

Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante ELISA indirecta y aislamiento*

Detection of subclinical bovine mastitis caused by mycoplasmosis by indirect ELISA test and isolation

César Núñez D.** Elizabeth Morales Salinas**
José Juan Martínez Maya*** Laura Hernández A.†

Abstract

The objective of this study was to determine the effectiveness of ELISA test in serum, for the diagnosis of subclinical bovine mastitis caused by *Mycoplasma bovis*, having as a reference test, the isolation of the microorganism in milk samples. Two hundred and twenty five blood and milk samples were obtained from herds from the State of Mexico, Coahuila and Hidalgo, all of them in Mexico. Using the Wisconsin test, 139 samples (61.8%) were positives to subclinical mastitis but only in six of them, *Mycoplasma bovis* was isolated. By ELISA test, 72 samples were positives (32.0%). All animals with positive isolation were also positive to the ELISA test. With a cut point higher or equal to 100, sensitivity and specificity were 83.3% and 83.56%, respectively, although the positive predictive value (PV) (+) was 12.2% and the negative predictive value (PV) (-) was 99.46%. The low PV (+) was associated to a low prevalence. ELISA test could be used as a screen test to detect mastitis associated to *Mycoplasma bovis*, particularly in herds with high frequencies (> 10%), this with the purpose to improve a positive predictive value (PV), which would allow to establish better diagnoses in cases where the most common tests do not give a specific result, mostly if ELISA test is considered as practical, fast and economic.

Key words: *MYCOPLASMA BOVIS*, MASTITIS, DIAGNOSTIC TESTS, SEROLOGY.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de una prueba de ELISA en suero para el diagnóstico de la mastitis bovina subclínica causada por *Mycoplasma bovis*, teniendo como prueba de referencia el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de leche. Se obtuvieron 225 muestras de sangre y de leche provenientes de hatos del Estado de México, Coahuila e Hidalgo, todos en México. Ciento treinta y nueve muestras (61.8%) resultaron positivas a mastitis subclínica mediante la prueba de Wisconsin, y de ellas sólo en seis se aisló *M. bovis*. A través de la prueba de ELISA, 72 muestras resultaron positivas (32.0%). Todos los animales con aislamiento positivo también fueron positivos a la prueba de ELISA. Con un punto de corte mayor o igual a 100, se obtuvo sensibilidad de 83.3% y especificidad de 83.56%, aunque el valor predictivo (VP) (+) fue de 12.2%, y el VP (-) de 99.46%. El bajo VP (+) se asoció con baja prevalencia. La técnica de ELISA podría ser utilizada como prueba tamiz para la detección de mastitis asociada con *M. bovis*, particularmente en hatos con frecuencias elevadas (> a 10%), esto con el fin de mejorar un valor predictivo positivo, lo que permitiría establecer mejores diagnósticos en casos donde las pruebas más comunes no dan un resultado concreto, sobre todo si se considera que la prueba de ELISA es práctica, rápida y económica.

Palabras clave: *MYCOPLASMA BOVIS*, MASTITIS, PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, SEROLOGÍA.

Recibido el 24 de octubre de 2006 y aceptado el 20 de febrero de 2008.

*Este trabajo forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

**Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

†Centro Nacional de Investigación en Microbiología, Km 15.5, Carretera Libre México-Toluca, Colonia Palo Alto, 05110, México, D. F.

Introduction

Mycoplasmosis is an infectious disease which affects several animal species. It is caused by microorganisms of genus: *Mycoplasma*, class: Mollicutes, order: Mycoplasmatales and family: Mycoplasmatacea.

Mycoplasmas are pleomorphic microorganisms, cell wall-less, measure from 200 to 500 nm, grow in solid or liquid medium, and use glucose as source of energy. For their growth, additional protein mediums and nutrimental complexes are used, penicillin and thallium acetate as inhibitors of contaminant bacteria are also used.

In bovine cattle it is possible to isolate several species of *Mycoplasma*, of those, *Mycoplasma alkalences*, *M. bovis*, *M. californicum* and *M. canadense* provoke mastitis, arthritis, pneumonia, otitis, and reproductive problems, among other manifestations.¹⁻³ Nevertheless, *M. bovis* is the main cause of mastitis.¹⁻⁵

In Mexico, Avila *et al.*⁶ informed on the isolation of *Mycoplasma* sp in one dairy herd located in the State of Mexico; Hernandez *et al.*⁷ described an outbreak of mastitis caused by *M. bovis* in a dairy herd of the same state; Barajas *et al.*⁸ observed prevalence of *M. bovis* greater than 50% in bovines of the Mexican tropic; Castro⁹ informs of the isolation of proteolytic *M. spp* in a mastitis outbreak in a dairy herd in Tizayuca, Hidalgo, Mexico.

