



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Agalaxia Contagiosa y Calidad de la Leche en la
Raza Caprina Majorera

D. Aldo Román Gutiérrez Llanos
2015



**UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA
Dpto. de Sanidad Animal**

TESIS DOCTORAL

**AGALAXIA CONTAGIOSA Y CALIDAD DE LA
LECHE EN LA RAZA CAPRINA MAJORERA**

**Aldo Román Gutiérrez Llanos
Murcia, 2015**



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

**AGALAXIA CONTAGIOSA Y CALIDAD DE LA
LECHE EN LA RAZA CAPRINA MAJORERA**

Tesis Doctoral presentada por D. Aldo Román Gutiérrez Llanos

Dirigida por el Prof. Dr. D. Christian de la Fe Rodríguez y el Dr. D.
Ángel Gómez-Martín

El Director

El Director

El Doctorando

Murcia, 2015.

A Begoña



Índice

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	2
II. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. AGALAXIA CONTAGIOSA	7
1.1 TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE LOS MICOPLASMAS	7
1.2. ETIOLOGIA	8
1.3. EPIDEMIOLOGIA	9
1.3.1. Distribución	9
1.3.2. Factores de riesgo	10
1.3.3. Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	11
1.4. SIGNOS CLÍNICOS	15
1.5. PATOGENIA	17
1.6. LESIONES	22
1.7. DIAGNÓSTICO	24
1.7.1. Diagnóstico clínico	24
1.7.2. Diagnóstico laboratorial	25
1.7.2.1. Métodos directos	26
1.7.2.1.1. Aislamiento e identificación	26
1.7.2.1.2. Detección genómica	28
1.7.2.1.3. Técnicas de inmunohistoquímica	30
1.7.2.2. Métodos indirectos	31
1.8. PREVENCIÓN Y CONTROL	32
2. AGALAXIA CONTAGIOSA Y CALIDAD DE LA LECHE	38
2.1. INTRODUCCIÓN	38
2.2. CALIDAD Y RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (RCS)	38
2.3. CALIDAD Y RECUENTO DE BACTERIAS TOTALES	41
2.4. LA INFECCIÓN POR MICOPLASMAS Y LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA	43
2.5. LA CALIDAD DE LA LECHE Y SU USO INDUSTRIAL	46
2.6. FACTORES QUE AFECTAN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO Y AL DIAGNÓSTICO EN LAS MUESTRAS DE LECHE DE CABRA	49
IV. EXPERIENCIA 1: ESTUDIO ETIOLÓGICO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA EN LA ISLA DE LANZAROTE	51

E1.1. INTRODUCCIÓN	51
E1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	52
E1.2.1. Diseño del estudio	52
E1.2.1.1. Población de estudio y procesado de las muestras	52
E1.2.1.2. Identificación de los aislamientos	58
E1.2.1.2.1. Identificación de <i>Mycoplasma</i> spp.	59
E1.2.1.2.1.1. Pasos preliminares	59
E1.2.1.2.1.2. Identificación bioquímica	59
E1.2.1.2.1.3. Producción de películas y cristales	63
E1.2.1.2.1.4. Identificación molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
E1.2.1.2.2. Identificación de otras bacterias	65
E1.2.1.2.2.1. Características culturales	65
E1.2.1.2.2.2. Coloración o tinción de Gram	65
E1.2.1.2.2.3. Pruebas enzimáticas	66
E1.2.1.2.2.3.1. Prueba de la catalasa	66
E1.2.1.2.2.3.2. Prueba de la oxidasa	66
E1.2.1.2.2.3.3. Prueba de la coagulasa	67
E1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
V. EXPERIENCIA 2: AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA Y CALIDAD DE LA LECHE EN ÁREAS ENDÉMICAS	79
EXPERIENCIA 2.A: PRESENCIA DE <i>MYCOPLASMA</i> SPP. Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA LECHE	79
E2.A.1. INTRODUCCIÓN	79
E2.A.2. MATERIAL Y MÉTODOS	80
E2.A.2.1. Diseño del estudio, rebaños y estatus respecto a Mycoplasma spp.	80
E2.A.2.2. Muestras de leche del tanque	81
E2.A.2.3. Calidad de la leche: Parámetros estudiados	81
E2.A.2.3.1. Calidad microbiológica	81
E2.A.2.3.2. Calidad físico-química	82
E2.A.2.3.3. Análisis estadístico	82
E2.A.3. RESULTADOS Y DISCUSION	82

E2.B EFECTO DE UN BROTE AGUDO DE AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA SOBRE EL VOLUMEN DE LECHE PRODUCIDO:	
INTRODUCCIÓN	90
E2.B.1. INTRODUCCIÓN	90
E2.B.2 MATERIAL Y MÉTODOS	91
E2.B.2.1. Características del rebaño seleccionado	91
E2.B.2.2. Monitorización de la AC en el rebaño previa al brote clínico y descripción del mismo.	93
E2.B.2.3. Monitorización del volumen de leche producido y análisis estadístico	98
E2.B.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
E.2 MATERIAL SUPLEMENTARIO	108
VI. CONCLUSIONES	121
VII. RESUMEN	123
VIII. AGRADECIMIENTOS	127
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	130



I. Abreviaturas

I. ABREVIATURAS

AC	Agalaxia contagiosa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
BTM	Leche de tanque
Ca	Calcio
CAEV	Virus de la artritis encefalitis caprina
CS	Células somáticas
CO₂	Dióxido de carbono
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Inmunoensayo ligado a enzima)
<i>et al</i>	y colaboradores
HCl	Ácido clorhídrico
ICE	Elemento integrativo conjugativo
IS	Secuencia de inserción
IppA	Lipoproteína IppA (Grupo <i>M. mycoides</i>)
Ma	<i>Mycoplasma agalactiae</i>
Marg	<i>Mycoplasma arginini</i>
Mcc	<i>Mycoplasma capricolum</i> subs. <i>capricolum</i>
Mg	Magnesio
Mmc	<i>Mycoplasma mycoides</i> subs. <i>capri</i>
MLST	Secuencia multilocus
Mp	<i>Mycoplasma putrefaciens</i>
MV	Maedi-Visna
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
pH	Menos logaritmo de la concentración de protones
PH	Medio de cultivo especial para micoplasmas
PL	Plasma
RCS	Recuento de células somáticas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ECN	Estafilococos coagulasa negativos
SPC	Recuento de bacterias en placa
uvrC	gen <i>uvrC</i>
Vmc	Lipoproteínas de superficie variables de <i>Mcc</i>
Vpma	Lipoproteínas de superficie variables de <i>Ma</i>
VNTR	Número de repeticiones variables en tándem
µm	Micrómetro



II. Introducción y objetivos

II. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las islas Canarias, el sector ganadero mayoritario es el caprino y su censo más reciente, facilitado por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias en el año 2012 cifra la cabaña caprina de las islas en unas 315.856 cabezas, datos que sitúan a la comunidad entre las que poseen uno de los censos caprinos más importantes, representando aproximadamente el 10% del total del país (Fuente: MAPA, 2012). Estos datos indican la importancia del ganado caprino en el sector primario de las islas, más allá incluso del que puede reflejar el propio número de animales y rebaños.

En este contexto, la mamitis, inflamación de la glándula mamaria que, generalmente, se produce como respuesta defensiva ante una infección, constituye la patología más importante en los rumiantes de aptitud láctea por sus repercusiones económicas. En el ganado caprino, un elevado número de microorganismos puede participar en su etiología, si bien en los últimos años, diversos trabajos han constatado la importancia emergente de diversas especies de *Mycoplasma* spp. asociadas a la agalaxia contagiosa (AC) en dichos procesos. Esta enfermedad, de distribución mundial, se considera endémica en la casi totalidad de los países del área mediterránea, y los trabajos realizados también parecen confirmar este estatus epidemiológico en las islas Canarias.

En el ámbito sanitario de la ganadería caprina, el estudio y posterior puesta en marcha de planes control de los procesos mamíticos clínicos y fundamentalmente subclínicos es fundamental para que el sector pueda seguir evolucionando hacía cotas productivas mayores, por lo que la escasez de datos epidemiológicos referentes a esta infección en la raza majorera supone una limitación para el desarrollo de planes eficaces de control. Además, resulta de mucho interés evaluar el efecto que puede ocasionar la presencia de estos microorganismos en la calidad de la leche, 1) tanto en la producida en las explotaciones crónicamente infectadas por los micoplasmas, que pudieran

inducir a cambios en los parámetros físicos-químicos de la leche, como 2) en aquellas que se ven afectadas por un episodio clínico de la enfermedad y ven reducida la producción láctea del rebaño drásticamente.

Por ello, los objetivos concretos del presente trabajo de Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Estudiar la presencia de los agentes asociados a la agalaxia contagiosa en el ganado caprino de la raza majorera de la isla de Lanzarote.
2. Evaluar el efecto de la presencia de infecciones crónicas por *Mycoplasma* spp. sobre la calidad de la leche del tanque de las explotaciones infectadas.
3. Evaluar el efecto de la presentación de un episodio clínico de agalaxia contagiosa sobre el volumen de leche producido en el rebaño.



III. Revisión bibliográfica

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

AGALAXIA CONTAGIOSA y CALIDAD DE LA LECHE

1. AGALAXIA CONTAGIOSA

1.1 TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE LOS MICOPLASMAS

La agalaxia contagiosa (AC) de los pequeños rumiantes es una enfermedad originada por cuatro especies diferentes del género *Mycoplasma*, pertenecientes a la clase *Mollicutes*. Dentro de esta clase, el género *Mycoplasma* es probablemente el de mayor relevancia, por lo que de forma general se identifica el término *Mollicutes* con *Mycoplasma*. El subcomité para la taxonomía de los *Mollicutes* aceptó en 2003 la taxonomía revisada de esta clase que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cuadro taxonómico

División IV <i>TENERICUTES</i>
Clase I <i>MOLLICUTES</i>
Orden I <i>MYCOPLASMATALES</i>
Familia <i>MYCOPLASMATACEAE</i>
Género <i>MYCOPLASMA</i>
Género <i>UREAPLASMA</i>
Orden II <i>ENTOMOPLASMATALES</i>
Familia I <i>ENTOMOPLASMATACEAE</i>
Género <i>ENTOMOPLASMA</i>
Género <i>MESOPLASMA</i>
Familia II <i>SPIROPLASMATECEAE</i>
Género <i>SPIROPLASMA</i>
Orden III <i>ACHOLEPLASMATALES</i>
Familia I <i>ACHOLEPLASMATACEAE</i>
Género <i>ACHOLEPLASMA</i>
Orden IV <i>ANAEROPLASMATALES</i>
Familia <i>ANAEROPLASMATACEAE</i>
Género <i>ANAEROPLASMA</i>
Género <i>ASTEROLEPLASMA</i>

Taxonómicamente, se considera un grupo con entidad suficiente como para englobarlo en una división aparte, *Tenericutes*, que presenta 1 clase, 4 órdenes y 8 géneros distintos (Miles y Nicholas, 1998).

1.2. ETIOLOGIA

La AC es una enfermedad que afecta a los pequeños rumiantes, principalmente, de actitud lechera, en la que intervienen cuatro especies de *Mycoplasma*, destacando *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) como el agente asociado más frecuentemente a la enfermedad en el ganado caprino y ovino (Corrales *et al.*, 2007). Las otras tres especies asociadas a la enfermedad y en orden decreciente en función de su implicación son *Mycoplasma mycoides* subs. *capri* (*Mmc*), *Mycoplasma capricolum* subs. *capricolum* (*Mcc*) y *Mycoplasma putrefaciens* (*Mp*), (Bergonier *et al.*, 1997; Chazel *et al.*, 2010). En este sentido, uno de los agentes causales de la AC, previamente definido como *M. mycoides* subs. *mycoides* large colony (LC), ha sido reclasificado como *Mmc* sobre la base de datos filogenéticos obtenidos (Manso-Silván *et al.*, 2007 y 2009; Shahram *et al.*, 2010).

Los micoplasmas son las bacterias de menor tamaño y vida libre que se conocen y no disponen de pared celular debido a su incapacidad para la síntesis de peptidoglucanos. Este pequeño tamaño, unido a la enorme flexibilidad de su membrana plasmática, es aprovechado en el laboratorio para eliminar contaminaciones en medios de cultivo ya que le permite atravesar filtros de 0.45 μm y 0.22 μm . Debido al pequeño tamaño de su genoma, los micoplasmas presentan limitaciones a la hora de poder codificar las proteínas implicadas en su escaso metabolismo celular, por lo que se hace necesario la utilización de medios ricos en esteroides y grandes cantidades de colesterol como componentes de la membrana plasmática (Rapaport y Levinshon, 1993; Corrales *et al.*, 2007). A pesar de las limitaciones de su genoma, disponen de herramientas que les permiten una extraordinaria capacidad de variación antigénica, gracias a sistemas de genes que codifican lipoproteínas de superficie variables (Razin *et al.*, 1998; Flitman-Tene *et al.*, 2000).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

1.3.1. Distribución

La AC está considerada endémica en muchos países y presenta una distribución mundial, aunque debido a la falta de datos concretos del número de individuos y rebaños infectados en las diferentes regiones geográficas, es realmente difícil valorar el impacto de la enfermedad y su repercusión en la sanidad de los rebaños en las áreas endémicas. La cuenca mediterránea ha sido declarada como endémica de la enfermedad desde 1987. No obstante, muchos países de la misma no han confirmado de forma oficial la enfermedad o la extensión de la misma, pese a que la literatura científica haya dado constancia de ello en alguno de los mismos. Diversas regiones de África y Asia son consideradas también como endémicas (Bergonier *et al.*, 1997; Corrales *et al.*, 2007).

Se trata de una enfermedad que pertenece a la antigua lista B de la OIE y que debe ser comunicada anualmente de forma obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (Corrales *et al.*, 2007). En España, se trata de una enfermedad de declaración obligatoria (Orden APA/ 1668/ 2004), y se han descrito brotes de la enfermedad ocasionados por las cuatro especies de micoplasmas (Talavera *et al.*, 1980; Gil *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c y 2003; De la Fe *et al.*, 2007a).

En Extremadura, Gil *et al.*, (1999b) destacaron la mayor prevalencia de los brotes causados por *Ma*, seguidos de los ocasionados por *Mmc*. De igual modo, *Ma* es la especie responsable de la mayoría de los brotes descritos en el País Vasco y Navarra (Pérez *et al.*, 1996). Villalba *et al.*, (1991) han descrito la enfermedad en el sur de España, y en la Región de Murcia se han realizado diversos trabajos que han podido constatar la presencia de *Ma* y *Mmc* en muestras de leche de cabra. Algunos de estos estudios han puesto en evidencia el estado de cronicidad que adopta la AC en estas zonas endémicas, en donde la ausencia de sintomatología aparente y la presencia de animales

portadores asintomáticos, son los factores más llamativos (Contreras *et al.*, 2008; Gómez Martín *et al.*, 2013a).

En las Islas Canarias también ha sido descrita y se considera endémica actualmente. La primera descripción fue en los años 90 (Villalba *et al.*, 1992) y posteriormente se realizaron otros hallazgos (Rodríguez *et al.*, 1994a; Real *et al.*, 1994; De la Fe *et al.*, 2005a y 2007a), estando actualmente considerada como uno de los grandes problemas que afectan a la población caprina del archipiélago. En este sentido, la isla de Lanzarote fue seleccionada para el presente estudio teniendo en cuenta que estudios anteriores fueron capaces de confirmar su estatus endémico respecto a esta enfermedad (Assuncao *et al.*, 2004; De la Fe *et al.*, 2007a).

1.3.2. Factores de riesgo

La AC es una enfermedad multifactorial, ya que además de los factores ligados al propio agente etiológico, está condicionada por el manejo, el sistema de explotación, las condiciones ambientales y factores de los propios individuos como condición genética, edad, estado inmunitario, etc. (DaMassa, 1992). Algunos autores (Bergonier *et al.*, 1997) indican que el ganado ovino está menos predispuesto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad en comparación con la cabra. En referencia a la edad, los individuos jóvenes son los más sensibles a la enfermedad, sobre todo los lactantes. Las hembras en lactación, es uno de los colectivos más afectados, ya que el ordeño supone la forma más importante de transmisión de la infección en condiciones de campo por vía galactófora (Perreau, 1979; Damassa *et al.*, 1986; Rodríguez *et al.*, 1994b).

El estado inmunitario del rebaño puede influir en la aparición de sintomatológica asociada a la enfermedad, observándose en algunos estudios una disminución de las manifestaciones clínicas en aquellos rebaños re infectados o vacunados (Foggie *et al.*, 1970; Taoudi *et al.*, 1987). Por otro lado, la tendencia de las explotaciones hacia una producción cada vez más

intensiva aumenta la sensibilidad de los rebaños, merced al aumento de la densidad de animales con los que se trabaja, la bajada del estado inmunitario de los individuos por factores estresantes y la intensificación de las rutinas de ordeño (Consenti y Montagna, 1989; Bergonier *et al.*, 1997).

A pesar de que la enfermedad ha sido estudiada durante años, varios son aun los factores de riesgo que precisan ser examinados en próximos estudios. Por un lado, no se conocen las consecuencias reales de la coexistencia de varias especies de micoplasmas (patógenas, apatógenas u oportunistas) en el mismo animal o rebaño (Gómez-Martín *et al.*, 2012), lo que supone un factor de riesgo para la transferencia horizontal de material genético entre las mismas de imprevisibles consecuencias. Por otro lado, será necesario profundizar en el papel epidemiológico de los portadores asintomáticos, principales responsables de que el movimiento de animales suponga un factor de riesgo estadísticamente significativo para la propagación de la infección (Al-Momani *et al.*, 2008). Finalmente, no debería ser obviado el riesgo potencial de transmisión de AC de los animales salvajes a los pequeños rumiantes domésticos y viceversa (Gómez-Martín *et al.*, 2013a).

1.3.3. Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

La principal vía de transmisión entre los rebaños es la introducción de animales procedentes de otras explotaciones que son portadores de micoplasmas y la utilización de zonas de pastoreo compartidas. Dentro de un rebaño, las principales vías de transmisión son a través del contacto directo, el amamantamiento y el ordeño (Bergonier *et al.*, 1997).

Los animales enfermos son la principal fuente de contagio dentro del rebaño. Las vías de excreción de micoplasmas más importantes en estos individuos son la leche y las secreciones respiratorias, y en menor medida las secreciones oculares, heces, orina, secreciones vaginales y genitales (Nicholas, 1995; Bergonier *et al.*, 1997) o incluso el semen (De la Fe *et al.*, 2009).

Se puede producir un contagio horizontal entre animales sanos y clínicamente afectados (Perreau, 1977) pudiendo ser directo o indirecto. Los aerosoles respiratorios constituyen una importante fuente de transmisión directa entre los individuos de un rebaño. La transmisión indirecta es muy frecuente en el ordeño, ya que muchas hembras presentan una excreción a través de la leche merced al tropismo mamario de los micoplasmas (Damassa *et al.*, 1987a; Esnal *et al.*, 1994; Bergonier *et al.*, 1997). Así pues, la transmisión horizontal en el ordeño constituye la principal vía de transmisión entre cabras en lactación. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha podido observar que *Ma* se puede encontrar presente en los exudados purulentos de senos y demás conductos glandulares mamarios, haciendo de estas secreciones lácteas una importante fuente de contagio (Rodríguez *et al.*, 2002).

Esta forma de contagio se ve favorecida si existe un mal funcionamiento de la máquina de ordeño y un mal manejo en la rutina del mismo (Corrales *et al.*, 2007). La combinación de la excreción mamaria y respiratoria elevan al máximo las posibilidades de contagio dentro del rebaño (Perreau, 1979; Damassa *et al.*, 1986).

Aunque se ha sospechado (Miege, 1978) sobre la capacidad de los micoplasmas para persistir en el ambiente de forma transitoria, lo cierto es que se trata de microorganismos sensibles al calor, a los detergentes y la luz ultravioleta (Bergonier *et al.*, 1997). También se ha estudiado la posibilidad de un contagio a través de vectores biológicos como ácaros, pulgas, garrapatas y moscas y algunos autores han conseguido aislar micoplasmas asociados a estos parásitos (Cottew, 1982; Nayak *et al.*, 1990; Damassa *et al.*, 1991; Bergonier *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 2009).

