

## Veterinaria México

Volumen  
Volume 35

Número  
Number 2

Abril-Junio  
April-June 2004

*Artículo:*

### Identificación de *Mycoplasma* spp en leche bovina con una prueba de inmunoperoxidasa

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de  
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in  
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[www.Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)

# Identificación de *Mycoplasma* spp en leche bovina con una prueba de inmunoperoxidasa

## Identification of *Mycoplasma* spp in bovine milk with an immunoperoxidase assay

Fidel Infante-Martínez<sup>\*,†</sup>  
Gerardo H. Flores-Gutiérrez<sup>\*\*</sup>  
Javier Lozoya-Chávez<sup>\*\*\*</sup>

### Abstract

The objective of this study was to implement an immunoperoxidase assay for the identification of *Mycoplasma* spp from bovine milk. Eighty samples of naturally infected milk, with different *Mycoplasma* spp, were analyzed; the immunofluorescence assay was used as a gold standard. The sensitivity of the immunoperoxidase assay was six colony-forming units, with no cross-reactions between the antisera, with 100% epidemiological sensitivity and specificity, and predictive values; there were no statistical differences ( $P > 0.05$ ) between both tests. The reproducibility of the immunoperoxidase assay was high, obtaining identical results four times. Furthermore, it was carried out in less time than the immunofluorescence assay, requiring only a light microscope to read the results and fewer antisera and conjugates. In this study, the immunoperoxidase assay proved to have similar diagnostic value to the immunofluorescence assay, but was easier to perform and did not require sophisticated equipment.

**Key words:** MYCOPLASMA, BOVINE MILK, IMMUNOPEROXIDASE ASSAY, IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY.

### Resumen

El propósito de este trabajo fue instrumentar una prueba de inmunoperoxidasa para identificar *Mycoplasma* spp aislados de leche bovina. Se analizaron 80 muestras de leche infectada de forma natural por diferentes *Mycoplasma* spp, utilizando la prueba de inmunofluorescencia como estándar de oro. La sensibilidad de la prueba instrumentada fue de seis unidades formadoras de colonias, sin presentarse reacciones cruzadas con los diferentes antisueros, con 100% de sensibilidad y especificidad epidemiológica y valores predictivos, no encontrándose diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ) entre ambas técnicas. La reproducibilidad de la prueba de inmunoperoxidasa fue alta, obteniendo cuatro veces los mismos resultados; se realizó en menos tiempo que la prueba de inmunofluorescencia, requiriendo sólo de un microscopio simple para leer los resultados y una menor cantidad de antisueros y conjugados. En este estudio la prueba de inmunoperoxidasa mostró tener características diagnósticas similares a la prueba de inmunofluorescencia, es más sencilla y no requiere de equipo sofisticado.

**Palabras clave:** MYCOPLASMA, LECHE BOVINA, PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA, PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Recibido el 27 de febrero de 2003 y aceptado el 21 de agosto de 2003.

\* División de Estudios de Posgrado e Investigación, Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Aldama, Tamaulipas, 13, San Luis Potosí 426, 87020, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

\*\* División de Estudios de Posgrado e Investigación, Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Centro Universitario Adolfo López Mateos, 87149, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

\*\*\* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km 5 Carretera Cd. Victoria-Cd. Mante, 87000, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

† Fallecido el 22 de marzo de 2002.

Autor para correspondencia: Gerardo H. Flores-Gutiérrez, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Calle 16 y Lago de Chapala, Colonia Aztlán, 88740, Reynosa, Tamaulipas, México, Teléfono y fax: (899) 9 23 06 22 y 9 21 33 40; correo electrónico: ghflores@uat.edu.mx

## Introduction

The micro-organisms of the genus *Mycoplasma* spp, that affect the bovine mammary gland, are the cause of mastitis for which there is no effective treatment. In this context, great losses are produced for the dairy industry in both milk production and the discarding of high genetic grade animals;<sup>1</sup> besides, it has been determined that the infected animals can be healthy carriers and quickly disseminate the disease among a herd free from it.<sup>2-4</sup> Therefore, it is necessary to have diagnostic techniques capable of identifying the genus and species of the causative micro-organisms, to be able to take the proper measures and achieve its control.<sup>5</sup>

The diagnosis of *Mycoplasma* spp has depended basically on micro-biological methods<sup>6,7</sup> that have been satisfactory, but have the disadvantage that they are executed slowly,<sup>8</sup> and they depend on biochemical tests for their final identification.<sup>6,7,9-12</sup> There are other diagnostic methods, amongst these: ELISA, immunofluorescence, DNA probe, and the polymerase chain reaction technique that are efficacious in the diagnosis of this disease. Nevertheless, they require reagents and equipment that has a very high cost<sup>8</sup> with the additional disadvantage that they only identify one micro-organism at a time.