Among mastitis caused by mycoplasmas, *M. bovis* is the most frequent, besides it is found in mucosa, respiratory and urogenic tract secretions.

The infection may be introduced to the herd by an infected animal or appear as a consequence of an infection in a mammary gland through the milking equipment; afterwards, it may spread through the milking machine, teat cup liners of the mechanical milking machines and by solutions commonly used in udder cleaning.^{2,4,5} The seasons or cold and humid conditions increase the incidence of infection, since mycoplasmas survive longer in those conditions.¹⁰

The clinical signs of mastitis appear days after the infection, which may be present in any phase of lactation; the antecedent is an acute mastitis in one or more quarters, that on palpation it is perceived hot, swollen, edematous or hard, secretions vary on aspect.² Generally, the first secretion may be watery with sand-like material.¹¹ After several days secretions may become purulent. If disease progresses, the galactophorous ducts develop squamous metaplasia, and some ducts and acini are filled with granulomatous exudates.

The acute mastitis caused by *M. bovis* disseminates

Introducción

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

Los 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 nutrimentales, también se utiliza penicilina y acetato de talio como inhibidores de bacterias contaminantes.

En ganado bovino es posible aislar varias especies de *Mycoplasma*, de ellas, *Mycoplasma alkalences*, *M. bovis*, *M. californicum* y *M. canadense* provocan mastitis, artritis, neumonías, otitis y problemas reproductivos, entre otras manifestaciones.¹⁻³ Sin embargo, *M. bovis* es el principal agente que causa mastitis.¹⁻⁵

En México, Ávila *et al.*⁶ informaron sobre el aislamiento de *Mycoplasma* spp en un hato lechero ubicado en el Estado de México; Hernández *et al.*⁷ describieron un brote de mastitis causado por *M. bovis* en un hato lechero del mismo estado; Barajas *et al.*⁸ observaron prevalencia de *M. bovis* mayor a 50% en bovinos en el trópico de México; Castro⁹ informa del aislamiento de *M. spp* proteolítico de un brote de mastitis en un hato lechero en Tizayuca, Hidalgo, México.

Entre las mastitis causadas por los micoplasmas, *M. bovis* es el más frecuente, además se le encuentra en mucosas y en secreciones de los tractos respiratorio y urogenital.

La infección puede ser introducida al hato por un animal infectado, o aparecer como consecuencia de la infección en glándula mamaria a través del equipo de ordeño; después se puede propagar por medio de los ordeñadores, las pezoneras de las ordeñadoras mecánicas y por soluciones que usualmente se emplean para el lavado de las ubres.^{2,4,5} Las épocas o condiciones frías y húmedas aumentan la incidencia de la infección, ya que los micoplasmas pueden sobrevivir más tiempo en esas condiciones.¹⁰

Los signos clínicos de mastitis aparecen días después de la infección, la cual puede darse en cualquier fase de lactancia; el antecedente es una mastitis aguda en uno o más cuartos, que a la palpación se perciben calientes, hinchados, edematosos o duros, las secreciones varían en su aspecto.² Por lo regular, la primera secreción puede ser acuosa y tener "copos" de un material arenoso.¹¹ Transcurridos varios días, las secreciones se pueden convertir en un exudado purulento. Si la enfermedad progresa, los conductos galactóforos

in a short period of time, milk production drastically diminishes, except in subclinical cases.^{1,2}

Traditionally, the only routine diagnosis method has been the isolation and identification of *M. bovis*, that requires two to ten days. Nowadays, there are other diagnostic techniques: polymerase chain reaction (PCR), *in situ* hybridization. Likewise, there are immunoenzymatic techniques (ELISA) to detect antigens and antibodies against *M. bovis*.

ELISA technique to detect antibodies is quick, requires one to two days to obtain results, its high specificity and sensitivity is higher than other methods as hemoagglutination inhibition.^{12,13} There are commercial kits of ELISA technique that utilize antigens of variable surface protein (VSP), particularly variable surface protein "A" (VSPA), that is specific for any infection caused by *M. bovis*.¹⁴ The test detects antibodies from 13 to 720 days post-infection. Specificity does not reveal cross reactivation with hyperimmune sera of other *Mycoplasma* species, except a small reaction with *Mycoplasma arginini*.¹⁵ Ninety six percent of sensitivity and 98% of specificity have been observed, with ELISA commercial reagents to detect antibodies against other *Mycoplasma* species.¹⁶

Mastitis diagnosis associated with *M. bovis* represents a problem, since it is commonly performed only after other etiologies have been discarded; also, by the time the cause is determined, generally, the clinical signs and serious lesions already exist; therefore, its treatment results complicated and expensive. For this reason, it is necessary to search for diagnostic alternatives which identify the infection in subclinical mastitis, in an easy, quick and economic way. Consequently, an indirect ELISA test was evaluated, to determine the effectiveness of subclinical mastitis diagnosis associated with *M. bovis*.