En el caso de los rumiantes salvajes, se han detectado brotes clínicos causados por *Ma* y *Mmc* en diferentes especies como el íbice ibérico (*Capra pyrenaica*) (Verbisck *et al.*, 2008, 2010.), en la cabra salvaje de los Alpes (*Capra ibex*) (Chazel *et al.*, 2010; Giangaspero *et al.*, 2010) y el rebeco (Tardy *et al.*, 2012). Se ha informado también de la existencia de neumonía asociada

a *Mcc* en el marjor (*Capra falconeri*) (Ostrowski *et al.*, 2011). La aparición de estos brotes en rumiantes silvestres se ha relacionado con la interacción que existe con especies domésticas al compartir tierras de pastoreo y abrevaderos, los movimiento de ganado, las alta densidad de rumiantes silvestres, las condiciones climáticas desfavorables y la disponibilidad de fuentes de forraje compartida (Verbisck *et al.*, 2008; Ostrowski *et al.*, 2011). Es necesario seguir trabajando para aclarar el papel de los rumiantes silvestres en la epidemiología de AC en ovejas y cabras domésticas (Gómez-Martín *et al.*, 2013a).

Dentro de la epidemiología de la enfermedad, en el ganado caprino cobra especial interés el conocimiento del papel desempeñado por los portadores auriculares asintomáticos. Las cuatro especies de *Mycoplasma* involucradas en la AC pueden ser identificadas en el canal auditivo externo de cabras, tanto en animales con enfermedad clínica como en animales asintomáticos (Bergonier *et al.*, 1997). Los individuos asintomáticos de la enfermedad suelen ser incluso serológicamente negativos, por lo que podrían suponer una importante fuente de contagio para el resto de individuos de un rebaño difícilmente detectables. Se sospecha que estos portadores suponen la principal vía de entrada de los microorganismos en rebaños indemnes (Damassa *et al.*, 1991; De la Fe *et al.*, 2005a), habiéndose descrito brotes de AC tras la entrada de animales aparentemente sanos en los mismos (Hazell *et al.*, 1985). Portadores de *Ma* y *Mmc* también se han detectado en las poblaciones de cabra salvaje de los Alpes (*Capra ibex*) (Chazel *et al.*, 2010).

Algunos estudios han puesto de manifiesto el importante papel que juegan estos individuos en la epidemiología de la enfermedad. Gil *et al.*, (1999c) evaluaron la presencia de micoplasmas en el canal auditivo externo de cabras afectadas con AC con el objetivo de establecer la asociación entre los aislamientos en canal auditivo externo y la etiología de los 40 brotes que estudiaron. Se identificaron micoplasmas en oídos procedentes de 21 rebaños (52% de los brotes) siendo *Ma* la especie con mayor incidencia, seguida de *Mmc*. En 15 de los 21 brotes (71%) el micoplasma responsable del mismo coincidía con el aislado en el oído.

Varias hipótesis han sido citadas para explicar la localización de *Mycoplasma* spp. en el oído como son: en primer lugar su propagación por vectores, tales como los ácaros que se alimentan de sangre (Cottew y Yeats, 1982; Damassa y Brooks, 1991); la presencia de *Mp* se correlaciona con la presencia de ácaros en el conducto auditivo externo (Otero *et al.*, 2009); en segundo lugar, debido a que se han observado infecciones simultáneas del oído medio y del canal auditivo externo en cabras (Cottew y Yeats, 1982), es contemplada también la hipótesis de una propagación de la infección hacia el oído externo a través de lesiones en la membrana timpánica (Gómez-Martín *et al.*, 2013b). En efecto, esta es una forma de colonización que ya ha sido descrita en *M. bovis* (Walz *et al.*, 1997); en tercer lugar se contempla también una propagación a través de la trompa de Eustaquio, que permite la propagación de *Mmc* desde el sistema respiratorio hasta el oído medio (Gómez-Martín *et al.*, 2012a.); tras la infección experimental, *Mmc* es capaz de colonizar el oído a través de la ruta oronasal (Damassa y Brooks, 1991); y finalmente en cuarto lugar, a través del torrente sanguíneo; después de la infección experimental en ausencia de ácaros, el conducto auditivo externo aparece colonizado por *Ma* tras la circulación sistémica del microorganismo (De la Fe *et al.*, 2011). En este sentido, en infecciones naturales, también se ha confirmado la presencia de portadores auriculares con infecciones sistémicas que afectaban de forma crónica a diversas localizaciones como sistema respiratorio, genitourinario y nervioso (Gómez-Martín *et al.*, 2012a).

Otro mecanismo de transmisión factible es el vertical, siendo la transmisión al neonato a través de la leche y calostro, un hecho constatado por diversos autores, constituyendo la principal fuente de transmisión de la enfermedad a la descendencia. Todo ello, hace que la leche y el calostro puedan suponer una fuente de contagio horizontal en aquellos casos en los que sean utilizados para ser suministrados de forma colectiva (Perreau *et al.*, 1977 y 1979; Damassa *et al.*, 1983; Taudi *et al.*, 1987).

Los últimos estudios sobre el papel del macho caprino en la epidemiología de la enfermedad han permitido sugerir la posibilidad de la transmisión venérea de la AC al menos en esta especie (Gómez-Martín *et al.*, 2013a). Varios son los indicios sobre los que se fundamenta esta hipótesis: en

primer lugar el aislamiento de *Ma* y *Mmc* en semen de machos infectados de forma natural (De la Fe *et al.*, 2009b; Gómez-Martín *et al.*, 2012b) supone un riesgo real de propagación. En segundo lugar, ha podido ser observada la capacidad de especies de micoplasmas como *Mp* o *Mmc* para colonizar y lesionar el tracto reproductivo femenino (Gil *et al.*, 2003; Szeredi *et al.*, 2003). En tercer lugar, estudios experimentales han constatado además la capacidad de *Ma* para crecer de forma exponencial en los eyaculados, que constituyen por tanto una secreción idónea para su propagación a la hembra (Gómez-Martín *et al.*, 2015). El hecho de que este estudio observara también la capacidad de *Ma* y *Mmc* para sobrevivir en concentraciones infectivas en el semen diluido, convierte a la inseminación artificial en una posible fuente de transmisión hasta ahora no contemplada ya que especies como *Ma*, *Mmc* y *Mcc* han sido identificadas en machos presentes en centros de selección (Amores *et al.*, 2011a; De la Fe *et al.*, 2010).

Algunos autores sugirieron un tropismo urogenital de las especies involucradas en la AC posiblemente subestimado (Gil *et al.*, 2003). Así se ha podido identificar e incluso aislar *Ma*, *Mmc* y *Mp* en varios sitios en el tracto reproductivo masculino, incluyendo los testículos, las glándulas bulbouretrales y el prepucio de machos infectados de forma natural (Gil *et al.*, 2003; De la Fe *et al.*, 2010; Gómez- Martín *et al.*, 2012a, 2012b).

1.4. SIGNOS CLÍNICOS

La sintomatología de la enfermedad se caracteriza por la aparición de la triada clásica donde las mamitis, las queratoconjuntivitis y las artritis, constituyen los principales síntomas de la enfermedad. No obstante, resulta difícil observar todos estos signos afectando a un mismo animal, apareciendo comúnmente en el conjunto del rebaño (Corrales *et al.*, 2007). Otros síntomas que pueden caracterizar la presentación clínica de la enfermedad son la presencia de trastornos de la reproducción como abortos y desordenes respiratorios, que se han observado en cabras infectadas por micoplasmas asociados a la AC (Bergonier *et al.*, 1997).

Podemos observar en la clínica de la AC cuadros agudos, subagudos y crónicos, generalmente estos dos últimos son más típicos de *Ma*, mientras que los cuadros agudos son más propios de *Mmc*, *Mp* y *Mcc* (Perreau, 1979; Nicholas, 1995). La variabilidad en los cuadros clínicos dependerá de la especie de micoplasma involucrada, de la especie animal afectada y de la inmunidad colectiva (Garrido *et al.*, 1982; Bergonier *et al.*, 1997; Madanat *et al.*, 2001).

En áreas endémicas de la enfermedad como España, algunos estudios (De la Fe *et al.*, 2005a; Amores *et al.*, 2012; Ariza *et al.*, 2012) han constatado altos porcentajes de rebaños infectados de hasta un 38,5 % (De la Fe *et al.*, 2005a) en los que la enfermedad se haya en un estado crónico asintomático. En estas infecciones crónicas, los rebaños de cabras lecheras presentan con mayor frecuencia mastitis subclínicas, donde los que los episodios de mastitis clínica son esporádicos. Estos cuadros suelen estar caracterizados por altas morbilidades y bajas mortalidades, afectando fundamentalmente a hembras en lactación y jóvenes lactantes (Contreras *et al.*, 1993a).

El primer síntoma de la enfermedad suele ser un aumento de la temperatura por encima de los 41°C, el cual suele pasar desapercibido y que es fruto de la micoplasmemia. Algunos autores hablan de un segundo pico de hipertermia cuando el micoplasma afecta a la glándula mamaria (Lebret, 1989). Otros autores (Nicholas, 1995) destacan la ausencia de pirexia en los estadios iniciales de los síndromes en los que interviene *Mp*. En general, el descenso en la producción láctea suele ser el primer síntoma que llama la atención del ganadero, junto con una infartación de los nódulos linfáticos retromamarios que se muestran aumentados de tamaño y calientes (Miege, 1978; Bergonier *et al.*, 1997).

En ocasiones se ve acompañado de un estado de decaimiento del animal, anorexia, postración o incluso diarrea, y que puede llevar a la muerte de aquellos animales más jóvenes o débiles. De forma anecdótica, ha podido ser evidenciado sintomatología nerviosa, lo cual sería coherente con el tropismo nervioso evidenciado en algunos estudios y que habría de ser contemplado en próximos estudios (Nayak y Bhowmik, 1990; Villalba *et al.*,

1992; Gil *et al.*, 1999a y 2003; Szeredi *et al.*, 2003; Gómez-Martín *et al.*, 2012a; Loria y Nicholas, 2013).

A continuación de esta fase inicial, se suele manifestar alguno de los signos clínicos de la triada sintomática clásica, y también es posible observar abortos, pero estos serán casos aislados dentro del rebaño, pudiendo observarse simultáneamente más de uno en el mismo. En muchas ocasiones, estos síntomas pasan inadvertidos tendiendo la enfermedad a un estado de cronicidad (Marco, 1988).

La enfermedad puede transcurrir en algunos casos de forma asintomática, suponiendo un peligro añadido, ya que producirá un contagio al resto de individuos de forma inadvertida, a la vez de reducir las medidas de control de la enfermedad por parte del ganadero y del veterinario de manera errónea (Corrales *et al.*, 2007). En áreas endémicas de la enfermedad, la presencia de rebaños crónicamente infectados constituye la forma más frecuente en que se manifiesta la infección, quedando los rebaños con brotes de la enfermedad relegados a casos en los que la infección entra por primera vez en la explotación o en aquellos rebaños con estados de inmunosupresión (Gómez-Martín *et al.*, 2013a).

1.5. PATOGENIA

En los jóvenes, la principal vía de entrada de los micoplasmas responsables de la AC es la vía oral, a través de la ingesta de leche y calostros. Mediante esta vía, también se pueden infectar individuos adultos al ingerir alimentos o agua contaminada con secreciones procedentes de individuos infectados. Generalmente, el contagio de los individuos adultos se produce principalmente a través de la vía mamaria. Se produce durante el ordeño cuando las cabras excretoras de micoplasmas en leche contaminan las pezoneras dando lugar a la propagación de las bacterias al resto del rebaño (Damassa, 1992; Corrales *et al.*, 2007).

Otra de las vías de entrada es la respiratoria tanto en adultos como en jóvenes, debido a los aerosoles procedentes de individuos infectados, mediante la vía oral o la respiratoria. Estas vías, junto a la mamaria, han sido utilizadas con éxito por diversos autores para inocular micoplasmas con el objetivo de reproducir experimentalmente la enfermedad (Taoudi *et al.*, 1987; Nayak y Bhowmik, 1990; Damassa, 1986 y 1992).

Otra forma de penetración de los micoplasmas en el organismo es a través de las mucosas conjuntivales, dando lugar a una rápida colonización de los nódulos linfáticos de drenaje de la conjuntiva, vía utilizada con éxito en inoculaciones experimentales (Sanchis *et al.*, 1998). Otras vías también han sido igualmente utilizadas por diversos autores para inocular micoplasmas con el objetivo de reproducir experimentalmente la enfermedad como la intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraarticular, intradérmica y genital (Bölske *et al.*, 1989; Bergonier *et al.*, 1997; Sanchis *et al.*, 1998 y 2000).

El período de incubación es el período transcurrido desde que el micoplasma entra en el organismo hasta que se producen los primeros síntomas y oscila entre los 7 días y los dos meses (Madanat *et al.*, 2001). Una vez los micoplasmas colonizan el organismo se produce una bacteriemia que es la causante de la fase febril de la que se ha hablado con anterioridad. Ya en sangre, se distribuyen por el organismo, originando una septicemia que puede dar lugar a lesiones en una gran variedad de órganos y alteraciones hematológicas. Estudios experimentales tras inoculaciones experimentales en cabritos, (Nayak y Bhowmik, 1990) han evidenciado leucopenias con disminución de neutrófilos, aumento en sangre de glucosa, fosfatasa alcalina y transaminasas junto con disminuciones del ratio albúmina/globulina. También se han podido constatar linfopenias, granulocitopenias y trombocitopenias. Esta bacteriemia transitoria llevará a los micoplasmas a colonizar aquellos órganos diana por los que tienen especial preferencia, tales como la glándula mamaria, articulaciones o mucosas conjuntivales (Rosendal, 1981., Gutiérrez *et al.*, 1999).

Los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos se basan entre otros en la capacidad de adhesión celular, la alteración de la respuesta inmune, citotoxicidad, secreción de toxinas, activación del complemento y activación de la cascada de coagulación (Razin, 1978; Rosendal *et al.*, 1984). Los micoplasmas han desarrollado durante su evolución y adaptación a un modo de vida parasitario diversos sistemas genéticos que les permiten la adhesión a los tejidos del huésped. Como parásitos extracelulares que son, necesitan de dicha adhesión a las células del organismo, sobre todo células epiteliales para beneficiarse de los productos del metabolismo de estas células. Para ello cuentan con proteínas de membrana entre las que destacan las adhesinas, además de diversas estructuras especializadas que se unen al ácido siálico de las células del hospedador, el cual actúa como receptor. Es de gran importancia para la supervivencia de los micoplasmas este mecanismo de adhesión, siendo un requisito previo para la posterior colonización e infección del organismo. La pérdida de esta capacidad de adherencia da lugar a una pérdida de la infectividad, por lo que está íntimamente relacionado con su virulencia (Kahane *et al.*, 1991; Koneman *et al.*, 1993).

La información detallada en los genes de las proteínas que intervienen en la citoadhesión (P1, PGPA, P30, P40, etc) y de sus propiedades moleculares ha sido estudiada por diversos autores (Baseman, 1996; Razin, 1998 y 1999; Friis *et al.*, 2003).

La citotoxicidad a que son sometidas las células parasitadas parece estar relacionada con los productos metabólicos citotóxicos, liberación de enzimas citotóxicas, producción de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. Este último resulta de los procesos de respiración de los micoplasmas, estando relacionado con la capacidad hemolítica de estas bacterias. También se han descrito casos de citotoxicidad sobre macrófagos, células NK y células T, lo que parece estar relacionado con la capacidad para evadir la respuesta inmune (Villemot *et al.*, 1962; Razin, 1978; Rosendal, 1984; Valdivieso-García *et al.*, 1989).

Se ha podido constatar que *Mmc* es capaz de originar endotoxinas pirogénicas, además de poseer un polisacárido superficial (el galactano) a modo de cápsula con gran importancia patogénica, ya que se relaciona con alteraciones endoteliales que conducen a la activación de la cascada de coagulación. Esta especie de micoplasma también es capaz de activar espontáneamente el complemento en ausencia de anticuerpos, originando la liberación de anafilotoxinas y otros mediadores de la inflamación (Villemot *et al.*, 1962; Rosendal *et al.*, 1984; Razin, 1998). Según Rosendal *et al.* (1984), la activación del complemento junto con las alteraciones endoteliales observadas, podrían justificar las coagulopatías propias de esta especie a la que antes se ha hecho alusión.

Los micoplasmas se valen también de la variación antigénica como herramienta para evadir el sistema inmunológico, gracias a la capacidad de cambiar rápidamente de superficie antigénica, alterando el carácter antigénico de sus componentes superficiales. Así, se favorece la colonización de los tejidos evadiendo la fagocitosis y el ataque de las inmunoglobulinas. En el caso de *Ma* se ha podido relacionar a la lipoproteína p48 con estos procesos inmunomoduladores (Dramsi *et al.*, 1993; Razin, 1998).

Otros mecanismos relacionados con la capacidad de los micoplasmas para evadir la respuesta inmune son la estimulación de linfocitos, monocitos y macrófagos, además de la inhibición de la producción de citoquinas (Razin, 1998; Chambaud *et al.*, 1999).

Por otra parte, y a nivel genético, se han utilizado diferentes técnicas para clasificar algunas cepas de *Ma* que circulan en Europa como el estudio de la secuencia de diversos genes altamente conservados (MLST), las repeticiones en tándem (VNTR) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (McAuliffe *et al.*, 2008, 2011; Manso Silvan *et al.*, 2012). En cabras, los estudios moleculares de aislamientos de *Ma* en un área endémica española de AC revelaron una alta diversidad genética (De la Fe *et al.*, 2012), en contraste con una diversidad genética relativamente baja en *Ma* de ovejas en Francia (Nouvel *et al.*, 2012), Italia (Tola *et al.*, 1999) y España (Ariza-Miguel *et al.*,

2013). Esta diversidad genética de *Ma* en cabras deberá ser considerada en el diseño de vacunas. Sin embargo, los signos clínicos desarrollados en cabras después de la inoculación experimental utilizando las bacterias de brotes clínicos, así como bacterias de aislamientos en animales asintomáticos, indican una falta de correlación entre la diversidad genómica y la patogenicidad en los aislamientos estudiados (Tardy *et al.*, 2011).

Los sistemas genéticos que permiten a los micoplasmas una alta frecuencia en la variación de los antígenos de superficie incluyen el *Vpma* en *Ma* y *Vmc* en *Mcc* (Glew *et al.*, 2000; Wise *et al.*, 2006). Los mecanismos moleculares que generan una alta variabilidad antigénica han sido revisados recientemente (Citti *et al.*, 2010). En *Ma*, la variación de fase *Vpma* no es necesaria para el establecimiento de la infección, pero puede influir en la supervivencia y persistencia del organismo (Chopra-Dewasthaly *et al.*, 2012). En referencia a este último aspecto, recientemente ha podido demostrarse la variación de los perfiles *Vpma* en cuestión de días, en dentro de un mismo individuo infectado e incluso la coexistencia de múltiples de estos perfiles en ovejas inoculadas experimentalmente (Baranowski *et al.*, 2014).

En la comparación de dos genomas de *Ma*, la mayoría de las diferencias eran atribuibles a elementos móviles genéticos, incluyendo elementos integrativos conjugativos (ICEs) y secuencias de inserción (IS), y elementos relacionados con las variables de expresión de las proteínas de superficie (Nouvel *et al.*, 2010).

La secuenciación genómica de *Ma* ha revelado la presencia de un profago parecido a uno identificado en *M. conjunctivae*, que se ha relacionado con brotes de queratoconjuntivitis en el Íbice alpino (*Capra ibex*) (Tardy *et al.*, 2012). Estos resultados apuntan a la naturaleza altamente dinámica de *Ma*. Varias secuencias de codificación identificadas en *Ma* se conservan en otras especies de micoplasmas de rumiantes, y algunos de estos fragmentos del genoma han estado implicados en la transferencia génica horizontal entre *Ma* y otros micoplasmas de rumiantes, tales como *M. bovis* y miembros del grupo *M. mycoides* (Skapski *et al.*, 2011).

1.6. LESIONES

En la glándula mamaria las lesiones pueden variar dependiendo de la gravedad del proceso, encontrando casos con simples mamitis catarrales, pudiendo llegar a inflamaciones purulentas.

