



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE MASTITIS BOVINA SUBCLÍNICA POR
MICOPLASMOSIS MEDIANTE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO
(PRUEBA DE ELISA INDIRECTA) Y AISLAMIENTO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

AUGUSTO CESAR NÚÑEZ DÍAZ

Asesores:

Dra. Elizabeth Morales Salinas

Dr. José Juan Martínez Maya

M.C. Laura Hernández Andrade

MEXICO, D. F.

2005



m. 345515



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

DEDICATORIA

A mis padres: Susana y Antonio

Por su amor y apoyo

A mi esposa e hija: Tania y Luha

Aunque puedo cerrar los ojos

No puedo dejar de verlas

Y de pensar en ustedes

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Augusto Cesar Nuñez Díez

FECHA: 16/ Junio / 2005

FIRMA: _____

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo y sincero agradecimiento a mis asesores por su apoyo y amistad gracias Dra. Elizabeth Morales, Dra. Laura Hernández, Dr. José Juan, Dr. Eduardo Puente P. y MVZ MC Enrique Herrera.

Por formar parte de mi vida gracias: Ameri, Tania, Susi, Azu, Lali, Tony, Mama Nico, Tomy, Abue Vicenta, Abue Samuel, Flavio, Toño, Sergio, Cejas, Homero, EL Chavo, Morris, Saúl, Vicente, Aresmi, Dra. Sandra y Juan Carlos, Paty, Pao, Mireya, Erika, Penélope, Edith, Nayeli, Andrés, Adrián, Jony, Juan, José, Neri y A bi, Iván, P aco, Ángel, Arón, Marcos, Canela, Michael, Gaby, Kika, Picuda, Don Víctor y Doña Emma, Adriana, Kikis, Lucy, Egna, Mireya (chiquitis), Carmelita, Mario, Don Luis, Lalo, Paco, Dr. Fernando, Dr. Enrique, Dr. Pepetón, Larisa, Dra. Eugenia, Paola, Beatriz, Evelia, Dra. Beatriz, Cesar

ETC.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	8
DISCUSIÓN.....	9
LITERATURA CITADA.....	12
CUADROS.....	16
FIGURAS.....	22

RESUMEN

NUÑEZ DIAZ, AUGUSTO CESAR. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante prueba de ELISA indirecta y aislamiento. (Bajo la dirección de Dra. Elizabeth Morales Salinas, Dr. José Juan Martínez Maya y M.C. Laura Hernández Andrade).

El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de una prueba comercial de ELISA en suero, para el diagnóstico de la mastitis bovina subclínica causada por *Mycoplasma bovis*, teniendo como prueba de referencia al 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, y de los estados de Coahuila e Hidalgo. Ciento treinta y nueve muestras (61.8%) resultaron positivas a mastitis subclínica mediante la prueba de Wisconsin, y de ellas, solo en 6 se aisló *M. bovis*. A través de la prueba de ELISA, 72 muestras fueron positivas (32.0%). Todos los animales con aislamiento positivo también fueron positivos a la prueba de ELISA. Con el punto de corte recomendado por el fabricante, se obtuvo una sensibilidad (Se) del 100%, una especificidad (Es) de 68.04%, un valor predictivo positivo (Vp(+)) de 7.89% y un valor predictivo negativo (Vp(-)) de 100%. El punto de corte que mostró la mayor capacidad de la prueba de ELISA fue en un porcentaje mayor o igual a 100, con una Se de 83.3%, una Es de 83.56%, aunque el Vp(+) fue del 12.2% y el Vp(-) de 99.46%. El Vp(+) bajo se asoció a un escaso número de aislamientos. Se concluye, que la técnica de ELISA podría ser utilizada como prueba tamiz para la detección de ganado bovino con mastitis asociada a *M. bovis* particularmente en hatos con frecuencias elevadas (> al 10%), a fin de garantizar un valor predictivo razonablemente alto, sumado a que la prueba es práctica, rápida y económica, o a reserva de utilizar otro método de diagnóstico con por lo menos la misma sensibilidad y especificidad.

INTRODUCCION

La Micoplasmosis es una enfermedad infecciosa que afecta a varias especies animales. Es causada por microorganismos del género *Mycoplasma*, el cual pertenece a la clase Mollicutes, orden *Mycoplasmatales* y familia *Mycoplasmatacea*.

Los micoplasmas son microorganismos pleomórficos, carecen de pared celular, miden de 200 a 500 nm, crecen en medios sólidos y líquidos, y utilizan glucosa como fuente de energía. Para su crecimiento se utilizan medios adicionados de proteínas y complejos nutricionales, también se utiliza penicilina y acetato de talio como inhibidores de bacterias contaminantes.

