo que forma es insoluble.

Solución para la prueba de esteroides:

Digitonina al 1.5% se esterilizó por filtración. Una gota se colocó sobre discos de papel filtro previamente esterilizados, secándose a 37°C y almacenándose a 4°C.

Procedimiento:

Los micoplasmas se sembraron en medio Friis sólido, inmediatamente después se colocaron sobre la superficie discos impregnados con digitonina y se incubaron a 37°C durante tres a cuatro días. Una zona de inhibición indica dependencia de esteroides/

## F. PRODUCCION DE ANTIGENO

Se hizo con la finalidad de inmunizar conejos y obtener antiseros, para usarlos como controles positivos y además para la identificación de especies de micoplasmas.

Procedimiento:

La cepa de referencia Mycoplasma bovis 201, fue usada para la producción de antiseros. Este micoplasma fue crecido a 37°C en 5 ml de medio Friis durante 48 h, posteriormente se pasó a un volumen de 25 ml, de este a 100 ml, hasta llegar a un volumen de 2 lts, en intervalos de 24h. Se centri-

fugó a 10,000 rpm durante 30 minutos y se lavó tres veces con solución buffer de fosfatos pH=7.0 El paquete fue reconstituido al 10% de su volumen original y se prepararon alicuotas de 1ml que se congelaron a -70°C.

El antígeno no fue inactivado (3), debido a su poca antigenicidad.

Se sembró en agar sangre y en medio sólido de Friis para verificar su pureza.

#### G. PRODUCCION DE ANTISUEROS

Se realizó con el objetivo de tener sueros control positivos para la prueba de hemaglutinación pasiva, y contar con antisueros para la identificación de micoplasmas.

Se usaron cinco conejos machos Nueva Zelanda de 3 Kg. Como controles se usaron dos conejos.

#### Programa de Inmunización

Día	Dosis	Vía
0	Sangrado inicial	
	0.75 ml antígeno y 0.75 ml ACF	IM
	1.0 ml antígeno repartido en cuatro partes	SC
3	0.75 ml antígeno y 0.75 ml AIF	IM
6	0.75 ml antígeno y 0.75 ml AIF	IM
9	0.75 ml antígeno y 0.75 ml AIF	IM



12	0.75 ml antígeno y 0.75 ml AIF	IM
	1.0 ml antígeno repartido en 4 partes.	SC
33	Sangrado de prueba	
	1.5 ml antígeno	IV
36	2.0 ml antígeno	IV
39	2.5 ml antígeno	IV
42	3.0 ml antígeno	IV
53	Sangrado final	

IM intramuscular

SC subcutáneo

IV intravenoso

ACF Adyuvante

completo de Freud

AIF Adyuvante incompleto de Freud

#### H DETERMINACION DE PROTEINAS DEL ANTIGENO

Se hizo para poder ajustar el antígeno inoculado en base a la concentración de proteína.

Fue realizado por el método de Micro Kjeldahl haciendo una modificación y titulando en una cámara de Conway (35, 42).

Reactivos:

Acido sulfúrico libre de nitrógeno

Oxido de mercurio libre de nitrógeno

Sulfato de potasio libre de nitrógeno

Solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio (60 g NaOH

5 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en 200 ml de agua destilada).

Solución saturada de  $\text{H}_3\text{BO}_3$

Acido clorhídrico 0.01 N

Procedimiento:

- 1.- Una muestra de 1 ml de antígeno se colocó en un matraz de digestión de 100 ml perfectamente limpio.
- 2.- Se adicionó 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.5 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y 15 mg de  $\text{HgO}$ .
- 2.- Se colocaron algunas perlas de ebullición y la muestra se digirió durante 30 a 60 minutos, el matraz se dejo enfriar y se agregaron 5 ml de agua destilada.
- 4.- Para llevar a cabo la titulación, se adicionaron 5 ml de ácido bórico en la cámara interior y dos gotas de indicador (mezcla de rojo de metilo y púrpura de bromocresol), a la cámara exterior se le agregaron 5 ml de la solución de hidróxido de sodio-tiosulfato y 1ml de la muestra ya digerida, se tapa rapidamente la cámara con un vidrio esmerilado, permitiendo la difusión del amoníaco hacia el compartimiento interior de la cámara, lo cual es indicado por el vire del indicador. El blanco se hizo de forma similar pero sin muestra.
- 5.- Se titulo con  $\text{HCl}$  0.02 N y se comparó con el blanco.

Cálculos:

$$\%N = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml blanco}) \times \text{Normalidad} \times 14.007 \times 100}{\text{ml de muestra}}$$

ml de muestra

% Proteína = %N X 6.25.