For the simultaneous identification of several species of *Mycoplasma* spp, the most often used method is the immunofluorescence assay;<sup>2,9</sup> through it, multiple diagnosis are obtained in the same agar, with sensibility and specificity. Nevertheless it requires the use of an immunofluorescence microscope that, due to its cost and complicated maintenance, is not available in the animal diagnostics laboratories that only have basic infrastructure. Because of this, the objective of this research was the instrumentation and evaluation of an immunoperoxidase assay, in agar, for the identification of bovine-origin *Mycoplasma* spp in milk, since, through this technique, it is possible to perform multiple diagnosis, without sophisticated equipment and avoiding cost increments.

## Material and methods

### Experimental samples

The micro-organisms that were used in this study were isolated from combined milk samples, obtained from herds that had mastitis cases caused by these micro-organisms, with a total of 80 samples: 30 of *Mycoplasma bovis*, 11 of *M. californicum*, 15 of *M. canadense*, 12 of *M. bovis genitalium* and 12 of *M. alkalescens*.

## Introducción

Los microorganismos del género *Mycoplasma* spp que afectan la glándula mamaria bovina son causa de mastitis para la cual no existe tratamiento efectivo; en este contexto, se han producido grandes pérdidas en la industria lechera, tanto en producción como en el desecho de animales de alto registro;<sup>1</sup> además se ha determinado que los animales infectados pueden ser portadores sanos y diseminar rápidamente la enfermedad en un hato libre de ella,<sup>2-4</sup> por lo que es necesario contar con técnicas de diagnóstico capaces de identificar el género y las especies de los microorganismos causales, para tomar medidas adecuadas y lograr su control.<sup>5</sup>

El diagnóstico de *Mycoplasma* spp ha dependido básicamente de métodos microbiológicos<sup>6,7</sup> que han resultado satisfactorios, pero con la desventaja de realizarse de manera lenta,<sup>8</sup> aunque dependen para su identificación final de pruebas bioquímicas.<sup>6,7,9-12</sup> Existen otros métodos de diagnóstico, entre ellos las pruebas de ELISA, inmunofluorescencia, sondas de ADN, y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, que son eficaces en el diagnóstico de esa enfermedad; sin embargo, requieren de reactivos y equipo con costo elevado<sup>8</sup> con la desventaja adicional de que sólo identifican un microorganismo a la vez.

Para la identificación de manera simultánea de varias especies de *Mycoplasma* spp el método más utilizado es la prueba de inmunofluorescencia,<sup>2,9</sup> mediante ésta se obtienen diagnósticos múltiples en un mismo agar con una sensibilidad y especificidad; sin embargo, requiere del uso del microscopio de inmunofluorescencia, que por su costo y manejo complicado no se encuentra disponible en los laboratorios de diagnóstico animal que cuentan con infraestructura básica. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue instrumentar y evaluar una prueba de inmunoperoxidasa en agar para la identificación de *Mycoplasma* spp de origen bovino en leche, ya que mediante esta técnica es posible realizar diagnósticos múltiples sin que se requiera de equipo sofisticado y con esto se aumenten los costos para su realización.

## Material y métodos

### Muestras experimentales

Los microorganismos usados fueron aislados de muestras compuestas de leche de hatos que presentaron casos de mastitis por estos microorganismos, contando con 80 muestras: 30 de *Mycoplasma bovis*, 11 de *M. californicum*, 15 de *M. canadense*, 12 de *M.*

## Antisera

The antisera were obtained from rabbits immunized with specific antigens for each one of the *Mycoplasma* spp. The rabbits were inoculated with the specific antigens together with Freund adjuvant according to an immunization schedule (Table 1); the sera of the rabbits were then precipitated with saturated ammonium sulphate.<sup>9,10</sup> Once the antisera were obtained, the amount of globulin contained in them was adjusted until there was 10 mg/mL.

