



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Implicación del Semental Caprino en la
Agalaxia Contagiosa:
Epidemiología Descriptiva y Molecular

D. Ángel Gómez Martín
2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Veterinaria

**IMPLICACIÓN DEL SEMENTAL CAPRINO
EN LA AGALAXIA CONTAGIOSA:
EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y
MOLECULAR**

Memoria presentada por
D. Ángel Gómez Martín
para optar al grado de
Doctor en Veterinaria

2015

A los ganaderos y ganaderas de ovino y caprino,
A sus familias.

La presente memoria de Tesis doctoral se presenta bajo la modalidad de compendio de publicaciones y opta a la mención de “Doctor Internacional” de acuerdo con la normativa de doctorado de la Universidad de Murcia. Los artículos internacionales publicados que constituyen el cuerpo de la Tesis Doctoral son los siguientes:

Autores: **Gómez-Martín, A.**, Amores, J., Paterna, A., De la Fe, C.
Título: Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control
Revista: The Veterinary Journal 198
Fecha de publicación: Abril 2013
Volumen: 198
Páginas: 48-56
Categoría del Journal of Citation Report (2013): Veterinary Sciences.
Índice de impacto: 2,165
Posición: 11 de 132
Índice impacto últimos cinco años: 2,165
Dirección url: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759248

Autores: **Gómez-Marín, A.**, De la Fe, C., Amores, J., Sánchez, A., Contreras, A., Paterna, A., Buendía, A., Corrales, J.C
Título: Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers
Revista: Veterinary Microbiology
Fecha de publicación: Enero 2012
Volumen:157
Páginas: 355-362
Categoría del Journal of Citation Report (2013): Veterinary Sciences
Índice de impacto: 2,726
Posición: 3 de 132
Índice impacto últimos cinco años: 3,123
Dirección url: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22284907

Autores: **Gómez-Martín, A.**, Corrales, J.C., Amores, J., Sánchez, A., Contreras, A., Paterna, A., De la Fe, C
Título: Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen
Revista: Theriogenology
Fecha de publicación: Abril 2012
Volumen: 77
Páginas: 1252-1256
Categoría del Journal of Citation Report (2013): Veterinary Sciences
Índice de impacto: 1,845
Posición: 16 de 132
Índice impacto últimos cinco años: 2,146
Dirección url: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115814

Autores: **Gómez-Martín, A.**, Sánchez, A., Amores, J., Corrales, J., Contreras, A., De la Fe, C
Título: Effect of marbofloxacin on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks
Revista: Small Ruminant Research
Fecha de publicación: Noviembre 2012
Volumen: 112
Páginas: 186-190
Categoría del Journal of Citation Report (2013): *Agriculture, Dairy and animal Science*
Índice de impacto: 1,099
Posición: 18 de 52
Índice impacto últimos cinco años: 1,342
Dirección url: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448812004592

Autores: **Gómez-Martín, A.**, Uc, N., Vieira, L., Gadea, J., Cádenas, J., Sánchez, A., De la Fe, C
Título: Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality
Revista: Theriogenology
Fecha de publicación: Noviembre 2014
Volumen: 83
Páginas: 911-919
Categoría del Journal of Citation Report (2013): Veterinary Sciences
Índice de impacto: 1,845
Posición: 16 de 132
Índice impacto últimos cinco años: 2,146
Dirección url: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25543157

En la presente Tesis Doctoral consta también un artículo científico de índole nacional:

Autores: **Gómez-Martín, A.**, Vieira, L., De Ondiz, A., Paterna, A., Gadea, J., De la FE, C
Título: Evaluación de la viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales caprinas para el desarrollo de un modelo de contaminación experimental con *Mycoplasma* spp
Revista: Anales de Veterinaria.
Fecha de publicación: 2012
Volumen: 28
Páginas: 129-139
I.S.S.N.: 0213-5434
Dirección url: <http://revistas.um.es/analesvet/article/view/188791>

I. TRABAJOS PUBLICADOS	1
I.1 Estudio 1. Agalaxia contagiosa debida a <i>Mycoplasma</i> spp. en pequeños rumiantes lecheros: Epidemiología y perspectivas para su diagnóstico y control.	2
I.2 Estudio 2. Localización anatómica de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> y <i>Mycoplasma agalactiae</i> en sementales caprinos portadores auriculares infectados de modo natural.	3
I.3 Estudio 3. Control de la agalaxia contagiosa en centros caprinos de inseminación artificial y detección de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> en el semen.	4
I.4 Estudio 4. Efecto de la marbofloxacina sobre el estado de portador y calidad espermática de sementales caprinos.	5
I.5 Estudio 5. Evaluación de la viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales caprinas para el desarrollo de un modelo de contaminación experimental con <i>Mycoplasma</i> spp.	6
I.6 Estudio 6. Capacidad de supervivencia de <i>Mycoplasma agalactiae</i> y <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp <i>capri</i> en el semen diluido de machos cabríos y su efecto en la calidad del esperma.	7
I.7 Study 1. Contagious agalactia due to <i>Mycoplasma</i> spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control.	8
I.8 Study 2. Anatomic location of <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> and <i>Mycoplasma agalactiae</i> in naturally infected goat male auricular carriers.	9
I.9 Study 3. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of <i>Mycoplasma mycoides</i> subspecies <i>capri</i> in semen.	10
I.10 Study 4. Effect of marbofloxacina on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks.	11
I.11 Study 5. Goat model for experimental mycoplasma contamination of semen: preliminary results.	12
I.12 Study 6. Survival capacity of <i>Mycoplasma agalactiae</i> and <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp <i>capri</i> in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality.	13

	Índice
II. RESUMEN	14
II.1 Objetivos	17
II.2 Conclusiones.	19
III. SUMMARY	21
III.1 Objectives	24
III.8 Conclusions	26
IV. APÉNDICES	28
IV.1 Cartas de aceptación de los trabajos que forman la Tesis Doctoral.	29
IV.2 Justificación documentada de la importancia e índice de impacto de las publicaciones presentadas	35
IV.3 Declaraciones de los coautores de los trabajos publicados.	37
IV.4 Trabajos en fase de publicación.	43
IV.4.1 Evaluation of the best samples to detect asymptomatic carriers of contagious caprine agalactia in endemic areas.	43
IV.4.1 Study of the genetic variability in goat strains of <i>Mycoplasma agalactiae</i> in the southeast of Spain by MLST.	44
IV.5 Comunicaciones a congresos derivadas de la presente Tesis Doctoral.	45
V. ABREVIATURAS	48
VI. AGRADECIMIENTOS	50

I. TRABAJOS PUBLICADOS

I.1. Estudio 1. Agalaxia contagiosa debida a *Mycoplasma* spp. en pequeños rumiantes lecheros: Epidemiología y perspectivas para su diagnóstico y control.

La agalaxia contagiosa (AC) es una enfermedad de los pequeños rumiantes lecheros que tiene un impacto económico y social elevado para la industria lechera ovina y caprina. El principal agente etiológico de la enfermedad es *Mycoplasma agalactiae*, si bien *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens* también participan en su etiología. Existen dos situaciones clínico-epidemiológicas de la AC; rebaños que manifiestan brotes clínicos o rebaños crónicamente infectados donde existe una elevada incidencia de mamitis subclínicas y casos puntuales de mamitis clínicas. La complejidad epidemiológica de la AC está relacionada con las características genéticas y mecanismos de variabilidad molecular de las especies de *Mycoplasmas* spp. involucradas. Además, es necesario tener en cuenta la presencia de estos agentes etiológicos en rumiantes silvestres y las consecuencias derivadas de la interacción entre éstos y los rumiantes domésticos. En cabras domésticas, la situación es particularmente compleja por la elevada presencia de portadores asintomáticos en rebaños crónicamente infectados. La coexistencia de otras especies de micoplasmas no patógenos en los rebaños complica aún más el diagnóstico de la AC y el diseño de estrategias eficientes para controlar la enfermedad. Rutas de infección, como la venérea, pueden estar involucradas en el establecimiento de infecciones crónicas en los rebaños. Los retos actuales que plantea el control de la infección incluyen la necesidad de mejorar los métodos de diagnóstico para la detección de las infecciones crónicas y subclínicas y el diseño de vacunas más efectivas.

I.2 Estudio 2. Localización anatómica de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* y *Mycoplasma agalactiae* en sementales caprinos portadores auriculares infectados de modo natural.

Este estudio evalúa si los sementales caprinos portadores auriculares asintomáticos de *Mycoplasma spp.* asociados a la agalaxia contagiosa podrían albergar estos microorganismos en otra localización anatómica distinta de los oídos. Se realizó un estudio en 6 sementales infectados de forma natural y previamente diagnosticados como portadores asintomáticos auriculares de *Mycoplasma (M.) mycoides* subsp. *capri* (Mmc) un año antes del estudio. Se determinó la presencia de *Mycoplasma spp.* por cultivo y PCR en 46 muestras tomadas de cada animal del sistema cardio-respiratorio, digestivo, nervioso, linfático y genitourinario y varias articulaciones. De un total de 274 muestras analizadas, 28 fueron positivas para la detección de micoplasmas (10,1%): Mmc se detectó en 17 de ellas (6,1%), *M. agalactiae* (Ma) en 12 (4,3%) y ambos microorganismos fueron identificados en una de las muestras. En los 6 sementales, se constató la existencia de una infección mixta por ambos microorganismos, a pesar de que ninguno fue portador auricular de Ma. *Mycoplasma spp.* fueron identificados en 15 localizaciones diferentes; siendo las más frecuentes las articulaciones (31,2%, 5 muestras positivas), los ganglios linfáticos (25%, 4 muestras positivas) y el tracto respiratorio (25%, 4 muestras positivas). También se obtuvieron resultados positivos en tres muestras de tejido cerebral (18,7%), dos de tejido cardíaco (12,5%) y una de íleon, uretra, testículos y glándulas bulbouretrales (6,25%). Los hallazgos histopatológicos sugirieron la presencia de lesiones crónicas leves en algunos de los órganos donde se detectó la presencia de micoplasmas. Nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez la capacidad de Mmc y Ma para colonizar otros órganos y sistemas en los portadores auriculares crónicamente infectados de forma natural, lo que representa un factor de riesgo añadido para la propagación de estos microorganismos. En el caso de Ma, la colonización parecía ser independiente del estado de portador auricular del animal.

