

Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a Partir de un Brote de Mastitis Bovina en una Vaquería de la Provincia de Buenos Aires. Primera Comunicación en la República Argentina

RAÚL CERDÁ,^{1*} JORGE XAVIER,² PABLO SANSALONE,¹ RUBEN DE LA SOTA¹ Y RICARDO ROSENBUSH³

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118. La Plata. 1900. Argentina.¹ Becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).² Veterinary Medical Research Institute, College of Veterinary Medicine, Iowa State University. 1802 Elwood Drive, Ames, IA 50011. USA.³

* Autor para la correspondencia, E-mail rcerda@fcv.medvet.edu.ar, Fax: +54-221-425-7980

ABSTRACT. Several mycoplasma species produce various diseases in different animal species. *M. bovis* has been described as the cause of mastitis, arthritis, pneumonia and infertility in cattle. Furthermore, this specie has been the most frequently isolated agent producing bovine mastitis. The objective of this study was to isolate and typify mycoplasma strains from a clinical mastitis outbreak in a dairy farm of Buenos Aires Province. A total of 279 samples were studied (276 from pooled quarter milk of cows with clinical mastitis that did not respond to antibiotic therapy, 1 from bulk tank milk and 2 prepucial swabs from bulls). The isolated mycoplasma strains (n=12) were further characterized by biochemical analysis, serological studies and electrophoretic analysis of the protein profiles (SDS-PAGE). Based upon these studies, the isolated strains were identified as *Mycoplasma bovis*. This is the first report of isolation of this microorganism in Argentina. Therefore the results described here could be very useful to improve mastitis control in dairy farms.

KEY WORDS: *Mycoplasma bovis*, bovine mastitis, isolation, biochemical characterization, serological characterization, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN. *Mycoplasma bovis* ha sido descrito como el agente etiológico de mastitis, artritis, neumonías e infertilidad en ganado bovino. Por otra parte, esta especie ha sido la más frecuentemente aislada entre los micoplasmas productores de mastitis bovina. El objetivo de este estudio fue aislar y tipificar las cepas de micoplasmas de un brote de mastitis clínica de un establecimiento lechero de la Provincia de Buenos Aires. Se procesaron 276 muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica refractarias al tratamiento con antibióticos β -lactámicos, 1 muestra de leche de tanque y 2 muestras de raspados prepuciales de toros. Del total de muestras analizadas, se aislaron 12 cepas de *Mycoplasma bovis*, las cuales se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas, serológicas y por el estudio de sus perfiles proteicos por electroforesis (SDS-PAGE). Esta es la primera comunicación de aislamiento de este microorganismo en la República Argentina. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, consideramos de suma importancia tener en cuenta a este agente productor de mastitis en el control microbiológico de rutina de los establecimientos lecheros.

PALABRAS CLAVE: *Mycoplasma bovis*, mastitis bovina, aislamiento, caracterización bioquímica, caracterización serológica, electroforesis.

INTRODUCCIÓN

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 micoplasmas productores de mastitis bovinas.¹⁰

La mastitis por micoplasmas está caracterizada por signos clínicos severos, que pueden involucrar desde uno a todos los cuartos de la glándula mamaria y por la resistencia a las antibióticoterapias convencionales. En otros casos,

los animales infectados pueden permanecer como reservorios asintomáticos dentro de un tambo. Como en otras mastitis contagiosas, la diseminación entre los animales puede producirse por fómites como las manos del operador, las pezoneras de la ordeñadora, o por vía respiratoria. En este último caso, los micoplasmas pueden alcanzar la glándula mamaria por vía hematógica.¹³

Hasta el presente, las mastitis causadas por micoplasmas 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



Tabla 1. Estudios de bacteriología masiva preliminares realizados en el rodeo total y en las vacas con mastitis clínica

Diagnóstico	Rodeo (n=476) ^A	Vacas/mastitis clínica (n=56) ^B
Negativo	28,7 ^C	52,41
<i>S. aureus</i>	7,7	6,7
<i>S. sp.</i>	13,2	-
<i>S. sp.</i> + <i>Corynebacterium sp.</i>	6,0	-
<i>Corynebacterium sp.</i>	19,0	-
<i>E. coli</i>	5,0	-
Levaduras	0,2	12,5
Contaminadas	6,2	28,2
Flora banal	13,7	-

^A Fecha de realización, 18/02/1997; recuento de células somáticas en leche, 700.000/ml.