Las mamitis catarrales se caracterizan por infiltrados inflamatorios en torno a acinis y conductos galactóforos, las inflamaciones purulentas se caracterizan por un infiltrado de macrófagos y neutrófilos en los conductos glandulares, en los alveolos, en los tejidos intersticiales y en los nódulos linfáticos. La consecuencia es por un lado un estado de agalaxia debida a la necrosis de los epitelios glandulares y por otro debido a la compresión mecánica ejercida por el parénquima fibrosado (Madanat *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002).

En el aparato respiratorio, las principales lesiones producidas por la enfermedad son las neumonías o las bronconeumonías intersticiales difusas. En muchos casos observamos neumonías caracterizadas por áreas de consolidación en lóbulos apicales y medios. También existen casos en los cuales es posible observar edemas pulmonares y espacios alveolares ricos en neutrófilos, macrófagos y células exfoliadas. Estas células inflamatorias también pueden aparecer en las paredes alveolares. También se pueden encontrar lesiones vasculares como vasculitis arteriales con necrosis de la pared vascular y trombosis pulmonar. En ocasiones encontramos nódulos linfáticos pulmonares hiperémicos y edematosos. En otros casos se observan un exceso de líquidos en cavidad pleural y adherencias fibrinosas de la pleura a la cavidad torácica y entre los propios lóbulos pulmonares. Todos estos descubrimientos se corresponden a las típicas lesiones de las pleuroneumonías fibrinosas o fibrinopurulentas en las que se alternan áreas de consolidación con otras atelectásicas, apareciendo exudados fibrinosos en uno o mas lóbulos pulmonares. También se han descrito bronquiectasias, pleuritis e incluso hemorragias pleurales en cabritos (Nayak y Bhowmik, 1990; Damassa *et al.*, 1992; Bajmocy *et al.*, 2000).

A nivel ocular, las lesiones oculares pueden variar desde simples queratoconjuntivitis, caracterizadas por congestiones de la conjuntiva y córnea, pudiendo mostrar infiltrados vasculares, llegando a queratitis ulcerativas, que en ocasiones se complican con perforaciones del globo ocular y salida de los humores, estas lesiones suelen ser más graves en los individuos jóvenes (Zavagli *et al.*, 1951; Fernández *et al.*, 1989; Nicholas, 1995; Madanat, 2001).

Las lesiones en las articulaciones se caracterizan por la aparición de edemas en el tejido conectivo periarticular. Se produce un engrosamiento de la cápsula articular, que puede presentar una membrana sinovial hiperémica y erosiones hemorrágicas del cartílago articular, donde encontramos abundancia de neutrófilos. La cavidad articular puede mostrar un aumento del líquido sinovial que puede exhibir un aspecto turbio o incluso hemorrágico con membranas de color amarillo grisáceo. El líquido sinovial afectado suele ser rico en leucocitos polimorfonucleares, fibrina y material necrótico. Se suele tratar de artritis fibrinopurulenta con hiperplasia del epitelio sinovial (Damassa, 1992; Rodríguez *et al.*, 1993; Nicholas, 1995; Madanat *et al.*, 2001).

Los micoplasmas que intervienen en el síndrome a raíz de los procesos septicémicos, son capaces de provocar lesiones en diversas localizaciones de los individuos afectados. Se ve afectado el sistema circulatorio, donde se han observado vasculitis y trombos, consecuencia de un daño circulatorio posiblemente por el efecto tóxico de los micoplasmas, también se han observado epicarditis, miocarditis y pericarditis fibrinosas. En diversos órganos y tejidos se han descrito inflamaciones como en hígado, riñón o peritoneo (Nayak y Bhowmik, 1990).

En el aparato reproductor se han constatado orquitis y vulvovaginitis en individuos inoculados experimentalmente. En este sentido, se ha descrito el aislamiento de *Ma* en cabras con vulvovaginitis (Singh *et al.*, 1975; Rosendal *et al.*, 1984; Nayak y Bhowmik, 1990; Damassa *et al.*, 1992; Ojo *et al.*, 1992; Szeredi *et al.*, 2003). También encontramos lesiones degenerativas en el oviducto en el útero y en testículos descritos en un brote de AC en Extremadura, el cual fue originado por *M. putrefaciens* (Gil *et al.*, 2003). En el

ganado ovino inoculado experimentalmente con *Mmc* se han observado balanopostitis y vulvovaginitis (Trichard *et al.*, 1993). No obstante, también ha sido descrita la presencia de ovejas con infecciones vaginales que no mostraron sintomatología alguna (Al-Momami *et al.*, 2006).

Como ya se ha comentado anteriormente, otro tropismo aun por esclarecer es el nervioso. En efecto, se ha constatado la capacidad de especies como *Ma*, *Mmc* y *Mp* para colonizar e incluso lesionar este sistema en el ganado caprino, siendo descritas meningitis purulentas y acúmulos perivasculares leucocitarios que en este último caso, estaban asociadas a un proceso crónico asintomático (Damassa *et al.*, 1987a; Nayak y Bhowmik, 1990; Bajmócy *et al.*, 2000; Gómez-Martín *et al.*, 2012a).

Es de destacar que las lesiones producidas en animales con AC, no ha de ir ligada a una clínica evidente de la enfermedad ya que han sido constatadas lesiones crónicas en portadores asintomáticos en localizaciones como sistema respiratorio o nervioso (Gómez-Martín *et al.*, 2012a).

1.7. DIAGNÓSTICO

En primer lugar tener en cuenta que el diagnóstico de la AC, especialmente en las zonas endémicas, es complejo y se va a ver influenciado por las diferentes técnicas de laboratorio (Bergonier *et al.*, 1997).

1.7.1. Diagnóstico clínico

En los brotes clínicos, el diagnóstico se basara en la observación de los diferentes síntomas referenciados anteriormente, caracterizados por la triada clásica de enfermedad.

En rebaños crónicamente infectados, la situación se caracteriza por la presencia de animales con mamitis subclínica. Generalmente, el ganadero descubre una bajada de la producción láctea asociada a las mamitis clínicas,

junto con la elevada mortalidad que se pueden observar en los brotes agudos de la enfermedad (Nicholas, 1995; Bergonier *et al.*, 1997). En rebaños caprinos infectados, existen un gran número de portadores asintomáticos que suelen ser serológicamente negativos. Por ello, en referencia a la anamnesis, será de gran importancia conocer los antecedentes de la explotación en relación a la enfermedad, los movimientos de animales procedentes de otras explotaciones que haya podido favorecer la introducción de portadores, el contacto con otros rebaños, así como el programa vacunal administrado en su caso (Corrales *et al.*, 2007; De la Fe *et al.*, 2005a).

Como se comentó anteriormente, es imprescindible para el diagnóstico de la enfermedad la confirmación laboratorial, por lo que será de enorme importancia la recogida de muestras para el aislamiento y/o detección de los micoplasmas. En general, se tomarán muestras de leche, sangre, conjuntiva y conducto auricular externo. Estudios recientes indican que las muestras de leche para el aislamiento de micoplasmas no deben congelarse, ya que la congelación reduce la viabilidad de los microorganismos (Amores *et al.*, 2010a). Por lo tanto, es preferible utilizar muestras frescas o tratar las muestras con un conservante bacteriostático, tal como el azidol (Amores *et al.*, 2010a).

Si se observan síntomas articulares, respiratorios o abortos, es recomendable la recogida de muestras de líquido articular, secreciones nasales o vaginales respectivamente. También puede ser útil la recogida de muestras de órganos internos como corazón, peritoneo, hígado, bazo, riñón, pulmón y nódulos linfáticos en animales que hayan fallecido o que se decidan sacrificar (Perreau, 1979; Damassa *et al.*, 1987a; Nicholas *et al.*, 1995; Madanat *et al.*, 2001).

1.7.2. Diagnóstico laboratorial

Para la realización del diagnóstico laboratorial podremos utilizar métodos directos o indirectos. Los primeros se basan en el aislamiento y posterior identificación de las cepas mediante su inoculación en medios específicos o

mediante la identificación por medio de las técnicas de biología molecular. Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a los diferentes agentes que intervienen en el síndrome de la AC (De la Fe *et al.*, 2005b).

1.7.2.1. Métodos directos

1.7.2.1.1. Aislamiento e identificación

Existen diferentes medios de cultivo específicos para el crecimiento de los micoplasmas, los cuales han sido desarrollados por diferentes autores. Destacan entre ellos el medio de Eaton, el medio de Hayflick, el medio PH y el medio SP4II (Kirchhoff y Rosengarten, 1984; Marco, 1994; Nicholas, 1995; Ramírez, 1999). Los micoplasmas poseen una limitada capacidad metabólica debido a lo cual se requiere de medios altamente enriquecidos. Para realizar un enriquecimiento de los medios los suplementamos principalmente con suero de caballo y también se les incorpora esteroides, precursores de ácidos nucleicos, y extracto de levadura. Para disminuir la carga bacteriana en los medios de cultivo, se suelen incorporar a los mismos antibióticos como la ampicilina o acetato de talio. También se pueden añadir antifúngicos como la anfotericina, ya que de esta manera prevenimos una disminución o inhibición del crecimiento de los micoplasmas (Atalaia y Brandao, 1981; Bergonier, 1997). De forma habitual se realizan pases de los medios líquidos a través de filtros de 0.45 μ m o 0.25 μ m con el propósito de eliminar posibles contaminaciones teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los micoplasmas.

También se hace necesaria la realización de pases de medios líquidos a sólidos con el objetivo de poder aislar las colonias de micoplasmas en los medios sólidos. El crecimiento en el medio sólido se puede observar habitualmente desde las 24 horas post- inoculación hasta los 5 días posteriores, no debiéndose dar la muestra por negativa hasta pasados los 15 días (Poveda y Nicholas, 1998). Para favorecer el crecimiento se utilizan atmósferas húmedas ricas en CO₂ y a una temperatura de cultivo de 37C°.

La utilización de medios convencionales como el agar sangre, también posibilita el crecimiento de los micoplasmas, principalmente a partir de muestras de leche, donde observamos pequeñas colonias caracterizadas por una débil hemólisis alfa o beta (Contreras *et al.*, 1993b).

Una característica de *Ma* y *Mp* es la formación de películas y cristales en los medios sólidos a modo de depósitos cristalinos. Esta característica es debida a la deposición de diversas sustancias del metabolismo bacteriano como el calcio, colesterol y fosfolípidos, pudiendo estar determinada por la composición del medio utilizado (Freundt, 1983).

Existen diferentes técnicas bioquímicas, que evidencian las necesidades nutricionales de las diferentes especies de micoplasma. Entre las mismas, encontramos las basadas en la reducción del tetrazolium y la actividad fosfatasa, la hidrólisis de urea y arginina o la fermentación de la glucosa y la manosa (Poveda y Nicholas, 1998).

Entre las pruebas serológicas que se han empleado están la inmunofluorescencia, la hemaglutinación indirecta, la prueba de inmunoperoxidasa o la inhibición del crecimiento y del metabolismo (Levishon *et al.*, 1991; Poveda y Nicholas, 1998). La inhibición del crecimiento es una prueba específica, simple y económica, que se basa en la utilización de potentes antisueros sobre cultivos en medio sólido para posteriormente medir el halo de inhibición de crecimiento que se encuentra relacionado con el título de anticuerpos (Poveda y Nicholas, 1998). La inhibición del metabolismo se basa en la inhibición del crecimiento en medios líquidos, siendo más sensible que la anterior y permitiendo además la cuantificación de anticuerpos (Madanat *et al.*, 2001).

El dot-inmunibinding es una técnica que parece ser más sensible, específica y rápida que los métodos directos anteriormente descritos. La técnica consiste en el filtrado de los cultivos en placas dispuestas de una membrana porosa de 0.22 μm a las que posteriormente se añaden anticuerpos

policlonales específicos que son detectados con antiglobulinas específicas (Bergonier *et al.*, 1997).

Existen algunas dificultades asociadas al empleo de antisueros alterados en las pruebas serológicas anteriormente descritas, como es la variabilidad antigénica intraespecie y la reactividad cruzada entre especies de micoplasmas estrechamente asociadas, como era el caso de *M capri* y *Mmm* LC, actualmente agrupados en *Mmc* (Corrales *et al.*, 2007; Manso-Silván *et al.*, 2009).

1.7.2.1.2. Detección genómica

Con la intención de mejorar los resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico se han desarrollado diversas técnicas que ofrecen mejores resultados, aumentando a su vez la rapidez en la emisión de los mismos (Nicholet, 1994). Dentro de esta línea encontramos inicialmente la hibridación mediante sondas de ADN (Razin, 1994), desarrollándose sondas para la detección de *Ma* (Mattsson *et al.*, 1991; Dedieu, 1995; Tola *et al.*, 1994) y *Mcc* (Dedieu *et al.*, 1995). En un estudio se diseñó una sonda capaz de identificar *Mmm* LC, con el inconveniente de que no era capaz de diferenciarla de *M. capri* lo que parece estar relacionado con la actual unificación de ambos en una sola especie (*Mmc*) (Taylor *et al.*, 1992).

Con posterioridad, se desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ofrecía una mayor sensibilidad y rapidez frente a la técnica de la hibridación (Razin, 1994) y que además en los últimos años se ha incorporado como técnica para el diagnóstico de las micoplasmosis en los pequeños rumiantes. Estudios recientes han demostrado la mayor sensibilidad de esta técnica en comparación con las que emplean cultivos para la identificación de los micoplasmas causantes de la AC (Tola *et al.*, 1997).

Este incremento en la sensibilidad, hace de esta técnica una buena herramienta para la detección de estos agentes. El desarrollo de pruebas

moleculares para el diagnóstico, especialmente la técnica de la PCR en tiempo real ha proporcionado pruebas rápidas, sensibles y robustas para el diagnóstico de la AC (Fitzmaurice *et al.*, 2008; Oravcová *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2012). Estas pruebas han demostrado ser válidas para el análisis sistemático de muestras de tanques de leche (BTM) (Chazel *et al.*, 2010), incluso en presencia de conservantes tales como bronopol o el azidiol (Amores *et al.*, 2011b).

En las zonas endémicas, para determinar el estado sanitario de los rebaños respecto a esta enfermedad es útil realizar pruebas en muestras de tanque de leche (Contreras *et al.*, 2008), pero siempre teniendo en cuenta que la detección de micoplasmas en esta muestra se ve afectada por el número de animales en ordeño y el volumen final de la leche del tanque (Amores *et al.*, 2012).

Se ha observado la presencia intermitente de *Ma* en las muestras de tanque de leche de ovejas ordeñadas en las zonas endémicas de AC, ya que se observó recientemente que un 26,3% de las explotaciones positivas muestreadas para la enfermedad obtuvieron un resultado negativo en el siguiente muestreo (Ariza-Miguel *et al.*, 2013).

Se propone que las muestras de casos clínicos de mamitis deben ser confirmadas o analizadas al mismo tiempo con muestras simultáneas del tanque de leche para aumentar la sensibilidad del diagnóstico a nivel del rebaño, dado que se han identificado rebaños en los cuales tras el estudio microbiológico de cinco muestras consecutivas de leche de tanque, éstas resultaron negativas para *Ma* y *Mmc*, mientras que el análisis de las mamitis clínicas confirmó la infección (Amores *et al.*, 2012).

La PCR permite la síntesis de varias copias de un fragmento de ADN determinado, que normalmente suelen ser segmentos conservados, a partir de una pequeña cantidad del mismo. Algunos de los genes utilizados para la identificación de *Ma* son el 16S del *ARNr* (Chavez *et al.*, 1995; Johannsson *et al.*, 1996; Hotzel *et al.*, 2003) y el *uvrC* (Subramaniam *et al.*, 1998).

También se ha logrado la identificación de *Mmc* y *Mcc* mediante el uso de la región genómica CAP-21 (Bashirudin *et al.*, 1994; Hotzel *et al.*, 1996) y la *lppA* para *Mmc* (Monnerat *et al.*, 1999). Peyraud *et al.*, (2003), desarrollaron una PCR para la identificación específica de *Mp*.

El mejor método para la detección de la AC en casos individuales es el cultivo en combinación con la PCR de muestras individuales (Amores *et al.*, 2010b; Gómez-Martín *et al.*, 2012a) combinado con muestras de leche de tanque para realizar el diagnóstico a nivel del rebaño (Ariza-Miguel *et al.*, 2012).

Sin embargo también se han aislado de los pequeños rumiantes especies no patógenas de *Mycoplasma*, como *Mycoplasma yeatsii*, *Mycoplasma cotewii* y *Mycoplasma auris*, especialmente cabras (Chazel *et al.*, 2010), lo que indica la necesidad de identificar correctamente las especies de micoplasma involucrados.

1.7.2.1.3. Técnicas de inmunohistoquímica

Algunos autores han concluido que el empleo de anticuerpos monoclonales que evidencien antígenos de micoplasmas involucrados en la AC, en concreto para la presencia de *Ma*, supone una técnica eficaz y específica para su detección postmortem en los casos de mamitis clínicas. Esta técnica también es una herramienta muy útil para el estudio de las rutas de infección y de las células involucradas en estas mamitis (Rodríguez *et al.*, 2000 y 2002) Así, recientemente, Castro *et al.*, (2010) inocularon 15 cabras lactantes para evaluar la capacidad de *Ma* para modular el sistema inmune en el huésped y caracterizar cronológicamente los principales subgrupos de células presentes durante la respuesta inmunoinflamatoria mamaria. Los resultados obtenidos mediante el uso de dicha técnica han contribuido a establecer la caracterización morfológica e inmunohistoquímica básica de la respuesta inmune local de este agente en la glándula mamaria de la cabra.

1.7.2.2. Métodos indirectos

La inhibición del complemento y el ELISA son utilizadas para la detección de anticuerpos específicos en el suero. Se trata de técnicas rápidas, pero que tienen el inconveniente de ser incapaces de discernir entre anticuerpos vacunales de los originados por la infección, lo que les lleva a errores de especificidad. Esto hace poco viable su utilización para la detección de rebaños infectados en aquellas zonas endémicas que realizan una vacunación sistemática. Estas técnicas serológicas son útiles para el estudio epidemiológico de rebaños afectados o para ver la prevalencia dentro de aquellos que resulten serológicamente positivos (Levisonh *et al.*, 1991; Poveda y Nicholas, 1998; Corrales *et al.*, 2007). Existen disponibles pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra los agentes asociados a la AC (Bergonier *et al.*, 1997; Nicholas *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos kits ELISA comerciales tienen una pobre capacidad para detectar anticuerpos frente a *Ma*. También se ha observado que el rendimiento de la prueba varía según las especies donde se hospeda y el origen geográfico de las muestras (Poumarat *et al.*, 2012).

La baja sensibilidad de algunas pruebas serológicas puede explicar la ausencia de respuesta de los anticuerpos detectables en algunos animales infectados (Amores *et al.*, 2011a). A la inversa, las reacciones cruzadas entre las especies de *Mycoplasma* darán falsos positivos, a veces correspondientes a la presencia de micoplasmas no patógenos (Di Provvido *et al.*, 2009; Poumarat *et al.*, 2012). Las técnicas del ELISA y fijación de complemento son limitadas a nivel de diagnóstico individual, pero pueden ser válidas a la hora de trabajar con colectivos de animales representativos (Bergonier *et al.*, 1997).

Estas deficiencias han limitado el uso de la serología para evaluar el estado sanitario de los rebaños (Bergonier *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2011; Gómez-Martín *et al.*, 2012b; Agnone *et al.*, 2013a). La sensibilidad del análisis serológico puede mejorarse mediante la combinación del ELISA con el inmunoblotting (Schubert *et al.*, 2011; Agnone *et al.*, 2013a).

En la inhibición del complemento, la sensibilidad y especificidad son menores que en las técnicas ELISA cuya sensibilidad llega a ser del 100%. La especificidad ronda el 78-92%, porcentajes que hacen que la técnica sea idónea para la detección de individuos serológicamente negativos.

La técnica ELISA puede mostrar dificultades para la detección de aquellas especies de micoplasmas que se caracterizan por una alta variabilidad antigénica (*M. agalactiae* y *Mmc*). Estudios han evidenciado mayor sensibilidad y especificidad para la detección de estas cepas de campo mediante Inmunoblotting (De la Fe *et al.*, 2005b).