Material and methods

Spatial and temporal location

The study was performed in the first semester of 2004 in three dairy herds located in different places: *a*) in Torreón, Coahuila; *b*) in Melchor Ocampo, State of Mexico, both with mycoplasmosis background; *c*) in Atitalaquia, Hidalgo, that did not have that type of background.

Obtainment of samples

In the three evaluated herds and during milking, the modified Wisconsin test was performed to all cows in production.¹⁷ Those who resulted with positive quarters to subclinical mastitis (> 500 000 somatic cells) a milk sample was taken to perform the isolation. In

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, salvo en los casos subclínicos.^{1,2}

Tradicionalmente, el único método de diagnóstico de rutina ha sido el aislamiento e identificación de *M. bovis*, que requiere de dos a diez días. En la actualidad existen otras técnicas de diagnóstico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación *in situ*. Asimismo, hay técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar antígenos y anticuerpos contra *M. bovis*.

La técnica de ELISA para detectar anticuerpos es rápida, requiere de uno a dos días para obtener resultados, su alta especificidad y sensibilidad es mayor a otros métodos como la inhibición de la hemoagglutinación.^{12,13} Existen paquetes comerciales de la técnica de ELISA que utilizan antígenos de proteínas variables de superficie (PVS), en particular la proteína variable de superficie "A" (PVSA), que es específica para toda infección provocada por *M. bovis*.¹⁴ La prueba detecta anticuerpos de los 13 a los 720 días posinfección. La especificidad no revela reactividad cruzada con sueros hiperinmunes de otras especies de *Mycoplasma*, excepto una pequeña reacción con *Mycoplasma arginini*.¹⁵ Con reactivos comerciales de ELISA para detectar anticuerpos en contra de otras especies de *Mycoplasma*, se ha observado sensibilidad de 96% y especificidad de 98%.¹⁶

El diagnóstico de mastitis asociada con *M. bovis* representa un problema, ya que por lo regular suele realizarse sólo hasta después de haber descartado otras etiologías; además, el tiempo que transcurre para ello hace que generalmente cuando se determina la causa, ya existen signos clínicos y lesiones graves, por lo que resulta más complicado y costoso su tratamiento. Por esta razón, es necesario buscar alternativas de diagnóstico que identifiquen la infección en casos de mastitis subclínicas, de manera fácil, rápida y económica. Por lo anterior, se buscó evaluar una prueba de ELISA indirecta, para determinar su efectividad en el diagnóstico de mastitis subclínica asociada con *M. bovis*.

Material y métodos

Ubicación espacial y temporal

El estudio se realizó en el primer trimestre de 2004 en tres hatos lecheros ubicados en lugares diferentes: *a*) en Torreón, Coahuila, *b*) en Melchor Ocampo, Estado de México, ambos con antecedentes de micoplasmosis; *c*) en Atitalaquia, Hidalgo, que no tenía ese tipo de antecedente.

cases where subclinical mastitis involved more than one quarter, a random sample was taken from any quarter, also a blood sample of 10 mL from the coccygeal vein was obtained; blood was centrifuged to obtain serum. Eighty six blood samples from animals with normal somatic cell count ($< 500\,000$ somatic cells) were taken as controls; therefore, they were considered negative to the Wisconsin test.

Antibody detection against *M. bovis*

The antibody detection against *M. bovis* was performed by indirect ELISA test using Checkit* reagent, following the manufacturer instructions; this test includes positive and negative control serums, with which cut point can be determined.

***M. bovis* isolation in milk**

For the isolation and identification of *M. bovis* in milk, 10 mL of milk were taken from each quarter that resulted positive in the modified Wisconsin test. Samplings were done in sterile essay tubes and were conserved between 2°C-4°C.¹⁸

The microorganism isolation was performed in the National Center of Researches in Veterinary Microbiology (CENID-Microbiology, for its Spanish meaning), from the National Institute of Forestry and Agricultural Investigations (INIFAP for its Spanish meaning). Milk samples were seeded in modified liquid of Friis medium and dilutions of 1:10 and 1:100 were made and incubated at 37°C and were daily examined. After seven days they were cultivated in solid medium of Friis and incubated at 37°C in humid atmosphere, with 5 to 10% of CO₂. The characteristic growth with “fried egg” aspect was observed in a stereoscopic microscope. The identification of the *Mycoplasma* species was performed by digitonin test,¹⁹ to differentiate it from *Acholeoplasma*. Besides, the serological identification was performed with the growth inhibition test with antiserums of *M. bovis*, *M. bovis genitalum* and *Acholeoplasma laidlawii*.²⁰