^B Fecha de realización, 12/03/1997

^C Datos expresados en porcentajes.

mismos.⁹ 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.⁷

En el año 1963 se observaron los primeros casos de mastitis por micoplasmas en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). A partir de 1970 y hasta el momento, muchos tambos de diferentes estados de EUA han diagnosticado mastitis por *M. bovis*.^{7, 10} También otros países como Francia, Gran Bretaña, Italia, Canadá e Israel han aislado *M. bovis* de sus rodeos lecheros con mastitis clínicas y subclínicas.^{8, 19} En la República Argentina, si bien son frecuentes los brotes de mastitis clínicas y subclínicas refractarias a los tratamientos convencionales, no se han informado hasta el momento aislamientos de micoplasmas como agentes responsables de los mismos.

El objetivo del presente estudio es comunicar el aislamiento de cepas de *Mycoplasma bovis*, a partir de un brote de mastitis en un rodeo lechero de la provincia de Buenos Aires, así como también detallar la metodología empleada para tal fin.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Los animales estudiados pertenecían a un establecimiento de producción lechera de la Provincia de Buenos Aires. El rodeo estaba compuesto por 476 vacas, de las cuales 56 presentaban mastitis clínica refractaria al tratamiento con antibióticos β -lactámicos y 223 presentaban mastitis subclínica. Los casos de mastitis clínica se caracterizaron por una producción de leche muy baja (4-6 l/día), y en algunos casos, la leche extraída contenía un sedimento arenoso muy particular. Los animales pertenecientes a este grupo presentaban un estado de salud aparen-

temente bueno (sin fiebre o problemas respiratorios, buen apetito, buen estado general). Previamente a este trabajo, se habían realizado dos estudios bacteriológicos, cuyos resultados se presentan en la Tabla 1.

Muestras. Se tomaron 276 muestras de leche total de vaca (muestra mancomunada de los cuatro cuartos mamarios) con mastitis clínica y subclínica, 1 muestra de leche de tanque, y 2 muestras de raspados prepuciales de toros utilizados para servicio natural de repaso en el rodeo.

Cultivos. Para realizar el aislamiento de micoplasmas se sembró 0.01 ml de cada muestra de leche individual en ¼ de placas con medio sólido de Hayflick modificado⁴ mediante el empleo de asa de platino. Las placas se incubaron a 37° C en cámara húmeda con 10% de CO₂ durante 10 días. Se realizaron observaciones diarias con microscopio estereoscópico para la detección de colonias de micoplasmas. Las cepas aisladas se clonaron en medio líquido de Hayflick adicionado con 10% de glicerol y se conservaron a -30 °C.

Pruebas bioquímicas. Para realizar la caracterización bioquímica de las cepas aisladas, se llevaron a cabo las siguientes pruebas: sensibilidad a la digitonina para la diferenciación del género *Acholeplasma*,²² fermentación de la glucosa,²⁰ hidrólisis de la arginina,¹ reducción del tetrazolium²¹ y detección de la producción de "film & spot".⁵

Pruebas serológicas. La caracterización serológica de las cepas aisladas se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.⁵

SDS-PAGE. A fin de conocer los perfiles de las proteínas totales de las cepas aisladas, se llevó a cabo un estudio mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12.5%.¹⁸

Cepas de referencia. Como control positivo de las pruebas bioquímicas y serológicas, y como patrón en el

Tabla 2. Resultado de las pruebas bioquímicas y serológica

Cepa	Sitio de aislamiento	Pruebas bioquímicas					Prueba serológica
		Glucosa	Arginina	Tetrazolium	"Film & Spot"	Digitonina	IF indirecta
1-10	Leche de cuartos	-	-	+	+	+	+
11	Leche de tanque	-	-	+	+	+	+
12	Hisopado prepucial	-	-	+	+	+	+
<i>M. bovis</i>	Cepa patrón	-	-	+	+	+	+
34/81							

SDS-PAGE, se empleó la cepa de *M. bovis* 34/81 cedida gentilmente por el National Institute of Health de Tsukuba, Japón.

RESULTADOS

Al cabo de 5 días de incubación, se obtuvo el aislamiento de 12 cepas de micoplasmas (10 de muestras de leche individuales, 1 de leche de tanque y 1 de raspado prepucial). Tanto en las muestras de leche individual como en la de raspado prepucial se observó un alto número de colonias de micoplasma.

Pruebas bioquímicas. Las cepas aisladas fueron sensibles a la digitonina al 1.5%, no fermentaron la glucosa ni hidrolizaron la arginina; fueron positivas a la reducción del tetrazolium y produjeron "film and spot" luego de 7 días de incubación en medio sólido (Tabla 2).