## I. PRUEBAS DE DIAGNOSTICO

### HEMAGLUTINACION PASIVA

Muestras de suero:

Todos los sueros fueron separados del coágulo por centrifugación a 2500 rpm, durante 10 minutos y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Soluciones:

Sol. de Alsever. Para conservación de eritrocitos

Dextrosa	2.05 g
Citrato de sodio	0.80 g
Cloruro de sodio	0.42 g
Agua destilada	100 ml

Se ajusta el pH a 6.1 con ácido cítrico al 10%, antes de esterilizarse a 10 libras durante 15 minutos.

Sol. de Trietanolamina

Trietanolamina	28 ml
HCl 1 N	180 ml
NaCl	75 g
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CaCl}_2$	0.2 g

Se diluye la solución stock con nueve volúmenes de agua, se ajusta el pH= 7.3 y se agrega gelatina al 0.05%.

Solución salina 0.15 M

Solución de cloruro crómico 0.1% (en Sol. salina)

Sol. de suero de conejo (diluyente)

El suero normal de conejo se inactiva a 56°C durante 30 minutos y se adsorbió con glóbulos rojos de carnero (0.9 de suero más 0.1 ml de paquete). Se mezcló 1 ml de suero en 99 ml de solución salina de fosfatos pH=7.2.

Procedimiento:

La prueba se realizó en microplacas

- 1.- Preparación de eritrocitos frescos de carnero, conservados en solución Al-sever, se centrifugaron a 1300 rpm durante 10 minutos y se lavaron tres veces con solución salina.
- 2.- Se tomó 0.1 ml del paquete de eritrocitos, se adicionó 0.2 ml del antígeno diluido y se agregó gota a gota 0.2 ml de solución fresca de cloruro crómico, con agitación constante.
- 3.- Se incubó a temperatura ambiente cinco minutos, se lavó cuatro veces con solución salina y los eritrocitos se resuspendieron en solución de trietanolamina a una concentración final 0.5%.

Titulación del antígeno:

Se prepararon diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:150 del antígeno (879 mg/ml de proteína) y se hicieron titulaciones de "ajedrez" con un suero negativo y otro suero positivo de un título alto.

Tomándose como dilución óptima de antígeno aquélla dilución que dió el título más alto con el suero positivo y negativa con el otro suero.

Muestras de suero:

Con el fin de inactivar el complemento los sueros fueron puestos a 56°C durante 30 minutos y se adsorbieron con glóbulos rojos a 37°C durante 30 minutos .

Procedimiento de la prueba:

- 1.- En las placas de microtitulación se transfirieron 0.05 ml de diluyente con suero normal de conejo a cada uno de los pozos.
- 2.- En el primer pozo de la microplaca se pusieron 0.05 ml del suero a probar se mezcló y se hicieron las diluciones con el microdilutor (Dynatech Laboratories, INC. ).
- 3.- Se adicionaron 0.025 ml de solución sensibilizada de glóbulos rojos de ternero a cada dilución de suero.
- 4.- Se incubó a 4°C durante 12 horas y se leyó.

#### J. PRUEBA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO Y DE PELICULA

- 1.- De un cultivo de 48 h de Mycoplasma bovis 201, se prepararon diluciones logaritmicas de  $10^{-2}$  con medio líquido de Friis.
- 2.- Se tomó 1 ml de la dilución y se sembró en una caja con un hisopo, se colocaron cilindros a los cuales se les adicionaron 250  $\mu$ l del suero a probar.

3.- Se incubó a 37°C en condiciones de humedad y velobiosis, durante cuatro días.

4.- Se observaron con el microscopio esteroscópico a una magnificaci6n de 25X la zona de inhibici6n de crecimiento y de pel6cula, las cuales fueron medidas respectivamente.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### A. AISLAMIENTOS

El micoplasma aislado fue identificado por el método de Inhibición de crecimiento (20), como Mycoplasma bovis.

En el cuadro 1 se presenta el número de aislamientos.

---

CUADRO 1 AISLAMIENTOS DE MICOPLASMAS EN MUESTRAS DE LECHE

PERIODO	NUMERO
Seco	9
Lactación	7

---

El micoplasma fue aislado en 19.64% de las vacas muestreadas y solamente en 9 animales durante el período seco y en 7 animales muestreados una semana después del parto.

El mayor número de aislamientos de micoplasma se obtuvo de los cuartos del lado derecho del animal; 15 en los cuartos derechos, tanto anterior como posterior y solo uno en el lado izquierdo.

## B. PRUEBAS BIOQUIMICAS

CUADRO 2. ALGUNAS PRUEBAS BIOQUIMICAS CARACTERISTICAS DE ESTE MICROORGANISMO.