Result analysis

The concordance between the isolation of the microorganism and the ELISA test was determined through the Kappa statistical. With the aim to determine if there was a better point of cut than the one referred in the commercial reagent, the optic density (OD) results were grouped in intervals of 5%. Besides, for each stratum, the estimated values of sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PV(+)) and negative predictive value (PV(-)) for each estimated were determined. The best point cut by the elabora-

Obtención de muestras

En los tres hatos evaluados y durante el ordeño, se realizó la prueba de Wisconsin modificada a todas las vacas en producción.¹⁷ A las que resultaron con cuartos positivos a mastitis subclínica ($> 500\,000$ células somáticas) se les tomó una muestra de leche para realizar el aislamiento. En los casos donde la mastitis subclínica involucró más de un cuarto, se tomó la muestra al azar de cualquier cuarto, además se obtuvo una muestra de sangre de 10 mL de la vena coccígea; la sangre se centrifugó para la obtención de suero. Como testigos se tomaron 86 muestras de sangre de animales con conteos normales de células somáticas ($< 500\,000$ células somáticas), por lo que se consideraron negativos a la prueba de Wisconsin.

Detección de anticuerpos contra *M. bovis*

La detección de anticuerpos contra *M. bovis* se realizó mediante la prueba de ELISA indirecta utilizando el reactivo Checkit,* siguiendo las instrucciones según lo especificado por el fabricante; esta prueba incluye sueros testigo positivos y negativos, con los cuales se puede determinar el punto de corte.

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 en tubos de ensayo estériles y se conservaron entre 2°C-4°C.¹⁸

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 incubaron 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 *Mycoplasma* se realizó mediante la prueba de digitonina,¹⁹ para diferenciarla de *Acholeoplasma*. Además se realizó la identificación serológica con la prueba de inhibición del crecimiento con antisueros de *M. bovis*, *M. bovis genitalum* y *Acholeoplasma laidlawii*.²⁰

*Bomeli, Intervet, Suiza.

tion of a curve with receptor operative characteristics (ROC) was searched.²¹

Results

Two hundred and twenty five blood and milk samples were obtained, from which 98 (43.6%) proceeded from the herd of the State of Mexico, 77 (34.2%) from Coahuila and 50 (22.2%) from Hidalgo.

Modified Wisconsin test

From the 225 evaluated samples, 139 (61.8%) resulted positive to subclinical mastitis (> to 500 000 somatic cells); highest positive in the herd of the State of Mexico (80.6%) ($P < 0.01$) (Table 1).

Indirect ELISA test for the identification of antibodies against *M. bovis*

From the total of the samples, 72 were positive (32.0%) and four suspicious (1.8%) (Table 2). In relation to the origin places, the positive percentage was higher in the herd of the State of Mexico (38.8%), although there was no significant statistical difference between the groups ($P > 0.05$).

Isolation and identification of *M. bovis*

Of the 139 positive samples of the Wisconsin test, *M. bovis* was only isolated from six samples (4.3%), of which three came from the State of Mexico and three from Coahuila. Six isolations obtained from animals were also positive to the ELISA test (Tables 3 and 4).

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 de densidad óptica (DO) se agruparon en grupos con intervalos de 5%. Además se determinó para cada estrato los valores estimados de sensibilidad (Se), especificidad (Es), valor predictivo positivo (Vp(+)) y valor predictivo negativo (Vp(-)). Se buscó el mejor punto de corte mediante la elaboración de una curva con características operantes de receptor (ROC).²¹

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%), de Coahuila y 50 (22.2%) de Hidalgo.

Prueba de Wisconsin modificada

De las 225 muestras evaluadas, 139 (61.8%) resultaron positivas a mastitis subclínica (> a 500 000 células somáticas); se registró mayor 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%)

Cuadro 1

FRECUENCIA Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE LECHE EVALUADAS PARA LA DETECCIÓN DE MASTITIS SUBCLÍNICA MEDIANTE LA PRUEBA DE WISCONSIN MODIFICADA, EN 225 VACAS DE TRES HATOS DE DIFERENTES ENTIDADES FEDERATIVAS, DE FEBRERO A ABRIL DE 2004

FREQUENCY AND PERCENTAGE OF MILK SAMPLES EVALUATED FOR DETECTION OF SUBCLINICAL MASTITIS BY MODIFIED WISCONSIN TEST, IN 225 COWS OF THREE HERDS FROM DIFFERENT FEDERATIVE IDENTITIES, FROM FEBRUARY TO APRIL OF 2004

<i>Herd origin</i>	<i>Positive</i>	<i>Negative</i>	<i>Total</i>
State of Mexico*	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

*Herds with mycoplasmosis history.

