

Mollicutes asociado a mastitis en rebaños bovinos lecheros en la provincia Zamora-Chinchipec, Ecuador



<https://cu-id.com/2248/v45e06>

Mollicutes associated with mastitis in dairy cattle herds in Zamora-Chinchipec province, Ecuador

¹Natacha Ramírez-Sanmartín¹, ²Luis Rodrigo-Saa², ³Evelyn Lobo-Rivero³,
³Anisleidy Pérez-Castillo³, ³María Irian Percedo-Abreu^{3*}

¹Universidad Nacional de Loja (UNL), Ecuador.

²Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), Ecuador.

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El crecimiento de la población mundial demanda disponibilidad de suficientes alimentos nutritivos e inoos, y la mastitis bovina es una enfermedad que aún causa grandes pérdidas económicas, además de otros riesgos a la salud de los rebaños y el público en general, pese a los avances tecnológicos y la profundización en el conocimiento de factores decisivos en su comportamiento, dependientes tanto de los hospederos, como de los patógenos involucrados y del ambiente donde su interacción tiene lugar. Para profundizar en la asociación de *Mollicutes*, en los procesos de mastitis en Zamora-Chinchipec se investigaron 386 vacas, de 99 rebaños, de las que 126 resultaron positivas (32,6 %) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en tanto 340 (88,1 %) se constataron con mastitis subclínica mediante Prueba de California para mastitis. Aunque no se evidenció *Mycoplasma bovis*, otros micoplasmas también patogénicos pudieron estar presentes y complicar la recuperación de los rebaños afectados por la reconocida resistencia de estos microorganismos a la antibioterapia tradicional, entre otros peligros. La no asociación entre los resultados de los métodos de diagnóstico empleados evidenció que otros patógenos estuvieron involucrados en el mosaico etiológico de la mastitis en la provincia y reveló la necesidad de su indispensable profundización para orientar adecuadamente las estrategias de control.

Palabras clave: *Mollicutes*, *Mycoplasma*, mastitis, PCR.

ABSTRACT: World population growth demands availability of sufficient nutritious and healthy food. Bovine mastitis is a disease that still causes great economic losses, besides other risks to the health of herds and people in general, in spite of the technological advances and the deepening of the knowledge of crucial factors in its behavior, which depend on the hosts and pathogens involved and the environment where they interact. To further research *Mollicutes* association with mastitis disease in Zamora-Chinchipec province, 386 cows from 99 herds were tested. From them, 126 were positive to *Mollicutes* (32.6 %) by Polymerase Chain Reaction (PCR), while 340 (88.1 %) were found to have subclinical mastitis by California Mastitis Test. Although *Mycoplasma bovis* was not detected, other pathogenic mycoplasmas could also be present affecting the recovery of the infected herds due to the recognized resistance of those microorganisms to the traditional antibiotic therapy, among other risks. The lack of association among the results of the diagnostic methods used showed that other pathogens were involved in mastitis etiology and revealed the need for further studies in order to adequately guide control strategies.

Key words: *Mollicutes*, *Mycoplasma*, mastitis, PCR.

INTRODUCCIÓN

La población mundial crece a un ritmo acelerado y demanda disponibilidad de suficientes alimentos nutritivos e inoos, y la mastitis bovina es una enfermedad que aún causa grandes pérdidas económicas, además de otros riesgos a la salud de los rebaños y el público en general, pese a los avances tecnológicos y la profundización en el conocimiento de factores decisivos en su comportamiento, dependientes tanto de hospederos, como de los patógenos involucrados y del ambiente donde su interacción tiene lugar (1-5).

También la mastitis constituye un problema de salud pública, porque la leche puede ser vehículo de microorganismos zoonóticos, y otros resistentes a los

antimicrobianos, que pueden diseminarse a través de la cadena alimentaria (6,7).

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) es uno de los patógenos más frecuentes en las infecciones de la glándula mamaria; responsable de episodios esporádicos de alta contagiosidad y serias pérdidas económicas en las explotaciones (8) y se considera uno de los principales patógenos emergentes del ganado bovino en países industrializados, en tanto, su diseminación se atribuye al comercio de animales (9-11). También otras especies de micoplasmas han sido reportadas en procesos de mastitis bovina, como *M. californicum*, *M. bovigenitalium*, *M. alkalescens*, *M. bovirhinis* y *M. dispar* (12-14).