I.3 Estudio 3. Control de la agalaxia contagiosa en centros caprinos de inseminación artificial y detección de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en el semen.

Se desarrolló un sistema de control para evitar la presencia de sementales portadores auriculares asintomáticos de *Mycoplasma* spp. en los centros de inseminación artificial (IA) caprinos españoles. Para ello, en los animales candidatos a entrar, se tomaron 2 hisopos de conducto auditivo externo para detectar la presencia de micoplasmas por PCR y cultivo y una muestra de sangre para determinar la presencia de anticuerpos frente a *Mycoplasma agalactiae* (Ma). Por otra parte, y en los animales ya presentes en los centros, el análisis de los hisopos fue complementado con el diagnóstico de la presencia de micoplasmas en las muestras de semen producidos en los mismos. El resumen anual de los análisis realizados muestra que tras analizar 48 hisopos de oído y 24 muestras de sangre procedentes de 24 candidatos, tres de las muestras de oído (3/48, 6.25%), procedentes de tres animales diferentes, resultaron positivas a la presencia de micoplasmas; Ma se detectó en 2 ocasiones y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) en una de ellas. Todos los animales fueron serológicamente negativos para Ma. Además, se procesaron 173 muestras de semen obtenidas a partir de 137 animales admitidos en los centros (2 y 3 muestras se obtuvieron en 16 y 10 sementales respectivamente), y una (1/173, 0,56%) fue positiva a Mmc. Nuestros hallazgos sugieren que el análisis de hisopos del conducto auditivo externo y las muestras de semen constituyen herramientas útiles para el control de AC en centros de IA. Este trabajo también supone la primera descripción de Mmc en el semen caprino de un semental infectado de forma natural, lo que confirma la capacidad de esta especie para colonizar el tracto reproductivo de sementales caprinos. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de mejorar las medidas de control en el semen que producen los centros para reducir al mínimo el riesgo de transmisión de CA.

I.4 Estudio 4. Efecto de la marbofloxacina sobre el estado de portador y calidad espermática de sementales caprinos.

La presencia de sementales caprinos portadores de los principales agentes etiológicos de agalaxia contagiosa, *Mycoplasma agalactiae* (Ma) y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), es un factor de alto riesgo para la propagación de la infección en los centros de inseminación artificial. El presente estudio fue diseñado para evaluar la eficacia de un tratamiento de 5 días con marbofloxacina administrada por vía intramuscular (2 mg kg⁻¹ día⁻¹) con el objetivo de verificar su posible capacidad para revertir el estado de portador auricular en un colectivo caprino infectado de forma natural (Mmc, n = 25; Mmc + Ma, n = 2). Se tomaron hisopos de conducto auditivo externo y muestras de semen antes y después del tratamiento para identificar micoplasmas mediante cultivo y PCR. También se evaluó el impacto de este tratamiento en la calidad del semen (concentración, motilidad y volumen espermático) controlando estas variables en 594 muestras de semen recogidas durante períodos pre y post-tratamiento de 48 días cada uno. Todos los sementales examinados resultaron positivos a la presencia de Ma y Mmc antes y después del tratamiento aunque *Mycoplasma* spp. nunca fue identificado en el semen. La motilidad del esperma se redujo significativamente en respuesta al tratamiento (de 72,9% a 56,9%), aunque se observó una recuperación al final del estudio (40 días después del tratamiento). El volumen del eyaculado y la concentración se mantuvo sin cambios durante todo el estudio. Nuestros hallazgos indican que la terapia sistémica con marbofloxacina es incapaz de eliminar micoplasmas del conducto auditivo externo de sementales caprinos y que también causa un efecto perjudicial transitorio en la motilidad del esperma. Otras estrategias para controlar la presencia de portadores de micoplasmas en los centros de inseminación artificial de cabra deben ser evaluadas.

I.5. Estudio 5. Evaluación de la viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales caprinas para el desarrollo de un modelo de contaminación experimental con *Mycoplasma* spp.

En los últimos años se ha detectado en diversos centros de inseminación artificial la presencia de machos caprinos en los que se han aislado *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en muestras de semen, sin que presenten ningún síntoma clínico asociado. Por otra parte, la capacidad de las bacterias del género *Mycoplasma* spp. para producir efectos perjudiciales en la calidad espermática es un hecho constatado en diversas especies animales, incluido el hombre. Además, el riesgo de una posible transmisión venérea y afectación de la calidad espermática podría comprometer los programas de mejora genética caprinos fundamentados en la inseminación artificial. El objetivo del presente trabajo es desarrollar un modelo experimental para el estudio del efecto de la contaminación seminal con *Mycoplasma* spp. en la especie caprina. Para ello, evaluamos la viabilidad y motilidad espermática de dosis seminales, tras dos horas de incubación a 37°C en muestras previamente transportadas bajo dos condiciones de temperatura (4-5 °C y 15-16°C). Posteriormente se estudió el efecto de la adición del medio PPLO, en el que se preparan los inóculos de *Mycoplasma* spp., sobre la calidad espermática. El transporte de dosis seminales a 4°C ofrece mejores resultados de motilidad total en semen incubado a 37°C durante 120 minutos. El medio PPLO no ejerció efecto significativo sobre los porcentajes de espermatozoides vivos o móviles totales a lo largo de 150 minutos de incubación. Con dicho medio, se pueden obtener valores de viabilidad y motilidad (total y progresiva) espermática superiores al 50% después de 150 y 60 minutos de incubación, respectivamente. En conjunto, este modelo permitiría el desarrollo de contaminaciones experimentales de dosis seminales caprinas con *Mycoplasma* spp. con el fin de evaluar su efecto sobre la viabilidad y motilidad espermática.

I.6 Estudio 6. Capacidad de supervivencia de *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* en el semen diluido de machos cabríos y su efecto en la calidad del esperma.

Este estudio examina la viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* (Ma) y *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* (Mmc) durante 150 minutos de incubación a 37°C en semen diluido (SD). También se evalúa el efecto de la presencia de ambos microorganismos sobre la viabilidad, motilidad y morfología espermática. En un segundo experimento, se determinó la viabilidad de Ma y su efecto sobre la viabilidad espermática en muestras de eyaculado y en diluyente espermático basado en leche desnatada. Ma y Mmc fueron capaces de sobrevivir en SD a concentraciones consideradas infectivas, no detectándose diferencias significativas en las concentraciones medias de ambas contaminaciones (7,1 log unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). No obstante, tanto la concentración inicial de Ma y Mmc descendieron ($P < 0,05$) de 7,5-6,9 log UFC/ml y de 7,7 a 7,1 log UFC/ml respectivamente después de la incubación. Por el contrario, las concentraciones de Ma en los eyaculados aumentaron significativamente (7,1 a 7,4 log ufc / ml, $P < 0,05$). Estas observaciones sugieren que el eyaculado (y la monta natural) es un medio más propicio para la viabilidad de Ma que la dosis seminal (y la inseminación artificial, IA). La presencia de Mmc redujo ligeramente la viabilidad de los espermatozoides en el SD (de 21,7% a 16,6%, $P < 0,05$). La ausencia de efectos importantes en la calidad del esperma podría dar lugar a que semen contaminado con Ma y Mmc sea destinado a la IA. Como ambas bacterias fueron capaces de sobrevivir a las condiciones de eyaculados y dosis de semen, estos hallazgos sugieren un riesgo de transmisión venérea de agalaxia contagiosa y apoyan la necesidad de emplear muestras de semen libres de micoplasmas para la IA.

I.7 Study 1. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control.

Contagious agalactia (CA) is a serious disease of small dairy ruminants that has a substantial economic impact on the goat and sheep milk industries. The main aetiological agent of the disease is *Mycoplasma agalactiae*, although other species, such as *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*, are pathogenic in goats. There are two clinical–epidemiological states of CA in sheep and goats; herds and flocks may exhibit outbreaks of CA or may be chronically infected, the latter with a high incidence of subclinical mastitis and only occasional clinical cases. The complex epidemiology of CA is related to the genetic characteristics and mechanisms of molecular variation of the *Mycoplasma* spp. involved, along with presence of CA-mycoplasmas in wild ruminant species. In goats, the situation is particularly complex and asymptomatic carriers have been detected in chronically infected herds. The coexistence of other non-pathogenic mycoplasmas in the herd further complicates the diagnosis of CA and the design of efficient strategies to control the disease. Routes of infection, such as the venereal route, may be involved in the establishment of chronic infection in herds. Current challenges include the need for improved diagnostic methods for detection of chronic and subclinical infections and for the design of more efficient vaccines.

I.8 Study 2. Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers.