En el ganado bovino las principales especies encontradas y sus respectivas manifestaciones se muestran en el cuadro 6. *Mycoplasma alkalences*, *M. bovis*, *M. californicum* y *M. canadense* provocan mastitis, artritis, neumonías, otitis y problemas reproductivos, entre otras manifestaciones.^{1,2,3} Sin embargo, *M. bovis* es el principal agente que causa mastitis en bovinos.^{1,2,3,4,5}

México no ha estado exento de micoplasmosis, Ávila y col. (1983) informan sobre el aislamiento de *Mycoplasma* spp. en un hato lechero ubicado en el Estado de México.⁶ Hernández y col. (1984) describen un brote de mastitis causado por *M. bovis* en un hato lechero del Estado de México.⁷ Barajas y col.(1993)observaron una seroprevalencia de *M. bovis* mayor al 50% en bovinos en el trópico de México.⁸ Miranda y Castro (1994), informan del aislamiento de *M. spp* proteolítico de un brote de mastitis en un hato lechero en Tizayuca, hidalgo.⁹

La mastitis es la enfermedad más común en los bovinos productores de leche y la más costosa para el productor por las pérdidas que genera.¹⁵ Dentro de las mastitis causadas por los micoplasmas, *M. bovis* es el más frecuente. *M. bovis* se puede encontrar en las mucosas y en las secreciones de los tractos respiratorio y urogenital.

La infección puede ser introducida al hato por un animal procedente de un rebaño infectado o puede aparecer espontáneamente como consecuencia de la transmisión de los microorganismos a la glándula mamaria o a través del equipo de ordeño. Después de la infección de la glándula mamaria, la infección se puede propagar por medio de los

ordeñadores, las pezoneras de las ordeñadoras mecánicas y soluciones que usualmente se emplean para el lavado de las ubres y estén contaminadas con *M. bovis*.^{2,4,5,16} Las épocas frías y húmedas del año también pueden aumentar la incidencia de la infección, ya que los micoplasmas pueden sobrevivir más tiempo en el ambiente.¹⁷

Los signos clínicos aparecen días después de la infección y las vacas pueden infectarse en cualquier fase de la lactación. El antecedente habitual es una mastitis aguda en uno o más cuartos de la vaca. A la palpación, los cuartos afectados están calientes, hinchados, de edematosos a duros y las secreciones varían en su aspecto.^{2,14} Clásicamente la primera secreción puede ser acuosa y tener “copos” de un material arenoso.¹⁸ Transcurridos varios días las secreciones se pueden convertir en exudado purulento, por infiltración de neutrófilos. Si la enfermedad progresa, los conductos galactóforos desarrollan metaplasia escamosa, y algunos conductos y acinis se llenan de exudado granulomatoso.

La mastitis aguda por *M. bovis* se disemina en un periodo corto, la producción de leche disminuye drásticamente. En los casos subclínicos la producción de leche puede no reducirse de manera significativa,^{1,2} siempre es importante detectar al microorganismo, así como los anticuerpos producidos en etapas tempranas de la infección.

Tradicionalmente, el único método de diagnóstico de rutina ha sido el aislamiento e identificación en cultivo de *M. bovis*, el cual requiere de 2 a 10 días para obtener resultados. En la actualidad existen otras técnicas de diagnóstico para detectar *M. bovis* como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación *in situ*. Asimismo, hay técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar antígenos y anticuerpos contra de *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 diferencia de otros métodos serológicos como la inhibición de la hemoaglutinación.^{10,11} Existen paquetes comerciales basados en la técnica de ELISA para el diagnóstico de *M. bovis*, en especial el que utiliza antígenos proteínas variables de superficie (Pvs), en particular la proteína variable de superficie “A” (PvsA) la cual es específica para toda infección provocada por *M. bovis*.¹² La prueba detecta anticuerpos en animales desde los 13 días de infección hasta 720 días. La especificidad no revela reactividad cruzada con sueros hiperinmunes de otras especies de *Mycoplasma*, excepto una pequeña reacción con *Mycoplasma arginini*.¹³ Con

reactivos comerciales de ELISA para detectar anticuerpos en contra de otras especies de *Mycoplasma*, se ha observado una sensibilidad del 96% y especificidad del 98%.¹⁴

El diagnóstico de mastitis asociada a *M. bovis* suele realizarse después de haber descartado a otros microorganismos y generalmente cuando ya existen lesiones y signos clínicos en los animales. 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 y por la disponibilidad del paquete comercial de ELISA indirecta, se busco la efectividad de dicha prueba para el diagnóstico de mastitis subclínica asociada a *M. bovis*.