## Development of the technique

All the reactions were performed in disposable Petri dishes prepared with modified Hayflick Mycoplasma agar, that contained 15% horse serum, DNA extract and fresh yeast.<sup>11</sup> On this agar, the milk samples were inoculated and incubated two to six days at 37°C in an atmosphere of 10% CO<sub>2</sub>, until an adequate bacterial growth was obtained. The amount of colony-forming units (CFU) contained in 0.01 mL of each one of the samples was determined through the immunofluorescence test.<sup>7</sup> After that, the samples where mycoplasmas were identified were diluted serially, subjecting each dilution to the immunoperoxidase test until no CFU's were detected while counting the micro-organisms by observation, in order to determine the sensibility of the evaluation test.

The antisera were diluted 1:50 in a Tris saline solution (TBS) (20 mM Tris,\* 500mM NaCl,\* pH 7.5) plus 0.05% of Tween 20%\* and 1% of gelatine;\*\* with the antisera diluted in this manner, 7 mm diameter discs were humidified until saturation.\* This same

*bovigenitalium* y 12 de *M. alkalescens*.

## Antiseros

Los antiseros fueron obtenidos de conejos inmunizados con antígenos específicos para cada uno de los *Mycoplasma* spp, aquellos fueron inoculados con adyuvante de Freund de acuerdo con un calendario de inmunización (Cuadro 1); posteriormente fueron precipitados con sulfato de amonio saturado.<sup>9,10</sup> Una vez obtenidos los antiseros, se ajustó la cantidad de globulina contenida en ellos hasta obtener 10 mg/ml.

## Desarrollo de la técnica

Todas las reacciones se realizaron en cajas de Petri desechables preparadas con agar de micoplasma de Hayflick modificado, que contenía 15% de suero de equino, extracto de ADN y levadura fresca.<sup>11</sup> Sobre este agar se sembraron las muestras de leche y se incubaron de dos a seis días a 37°C en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>, hasta obtener un crecimiento bacteriano adecuado. La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) contenidas en 0.01 ml de cada una de las muestras se determinó por medio de la prueba de inmunofluorescencia;<sup>7</sup> posteriormente, las muestras en las que se identificaron micoplasmas se diluyeron de manera seriada, sometiendo cada dilución a la prueba de inmunoperoxidasa hasta que no se detectaran UFC y realizando conteos de los microorganismos por medio de observación directa, con el objeto de determinar la sensibilidad de la prueba en evaluación.

Los antiseros fueron diluidos 1:50 en solución salina de tris (TBS) (20 mM Tris,\* 500 mM NaCl,\*

\* Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.

\*\* Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

**Cuadro 1**

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE CONEJOS UTILIZADOS PARA PRODUCIR ANTISUEROS PARA LA DETECCIÓN DE *Mycoplasma* spp EN MUESTRAS DE LECHE BOVINA MEDIANTE UNA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA

IMMUNIZATION SCHEDULE OF RABBITS USED FOR THE PRODUCTION OF ANTISERA FOR THE DETECTION OF *Mycoplasma* spp IN BOVINE MILK SAMPLES, BY THE IMMUNOPEROXIDASE TEST

|                 | <i>Amount of antigen</i>  | <i>Inoculation form</i> | <i>Anatomical site</i>    |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Day 1           | 0.2 ml                    | Intradermal             | Both hind limbs foot pads |
|                 | 0.6 ml                    | Intradermal             | 3-4 sites along the back  |
|                 | 0.5 ml                    | Intramuscular           | Both hind limbs           |
|                 | 1.0 ml                    | Intramuscular           | Both shoulders            |
| Week 3          | 0.5 ml                    | Intramuscular           | Both hind limbs           |
|                 | 0.2 ml (without adjuvant) | Intravenous             | --                        |
| Weeks 6, 7, 8 9 | 0.2 ml (without adjuvant) | Intravenous             | --                        |
|                 | Bleeding                  | --                      | Heart                     |

\* After two months of rest, the inoculations and the bleeding were repeated beginning with the third week of the schedule.

process was used to prepare the goat conjugate anti-IgG of rabbit linked to peroxidase.\*\*

The saturated antisera discs were placed with "forceps" over the *Mycoplasma* spp colonies and incubated during 40 minutes. After this period, the saturated antisera discs were withdrawn, placing over the same site, the discs saturated with goat conjugate anti-IgG of rabbit linked to peroxidase and then were incubated during 30 minutes. Once the second incubation process was finished, the disks were removed and TBS was used to wash the antisera and conjugates that were not attached during the reaction.