	Fermentación de glucosa	Hidrólisis de la arginina	Formación de película	Dependencia de esteroles
Micoplasma aislado	-	-	+	+

## C. APARIENCIA FISICA DE CUARTOS

CUADRO 3. APARIENCIA FISICA EXTERNA DE CUARTOS EN LOS QUE SE AISLO MICOPLASMA

	NORMAL	INFLAMADO	FIBROTICO
Período seco	4	2	3
Período lactación	2	1	4

## D. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS

Se tenía un hato control negativo de 40 animales el cual no presentaba historia de mastitis por micoplasma. En este grupo se realizaron las tres pruebas serológicas y se intentó el aislamiento de micoplasma de cada cuarto. No se aisló y por lo tanto se consideró control negativo.



A el hato problema de 57 animales, con historia clínica - aparente de mastitis por micoplasma, se le realizaron las tres pruebas serológicas y se intentó el aislamiento. Se aislo micoplasma y se consideró como hato control positivo

CUADRO 4 TITULOS DE HEMAGLUTINACION PASIVA (%DE VACAS)

Título (recíproco de la dilución final)	Hato problema		Hato control
	seco	lactación	
-	3.5	23.5	57.5
10	14.0	43.1	20.0
20	31.57	19.6	12.5
40	31.57	9.8	10.0
60	10.52	3.92	
160	8.67		

E. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO

CUADRO 5. INHIBICION DE CRECIMIENTO (% DE VACAS)

mm de inhibición	Hato problema		Hato control
	seco	lactación	
-	45.6	56.1	92.5
2 - 5	21.0	24.6	2.5
6 - 10	29.8	15.7	2.5
10	3.5	3.5	2.5

F. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICION DE PELICULA

CUADRO 6 INHIBICION DE PELICULA (% DE VACAS)

mm de inhibición	Hato problema		Hato control
	seco	lactación	
-	5.3	15.8	47.5
2 - 5	19.3	24.6	20.0
6 - 10	38.6	36.8	20.0
10	36.8	22.3	12.5

G. COMPARACION DE MEDIAS

Se compararon las medias de anticuerpos sanguíneos entre el grupo control negativo (n = 40) y el grupo control positivo (n = 8). Haciendo una prueba t de Student para determinar diferencia de medias. Se realizó una transformación al recíproco del título de anticuerpos y posteriormente se hizo la prueba de t de Student.

Lo mismo se hizo (diferencia de medias) por t de Student para inhibición de película e inhibición de crecimiento.

CUADRO 7 COMPARACION DE MEDIAS

H a t o	+	-
Hemaglutinación pasiva; recíproco de la dilución del suero	22.22 <sup>a</sup>	8.5 <sup>b</sup>
Inhibición de crecimiento; mm de inhibición	3.62 <sup>a</sup>	0.30 <sup>b</sup>
Inhibición de película; mm de inhibición	8.5 <sup>a</sup>	3.9 <sup>b</sup>

a, b diferente literal dentro del mismo renglón indica diferencia significativa (P 0.05).

Las tres medias del grupo positivo en cada una de las pruebas resultaron mayores que el grupo negativo.

#### H. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

$$\% \text{ Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad HP} = \frac{2}{2 + 6} = 0.25$$

$$\text{Especificidad HP} = \frac{36}{36 + 4} = 0.9$$

Prueba de inhibición de crecimiento y de película se tomó como positiva con 1 mm de inhibición (20).

$$\text{Sensibilidad IC} = \frac{5}{5 + 3} = 0.625 \quad \text{Especificidad IC} = \frac{38}{38 + 2} = 0.95$$

$$\text{Sensibilidad IP} = \frac{8}{8 + 0} = 1.0 \quad \text{Especificidad IP} = \frac{21}{21 + 19} = 0.525$$

CUADRO 8 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CADA UNA DE LAS PRUEBAS

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
Hemaglutinación pasiva	25%	90%
Inhibición de crecimiento	62.5%	95%
Inhibición de película	100%	52.5%

CUADRO 9 RESULTADOS DE LOS ANIMALES VERDADEROS POSITIVOS

A n i m a l	IC	IP	HP
1	3 mm	6 mm	1:10
2	0	3	1:10
3	7	7	1:40
4	0	10	1:20
5	2	11	-
6	9	14	1:20
7	0	3	1:80
8	6	10	1:10

IC Inhibición de crecimiento

IP Inhibición de película

HP Hemaglutinación pasiva

CUADRO 10 RESULTADOS DE LAS TRES PRUEBAS EN EL HATO  
NEGATIVO

A N I M A L	IC	IP	HP
1	-	-	-
2	-	8	1:20
3	-	7	-
4	-	7	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	12	1:20
8	-	5	1:10
9	-	4	-
10	-	4	1:10
11	-	12	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	14	-
16	-	-	-
17	-	-	1:10
18	-	10	1:20
19	-	-	1:10
20	-	-	-
21	-	-	1:10
22	-	-	1:10
23	-	-	1:40
24	-	-	-
25	-	12	-
26	7	7	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	5	-
30	-	4	-
31	-	6	-
32	-	-	1:10
33	-	7	1:40
34	-	8	1:40
35	-	5	-
36	-	-	-
37	-	3	1:10
38	5	6	1:20
39	-	-	1:40
40	-	12	1:20

En la prueba de hemaglutinación pasiva se tomó como positivo el valor crítico de 1:40 (18).