This study sought to determine whether male goat auricular carriers of mycoplasmas known to cause contagious agalactia could harbour these microorganisms at anatomical sites other than the ears. A microbiological study was conducted in 6 naturally infected bucks that had been diagnosed as chronic auricular asymptomatic carriers of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) more than one year previously. To detect mycoplasmas, cultures and PCR were performed on 46 samples taken from each goat from the cardio-respiratory, digestive, nervous, lymph and genitourinary systems and several joints. Of a total of 274 samples analyzed, 28 were positive for mycoplasmas (10.1%): Mmc was detected in 17 (6.1%), *Mycoplasma agalactiae* (Ma) in 12 (4.3%) and both microorganisms were identified in one of the samples. In all 6 goats, mixed infection was observed despite none being auricular carriers of *M. agalactiae*. *Mycoplasma* spp. were identified at 15 different sites; the most frequent sites being the joints (31.2%, 5 positive samples), lymph nodes (25%, 4 positive samples) and respiratory tract (25%, 4 positive samples). Positive results were also obtained in three brain tissue (18.7%), two cardiac tissue (12.5%) and one ileum, urethra, testicle and bulbourethral gland (6.25%) samples. The histopathological findings may suggest the presence of mild chronic conditions in some of the organs where the bacteria were found. Our findings reveal for the first time the capacity of Mmc and Ma to colonize several other organ systems in chronically naturally infected auricular carriers, possibly representing an added risk factor for the spread of these microorganisms. In the case of Ma, colonization seemed to be independent of the animal's auricular carrier state.

I.9 Study 3. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen.

Many goat artificial insemination (AI) centers in Spain have adopted new measures to control contagious agalactia (CA). To avoid the introduction of male goats carrying mycoplasma organisms subclinically in their external ear canal (auricular carriers) in these centers, two ear swabs and a blood sample are obtained from all candidate animals for polymerase chain reaction (PCR), culture (swabs) and serologic tests to detect the presence of mycoplasmas. In addition, the semen produced at these centers is routinely cultured and PCR tested also to detect the presence of mycoplasmas. One year after the introduction of this program, we tested 48 ear swabs and 24 blood samples from 24 candidates for admission to these AI Centers. Three of these ear swab samples (3/48, 6.25%) scored positive for the presence of mycoplasmas; *Mycoplasma agalactiae* (Ma) was detected in two samples and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) in one. All animals were serologically negative for Ma. Also, out of 173 semen samples obtained from 137 admitted animals (2 and 3 samples were obtained in 16 and 10 bucks, respectively), one (1/173, 0.56%) was positive for Mmc. Our findings suggest that ear swab and semen samples are useful tools to control CA at AI Centers. The introduction of this program has also resulted in the first detection of Mmc in semen from a naturally infected goat, confirming the ability of this mycoplasma to colonize the reproductive tract of male goats. These results highlight the need to improve control measures in semen producing centers to minimize the risk of CA transmission.

I.10 Study 4. Effect of marbofloxacin on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks

The presence of goat males carriers of the main causal agents of contagious agalactia, *Mycoplasma agalactiae* (Ma) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), is a high risk factor for the spread of the infection in artificial insemination centres. The present study was designed to assess the efficacy of a 5 day course of marbofloxacin given intramuscularly ($2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) in terms of its capacity to reverse the carrier state of goat buck populations naturally infected with one or both mycoplasmas (Mmc, $n = 25$; Mmc + Ma, $n = 2$). Before and after treatment, ear swabs and semen samples were culture- and PCR-checked for both mycoplasmas. We also evaluated the impact of this treatment on semen quality (sperm count, motility and daily sperm production) by monitoring these variables of 594 semen samples collected during pre- and post-treatment periods of 48 days each. All bucks examined tested positive for the presence of Ma and Mmc before and after treatment though *Mycoplasma* spp. never was identified in semen. Sperm motility was significantly reduced in response to treatment (from 72.9% to 56.9%), although some recovery was observed at the end of the study (40 days after treatment). Ejaculate volume and concentration remained unchanged throughout the study. Our findings indicate that systemic marbofloxacin therapy is unable to eliminate mycoplasmas from the external auditory canal of male goats, and that it also causes a transient detrimental effect on sperm motility. Other strategies to control the presence of mycoplasma carriers in goat artificial insemination centres need to be assessed.

I.11 Study 5. Goat model for experimental mycoplasma contamination of semen: preliminary results

The presence of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in semen samples taken from asymptomatic bucks placed in artificial insemination centres has been confirmed in the last years. The ability of *Mycoplasma* spp. to cause adverse effects on sperm quality has been also demonstrated in several animal species including humans. In this sense, the risk of venereal transmission and the effects of mycoplasmas on sperm quality could affect goat breed improvement programs based on artificial insemination. The present study was conducted to develop an experimental model useful to study the effect of *Mycoplasma* spp. in goat semen. We evaluated the viability and motility of seminal doses maintained during two hours at 37 °C in semen samples previously kept under two temperature conditions (4-5 °C or 15-16 °C). The effect of PPLO medium in sperm motility, in which *Mycoplasma* spp. inocula are prepared, was also studied. Motility results registered in semen samples incubated at 37 °C during 120 minutes are better in seminal doses kept at 4-5 °C. PPLO medium had no significant effect on live or motile spermatozoa percentages registered after 150 minutes. Sperm viability and motility values (total and progressive) higher than 50% during the 150 and 60 minutes of incubation respectively were obtained using this medium. Overall, the present model is useful to conduct experimental contamination of goat semen doses with *Mycoplasma* spp. in order to evaluate its effect on spermatoc viability and motility.

I.12 Study 6. Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality.

This study examines the viability of *Mycoplasma agalactiae* (Ma) and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* (Mmc) during 150 minutes of incubation at 37 °C in contaminated diluted semen (DS) doses. The effects of the presence of both microorganisms on sperm viability, motility, and morphology were also examined. In a second experiment, the viability of Ma and its effects on sperm viability were determined in ejaculate samples and skimmed milk semen extender samples. Ma and Mmc were able to survive in DS at concentrations considered infectious, and no significant differences in mean concentrations were detected (7.1 log colony-forming units [CFU]/mL). However, initial concentration of Ma declined ($P < 0.05$) from 7.5 to 6.9 log CFU/mL and Mmc declined ($P < 0.05$) from 7.7 to 7.1 log CFU/mL after incubation. Conversely, ejaculate concentrations of Ma increased significantly (from 7.1 to 7.4 log CFU/mL, $P < 0.05$). These observations suggest that the natural breeding medium is more suitable for Ma than the medium used for artificial insemination (AI). The presence of Mmc slightly reduced sperm viability in the DS (from 21.7% to 16.6%, $P < 0.05$). The absence of major effects on sperm quality could lead to the unnoticed use of semen contaminated with Ma and Mmc for AI. As both bacteria were able to survive the conditions of ejaculates and semen doses, these findings suggest a risk of venereal transmission of contagious agalactia and support the use of mycoplasma-free semen samples for (AI).

II. RESUMEN

II. RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se presenta en la modalidad de compendio de artículos y opta a la Mención Internacional del Título de Doctor según la normativa contemplada por la Universidad de Murcia. La tesis se compone de 5 artículos publicados en revistas internacionales con indicadores de calidad, ponderadas en el Journal of Citation Report (2013) y comprendidas en las categorías *Veterinary Sciences* y *Agricultural, Dairy and Animal Sciences*.

Los trabajos desarrollados en la Tesis Doctoral se enmarcan en el desarrollo de estrategias que optimicen el control y la prevención de la agalaxia contagiosa (AC) de los pequeños rumiantes, una de las enfermedades con mayor repercusión sanitaria en el sector caprino lechero español. Los recursos empleados para el estudio de esta enfermedad se justifican, por un lado, en que se trata de una infección que en ocasiones se manifiesta mediante brotes clínicos graves que comprometen seriamente la integridad de los rebaños afectados en cuestión de semanas, con la repercusión socioeconómica que de ello se deriva en áreas con una marcada presencia de rebaños caprinos lecheros. Por otro lado, en los rebaños crónicamente infectados la infección produce pérdidas económicas difícilmente calculables, como consecuencia especialmente del descenso en la producción lechera que a menudo pasa desapercibida por los ganaderos. Los últimos estudios publicados sobre la enfermedad y especialmente los avances en el conocimiento de su epidemiología molecular y analítica, así como los aspectos más relevantes que habrán de ser estudiados en un futuro, fueron abordados en la revisión por invitación que nos solicitó la revista *The Veterinary Journal*, y que figura como primer artículo de la presente tesis doctoral (Estudio 1).

No obstante, la Tesis Doctoral se ha centrado principalmente en estudiar las implicaciones epidemiológicas del semental caprino en la AC. Aunque el papel epidemiológico de estos individuos en la propagación de la infección siempre se ha asumido, trabajos recientes han constatado la presencia de sementales portadores auriculares asintomáticos en el interior de centros de recogida de semen y mejora genética. Estos portadores suponen una de las principales fuentes de difusión de la enfermedad y se ha constatado que su entrada en los centros de inseminación pueden dar lugar a la propagación latente al resto del colectivo. Este hecho, unido a la presencia

de individuos infectados asintomáticos excretando *Mycoplasma (M.) agalactiae*, agente principal de la enfermedad, en el semen, evidenció la necesidad de profundizar en esta línea de investigación.

Dentro de este ámbito de estudio, se ha evaluado en primer lugar la distribución del microorganismo en los sementales portadores auriculares asintomáticos, al objeto de determinar la existencia de posibles infecciones sistémicas que pudieran esclarecer la patogenia de la infección en los individuos portadores y el riesgo que suponen. Todas estas cuestiones fueron desarrolladas en un segundo trabajo, mediante el estudio microbiológico y molecular de sementales infectados de forma natural (Estudio 2). Por otra parte, el riesgo que suponía para los centros de inseminación la entrada de sementales infectados hizo necesario implantar estrategias de prevención y vigilancia en los mismos que contemplaran la identificación de portadores asintomáticos y que es abordado en el tercer trabajo incluido en la Tesis Doctoral. Este modelo se fundamenta en el muestreo tanto de animales candidatos a entrar en los centros como de aquellos presentes en ellos. Estas estrategias tratan de ser coherentes con la situación epidemiológica de áreas endémicas como España, donde el desconocimiento sobre el estatus sanitario de los rebaños supone un riesgo para el movimiento descontrolado de animales y donde la vacunación supone una práctica que invalida el diagnóstico serológico (Estudio 3).