*Correspondencia a: María Irian Percedo-Abreu. E-mail: percedo.mi@gmail.com

Recibido: 18/06/2023

Aceptado: 11/07/2023

En Zamora-Chinchipe, Ecuador, fue reportado por primera vez *Mollicutes* en leche de tanque de rebaños bovinos (15), por lo que se precisa profundizar acerca de su asociación con los procesos de mastitis bovina que afectan con significativo impacto económico a los productores de esa provincia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador, con una superficie de 10 556 Km² y políticamente dividida en nueve cantones: Zamora, Chinchipe, Nangaritza, Yacuambi, Yantzaza, El Pangui, Palanda, Paquisha y Centinela del Cóndor. La temperatura promedio oscila entre los 18 y 22°C; la humedad relativa alcanza hasta un 92% (Gobierno Provincial de Zamora Chinchipe, 2010).

Selección de rebaños para el estudio

El número de rebaños seleccionados para el estudio se determinó mediante el programa EpiData (16). Se asumió una prevalencia de 50%, debido a la falta de conocimiento *a priori* sobre la prevalencia en la región, con un intervalo de confianza de 95% y una precisión de 10%. La prevalencia se calculó a través de una aproximación Bayesiana basado en la distribución Beta, beta (s + 1; n-s + 1), donde: s = positivos; n = número de fincas testadas.

Se realizó una zonificación en bloques de 25 km² de la provincia, de acuerdo con sus condiciones ecológicas (conglomerados). En cada uno se seleccionó aleatoriamente la cantidad de fincas a muestrear del total en existencia (15,17).

Como criterios de inclusión en el estudio se consideró que las fincas tuvieran el consentimiento de sus propietarios para participar en el estudio y que abastecieran de leche cruda el centro de acopio. Las que no cumplían con estos criterios no se incluyeron.

Determinación de *Mollicutes* en muestras de leche

De las vacas en ordeño, en los rebaños seleccionados, se colectó en tubos estériles un pool de 10mL de leche proveniente de todos sus cuartos, previa su limpieza exhaustiva y la desinfección con etanol al 70 % de las puntas de los pezones, en tanto los primeros chorros de leche se descartaron (18). Los muestreos

se realizaron en el período comprendido entre 2015 y 2016.

Diagnóstico de *Mycoplasma* spp.

Todas las muestras de leche colectadas se refrigeraron (2-8 °C) para su traslado al Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis, de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se conservaron a 4°C para posteriores análisis.

El diagnóstico de *Mycoplasma* spp. se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en MYCOLAB (Laboratorio Acreditado por la ISO/IEC: 17025, y de Referencia de la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) para el diagnóstico de *Mycoplasmas*), del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba.

Extracción de ADN a partir de muestras de leche

La muestra de leche se centrifugó (3000 rpm por 10 minutos) y el sobrenadante se decantó. Posteriormente se tomaron 50 µL del sedimento y se le adicionó 200 µL de buffer de ruptura (Tris HCl, 0,1M, pH 8,5, Tween 20, 0,05% y proteinasa K 0,24mg/mL). La mezcla se incubó durante 1 hora a 60 °C y luego de ese periodo se incubó a 95°C durante 15 minutos con el objetivo de lograr la desnaturalización del ADN (19).

Diagnóstico de *Mollicutes*

Para la determinación de *Mollicutes* por PCR, se utilizó una pareja de cebadores (MGSO y GPO-1), que amplifican un fragmento de 270 pb correspondiente a la región conservada del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) (20) (Tabla 1). Los cebadores se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba. Como control positivo se utilizó ADN de *Mycoplasma arginini*.

Preparación de la mezcla, condiciones de corrida y visualización de los PCR

La preparación de la mezcla para la amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL. Esta mezcla se compuso de 5 µL del ADN de la muestra, 1,5µL de cada cebador (20 pmoles) y 17 µL de Master mix (Promega). Las reacciones se desarrollaron en un equipo Termociclador de ADN REACTOR ThermoHyBaid™, con el empleo del programa de amplifi-

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en la amplificación de un fragmento del ARNr 16S de la clase *Mollicutes*. / Nucleotide sequence of the primers used in the amplification of a 16S rRNA fragment of the class *Mollicutes*.