CUADRO 11 RESULTADOS DE LAS TRES PRUEBAS EN EL HATO PROBLEMA

A n i m a l	Período seco			Período de lactación		
	IC	IP	HP	IC	IP	HP
1	-	12	1:20	4	4	1:40
2	5	13	1:80	-	7	1:20
3	-	7	1:20	-	7	1:10
4	-	4	1:160	-	5	1:80
5	3	6	1:10	-	8	1:20
6	8	14	1:80	2	8	1:10
7	-	7	1:10	7	11	1:10
8	-	-	1:10	-	4	-
9	2	12	1:40	6	14	-
10	-	8	1:80	-	9	1:10
11	15	18	1:20	-	14	1:10
12	5	14	1:10	4	12	-
13	6	7	1:40	-	-	-
14	-	7	1:40	-	4	1:20
15	-	5	1:40	-	7	1:20
16	2	4	1:20	4	4	1:10
17	10	17	1:20	9	11	1:10
18	10	17	1:10	8	5	1:10
19	6	14	1:40	7	13	-
20	-	9	1:10	-	-	-
21	-	2	1:20	-	8	1:10
22	10	17	1:40	9	15	1:20
23	10	12	1:20	-	6	-
24	8	14	1:80	-	9	1:10
25	5	14	1:40	-	11	-
26	-	9	1:40	-	7	1:10
27	7	13	1:40	-	13	1:20
28	-	7	1:160	2	9	1:80
29	12	12	1:80	14	16	1:10
30	-	-	1:40	-	-	1:10
31	-	7	1:160	-	7	1:20
32	7	10	1:40	3	10	1:20
33	6	10	1:20	-	2	-
34	-	10	1:20	-	10	1:10
35	-	-	1:40	-	-	1:10
36	1	7	1:160	4	17	1:40
37	-	3	1:10	2	9	1:10
38	4	5	1:20	1	6	1:10
39	4	4	1:20	12	12	1:10
40	2	11	-	7	10	1:10
41	9	14	1:20	6	12	1:10
42	3	8	-	-	10	-
43	3	12	1:40	3	7	1:20
44	1	6	1:40	2	8	1:20
45	6	13	1:40	1	12	1:40

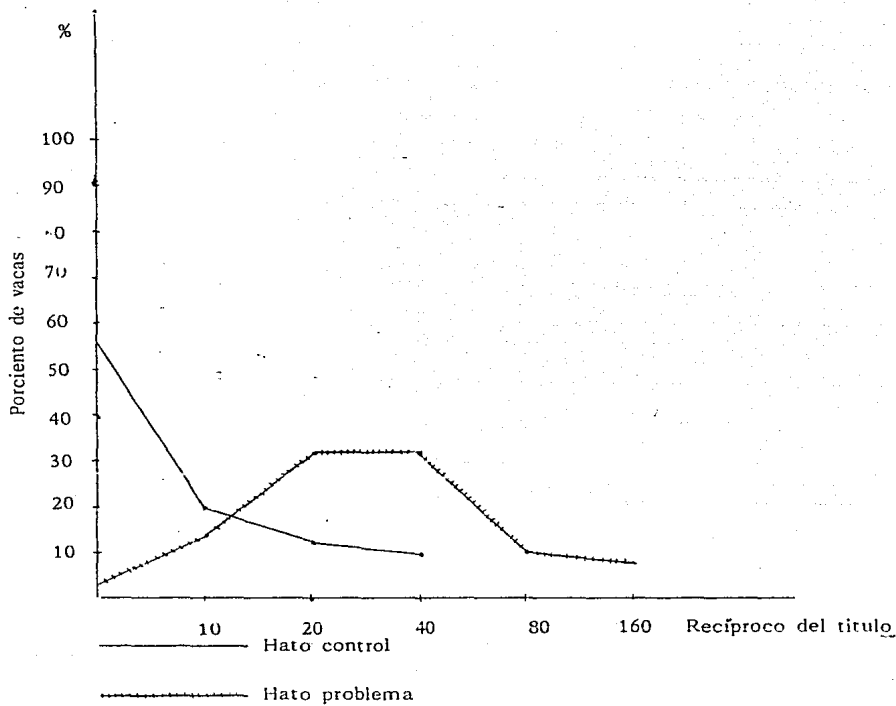
CONTINUACION CUADRO 10 RESULTADOS DE LAS TRES PRUEBAS EN EL HATO PROBLEMA

A n i m a l	IC	IP	HP	IC	IP	HP
46	5	12	1:160	-	-	1:40
47	-	12	1:20	-	11	1:20
48	2	2	1:20	4	4	1:10
49	8	14	1:40	-	-	1:20
50	--	3	1:80	-	2	1:40
51	-	11	1:20	-	-	-
52	-	4	1:20	-	2	1:20
53	-	8	1:20	-	2	-
54	-	11	1:20	3	16	1:10
55	6	10	1:10	7	10	1:10
56	3	10	1:40	5	10	1:20
57	-	8	1:20	=	10	1:10

En las gráficas 1, 2, y 3 se muestran los resultados del hato problema (57 animales y el hato control 40 animales en cada una de las pruebas.