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de mastitis asociada a *M. bovis* suele realizarse después de haber descartado a otros microorganismos y generalmente cuando ya existen lesiones y signos clínicos en los animales. Por esta razón es necesario buscar alternativas de diagnóstico que identifiquen a la infección en casos de mastitis subclínicas como la prueba de ELISA indirecta que detecta anticuerpos contra la PVSA de *M. bovis*, con el fin de establecer medidas de prevención, control y terapias más rápidas y eficaces.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de una prueba comercial de ELISA en suero para el diagnóstico de la mastitis bovina subclínica causada por *M. bovis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar animales con mastitis subclínica por medio de la prueba de Wisconsin modificada en hatos lecheros del Estado de México, Hidalgo y Coahuila con antecedentes de micoplasmosis.
- 2.- De los animales con mastitis subclínica, realizar el aislamiento de *M. bovis*.
- 3.- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA para el diagnóstico de mastitis subclínica por *M. bovis*.
- 4.- Establecer el punto de corte para el diagnóstico serológico de mastitis subclínica por *M. bovis*.

HIPÓTESIS

La prueba de ELISA indirecta presenta una sensibilidad de por lo menos el 80% y una especificidad del 90% para detectar animales con mastitis subclínica por *M. bovis*.

Se espera una concordancia significativa entre el resultado serológico y el aislamiento de *M. bovis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ubicación espacial y temporal

El estudio se realizó en el primer trimestre del 2004 en tres hatos lecheros: el primero se ubica en el Municipio de Torreón, en el estado de Coahuila, el segundo en el poblado de Visitación del municipio Melchor Ocampo, en el Estado de México. Ambos hatos presentaban antecedentes de micoplasmosis. El tercer hato, se localiza en el municipio de Atitalaquia, en el estado de Hidalgo y no había tenido antecedentes de micoplasmosis. El hato ubicado en Torreón, se encuentra en un clima BW (h) (clima caliente y árido con lluvias en julio, agosto y septiembre), una precipitación pluvial anual de 48 a 75 mm y una temperatura anual promedio de 22 °C, en invierno se registra una temperatura media de 8°C. En los otros hatos hay un clima Cb (wo) (e) g (clima templado seco extremo con verano fresco y con lluvias antes del 21 de julio), una precipitación pluvial anual de 611.2 mm y una temperatura anual promedio de 15.6 °C.¹⁹

2. Obtención de muestras

Durante el ordeño en los tres hatos evaluados, se realizó la prueba de Wisconsin modificada,²⁰ en aquellas vacas que resultaron con cuartos con mastitis subclínica (> 500 000 células somáticas), se les tomó una muestra de leche para realizar el aislamiento, en los casos donde la mastitis subclínica involucro más de un cuarto se tomo una muestra al azar, además, también se obtuvo una muestra de sangre de 10 ml a través de punción en la vena coccigea, la sangre fue centrifugada para la obtención de suero. Como testigos, se tomaron 86 muestras de animales con conteos normales de células somáticas (< 500,000 células somáticas) que se consideraron negativos a la prueba de Wisconsin.

3. Detección de anticuerpos contra *M. bovis*

La detección de anticuerpos contra *M. bovis*, se realizó mediante la prueba de ELISA indirecta utilizando el reactivo comercial "Chekit" del laboratorio Bomeli, Intervet, siguiendo las instrucciones según lo especificado por el fabricante y evaluando los resultados a una densidad óptica de 450 nm.

4. Aislamiento de *M. bovis* en leche

Para el aislamiento e identificación de *M. bovis* en leche, se tomaron 10 ml de leche de cada cuarto que resultó positivo a la prueba de Wisconsin modificada. La toma de muestra se realizó asépticamente en tubos de ensayo y se conservaron a una temperatura de 2 a 4 °C (como lo indica "National Mastitis Council")²¹. El aislamiento del microorganismo se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las muestras de leche se sembraron en medio líquido de Friis modificado y se realizaron diluciones de 1:10 y 1:100, se incubarán a 37 °C y se examinaron diariamente. A los siete días, se cultivaron en medio sólido de Friis y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda, con 5 a 10% de CO₂. El crecimiento característico con aspecto de "huevo frito" se observó en un microscopio estereoscópico. La identificación de la especie de *Mycoplasma* se realizó mediante la prueba de digitonina, las cuales son útiles para diferenciar *Acholeoplasma* de *Micoplasma*. Además se realizó la identificación serológica con la prueba de inhibición del crecimiento con antisueros de *M. bovis*, *M. bovis genitalum* y *Acholeoplasma laidlawii*.²²

5. Análisis de resultados

Se determinó la concordancia entre el aislamiento del microorganismo y la prueba de ELISA a través del estadístico Kappa. Con el fin de determinar si hubo un mejor punto de corte que el referido en el reactivo comercial, los resultados serológicos se agruparon en valores con intervalos de 5% y se calcularon los verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos. Además se determinó para cada estrato, los valores estimados de sensibilidad (Se), especificidad (Es), valor predictivo positivo (Vp(+)) y valor predictivo (Vp(-)) negativo. Se buscó el mejor punto de corte a través de la elaboración de una curva de características operantes de receptor (ROC).²³

RESULTADOS

Se obtuvieron 225 muestras de sangre y leche, de las cuales, 98 (43.6%), provenían del hato del Estado de México, 77 (34.2%), del estado de Coahuila y 50 (22.2%) del hato ubicado en el estado de Hidalgo.