El alto valor genético de algunos de los sementales caprinos infectados para ciertas razas caprinas selectas, motivó el desarrollo de otra experiencia evaluando la eficacia del uso del tratamiento antibiótico de sementales portadores auriculares asintomáticos. Además, también fueron consideradas las posibles repercusiones que este tratamiento podría tener sobre la calidad espermática de los sementales afectados (Estudio 4).

Finalmente, y por las implicaciones prácticas del trabajo en la seguridad de la inseminación artificial caprina, se evaluó la supervivencia de los principales agentes etiológicos de la AC, *M. agalactiae* y *M. mycoides* subsp. *capri*, en la dosis seminal. Para ello, previamente hubo que desarrollar un modelo de contaminación experimental que permitiera obtener resultados válidos y extrapolables a las condiciones de campo, y que fue publicado en la revista científica nacional “Anales de Veterinaria” (Artículo 5). Este modelo, permitió desarrollar posteriormente un estudio experimental para evaluar la supervivencia de estas especies de micoplasmas en semen diluido y eyaculados, así como su repercusión sobre la calidad espermática (Estudio 6).

La hipótesis de partida, basada en el riesgo que podrían suponer los sementales portadores auriculares asintomáticos para la difusión de la enfermedad, así como la probable necesidad de desarrollar y aplicar nuevas estrategias para el control de la infección, motivaron los objetivos específicos abordados en la presente Tesis Doctoral que se exponen a continuación:

II.1 Objetivos

PRIMERO:

Realizar una revisión bibliográfica en donde se expongan los avances en el estudio de la epidemiología molecular y analítica de la agalaxia contagiosa, su control y el planteamiento de las estrategias de futuro en su investigación.

SEGUNDO:

Estudiar la distribución de *Mycoplasma spp.* en sementales caprinos portadores auriculares asintomáticos.

TERCERO:

Desarrollar un programa de prevención y vigilancia de agalaxia contagiosa caprina en centros de inseminación artificial que permita la detección de sementales portadores asintomáticos susceptibles de entrar en los centros o que estén presentes en los mismos.

CUARTO:

Estudiar la eficacia del tratamiento sistémico con marbofloxacina para eliminar la infección en sementales caprinos portadores auriculares asintomáticos infectados de forma natural con *Mycoplasma* subsp. *mycoides* subsp. *capri*, evaluando su efecto sobre la calidad espermática.

QUINTO:

Desarrollar un modelo experimental para la contaminación de semen caprino con *Mycoplasma spp.*, que permita evaluar su efecto sobre la viabilidad y motilidad

espermática, así como sus repercusiones en la calidad espermática bajo diferentes condiciones de transporte.

SEXTO:

Evaluar la viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en semen diluido y sus repercusiones en la calidad espermática.

II.2 CONCLUSIONES

PRIMERA

Se confirma la distribución sistémica de *M. agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en sementales caprinos portadores auriculares asintomáticos infectados de modo natural.

SEGUNDA

La presencia de Ma y Mmc en el sistema respiratorio, digestivo y urogenital de portadores asintomáticos puede suponer un factor de riesgo para la transmisión de la AC mediante las secreciones relacionadas con las dichas localizaciones anatómicas infectadas.

TERCERA

Se ha determinado por primera vez la presencia de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en semen caprino de sementales asintomáticos.

CUARTA

El análisis combinado de hisopos de conducto auditivo externo y muestras de semen para el diagnóstico de micoplasmas asociados a la AC, resulta una herramienta útil para controlar la presencia de sementales caprinos portadores asintomáticos en los centros de inseminación.

QUINTA

El tratamiento sistémico con marbobloxacina resulta ineficaz para eliminar la infecciones por *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* del conducto auditivo externo de sementales caprinos naturalmente infectados a la vez que afecta la calidad espermática.

SEXTA

El transporte de semen caprino diluido a 4°C y el empleo del medio de cultivo PH para preparar el inóculo ofrecen las condiciones adecuadas para el desarrollo de modelos experimentales de contaminación seminal con *Mycoplasma* spp.

SEPTIMA

La supervivencia a dosis infectivas de *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en semen diluido durante al menos 150 minutos supone un factor de riesgo para su transmisión venérea.

OCTAVA

En las condiciones estudiadas, la dosis seminal disminuye la viabilidad de Ma y el eyaculado la incrementa, sugiriendo que la monta natural puede incrementar las posibilidades de transmisión venérea de la agalaxia contagiosa caprina respecto al uso de la inseminación artificial.

III. SUMMARY

III. SUMMARY

This Thesis is presented in the form of a compendium of articles and chooses the International Doctor Mention title accordance with the rules provided by the University of Murcia. The work consists of five papers published in international journals with quality indicators, weighted in the Journal of Citation Report (2013) and in Categories Veterinary and Agricultural Sciences, Dairy and Animal Sciences.

The work done in the doctoral thesis are part of the development of strategies to optimize the control and prevention of contagious agalactia (CA) in small ruminants, a disease with greater health impact in the Spanish dairy goat sector. The resources used for the study of this disease are justified, first, that it is an infection that is sometimes manifested by severe clinical outbreaks that seriously compromise the integrity of the affected herds within weeks, with the socioeconomic impact that it follows in areas with a strong presence of dairy goat herds. On the other hand, in chronically infected herds infection occurs incalculably economic losses due to the decrease in milk production that often goes unnoticed by farmers. Recent published studies on the disease and especially the advances in the knowledge of their molecular epidemiology and analytical as well as the most relevant aspects that are to be studied in the future were discussed in the review by invitation asked us magazine *The Veterinary Journal*, and listed as the first article of this thesis (Study 1).

However, the doctoral thesis has mainly focused on studying the epidemiological implications of bucks on the CA. Although the epidemiological role of these individuals in the spread of infection is always assumed, recent work has confirmed the presence of ear asymptomatic carriers bucks inside semen collection centers and genetic improvement centers. These carriers represent a major source of spread of the infection and it was found that their entry into insemination centers may can cause the latent population spread. This fact, coupled with the presence of asymptomatic infected individuals excreting *Mycoplasma (M.) agalactiae* in semen, highlighted the need to pursue this line of research.

Within this field of study has evaluated first the distribution of the organism in ear asymptomatic carrier bucks in order to determine the existence of possible systemic infections that could clarify the pathogenesis of infection in individuals carrying and risk pose. All these questions were developed in a second work, by microbiological and molecular study of naturally infected stallions (Study 2). Moreover, because of the risk posed to the insemination centers the entry of infected stallions was necessary to implement prevention strategies and monitoring them to contemplate the identification of asymptomatic carriers. This objective was addressed in the third work included in the Doctoral Thesis (Study 3). This model is based on sampling animals both candidates to enter the centers as those present in them. These strategies try to be consistent with the epidemiological situation of endemic areas such as Spain, where ignorance about the health status of herds poses a risk to the uncontrolled movement of animals and where vaccination is a practice that invalidate the serological diagnosis.

The high genetic value of some of the goats infected stallions for certain selected goat breeds, motivated the development of another experience evaluating the effectiveness of the use of antibiotic treatment for ear asymptomatic carriers bucks. In addition, were also considered the potential impact that this treatment might have on sperm quality of stallions affected (Study 4).

Finally, because of the practical implications of working in the safety of goat artificial insemination, the survival of the major etiological agents of CA, *M. agalactiae* and *M. mycoides* subsp *capri* was evaluated in the diluted semen. For this purpose, previously it was necessary to develop a model of experimental contamination which to obtain valid and extrapolated to field conditions results, and which was published in national journal "Annals of Veterinary" (Article 5). This model allowed subsequently developing a experimental study to evaluate the survival of these species of mycoplasmas in diluted semen and ejaculate, and their impact on sperm quality (Study 6).

The hypothesis of this thesis, based on the risk they might pose the ear asymptomatic carriers bucks for the spreading of the CA and the likely need to develop and implement new strategies for infection control, prompted the specific objectives that are exposed below:

III.1 Objectives

FIRST:

Perform a literature review where progress is exposed in the study of molecular and analytical epidemiology of contagious agalactia, control and approach future strategies in their research.

SECOND:

Study the distribution of *Mycoplasma* spp. in ear asymptomatic carriers bucks.

THIRD:

Develop a program of prevention and monitoring of caprine contagious agalactia in artificial insemination centers effective for detecting asymptomatic carrier bucks candidates to enter in the centers and present inside.

FOURTH:

To study the efficiency of systemic treatment with marbofloxacin to eliminate infection in naturally infected ear asymptomatic carriers bucks with *Mycoplasma* subsp. *mycoides* subsp. *capri*, evaluating its effect on sperm quality.

FIFTH:

Develop an experimental model for goat semen contamination with *Mycoplasma* spp., to evaluate its effect on the viability and motility sperm, as well as its impact on sperm quality under different conditions of carriage.

SIXTH:

Evaluation of the *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* viability in diluted semen and their impact on sperm quality.

III.2 Conclusions.

FIRST:

Systemic distribution of *M. agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* is confirmed in naturally infected ear asymptomatic carriers bucks.

SECOND:

The presence of Ma and Mmc in the respiratory, digestive and urogenital system of asymptomatic carriers can be a risk factor for CA transmission by related secretions with this infected anatomic locations.

THIRD:

Has been determined for the first time the presence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in semen of asymptomatic bucks.

FOURTH:

The combined of ear canal swabs and semen samples for the diagnosis of mycoplasma associated with CA is a useful tool to monitor the presence of asymptomatic carriers bucks in insemination centers.

FIFTH:

Marbobloxacin systemic treatment was ineffective to eliminate *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* ear infections of naturally infected bucks while affecting sperm quality.

SIXTH:

Transport of goat diluted semen at 4 °C and the use of PH culture medium to prepare the inoculum offer adequate conditions for the development of experimental models of seminal contamination with *Mycoplasma* spp.

SEVENTH:

The survival as infective dose of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* diluted semen for at least 150 minutes is a risk factor for venereal transmission.