The substrate that was used was prepared with 30 mg of chlorine-naftol\* diluted in 10 ml of cold metha-nol\*, mixing this solution with a second one that contained 50 ml of TBS plus 30 µl of 30% hydrogen peroxide,\* according to that which has been previously described.<sup>7</sup> Ten ml of this substrate were added to each Petri dish allowing an incubation time of ten minutes, and then it was washed with TBS and examined with a simple or stereoscopic microscope; the colonies stained dark blue were considered positive. All the incubation processes were performed at room temperature.

### Statistical analysis

The gold standard that was used was the immunofluorescence technique that was done with each one of the milk samples used, following the Baas and Jasper technique.<sup>9</sup>

Through the results of both techniques, the diagnostic validity was obtained for the immunoperoxidase test, through the estimation of the epidemiological sensibility (absence of false negative results) and epidemiological specificity (absence of false positive results), as well as the predictive values (probability of obtaining a true diagnosis, no matter if is positive or negative) by means of Episcopo 2.0 software.

The reproducibility of the immunoperoxidase test was evaluated doing it four more times with the same samples used. The concordance between the results that were obtained with the immunoperoxidase test and the immunofluorescence test was analyzed through the Mc Nemar<sup>13</sup> test at a 0.05 level of significance, to test the hypothesis of no difference using non independent samples.

### Results

The sensibility of the immunoperoxidase test was six CFU of *Mycoplasma* spp. The immunofluorescence test, as well as the immunoperoxidase test were highly

pH 7.5) más 0.05% de Tween 20%\* y 1% de gelatina;\*\* con los antisueros diluidos de esta manera, se humedecieron hasta su saturación discos redondos de 7 mm de diámetro.\* Este mismo proceso se utilizó para preparar el conjugado de cabra anti-IgG de conejo unido a peroxidasa.\*\*

Los discos saturados de antisueros fueron colocados con "fórceps" sobre las colonias de *Mycoplasma* spp e incubados durante 40 minutos. Después de este periodo los discos saturados de antisueros fueron retirados, colocando sobre el mismo lugar los discos saturados de conjugado de cabra anti-IgG de conejo unido a peroxidasa, incubándolos por un lapso de 30 minutos. Una vez finalizado el segundo proceso de incubación, se retiraron los discos y se utilizó TBS con el propósito de lavar los antisueros y conjugados que no se unieron durante la reacción.

El sustrato utilizado fue preparado con 30 mg de cloro-naftol\* diluidos en 10 ml de metanol\* frío, mezclando esta solución con una segunda que contenía 50 ml de TBS más 30 µl de peróxido de hidrógeno\* al 30%, de acuerdo con lo descrito previamente.<sup>7</sup> Sobre cada caja de Petri se agregaron 10 ml de este sustrato permitiendo un tiempo de incubación de diez minutos, para posteriormente lavar con TBS y examinar con un microscopio simple o un estereoscopio; las colonias teñidas de color azul oscuro fueron consideradas como positivas. Todos los procesos de incubación se realizaron a temperatura ambiente.

### Análisis estadístico

El estándar de oro utilizado fue la técnica de inmunofluorescencia, la cual fue realizada a cada una de las muestras de leche utilizadas siguiendo la técnica de Baas y Jasper.<sup>9</sup>

Mediante los resultados de ambas técnicas se obtuvo la validez diagnóstica de la prueba de inmunoperoxidasa, a través del cálculo de la sensibilidad epidemiológica (ausencia de resultados falsos negativos) y especificidad epidemiológica (ausencia de resultados falsos positivos), así como los valores predictivos (probabilidad de obtener un diagnóstico verdadero, sin importar si éste es positivo o negativo) por medio del software Episcopo 2.0.

La reproducibilidad de la prueba de inmunoperoxidasa fue evaluada realizándola cuatro veces más en las mismas muestras utilizadas. La concordancia entre los resultados obtenidos por la prueba de inmunoperoxidasa y la técnica de

\* Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

\*\* Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA.

specific, since there were no cross reactions between any of the different antisera that were used to identify the species of the micro-organisms that were used. Nevertheless, the immunoperoxidase test was performed in a 1.5 hour period, while the immunofluorescence test took two days to be performed.