**Herds without history of *Mycoplasma bovis* infection.

Sensitivity and specificity assessment of indirect ELISA test evaluated in serum for the detection of *M. bovis* in milk

With the cut point recommended by the manufacturer (80%), a 83.3% sensitivity, specificity of 72.15%, a positive predictive value of 7.58% and negative predictive value of 99.37% were obtained.

When gathering ELISA test results in 5% ranges, it was found that a better point of cut was equal to 100, with which sensitivity (83.3%) and specificity (83.56%) was presented. The positive predictive value was 12.12% and the negative predictive value was 96.46%, the obtained proportion under the ROC analysis curve was 0.9075 (Figure 1).

y cuatro sospechosas (1.8%) (Cuadro 2). En relación con 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, sólo se aisló *M. bovis* en seis muestras (4.3%), de las cuales tres provenían del Estado de México y tres de Coahuila. Los seis aislamientos que se obtuvieron de animales también fueron positivos a la prueba de ELISA (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 2

FRECUENCIA Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE SUERO EVALUADAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *M. bovis* MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA, EN 225 VACAS DE TRES HATOS DE DIFERENTES ENTIDADES FEDERATIVAS, DE FEBRERO A ABRIL DE 2004
FREQUENCY AND PERCENTAGE OF SERUM SAMPLES EVALUATED FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST *M. bovis* BY INDIRECT ELISA TEST, IN 225 COWS FROM THREE HERDS OF DIFFERENT FEDERATIVE IDENTITIES, FROM FEBRUARY TO APRIL 2004

<i>Herd origin</i>	<i>Positive</i>	<i>Negative</i>	<i>Suspicious</i>	<i>Total</i>
State of Mexico*	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

*Herds with mycoplasmosis history.

Cuadro 3

RELACIÓN ENTRE LA PRUEBA DE WISCONSIN MODIFICADA Y EL AISLAMIENTO DE *M. bovis* DE TRES HATOS DE DIFERENTES ENTIDADES FEDERATIVAS, DE FEBRERO A ABRIL DE 2004
RELATION BETWEEN MODIFIED WISCONSIN TEST AND THE ISOLATION OF *M. bovis* FROM THREE HERDS OF DIFFERENT FEDERATIVE IDENTITIES, FROM FEBRUARY TO APRIL 2004

		<i>Isolation</i>		
		<i>Positive</i>	<i>Negative</i>	<i>Total</i>
Modified Wisconsin	Positive	6 (4.3%)	133 (95.7%)	139
	Negative	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 TRES HATOS DE DIFERENTES ENTIDADES FEDERATIVAS, DE FEBRERO A ABRIL DE 2004

RELATION BETWEEN INDIRECT ELISA TEST FOR THE ANTIBODY DETECTION AGAINST *M. bovis* AND THE ISOLATION OF *M. bovis* FROM THREE HERDS OF DIFFERENT FEDERATIVE IDENTITIES, FROM FEBRUARY TO APRIL 2004

		Isolation		
		Positive	Negative	Total
Indirect ELISA	Positive	6 (4%)	143 (96%)	149
	Negative	0	72 (100%)	72
	Suspicious	0	4 (100%)	4
Total		6 (2.7%)	219 (97.3%)	225

Discussion

The subclinical mastitis recorded with the Wisconsin test (61.8%) was greater in comparison to other studies done in Mexico, like the one performed in Tres Marias, Morelos, where a prevalence that varied from 19.6 to 52.9% was found,²² or in the Complejo Agro-industrial of Tizayuca, Hidalgo, where a frequency of 20.82% was observed.²³ In the United States of America, frequencies of 48.5% have been informed in New York and Pennsylvania.²⁴

In the herd from the State of Mexico, the high subclinical mastitis percentage (80.6%) is associated with inadequate hygiene and disinfectant practices, besides incorrect handling and lack of maintenance of the milking machine. With this respect, Jaramillo *et al.*²³ found that the implementation of hygiene and disinfectant techniques contributed to lower the prevalence from 17.1% to 14.26% in two stables with different handling systems. Likewise, in that study it was informed that the incorrect handling of the milking unit, mainly from excessive milking, caused an increase in subclinical mastitis.

The positive percentage (32%) of the indirect ELISA test came out lower to the one found by Barajas *et al.*,⁸ whom observed a prevalence of 50% in a study carried out in animals from Veracruz, and of 43% according to the results of Ghadersohi *et al.* in dairy cattle in Townsville, Australia.²⁵

The percentage of obtained isolations from animals with subclinical mastitis in this study (4.3%) was greater in comparison with the percentage (0.1%)

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 (80%), se obtuvo sensibilidad de 83.3%, especificidad de 72.15%, valor predictivo positivo de 7.58% y valor predictivo negativo de 99.37%.