GRAFICA 1

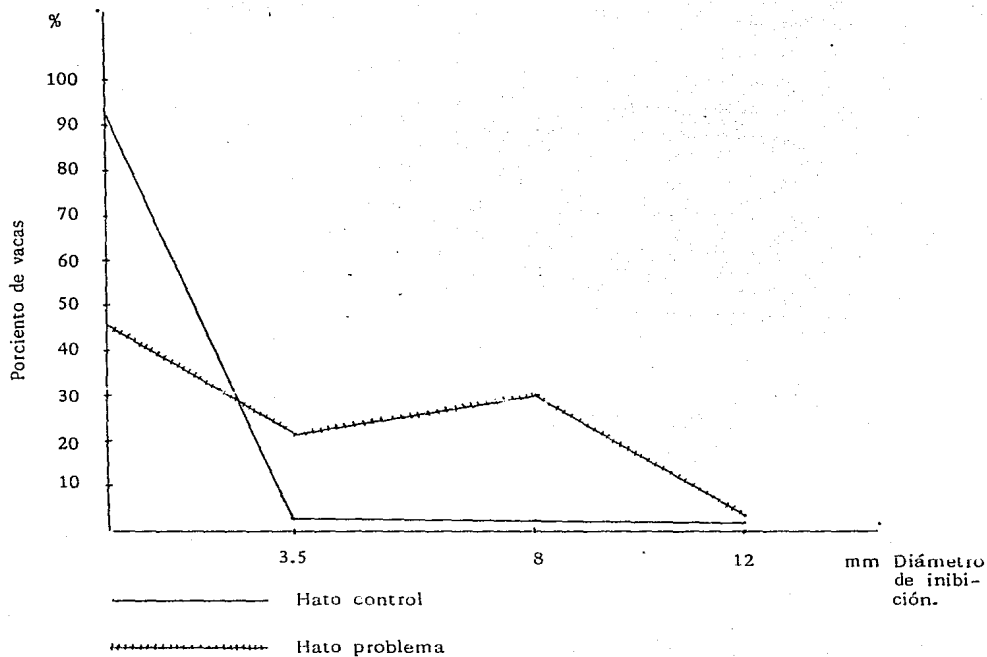
HEMAGLUTINACION PASIVA



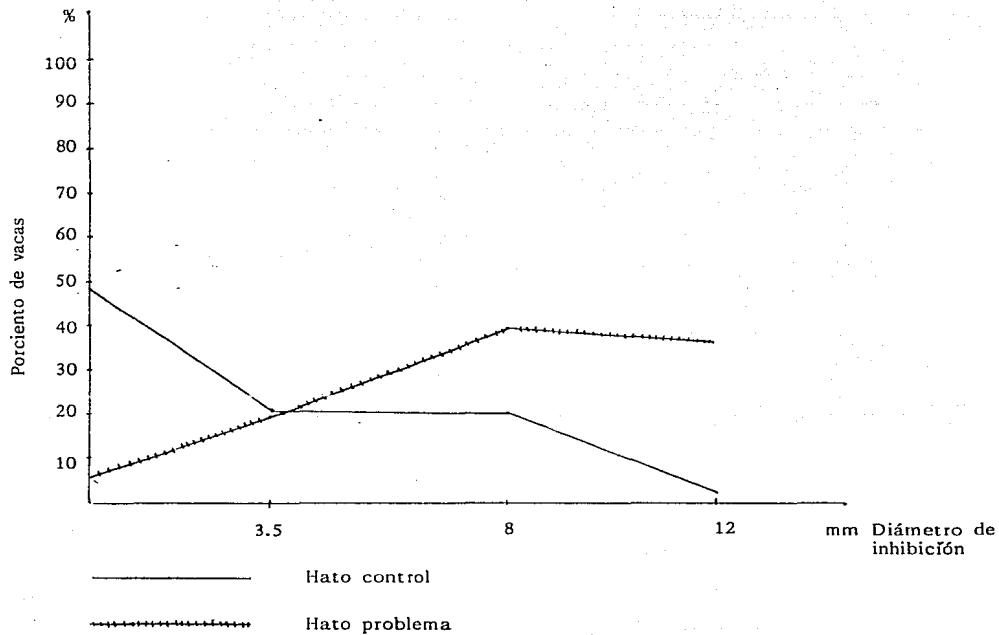


GRAFICA 2

INHIBICION DE CRECIMIENTO



GRAFICA 3  
INHIBICION DE PELICULA



## CAPITULO V

### DISCUSION

El diagnóstico en un hato usualmente se hace con cultivos de leche de casos clínicos (39). Las dificultades en el cultivo y en el aislamiento de micoplasma imponen limitaciones en el diagnóstico de ganado infectado, lo que se comprueba en este trabajo como se muestra en el cuadro 1, donde se presentan el número de aislamientos realizados. La baja cantidad de aislamientos en las muestras nos indica la dificultad que presenta el aislamiento.