In agreement with the results that were obtained, when the experimental samples were subjected to both techniques (Table 2), 100% values were obtained for the parameters of epidemiological sensibility, epidemiological specificity and positive and negative predictive values, as indicators of diagnostic validity of the immunoperoxidase test in a general manner, taking into consideration the total of 80 infected samples, as well as in a particular way for each one of the micro-organisms considered in this study.

As a consequence of these results, there were no significant differences between both techniques when the results were analyzed with the Mc Nemar test at a 0.05 level of significance. Also, the reproducibility of the immunoperoxidase test was good, since it reproduced the same results each one of the four times the test was performed in the milk samples.

## Discussion

*Mycoplasma* spp causes a severe form of mastitis, whose effective control depends on the capacity of a quick and reliable diagnosis at the beginning of the presentation of cases. This necessity has been demonstrated by the strategies developed for the control of certain outbreaks.<sup>1,14</sup> The identification of these micro-organisms has been basically performed through micro-biological-culture means which must be done by personnel or laboratories that have ample experience, since these are fastidious micro-organisms,<sup>15</sup> and also, because of the additional disadvantage of requiring several days in order to reach a definitive diagnosis. Other techniques that have been developed for the same purpose have been the ELISA and the polymerase chain reaction tests that are highly sensitive and specific,<sup>14,16</sup> but are only capable of identifying one micro-organism per test; this constitutes a disadvantage, since outbreaks have been described where several species of *Mycoplasma* spp have been identified at the same time,<sup>1</sup> and the identification of the causative agent requires more time and an elevated consumption of reagents.

The immunofluorescence test has demonstrated to be a sensitive and specific test for the identification of *Mycoplasma* spp in a multiple way,<sup>17-19</sup> and its sensibility and specificity has been established at 96.66% and 95%, respectively.<sup>20</sup> Nevertheless, it requires the use of an immunofluorescence micro-

immunofluorescence fue analizada mediante la prueba de Mc Nemar<sup>13</sup> al 0.05 nivel de significancia, para probar la hipótesis de no diferencia utilizando muestras no independientes.

## Resultados

La sensibilidad de la prueba de inmunoperoxidasa fue de seis UFC de *Mycoplasma* spp. Además, tanto la prueba de inmunofluorescencia como la de inmunoperoxidasa fueron altamente específicas, ya que no se presentaron reacciones cruzadas entre ninguno de los diferentes antisueros utilizados para identificar las especies de los microorganismos utilizados. Sin embargo, la prueba de inmunoperoxidasa se realizó en un tiempo de 1.5 horas, en comparación con los dos días requeridos por la prueba de inmunofluorescencia.

De acuerdo con los resultados obtenidos al someter las muestras experimentales a ambas técnicas (Cuadro 2), se obtuvieron valores de 100% para los parámetros de sensibilidad epidemiológica, especificidad epidemiológica y valores predictivos positivo y negativo como indicadores de la validez diagnóstica de la prueba de inmunoperoxidasa, tanto de manera general considerando el total de las 80 muestras de leche infectada, como para cada uno de los microorganismos considerados en este estudio.

Como consecuencia de estos resultados tampoco hubo diferencias significativas entre ambas técnicas cuando los resultados fueron analizados con la prueba de Mc Nemar al 0.05 de nivel de significancia. Además, la reproducibilidad de la prueba de inmunoperoxidasa fue buena, ya que reprodujo los mismos resultados en cada una de las cuatro veces que fue realizada en las muestras de leche.