Cebador	Secuencia	Producto	Referencia
GPO-3	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	270 pb	Van Kuppeveld y col., 1998
MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'		

cación específico para cada cebador, según lo descrito por los autores antes mencionados.

Los productos de PCR se aplicaron en gel de agarosa al 2 % (v/v). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EE.UU.). El gel se tiñó con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos y los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Diagnóstico de *Mycoplasma bovis*

El diagnóstico de *M. bovis* se realizó a las muestras que resultaron previamente positivas a *Mollicutes*. Se utilizaron los cebadores MboF y MboR que amplifican un segmento 360 pb del gen que codifica para el ARNr 16S (21) (Tabla 2). Como control positivo se utilizó ADN de *M. bovis* (cepa Donetta Pg45 de *M. bovis* ATCC 25524). La preparación de la mezcla, condiciones de corrida y visualización del PCR se realizó como se describe anteriormente para la clase *Mollicutes*.

Prueba de California para mastitis

Luego del despunte del pezón se depositó un pool de 2 ml de leche de todos los cuartos en los pocillos de la paleta indicada para esta prueba, a los que se agregó igual volumen del reactivo para la Prueba de California para Mastitis (CMT, de sus siglas en inglés, Lauril sulfato de sodio al 4% Diagnóstico Mastitis Nocar, Medick). Se homogenizó la muestra con movimientos circulares por un tiempo aproximado de 10 a 20 segundos, e inmediatamente se interpretaron los resultados de acuerdo al grado de gelificación observado en la mezcla (22).

Se consideró como resultado negativo (-) cuando no hubo formación de gel. Mastitis subclínica grado 1 (+) o débilmente positiva, cuando en el fondo de la paleta se formó el gel que desapareció rápidamente. Mastitis subclínica grado 2 (++) o positiva, cuando hubo presencia de grumos consolidados. Mastitis subclínica grado 3 (+++) o muy positiva, cuando se formó un gel robusto que no desapareció al dejar de girar la paleta.

Análisis estadístico

Mediante comparación de proporciones (23) se analizaron los resultados del diagnóstico de *Mollicutes* y a CMT en vacas por cantones y las frecuencias de los diferentes patógenos identificados en las vacas positivas a *Mollicutes*. A través de Chi Cuadrado se evaluó la relación entre los resultados del diagnóstico

de *Mollicutes* y CMT, así como con los patógenos identificados en el estudio bacteriológico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se investigaron 386 muestras de leche de vacas individuales, de 99 rebaños distribuidos en los 10 cantones de la provincia Zamora-Chinchipe; 126 resultaron positivas a *Mollicutes* (32,6 %) (Tabla 3). La Figura 1 muestra el resultado del PCR para la detección de mollicutes en muestras de leche.

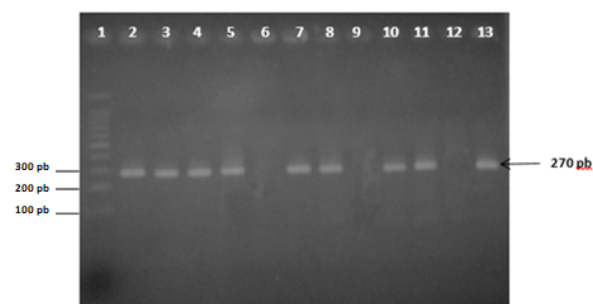


Figura 1. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2 %. Línea 1: Patrón de peso molecular 100 pb (Promega), líneas 2-11: muestras en estudio, línea 12: control negativo PBS; línea 13: control positivo, ADN de *Mycoplasma arginini*. / *Electrophoresis of PCR products at 2 % agarose gel. Lane 1: 100 bp molecular weight marker (Promega), lanes 2-11: test samples, lane 12: PBS negative control; lane 13: positive control, Mycoplasma arginini DNA.*

A CMT resultaron positivas con una, dos o tres cruces, 75 (19.4%), 232 (60.1%) y 33 (8.5%) vacas respectivamente; solo 46 (11.9%) fueron negativas (Tabla 3).

Prácticamente no existen diferencias entre cantones respecto a los resultados de la Prueba de California, y en cuanto al diagnóstico de mollicutes, solo Palanda con todas sus muestras positivas (4/4), difiere del resto de los cantones.