1.8. PREVENCIÓN Y CONTROL

En un brote clínico, las medidas a adoptar variarán en función de si el rebaño se encuentra en una región libre de la enfermedad o si por el contrario se trata de una zona endémica. Si nos encontramos en una zona libre de AC, la mejor medida a adoptar es la eliminación de todos los individuos del rebaño, realizar una desinfección completa de las instalaciones, acompañado de un correcto vacío sanitario. Si nos encontramos en áreas endémicas, las medidas de control se van a basar en impedir la propagación de la enfermedad a otros rebaños y disminuir las pérdidas económicas que pueda originar la enfermedad dentro del rebaño afectado (Bergonier *et al.*, 1997).

Las medidas actuales para controlar la AC en las zonas endémicas se basan en el uso de antibióticos y vacunas, con pocos cambios durante los últimos 15 años (Gómez-Martín *et al.*, 2013a). En el momento de controlar un brote agudo de la enfermedad, y descartado un sacrificio masivo del rebaño, el objetivo será disminuir las manifestaciones clínicas, intentando alcanzar un estado de cronicidad en el rebaño en el que mejoren las producciones lecheras y los recuentos de células somáticas (RCS). Esto se puede conseguir mediante una antibioterapia que será aplicada a todos los individuos del rebaño, en especial aquellos que no hayan mostrado clínica aparente, ya que pueden tratarse de individuos que propaguen la enfermedad activamente de forma asintomática (Esnal *et al.*, 1994). Estos tratamientos son una alternativa al

sacrificio de los animales infectados de alto valor genético, así como razas domésticas en peligro de extinción y especies silvestres en peligro de extinción. Varios estudios han determinado los perfiles de resistencia a los antibióticos de las especies de *Mycoplasma* spp. causantes de la AC (Loria *et al.*, 2003; Al-Momani *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007a, 2007b, 2008; Paterna *et al.*, 2013), ya que la resistencia puede conducir al fracaso de algunos tratamientos con antibióticos (Gómez-Martín *et al.*, 2013a).

No obstante, hay que considerar que la presencia de residuos antimicrobianos en la leche puede suponer un riesgo para el consumidor (Allison, 1985;. Dewdney *et al.*, 1991) y podría poner en peligro la fermentación bacteriana que se requiere para la producción de queso (Mourot y Loussouarn, 1981). Ninguna de las cuatro pruebas para la detección de residuos de 20 agentes antimicrobianos (donde se incluyeron los aminoglucósidos, los macrólidos, las tetraciclinas, las sulfonamidas y el grupos de las quinolonas) en la leche de cabra, fueron capaces de detectar los niveles máximos permitidos por la Unión Europea de tetraciclinas o quinolonas, utilizadas actualmente contra la AC (Sierra *et al.*, 2009). Esto indica la necesidad de mejorar la sensibilidad de los métodos utilizados rutinariamente en los programas de control de residuos antimicrobianos.

Los antibióticos de elección contra *Mmc* y *Ma* son fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos. Mientras que la eritromicina es eficaz contra *Mmc*, *Mcc* y *Mp*, se muestra ineficaz contra las cepas estudiadas de *Ma* hasta el momento (Loria *et al.*, 2003; Al-Momani *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007a, 2007b, 2008; Paterna *et al.*, 2013). Se ha utilizado enrofloxacin, florfenicol, oxitetraciclina y espiramicina para tratar la balanitis ulcerosa y vulvitis en ovejas causada por *Mmc* (Kidanimariam *et al.*, 2005b.), determinándose que que esta especie bacteriana presenta resistencia al ácido nalidíxico, a la gentamicina, a la estreptomina y a la espectinomicina. Del mismo modo, *Ma* es resistente a la estreptomina y el ácido nalidíxico (Antunes *et al.*, 2007a, 2008).

Las tetraciclinas (oxitetraciclina) se han utilizado de forma única o combinada, bien con macrólidos o bien con quinolonas, obteniéndose buenos

resultados (Picavet, 1984; Ziv y Soback, 1989). Se ha observado en algunas cepas de *Mp* una baja sensibilidad a las tetraciclinas (Antunes *et al.*, 2007b).

Es importante considerar a la hora de instaurar una antibioterapia, no sólo las resistencias adquiridas sino también las propias de algunas especies de micoplasmas. Ello es debido a que se ha corroborado que el grupo *Hominis*, al que pertenece *Ma*, muestra una resistencia intrínseca a la eritromicina y a la estreptomocina (Furneri *et al.*, 2001; Königsson *et al.*, 2002).

A pesar de la existencia de antibióticos efectivos *in vitro*, el especial tropismo de los micoplasmas por localizaciones de difícil difusión antibiótica como el conducto auditivo externo, supone una dificultad añadida que fomenta el estado de portador (Bergonier *et al.*, 1997). El tratamiento con marbofloxacin sistémica, fue evaluado en machos caprinos portadores auriculares asintomáticos de *Mmc* y *Ma* (Gómez-Martín *et al.*, 2013b). Este trabajo concluyó que a pesar de la alta susceptibilidad conocida de estos microorganismos a las fluoroquinolonas y su buena penetración en los tejidos de las mismas, el tratamiento fue incapaz de eliminar la infección del conducto auditivo externo de los animales afectados. Además, también se observó un efecto perjudicial sobre la motilidad espermática, lo que evidencia un inconveniente de la antibioterapia empleada en la lucha de la AC que es necesario considerar en animales, razas o especies de elevado valor genético (Gómez-Martín *et al.*, 2013b).

Las estrategias antimicrobianas actuales tienen un efecto limitado sobre los portadores en rebaños infectados crónicamente, con las consecuencias que esto tiene para el control de la AC en los centros de inseminación y recogida de semen (Gómez-Martín *et al.*, 2013a). Es de gran importancia la detección de estos portadores asintomáticos, que vehiculan los micoplasmas en oídos y otros órganos diana para estas bacterias (Damassa y Brooks, 1991). Estos individuos pueden suponer una fuente de infección durante toda su vida, por lo que las cuarentenas pueden no ser seguras para evitar la entrada de la enfermedad en la explotación (Carmona, 1992), comprometiendo seriamente el control de la enfermedad y las medidas de erradicación (Thiaucourt *et al.*,

1996). Para la correcta realización de los muestreos anteriormente comentados, es necesario contar con técnicas fiables y operativas. La PCR ha sido perfeccionada para su utilización a partir de muestras de leche, complementando las técnicas de microbiología y serología (Tola *et al.*, 1996 y 1997), que son válidas para trabajar a nivel de rebaño (Bergonier *et al.*, 1997).

Además, otra dificultad es el hecho de que la respuesta inmune humoral del portador no parece ser capaz de prevenir la colonización de los oídos por parte de las especies de *Ma* (Castro-Alonso *et al.*, 2009; De la Fe *et al.*, 2011), encontrando que una alta proporción de cabras que presentan colonización auricular por *Ma* y *Mmc* son seronegativas (De la Fe *et al.*, 2010; Gómez-Martín *et al.*, 2012b). En las zonas endémicas, donde la AC se presenta de forma crónica en los rebaños, la presencia de portadores asintomáticos perpetúa la infección, comprometiendo el control de la enfermedad y las medidas de erradicación (Thiaucourt y Bölske, 1996; Mercier *et al.*, 2007).

En áreas endémicas, la enfermedad se mantendrá en los rebaños de forma asintomática, suponiendo un riesgo epidemiológico para los rebaños no infectados los cuales deberán restringir los movimientos de intercambio de ganado y el acceso a pastos comunales. En los rebaños crónicamente afectados se deberán implantar una serie de medidas, entre las que encontramos el tratamiento precoz de animales afectados, la eliminación de animales crónicamente infectados mediante sistemas de sacrificios parciales, aislamiento de los enfermos, y tratamiento al comienzo de secado (Esnal *et al.*, 1994).

Debido a que la forma de transmisión horizontal entre los individuos del rebaño más importante es el ordeño, es fundamental realizar unas buenas prácticas de manejo, con el fin de evitar la transmisión de la enfermedad. La higiene durante el mismo será un aspecto a tener en cuenta, por lo que los operarios habrán de extremar la limpieza de manos, de la sala de ordeño y de la maquinaria. Es recomendable desinfectar los pezones al final del ordeño, para garantizar un correcto sellado del esfínter mamario. Es necesario llevar un control de los parámetros de ordeño para evitar lesiones y traumatismos en las

mamas debidas a fluctuaciones en las presiones de vacío, pulsaciones, etc. Con el fin de disminuir el contagio a los nuevos animales que se incorporan al ordeño es recomendable seguir un orden de ordeño en el que los animales más jóvenes y los recién paridos se ordeñarán primero, dejando para después los que lleven más tiempo en lactación y terminando por los enfermos o bajo tratamiento (Picavet, 1984; Bergonier *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1997).

Otra medida a adoptar es la separación de las crías de sus madres nada más nacer, con el objetivo de disminuir el contagio vertical a través del calostro, lo cual supone la principal vía de contagio para el neonato. Una propuesta para eliminar una fuente de infección por AC para la descendencia es la pasteurización del calostro. Tratamiento experimental de muestras de calostro contaminadas durante 60 minutos a 60°C fue un éxito eliminando totalmente las colonias viables de *Mmc* (Paterna *et al.*, 2012). Aunque el tratamiento de calostro durante 30 minutos a 56°C reduce significativamente los recuentos de *Ma*, esta especie micoplasma es capaz de sobrevivir después de tratamientos de 120 minutos a 60 ° C (Paterna *et al.*, 2012).

El potencial riesgo de transmisión de la infección de machos a hembras ha impulsado el diseño de medidas de vigilancia y prevención específicas vinculadas a los programas de mejora genética en las razas de cabras lecheras. Éstas se basan por un lado en prevenir la entrada de portadores auriculares asintomáticos en los centros de selección genética empleando la muestra de conducto auditivo externo (hisopos) en los animales candidatos a entrar en los centros. Ha podido constatarse igualmente, la incapacidad de la serología para detectar portadores asintomáticos susceptibles de entrar en los centros. Por otro lado, el muestreo periódico de eyaculados se ha confirmado como una medida de vigilancia capaz de detectar portadores asintomáticos presentes en los centros, siendo necesario una monitorización a lo largo del tiempo debido al carácter intermitente de esta excreción (De la Fe *et al.*, 2009; Amores *et al.*, 2011a). El diseño de estos programas, ha de fundamentarse en la combinación del cultivo y PCR de las muestras empleadas con el fin de aumentar la capacidad de detección de animales infectados. (Amores *et al.*, 2011a; De la Fe *et al.*, 2009; Gómez-Martín *et al.*, 2012b).

Otra herramienta empleada para la prevención de la AC es la vacunación de los rebaños, aunque ello va a depender de los objetivos que se planteen para controlar la enfermedad. Si lo que se propone es eliminar la enfermedad a corto plazo, la vacunación será incompatible con los chequeos serológicos a que deberán ser sometidos los individuos del rebaño para su posterior eliminación. En cambio, si no se persigue una erradicación de la enfermedad, la vacunación podría disminuir la presentación clínica, mejorando los índices económicos (Corrales *et al.*, 2007). Las estrategias utilizadas para la vacunación contra la AC han variado poco a lo largo de los años y se siguen utilizando las vacunas monovalentes o las polivalente muertas convencionales (Gómez-Martín *et al.*, 2013a). Los mejores resultados clínicos con vacunas inactivadas fueron observados con la utilización de la saponina como un adyuvante o agente de inactivación (De la Fe *et al.*, 2007a, 2007b; Agnone *et al.*, 2013a, 2013b). El efecto beneficioso de la saponina en las vacunas está relacionado con el momento de la activación de las células de memoria de los linfocitos T (Agnone *et al.*, 2013a). En un estudio experimental en ovejas, una vacuna viva atenuada contra *Ma* también proporcionó una buena protección clínica (Agnone *et al.*, 2013b). Es probable que en los próximos 10 años una nueva generación de vacunas recombinantes proporcionará una mejor protección frente a la AC (Gómez-Martín *et al.*, 2013a).

2. AGALAXIA CONTAGIOSA Y CALIDAD DE LA LECHE

2.1. INTRODUCCIÓN

La leche de cabra se reserva principalmente para la producción de queso y, por tanto, es de gran importancia una evaluación de su calidad. Por un lado, el nivel de calidad de la leche es de interés para la industria quesera, que tiene que hacer frente a la creciente demanda de los consumidores pero también de gran interés para los productores de leche, ya que puede aumentar sus ingresos mediante el incremento de la calidad. La calidad de la leche para la elaboración del queso depende esencialmente de su composición física y química y de factores higiénicos y sanitarios (Pirisi *et al.* 2007). En este contexto, el impacto de los micoplasmas sobre calidad de la leche está probablemente subestimado (Contreras *et al.*, 2008). El riesgo de exceder los límites legales para el (RCS) en leche de tanque es alto durante un brote de AC, ya que los rebaños afectados pueden sufrir graves problemas de mastitis. Sin embargo, el (RCS) no se puede utilizar para la detección indirecta de rebaños infectados crónicamente ni en el caprino (Corrales *et al.*, 2004) ni en el ovino (Gonzalo *et al.*, 2005), particularmente en áreas donde la enfermedad es endémica.

2.2. CALIDAD Y RECuento DE CÉLULAS SOMÁTICAS (RCS)

Se han descrito múltiples factores que pueden afectar el RCS en el tanque de las explotaciones ganaderas. En el ganado caprino y ovino, el proceso inflamatorio provocado por una infección intramamaria tiene como consecuencia un incremento del RCS, aunque también se puede producir en condiciones no patológicas asociado a procesos fisiológicos tales como el estro o estados avanzados de gestación (Raynal-Ijutovac *et al.*, 2007). Otros factores estudiados en ganado ovino como la raza, el tipo de ordeño, el tipo de parto, el número de partos y las variaciones estacionales también contribuyen significativamente a producir cambios en el RCS, la producción de lechera y la composición de la leche (Gonzalo *et al.*, 1994), determinándose que la media global en el RCS para una lactación completa se incrementa a medida que

avanza la misma (Zeng *et al.*, 1996b). Estos efectos explican en conjunto un 48% de la variabilidad de este parámetro (Gonzalo *et al.*, 2002).

Como se ha indicado anteriormente, el nivel normal de las células somáticas (CS) en la leche (en ausencia de mastitis) se caracteriza por una gran variabilidad. Es particularmente alto en el período de calostro y al final de la lactancia, pero puede estar influenciada por varios factores tales como la edad del animal, su nivel de producción, el estrés, el estado sanitario de los animales, etc. Las CS se pueden agrupar en tres tipos: células epiteliales, células sanguíneas y partículas citoplasmáticas, observándose que las proporciones de las diferentes categorías de células varían durante el curso de la lactancia y dependen también del estado sanitario del animal. Durante un episodio de mastitis, las defensas inmunitarias de la ubre se activan, los leucocitos polinucleados pasan de la sangre a la glándula mamaria en gran número, y el RCS en la leche aumenta (Pirisi *et al.* 2007). En las cabras, esta variación es generalmente mayor, ya que el RCS en los animales no infectados es mayor que los valores que se registran en ovejas y vacas. La secreción láctea de las ovejas y principalmente de las cabras tiene un gran porcentaje de células apocrinas y partículas citoplasmáticas, similares en tamaño a las CS lo que aumenta su recuento de forma natural en comparación a lo registrado en la leche de vaca y oveja en menor medida (Paape *et al.*, 2001). Los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares comprenden el tipo de célula principal en la leche de las glándulas mamarias de la cabra tanto si existe infección como si no. En animales libres de infección constituyen de un 45 a un 74% de las CS y en las glándulas mamarias infectadas representan de un 71 a un 86% de las CS (Paape *et al.*, 2001). Por tanto, a efectos diagnósticos, es importante identificar los factores no infecciosos que incrementan el RCS y utilizar sólo métodos que permitan discernir entre CS y partículas citoplasmáticas en muestras de leche de cabra (Paape *et al.*, 2001). Asimismo, es necesario tener en cuenta que en la relación entre los cambios en la calidad de la leche y el RCS, la extrapolación sistemática de los resultados obtenidos en vacas lecheras a los pequeños rumiantes conduce a errores en el diagnóstico de infecciones intramamarias subclínicas y a la aplicación de normas discriminatorias sobre la calidad de la leche producida por cabras y ovejas

(Raynal-Ijutovac *et al.*, 2007).

Hoy en día, entre el 15-40 % de las ubres de la mayoría de los rebaños caprinos están infectados de forma intramamaria por diferentes especies de bacterias (Silanikove *et al.*, 2014). Una visión general de los estudios realizados sobre las infecciones intramamarias en cabras las sitúan durante la lactación (Leitner *et al.*, 2007), si bien otros autores indican que un 8% de las cabras sin infección en el momento del estudio adquirieron la infección durante el periodo de secado y un 15% adquirieron la bacteria inmediatamente después del primer parto y ninguna la adquirió durante la lactación (Leitner *et al.*, 2007), cuestionando dicha hipótesis. La infección intramamaria causa aumentos significativos en el RCS en la leche de cabra (Paape *et al.*, 2001; Luengo *et al.*, 2004), incluso en su presentación subclínica asociada a diferentes agentes como los estafilococos coagulasa negativos (ECN), que originan pérdidas en volumen de leche producida y en su composición (Gonzalo *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2004).

El riesgo de superar el umbral de RCS establecido por las autoridades puede verse favorecido por la presencia de micoplasmas en la leche de tanque de cabra, con las implicaciones económicas que entraña y supone un incentivo para fomentar la aplicación de programas específicos de control de la AC (Contreras *et al.*, 2008). Las consecuencias clínicas que genera la enfermedad y las pérdidas económicas que ocasiona el empleo de los tratamientos, la asistencia veterinaria y el uso de vacunas, se añade a los efectos que ocasiona la pérdida de recursos genéticos a través de la mortalidad, los abortos o la eliminación de los animales seleccionados afectados por la enfermedad (Bergonier *et al.*, 1997; Corrales *et al.*, 2007; Torado *et al.*, 2015). No obstante, su efecto principal es sobre la producción y la calidad de la leche (Bergonier *et al.*, 1997; Corrales *et al.*, 2007), asociadas principalmente con reducciones significativas o pérdida completa de la producción lechera (Torado *et al.*, 2015).

En relación con el RCS, la presencia de brotes clínicos de AC aumenta el RCS en el tanque en la especie ovina, mostrando recuentos significativamente más altos en comparación con los registros obtenidos en

rebaños donde se observa la ausencia de episodios clínicos de la enfermedad (Gonzalo *et al.*, 2005). Ello coincide con lo observado a nivel individual, ya que la infección experimental con *Ma* incrementa el número de CS en la oveja (Bergonier *et al.*, 1996). Todo ello motiva que esta enfermedad sea una seria limitación a la hora de mejorar la salud de la ubre y la calidad higiénica de la leche (Gonzalo *et al.*, 2005). Resultados similares se han registrado en el ganado caprino, donde se observa que sólo el rebaño que sufría un brote clínico de AC mostraba RCS significativamente más altos, sin observar diferencias significativas para esta variable entre rebaños sin episodios clínicos del síndrome, independientemente de si el micoplasma se había aislado o no (Corrales *et al.*, 2004).

2.3. CALIDAD Y RECuento DE BACTERIAS TOTALES

El tratamiento de secado utilizado para las mamitis tanto clínicas como subclínicas reduce significativamente el recuento de bacterias totales en el ovino lechero, en comparación a los casos en que no se realiza ningún tratamiento. No obstante, los brotes clínicos de AC no parecen incrementar significativamente este parámetro (Gonzalo *et al.*, 2006). La presencia de microorganismos en la leche de tanque tiene gran importancia desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria, la Salud Pública y la calidad de las producciones, donde el recuento total de bacterias es un método frecuentemente utilizado (Gonzalo *et al.*, 2006). Actualmente, el Reglamento (Ce) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal cita en su ordenamiento que: los operadores de empresa alimentaria deberán iniciar procedimientos para garantizar que la leche cruda cumpla los siguientes criterios para la leche cruda procedente de otras especies que no sea la vaca: Colonias de gérmenes a 30°C (por ml) $\leq 1\ 500\ 000$. Sin embargo, en caso de que se destine la leche cruda procedente de especies distintas de la vaca a la fabricación de productos realizados con leche cruda mediante un proceso que no implique ningún tratamiento térmico, los operadores de empresa alimentaria deberán adoptar medidas para garantizar

que la leche cruda utilizada cumpla los siguientes criterios: Colonias de gérmenes a 30°C (por ml) \leq 500 000.