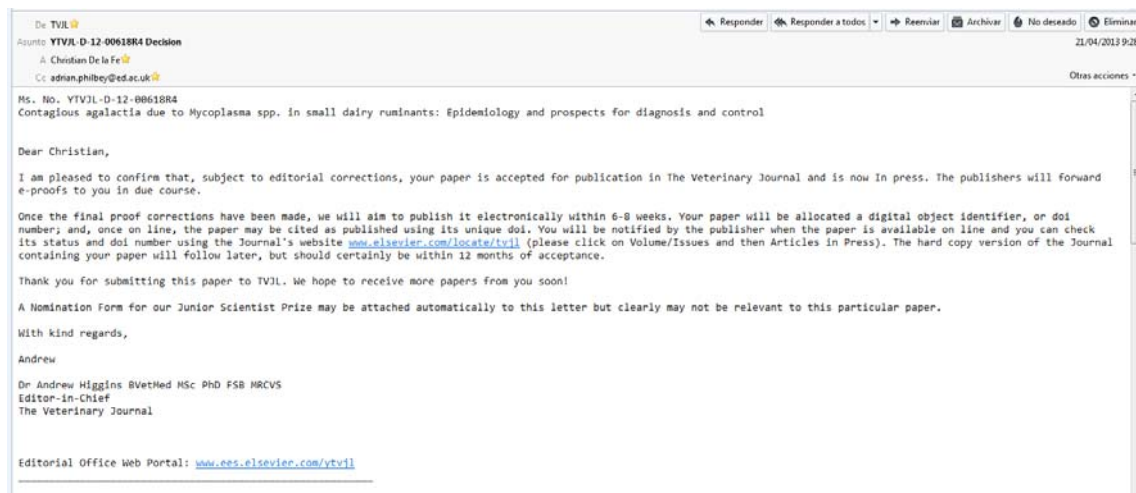
EIGHTH:

Under the conditions studied, the seminal dose decreases the viability of *Mycoplasma agalactiae* while ejaculated is a medium that favors their growth, suggesting that natural breeding can increase the possibilities of venereal transmission of caprine contagious agalactia regarding the use of artificial insemination.

IV. APÉNDICES

IV. 1 Cartas de aceptación de los trabajos que forman parte de ña Tesis Doctoral.

Study 1. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control.



Study 2. Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers.

Date: Mon, 9 Jan 2012 12:19:28 +0100
From: cdelafe@um.es
To: sanidadcaprina@um.es; abuendia@um.es
Subject: Fwd: VETMIC-D-11-5580R3 Decision

Enhorabuena a todos.
Christian

----- Mensaje original -----

Asunto:VETMIC-D-11-5580R3 Decision
Fecha:4 Jan 2012 16:38:01 +0000
De:VETMIC <vetmic@elsevier.com>
Para:cdelafe@um.es

Ms. No. VETMIC-D-11-5580R3
Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers

Dear Professor De la Fe,

I am pleased to be able to inform you that your manuscript has been accepted as Research Paper for publication in *Veterinary Microbiology*.

The manuscript will be transferred to our Production Department. Proofs will be sent to you in due course.

With kind regards,

Gio Bakker
Editorial Office
Veterinary Microbiology

Dear Dr. De la Fe,

Thank you very much for sending me the revised version of your manuscript and the letter in which you indicate how you have dealt with the various comments by the referees. :

Sincerely Yours,

Wim Gaastra
Editor-in-Chief

Study 3. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen.

De Fulvio Gandolfi ✉

Asunto: Your Submission THERIO-D-11-00494R1

A Christian De la Fe ✉

10/10/2011 17:28
Otras acciones ▾

Ms. Ref. No.: THERIO-D-11-00494R1
Title: Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of Mycoplasma mycoides subsp. capri in semen
Theriogenology

Dear Proffesor De la Fe,

I am pleased to confirm that your manuscript, "Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of Mycoplasma mycoides subsp. capri in semen, has been accepted for publication in Theriogenology.

The files have been forwarded to the publisher and you will be contacted in due course regarding galley proofs.

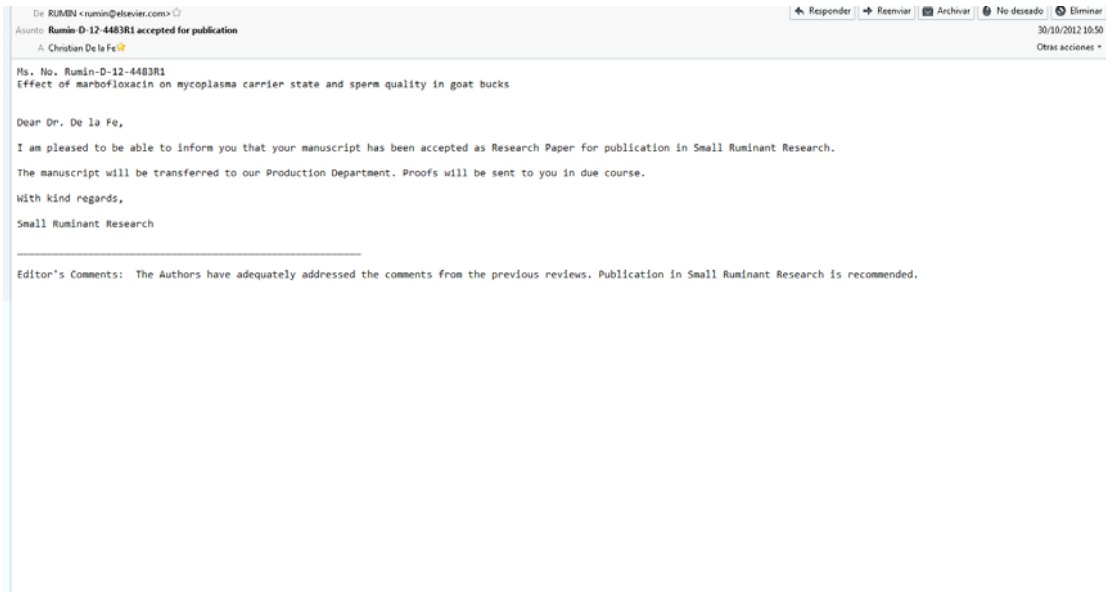
Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Fulvio Gandolfi, DVM, PhD
Co-Editor-in-Chief
Theriogenology

Reviewers' comments:

Study 4. Effect of marbofloxacin on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks.



Study 5. Goat model for experimental mycoplasma contamination of semen: preliminary results

--Archivo adjunto de mensaje reenviado--

Date: Thu, 31 Jan 2013 07:52:29 +0100

From: berriatu@um.es

To: angelgomez@um.es

Subject: Re: Correcciones para evaluador, Anales de Veterinaria

El 30/01/2013 13:23, ANGEL escribió:

> Buenos días Eduardo.

>

> Soy Ángel Gómez Martín. Te adjunto el artículo para Anales de
> Veterinaria con las correcciones solicitadas por los evaluadores. He
> intentado mandártelo a través de la aplicación online de la revista
> pero en el estado del artículo me figura como "en proceso de asignación".

>

> Un saludo

>

> Ángel

Hola Angel, lo damos por aceptado. Enhorabuena!

Gracias por tu trabajo.

Un abrazo,

Eduardo

--

Eduardo Berriatua

Professor of Animal Health

Facultad de Veterinaria

Universidad de Murcia

30100 Campus de Espinardo,


Murcia, Spain

Tel: +34 868 883 997

M-Tel: +34 659 372 257

Fax: +34 868 884 147

Study 6. Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality.

Account: Your Submission THERIO-D-14-00426R1 24/11/2014 18:14
A Christian De la Fe  Otras acciones -

Ms. Ref. No.: THERIO-D-14-00426R1
Title: Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality
Theriogenology

Dear Prof. de la Fe,

I am pleased to confirm that your manuscript, "Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality, has been accepted for publication in *Theriogenology*.

The files have been forwarded to the publisher and you will be contacted in due course regarding galley proofs.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Leonardo Brito, DVM, PhD, DACT
Associate Editor
Theriogenology

Reviewers' comments:

IV.2. Justificación documentada de la importancia e índice de impacto de las publicaciones presentadas.

La presente Tesis Doctoral se compone de varios artículos comprendidos en 4 revistas de divulgación científica diferentes recogidas en las principales bases de datos internacionales especializadas.

Veterinary Microbiology (ISSN: 0378-1135) publicada por *Elsevier*, es la revista principal para la publicación y divulgación internacional de resultados relativos a microorganismos que afectan principalmente a animales domésticos de producción. Según el *Journal of Citation Report-Science Edition* (2013), ocupa la cuarta posición de 132 revistas en la categoría *Veterinary Science* tanto por el índice de impacto (2,726) y la tercera según el índice de impacto de cinco años (3,123).

The Veterinary Journal (ISSN: 1090-0233) publicada por *Elsevier*, es una revista especializada en la publicación y divulgación internacional de diversos aspectos relativos a la ciencia veterinaria. Según el *Journal of Citation Report-Science Edition* (2013) ocupa la decimoprimer posición de 132 revistas en la categoría *Veterinary Science* por índice de impacto (2,165) y la octava posición según el índice de impacto de 5 años (2,480).

Theriogenology (ISSN: 0093-691X) publicada por *Elsevier*, es una revista especializada en la publicación y divulgación internacional de aspectos relacionados con la reproducción animal. Según el *Journal of Citation Report-Science Edition* (2010) ocupa la decimoséptima posición de 132 revistas en la categoría *Veterinary Science* por índice de impacto (1,845) y la décimosexta según el índice de impacto de cinco años de 5 años (2,146).