Prueba de Wisconsin modificada

De las 225 muestras evaluadas, 139(61.8%) resultaron positivas a mastitis subclínica (> a 500,000 células somáticas), siendo mayor la positividad en el hato del Estado de México (80.6%) ($P<0.01$)(Cuadro 1).

Prueba de ELISA indirecta para la identificación de anticuerpos contra *M. bovis*

Del total de las muestras, 72 fueron positivas (32.0%), 149 negativas (66.2%) y 4 sospechosas (1.8%) (Cuadro 2). Con relación a los lugares de procedencia, el porcentaje de positividad fue mayor en el hato del Estado de México (38.8%) aunque no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos ($P>0.05$).

Aislamiento e identificación de *M. bovis*

De las 139 muestras positivas a la prueba de Wisconsin, únicamente se aisló *M. bovis* en 6 muestras (4.3%), de las cuales 3 provenían del Estado de México y 3 del estado de Coahuila. Los 6 aislamientos se obtuvieron de animales que a su vez fueron positivos a la prueba de ELISA.

Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA indirecta evaluada en suero para la detección de *M. bovis* en leche

Con el punto de corte recomendado por el fabricante del reactivo comercial, se obtuvo una Sensibilidad de 100%, una Especificidad de 68.98%, un Valor predictivo positivo de 6.9% y un Valor predictivo negativo de 100%.

Al agrupar los resultados de la prueba de ELISA en rangos de 5%, se encontró que la mejor sensibilidad (83.3%) y especificidad (83.56%) de la prueba se ubicó en un punto de corte mayor o igual a 100. Aún así, el Valor predictivo positivo fue de 12.2% y el Valor predictivo negativo de 99.43% (cuadro 5). En base a estos valores el resultado es prometedor ya que la proporción obtenida bajo la curva de una análisis ROC fue del 0.9075 (figura 1)

DISCUSIÓN

La mastitis subclínica encontrada con la prueba de Wiscosin (61.8%) fue mayor en comparación con otros estudios realizados en México como el efectuado en Tres Marias, Estado de México donde se encontró una prevalencia que varió del 19.6% al 52.9%,²⁴ o en el Complejo Agroindustrial de Tizayuca, en Tizayuca, Hidalgo, donde se observó el 20.82%.²⁵ En Estados Unidos de América, se han informado frecuencias del 48.5% en New York y Pennsylvania.²⁶

En el hato ubicado en el Estado de México el alto porcentaje de mastitis subclínica (80.6%) se puede asociar a que las prácticas de higiene y desinfección no son adecuadas, además del mal manejo y falta de mantenimiento de la ordeñadora mecánica. A este respecto Jaramillo y col.(1979) encontraron que la implementación de prácticas de higiene y desinfección contribuyeron a bajar la prevalencia de 17.1% al 14.26% en dos establos con diferentes sistemas de manejo. Asimismo, en ese estudio se informó que el mal manejo de la unidad ordeñadora principalmente por sobre ordeño provocó un aumento de la prevalencia de mastitis subclínica.²⁵

El porcentaje de positividad (32%) de la prueba de ELISA indirecta resulto menor al encontrado por Barajas y col.(1993) quienes observaron una prevalencia del 50% en un estudio realizado con animales del estado de Veracruz o del 43% informado por Ghadersohi y col.(2005) en ganado lechero de Townsville, Australia.^{8,27}

El porcentaje de aislamientos obtenidos de animales con mastitis subclínica en este estudio (4.3%) fue mayor en comparación con el porcentaje (0.1%) encontrado por Wilson y col. (1997) en 105,083 vacas estudiadas en New York y Pennsylvania,²⁶ así como también mayor al porcentaje (1.8%) obtenido por González y col. (1990) en 9,884 muestras en New York,²⁸ en ambas estudios las muestras provenían de vacas con mastitis subclínica. En contraste, Ghadersohi y col. (1999) reportaron un porcentaje mayor(19.8%) en 202 muestras de leche de vacas con mastitis subclínica en Australia.²⁹ Un porcentaje similar (19.64%) fue reportado por Hernández y col. (1984) en 56 animales con mastitis clínica provenientes del Estado de México.⁷

El escaso número de aislamientos puede estar relacionado a diversos factores. Al respecto, Nicholas y Ayling³⁰ encontraron que en casos de mastitis crónicas y el uso de antimicrobianos dificultan el aislamiento. Miranda y col.³¹ mencionan además que bajas

cantidades de micoplasmas en la muestra dificultan el aislamiento. Por otro lado, Ghadersohi y col.²⁷ indicaron que títulos altos de anticuerpos en la leche inhiben el desarrollo de *M. bovis* y en conjunto con el complemento provocan lisis de este.