Análisis estadísticos mostraron que existen diferencias significativas en el recuento de bacterias totales asociadas a diferentes factores como el mes de recogida de la muestra, el número de ordeños que contiene el tanque de leche, las diferentes prácticas de ordeño realizadas y el tamaño del rebaño. En este sentido, existe una mayor probabilidad de que en junio se alcance un mayor recuento de bacterias totales o que aumentan las probabilidades de alcanzar el máximo valor de este parámetro en el tanque de leche cuando realizamos cuatro ordeños consecutivos en el mismo. En el caso de las diferentes prácticas de ordeño, los recuentos menores se logran con la utilización de maquinas de ordeño en una sala acondicionada a tal fin y con traslado directo al tanque de frio, si bien también se registran mayores valores cuanto mayor es el tamaño del rebaño (Zweifel *et al.*, 2005).

En relación con el RCS, algunos autores no observan correlación entre el número de bacterias y el mismo, y se aprecia que el establecimiento de condiciones adecuadas de higiene sanitaria en las granjas mejora la calidad bacteriológica y permite reducir el RCS por debajo de los límites recomendados (Delgado-Pertiñez *et al.*, 2003). Sin embargo, como hemos indicado previamente, la AC si está asociada a un aumento del RCS en leche de tanque y no del recuento de bacterias totales (Corrales *et al.*, 2004; Gonzalo *et al.*, 2005; Gonzalo *et al.*, 2006) lo que supone un serio obstáculo a la hora de optimizar las estrategias de control de las CS y de las mamitis en el tanque de leche (Madanat *et al.*, 2001). Por esto, el registro del recuento de bacterias totales no es una herramienta útil para el diagnóstico de esta enfermedad (Razin *et al.*, 1998).

2.4. LA INFECCIÓN POR MICOPLASMAS Y LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA

La bibliografía existente en referencia a la variación de los parámetros de la calidad físico-química de la leche del tanque y su relación con la presencia de micoplasmas en el rebaño es escasa, y en su mayoría se relaciona con el efecto que ocasiona su presencia en el (RCS), como ya hemos abordado anteriormente.

No obstante, y con el objetivo de estimar de modo experimental las pérdidas de producción de leche causados por la AC en la especie ovina, Torado *et al.*, (2015) realizaron recientemente la infección experimental de un rebaño de ovejas que fueron monitorizadas sesenta días después del parto. Se diseñaron curvas de lactancia individuales con el fin de estimar el impacto de la infección y los resultados obtenidos permitieron determinar que se produjo una reducción de un 17% en la producción de leche del 41% de los animales, mientras que el 37% restante tuvo una caída de la producción similar durante 2 o 3 semanas pero se recuperó rápidamente, estimándose la pérdida final en un 3%.

En este mismo trabajo, la leche infectada mostraba un RCS significativamente mayor, en consonancia con lo que se observa en infecciones naturales (Gonzalo *et al.*, 2005), y los porcentajes de proteína y caseína fueron mayores en la leche con excreción de *Ma*, debido a la concentración de la leche. Por el contrario, el porcentaje de lactosa en la leche fue significativamente menor y no se encontró ningún efecto significativo en el porcentaje de grasa de la leche. Estos autores sugieren que la pérdida de leche después de la infección es variable y esta probablemente relacionado con el grado de exposición y la capacidad individual de la oveja para resistir el efecto ocasionado por la presencia del microorganismo (Torado *et al.*, 2015).

Otros autores han descrito la ausencia de variación en la concentración sanguínea de vitamina E en rebaños ovinos con gran incidencia de mamitis, en

comparación con rebaños de poca incidencia. Sin embargo, el mismo estudio registró una diferencia en la concentración sanguínea de selenio y vitamina A en mamitis asociadas a *Ma* en comparación con animales sanos, ante lo cual vemos que existen valores que se podrían alterar y otros que permanecen estables durante este tipo de infecciones (Giadinis *et al.*, 2011). No obstante, también debemos tener en cuenta que estos valores también podrían variar por causas ajenas a la enfermedad como podría ser la alimentación (Waage y Vatn, 2008) predisponiendo a estos individuos a la enfermedad al tener estas deficiencias en selenio antes de la infección (Giadinis *et al.*, 2011).

Existen más datos en la especie bovina, en la que diversas especies de micoplasma pueden producir infecciones. La especie de mayor prevalencia asociada a la aparición de mamitis es *Mycoplasma bovis*, que siendo un patógeno importante a menudo se menosprecia su efecto, caracterizado por la presencia de sintomatología respiratoria, mamitis y artritis (Nicholas *et al.*, 2003). *Mycoplasma californicum* y *Mycoplasma bovigenitalium* aparecen como las siguientes especies más comunes asociadas a la producción de mamitis (Jasper *et al.*, 1980, Kirk *et al.*, 1997). Otras especies que se han observado que pueden producir mamitis son *Mycoplasma arginini* (Marg), *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma dispar* (Fox 2012; González *et al.*, 2003), si bien no se encontraron variaciones significativas en los componentes cualitativos de la leche en relación a la presencia de micoplasmas en la leche del tanque (Fox *et al.*, 2003). En los rebaños donde se observó la presencia de micoplasmas, el porcentaje de grasa fue menor, y el porcentaje de lactosa superior pero sin llegar a ser significativo (Fox *et al.*, 2003). En este mismo estudio, se vio que los cambios en la calidad de la leche y los parámetros bacteriológicos a los 12 meses del primer aislamiento positivo de *Mycoplasma* spp. no fueron significativamente diferentes en cuanto a la concentración de grasa, en comparación con los 12 meses antes de aislamiento. Sin embargo las proteínas y la concentración de lactosa si se redujeron significativamente en dicho periodo (Fox *et al.*, 2003).

Existe más información en la bibliografía en referencia a la infección intramamaria ocasionada por otros agentes. En estudios realizados en ganado

caprino se observó que la lactosa y la proteína se ve significativamente afectada por el estatus bacteriológico, pero no así la grasa. El porcentaje de lactosa fue menor en las glándulas infectadas, observándose también que desciende de manera independiente a la infección al final de la lactación (Leitner *et al.*, 2007). El porcentaje de sólidos totales se vio reducido ovejas con altos RCS (Jaeggi *et al.*, 2003) mientras que Pirisi *et al.*, 1996, 2000, no encontraron influencias de las CS sobre los sólidos totales. En el caso del porcentaje de lactosa en la leche de cabra (Zeng y Escobar, 1996a; Jaubert *et al.*, 1996) encontraron una disminución de la lactosa en incrementos de las células somáticas algo normalmente aceptado, mientras que los resultados obtenidos por Pasquini *et al.*, 1996 no observaron dicho efecto. En la relación entre el aumento de CS y la grasa, diversos autores han descrito la inexistencia de cambios en el contenido de grasa tanto en ovejas (Díaz *et al.*, 1996) (Pirisi *et al.*, 1996, 2000) como en cabras (Pasquini *et al.*, 1996), si bien Bianchi *et al.*, (2004) si observan descensos significativos de la grasa en leche de ovejas infectadas. En este mismo sentido, Pisoni *et al.*, (2004) registran un descenso en la concentración de grasa en cabras infectadas con *S. aureus*.

En la relación entre el aumento de CS y los porcentajes de proteína de la leche encontramos diferentes resultados dependiendo del trabajo. Así, por ejemplo Díaz *et al.*, (1996) y Bianchi *et al.*, (2004) registran un aumento de las proteínas totales en muestras de leche con recuentos altos de células somáticas frente a muestras con recuentos inferiores. Por el contrario, Jaeggi *et al.*, (2003) observan que las proteínas totales eran menores en recuentos altos de CS y Pirisi *et al.*, (1996, 2000) no registran cambios significativos en las proteínas de la leche con altos RCS. Contrariamente a las experiencias realizadas con vacas lecheras, donde se acepta la disminución de la concentración de la caseína durante las mastitis, los estudios realizados en el ganado ovino son contradictorios (Raynal-Ijutovac *et al.*, 2007).

En referencia a los factores que afectan a los parámetros de calidad de la leche, numerosos estudios generalmente realizados en el vacuno de leche muestran que un aumento en el RCS está relacionado con cambios en la composición de la leche. Estos son motivados por dos posibles causas, los

daños en las células de la ubre lo que reduce la síntesis de componentes de la leche, y cambios en la permeabilidad de las membranas y espacios intersticiales que incrementan el trasvase de componentes de la sangre a la leche (Raynal-Ijutovac *et al.*, 2007). Por ejemplo, en un estudio realizado en la especie bovina por Tomazi *et al.*, (2015) se estudió el efecto de la infección intramamaria subclínica causada por (ECN) sobre la producción de leche, su composición y el RCS, observando que la infección intramamaria no tuvo efecto sobre la producción de leche, el contenido de grasa, la proteína cruda, la caseína, la lactosa, los sólidos totales ni sobre los sólidos no grasos, pero aumentó el RCS sin ningún efecto sobre la producción de leche ni la composición (Tomazi *et al.*, 2015).

2.5. LA CALIDAD DE LA LECHE Y SU USO INDUSTRIAL

El pago de la leche en relación con la calidad esta cada vez más generalizada en la producción lechera de las cabras. El sistema de pago se basa principalmente en la creación de una tabla de precios en la que se toman en consideración diversos parámetros con el fin de establecer bonificaciones y penalizaciones, que luego se aplican al precio base de la leche (Pirisi *et al.* 2007).

El incremento del RCS en el ganado caprino produce cambios en la producción lechera tales como un descenso en el volumen de leche producida, un descenso de la concentración de grasa de la leche y un aumento de la concentración de proteína (Paape *et al.*, 2001). El incremento de las proteínas es atribuido en la especie bovina al incremento de la permeabilidad vascular y la entrada de albumina sérica a la leche debido a una inflamación de la ubre (Paape *et al.*, 2001). Observamos que la presencia de bacterias aumenta el RCS en el lumen de la glándula mamaria e induce un deterioro en la calidad de la leche. En relación con el uso industrial de este producto, existe una relación positiva entre el porcentaje de caseína (caseína / proteína total) y la firmeza de la cuajada, y una relación negativa entre lactosa y RCS con la firmeza de la cuajada (Silanikove *et al.*, 2014). En las cabras con infección intramamaria, la

relación entre los niveles de grasa, proteína, caseína, y rendimiento de la cuajada es menor en comparación con animales no infectados. Por ende, la composición bruta de leche no es una buena predicción de la calidad de la misma para la elaboración de queso, debido a que un gran porcentaje de la leche de tanque puede proceder de glándulas mamarias con infecciones subclínicas (Silanikove *et al.*, 2014). Desde un punto de vista cuantitativo, el queso está compuesto principalmente de proteína y grasa, así como minerales, agua, etc., por lo tanto, un contenido adecuado de proteínas y grasa en la leche utilizada como materia prima para la fabricación de queso es de gran importancia para definir de su calidad química, ya que tiene un efecto determinante en el rendimiento quesero de la leche (Pirisi *et al.*, 2007). La inflamación de la ubre y la involución mamaria pueden aumentar la actividad de la plasmina (PL) ,la cual es responsable de una degradación de las proteínas de la leche. El índice de caseína fue menor en ubres sanas frente a ubres infectadas, y el índice de proteólisis aumentó en el grupo infectado en relación con el grupo sano.

El estado sanitario de la ubre afecta a parámetros tecnológicos de la leche, pues la inflamación de la ubre infectada se traduce en un aumento del tiempo de coagulación de la leche y en una disminución de la firmeza de la cuajada. Los resultados obtenidos evidencian que la actividad de la PL es afectada tanto por la fase de lactación como por la salud de la ubre, lo que supone un importante agente en el detrimento de la calidad de la leche (Bianchi *et al.*, 2004).

Los datos existentes en referencia a estudios asociados a la presencia de AC son escasos, si bien durante un episodio clínico de AC, el análisis de la composición de la leche mostró cambios de los parámetros químicos que afectaron al rendimiento quesero, a la calidad y a los porcentajes de grasa y proteína (Torado *et al.*, 2015). En estudios realizados en ganado caprino, se confirma que la mamitis subclínica por (ECN) produce cambios negativos tanto en la eyección de leche como en su calidad para la producción de queso, afectando también a sus valores nutricionales. La concentración de lactosa fue considerablemente menor en las glándulas infectadas, aunque sin embargo, la

grasa, la proteína total y la caseína no tuvieron diferencias significativas entre las glándulas infectadas y las no infectadas. Posteriormente, la firmeza de la cuajada fue significativamente menor y el tiempo de coagulación del cuajo fue mayor en glándulas infectadas (Silanikove *et al.*, 2014b). El valor de pH en la leche con mamitis también está alterado y es mayor que en la leche normal, resultando en una baja aptitud para la coagulación de la leche y la fabricación de queso (Pirisi *et al.*, 2007).

En un estudio, se valoró el efecto del RCS sobre la elaboración de queso en ovejas, segregando y categorizando la leche en tres grupos según sus valores de RCS, < 100,000 (grupo 1), de 100,000 a 1,000,000 (grupo 2) y > 1,000,000. Es necesario indicar que no se tuvo en cuenta si los valores de RCS eran debidos a procesos infecciosos clínicos o subclínicos u otros factores fisiológicos que pudieran explicar los mismos. Se demostró que cuando aumenta el RCS, la caseína, la proteína total y la grasa descienden, y también se pudo apreciar que el tiempo requerido para el cuajado visual de la leche aumenta, y se tarda más tiempo en alcanzar la firmeza deseada para cortar el coágulo. Asimismo, se registró una mayor proteólisis en los quesos con recuentos altos de proteínas, seguramente asociado a un nivel más alto de humedad de los mismos. Algunos ácidos grasos libres totales como el caproico, cáprico, láurico, butírico y caprílico aumentaron significativamente con altos niveles de RCS en todas las etapas de maduración (Jaeggi *et al.*, 2003). La aplicación de sistemas de pago de la leche en relación a la calidad en los países europeos ha estado directamente relacionado con el desarrollo y la industrialización del sector y ha contribuido significativamente a mejorar la calidad de la leche y queso de cabra y oveja, en los países en los que aún no existen pagos de leche e incentivos para el desarrollo de la calidad. Las medidas profilácticas y sanitarias de financiación pública deben ser un requisito previo antes de poder hacer esfuerzos para desarrollar el sistema de pago por incentivos (Pirisi *et al.*, 2007).

2.6. FACTORES QUE AFECTAN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO Y AL DIAGNÓSTICO EN LAS MUESTRAS DE LECHE DE CABRA

Los distintos parámetros medidos en las muestras de leche representan el pilar fundamental de los programas de mejora productiva y sanitaria desarrollados en el ganado caprino lechero. La adición de conservantes ha resultado ser uno de los factores más relevantes que modifican los valores de los componentes de la leche de cabra. Al considerar el efecto de la temperatura de almacenamiento, se obtuvieron valores significativamente más elevados en el porcentaje de lactosa para las muestras congeladas frente a las refrigeradas, por el contrario, los valores de grasa no se vieron afectados por la temperatura de almacenamiento (Amores *et al.*, 2008).

Se debe tener en cuenta por parte de los laboratorios los métodos de conservación para valorar sus controles de calidad (Sánchez *et al.*, 2005), el tratamiento de conservación de las muestras es un factor de variación importante de los resultados.

Los mayores RCS se dan en muestras conservadas en bronopol y los mas bajos en muestras conservadas en azidol, la congelación de las muestras redujo el recuento frente la utilización de azidiol y bronopol.

Los porcentajes de proteína total, de lactosa y solidos totales más elevados se dieron en la muestras conservadas en bronopol, contrariamente a lo ocurrido con el azidiol como conservante, en ausencia de conservante se dan niveles intermedios de los porcentajes de proteína total, de lactosa y solidos totales (Sánchez *et al.*, 2005).



IV. Experiencia 1

IV. EXPERIENCIA 1: ESTUDIO ETIOLÓGICO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA EN LA ISLA DE LANZAROTE

E1.1. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas económicas que ocasionan los agentes etiológicos de la AC y el carácter “inadvertido” de estas infecciones para el ganadero en los rebaños crónicamente infectados, motiva que su control deba considerarse de gran importancia para el sector lechero caprino. La enfermedad, de distribución mundial, afecta a la mayoría de los países productores de leche de cabra del área mediterránea y del continente africano, donde en muchos de ellos ha sido declarada como endémica, y refiriéndonos al presente estudio, en la isla de Lanzarote. Mientras los procesos clínicos que afectan a la glándula mamaria de esta especie producen una serie de alteraciones en la secreción láctea y en la glándula mamaria que suelen ser detectadas durante el proceso de ordeño, las mamitis subclínicas, características de la infección crónica en los rebaños caprinos infectados, no provocan alteraciones macroscópicas en la leche, disminuyendo la producción láctea del animal y afectando también a los parámetros de calidad de la leche. El no tener “constancia del peligro” implica la ausencia de medidas de control de esos animales infectados, los cuales, además de ver mermada su producción láctea, se convierten en portadores crónicos que probablemente continuarán infectando nuevos animales sanos. (Corrales *et al.*, 2007).

Estudios llevados a cabo en ganado ovino y caprino lechero en la península ibérica, han constatado porcentajes de rebaños infectados de entre el 36,8 % y 66,7 % (Ariza *et al.*, 2012; Amores *et al.*, 2012). En este sentido, la presencia de rebaños infectados en el ganado caprino de las islas Canarias fue descrita por primera vez en los años 90 y actualmente está considerada como endémica (Villalba *et al.* 1992; De la Fe *et al.*, 2005). La isla de Lanzarote fue seleccionada para el presente estudio teniendo en cuenta que estudios anteriores fueron capaces de confirmar dicho estatus endémico (Assuncao *et al.*, 2004). No obstante, a la hora de valorar la importancia de la AC en la isla,

habrían de tenerse además en cuenta su prevalencia en los rebaños con respecto a otros agentes etiológicos de las mamitis caprinas, sin obviar además la posible presencia en los rebaños de especies de micoplasmas apatógenos u oportunistas (Paterna *et al.*, 2014). Por todo ello, el objetivo de la presente experiencia ha sido estudiar la presencia de *Mycoplasma* spp. en los rebaños de la isla de Lanzarote, lo cual ha de permitirnos en primer lugar conocer la importancia relativa de los micoplasmas respecto a otros agentes infecciosos implicados en la etiología de estos procesos, para que así, posteriormente, sea factible la puesta en marcha de programas eficaces de control de la AC en los rebaños de la isla. Este estudio, habría de contribuir y repercutir en el aumento de la rentabilidad económica de las explotaciones, lo que podría hacer más atrayente y factible la dedicación laboral al sector primario.

E1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

E1.2.1. Diseño del estudio

E1.2.1.1. Población de estudio y procesado de las muestras

Durante el año 2004, se muestrearon un total de 31 rebaños situados en la isla de Lanzarote (figura E1.1), que agrupan aproximadamente un total de 14000 cabras de la raza majorera. Esta raza lechera, es autóctona de las Islas Canarias (tabla E1.1), representando el 56,88% aproximado de los 24610 caprinos totales del censo isleño (Fuente: Servicio de Estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias).

Los rebaños sobre los que se realizó el estudio tenían un rango de tamaño entre 50 y 1850 animales. En estas granjas, los animales se manejan de manera general en un régimen de producción extensivo o semi-intensivo, donde los animales son ordeñados diariamente por la mañana mediante sistemas de ordeño mecánico. La leche es refrigerada a 4°C de manera inmediata después del ordeño. No existe un programa de control de mamitis

clínicas o subclínicas instaurado en estas explotaciones para el control de la AC en el momento del estudio.



Figura E1.1 Situación geográfica de las explotaciones analizadas

El objetivo ha sido detectar la presencia de las diferentes especies de micoplasma implicadas en la AC en estos rebaños, realizando el diagnóstico específico a nivel individual, para determinar la prevalencia de la infección intramamaria por micoplasmas en infecciones subclínicas. Además, se ha realizado el diagnóstico de otras bacterias que forman parte de espectro etiológico de la mamitis caprinas mediante bacteriología convencional. Para el desarrollo del trabajo, se analizaron muestras individuales procedentes de un total de 31 rebaños, procedentes de animales aparentemente sanos y que no presentaban sintomatología de ningún tipo para el estudio particular de las especies de *Mycoplasma* spp. El tamaño de la muestra requerido para la detección de la enfermedad se estableció de acuerdo con el tamaño de cada rebaño y la expectativa de prevalencia en esta zona (Assuncao *et al.*, 2004) utilizando el software Win Episcopo 2.0 (Thursfield *et al.*, 2001), con un mínimo de 10 por rebaño. En algunos rebaños, el estudio se complementó con el

análisis de la leche del tanque de la visita a la explotación, al objeto tan sólo de ayudar a caracterizar el estatus de la explotación respecto a la AC.