Al agrupar los resultados de la prueba de ELISA en rangos de 5%, se encontró que un mejor punto de corte fue igual a 100, con el cual se presentó sensibilidad de 83.3% y especificidad de 83.56%. Aun así, el valor predictivo positivo fue de 12.2% y el valor predictivo negativo de 99.46%, la proporción obtenida bajo la curva del análisis ROC fue de 0.9075 (Figura 1)

Discusión

La mastitis subclínica registrada con la prueba de Wisconsin (61.8%) fue mayor en comparación con otros estudios realizados en México, como el efectuado en Tres Marias, Morelos, donde se encontró prevalencia que varió de 19.6% a 52.9%,²² o en el Complejo Agroindustrial de Tizayuca, Hidalgo, donde se observó frecuencia de 20.82%.²³ En Estados Unidos de América, se han informado frecuencias de 48.5% en Nueva York y Pennsylvania.²⁴

En el hato del Estado de México, el alto porcentaje de mastitis subclínica (80.6%) se asocia con prácticas inadecuadas de higiene y desinfección, además del mal manejo y falta de mantenimiento de la orde-

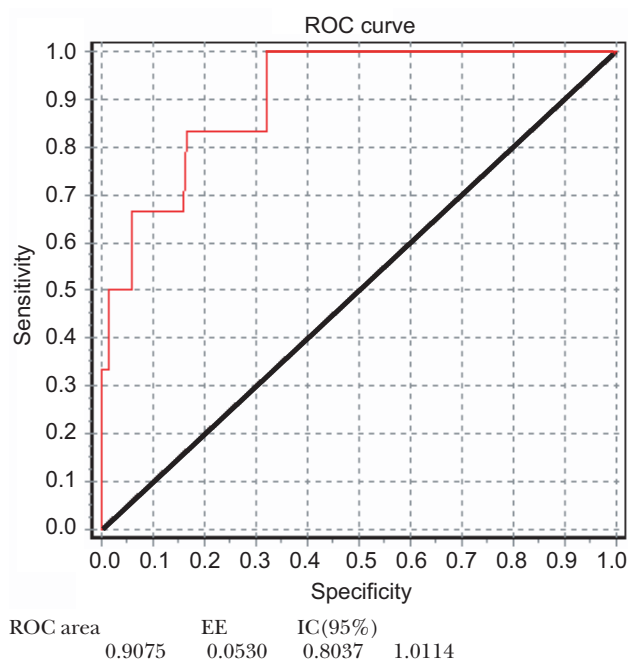


Figura 1: Curva ROC de la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA indirecta, con respecto al aislamiento de *M. bovis*.

Figure 1: Sensitivity and specificity ROC curve of indirect ELISA test, in relation to the isolation of *M. bovis*.

found by Wilson *et al.*²⁴ in 105 083 studied cows in New York and Pennsylvania, and to the percentage (1.8%) obtained by Gonzalez *et al.*²⁶ in 9 884 samples in New York; in both studies the samples came from cows with subclinical mastitis. Nevertheless, it is lower than the percentage notified (19.8%) by Ghadersohi *et al.*²⁷ in 202 milk samples from cows with subclinical mastitis in Australia. A similar percentage (19.64%) was registered by Hernandez *et al.*⁷ in 56 animals with clinical mastitis coming from the State of Mexico.

The scarce number of isolations may be related with several factors. To this respect, Nicholas and Ayling²⁸ found that in cases of chronic mastitis the use of antibiotics difficult the isolation. Miranda *et al.*²⁹ mentioned that low quantities of mycoplasmas in the sample difficult isolation. Likewise, Ghadersohi *et al.*²⁵ indicated that high titles of antibodies in milk inhibit the development of *M. bovis*, this combined with the action of the complement cause lyses of this.

The sensitivity (83.3%) and specificity (67.58%) of ELISA test for the detection of *M. bovis* mastitis, based on the cut point of the manufacturer may be considered as reasonable, this coincides with the results of Brank *et al.*¹⁴ whom elaborated an indirect ELISA test based on recombinant antigens which consists in PvsA, which allowed them to obtain a sensitive, specific and quick serological test for the detection of *M. bovis* in its different manifestations. Ghadersohi *et al.*²⁵ developed another indirect ELISA test based on

ñadora mecánica. A este respecto, Jaramillo *et al.*²³ encontraron que la instrumentación de prácticas de higiene y desinfección contribuyeron a bajar la prevalencia de 17.1% a 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 sobreordeño, provocó aumento de la prevalencia de mastitis subclínica.