La sensibilidad (100%) y especificidad (68.98%) de la prueba de ELISA para la detección de mastitis por *M. bovis* podría considerarse buena, lo que concuerda con los resultados informados por Brank y col.¹² quienes elaboraron una prueba de ELISA indirecta a base de antígenos recombinantes que consisten en PvsA que les permitió obtener una prueba serológica sensible, específica y rápida para la detección de *M. bovis* en sus diferentes manifestaciones. Ghadersohi y col.²⁷ desarrollaron otra prueba de ELISA indirecta a base de anticuerpos monoclonales para detectar anticuerpos de *M. bovis* en suero de animales con manifestaciones clínicas de mastitis y problemas respiratorios, así como en animales infectados experimentalmente mediante esponjas nasales encontrando alta especificidad y buena sensibilidad.

El punto de corte que recomienda el fabricante se basa en la detección de anticuerpos contra *M. bovis* en suero de ganado bovino lo cual fue razonablemente bueno, aunque pudo mejorarse cuando se buscó el mejor punto de corte mediante la curva ROC (0.9075) y al agruparlos en rangos del 5% (≥ 100) para la detección de anticuerpos en los casos de mastitis asociada a *M. bovis*, como lo recomienda Greenberg y col.(2002)³² y Fletcher y col.(1998)²³, el resultado redujo la sensibilidad (100% a 83.33%) pero se mejoró la especificidad (68.04% a 83.56%) lo que permitió obtener la medición global del rendimiento de la prueba. Sin embargo, con este punto de corte 1 de los 6 aislamientos queda como negativo a la prueba.

El valor predictivo positivo se asoció al número de aislamientos, sin embargo, no quiere decir necesariamente que la prueba sea mala ya que por definición la prevalencia de la enfermedad se refleja en el valor predictivo de la misma forma,³³ por lo que sería recomendable realizar un número mayor de muestreos y aislamientos con la finalidad de encontrar el mejor rendimiento de la prueba. Ghadersohi y col.²⁷ realizaron un estudio similar, pero en lugar de aislamientos se comparó la prueba de ELISA con la técnica de PCR para detectar *M. bovis*. La prueba de ELISA fue altamente específica, suficientemente sensible y la correlación fue significativa entre ambas pruebas (Kappa = 0,44, P = 0,0456).

La identificación mediante PCR, es altamente sensible, específica y rápida, sin embargo, se requiere de equipo y de personal especializado, además de que el costo por muestra es más elevado,⁸ por lo que las condiciones que presentan los laboratorios de diagnósticos en el país permiten implementar con mayor facilidad la prueba de ELISA.

Con base a los resultados arrojados por la prueba de ELISA, esta podría ser una buena alternativa para el diagnóstico de mastitis por *M. bovis*, sin embargo, se requiere emprender más estudios con un mayor número de muestras que permita una mayor cantidad de aislamientos, obteniendo con ello mejores indicadores de la Especificidad y Sensibilidad y de los valores predictivos. Con los resultados obtenidos de sensibilidad se acepta la hipótesis planteada en este trabajo, en contraste, se esperaba obtener una especificidad mayor a la obtenida en este estudio por lo se rechaza la hipótesis. Sin embargo, con el punto de corte de obtenido en este estudio 1 de los 6 aislamientos queda fuera de los positivos y tomando en cuenta la capacidad de *M. bovis* para diseminarse en un periodo corto entre los animales del hato,^{1,2,7} se recomienda tomar como sospechosas a las muestra que queden entre los puntos de corte (100 - 60 %) y tomarles nuevamente muestras de suero y leche para volver a ser analizadas con la prueba de ELISA y aislamiento con el fin de confirmar el diagnóstico. Finalmente, la prueba podría ser utilizada para la detección de ganado bovino con mastitis asociada a *M. bovis* particularmente en hatos con frecuencias elevadas (> al 10%), a fin de garantizar un valor predictivo razonablemente alto o como en este caso donde la frecuencia fue de 2.66% podría utilizarse como prueba tamiz, sumado a que la técnica de ELISA es práctica, rápida y económica o a reserva de utilizar otra prueba con por lo menos la misma sensibilidad y especificidad.

LITERATURA CITADA

1. Hirsh DC, Zee y C. Veterinary Microbiology. 2nd ed., Blackwell Science, Massachusetts, 1999.
2. Rebhun WC, Guard C, Richards MC. Diseases of Dairy Cattle. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1995.
3. Jones TC and Hunt RD. Veterinary Pathology of Domestic Animals. 6th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1997.
4. Kirk HJ. Mycoplasma Mastitis in Dairy Cows, The Comp. 1994; 16: 541-546.
5. Gourlay RN, Thomas LH, Howar CJ. Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae* subsp *bovis*. The Vet. Rec. 1976; 98: 506-507.
6. Avila S, Dominguez J, Ruíz H, Valdivieso A, y de la Peña A. Evaluación de un brote de mastitis por *Mycoplasma bovis* y otros agentes etiológicos en un hato productor de leche. Memorias del IX Congreso Nacional de Buiatria. Puebla, Puebla, México, 1983; 99.
7. Hernández AL, González GA, Campos RV, Payan RM, Jaramillo ML, y Pérez DM. Reporte de un caso de mastitis provocado por *Mycoplasma bovis* en un hato lechero. Memorias del X Congreso Nacional de Buiatria. Acapulco, Guerrero, México, 1984; 608-609.
8. Barajas RJA, Riemann HP, Franti CE. Application of enzyme linked immunosorbent assay for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of México. Rev. sci. tech. Off. Epiz 1993; 12: 717-732.
9. Castro MMJ. Concentración mínima inhibitoria en 3 antimicrobianos probados con cepas de *Mycoplasma* spp. Proteolíticas aisladas de mastitis bovina. Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1994.