En sentido general es elevada la frecuencia de vacas cuyas muestras de leche resultaron positivas a ambos métodos de diagnósticos, 32,6 % positivas a mollicutes y 88,1% a CMT, en alguna de las categorías. Estos resultados son más desfavorables respecto a otros reportados en Ecuador, tanto para la provincia El Oro, con una prevalencia de 11,6 % de mastitis clínica moderada y 60% de mastitis subclínica (24), así como para la provincia del Cañar - Biblián, donde la prevalencia de mastitis subclínica en vacas y hatos ganaderos, fue de 9,1 y 56,5 %, respectivamente (25).

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en la amplificación de un fragmento del ARNr 16S de *Mycoplasma bovis*. / *Nucleotide sequence of the primers used in the amplification of a 16S rRNA fragment of Mycoplasma bovis.*

Micoplasma	Cebador	Secuencia	Producto	Diana	Referencia
<i>M. bovis</i>	MboF	5'- GGC TCT CAT TAA GAA TGT C - 3'	360 pb	uvrC gen	Hotzel y col., 1996
	MboR	5'- TTT TAG CTC TTT TTG AAC AAA T - 3'			

Tabla 3. Resultados de la Prueba de California y el diagnóstico de *Mollicutes* en vacas de rebaños lecheros en cantones de la provincia Zamora-Chinchipe. / California test results and *Mollicutes* diagnosis in cows from dairy herds in cantons of the Zamora-Chinchipe province.

Cantones	Total	Prueba California				<i>Mollicutes</i>		
		Neg.	+	++	+++	Total Post.	Posit.	Neg.
Centinela del Cóndor	70	0	38 (54,3)	32 (45,7)	0	70 (18,1) ^a	20 (28,6) ^b	50 (71,4)
Paquisha	8	2 (25,0)	0	6 (75,0)	0	6 (1,6) ^{abc}	0	8 (100,0)
Nangaritzza	77	8 (10,4)	23 (29,9)	43 (55,8)	3 (3,9)	69 (17,9) ^b	30 (39,0) ^b	47 (61,0)
Zumba	6	0	5 (83,3)	1 (16,7)	0	6 (1,6) ^a	0	6 (100,0)
Zamora	37	8 (21,6)	2 (5,4)	23 (62,2)	4 (10,8)	29 (7,5) ^c	15 (40,5) ^b	22 (59,5)
Chinchipe	6	2 (33,3)	0	4 (66,7)	0	4 (1,0) ^{abc}	3 (50,0) ^b	3 (50,0)
Yacuambi	21	1 (4,8)	3 (14,3)	16 (66,2)	1 (4,8)	20 (5,2) ^{ab}	6 (28,6) ^b	15 (71,4)
Palanda	4	0	2 (50,0)	2 (50,0)	0	4 (1,0) ^a	4 (100,0) ^a	0
El Pangui	2	0	2 (100,0)	0	0	2 (0,5) ^a	0	2 (100,0)
Yantzatzza	155	25 (16,1)	0	105 (67,7)	25 (16,1)	130 (33,7) ^c	48 (31,0) ^b	107 (69,0)
Total	386	46 (11,9)	75 (19,4)	232 (60,1)	33 (8,5)	340 (88,1)	126 (32,6)	260 (67,4)

Pese al elevado porcentaje de vacas positivas a mollicutes y CMT, no se encontró asociación entre los resultados de ambos diagnósticos en vacas mediante Chi Cuadrado ($p < 0,05$), posiblemente porque muchos animales positivos a CMT están infectados por otros patógenos. Aunque no se pueden descartar resultados falsos negativos a mollicutes, pues el porcentaje de infección a nivel de los rebaños y la intermitencia en la excreción de esos microorganismos puede incidir en un resultado negativo en el momento de la toma de muestra (26,27).

Se destaca que todas las vacas positivas a mollicutes resultaron negativas a *M. bovis*, al igual que las muestras de leche de tanque de los rebaños que se investigaron previamente en la provincia (15).

Se ha señalado que la participación de *Mycoplasma* spp. puede ser como agente secundario que exacerba las infecciones preexistentes, o incluso como agente primario, que después facilita la infección con otros patógenos frecuentes en los cuadros de mastitis bovina (14).