Número de explotación	Localidad	Municipio	Número de individuos
Granja 1	El Cuchillo	Tinajo	470
Granja 2	Guatiza	Teguisse	800
Granja 3	Los Valles	Teguisse	100
Granja 4	La Vegueta	Tinajo	600
Granja 5	Teguisse	Teguisse	950
Granja 6	Playa Quemada	Yaiza	150
Granja 7	Soo	Teguisse	90
Granja 8	Montaña Blanca	San Bartolomé	90
Granja 9	Maguez	Teguisse	81
Granja 10	Soo	Teguisse	160
Granja 11	Playa Quemada	Yaiza	625
Granja 12	Playa Quemada	Yaiza	600
Granja 13	Maguez	Teguisse	117
Granja 14	Guatiza	Teguisse	70
Granja 15	Las Quemadas	Haría	100
Granja 16	Ye	Haría	50
Granja 17	San Bartolomé	San Bartolomé	750
Granja 18	Los Valles	Teguisse	100
Granja 19	Haría	Haría	1026
Granja 20	Teguisse	Teguisse	1850
Granja 21	Montaña	San Bartolomé	750

	blanca		
Granja 22	Maguez	Teguise	30
Granja 23	Los Valles	Teguise	200
Granja 24	Los Valles	Teguise	150
Granja 25	Los Valles	Teguise	330
Granja 26	La Costa	Tinajo	210
Granja 27	Mala	Teguise	60
Granja 28	Tesequite	Teguise	20
Granja 29	Soo	Teguise	210
Granja 30	Las Breñas	Yaiza	200
Granja 31	Las Breñas	Yaiza	300

Tabla E1.1: Localización y censo de los rebaños analizados en la E1.

Todas las muestras se transportaron a 4°C hasta el Laboratorio de Microbiología de la Granja Agrícola Experimental del Excmo. Cabildo Insular de Lanzarote, donde fueron procesadas. Las muestras fueron analizadas para detectar la presencia de *Mycoplasma* spp. y para ello fueron inoculadas en 2 ml de medio PH líquido (Kirchhoff y Rosengarten, 1984), cuya composición se describe en la tabla E1.2. Los tubos se incubaron a 37°C, y 24 horas más tarde fueron filtrados a través de 0.45 µm de diámetro. Posteriormente, se inoculó 2 ml de medio fresco con 250 µl del filtrado y se continuó con la incubación durante 2-15 días. Las muestras en las que se observó crecimiento, fueron subcultivadas en medio PH sólido (tabla E1.2) (Kirchhoff y Rosengarten, 1984), con 10 µl de cada cultivo líquido, incubándose las placas en cámara húmeda, a 37°C durante al menos 15 días antes, de considerarlas negativas.

Todos los aislamientos de *Mycoplasma* spp. fueron conservados mediante congelación a -20°C (con una solución protectora de glicerol al 15%). Para la correcta identificación microbiológica de la especie de micoplasma

aislada, se llevó a cabo una identificación bioquímica y molecular de todas las cepas según la metodología descrita más adelante.

Por otra parte, y con el objetivo adicional de determinar de modo general la presencia de otras bacterias asociadas a las mamitis subclínicas, se inoculó una batería de placas de Petri con diversos medios de cultivo; Agar sangre, Agar Saboureaud, Agar Baird-Parker y Agar Mc-Conkey (Cultimed, Panreac), cuya composición y preparación se especifica en la tabla E1.3 a-d. Las placas fueron posteriormente incubadas en condiciones aerobias a 37°C durante al menos 48 horas. Con posterioridad, se procedió a identificar los aislamientos.

Fase A:	
Bacto PPLO broth*	16.8 g
Agua bidestilada	700.0 ml
Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	
* En el medio sólido se sustituyó este componente por 28 g. de Bacto PPLO agar.	
Fase B:	
Extracto fresco de levadura (50% p/v)	9.0 ml
Solución de Penicilina G (100.000 UI/ml)	6.0 ml
Solución de ADN (0.4% p/v)	4.4 ml
Agua bidestilada	100.0 ml
Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó por filtración.	
Fase C:	
Suero de caballo estéril e inactivado	178.0 ml

Tabla E1.2: Composición y protocolo de elaboración de los medios PH líquido y PH sólido

En el caso concreto de los medios específicos para aislamiento de micoplasma (tabla E1.2), para elaborar el medio líquido, de forma aséptica se agregaron a la fase A, las fases B y C, distribuyéndose en tubos de 2 ml. estériles, que se conservaron a -20°C . Para elaborar el medio sólido, antes de mezclar las 3 fases, estas se atemperaron a 45°C , agregando posteriormente a la fase A, las fases B y C. Posteriormente, se distribuyeron inmediatamente después en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservaron a 4°C .

Agar sangre:

Composición (g/l):	
Infusión del Músculo Cardíaco (a partir de 375 g)	10.0
Peptona de Carne	10.0
Sodio Cloruro	5.0
Agar	15.0

Se suspenden 40 g en 1 l de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en tubos de ensayo o en placas de Petri estériles. Para preparar placas de Agar Sangre, inocular de 5 a 8% de Sangre desfibrinada antes de distribuir. El pH se ajusta a 7.3

Agar Baird Parker:

Composición (g/l):	
Extracto de Carne	5.0
Extracto de Levadura	1.0
Glicina	12.0
Litio Cloruro	5.0
Peptona de Caseína	10.0
Sodio Piruvato	10.0
Agar	

Se suspenden 60 g en 1 l de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45°C y añadir 50 ml de Emulsión de Yema de Huevo Telurito, homogeneizar y distribuir. El pH se ajusta a 6.8 ± 0.2 .

Agar MacConkey:	
Composición (g/l):	
Lactosa	10.0
Peptona	3.0
Sales Biliares	1.5
Peptona de Gelatina	17.0
Rojo Neutro	0.03
Sodio Cloruro	5.0
Violeta Cristal	0.001
Agar	

Se suspenden 50 g en 1 l de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas de Petri estériles con 20 ml en cada una. Dejar solidificar las placas parcialmente destapadas. El pH se ajusta a 7.1 +/- 0.2.

Agar Saboureaud:	
Composición (g/l):	
D(+)-Glucosa	20.0
Peptona	10.0
Agar	

Se disuelven 30 g en 1 l de agua destilada. Distribuir en tubos o frascos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. El pH se ajusta a 5.6 +/- 0.2.

Tabla E1.3 a, b, c y d: Composición y protocolo de elaboración de los medios de cultivo bacteriológico convencional utilizados

E1.2.1.2. Identificación de los aislamientos

En este trabajo, y a excepción de los aislamientos de *Mycoplasma* spp. identificados a nivel de especie, no hemos realizado la identificación a nivel de especie del resto de microorganismos aislados, al no ser un objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral. Tan sólo en algunos casos concretos, y debido a la importancia de una determinada especie, como puede ser *Staphylococcus aureus*, si hemos considerado interesante la identificación a este nivel.

E1.2.1.2.1. Identificación de *Mycoplasma* spp.

Para ello, se han realizado una serie de pruebas bioquímicas y moleculares:

E1.2.1.2.1.1. Pasos preliminares

En primer lugar, para evitar los cultivos mixtos de micoplasmas con otras bacterias, se procedió al clonaje, realizándose sucesivas diluciones de los cultivos positivos, y sembrándose en medio sólido para poder conseguir colonias bien separadas, que fueron extraídas con la ayuda de pipetas Pasteur estériles, y sembradas de nuevo en medio líquido, repitiéndose este proceso al menos tres veces.

E1.2.1.2.1.2. Identificación bioquímica

La composición de los medios empleados en la identificación bioquímica, se basa en la descripción realizada por Poveda, (1998). Todos los componentes de los medios para la identificación bioquímica se esterilizaron antes de mezclarse, conservándose a -20°C hasta su uso. Las soluciones de HIB (Heart infusion broth) e HIA (Heart infusion agar) se esterilizaron en autoclave y el resto por filtración (a través de 0.22 µm). La solución del extracto de levadura es calentada en un baño térmico a 60°C durante una hora, para inactivar la actividad fosfatásica del extracto de levadura. El suero de caballo se comercializa estéril y antes de su uso, y después de descongelarse, es calentado a 56°C durante 30 minutos para la inactivación del complemento. Finalmente, los medios fueron distribuidos en tubos de plástico estériles, a razón de 2 ml por tubo y conservados a -20° C hasta su uso. La descripción de los medios específicos utilizados se realiza a continuación:

Medio para la prueba de la fermentación de la glucosa

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de glucosa (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml

Se ajustó a un pH final de 7,6.

Medio para la prueba de la fermentación de la manosa

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de manosa (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml

Se ajustó a un pH final de 7,6.

Medio para la prueba de la hidrólisis de la urea

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de urea (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml

Se ajustó a un pH final de 7,0.

Medio para la prueba de la hidrólisis de la arginina	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de urea (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml

Se ajustó a un pH final de 7,0.

Medio para la prueba de reducción del tetrazolium	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	40 ml
Solución de extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución 2,3,5-trifeniltetrazolium (2% p/v)	20 ml

Se ajustó a un pH final de 7,6.

Protocolos:

La realización de las pruebas de identificación bioquímica se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Poveda, (1998). En aquellos casos en los que el microorganismo a identificar manifestaba un escaso crecimiento, fue preciso su adaptación previa en el medio líquido estándar con un 10% de suero.

-Fermentación de los azúcares (glucosa y manosa)

Para las pruebas de fermentación de la glucosa y de la manosa, se inocularon los tubos de ambos medios con 200 µl del cultivo fresco del microorganismo a identificar, agregando 0.5 ml de parafina líquida estéril para conseguir un ambiente anaerobio. Los tubos se incubaron a la temperatura adecuada (37°C), junto a un control negativo.

Ambas pruebas se consideraron positivas cuando se produjo un descenso del pH del medio de al menos media unidad de pH, momento en el

cual, el color del medio cambiaría hacia amarillo. Transcurridos 15 días sin cambio aparente del color, y por tanto del pH del medio, las pruebas fueron consideradas negativas.

-Hidrólisis de la urea

Para esta prueba, que sirve para diferenciar los ureaplasmas del resto de los *Mollicutes*, también se inocularon 200 µl de cultivo de todas las cepas a identificar, añadiéndose de igual modo 0.5 ml de parafina líquida estéril e incubándose a 37°C. Con la actividad ureásica, el pH aumentaría al menos 0.5, por lo que el color del indicador de pH (rojo fenol) viraría hacia rojo-violeta, considerándose la prueba negativa una vez transcurridas dos semanas.

-Hidrólisis de la arginina

Con esta prueba se pretendió detectar la actividad de la arginina dehidrolasa de los micoplasmas y para ello, se inoculó la misma cantidad de cultivo que en las pruebas anteriores, 200 µl, colocando los tubos en anaerobiosis a 37°C durante 15 días.

Si el medio se alcalinizaba, la prueba se consideraba positiva, mientras que si el indicador de pH no viraba a rojo violáceo, la prueba se consideraba negativa.

-Reducción del trifenil tetrazolium

Para demostrar la capacidad de reducción del 2-3-5- trifenil tetrazolium de las cepas estudiadas, se inocularon tubos con el medio por duplicado, uno en anaerobiosis con parafina líquida estéril, y otro en aerobiosis. Como control negativo se utilizó medio sin inocular. Todos los tubos se incubaron a 37°C hasta 15 días. En los casos positivos se detectó un precipitado rojo en el fondo del tubo.

E1.2.1.2.1.3. Producción de películas y cristales

Con la realización de esta prueba se pone de manifiesto la presencia o ausencia de actividad lipolítica. Para ello, se inocularon placas de medio sólido PH con un 20% de suero, a las que previamente se les eliminó la humedad superficial (a 37°C, 30 minutos), incubándose en atmósfera húmeda a 37°C.

Con la ayuda de un microscopio óptico y con el objetivo de 4X aumentos, se observó la formación de cristales (precipitados de Ca y Mg) alrededor de las colonias. La presencia de película se reveló el último día de incubación. Al inundar la placa con agua destilada, se debería desprender una fina capa de lípidos que quedaría flotando. Ambos efectos siempre aparecen juntos, ya que son el resultado de la acción de una lipasa.

E1.2.1.2.1.4. Identificación molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación definitiva de los aislamientos se utilizaron varias pruebas de biología molecular de la reacción en cadena de la polimerasa. Para el diagnóstico molecular, se han utilizado dos técnicas de PCR específicas para *Ma* (Tola *et al.*, 1996) y para el grupo *M. mycoides* (Hotzel *et al.*, 1996).

Los cebadores de *Ma* amplifican un fragmento de 375 pb del genoma de este microorganismo, situado en una región de 4.5 kb específica de dicho micoplasma (Tola *et al.*, 1994; 1996). Los cebadores del grupo *M. mycoides*, amplifican un fragmento del genoma de estos micoplasmas situado en la región genómica CAP-21, utilizando un par de “primers” que amplifican de modo general todos los miembros del grupo *M. mycoides*, oscilando el tamaño del amplicón entre 253 y 265 pb. Los oligonucleótidos fueron elaborados en Sygma-Genosys Ltd., Reino Unido, siendo la secuencia de los mismos reflejada en la siguiente tabla:

ESPECIE	SECUENCIA
M. agalactiae	FS1 5'-AAA GGT GCT TGA GAA ATG GC-3'
	FS2 5'-GTT GCA GAA GAA AGT CCA ATAC-3'
Grupo M. mycooides	P1 5' -TAT ATG GAG TAA AAA GAC- 3'
	P2 5' -AAT GCA TCA TAA ATA ATT G- 3'

Tabla E1.4: Cebadores utilizados en este estudio

Previamente a la realización de las técnicas de PCR, se realizó la purificación de los posibles ácidos nucleicos, siguiendo el protocolo descrito por Tola *et al.*, (1997), basado en la descripción de Boom *et al.*, (1990) para la extracción de ADN a partir de muestras de leche. Para ello, se obtuvieron 200 μ l de cada una de los cultivos a identificar y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 ml. A cada una de ellas, se le añadieron 50 μ l de solución desnaturizante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) dejando posteriormente el vial 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se añadieron 900 μ l de tampón de lisis (10.12 M tiocianato de guanidina, 0.1 M Tris HCl pH 6.4, EDTA 0.2 M y 2.6% Tritón X-100) y 40 μ l de matriz de sílice a cada muestra, dejándolas a temperatura ambiente 10 minutos, sin dejar de agitar manualmente. Posteriormente, tras aplicar breves segundos el vortex, se realizan 2 lavados con solución lavadora (10.12 M tiocianato de guanidina, 0.1M Tris HCl pH 6.4), 2 lavados con etanol y un lavado con acetona, centrifugando a 12.000 g durante 15 segundos al final de cada lavado. Tras el último de los lavados, y tras eliminar el sobrenadante, cada vial eppendorf se invirtió durante unos segundos en papel de filtro, y posteriormente se colocaron a 56°C durante 10 minutos en el hervidor de eppendorf con la tapa abierta. Transcurrido el tiempo, se resuspendió el pellet de cada eppendorf con 100 μ l de tampón TE pH 8.00, y se colocó nuevamente a 56°C durante 10 minutos en el hervidor de eppendorf pero con la tapa cerrada. Finalmente, y tras colocar

unos segundos en el vortex, se centrifugaron las muestras a 14.000 RPM durante 2 minutos, obteniendo directamente 50 µl del sobrenadante, utilizando 5 µl como muestra para la PCR. Como control positivo de la técnica, se empleó ADN purificado de las cepas (*M. agalactiae*, PG2) y (*Mmm LC*, Y-goat). Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes:

PASOS DE LA PCR		TEMPERATURAS Y TIEMPOS
Desnaturalización inicial		95°C durante 2 minutos
30 CICLOS	Desnaturalización	94°C durante 1 minuto
	Alineación	45°C durante 1 minuto
	Amplificación	72°C durante 45 segundos
Amplificación final		72°C durante 5 minutos

Tabla E1.5: Condiciones de la amplificación

E1.2.1.2.2. Identificación de otras bacterias

E1.2.1.2.2.1. Características culturales

En función del crecimiento o no en los principales medios de cultivo bacterianos y de algunas de las características observadas en las mismas (tamaño de la colonia, pigmentación, aspecto o presencia de halo de hemólisis, etc..) los aislamientos fueron clasificados en diversos grupos, a la espera de la realización del resto de pruebas. Por ejemplo, el crecimiento en agar MacConkey, nos diferenciaron las bacterias gramnegativas que pueden fermentar el azúcar lactosa y las que no lo hacen (coliformes de no coliformes, única diferencia que se observa habitualmente en el diagnóstico rutinario).

E1.2.1.2.2.2. Coloración o tinción de Gram

Para su realización, en primer lugar se fijó el material orgánico (colonias bacterianas en este caso) a la superficie de un portaobjeto. Posteriormente se

procedió a la tinción propiamente dicha. En primer lugar, se adicionó el colorante principal violeta cristal durante 1 minuto. A continuación se aplicó un mordiente durante 1 minuto, el yodo de Gram, para que el colorante alcalino se ligue a la pared celular bacteriana. El tercer paso, la decoloración, que dura unos 20 segundos, distingue las células grampositivas de las gramnegativas. Los dos últimos pasos consistieron en la aplicación de cristal violeta (retenido por los grampositivos) y posteriormente de la safranina durante unos 15 segundos, que colorea las bacterias gramnegativas de color rosa o rojo.

E1.2.1.2.2.3. Pruebas enzimáticas

Este tipo de pruebas está preparado para determinar la presencia de una enzima específica o una vía metabólica completa que contenga varias enzimas diferentes. En este caso utilizamos las siguientes pruebas:

E1.2.1.2.2.3.1. Prueba de la catalasa

Esta enzima media la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. Para determinar su presencia, se realizó la mezcla directa de un cultivo bacteriano con una solución de peróxido de hidrógeno. La producción rápida de burbujas (efervescencia) se interpreta como una reacción positiva. Esta prueba nos permitió diferenciar los cocos grampositivos en estafilococos o estreptococos.

E1.2.1.2.2.3.2. Prueba de la oxidasa

Esta enzima participa en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de ciertas bacterias. Nosotros realizamos el método de Kovac, que consiste en frotar una muestra de la colonia bacteriana sobre un papel de filtro impregnado con el reactivo que lleva el mismo nombre (dihidroclorhidrato de tetrametil-p-fenilenediamina al 1%). La presencia de un color púrpura oscuro indica una reacción oxidasa positiva. Esta prueba permitió diferenciar las especies de *Pseudomonas* del resto de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

E1.2.1.2.2.3.3. Prueba de la coagulasa

Esta prueba es utilizada para diferencial *S. aureus* (positivo) de los (ECN). Este microorganismo produce dos formas de coagulasa, ligada y libre. La ligada, o factor de aglutinación, se encuentra unida a la pared celular de la bacteria y reacciona directamente con el fibrinógeno, el cual se altera, precipita sobre la célula y genera la agrupación de las mismas al mezclar la suspensión bacteriana con el plasma. En este trabajo, hemos utilizado un kit comercial (Sigma).

E1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente experiencia pretendió realizar un estudio etiológico de la AC en la isla de Lanzarote. Para ello, se analizaron un total de 670 muestras individuales procedentes de las 31 granjas incluidas en el trabajo, complementadas por un total de 73 muestras de leche de tanque. En primer lugar, pudimos observar que la frecuencia de muestras en las que se produjo el aislamiento de alguna especie bacteriana asociada a la producción de mamitis subclínica en el ganado caprino fue del 39.8%, ya que del total de muestras, 267 resultaron ser positivas. De las muestras de tanque analizadas, donde sólo se determinó la presencia de micoplasmas, un total de 6 resultaron también positivas (8,2%). Los resultados microbiológicos en cada explotación se muestran en la tabla E1.6.