El porcentaje de positividad (32%) de la prueba de ELISA indirecta resultó menor al encontrado por Barajas *et al.*,⁸ quienes observaron prevalencia de 50% en un estudio realizado con animales de Veracruz, y de 43% según los resultados de Ghadersohi *et al.* en ganado lechero de Townsville, Australia.²⁵

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 *et al.*²⁴ en 105 083 vacas estudiadas en Nueva York y Pennsylvania, y al porcentaje (1.8%) obtenido por González *et al.*²⁶ en 9 884 muestras en Nueva York; en ambos estudios las muestras provenían de vacas con mastitis subclínica. Sin embargo, es menor al porcentaje notificado (19.8%) por Ghadersohi *et al.*²⁷ en 202 muestras de leche de vacas con mastitis subclínica en Australia. Un porcentaje similar (19.64%) fue registrado por Hernández *et al.*⁷ en 56 animales con mastitis clínica provenientes del Estado de México.

El escaso número de aislamientos puede estar relacionado con diversos factores. Al respecto, Nicholas y Ayling²⁸ encontraron que en casos de mastitis crónicas el uso de antimicrobianos dificulta el aislamiento. Miranda *et al.*²⁹ mencionan que bajas cantidades de micoplasmas en la muestra dificultan el aislamiento. Asimismo, Ghadersohi *et al.*²⁵ indicaron que títulos altos de anticuerpos en la leche inhiben el desarrollo de *M. bovis*, aunado a la acción del complemento provocan lisis de éste.

La sensibilidad (83.3%) y especificidad (67.58%) de la prueba de ELISA para la detección de mastitis por *M. bovis*, con base en el punto de corte del fabricante podría considerarse razonable, ello concuerda con los resultados de Brank *et al.*,¹⁴ 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 *et al.*²⁵ 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, y en animales infectados experimentalmente mediante esponjas nasales encontraron alta especificidad y buena sensibilidad.

A través de la curva ROC, la relación entre ambas

monoclonal antibodies, to detect *M. bovis* antibodies in animal serum with clinical manifestations of mastitis and respiratory problems, and in experimentally infected animals, by means of nasal sponges, they found high specificity and good sensitivity.

Through the ROC curve, the relation between both tests was reasonably good (0.9075). The cut point could be improved, as recommended by Greenberg *et al.*³⁰ and Fletcher *et al.*,²¹ since the result kept the sensitivity, but it improved specificity (67.58% to 79%), which allowed to obtain the global measurement of the test's performance. Nevertheless, with this cut point, one of the six isolations stays negative to the test.

The predictive positive value was associated with the number of isolations; therefore, it does not mean that the test is bad, since by definition a low prevalence of the disease reflects in the same way in the positive predictive value;³¹ consequently, it would be advisable to carry out a greater number of samplings and isolations with the finality to find the best performance of the test. Ghadersohi *et al.*²⁵ carry out a similar study, but instead of isolations ELISA test was compared to the PCR technique to detect *M. bovis*. ELISA test was highly specific, sufficiently sensitive and correlation was significant among both tests (Kappa = 0.44, P = 0.0456).

PCR identification is highly sensitive, specific and quick; nevertheless, it requires equipment and specialized personnel, besides cost per sample is higher,⁸ since the diagnostic laboratories condition in the country allow to perform ELISA test easier.

Based on results of ELISA test, this could be a good alternative for the diagnosis of mastitis by *M. bovis*; nevertheless, more studies should be done with a greater number of samples that allow greater quantity of isolations, obtaining better indicators of specificity and sensitivity and predictive values. With the obtained results, sensitivity and specificity are acceptable; even with the cut point proposed in this study, one of the six isolations stays as false negative, and taking into consideration *M. bovis* capacity to disseminate in a small period of time among the herd,^{1,2,7} it is recommended to take as suspicious the samples that appear between the cut points (100%-60%), and later take new serum and milk samples to be once again analyzed with ELISA test and isolation, with the objective to confirm the diagnosis. Finally, the test could be used to detect mastitis associated with *M. bovis* in bovine cattle, particularly in herds with elevated frequency (> to 10%), with the aim to guarantee a reasonable high predictive value, or as in this case, where the frequency was of 2.66%, could be used as a screening test, in addition to the fact that ELISA technique is practical, quick and economic.

pruebas fue razonablemente buena (0.9075). El punto de corte pudo mejorarse, como lo recomiendan Greenberg *et al.*³⁰ y Fletcher *et al.*,²¹ ya que el resultado mantuvo la sensibilidad, pero se mejoró la especificidad (67.58% a 79%), lo que permitió obtener la medición global del rendimiento de la prueba. Sin embargo, con este punto de corte, uno de los seis aislamientos queda como negativo a la prueba.

El valor predictivo positivo se asoció con el número de aislamientos, por lo que no significa que la prueba sea mala, pues por definición una baja prevalencia de la enfermedad se refleja de igual manera en el valor predictivo positivo,³¹ 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 *et al.*²⁵ 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 instrumentar con mayor facilidad la prueba de ELISA.