10. Sacase K, Pfützner H, Hotzem H. Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. Rev. sci. tech. Off. Epiz 1993; 12: 571-580.

11. Grand D-le, Calavas D, Brank M, Citti C, Rosentgarten R, Bezille P. Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. Vet. Rec. 2002; 150: 268-273.

12. Brank M, Grand DL, Poumarat F, Bezille P, Rosengarten R, Citti C. Development of a recombinant antigen of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Clin Diagn lab immunol. 1999; 6, 861-867.

13. Le Grand D, Poumarat F, Bezille P. Assesment of a serological ELISA test for screening of *Mycoplasma bovis* infection within livestock. FEMS Microbiol. 1999; 173, 103-110.

14. Nava NE. Análisis serológico de granjas porcinas tecnificadas ubicadas en tres estados de la república mexicana con respecto a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Edo. de México (México), 1987.

15. Cano C P. Clasificación clínica de las mastitis y nuevas alternativas en su tratamiento. Memorias de III Congreso Nacional de Mastitis y Calidad de la Leche, Consejo Nacional de Mastitis, A. C. Asociación Iberoamericana de Médicos Veterinarios Especialistas en Producción Animal. León, Guanajuato, México, 2001; 136-141.

16. Kirk HJ. Mastitis control program for *Mycoplasma mastitis* in dairy cows. Veterinary medicine extension, School of veterinary medicine 2003: 1-11.

17. Bayoumi FA, Farver TB, Bushnell B, Oliveria M. Enzootic *Mycoplasma* mastitis in a large dairy during and eight-year period. *Cornell Vet.* 1992; 82: 29-40.
18. Busnell RB. *Mycoplasma* mastitis. *Vet. Clin. North Am. (large Anim. Pract.)*. 1984; 6: 301-312.
19. Garcia E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ta ed., SIGSA, México (D.F.), 1988.
20. Blanco O M. Diagnóstico de mastitis subclínica bovina. Memorias de III Congreso Nacional de Mastitis y Calidad de la Leche, Consejo Nacional de Mastitis, A. C. Asociación Iberoamericana de Médicos Veterinarios Especialistas en Producción Animal. León, Guanajuato, México, 2001; 7pp.
21. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection, 3rd Edition, National Mastitis Council, 1990
22. Hernández AL. Comparación de tres técnicas para el diagnóstico de mastitis causada por *Mycoplasma bovis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 1987.
23. Fletcher HR, Fletcher WS, Wagner HE. Epidemiología clínica aspectos fundamentales. 2a ed., Masson-Williams & Wilkins, España, 1998
24. Díaz RO. Eficacia del digluconato de clorhexidina al 0.5% utilizado como desinfectante después del ordeño considerando la prevalencia de mastitis subclínica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México, 2003.
25. Jaramillo DC. Prevalencia de mastitis en un hato lechero y su relación con las practicas de ordeño, manejo y medicina preventiva. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México, 1979.

26. Wilson DJ, Gonzalez RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J Dairy Sci.* 1997; 80, 2592-2598.
27. Ghadersohi A, Falláis Z, Hirs RG. Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Vet Imm Imm.* 2005; 8, 183-193.
28. González RN, Sears PM, Merril RA, Hayes GL. Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period 1972-1990. *Cornell Vet.* 1992;82, 29-40
29. Ghadersohi A, Hirs RG, Forbes-Faulkener J, Coelen RJ. Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy in cattle in Australia. *Vet Microbiol.* 1999 ;65, 185-194.
30. Nicholas RA, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. *Res Vet Sci*; 74, 105-112.
31. Miranda MR. Patogenicidad de Micoplasmas involucrados en la mastitis bovina. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México, 1999.
32. Greenberg RS, Et. Al. Epidemiología clínica. 3a edición, Editorial Manual Moderno, México, 2002.
33. Riegelman RK, Hirsch RP. Como estudiar un estudio y probar una prueba: Lectura crítica de literatura médica. 2ª edición, Organización Panamericana de la Salud, E.E. U.U., 1992.