Rebaño	Muestras Ind.+LT	Ma	Mmc	Mcc	S. aur ¹	ECN ²	BG- ³	Otros ⁴
1	20+2	0	0	0	3	8	0	2
2	25+7	0	0	0	2	6	0	0
3	20+1	2	2	0	0	1	1	1
4	25+7	0	2+1 ⁵	0	2	5	3	2
5	20+1	0	4	0	1	6	3	1
6	20+1	0	0	0	1	8	0	0
7	20+2	0	0	0	1	7	0	0
8	20+1	0	1	0	1	8	4	0
9	20+1	0	0	0	0	0	0	0
10	20+1	0	0	0	1	6	0	0
11	25+7	0	0	0	1	4	5	0
12	25+7	0	1+1	0	2	3	3	0
13	20+1	0	3	0	2	6	0	0
14	20	2	0	0	0	5	0	2
15	20+1	0	0	0	2	5	1	0
16	20+1	0	3	0	2	4	5	0
17	20+1	2	2	0	1	4	1	2
18	20+1	0	0	0	1	0	1	0
19	30+7	0	4	7+3	2	7	0	3
20	30+7	0	0	0	1	3	0	0
21	20+7	0	3+1	0	1	2	0	0
22	20+1	0	0	0	0	2	0	0
23	20+3	0	1	0	1	0	4	3
24	20	2	2	0	0	1	4	0
25	20+1	0	0	0	2	1	6	1
26	20+1	2	0	0	2	0	3	0
27	20+1	0	0	3	0	3	0	0
28	20+1	0	2	1	0	0	0	0
29	20+1	0	1	3	0	4	1	0
30	20	0	2	0	0	3	4	1
31	20	0	1	0	0	1	4	2
TOTAL	670+73	10	34+3	14+3	32	113	53	20

¹ *Staphylococcus aureus*

² Estafilococos coagulasa negativos

³ Bacilos gram negativos (Enterobacterias)

⁴ Ocho muestras se identificaron como *Streptococcus* spp.

⁵ Aislamientos de la leche del tanque

Tabla E1.6: Resultados microbiológicos de la E1: Se indica el número de aislamientos de cada grupo identificados en cada explotación.

Hay que indicar que la comparación de nuestros datos con otros estudios de prevalencias de infección intramamaria resulta complicada, por la existencia de diversos factores, como el tipo de muestra analizada, la raza, las condiciones higiénico-sanitarias, el tipo de estudio realizado, el momento productivo de la toma de muestras, etc... En este sentido, el conjunto de factores propios existentes en cada rebaño, es probablemente el factor más influyente en la prevalencia de la infección (Corrales, 1998). No obstante, y a modo informativo, sí podemos citar algunos datos existentes, que nos sirvan para esclarecer el estado sanitario actual de rebaños los rebaños de Lanzarote, sin olvidar el objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral, describir la presencia de agentes asociados a la AC.

Los resultados anteriormente indicados se aproximan a los últimos análisis realizados en la Comunidad de Murcia, en la raza Murciano-Granadina, en los cuales un 37.2% de las muestras resultaron ser positivas, valores algo superiores a los obtenidos en dicha región en estudios anteriores (Corrales, 1998). Una prevalencia menor (28.7%) también se registró en Kenia recientemente (Ndegwa *et al.*, 2001), tras analizar 630 muestras de leche recogidas en razas caprinas como la Toggenburg o la Saanen, y en otros países africanos como Marruecos, los porcentajes de aislamiento se han situado en el 34% (El Idrissi *et al.*, 1994). En Nueva Zelanda, McDougall *et al.*, 2001, registraron un total de 17.7% muestras positivas tras realizar un estudio en cabras en lactación. Como podemos observar, los últimos datos de prevalencia de infecciones subclínicas registradas en otros países, han sido, por lo general, inferiores a los registrados en la isla de Lanzarote.

A pesar de eso, tal y como explicamos anteriormente, es difícil realizar la comparación directa entre los datos existentes, ya que estos resultados son valores puntuales encontrados en un momento y en unas condiciones muy concretas. Prueba de ello, es que algunos estudios realizados en países como Francia, hayan registrado valores dispares como el 32.6% y el 45% (Poutrel *et al.*, 1997). No obstante, hemos de indicar que algunos autores, estiman en un 33% la media de prevalencia de la infección intramamaria subclínica en el ganado caprino, y por ello, si resulta significativo que los valores obtenidos en

Lanzarote se encuentren por encima de este valor y superen, y casi dupliquen en algunos casos, los registrados en otras zonas productivas recientemente.

En cuanto a los resultados registrados en cada explotación, hemos de comentar que de las 31 explotaciones analizadas, en tan sólo una de ellas, resultaron todas las muestras analizadas negativas (3.2%). En el resto de las explotaciones (96.8%) siempre se detectó al menos un animal positivo tras el chequeo microbiológico. En 19 de ellas, se determinó la presencia de alguna especie de micoplasma asociada a la AC (58%) (tabla E1.6).

Centrándonos específicamente en los agentes involucrados en la AC, y concretamente en cuanto a la etiología de la infección intramamaria de origen micoplásmico, los aislamientos realizados (n=58) evidencian un porcentaje del 21,7% de infecciones producidas por varias especies del género *Mycoplasma* del total de muestras analizadas con resultado positivo, confirmando el papel emergente de este tipo de microorganismos como agentes causales de mamitis en el ganado caprino de la isla de Lanzarote. Estos porcentajes de aislamiento son muy superiores a los registrados en otras regiones del país, aunque en algunos casos, pueda justificarse por el propio diseño del estudio, como el caso del realizado por Corrales, (1988), que chequeó un conjunto de rebaños libres de micoplasmas. Estos elevados porcentajes de infección micoplásmica observados, podrían explicarse en parte por la introducción e intercambio de animales sin ningún tipo de control entre unas explotaciones y otras, principal factor favorecedor de la micoplasmosis (Nicolet, 1996) y práctica habitual en las Islas Canarias (Capote *et al.*, 1992).

Por especies, estos resultados, sitúan a *Mmc* como la especie de micoplasma que se aísla con mayor frecuencia en la isla de Lanzarote en el presente estudio, con datos similares a lo observado en la isla de Gran Canaria por De la Fe *et al.*, (2005) en rebaños crónicamente infectados. El 54,1 % de aislamientos identificado en la isla de Gran Canaria es similar al 58,6 % detectado en la isla de Lanzarote (12,6% del total de muestras positivas del estudio), si bien el primero de los trabajos incluyó la presencia de portadores auriculares y el análisis de hisopos tomados de esta localización anatómica. No

obstante, Déniz *et al.*, (1996) en brotes de AC acaecidos entre 1992 y 1995 para muestras obtenidas de toda Canarias, ya registró unos porcentajes del 58.6 % de aislamientos de *M. mycoides subsp. mycoides large colony* y un de 3,4% de *Mmc* (actualmente reclasificados ambos como una sólo especie *Mmc*, sobre la base de datos filogenéticos obtenidos recientemente (Manso-Silván *et al.*, 2007 y 2009;. Shahram *et al.*, 2010). Estos datos, significativamente similares pueden ser debidos al continuo intercambio que se produce entre estas islas dado que explotan la misma raza de cabra canaria, la raza majorera.

En comparación con los datos recogidos en el resto de España, donde *Ma* es frecuentemente la especie más prevalente, desconociendo que factores pueden ser los causantes de esta diferencia en la distribución, mencionar que estudios de seroprevalencia realizados en Canarias también evidencian una prevalencia para Lanzarote del 65% para *Mmc*, llegando al 90% para Gran Canaria (Assunção *et al.*, 2004), lo que evidencia la elevada difusión del microorganismo en los rebaños isleños, a diferencia de lo encontrado en el territorio peninsular donde en trabajos microbiológicos, *Mmc* se aisló el 4,55 % del total de las muestras positivas a *Ma* o *Mmc* en el ganado caprino (Amores *et al.*, 2012). Los estudios serológicos de esta especie en territorio peninsular son testimoniales. En el ovino, no suele detectarse su presencia como lo evidencian trabajos recientes donde se testaron 597 granjas de ovino en el territorio peninsular y no se aisló (Ariza *et al.*, 2012). Es significativo observar que diversos autores han estimado que *Mmc* es el agente causal de entre el 8.6% (Garrido *et al.*, 1987), el 10% (León Vizcaíno *et al.*, 1995) y el 15% (Villalba *et al.*, 1991) de los brotes clínicos de la enfermedad en todo el país, si bien la presencia de rebaños crónicamente infectados donde la presencia del agente puede verse enmascarada, podría subestimar el número real de rebaños infectados con este agente.

Un hecho similar sucede en el caso de *Ma*, donde los datos también reflejan la particularidad de las islas Canarias en comparación con el territorio peninsular. Este microorganismo está considerado el principal agente del síndrome de AC, tanto en ovino como en caprino, oscilando los porcentajes de

aislamiento en algunos casos entre el 60 y el 90% (Garrido *et al.*, 1987; León Vizcaíno *et al.*, 1995), porcentajes se han confirmado con posterioridad en Extremadura (Gil *et al.*, 1999). Más recientemente, Amores *et al.*, (2012) aislaron *Ma* en el 95,45 % del total de las muestras positivas a *Ma* o *Mmc* y en esta línea, Ariza *et al.*, (2012) observaron que un 100% de aislamientos se corresponden con *Ma* en granjas de ovino testadas en el territorio peninsular. Por ello resulta significativo que sólo el 10% de aislamientos de micoplasmas del presente trabajo realizado en la isla de Lanzarote se correspondan con *Ma*, relegando a este agente a un tercer lugar en el número de aislamientos, con sólo un 3,7% del total de muestras donde se aisló algún agente bacteriano. En otras islas, como en Gran Canaria, el porcentaje de aislamientos ha sido superior, con un 27% de los aislamientos en los estudios puntuales realizados (De la Fe *et al.*, 2005). Déniz *et al.*, (1996) en brotes de AC acaecidos entre 1992 y 1995 registró porcentajes del 20,7 % cercanos a los de De la Fe *et al.*, (2005) para muestras obtenidas de toda Canarias.

En este sentido, y pesar del menor papel epidemiológico de la transmisión indirecta, la isla de Lanzarote tiene un clima mucho mas seco que Gran Canaria lo que podría reducir la supervivencia en el medio del microorganismo dado el contagio horizontal entre animales sanos y clínicamente afectados (Perreau, 1977). Esto podría ser un factor a tener en cuenta en el mapa de la distribución de los diferentes agentes implicados en la AC, donde algunas de las especies implicadas como *Ma* pudiera ser más sensible a estos cambios ambientales en comparación con *Mmc*. En este sentido, trabajos recientes avalan la diferente susceptibilidad de los principales agentes asociados a la AC al empleo del calor como inactivante (Paterna *et al.*, 2013), un hecho ya descrito en la utilización de diversos protocolos de inactivación para la elaboración de bacterinas polivalentes frente a la enfermedad (De la Fe *et al.*, 2004).

En el caso de *Mcc*, que se identificó en un 24,1 % de los aislamientos de micoplasmas obtenidos de las muestras individuales (5,2% de las muestras positivas), a pesar de ser un patógeno importante en nuestro país desde la década de los 50, a partir de la década de los 80, pareció confirmarse la

escasa o nula presencia en los procesos agalácticos del país, atribuyéndosele sólo entre un 1.6% y un 2% de los brotes clínicos de AC estudiados (Talavera & Goncer, 1983; Garrido *et al.*, 1987). Más recientemente, también ha sido descrito en el conducto auditivo externo de tres machos caprinos portadores asintomáticos (Amores *et al.*, 2010). Es por ello que este porcentaje de aislamientos debe conllevar un estudio epidemiológico exhaustivo que aclare las causas que han producido tan elevado porcentaje de aislamientos en la isla de Lanzarote. Este hecho también podría deberse a un problema en su identificación como miembro del grupo *M. mycoides*, ya que si bien De la Fe *et al.*, (2005) no aislaron este agente, sugiriendo una distribución esporádica del mismo, esta especie sin embargo se ha detectado en el pasado (Garrido *et al.*, 1987; Gil *et al.*, 1999), incluso en brotes de AC acaecidos en las islas Canarias entre 1992 y 1995 (Déniz *et al.*, 1996). Así, recientemente, el avance en la identificación molecular de los aislamientos ha permitido reclasificar algunos aislamientos inicialmente identificados como *Mmc* en *Mcc* (De la Fe, comunicación personal). Déniz *et al.*, (1996) en brotes de AC acaecidos entre 1992 y 1995 encontró porcentajes del 3,4 %.

Actualmente, esta bacteria tiene básicamente importancia en algunos países africanos como Marruecos, Argelia o Nigeria (Belaid *et al.*, 1990; Egwu *et al.*, 2001) por lo que el factor geográfico sería uno de los aspectos que podría explicar, al igual que observamos previamente en algunos otros microorganismos, los porcentajes de aislamientos obtenidos en el presente estudio.

Continuando con las especies de micoplasmas aisladas, no se aisló ninguna cepa de *Mp*. En consonancia con nuestros resultados, De la Fe *et al.*, (2005) en Gran Canaria no aislaron *Mp*, sugiriendo una distribución esporádica del mismo. Esta especie, sin embargo, se ha observado en el pasado (Garrido *et al.*, 1987; Gil *et al.*, 1999). Así, Déniz *et al.*, (1996) encontraron porcentajes del 3,4% en brotes de AC acaecidos en Canarias entre 1992 y 1995. Mencionar que Chazel *et al.*, 2010 lo aislaron en el 15.5 % de los aislamientos de micoplasmas de Francia (periodo de 2003-2008), y que también han sido

descritos brotes en Extremadura donde *Mp* a tenido graves repercusiones en los rebaños (Gil *et al.*, 2003).

Globalmente, la situación observada en nuestro trabajo, es similar a la descrita en el ganado caprino francés, donde en el periodo transcurrido entre 2003 y 2008, *Mmc* fue la especie más frecuentemente identificada en el ganado caprino (42.3%), seguida de *Mcc* (26.3%) (Chazel *et al.*, 2010). Al igual que ocurre en Lanzarote, *Ma* en Francia resultó ser identificado con menos frecuencia (2%).

En nuestro trabajo, no hemos valorado los aislamientos procedentes de muestras de leche de tanque, al analizarse éstas de un modo muy dispar entre las diferentes explotaciones. En 7 explotaciones se analizó un número significativo de muestras (n=7), al realizarse diversas visitas durante el estudio, mientras que no disponemos de datos de algunas explotaciones, lo que hace imposible realizar cualquier valoración o discusión al respecto. No obstante, los aislamientos procedentes de dichas muestras (n=6) no modificaron el estatus etiológico de las explotaciones de las que se obtuvieron, al aislarse dicha especie de las muestras individuales. Ello refleja la utilidad de la leche de tanque como muestra representativa del estatus sanitario del rebaño (Contreras *et al.* 2008; Ariza De Miguel *et al.*, 2012). No obstante, se ha corroborado que para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de la AC caprina, es necesario contemplar la muestra de leche individual (Amores *et al.*, 2012).

En referencia a la presencia de otros agentes bacterianos identificados durante el análisis de las muestras de leche, y contrariamente a lo observado anteriormente en referencia a los datos de prevalencia, los porcentajes de aislamiento de los diferentes grupos estudiados si suelen ser bastante similares en los estudios realizados (Corrales, 1998). Como podemos observar (tabla E1.6), las bacterias pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* son los microorganismos aislados en un mayor número de ocasiones. Especialmente significativo, resulta el 41% de aislamientos de microorganismos pertenecientes al grupo de los (ECN) en todas las muestras positivas, para un

total de 16,8% del total de muestras de leche analizadas en este trabajo. Este grupo de bacterias son los microorganismos más importantes asociados a la mamitis subclínica del ganado caprino (Poutrel *et al.*, 1997; Ndegwa *et al.*, 2000; De la Fuente y Orden, 2002) aunque en alguna ocasión, como el trabajo realizado por Maisi y Riipinen, (1991), se haya señalado que *S. aureus* es el estafilococo más prevalente en este tipo de mamitis.

No obstante, nuestros resultados discrepan con los obtenidos por otros autores en lo referente al porcentaje de aislamiento de estos microorganismos. Según Bergonier *et al.*, (1999), éste, oscila entre el 75 y el 80% de los casos registrados, un porcentaje mucho mayor al registrado en Lanzarote, si bien, refiere que en algunos casos pueden registrarse variaciones del mismo. Así, en otras zonas de España, en Murcia oscila entre el 60.1% antes del secado y el 60% después del parto, Corrales, (1998) y en Madrid, el porcentaje de aislamientos oscila alrededor del 86% del total de mamitis subclínicas analizadas (Las Heras, 2002). No obstante, resulta epidemiológicamente interesante el estudio de algunos datos obtenidos en Marruecos, un país muy cercano geográficamente al archipiélago canario, y con unas condiciones climáticas y generales que pueden aproximarse más a lo registrado en las islas. En este caso, el Idrissi *et al.*, (1994), sitúan el porcentaje de mamitis subclínicas ocasionadas por ECN en torno al 43%, un valor muy similar al registrado en nuestro estudio. No obstante, prueba de la dificultad de establecer paralelismos, otros autores africanos como Ndegwa *et al.*, (2000), los aíslan en el 64.3% de los casos acontecidos en Kenia. En la comunidad de Madrid, la especie predominante fue *S. epidermidis*, aunque fueron también aislados, en orden decreciente de importancia, *S. chromogenes*, *S. lentus*, *S. xilosus*, *S. warneri* y *S. caprae*, mientras que en Murcia, *S. caprae* fue aislado en un número mayor de ocasiones antes del secado y después del parto, seguido de *S. xilosus*, *S. epidermidis* y *S. chromogenes* en ambos casos, y también de *S. hominis* y *S. capitis*, después del parto, Corrales, (1998). En nuestro caso, y a pesar de que no hemos realizado la identificación generalizada de todos los microorganismos aislados, hemos registrado la importancia de especies como *S. simulans*, *S. chromogenes* y *S. caprae* tras el análisis esporádico de algunas de las cepas aisladas.

En un estudio realizado en Italia y España, Bergonier *et al.*, (1999), citan prevalencias de *S. aureus* entre el 5,5% y el 9,8% respectivamente, en ambos países. Como podemos observar, el primer valor se acerca bastante al 5,8% observado por nosotros en la isla de Lanzarote, para un total del 11,8% de las muestras positivas. En Murcia, sin embargo, este porcentaje, disminuyó al 6.5% antes del secado, y tan sólo al 0.46% después del parto (Corrales, 1998), coincidiendo con lo observado en Madrid (1.4%) (Las Heras, 2002). En las Islas Canarias, este porcentaje parece aumentar de modo significativo, siendo aislado en el 15% de las ocasiones como agente causal de las mamitis subclínicas, según los datos obtenidos por Poveda, (2003). Curiosamente, estos datos se muestran en consonancia nuevamente con lo observado en algunas regiones africanas geográficamente cercanas como Marruecos, donde el porcentaje de aislamiento de este microorganismo alcanza el 13% (el Idrissi *et al.*, 1994).

Aunque en algunas ocasiones, *Micrococcus spp.* puede estar implicado en la etiología de estas mamitis, e incluso algunos autores han encontrado una frecuencia de aislamiento de hasta el 17.7% (Ndegwa *et al.*, 2000), en nuestro país la frecuencia de presentación ronda el 1%, (Corrales, 1998; Las Heras, 2002), lo que es coherente con la ausencia de mamitis originadas por estos microorganismos observada en la presente experiencia. Un hecho similar ha sucedido con otros microorganismos grampositivos como las corinebacterias y *Bacillus spp.* Estos agentes también adquieren mucha importancia en otros estudios, registrando las primeras porcentajes de aislamiento que oscilan entre el 5% (Las Heras, 2002), el 12%, (Contreras *et al.*, 1995), o incluso el 26%, (Corrales, 1998), y los segundos, hasta un 27% de los aislamientos (el Idrissi *et al.*, 1994). Sin embargo, en nuestro caso, su presencia parece ser sólo testimonial (tabla E1.6), en coincidencia con lo observado por Poveda, (2003) en mamitis subclínicas registradas en el archipiélago canario.