En el caso de las pruebas serológicas los anticuerpos a micoplasma pueden ser detectados por muchos procedimientos; una o más pruebas se pueden usar para detectar la infección del hato dependiendo de la sensibilidad y especificidad, de la prueba en lugar de un examen de cultivo (18, 36). Se ha demostrado que Mycoplasma bovis estimula anticuerpos aglutinantes, inhibidores de metabolismo, inhibidores de crecimiento etc.(1).

Se encontró que la prueba de hemaglutinación pasiva era sensible, reproducible, específica y rápida, (18). Se encontró que los títulos de hemaglutinación pasiva se incrementan en animales infectados a diferencia de los títulos bajos en animales no expuestos a Mycoplasma bovis. Esto se pudo observar en el hato problema y en el hato control (gráfica 1), en donde el porcentaje de animales con títulos bajos fue menor en el control y mayor

en el hato problema. Se encontró que la prueba era específica (cuadro 8) y rápida ya que con el método de microplaca se pueden trabajar un gran número de sueros y se necesita poca cantidad de antígeno. Sin embargo el título no es una guía segura de la infección, ya que algunos animales con títulos altos podrían estar en recuperación cuando se tomó la muestra y animales recientemente infectados podrían no mostrar títulos altos todavía. Lo que se podría sugerir en la prueba de hemaglutinación pasiva, es que se realicen más muestras de los animales para poder encontrar títulos.

Los anticuerpos inhibidores de crecimiento se encontraron en un alto porcentaje en el hato problema comparándose con el control en donde el 95% de animales no presentó estos anticuerpos (gráfica 2). La técnica es sencilla pero requiere de más tiempo que la de hemaglutinación pasiva para su ejecución y además se necesita de medios apropiados para el crecimiento de micoplasmas. La prueba de inhibición de crecimiento resultó ser específica y sensible en mayor proporción que la prueba de hemaglutinación pasiva.

La prueba de inhibición de película tiene la ventaja de que se puede hacer al mismo tiempo que la de inhibición de crecimiento siempre y cuando el micoplasma involucrado produzca película como en el caso de M. bovis. Se ha encontrado que los anticuerpos inhibidores de película persisten durante más de un año (57) y en este trabajo se encontró un

porcentaje mas alto de estos anticuerpos, que de anticuerpos aglutinantes o inhibidores de crecimiento (cuadros 4, 5, y 6). La prueba resultó ser sensible pero poco específica (cuadro 8).

Se encontraron diferencias significativas en cada prueba - (cuadro 7) entre el hato problema y el control.

La falta de correlación entre un cultivo positivo y un título alto de anticuerpos específicos no es necesariamente incongruente. - Puede indicar que la muestra obtenida carecía del microorganismo o que el organismo no es suficientemente invasivo para producir una buena respuesta o que los organismos no son buenos antígenos para producir anticuerpos.

Es de vital importancia el diagnóstico de la infección en - un hato para poder controlarla. En este caso la propagación de la infección se vió incrementada por falta de medidas higiénicas.

Se pudo comprobar que la infección se presenta tanto en período seco como en lactación como es mencionado por Boughton, la apariencia de la leche en algunas de las muestras de donde fue aislado el micoplasma parecía casi normal con pequeños grumos; sin embargo en otras muestras se - presentaban mas cambios característicos de mastitis por micoplasma.

La cepa aislada en todos los casos fue Mycoplasma bovis (cuadro 2) encontrándose generalmente en los cuartos derechos, concordando con los reportes de que Mycoplasma a veces afecta un solo tipo de cuartos (11).

## CAPITULO VI

### C O N C L U S I O N E S

- 1.- Las tres pruebas se pueden usar para el diagnóstico a nivel de hato.
- 2.- La prueba que resultó más sensible y específica para el diagnóstico fue la de inhibición de crecimiento.
- 3.- Se pudo establecer la técnica para el aislamiento de micoplasma a partir de leche.
- 4.- Se obtuvo antisuero para la identificación de M. bovis