Cuadro 1

Frecuencia y porcentaje de muestras de leche evaluadas para la detección de mastitis subclínica* en 225 vacas de 3 hatos de diferentes entidades federativas
Febrero-Abril 2004

Procedencia de los hatos	Positivas	Negativas	Total
Edo. de México**	79(80.60%)	19(19.40%)	98
Coahuila**	30(39%)	47(61%)	77
Hidalgo***	30(60%)	20(40%)	50
	139(61.80%)	86(38.20%)	225

* Mediante la prueba de Wisconsin modificada.

**Hatos con antecedentes de micoplasmosis.

*** Hato sin antecedentes de infección por *Mycoplasma bovis*

Cuadro 2

Frecuencia y porcentaje de muestras de suero evaluadas para la detección de anticuerpos contra *M. bovis** en 225 vacas de 3 hatos de diferentes entidades federativas
Febrero-Abril 2004

Procedencia de los hatos	positiva	negativa	sospechosa	Total
Edo de México**	38(38.80%)	58(59.20%)	2(2.00%)	98
Coahuila**	23(29.90%)	53(68.80%)	1(1.30%)	77
Hidalgo	11(22.00%)	38(76.00%)	1(2%)	50
	72(32.00%)	149(66.20%)	4(1.80%)	225

* Mediante la prueba de ELISA indirecta.

**Hatos con antecedentes de micoplasmosis.

Cuadro 3

Relación entre la prueba de Wisconsin modificada y el aislamiento de *M. bovis* de 3 hatos de diferentes entidades federativas
Febrero-Abril 2004

		Aislamiento		Total
		Positivos	Negativos	
Wisconsin modificada	Positivos	6(4,3%)	133(95,7%)	139
	Negativos	0	86(100%)	86
		6(2.7%)	219(97.3%)	225

Cuadro 4

Relación entre la prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos
 contra *M. bovis* y el aislamiento de *M. bovis* de 3 hatos de diferentes
 entidades federativas
 Febrero-Abril 2004

		Aislamiento		Total
		Positivos	Negativos	
ELISA indirecta	Positivos	6(4%)	143(96%)	149
	Negativos	0	72(100%)	72
	Sospechosos	0	4(100%)	4
		6(2.7%)	219(97.3%)	225

* Mediante la prueba de ELISA indirecta y aislamiento e identificación respectivamente.

Cuadro 5

Determinación de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA indirecta en suero para la detección de *M. bovis* en leche considerando diferentes puntos de corte y tomando al aislamiento como prueba de oro

% de la prueba	sin aislamiento	con aislamiento	Punto corte	V+	V-	F-	F+	Se	Es	Vp+	Vp-
(-)15 a (-)10.01	5	0	>= -15	6	0	0	219	100	0.00	2.67	100.00
(-)10 a (-)5.01	5	0	>= -10	6	5	0	214	100	2.28	2.73	100.00
(-)5 a (-)0.01	9	0	>= -5	6	9	0	210	100	4.11	2.78	100.00
0 a 4.99	8	0	>= 0	6	17	0	202	100	7.76	2.88	100.00
5 a 9.99	5	0	>= 5	6	22	0	197	100	10.05	2.96	100.00
10 a 14.99	14	0	>= 10	6	36	0	183	100	18.44	3.17	100.00
15 a 19.99	14	0	>= 15	6	50	0	169	100	22.83	3.43	100.00
20 a 24.99	14	0	>= 20	6	64	0	155	100	29.22	3.73	100.00
25 a 29.99	6	0	>= 25	6	72	0	147	100	32.88	3.92	100.00
30 a 34.99	13	0	>= 30	6	85	0	134	100	38.81	4.29	100.00
35 a 39.99	14	0	>= 35	8	99	0	120	100	45.21	4.76	100.00
40 a 44.99	15	0	>= 40	8	114	0	105	100	52.05	5.41	100.00
45 a 49.99	10	0	>= 45	8	124	0	95	100	58.62	5.94	100.00
50 a 54.99	8	0	>= 50	8	132	0	87	100	60.27	6.45	100.00
55 a 59.99	5	0	>= 55	8	137	0	82	100	62.58	6.82	100.00
60 a 64.99	2	0	>= 60	6	139	0	80	100	63.47	6.98	100.00
65 a 69.99	0	1	>= 65	5	139	1	80	83.33	63.47	5.88	99.29
70 a 74.99	2	0	>= 70	5	141	1	78	83.33	64.38	6.02	99.30
75 a 79.99	1	0	>= 75	5	142	1	77	83.33	64.84	6.10	99.30
80 a 84.99 *	6	0	>= 80	5	148	1	71	83.33	67.58	6.58	99.33
85 a 89.99	5	0	>= 85	5	153	1	66	83.33	68.86	7.04	99.35
90 a 94.99	9	0	>= 90	5	162	1	57	83.33	73.97	8.06	99.39
95 a 99.99	3	0	>= 95	5	165	1	54	83.33	75.34	8.47	99.40
100 a 104.99	8	0	>= 100	5	173	1	48	83.33	79.00	9.80	99.43
105 a 109.99	4	1	>= 105	4	177	2	42	68.67	80.82	8.70	98.88
110 a 114.99	2	0	>= 110	4	179	2	40	68.67	81.74	9.09	98.90
115 a 119.99	1	0	>= 115	4	180	2	39	68.67	82.19	9.30	98.90
120 a 124.99	7	0	>= 120	4	187	2	32	68.67	85.39	11.11	98.94
125 a 129.99	8	0	>= 125	4	193	2	26	66.67	86.13	13.33	98.97
130 a 134.99	2	0	>= 130	4	195	2	24	66.67	89.04	14.29	98.98
135 a 139.99	1	0	>= 135	4	198	2	23	66.67	89.50	14.81	98.99
150 a 154.99	0	1	>= 150	3	198	3	23	50	89.50	11.54	98.49
170 a 174.99	2	0	>= 170	3	198	3	21	50	90.41	12.50	98.51
180 a 184.99	1	0	>= 180	3	199	3	20	50	90.87	13.04	98.51
185 a 189.99	2	0	>= 185	3	201	3	18	50	91.78	14.29	98.53
190 a 194.99	1	0	>= 190	3	202	3	17	50	92.24	15.00	98.54
210 a 214.99	1	0	>= 210	3	203	3	16	50	92.89	15.79	98.54
235 a 239.99	1	0	>= 235	3	204	3	15	50	93.15	16.87	98.55
240 a 244.99	2	0	>= 240	3	208	3	13	50	94.08	18.75	98.58
250 a 254.99	0	1	>= 250	2	208	4	13	33.33	94.06	13.33	98.10
260 a 264.99	1	0	>= 260	2	207	4	12	33.33	94.52	14.29	98.10
295 a 299.99	1	0	>= 295	2	208	4	11	33.33	94.98	15.38	98.11
300 a 304.99	1	0	>= 300	2	209	4	10	33.33	95.4338	17	98.12
405 a 409.99	0	2	>= 405	0	209	6	10	0	95.4338	100	95
Total	219	6									