## Discusión

Los *Mycoplasma* spp ocasionan una forma severa de mastitis, cuyo control efectivo depende de la capacidad para realizar un diagnóstico confiable y de manera rápida cuando inicia la presentación de casos, lo cual ha sido demostrado en las estrategias establecidas para el control de algunos brotes.<sup>1,14</sup> La identificación de estos microorganismos se ha realizado básicamente por medio del cultivo microbiológico, que debe ser realizado por personal o laboratorios que cuenten con una amplia experiencia ya que se trata de microorganismos fastidiosos,<sup>15</sup> además de la desventaja adicional de requerir de varios días para llegar a un diagnóstico definitivo. Otras técnicas que se han desarrollado con el mismo fin han sido ELISA y la técnica de

**Cuadro 2**  
**RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA Y LA PRUEBA DE**  
**INMUNOPEROXIDASA, USANDO 80 MUESTRAS DE LECHE BOVINA INFECTADA CON**  
**DIFERENTES *Mycoplasma* spp**

**RESULTS OF THE IMMUNOFLUORESCENCE AND IMMUNOPEROXIDASE TESTS, USING 80**  
**BOVINE MILK SAMPLES INFECTED WITH DIFFERENT *Mycoplasma* spp**

| <i>Mycoplasma</i> spp | Immunofluorescence |          | Immunoperoxidase |          |
|-----------------------|--------------------|----------|------------------|----------|
|                       | Positive           | Negative | Positive         | Negative |
| <i>Bovis</i>          | 30                 | 0        | 30               | 0        |
| <i>Californicum</i>   | 11                 | 0        | 11               | 0        |
| <i>Canadense</i>      | 15                 | 0        | 15               | 0        |
| <i>Bovigenitalium</i> | 12                 | 0        | 12               | 0        |
| <i>Alkalescens</i>    | 12                 | 0        | 12               | 0        |

scope, which represents an elevated cost, besides requiring trained personnel for its handling. That the immunofluorescence test constitutes a rapid method of identification of *Mycoplasma* spp has been determined in several studies,<sup>20</sup> even though it requires several days to take place.<sup>21,22</sup>

An alternative for the multiple diagnosis of these micro-organisms is the immunoperoxidase test, that only requires a simple or stereoscopic microscope to perform it,<sup>21,23</sup> and only requires 1.5 hours to perform, as is described in this study, and it has 100% values as far as the diagnostic validity of the test is concerned.

In this study, the immunoperoxidase test gave the same results as the immunofluorescence test, allowing a rapid and simultaneous identification of different *Mycoplasma* spp at the level of species and with the requirement of conventional equipment that can be found in any animal diagnostic laboratory, and therefore, it was shown that it is a simple, low-cost alternative for the diagnosis of mastitis caused by *Mycoplasma* spp in the dairy-production areas of the country.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Donald E. Jasper, of the University of California, Davis, for the donation of

1. the *Mycoplasma* spp strains used in this study.

## Referencias

2. Infante-Martinez F, Aguado SJ, Jasper DE. Mastitis outbreak due to *Mycoplasma californicum* and
3. *Mycoplasma canadense* in a commercial dairy herd in the state of Jalisco, Mexico. Rev Latinoam Microbiol 1999;41:117-120.
4. Jasper DE. Bovine mycoplasmal mastitis. Adv Vet Sci Comp Med 1981;25:121-125.
5. Jasper DE, Dellinger JD, Rollins MH. Prevalence of mycoplasmal bovine mastitis in California. Am J Vet

reacción en cadena de la polimerasa, que son altamente sensibles y específicas,<sup>14,16</sup> pero solamente son capaces de identificar un microorganismo a la vez, lo cual constituye una desventaja ya que se han descrito brotes de mastitis en los que se encuentran involucradas varias especies de *Mycoplasma* spp a la vez,<sup>1</sup> en los cuales se requiere de un lapso mayor y un consumo de reactivos elevado para poder llegar a la identificación del agente causal.

La prueba de inmunofluorescencia ha demostrado ser una técnica sensible y específica para la identificación de *Mycoplasma* spp en forma múltiple,<sup>17-19</sup> cuya sensibilidad y especificidad ha sido determinada en 96.66% y 95%, respectivamente.<sup>20</sup> Sin embargo, requiere del uso de un microscopio de inmunofluorescencia, el cual representa un costo elevado además de requerir de personal capacitado para su manejo. Se ha determinado en algunos estudios que la prueba de inmunofluorescencia constituye un método rápido para la identificación de *Mycoplasma* spp,<sup>20</sup> aun cuando requiere de varios días para llevarse a cabo.<sup>21,22</sup>

Una alternativa para el diagnóstico múltiple de estos microorganismos por medio de la prueba de inmunofluorescencia ha sido la prueba de inmunoperoxidasa, la cual solamente requiere de un microscopio simple o de un estereoscopio para realizarla en tres días,<sup>21,23</sup> a diferencia de la prueba de inmunoperoxidasa descrita en este estudio, la cual requirió de 1.5 horas, además de los valores de 100% obtenidos en cuanto a la validez diagnóstica de la prueba.