Aunque *M. bovis* se considera uno de los agentes más importantes asociados a mastitis y además es la especie del género que se aísla con mayor frecuencia, otras especies le siguen en relevancia, como son *M. alkalescens*, *M. californicum*, *M. bovisgenitalium*, *M. arginini*, *M. bovirhinis* y *M. dispar* (12,13,28). *Mycoplasma primatum* también se aisló de una muestra de leche de un cuarto con mastitis clínica (28).

También otras especies como *M. leachii*, *M. dispar* y *M. canadense* no deben subestimarse como causa importante de enfermedad (29). A su vez, la co-infección de *M. bovis* con *M. bovisgenitalium*, *M. alkalescens*, *M. canadense* y *M. arginini* en los mismos rebaños se señala como una observación interesante, que requiere de más investigación para determinar si tienen o no influencia directa en la salud de la glándula mamaria (28).

En Sao Paulo se encontró un 16.4% (11/67) de rebaños positivos a mollicutes; solo uno fue positivo a *M. bovis* y no se descartó la participación de otras especies de micoplasmas que pueden causar mastitis, como *Mycoplasma alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovisgenitalium*, *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. dispar*, así como mollicutes como *Acholeplasma* spp. (principalmente *A. laidlawii* e *A. axanthum*) (30).

Mollicutes se reportó por primera vez en Río de Janeiro en el 2021; en el 21% de rebaños (4/19) y 4% de las vacas (16/387), de estas el 1% (5/387) fueron positivas a *M. bovis* y el 3% (11/387) a *M. arginini*. En Minas Gerais, Río de Janeiro y São Paulo solo se identificó *M. arginini* (31).

También en Brasil, estado de Paraná, la positividad para *M. bovis* fue del 3,78% en muestras de leche de vacas con mastitis, así como en el 20% de hisopos nasales de terneros saludables, pero hijos de vacas con mastitis, por lo que se destaca a ese microorganismo como parte de la microbiota pulmonar de los terneros. Además, se especula sobre la participación de otras especies de micoplasmas, pues se constató 17.84% de casos de mastitis positivos a *Mollicutes*, en tanto solo el 3.78% lo fue a *M. bovis* (13).

También en Brasil, en un estudio de 1166 muestras de leche de vacas con mastitis clínica, el 8.6% (100/1166) resultó positiva a mollicutes, en tanto por PCR se constató *M. bovis* en el 1.1% (13/1166) y el 0.9% (11/1166) por PCR en tiempo real, y se señaló la necesidad de profundizar en el conocimiento de otras especies de micoplasmas involucradas (32).

En el Altiplano Boyacense de Colombia no se detectó *M. bovis* en muestras de leche de tanque (33).

En el sur de Chile se aisló *M. bovis* y *M. bovisgenitalium* en leche de tanque, y de una vaca individual *M. alkalescens*, y se destaca el riesgo potencial para los rebaños lecheros de estas dos últimas especies (34).

La frecuencia de muestras de leche positivas a mollicutes en todos los cantones, en leche de tanque o de vacas individuales, revela la importancia que pueden tener en los procesos de mastitis observados en la provincia. Incluso en rebaños que resultaron negativos en leche de tanque, como en Chinchipe y Palanda (15), la confirmación en ellos de vacas positivas puede tener relación con el periodo de excreción del patógeno, lo que puede contribuir a subestimar su presencia en los rebaños (26, 27).

Si bien la frecuencia de vacas positivas a mollicutes resultó elevada (32,6%), el porcentaje con mastitis subclínica fue mayor (88,1%), con 68,6% de vacas afectadas con dos o tres cruces a CMT, un indicativo de la complejidad que puede tener el mosaico etiológico de la enfermedad en los rebaños investigados.

Así, se recomienda investigar la colonización intramamaria de *Mollicutes* en los rebaños porque puede ser un factor que complique los procesos de mastitis, debido a la posible interacción sinérgica con otros micoplasmas y otros microorganismos, además de ocasionar otras enfermedades en los bovinos (31).

Los micoplasmas se relacionan con una amplia gama de trastornos, como enfermedades respiratorias, artritis, abscesos subcutáneos, queratoconjuntivitis, meningitis, infertilidad y otitis, y el creciente número de países que lo reportan desde hace algunos años es una alerta de su carácter emergente para la ganadería bovina, particularmente en países industrializados donde el tamaño de los rebaños está en aumento (9-11).