Small Ruminant Research (ISSN: 0921-4488) publicada por *Elsevier*, es la principal revista de divulgación internacional científica relacionada con los pequeños

rumiantes (ovino y caprino). Según el *Journal of Citation Report-Science Edition* (2013) ocupa la decimoctava posición de 52 revistas englobadas en la categoría *Agriculture, Dairy and animal Science* con un índice de impacto de 1,099 y la décimo séptima según el índice de impacto de 5 años (1,342).

admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR

Journals 1 - 20 (of 132) Page 1 of 7

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <small>(linked to journal information)</small>	ISSN	JCR Data ^j					Eigenfactor [®] Metrics ^j		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	VET RES	0928-4249	3521	3.383	3.849	0.339	124	6.7	0.00731	1.089
<input type="checkbox"/>	2	TRANSBOUND EMERG DIS	1865-1674	866	3.116	2.622	0.783	106	2.5	0.00323	0.655
<input type="checkbox"/>	3	FISH SHELLFISH IMMUN	1050-4648	8000	3.034	3.452	0.466	440	5.0	0.01224	0.559
<input type="checkbox"/>	4	VET MICROBIOL	0378-1135	12896	2.726	3.123	0.637	488	5.8	0.02782	0.827
<input type="checkbox"/>	5	VET PARASITOL	0304-4017	14204	2.545	2.719	0.608	498	6.6	0.02166	0.580
<input type="checkbox"/>	6	PREV VET MED	0167-5877	4966	2.506	2.530	0.408	218	7.2	0.00813	0.609
<input type="checkbox"/>	7	EQUINE VET J	0425-1644	6124	2.369	2.267	0.993	138	>10.0	0.00697	0.529
<input type="checkbox"/>	8	MED VET ENTOMOL	0269-283X	2890	2.333	2.512	0.740	50	>10.0	0.00378	0.754
<input type="checkbox"/>	9	MED MYCOL	1369-3786	3132	2.261	2.205	0.542	120	5.3	0.00830	0.668
<input type="checkbox"/>	10	J VET INTERN MED	0891-6640	5410	2.224	2.378	0.293	208	6.9	0.00927	0.593
<input type="checkbox"/>	11	VET J	1090-0233	5621	2.165	2.480	0.630	413	5.0	0.01436	0.651
<input type="checkbox"/>	12	COMP IMMUNOL MICROB	0147-9571	1307	2.107	2.367	0.726	62	6.2	0.00267	0.639
<input type="checkbox"/>	13	ZOOZOSES PUBLIC HLTH	1863-1959	1155	2.065	2.352	0.848	66	3.7	0.00453	0.660
<input type="checkbox"/>	14	AVIAN PATHOL	0307-9457	2866	2.041	2.139	0.237	76	>10.0	0.00353	0.576
<input type="checkbox"/>	15	VET PATHOL	0300-9858	4473	2.038	1.893	0.420	138	>10.0	0.00601	0.550
<input type="checkbox"/>	16	VET DERMATOL	0959-4493	1575	1.993	2.292	0.402	102	5.3	0.00289	0.474
<input type="checkbox"/>	17	THERIOGENOLOGY	0093-691X	12505	1.845	2.146	0.369	309	8.5	0.01576	0.534
<input type="checkbox"/>	18	J MED ENTOMOL	0022-2585	7352	1.815	2.255	0.420	169	9.9	0.00943	0.644
<input type="checkbox"/>	19	ANIMAL	1751-7311	2506	1.784	1.922	0.270	282	3.7	0.00994	0.551
<input type="checkbox"/>	20	VET ANAESTH ANALG	1467-2987	1210	1.776	1.986	0.281	89	5.3	0.00264	0.451

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 132) Page 1 of 7

Journals 1 - 20 (of 52) Page 1 of 3

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <small>(linked to journal information)</small>	ISSN	JCR Data ^j					Eigenfactor [®] Metrics ^j		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	GENET SEL EVOL	0999-193X	1717	3.747	3.365	0.205	44	8.1	0.00391	1.071
<input type="checkbox"/>	2	J DAIRY SCI	0022-0302	31754	2.550	3.080	0.505	782	9.4	0.03285	0.627
<input type="checkbox"/>	3	ANIM GENET	0268-9146	3329	2.210	2.682	0.532	109	6.2	0.00610	0.633
<input type="checkbox"/>	4	ANIM FEED SCI TECH	0377-8401	6437	2.086	2.066	0.217	143	8.1	0.00956	0.554
<input type="checkbox"/>	5	J ANIM BREED GENET	0931-2668	1168	2.059	1.706	0.388	49	6.7	0.00215	0.488
<input type="checkbox"/>	6	J ANIM SCI	0021-8812	25061	1.920	2.551	0.439	602	>10.0	0.02296	0.569
<input type="checkbox"/>	7	ANIMAL	1751-7311	2506	1.784	1.922	0.270	282	3.7	0.00994	0.551
<input type="checkbox"/>	8	DOMEST ANIM ENDOCRIN	0739-7240	1865	1.783	2.127	0.358	53	8.3	0.00312	0.626
<input type="checkbox"/>	9	J REPROD DEVELOP	0916-8818	1652	1.635	1.693	0.191	89	5.5	0.00403	0.471
<input type="checkbox"/>	10	APPL ANIM BEHAV SCI	0168-1591	6323	1.626	2.016	0.206	141	9.7	0.00719	0.498
<input type="checkbox"/>	11	ANIM REPROD SCI	0378-4320	5717	1.581	1.854	0.152	217	7.7	0.00957	0.486
<input type="checkbox"/>	12	POULTRY SCI	0032-5791	13522	1.544	2.001	0.264	394	>10.0	0.01343	0.447
<input type="checkbox"/>	13	J DAIRY RES	0022-0299	2632	1.394	1.574	0.297	64	>10.0	0.00258	0.450
<input type="checkbox"/>	14	J ANIM PHYSIOL AN N	0931-2439	1283	1.317	1.263	0.261	138	5.4	0.00308	0.342
<input type="checkbox"/>	15	REPROD DOMEST ANIM	0936-6768	2828	1.177	1.442	0.202	178	4.9	0.00825	0.394
<input type="checkbox"/>	16	WORLD POULTRY SCI J	0043-9339	1342	1.158	1.489	0.155	58	9.7	0.00154	0.408
<input type="checkbox"/>	17	LIVEST SCI	1871-1413	3193	1.100	1.501	0.193	295	4.6	0.01058	0.429
<input type="checkbox"/>	18	SMALL RUMINANT RES	0921-4488	4004	1.099	1.342	0.189	265	7.3	0.00548	0.319
<input type="checkbox"/>	19	ANIM SCI J	1344-3941	851	1.044	1.006	0.171	111	4.5	0.00225	0.257
<input type="checkbox"/>	20	CAN J ANIM SCI	0008-3984	2019	0.983	1.130	0.186	59	>10.0	0.00176	0.326



IV.3. Declaraciones de los coautores de los artículos publicados

Los abajo firmantes, coautores del trabajo titulado "Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control" publicado en The Veterinary Journal. 2013. 198, 48-56.

DECLARAN:

Que Ángel Gómez Martín, doctorando del Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, ha contribuido de forma relevante en la investigación que dio lugar a los resultados publicados en el trabajo arriba mencionado.

SE DECLARAN CONFORMES:

En que dicho trabajo sea empleado en la tesis doctoral que tiene intención de defender el doctorando anteriormente mencionado y que tendrá por título "Implicación del semental caprino en la agalaxia contagiosa: epidemiología descriptiva y molecular".

Y SE COMPROMETEN:

A no presentar este artículo como parte de otra tesis doctoral.

y para que conste donde proceda, lo firman con fecha 9 de diciembre de 2014.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Ana Paterna Morán".

Fdo: Ana Paterna Morán

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Joaquín Amores Iniesta".

Fdo: Joaquín Amores Iniesta

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Christian de la Fe Rodríguez".

Fdo: Christian de la Fe Rodríguez



Los abajo firmantes, coautores del trabajo titulado “Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers”, publicado en *Veterinary Microbiology*, 2012, 157: 355-362

DECLARAN:

Que Ángel Gómez Martín, doctorando del Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, ha contribuido de forma relevante en la investigación que dio lugar a los resultados publicados en el trabajo arriba mencionado.

SE DECLARAN CONFORMES:

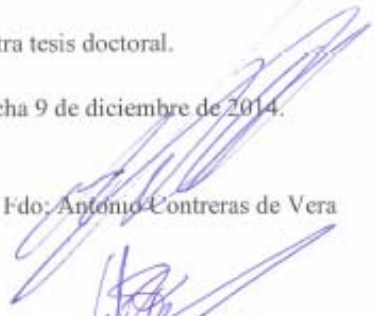
En que dicho trabajo sea empleado en la tesis doctoral que tiene intención de defender el doctorando anteriormente mencionado y que tendrá por título “Implicación del semental caprino en la agalaxia contagiosa: epidemiología descriptiva y molecular”.

Y SE COMPROMETEN:


A no presentar este artículo como parte de otra tesis doctoral.

y para que conste donde proceda, lo firman con fecha 9 de diciembre de 2014.



Fdo: Juan Carlos Corrales Romero


Fdo: Antonio Contreras de Vera


Fdo: Joaquín Amores Iniesta


Fdo: Christian de la Fe Rodríguez


Fdo: Ana Paterna Morán


Fdo: Antonio Sánchez López


Fdo: Antonio Julián Buendía



Los abajo firmantes, coautores del trabajo titulado “Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen”, publicado en *Theriogenology* 2012. 77: 1252-1256

DECLARAN:

Que Ángel Gómez Martín, doctorando del Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, ha contribuido de forma relevante en la investigación que dio lugar a los resultados publicados en el trabajo arriba mencionado.

SE DECLARAN CONFORMES:

En que dicho trabajo sea empleado en la tesis doctoral que tiene intención de defender el doctorando anteriormente mencionado y que tendrá por título “Implicación del semental caprino en la agalaxia contagiosa: epidemiología descriptiva y molecular”.