En este estudio la prueba de inmunoperoxidasa obtuvo los mismos resultados que la prueba de inmunofluorescencia, permitiendo la identificación rápida y simultánea de diferentes *Mycoplasma* spp al nivel de especie y con un requerimiento de equipo convencional que puede ser encontrado en cualquier laboratorio de diagnóstico animal, por lo que mostró ser una alternativa sencilla y de bajo costo para realizar el diagnóstico de mastitis ocasionada por *Mycoplasma* spp en las áreas de producción lechera

- Res 1979;40:1043-1047.
- Jasper DE. Prevalence of mycoplasmal mastitis in the western states. *Cal Vet* 1980;34:24-26.
6. Boothby JT, Jasper DE, Rollins MH. Detection of *M. bovis* specific IgG in bovine serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 1981;42:1242-1247.
  7. Gourlay RN. Isolation and characterization of mycoplasmas viruses. In: Tully JG, Razin S, editors. *Methods in mycoplasmaology*. New York: Academic Press, 1983:413-420.
  8. Infante Martinez F, Jasper DE, Stott JL, Cullor JS, Dellinger JD. Immunobinding assay for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Can J Vet Res* 1990;54:251-255.
  9. Infante F, Infante F Jr, Flores-Gutierrez GH. Improved immunobinding test using monoclonal antibodies for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Can J Vet Res* 2002;66:282-284.
  10. Baas E, Jasper DE. Agar block technique for identification of mycoplasmas by use of fluorescent antibody. *Appl Microbiol* 1972;23:1097-1100.
  11. Carrol EJ, Rollins MH, Jasper DE. The immune response of rabbits to 3 strains of *M. agalactiae* var. *bovis* isolated from mastitis bovine udders. *Cornell Vet* 1976;66:143-151.
  12. Chavez Gonzalez YR, Ros Bascunana C, Bolske G, Mattsson JG, Fernandez Molina C, Johansson KE. *In vitro* amplification of the 16sr rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet Microbiol* 1995;47:183-190.
  13. Clyde A. *Mycoplasma pneumoniae* infection of man. In: Tully JG, Whitcomb RF, editors. *The Mycoplasmas*. New York: Academic Press, 1979:401-404.
  14. Remington RD, Shchork MA. *Statistics with applications to the biological and health sciences*. New Jersey: Prentice Hall Inc, 1975.
  15. Heller M, Berthold E, Pfützner H, Leirer R, Sachse del país.
  16. K. Antigen capture ELISA using monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Vet Microbiol* 1993;37: 127-133.
  17. Mauch H. Diagnosis of acute respiratory tract infections: serology and new methods. *Clin Microbiol Infect* 1996;1 Suppl 2:S16-S19.
  18. Verdin E, Saillard C, Labbe A, Bove JM, Kobisch M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet Microbiol* 2000;76:31-40.
  19. Muenster OA, Ose EE, Matsuoka T. The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional *Mycoplasma* in the pneumonic calf lung. *Can J Comp Med* 1979;43:392-398.
  20. Trichard CJ, Basson PA, Van der Lugt JJ, Jacobsz EP. An outbreak of contagious bovine pleuropneumonia in the Owambo Mangetti area of South West Africa/Namibia: microbiological, immunofluorescent, pathological and serological findings. *Onderstepoort J Vet Res* 1989;56:277-284.
  21. Bencina D, Bradbury JM. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol* 1992;30:407-410.
  22. Gogate A, Deodhar L, Bhatt R, Vaidya P. *Mycoplasma hominis* infections in female genital tract & use of immunofluorescence for antibody detection. *Indian J Med Res* 1990;91: 364-367.
  23. Flores-Gutiérrez GH. Desarrollo de una prueba de inmunodot para el diagnóstico de *Mycoplasma bovis* en semen y tracto reproductor bovino (tesis de doctorado). Victoria (Tamaulipas) México: Univ Autónoma de Tamaulipas, 2001.
  - Hotzel H, Sachse K. Improvement and acceleration of the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia by direct detection of the microbe using polymerase chain reaction (PCR). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1998;111:268-272.