Los terneros con procesos respiratorios por micoplasmas pueden ser el origen de una nueva cadena de infección en un rebaño, así como los que se alimentan con leche de madres infectadas, pues pueden mostrar la infección después que se incorporan a la reproducción (35,36). Por ello, la existencia en los rebaños de grupos de animales de diferente edad en contacto se considera un factor de riesgo para las mastitis por micoplasmas (1).

En la transmisión de esos microorganismos tienen importancia los aerosoles, las secreciones de los animales con trastornos respiratorios y la vía genital (37,38). En el ambiente contaminado con el patógeno, este puede sobrevivir fuera del animal durante largos periodos de tiempo en estiércol, agua, arena y distintos materiales de cama, y las condiciones frías y húmedas aumentan su incidencia al favorecer la viabilidad del agente (12).

La presencia de micoplasmas en muestras de leche de tanque y de vacas individuales en los rebaños estudiados reviste especial importancia y tiene un impacto práctico en el control de esta enfermedad, pues para minimizar el riesgo de diseminación de la infección se deben identificar y controlar todos los factores de riesgo (11), porque los micoplasmas tampoco son sensibles a los antimicrobianos comunes.

Por carecer de pared celular, los micoplasmas no son sensibles a los antimicrobianos β -lactámicos, y

también son intrínsecamente resistentes a las sulfonamidas, porque tampoco sintetizan ácido fólico; solo son generalmente susceptibles a las drogas que interfieren con la síntesis de proteínas (tetraciclinas, macrólidos, lincosamidos y florfenicol) o la síntesis de ADN (fluoroquinolonas) (39).

Como los micoplasmas son prácticamente intratables, se recomienda intentar la eliminación de los casos mediante el sacrificio, atendiendo a lo poco exitoso del tratamiento y el riesgo de los portadores asintomáticos del patógeno desde edades tempranas (40). Por ello la diseminación de *M. bovis* que se constata en la ganadería bovina de casi todos los países ha incentivado la obtención de vacunas que aún no están disponibles (41).

Por todo lo expuesto es indispensable profundizar en la etiología de la mastitis asociada a *Mollicutes*, y la identificación de las especies involucradas en Zamora-Chinchipe, por la repercusión económica que tiene la enfermedad en los productores del territorio y la necesidad de orientar adecuadamente las estrategias de control.

CONCLUSIONES

Se constató alta frecuencia de muestras de leche de vacas individuales positivas a *Mollicutes* (32,6%), también con elevada presencia de mastitis subclínica (88,1%) en los rebaños estudiados de la provincia, lo que sugiere la participación de otros patógenos. Aunque no se confirmó presencia de *M. bovis*, se conocen otras especies del género que también son patogénicas y difíciles de controlar. Por ello es importante continuar las investigaciones para identificar las especies de micoplasmas involucrados, así como otros patógenos asociados a la enfermedad en la provincia.

REFERENCIAS

1. Zadoks RN, Middleton JR, McDougal S, Katholm J, Schukken YH. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16:357-372. DOI 10.1007/s10911-011-9236-y
2. Boboš S, Radinović M, Vidic' B, Pajic' M, Vidic' V, Galfi A. Mastitis therapy: Direct and indirect costs. *Biotechnol. Anim. Husb.* 2013; 29, 269-275
3. Hertl J, Shukken Y, Bar D, Bennett G, González R, Rauch B, et al. The effect of recurrent episodes of clinical mastitis caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organism on mortality and culling in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2011; 94:4863-4877.
4. Fernandes I, Guimaraes NR, Noyes LS, Caixeta VS. Effect of subclinical mastitis detected in the first month of lactation on somatic cell count linear scores, milk yield, fertility, and culling of