Y SE COMPROMETEN:

A no presentar este artículo como parte de otra tesis doctoral.

y para que conste donde proceda, lo firman con fecha 9 de diciembre de 2014.

Fdo: Juan Carlos Corrales Romero

Fdo: Antonio Contreras de Vera

Fdo: Joaquín Amores Iniesta

Fdo: Christian de la Fe Rodríguez

Fdo: Ana Paterna Morán

Fdo: Antonio Sánchez López



Los abajo firmantes, coautores del trabajo titulado "Effect of marbofloxacin on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks", publicado en Small Ruminant Research. 2013. 112: 186-190.",

DECLARAN:

Que Ángel Gómez Martín, doctorando del Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, ha contribuido de forma relevante en la investigación que dio lugar a los resultados publicados en el trabajo arriba mencionado.

SE DECLARAN CONFORMES:

En que dicho trabajo sea empleado en la tesis doctoral que tiene intención de defender el doctorando anteriormente mencionado y que tendrá por título "Implicación del semental caprino en la agalaxia contagiosa: epidemiología descriptiva y molecular".

Y SE COMPROMETEN:

A no presentar este artículo como parte de otra tesis doctoral.

y para que conste donde proceda, lo firman con fecha 9 de diciembre de 2014.

Handwritten signature of Juan Carlos Corrales Romero in blue ink.

Fdo: Juan Carlos Corrales Romero

Handwritten signature of Antonio Contreras de Vera in blue ink.

Fdo: Antonio Contreras de Vera

Handwritten signature of Joaquín Amores Iniesta in blue ink.

Fdo: Joaquín Amores Iniesta

Handwritten signature of Christian de la Fe Rodríguez in blue ink.

Fdo: Christian de la Fe Rodríguez

Handwritten signature of Antonio Sánchez López in blue ink.

Fdo: Antonio Sánchez López



Los abajo firmantes, coautores del trabajo titulado "Evaluación de la viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales caprinas para el desarrollo de un modelo de contaminación experimental con *Mycoplasma spp*", publicado en Anales de Veterinaria. 2012. 28: 129-139.

DECLARAN:

Que Ángel Gómez Martín, doctorando del Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, ha contribuido de forma relevante en la investigación que dio lugar a los resultados publicados en el trabajo arriba mencionado.

SE DECLARAN CONFORMES:

En que dicho trabajo sea empleado en la tesis doctoral que tiene intención de defender el doctorando anteriormente mencionado y que tendrá por título "Implicación del semental caprino en la agalaxia contagiosa: epidemiología descriptiva y molecular".

Y SE COMPROMETEN:

A no presentar este artículo como parte de otra tesis doctoral.

y para que conste donde proceda, lo firman con fecha 9 de diciembre de 2014.

Fdo: Luis Alberto Vieira

Fdo: Joaquín Gadea Mateos

Fdo: Ana Paterna Morán

Fdo: Aitor de Ondiz Sánchez

Fdo: Christian de la Fe Rodríguez

Fdo: Antonio Sánchez López



Los abajo firmantes, coautores del trabajo titulado "Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality", aceptado en *Theriogenology* y con doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.029

DECLARAN:

Que Ángel Gómez Martín, doctorando del Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, ha contribuido de forma relevante en la investigación que dio lugar a los resultados publicados en el trabajo arriba mencionado.

SE DECLARAN CONFORMES:

En que dicho trabajo sea empleado en la tesis doctoral que tiene intención de defender el doctorando anteriormente mencionado y que tendrá por título "Implicación del semental caprino en la agalaxia contagiosa: epidemiología descriptiva y molecular".

Y SE COMPROMETEN:

A no presentar este artículo como parte de otra tesis doctoral.

y para que conste donde proceda, lo firman con fecha 9 de diciembre de 2014.

Fdo: Jesús Cadena Moreno

Fdo: Joaquín Galca Mateos

Fdo: Nayeli Uk Espinosa

Fdo: Luis Alberto Vieira

Fdo: Cristian de la Fe Rodríguez

Fdo: Antonio Sánchez López

IV.4 Trabajos en fase de publicación.

IV.4.1 Evaluation of the best samples to detect asymptomatic carriers of contagious caprine agalactia in endemic areas.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el congreso de la The International Organization for Mycoplasmatology (IOM) celebrado en 2014 y cuyo resumen es mostrado a continuación:

External auricular canal: a suitable body site for the detection of asymptomatic animals carrying mycoplasma species responsible for contagious caprine agalactia in endemic areas

Angel Gómez-Martín¹, Eveline Sagné², Ana Paterna¹, Miranda Prats-van der Ham¹, Eric Baranowski³, Juan Tatay-Dualde¹, Joaquín Amores¹, Juan Carlos Corrales¹, Antonio Sánchez¹, Antonio Contreras¹, Christine Citti³, Christian De la Fe¹

¹ Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Murcia, Spain; ² Université de Toulouse, INP-ENVT, UMR 1225, 31076 Toulouse, France; ³ INRA, Université de Toulouse, INP-ENVT, UMR 1225, 31076 Toulouse, France

Phone: +34 868887259, Fax: +34 868884147, Email: cdelafe@um.es

Asymptomatic carriers are thought to be one main source of caprine contagious agalactia (CA) transmission in endemic areas. Therefore, their detection appears to be important, but has a high cost for farmers because of the body sites to be sampled. The occurrence of the 4 mycoplasmas species (*M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. putrefaciens*) associated with CA was tested in 154 goat bucks of chronically infected herds from six regions of Spain using PCR. Data show that 16.8 % of ear swabs (n=308) were positive for at least one species, for only 1.3 % of conjunctival swabs (n=308) and none of the nasal swabs (n=54). This suggested that ear swabs alone are suitable for detection of carrier animals. Because in the Iberian Peninsula, CA in caprine is mainly caused by *M. agalactiae*, we started to investigate whether a single *M. agalactiae* strain circulates within one herd. This was performed using multi locus sequence typing (MLST) based on *fusA*, *gyrB*, *rpoB* and *lepA* genes and samples collected from different animals of a same herd (conjunctival swabs, ear swabs and mastitis milk). A single sequence type was found for all samples tested, indicating that only one clone is circulating in this herd. This further suggested that the strain found in the external auricular canal from asymptomatic carriers might be responsible for production losses by mastitis in this herd. Further studies are being conducted to confirm this hypothesis.

IV.4.1 Study of the genetic variability in goat strains of *Mycoplasma agalactiae* in the southeast of Spain by MLST.

Los resultados de este estudio fueron presentados en el Colloque International Francophone de Microbiologie Animale (CIFMA 2014) y cuyo resumen es mostrado a continuación:

Etude de la variabilité génétique de souches caprines de *Mycoplasma agalactiae* dans le sud-est de l'Espagne par MLST

Gómez-Martín, A¹ ; Sagne, E^{2,3} ; Baranoski, E^{3,2}; De la Fe, C¹ ; Citti, C^{3,2*}.

¹ Groupe de recherche en Santé des Ruminants. Département de santé animale. Campus régional d'excellence internationale "Campus Mare Nostrum", Faculté de médecine vétérinaire. Université de Murcia, 30100 Murcia, Espagne.

² Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, 31076 Toulouse, France.

³INRA, UMR 1225, IHAP, 31076 Toulouse, France.

*c.citti@envt.fr

Mycoplasma agalactiae est l'agent étiologique de l'agalactie contagieuse des petits ruminants. Récemment, des souches caprines de *M. agalactiae* avec des profils génétiques hétérogènes ont été isolées dans le sud-est de l'Espagne, une situation qui diffère de celle observée au nord du pays où les souches ovines sont très homogènes. Afin de mieux comprendre l'origine de cette hétérogénéité, la technique de Multi Locus Sequence Typing (MLST) a été réalisée sur 14 isolats de terrain, avec comme cibles les gènes de ménage *fusA*, *gyrB*, *rpoB* et *lepA*. Les résultats ont mis en évidence la présence de trois types moléculaires. Un de ces types présente un ancêtre commun avec la souche de référence PG2 et appartient à un groupe constitué de souches provenant d'Espagne, de France, du Portugal et de Sardaigne. Les deux autres forment deux groupes indépendants, proches de la souche 5632, une souche génétiquement très éloignée de la souche type PG2. Curieusement, ces deux groupes se distinguent de toutes les souches de *M. agalactiae* présentes dans la banque de séquences GenBank et possèdent des signatures moléculaires uniques. Ces résultats confirment la circulation de plusieurs clones phylogénétiquement éloignés dans le sud-est de l'Espagne, avec des conséquences pour la mise en place de mesures cohérentes pour le contrôle et la prévention de l'agalaxie contagieuse.

IV.5 Comunicaciones a congresos derivadas de la presente Tesis Doctoral.

Comunicaciones presentadas en congresos internacionales:

DE LA FÉ, C; CORRALES, JC; RUIZ, I; SÁNCHEZ , A ; **GÓMEZ MARTÍN, A.**, CONTRERAS, A. *Mycoplasma* spp. in goats from a stud centre of selected dairy goat. V International symposium on the challenge to sheep and goats milk sectors. Alguero, Italia, 2007.

GÓMEZ MARTÍN, A.; CORRALES, JC.; SÁNCHEZ, A.; AMORES, J.; MARTÍNEZ-PARRA, J.; CONTRERAS, A. y DE LA FE C. Estudio microbiológico de sementales caprinos portadores auriculares asintomáticos de *Mycoplasma* spp. XXXIII Jornadas Científicas y XII Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). PRODUCCIÓN OVINA Y CAPRINA N° XXIX SEOC (Alcalde Aldea y cols): 318-323. Almería, 2008.

GÓMEZ MARTÍN, A., AMORES, J, CORRALES, J.C., CONTRERAS, A., SANCHEZ, A., PORRAS, S., MARTINEZ PARRA, J., DE LA FE, C. 2009. Detection of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in different anatomical locations of carriers goats bucks headphone asymptomatic. Mycoplasmaology, a review of developments over the last decade, Gran Canaria, Spain, 10-12 junio.