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Al-Aubaidi, J. M.: Bovine Mycoplasma: Purification, characterization, classification and pathogenicity. Ph. D. Thesis Cornell University , -  
United States (1970).
- 2.- Alstrom L.: Filt rebar pleomorf penicillinoch pasteuriserings resistent -  
mikroorganism pasisad. Mjorlk Nord Hyg Tids Kr. 36: 230 ( 1955)
- 3.- Anders D. F.: Indirect Hemagglutination with Mycoplasma antigens: Effect  
of pH on antigen sensitization of tanned fresh and formalinized -  
sheep erythrocytes Appl. Microb. 22 (5): 756-759 (1971).
- 4.- Bar-Moshe B: The isolation of Mycoplasma from an outbreak of bovine -  
mastitis in Israel. Refauh Vet. 21: 97-99 (1964).
- 5.- Bennet, R., Jasper, D.: Factors associated with differentiation between -  
cattle resistant and susceptible to intramammary challenge exposure  
with Mycoplasma bovis . Am. J. Vet. Res 39: 407-416 (1973).
- 6.- Bennet, R., Jasper, D.: Immunosuppression of humoral and cell mediated -  
responses in calves associated with inoculation of Mycoplasma bovis.  
Am. J. Vet. Res. 38:(10) 1731-1738 (1977).
- 7.- Biancardi, G.: Mastite micoplasmica bovina; contributo casistico. Atti. Soc  
Ital. Sci. Buiatria 2: 513-517 (1970).
- 8.- Bing, D. H., Weyand, A., Stavitsky A.: Hemagglutination with aldehyde  
fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. Proc. Soc  
Exp. Biol. Med. 124: 1166-1170 (1967).

- 9.- Blood, D. C., Henderson, J. A.: Medicina Veterinaria, Quinta edición, nueva Editorial Interamericana, México D.F., 403 (1983).
- 10.- Boughton, E.: Mycoplasma bovis mastitis Vet. Rec. 103: 2270-2271 (1978).
- 11.- Boughton, E.: Mycoplasma bovis mastitis. Vet. Bull. 49 (6): 377 - 387 (1979).
- 12.- Boughton, C., Thorns, J. Mycoplasma Laboratory Handbook, Ministry of Agriculture, Fisheries and food Central Veterinary Laboratory, England (1975).
- 13.- Boyden S.V. J.: Exp Med. 93: 107 (1951).
- 14.-Burton, A., Fraser, C. Animal Microbiology, Blackwell Scientific Publications Vol. 1, Oxford, London, 267, (1977).
- 15.- Campbell, D. H., Garvey. J., Cremer N. E., Methods in Immunology, Tomo II, 2a. edición, W. A. Benjamín Inc, N.Y., 271 (1970).
- 16.-Carter, G. R. Essentials of Veterinary, Bacteriology and Micology, Michigan State University Press, East Lansing Blacksburg, Virginia, 321 (1982).
- 17.- Carroll, E. J., Rollins, M., Jasper, D.: The immune response of rabbits to 3 strains of Mycoplasma agalactiae var. bovis isolated from mastitis bovine udders, Cornell Vet. 66: 143-151 (1976).
- 18.- Cho, H., Ruhnke, H. L., Langford, E. U.: The indirect haemagglutination test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with mycoplasmas. Can. J. Comp. Med. 40: 20-29 (1976).



- 19.- Claus, E., Illiner, F. *Mycoplasmosis de los animales*, editorial Acribia, - Zaragoza España. 117 (1973).
- 20.-Clyde, W. A.: Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera, J. Immun. 92: 958-965 (1964).
- 21.- Cottew, G. S.: Indirect haemagglutination and haemagglutination inhibition with Mycoplasma mycoides. Aust. Vet. J. 18(2): 54-56 (1960).
- 22.- Cottew, G. S.: Mycoplasmas isolated from cattle in Australia. Aust. Vet. J. 46: 378-381 (1970).
- 23.- Counter, D. E.: A severe outbreak of bovine mastitis associated with Mycoplasma bovigenitalium and Acholeplasma laidlawii Vet. Rec. 103: 130-131 (1978).
- 24.- Curtis, A., Chase, M. *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Academic Press. Vol IV, New York, 26 (1967).
- 25.-Davidson, Stuart: Isolation of a Mycoplasma like organism from an outbreak of bovine mastitis. Vet. Rec. 72: 766 (1960).
- 26.- Davies, A., Boughton, E.: Mastitis caused by M. agalactiae var. bovis in north Wales. Vet. Rec. 99: 322 (1976).
- 27.-Dowdle, W. R., Robinson, R.: An indirect haemagglutination test for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae; infection, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116(4): 947-950 (1964).
- 28.- Edward, D., Fitzgerald, W.: Inhibition of growth of pleuropneumonia like - organisms by antibody. J. Pathol. Bacteriol. 68: 23-30 (1954).