Con base en los resultados de la prueba de ELISA, ésta podría ser buena alternativa para el diagnóstico de mastitis por *M. bovis*; sin embargo, se requiere emprender más estudios con un mayor número de muestras que permitan mayor cantidad de aislamientos, obteniendo con ello mejores indicadores de la especificidad y sensibilidad y de los valores predictivos. Con los resultados obtenidos, la sensibilidad y especificidad son aceptables; aun con el punto de corte propuesto en este estudio, uno de los seis aislamientos queda como falso negativo, 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 las muestras que queden entre los puntos de corte (100%-60%), y tomar luego nuevas muestras de suero y leche para volver a analizarlas 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%), con el 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.

Acknowledgements

Special thanks to MVZ Tatiana Chavez Heres for her support in the review of this work.

Referencias

1. Hirsh DC, Zee YC. Veterinary Microbiology. 2nd ed. USA (Massachusetts): Blackwell Science, 1999.
2. Rebhun WC, Guard C, Richards MC. Diseases of Dairy Cattle. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995.
3. Jones TC, Hunt RD. Veterinary Pathology of Domestic Animals. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1997.
4. Kirk HJ. *Mycoplasma* mastitis in Dairy Cows, The Compendium 1994; 16:541-546.
5. Gourlay RN, Thomas LH, Howar CJ. Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae* subsp bovis. Vet Rec 1976; 98:506-507.
6. Ávila S, Domínguez J, Ruiz H, Valdivieso A, 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 Buiatría; 1983 Junio 21-23; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1983:118-124.
7. Hernández AL, González GA, Campos RV, Payan RM, Jaramillo ML, Pérez DM. Reporte de un caso de mastitis provocado por *Mycoplasma bovis* en un hato lechero. Memorias del X Congreso Nacional de Buiatría; 1984 Agosto 19-22; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 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 Mexico. 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 (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.
10. 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.
11. Busnell RB. *Mycoplasma mastitis*. Vet Clin North Am (large Anim Pract) 1984; 6:301-312.
12. 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.
13. 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.
14. Brank M, Grand DL, Poumarat F, Bezille P, Rosentgarten R, Citti C. Development of a recombinant antigen of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6:861-867.

Agradecimientos

Se agradece a la MVZ Tatiana Chávez Heres su apoyo en la revisión de este trabajo.

15. Le Grand D, Poumarat F, Bezille P. Assessment of a serological ELISA test for screening of *Mycoplasma bovis* infection within livestock. FEMS Microbiol 1999; 173:103-110.
16. Nava NE. Análisis serológico de granjas porcinas tecnificadas ubicadas en tres estados de la República Mexicana con respecto a *Mycoplasma hyopneumoniae* (tesis de licenciatura.). Estado de México (México): Universidad Autónoma del Estado de México, 1987.
17. Blanco O M. Diagnóstico de mastitis subclínica bovina. Memorias de III Congreso Nacional de Mastitis y Calidad de la Leche; 2001 Junio 21-23; León (Guanajuato) México. México (DF): Consejo Nacional de Mastitis, AC, Asociación Iberoamericana de Médicos Veterinarios Especialistas en Producción Animal, 2001:7.
18. Harmon R J, Eberhart R J, Jasper D E, Langlois B E. Wilson R A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection, 3rd ed. Virginia (USA): National Mastitis Council, 1990.
19. Tully JG. Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. In: Razin S, Tully JG editors. Methods in Mycoplasma. New York: Academic Press. 1983: 355-362.
20. Hernández AL. Comparación de tres técnicas para el diagnóstico de mastitis causada por *Mycoplasma bovis* (tesis de licenciatura). Estado de México (México): Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
21. Fletcher HR, Fletcher WS, Wagner HE. Epidemiología clínica aspectos fundamentales. 2^a ed. España (Madrid): Masson-Williams & Wilkins, 1998
22. 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). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
23. Jaramillo DC. Prevalencia de mastitis en un hato lechero y su relación con las prácticas de ordeño, manejo y medicina preventiva (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1979.
24. 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.
25. Ghadersohi A, Fayazi Z, Hirst 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 Immunol Immunopathol 2005; 104,183-193.
26. Gonzalez RN, Sears PM, Merrill RA, Hayes GL. Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period 1972-1990. Cornell Vet 1992;82:9-40
27. 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; 65:85-194.
28. Nicholas RA, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. Res Vet Sci 2003; 74: 105-112.
29. Miranda MR. Patogenicidad de *Mycoplasmas* involucrados en la mastitis bovina (tesis de maestría). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
30. Greenberg RS, Flanders WD, Eley JW, Dariels SR, Boring JR. Epidemiología médica. 3ª ed. México DF: Manual Moderno, 2002.
31. Riegelman RK, Hirsch RP. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: Lectura crítica de literatura médica. 2ª ed. Washington DC: OPS-OMS, 1992.