- dairy cows in certified organic herds, *Journal of Dairy Science*. 2021; 104 (2): 2140-2150. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19153>.
5. da Silva Bomfim BV, Costa Balieiro A, Messias de Souza Ferreira da Costa AC, Teles Romeiro E, de Souza Franco E, Menezes Wanderley ML et al. Factores de riesgo asociados a la mastitis bovina. *Rev. Ibero-Am. de Hum., Ciências e Educ. São Paulo*. 2023; 9(3). REASE. <http://doi.org/10.51891/rease.v9i3.8958>
 6. Awandkar SP, Kulkarni MB, Khode NV. Bacteria from bovine clinical mastitis showed multiple drug resistance. *Veterinary Research Communications*. 2022; 46(1), 147-158.
 7. Paramasivam R, Raj Gopal D, Dhandapani R, Subbarayalu R, Prabu Elangovan M y col. Is AMR in Dairy Products a Threat to Human Health? An Updated Review on the Origin, Prevention, Treatment, and Economic Impacts of Subclinical Mastitis. *Infection and Drug Resistance*. 2023; 16.
 8. Dhakal K, Tiezzi F, Clay JS, Maltecca C. Causal relationships between clinical mastitis events, milk yields and lactation persistency in US Holsteins. *Livestock Science*. 2016; 189, 8-16.
 9. Citti C, Blanchard A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*. 2013; 21(4):196-203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
 10. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci*. 2017; 100:10381-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
 11. Haapala V, Vähänikkilä N, Kulkas L, Tuunainen E, Pohjanvirta T, Autio T, et al. *Mycoplasma bovis* infection in dairy herds-Risk factors and effect of control measures. *J. Dairy Sci*. 2021; 104:2254-2265 <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18814>
 12. Justice-Allen A, Trujillo J, Goodell G, Wilson D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. *J Dairy Sci*. 2011; 94:34113419
 13. Adorno, BMV, Salina A, Joaquim SF, Guimarães FF, Lopes BC, Menozzi BD, Langoni H. Presença de Mollicutes e *Mycoplasma bovis* em Swabs Nasais de bezerros e na secreção mastítica de vacas *Vet. e Zootec*. 2021; 28: 001-009. ISSN Eletrônico 2178-3764
 14. Deeney AS, Collins R, Ridley AM. Identification of *Mycoplasma* species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005-2019. *BMC Veterinary Research*. 2021; 17(1):1-12.
 15. Ramírez-Sanmartín N, Luis Rodrigo-Saa, Percedo-Abreu MI, Pérez Castillo A, Lobo-Rivero E. Detección de Mollicutes en leche de tanques procedentes de la provincia Zamora-Chinchi, Ecuador. *Rev. Salud Anim*. 2017; 39(3)
 16. Hervada Vidal X, Naveira Barbeito G, Santiago Pérez MI, Mujica Lengua ÓJ, Vázquez Fernández E, Manrique Hernández R et al. Epidat: programa para análisis epidemiológico de datos. Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España, Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS), 2016. Universidad CES, Colombia.
 17. Saa LR, Perea A, García-Bocanegra I, Arenas AJ, Jara DV, Ramos R, Carbonero A. Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod*. 2012; 44:645-649. DOI [10.1007/s11250-011-9948-4](https://doi.org/10.1007/s11250-011-9948-4)
 18. National Mastitis Council (NMC). *Golbal Milk Quality. Procedures for Collecting Milk Samples*. 2014; <http://www.nmconline.org/sampling.htm>
 19. Rossetti B, Frey J, Pilo P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Mol Cell Probes*. 2010; 24:321-323.
 20. Van Kuppeveld FJM, Johansson KE, Galama JMD, Kissing J, Bölske G, van der Logt JTM et al. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied Environment Microbiol*. 1998; 60:149-152.
 21. Hotzel H, Heller M, Sachse K, Pfützner H. Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*. 1996; 13:175e8
 22. Blowey R, Edmondson P. Somatic cell count. *Mastitis Control in dairy herds*, (Ed. 2). 2010; 152-170.
 23. Castillo Duvergel Y, Miranda I. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Rev. Protección Veg*. 2014; 29(3): 231-234
 24. Amer S, Gálvez FLA, Fukuda Y, Tada C, Ludeña IL, Valle WFM, Nakai Y. Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *J. Vet. Med. Sci*. 2018; 80(6):861-868. DOI:[10.1292/jvms.17-0504](https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504)
 25. Cuenca M, García D, Reinoso L, González J, Torracchi J. Detección de Mastitis Subclínica Bovina y factores asociados, en fincas lecheras de la Provincia del Cañar--Biblián, Ecuador. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 2021; 31(3), 93-98.<https://doi.org/10.52973/rcfcv-luz313.art3>
 26. Wilson DJ, Skirpstunas RT, Trujillo JD, Cavende KB, Bagley CV, Harding RL. Unusual history