- 29.- Erno, H.: Mycoplasmosis: Experimental mastitis, demonstration of antibody in milk. Acta. Vet. Scand. 12: 451-453 (1971).
- 30.- Fudenberg, H., Stites, D., Caldwell J., Manual de Inmunología Clínica, editorial El manual moderno, 2a. edición, 411, México, (1980).
- 31.- Gold, R., Yankaskas, B. Epidemiología y Salud Pública, Mc. Graw Hill, 2a. edición, 40 México, (1982).
- 32.- Gourlay, R., Wyld. S.: Isolation of Mycoplasma canadense from an outbreak of bovine mastitis in England. Vet. Rec. 103: 74-75 (1978).
- 33.- Gourlay, R, Scott, N.: Isolation of Mycoplasma agalactiae var. bovis and infectivos bovine rhinotracheitis virus from an outbreak of mastitis in France. Vet. Rec. 95: 534-535 (1974).
- 34.- Gow, T., Lam, H., Morton, E.: Stable Mycoplasma antigen, preparations for indirect haemagglutination tests. Appl. Microb. 27: 356-359 (1974).
- 35.- Hawk's, Oser, B. L. Physiological Chemistry, fourteenth edition, Mc. Graw Hill, 1023, New York (1965).
- 36.- Howard, C., Collins, J., Gourlay, R.: A radial growth precipitation test and its comparison with certain other serological tests for the detection of antibody in bovine sera to Mycoplasma agalactiae subs. bovis. Vet. Microb. 1: 23-30 (1976).
- 37.- Jain, N. C.: Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J Dairy. Sci. 62: 128-139 (1979).

- 38.- Jain, N. C.: Serologic response of cows to Mycoplasma under experimental and field conditions. Am. J. Vet. Res. 30(5): 733-742 (1969).
- 39.- Jasper, D. E.: Mycoplasma and mycoplasma mastitis J. Am. Vet. Med. Ass. 170 (10): 1167-1171 (1977).
- 40.- Jasper, D. E.: Mycoplasmas their role in bovine disease. J. Am. Vet. Med. Ass. 148: 1650-1655 (1967).
- 41.- Jasper, D. E., Jain, N., Brazil, L.: Clinical and laboratory observations on - bovine mastitis due to Mycoplasma. J. Am. Vet. Med. Ass. 148: 1017-1029 (1966).
42. Kabat, E., Mayer, M. Experimental Immunochemistry. 2a. edición, Charles - C. Thomas, 449, United States (1971).
- 43.- Kreyszig, E. Introducción a la estadística matemática, editorial Limusa, - 168, México (1978).
- 44.-Krogsgaard, A. J.: Indirect haemagglutination with mycoplasma antigens - effect of pH on antigen sensitization of tanned fresh and formalinized sheep erythrocytes Appl. Microb. 22(5): 756-759 (1971).
- 45.- Lascells, A. K.: The immune system of the Ruminant, J. Dairy Sci. 62: 154-160 (1979).
- 46.- Laskin, A., Lechevaliers, H. I. Handbook of Microbiology. 2a. edition, C.R.C. Press. Inc., 99 United States (1977).
- 47.- Manual de prácticas de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México IPN, 66 (1978).

- 48.- Marcos Barrado A., Sanz, P.: Aislamiento de mycoplasma a partir de leche mastitica Rev. Lat. Microb. Paras. 9: 21-22 (1967).
- 49.- Memorias del curso: Mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 12, junio (1982).
- 50.- Molen, V. E., Grootenhuis G.: An investigation of the pathology of mycoplasma mastitis in the cow. Vet. Quart. 1(3) 126-133 (1979).
- 51.- National Mastitis Council. Microbiological procedures for the diagnosis of New Hampshire. England, Press Washington, 23 (1979).
- 52.- Neimark, H.: Glutaraldehyde-fixed erythrocytes for indirect haemagglutination with mycoplasma. Nature 219 (20): 293-294 (1968).
- 53.- Razin, S., Tully, J. Methods in Mycoplasmaology. Volume I, Academic Press Inc. 405, New York (1983).
- 54.- Ruhnke, L. H.: Bovine mastitis in Ontario due to Mycoplasma agalactiae Subs. bovis. Can. J. Comp. Med. 40: 142-148 (1976).
- 55.- Shimizu, T., Nagatomo, H.: Isolation of Mycoplasma and unstable L-forms from sporadic bovine mastitis Jap. J. Vet. Sci. 39: 581-585 (1977).
- 56.- Smith, P. The Biology of Mycoplasmas, Academic Press, 1a. edition, 212, New York (1971).
- 57.- Thorns, C. J. Boughton, E.: Studies on film production and its specific inhibition with special reference to Mycoplasma bovis (M. agalactiae var. bovis). Zbl. Vet. Med. 25:657-667 (1978).

58.- Thomas, C. B., Jasper, D.: Mycoplasma mastitis and the herd size factor,

Cal. Vet. 36(7): 15-16 (1982).

59.- Zimmerman, B.J., Ross, R.: Antibody response of swine experimentally -

infected with Mycoplasma hyosynoviae. Vet. Microb. 7:135-146 (1982).