* Punto de corte recomendado por el fabricante donde se considera positiva la muestra

Cuadro 6
Principales especies de *Mycoplasma* que afectan al ganado bovino y sus respectivas manifestaciones.

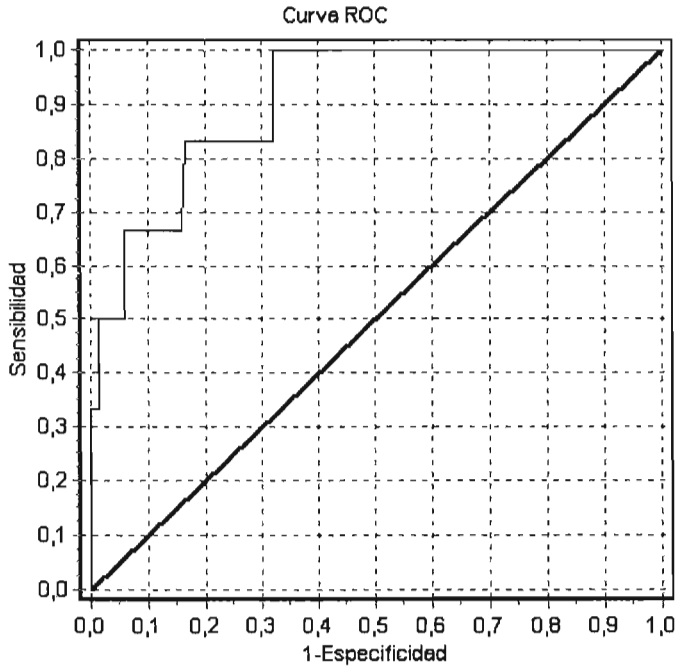
Especie	Manifestaciones clínicas
<i>M. alkalences</i>	Artritis, mastitis
<i>M. bovigentalum</i>	Infertilidad, mastitis y vesiculitis seminal
<i>M. bovis</i>	Abscesos, artritis, mastitis, otitis y neumonía
<i>M. bovoculi</i>	Queratoconjuntivitis
<i>M. californicum</i>	Artritis, Mastitis
<i>M. canadenses</i>	Artritis, mastitis
<i>M. dispar</i>	Alveolitis, bronquiolitis
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i> (S.C.)	Artritis, pleuroneumonia
<i>M. diversum</i>	Infertilidad, neumonía y vulvovaginitis

Tomado de:

Hirsh DC, Zee y C. Veterinary Microbiology. 2nd ed., Blackwell Science, Massachusetts, 1999.

Figura 1

Curva ROC, de la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA indirecta con respecto al aislamiento de *M. bovis* cuya área es de 0.9075



Area ROC	EE	IC(95%)		
0,9075	0,0530	0,8037	1,0114	DeLong
	0,0819	0,7469	1,0681	Hanley & McNeil