GÓMEZ-MARTÍN, A., AMORES, J., CORRALES, J.C., SÁNCHEZ, A., CONTRERAS, A., DE LA FE, C. 2011. Effect of marbofloxacin intramuscular treatment on the presence of mycoplasma carriers and seminal quality of goat bucks. IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk. Atenas (Grecia).

AMORES J., **GÓMEZ-MARTÍN, A.**, CORRALES, J.C., SÁNCHEZ, A., CONTRERAS, A., DE LA FE, C. 2011. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* detected in semen of goat bucks. IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk. Atenas (Grecia).

GÓMEZ-MARTÍN, A., CÁDENAS, J., PATERNA, A., VIEIRA, L., AMORES, J., PRATS VD HAM, M., RABAL, F., CARRIZOSA, J., GADEA, J., DE LA FE, C. 2013. Viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* en eyaculados de machos caprinos y su influencia en la viabilidad espermática. XXXVIII Jornadas Científicas y XIV Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Málaga (España).

PATERNA, A., **GÓMEZ MARTÍN, A.**, TATAY-DUALDE, J., ANDRADE, J.D., AMORES, J., SANCHEZ-BARO, A., CORRALES, JC., SÁNCHEZ, A., CONTRERAS, A. Y DE LA FE C. 2013. Programa de vigilancia de *Mycoplasma* spp. en rebaños caprinos y sementales de la raza malagueña. XXXVIII Jornadas Científicas y XIV Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Málaga (España).

GÓMEZ-MARTÍN A; SAGNE, E ; BARANOSKI, E; DE LA FE, C ; CITTI, C. Etude de la variabilité génétique de souches caprines de *Mycoplasma agalactiae* dans le sud-est de l'Espagne par MLST. 2014. 6^{ème} Colloque International Francophone de Microbiologie Animale (CIFMA). Toulouse. France.

GÓMEZ-MARTÍN A ; CEBALLOS, D ; CADENAS, J ; PATERNA, A; PRATS-VAN DER HAM, M; TATAY-DUALDE, J; AMORES, J; CORRALES, C.J; SANCHEZ, A; CONTRERAS, A; DE LA FE, C. 2014. Viabilité de *Mycoplasma agalactiae* dans les doses séminales caprines traitées à la marbofloxacin. 6^{ème} Colloque International Francophone de Microbiologie Animale (CIFMA) (Comunicación oral).

GOMEZ-MARTIN A, SAGNE E, PATERNA A, PRATS-VAN DER HAM M, BARANOWSKI E, TATAY-DUALDE J, AMORES J, CORRALES JC, SANCHEZ A, CONTRERAS A, CITTI C, DE LA FE C. 2014. External auricular canal: a suitable body site for the detection of asymptomatic animals carrying mycoplasma species responsible for contagious caprine agalactia in endemic areas. International Organisation for Mycoplasmaology. Blumenau, Brazil.

Comunicaciones presentadas en Congresos Nacionales:

GÓMEZ-MARTÍN, A., AMORES, J.; CORRALES, JC.; SÁNCHEZ, A. MARTÍNEZ-PARRA, J.; CONTRERAS, A. Y DE LA FE C. Vigilancia de *Mycoplasma agalactiae* en colectivos de sementales caprinos españoles. XXXV Jornadas Científicas Nacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Valladolid 2010 (España). (Comunicación oral premiada).

GÓMEZ MARTÍN, A., AMORES, J., BUENO, E. Programa de control de portadores de micoplasmas asociados a la agalaxia contagiosa caprina en sementales de la Raza Murciano-Granadina. I Congreso Nacional científico de alumnos de Veterinaria. 17,18 y 19 de Febrero, 2011, Murcia.

GÓMEZ-MARTÍN, A., GADEA, J., RABAL, F., DE ONDIZ, A., VIERA, L.A., SÁNCHEZ, A., DE LA FE, C. Viabilidad de *mycoplasma agalactiae* y *mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en dosis seminales de macho cabrío. XIV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza 2011. Publicación: AIDA. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, 434-436.

GÓMEZ-MARTÍN, A., UC, N., GADEA, J., DE ONDIZ, A., VIEIRA, L.A., AMORES, J., RABAL, F., DE LA FE, C. Influencia de *mycoplasma agalactiae* y *mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en la viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales de macho cabrío. XIV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza 2011. Publicación: AIDA. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, 431-433.

V. ABREVIATURAS

AC (CA): Agalaxia contagiosa (Contagious agalactia).

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme-Linked immunosorbent assay).

IA (AI): Inseminación artificial.

M: Mycoplasma

Ma: *Mycoplasma agalactiae*.

Mcc: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*.

Mmc: *Mycoplasmas mycoides* subsp. *capri*.

Mp: *Mycoplasma putrefaciens*.

OIE: Organización mundial de sanidad animal (World organization for animal health).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).

UFC/ ml (CFU/ ml): Unidades formadoras de colonias por mililitro (Colony forming unit per millilitre).

VI. AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, porque este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos 05693/PI/07 y 11785/PI/09.

Al Ministerio de Economía del Gobierno de España que ha financiado parte del trabajo mediante el proyecto AGL2013-44771-R.

Al Grupo de Investigación de Sanidad Caprina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por haberme brindado la oportunidad de aportar mi pequeño granito de arena al sector caprino. Sin duda, trabajar aquí ha sido una ilusión cumplida. Gracias por la acogida y sobre todo por la confianza.

A mis jefes, Juan Carlos Corrales, Christian De la Fe, Antonio Sánchez y Antonio Contreras. Gracias por la confianza depositada en mi siempre. A ellos les deberé siempre mi forma de trabajo como investigador y la mayoría de mis conocimientos sobre los pequeños rumiantes. Para mí trabajar con ellos siempre fue un sueño cumplido del que estoy muy satisfecho. Gracias por el gran apoyo prestado pero sobre todo por vuestra sencillez y gran humanidad.

A Luis León Vizcaíno y a María José Cubero Pablo por lo bien que me han acogido dentro del Departamento de Sanidad Animal y por la ayuda prestada siempre que se les ha necesitado.

Al doctor Joaquín Amores Iniesta que ha participado de forma activa en este trabajo. Porque en él encontré a un ejemplar compañero de trabajo pero sobre todo a un gran amigo. Gracias por toda la ayuda prestada, por las risas que siempre nos hicieron tan amenas las largas horas dentro del laboratorio y por los grandes momentos vividos en los congresos.

A nuestros nuevos compañeros del Grupo de Investigación, Juan y Miranda, que han demostrado una gran capacidad de trabajo pero sobre todo entusiasmo por lo que hacen. Gracias por vuestra gran amistad y grandes momentos dentro y fuera del trabajo.

A José Martínez-Parra, técnico de laboratorio de Sanidad Animal porque su profesionalidad y asesoramiento han sido claves para la realización de este trabajo y para solucionar problemas. Gracias por todo lo que me has enseñado y por tu gran amistad.

A Silvia Porras Pérez y Daniel Riquelme, técnicos de laboratorio del Grupo de Investigación de Sanidad de Rumiantes. Su ayuda resultó fundamental para el desarrollo de este trabajo y en ellos también encontré a dos buenos amigos en los que apoyarme siempre.

A los miembros del grupo de Investigación de micoplasmosis ENV-T-INRA 1225 de la Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse donde pasé 11 meses de estancia investigadora porque sin duda, gracias a su modelo de trabajo y a sus enseñanzas, me han hecho mejorar como investigador. Gracias por la gran acogida que me disteis y por las grandes amistades que de esta estancia se han derivado.

A los veterinarios Isabel Ruiz López y Fernando Rabal del Centro de Recogida de Semen de la Asociación de Criadores de la Raza Murciano-Granadina (ACRIMUR), por los consejos y la ayuda prestada para la obtención de semen diluido libre de micoplasmas que ha sido requerido en el presente trabajo.

A los Veterinarios David Andrade de la Asociación Nacional de la Cabra Malagueña (CABRAMA), Pedro Martínez y Francisco Moya del Núcleo de Control Lechero de la Región de Murcia (NUCOLEMUR) y Jorge Castillo, de la Asociación Española de la Cabra Murciano Granadina (ACRIMUR). Gracias por toda la disposición a colaborar con nosotros y por vuestro ejemplar compañerismo y profesionalidad. Gracias también a los ganaderos de dichas asociaciones ya que sin su colaboración, ningún avance científico en este sector sería posible.

A todos los veterinarios y personal de los centros de inseminación artificial que han colaborado en este trabajo prestando todo su apoyo.

Al Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas por toda la disposición y ayuda ofrecida a la hora de realizar la recogida de muestras en la Sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. Al profesor de dicho departamento Antonio Buendía, cuya profesionalidad apoyó sin duda el segundo estudio de esta Tesis Doctoral. Al profesor Jose María Vázquez, por el asesoramiento aportado a la hora de recoger las muestras durante las necropsias.

A mis grandes amigos y amigas, que me han apoyado totalmente a la hora de embarcarme en este trabajo y que siempre han sabido de lo importante que ha sido para mí trabajar en este proyecto.

A mis perras, ya que paseando con ellas salieron no pocas ideas plasmadas en este trabajo y numerosas soluciones al cotidiano ensayo y error de la investigación.

A mis padres y hermanos, que también han vivido este trabajo con la misma ilusión que yo. Gracias por enseñarme a perseguir un sueño y trabajar al máximo por él.

A Ana, que siempre ha sentido la misma pasión por las cabras que yo. Porque en ella he encontrado a mi alma gemela. Gracias por ayudarme en todo y por estar siempre a mi lado.

A la Casa de la Panda, en Alpera (Albacete). Porque allí empezó un buen día mi admiración por las cabras y las ovejas.