Pruebas serológicas. Mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, se detectó fluorescencia específica en las colonias aisladas, empleando sueros hiperinmunes anti-*M. bovis* (Tabla 2).

SDS-PAGE. El estudio de los perfiles proteicos evidenció una alta correlación entre las cepas aisladas de leche, de prepucio y la cepa patrón (Fig. 1).

DISCUSIÓN

En base a las características bioquímicas, serológicas y proteicas de las cepas aisladas, podemos afirmar que las mismas corresponden a *Mycoplasma bovis*. El alto número de colonias observadas en las muestras de leche individual se correlacionan con una fase aguda de la mastitis por micoplasmas.¹⁴

Teniendo en cuenta la gran similitud entre las bandas proteicas de las cepas aisladas de leche y la aislada del toro de repaso, se podría sospechar que fue éste la fuente de contagio y de diseminación del brote. Esta hipótesis se fundamenta en varios hallazgos de otros autores.^{15,16,17} Basán-

donos en esto, sería recomendable no utilizar toros de repaso luego de la inseminación artificial del rodeo o hacerlo con animales sanitariamente controlados. No obstante, no se debería fijar la atención solamente en este dato aislado, sino que sería fundamental analizar retrospectivamente la posible entrada de animales de reposición al rodeo por ser esta la principal fuente de contagio del mismo.⁴

Los datos de los estudios bacteriológicos previos, fueron de suma importancia para sospechar de un brote de micoplasmosis (altos recuentos de células somáticas con bajos porcentajes de aislamiento de microorganismos patógenos, Tabla 1) ya que coinciden con los datos publicados por otros investigadores.^{11,12} Otros elementos a tener en cuenta y que también se hallan bien documentados,^{9,11,12,13,14} fueron el alto número de animales con los cuatro cuartos comprometidos, la marcada baja de producción (aproximadamente 10 l/día de febrero a marzo), la falta de respuesta a las terapias antimicrobianas y por último la observación de un sedimento arenoso en algunas de las muestras de leche positivas al aislamiento. Todos estos factores deberían ser tenidos en cuenta, tanto por los veterinarios de cada establecimiento, como por los laboratorios de diagnóstico bacteriológico, a fin de detectar posibles brotes de esta enfermedad. Si bien los porcentajes de aislamiento de este microorganismo son bajos a nivel mundial, las pérdidas económicas que ocasiona son considerables debido a la ineficacia de las antibioticoterapias, la rápida diseminación de la enfermedad, la alta pérdida de la producción láctea y los inconvenientes de manejo (varios rodeos, unidades de ordeña separadas, etc.).² Por tales motivos, en los últimos años muchos países han puesto énfasis en el control de esta enfermedad. En la República Argentina los productores lecheros se preocupan cada vez más en mejorar su producción mediante la incorporación de nuevas tecnologías y el control sanitario. Por tal razón, y a partir de los resultados obtenidos en este estudio, consideramos de suma importancia tener en cuenta a este agente productor de mastitis en el control microbiológico de rutina de los establecimientos lecheros.