- and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first lactation cows in a closed commercial dairy herd. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230:1519-1523.
27. Kruze J, Mella A. First bovine clinical mastitis outbreak in a large dairy herd in Chile caused by the environmental algae *P. zopfii*. In Proc XXVI World Buiatrics Congress. 2011
 28. Gioia G, Addis MF, Santisteban C, Gross B, Nydam DB, Sipka AS et al. Mycoplasma species isolated from bovine milk collected from US dairy herds between 2016 and 2019. *J. Dairy Sci.* 2020; 104:4813-4821. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19171>
 29. Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med.* 2018; 32:1241-1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>
 30. Manzi MP, Joaquim SF, Guimarães FF, Bruder-Nascimento ACMO, Pantoja JC, Langoni H. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. *Pesq. Vet. Bras.* 2018; 38(4):665-669. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5192
 31. Nunes de Moraes AC, Regis Pires D, Costa da Cunha N, dos Santos Machado L, Abdalla Helayel M, Monteiro de Mendonça JF et al. Risk factors associated with intramammary colonization with Mollicutes in dairy cattle from Southeast Brazil. *Ciência Rural, Santa Maria.* 2021; 51:8 <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200694>
 32. Salina A, Timenetsky J, Barbosa MS, Azevedo CM, Langoni H. Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis. *Pesq. Vet. Bras.* 2020; 40(2):82-87.
 33. Andrade-Becerra, R. J., Caro-Carvajal, Z., Pulido-Medellín, M., López-Cepeda, M. Prevalencia de *Mycoplasma* spp., en fincas lecheras del Altiplano Boyacense (Colombia). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica.* 2014; 17(2), 461-466.
 34. Ulloa, F., Soto, J.P., Kruzea, J., Mella, A. Mycoplasma isolation in milk samples from dairy herds in Chile. *Austral J Vet Sci.* 2021; 53:109-113
 35. Maunsell F, Donovan A. *Mycoplasma bovis* Infections in young calves. *Vet Clin Food Anim.* 2009; 25:139-177.
 36. Hazelton MS, Morton JM, Parker AM, Bosward KL, Sheehy A, Dwyer CJ, et al. Mycoplasma bovis and other Mollicutes in replacement dairy heifers from Mycoplasma bovis-infected and uninfected herds: A 2-year longitudinal study. *J. Dairy Sci.* 2020; 103:11844-11856. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18921>
 37. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 2006; 89:1877-1895.
 38. De Schutter L. *Mycoplasma bovis* als veroorzaker van acute uierontsteking. Epidemiologisch onderzoek op 2 positieve melk veebedrijf en Katholieke Hogeschool Kempen, Campus Geel, Belgium. 2010
 39. Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED. *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:772-783
 40. Fujimoto Y, Ito H, Higuchi H, Ohno H, Makita K. A case-control study of herd- and cow-level risk factors associated with an outbreak of Mycoplasma mastitis in Nemuro, Japan. *Preventive Veterinary Medicine.* 2020; 177, 104946. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104946>
 41. Dudek, K.; Szacawa, E.; Nicholas, R.A.J. Recent Developments in Vaccines for Bovine Mycoplasmoses Caused by Mycoplasma bovis and Mycoplasma mycoides subsp. mycoides. *Vaccines.* 2021, 9, 549. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060549>

Declaración de conflicto de intereses. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores. Natacha Ramírez Sanmartín: **Análisis Formal, Investigación, Metodología, Visualización, Redacción-Borrador Original, Redacción-Revisión y Edición.** Luis Rodrigo Saa: **Análisis Formal, Investigación, Metodología, Visualización y Revisión.** Evelyn Lobo Rivero: **Investigación, Metodología.** Anisleidys Pérez Castillo: **Investigación, Metodología.** María Irian Percedo-Abreu: **Conceptualización, Análisis Formal, Investigación, Metodología, Supervisión, Visualización, Redacción-Borrador Original, Redacción-Revisión y Edición.** Todos los autores participaron en la discusión de los resultados, leyeron, revisaron y aprobaron el texto final.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)