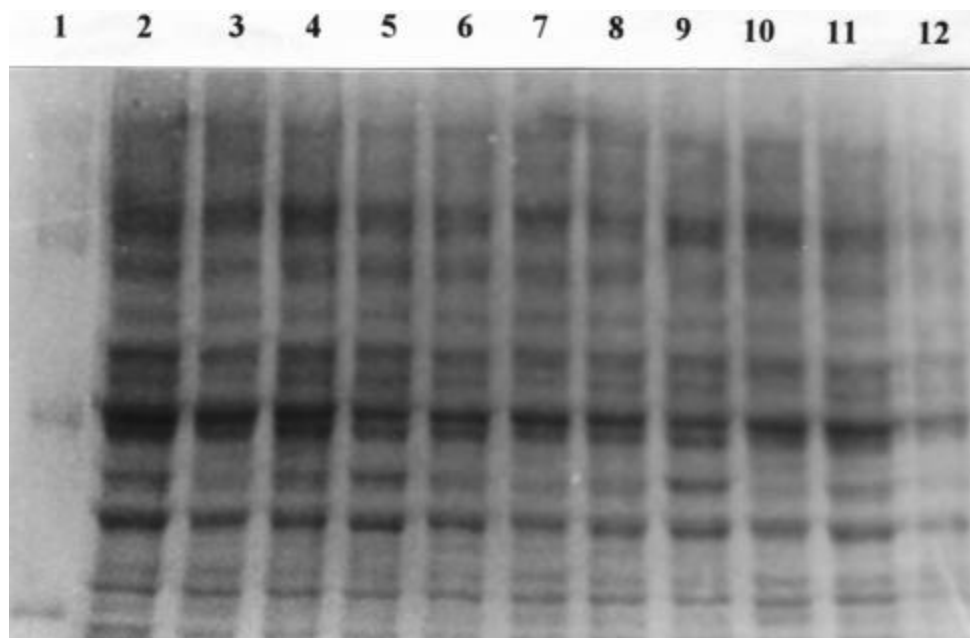


Figura 1. SDS-PAGE de las cepas de *Mycoplasma bovis* aisladas y de la cepa de referencia. Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, cepa de referencia *M. bovis* 34/81; línea 3, cepa de *M. bovis* aislada de leche de tanque; líneas 4-11, cepas de *M. bovis* aisladas de leche individual; línea 12, cepa de *M. bovis* aislada de prepucio.

REFERENCIAS

- Barile, M. F. 1983. Arginine hydrolysis, p. 345-349. In: S. Razin and J.G. Tully (ed.). Methods in Mycoplasma, Vol. 1. Academic Press, Inc. New York.
- Bayoumi, F. A., T. B. Farver; B. Bushnell y M. Oliveira. 1988. Enzootic mycoplasmal mastitis in a large dairy during an eighth-year period. J. Am. Vet. Med. Assoc. 192:905-909.
- Boughton, E. 1978. *Mycoplasma bovis* mastitis. Vet. Rec. 103:2270-2271.
- Freundt, E. A. 1983. Culture media for classic mycoplasma, p. 127- 135. In: S. Razin y J. G. Tully (ed.). Methods in Mycoplasma, Vol. 1. Academic Press Inc. New York.
- Freundt, E. A. 1983. Film and spot production. En: S. Razin and J. G. Tully (ed.). Methods in Mycoplasma, p. 373-378. Vol. 1. Academic Press, Inc. New York.
- Gardella, R. S., R. A. Delgiudice y J. G. Tully. 1983. Immunofluorescence. En: S. Razin and Tully J.G. (ed.). Methods in Mycoplasma, p. 431- 439 Vol. 1. Academic Press Inc. New York.
- Gonzalez, 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.
- Gourlay, R. N. y C. J. Howard. 1979. Bovine mycoplasmas. En: M. F. Barile; S. Razin; J. G. Tully and R. F. Whitcomb (ed.). p.49-102 The Mycoplasmas, Vol 2. Academic Press, New York.
- Hernandez Andrade, L. y L. Jaramillo Meza. 1995. Comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico de mastitis por *Mycoplasma bovis*. Vet. Mex. 26:353-357.
- Hotzel, H., K. Sachse, H. Pflutzner, B. Demuth y A. Pflitsch. 1993. Detection of *Mycoplasma bovis* using in vitro deoxyribonucleic acid amplification. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 12:581-591.
- Jasper, D. E. 1979. Bovine mycoplasmal mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 175:1072.
- Jasper, D. E. 1982. The role of *Mycoplasma* in bovine mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181:158.
- Jasper, D. E. 1981. Bovine mycoplasmal mastitis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 25: 121-157.
- Jasper, D. E. 1977. *Mycoplasma* and *Mycoplasma* Mastitis. JAVMA, Vol. 170, N° 10 (2).
- Jasper, D. E., J. M. Al-Aubaidi, y J. Fabricant. 1974. Isolation of *Mycoplasma* from preputial washings of bulls. Cornell Vet. 64: 296.
- Jasper, D. E., J. M. Al-Aubaidi, y J. Fabricant. 1974. Epidemiological observations on mycoplasma mastitis. Cornell Vet. 64:407.
- Kissi, B., S. Juhos, y L. Stipkovits. 1985. Effect of mycoplasma contamination of bull semen on fertilization. Acta. Vet. Hung. 33:107.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:6680-685.
- Pflutzner H. 1984. Die *Mycoplasma bovis* infektion des rindes. Mh. Vet. Med. 39: 217-220.



20. Razin, S. y V. P. Cirillo. 1983. Sugar fermentation. En: S. Razin and J.G. Tully (ed.). *Methods in Mycoplasma*. p. 337- 343 Vol. 1. Academic Press, Inc. New York.
21. Senterfit, L. 1983. Tetrazolium reduction inhibition, p. 419- 421. En: S. Razin and J.G. Tully (ed.). *Methods in Mycoplasma*, Vol. 1. Academic Press, Inc. New York.
22. Tully, J. G. 1983. Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. En: S. Razin and J.G. Tully (ed.). *Methods in Mycoplasma*, p. 355- 362 Vol. 1. Academic Press, Inc. New York.