Por otro lado, un dato que no debería de ser menospreciado es el 3% de muestras positivas en los que se ha aislado como agente causal a los estreptococos, para un total de un 1,2% del total de muestras de leche

individual analizadas. Tal y como se ha apreciado en varios estudios, la presencia de estreptococos en los procesos de mastitis subclínicas no pasa de ser meramente anecdótica, con porcentajes cercanos al 1% (Contreras *et al.*, 1995; Corrales, 1998; Ndegwa *et al.*, 2000; Las Heras, 2002). Sin embargo, nuestros resultados indican que, aunque en un pequeño porcentaje, este microorganismo es responsable de un porcentaje de las mastitis subclínicas que se producen en la isla de Lanzarote.

En las Islas Canarias, algunos datos sitúan el porcentaje de aislamientos de bacterias gram negativas se estima en un 10% respectivamente, encontrándose entre las especies más significativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Poveda, 1988). En nuestro estudio, hemos registrado un porcentaje de aislamientos elevado, siendo identificadas la mayor parte de las cepas bacterianas aisladas al grupo de las enterobacterias, siendo identificadas puntualmente algunas de ellas como *Escherichia coli*.

Globalmente, los resultados obtenidos en la presente experiencia ofrecen una radiografía de los principales agentes etiológicos implicados en las mastitis subclínicas caprinas de la isla de Lanzarote. Estos resultados, podrían ayudar al desarrollo de estrategias de lucha más específicas frente a este tipo de infecciones en la isla. En el caso de la AC, el conocimiento de los agentes etiológicos presentes en los rebaños permite implementar antibioterapias orientadas que disminuyen el riesgo de generar antibioresistencias (Gómez-Martín *et al.*, 2013a). Además, siguiendo las sugerencias de algunos autores (Contreras *et al.*, 2008), es relevante considerar que estos resultados pueden ayudar a desarrollar programas de control y vigilancia de mastitis en la isla de Lanzarote, lo que no sólo podría mejorar la rentabilidad de los rebaños sino que también repercutiría favorablemente en el aumento de la calidad de sus productos lácteos.



V. Experiencia 2

V. EXPERIENCIA 2: AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA Y CALIDAD DE LA LECHE EN ÁREAS ENDÉMICAS

Este trabajo de Tesis Doctoral también ha pretendido contribuir al estudio del efecto que tiene la AC caprina en la calidad y producción de la leche producida en un área endémica de AC.

Para tal finalidad, se han desarrollado dos experiencias diferentes:

1. En primer lugar, hemos evaluado el efecto de la presencia de *Mycoplasma* spp. en los parámetros físico químicos y microbiológicos de la leche del tanque producida en rebaños situados en un área endémica de AC caprina.
2. En segundo lugar, hemos evaluado el efecto que ocasiona un brote clínico de la enfermedad en el volumen de leche producida en un rebaño situado en un área endémica, comprendiendo los años previos al episodio clínico y los años posteriores.

EXPERIENCIA 2.A: PRESENCIA DE *MYCOPLASMA* SPP. Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA LECHE

E2.A.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se indicó durante la revisión bibliográfica, la relación entre la infección crónica por *Mycoplasma* spp. en los rebaños caprinos, su presencia en la leche del tanque (BTM) y el RCS ya fue evaluado con anterioridad (Corrales *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2008), si bien, su efecto en la calidad de la leche de los rebaños crónicamente infectados permanece sin evaluar. En efecto, en el caso de la AC caprina, lejos de una situación epidemiológica caracterizada por brotes clínicos de la enfermedad, la situación epidemiológica más habitual en áreas endémicas se caracteriza por la presencia de rebaños infectados asintomáticos (Gómez-Martín *et al.*, 2013a) donde las posibles repercusiones en la calidad lechera podrían estar infravaloradas.

Los efectos en la composición de la leche de tanque en los rebaños crónicamente infectados son cruciales si tenemos en cuenta que la leche de cabra y oveja es mayoritariamente utilizada para la elaboración de queso (Pirisi *et al.*, 2007), tal y como tradicionalmente sucede en las Islas Canarias.

En el trabajo, otros factores relacionados con la calidad microbiológica de la leche, y por tanto, con los sistemas de pago por calidad que se están instaurando, como el recuento de bacterias en placa (SPC) y la presencia de *S. aureus*, fueron comparados en rebaños de animales infectados con micoplasmas y en rebaños no infectados.

E2.A.2. MATERIAL Y MÉTODOS

E2.A.2.1. Diseño del estudio, rebaños y estatus respecto a *Mycoplasma* spp.

Se seleccionaron un total de 26 rebaños de los 31 analizados durante la primera experiencia de la presente Tesis Doctoral al objeto de estudiar los parámetros de calidad que indicaremos con posterioridad en función de la presencia o no de micoplasmas asociados a la AC en la explotación. Para ello, se seleccionaron un total de 13 rebaños infectados y 13 rebaños donde no logró determinarse previamente la presencia de estos microorganismos. El estatus sanitario de los rebaños fue definido de acuerdo con los resultados de los análisis microbiológicos realizados. Un rebaño fue considerado infectado por *Mycoplasma* spp. cuando al menos una muestra de un individuo o del tanque resultó positiva a su presencia, sin necesidad de que el mismo presentara signos clínicos de la enfermedad.

En los 13 rebaños infectados, se determinó previamente la presencia conjunta de *Ma* y *Mmc* (n=4), la presencia de *Mmc* junto a *Mcc* (n=1) o bien se determinó únicamente la presencia de un microorganismo como *Mmc* (n=7) o *Ma* (n=1).

E2.A.2.2. Muestras de leche del tanque

En las explotaciones seleccionadas se recogieron muestras de leche del tanque a lo largo de toda la lactación, a intervalos de 42 días siguiendo el esquema de recogida de muestras del programa para la mejora de la calidad de la leche de cabra producida en la isla de Lanzarote, financiado por el Gobierno de Canarias. El número de muestras analizadas en cada rebaño osciló entre 9 y 12 a lo largo de todo el estudio. Todas las muestras, sin la adición de conservantes, fueron inmediatamente conservadas a 4°C por un periodo comprendido entre 2 y 4 horas y transportadas al laboratorio de microbiología de la Granja Agrícola Experimental, donde se llevaron a cabo los correspondientes análisis dentro de las primeras 24 horas tras la recolección de las muestras.

E2.A.2.3. Calidad de la leche: Parámetros estudiados

E2.A.2.3.1. Calidad microbiológica

En cada muestra de tanque se realizó un (SPC) para determinar la presencia de microorganismos aerobios mesófilos y se determinó la presencia de *S. aureus* de acuerdo con los procedimientos IDF Standard 100B (1991) y IDF Standard 145A (1997) respectivamente.

Para ello, una alícuota de 10 microlitros cada una de las muestras fue cultivada en placa en un medio de cultivo de agar-sangre. Los medios fueron incubados de manera aeróbica a 37°C y examinados a las 24, 48 y 72 horas. El aislamiento de 5 colonias idénticas (500 ufc/ml) es tomado como indicador de que un individuo posee una infección intramamaria subclínica y el aislamiento de tres o más tipos diferentes de colonias fue considerado como un indicador de contaminación. La identificación de las bacterias se realizó siguiendo las recomendaciones del National Mastitis Council (Harmon *et al.*, 1990).

E2.A.2.3.2. Calidad físico-química

Los componentes de la leche tales como grasa, proteínas totales, lactosa y sólidos totales de las muestras de leche de tanque fueron analizados por duplicado mediante el uso de un MilkoScan FT 120 (Foss Electric, Hillerød, Denmark), el cual realiza la determinación a través de un sistema de absorción infrarroja, método utilizado en múltiples estudios (Bianchi *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Leitner *et al.*, 2007; Amores *et al.*, 2008; Silanikove *et al.*, 2014; Tomazi *et al.*, 2015).

E2.A.2.3.3. Análisis estadístico

Para determinar estadísticamente las diferencias entre los parámetros evaluados, se siguió el procedimiento PROC MIXED del SAS (SAS institute, 1998) usando un modelo mixto en el cual el efecto del rebaño fue al azar todo el mes (12 niveles), la presencia de micoplasma y de *S. aureus* de los rebaños fue fija. El estatus en el que se encontraban los rebaños frente micoplasma se definió en dos niveles: rebaños infectados y no infectados. El estatus en el que se encontraban los rebaños frente a *S. aureus* se definió en dos niveles: rebaños infectados y no infectados. Un rebaño se considera infectado frente a *S. aureus* cuando al menos una de las muestras de tanque fue positiva para esta bacteria. Las variables dependientes incluidas en este modelo fueron: grasa, proteína total, lactosa, sólidos totales y log del recuento de bacterias en placa.

E2.A.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Para la presente experiencia, se analizaron un total de 264 muestras de leche de tanque. Los datos obtenidos en el análisis de los posibles efectos sobre los parámetros de calidad de la leche de tanque en los 26 rebaños estudiados son mostrados en la Tabla 1. En líneas generales, estos resultados sugieren que la presencia de micoplasmas parece no tener repercusión sobre la calidad de la leche de tanque de las explotaciones. Los datos obtenidos en

cada muestreo se indican en las tablas del material suplementario de esta experiencia.

A pesar de la escasa información disponible sobre la detección de micoplasmas asociados a la AC en la leche de tanque en rebaños caprinos (Amores *et al.*, 2012; Contreras *et al.*, 2008) y los pocos datos en la literatura de los efectos de patógenos en la calidad de la leche de tanque, nuestros resultados están de acuerdo con lo observado en ganado vacuno por otros autores, donde los componentes cualitativos de la leche no se relacionaron significativamente con la presencia de micoplasmas en la leche del tanque (Fox *et al.*, 2003). En dicho trabajo, los estudios realizados en rebaños con aislamiento de micoplasmas reflejaron que el porcentaje de grasa fue menor, mientras que el porcentaje de lactosa fue superior en los rebaños positivos a micoplasma, aunque sin llegar a ser significativo en comparación con los rebaños sin presencia de micoplasma (Fox *et al.*, 2003). Estos resultados coinciden con nuestros resultados en referencia a la falta de significancia pero con una diferencia, y es que en nuestro estudio el porcentaje de grasa fue mayor en los rebaños infectados con micoplasma. Una posible explicación es que al tratarse de una raza carente de un programa avanzado de selección, los parámetros cualitativos de la leche varían en función de la selección propia realizada por cada ganadero, pudiendo darse el caso que rebaños portadores de micoplasma tengan una mayor producción de grasa debido al genotipo o una mejor alimentación. Estos autores también estudiaron los cambios en la calidad de la leche a los 12 meses del primer aislamiento positivo de *Mycoplasma* spp. los cuales no fueron significativamente diferentes en cuanto a la concentración de grasa, en comparación con los 12 meses antes de aislamiento. Sin embargo las proteínas y la concentración de lactosa sí se redujeron significativamente en dicho periodo (Fox *et al.*, 2003).

Trabajos similares realizados también en la especie bovina al objeto de establecer el efecto de la infección intramamaria subclínica causada por (ECN) sobre los parámetros cualitativos de producción de láctea, demostraron que la infección intramamaria tampoco tuvo efecto sobre el contenido de grasa, de proteína, de caseína, de lactosa, de sólidos totales ni sobre los sólidos no

grasos (Tomazi *et al.*, 2015). No obstante, en relación a los cambios cualitativos de la leche en presencia de otros agentes, Leitner *et al.*, (2007) observó como en caso de infección intramamaria, la lactosa y la proteína se ve significativamente afectada pero no así la grasa. Bianchi *et al.*, (2004) si observan descensos significativos de la grasa en leche individual de ovejas infectadas en base al valor del RCS, al igual que Pisoni *et al.*, (2004) donde registraron un descenso en la concentración de grasa en cabras infectadas con *S. aureus*.

En relación al RCS, y aunque nosotros no hemos evaluado los cambios en este trabajo, Corrales *et al.*, (2004) no encontraron cambios significativos en la leche de tanque entre las muestras analizadas procedentes de rebaños infectados crónicamente por micoplasmas asociados a la AC y rebaños libres de la infección, con ausencia de signos clínicos de la enfermedad ya que es durante un episodio de mastitis clínica cuando las defensas inmunitarias de la ubre se activan, los leucocitos polinucleados pasan de la sangre a la glándula mamaria en gran número, y el RCS en la leche aumenta (Pirisi *et al.*, 2007).

	Infectados con micoplasma	SE	No infectados con micoplasma	SE
Rebaños	13		13	
Tamaño medio de los rebaños	439.46	97.9	364.31	140
Rebaños infectados con <i>S. aureus</i>	11		11	
Media log de <i>S. aureus</i>	3.49	0.99	3.04	0.87
Grasa %	4.74 ^a	0.11	4.63 ^a	0.12
Proteína total %	4.19 ^a	0.06	4.14 ^a	0.06
Lactosa %	4.55 ^a	0.10	4.44 ^a	0.10
Sólidos totales	14.34 ^a	0.14	14.24 ^a	0.14
Log SPC	5.48 ^a	0.13	5.65 ^a	0.14
SPC † ($\times 10^{-3}$ ufc/ml)	302		447	

a, medias con diferentes superíndices dentro de la línea significativamente ($P < 0.001$)

† Media geométrica del recuento de bacterias en placa (SPC)

Tabla 1: Tamaño del rebaño, estatus frente a *S. aureus*, medias cuadradas y SE de los componentes del tanque de leche y el recuento de bacterias en placa (SPC) de acuerdo con el estatus del rebaño frente a la presencia de micoplasmas.

A nivel microbiológico, en el presente estudio la media logarítmica del recuento de bacterias en placa (SPC) con un número de muestra $n=5$ fue de 5.51 ± 0.07 (media geométrica: 324×10^3 cfu/ml), no observándose ningún efecto significativo en referencia a la presencia o ausencia de micoplasmas en la explotación. Es necesario indicar que la leche de cabra producida en Lanzarote en el momento de desarrollo del presente trabajo se somete a pasteurización

y se utiliza en su totalidad para la elaboración de queso y que la media del (SPC) en cada rebaño estuvo siempre por debajo de los límites establecidos por la Unión Europea (1.0×10^6 cfu/ml) en la DIRECTIVA 92/46/CEE DEL CONSEJO de 16 de junio de 1992 por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos aplicables a las producciones lecheras de cabra y oveja (Pirisi *et al.*, 2007).

A pesar de esto, algunas de las muestras individuales de tanque de leche sobrepasaban este límite. Esto puede ser explicado por el hecho de que los recuentos en placa han sido tomados en muestras que han permanecido más de un día en el tanque ya que la mayoría de las granjas de la isla los camiones de distribución de recogen la leche cada 2 o 3 días. Este factor ha sido relacionado con altos (SPC) en muestras obtenidas en tanques de leche de granjas de pequeños rumiantes (Zweifel *et al.*, 2005). Otros factores que influyen la calidad microbiológica de la leche, tales como las condiciones de higiene durante el ordeño o las prácticas de cría deben ser revisadas en un esfuerzo por reducir el (SPC) en los rebaños. En el caso de las diferentes prácticas de ordeño, observamos que los recuentos menores se logran con la utilización de máquinas de ordeño en una sala acondicionada a tal fin y con traslado directo al tanque de frío, si bien también se registran mayores valores cuanto mayor es el tamaño del rebaño (Zweifel *et al.*, 2005). Estas consideraciones serían coherentes por tanto con los recuentos bacterianos medios de este trabajo, (que estuvieron dentro de los límites legales establecidos), dado que los rebaños empleados no excedieron de un tamaño medio de 440 individuos y debido a que todos empleaban salas de ordeño con adecuadas condiciones de higiene.

Tal y como hemos indicado, las diferencias en los (SPC) entre los distintos rebaños con un estatus diferente ante la presencia de micoplasmas no fueron significativas. A pesar de la falta de información disponible, estas observaciones están en consonancia con las encontradas por Gonzalo *et al.*, (2006) quien observó que los brotes clínicos de AC en ovejas no suponían un incremento significativo en el recuento total de bacterias. Otros autores han

observado que la contribución de un grupo particular de bacterias al recuento total de la leche, sólo es coherente para las muestras recogidas del mismo rebaño, mientras que varió considerablemente en muestras de diferentes productores (Foschino *et al.*, 2002). Análisis estadísticos mostraron que existen diferencias significativas en el recuento de bacterias totales asociadas a diferentes factores como el mes de recogida de la muestra, el número de ordeños que contiene el tanque de leche, las diferentes prácticas de ordeño realizadas y el tamaño del rebaño (Zweifel *et al.*, 2005).

En referencia a la presencia de *S. aureus* en las explotaciones seleccionadas, dicho microorganismo se aisló en 22 de los 26 rebaños examinados lo que supone un 86 % del total. La media logarítmica de *S. aureus* encontrada fue de 3.30 ± 0.96 (una media geométrica de 2×10^3 cfu/ml) lo que sugiere una alta prevalencia de este microorganismo en los rebaños de la isla. Este hallazgo es un motivo de preocupación debido al riesgo para la Salud Pública que supone el consumo de productos elaborados con leche no pasteurizada o leche cruda (Muehlerr *et al.*, 2003). Además, es importante considerar que las toxinas producidas por esta especie pueden contaminar incluso la leche pasteurizada (Schmid *et al.*, 2009).

En relación a la presencia de esta especie, el análisis estadístico también reveló que el estatus de un rebaño frente a *S. aureus* si contribuye significativamente a los niveles de grasa determinados en la leche de tanque (5.21 ± 0.20 % en los rebaños no infectados frente a 4.63 ± 0.08 % en los rebaños infectados). Teniendo en cuenta la sugerencia anterior las concentraciones de lactosa, proteínas o grasas podrían verse afectadas por la infección (Leitner *et al.*, 2007). Incluso cuando este agente se presenta de forma subclínica origina pérdidas en volumen de leche producida y en su composición (Gonzalo *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2004), tal y como también evidencian Pisoni *et al.*, (2004) que registran un descenso en la concentración de grasa en cabras infectadas con *S. aureus*.

Todo esto, junto con el hecho de que los estafilococos son los

patógenos más comúnmente aislados en las glándulas mamarias de las cabras (Contreras *et al.*, 1997) los futuros estudios deberían tratar de determinar los efectos específicos que ocasiona la presencia de *S. aureus* en la composición de la leche de tanque en las explotaciones caprinas.

Sin embargo Tomazi *et al.*, (2015) estudió el efecto de la infección intramamaria subclínica causada por (ECN) sobre la producción de leche, su composición y el RCS, observando que la infección intramamaria no tuvo efecto sobre la producción de leche, el contenido de grasa, la proteína cruda, la caseína, la lactosa, los sólidos totales ni sobre los sólidos no grasos, pero si aumentó el RCS, concluyendo que la mamitis subclínica causada por ECN aumenta el RCS pero no tiene ningún efecto sobre la producción de leche y su composición en vacas lecheras.

A pesar de no observarse la existencia de síntomas clínicos o efectos sobre la calidad físico-química de la leche de tanque en los rebaños infectados por agentes asociados a la AC, el porcentaje de aislamientos de micoplasmas y la respuesta inflamatoria que ocasiona su presencia en los animales infectados clínica o subclínicamente (Castro *et al.*, 2010) evidencian la necesidad de realizar un control estricto de la enfermedad. Las observaciones muestran que pueden producir episodios clínicos de la enfermedad bajo determinadas condiciones de estrés o reducción de la respuesta inmune del huésped (De la Fe *et al.*, 2007) destacando el alto impacto clínico y económico de la presencia de micoplasma en las zonas endémicas, difícilmente estimables.

Los resultados confirman que Lanzarote debe ser considerada un área en la cual la AC es endémica pero donde la sintomatología típica no es frecuentemente observada. A pesar del elevado impacto económico que produce su presencia en relación a parámetros como el volumen de leche producido, el desvieje precoz de animales o los gastos veterinarios derivados del intento de controlar la enfermedad, en este trabajo, la presencia de micoplasmas en los rebaños analizados no tuvo ningún efecto significativo en la calidad de la leche de tanque y no se observaron diferencias significativas en

el (SPC) o el estado de los rebaños frente a *S. aureus* que puedan ser atribuibles a su presencia.

En base a ello, los parámetros de medida de la calidad de la leche de cabra como son el porcentaje en grasa, proteína total, lactosa y sólidos totales no deberían ser empleados como métodos de detección indirecta para detectar o sospechar la presencia de rebaños crónicamente infectados de AC.

E2.B EFECTO DE UN BROTE AGUDO DE AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA SOBRE EL VOLUMEN DE LECHE PRODUCIDO: INTRODUCCIÓN

E2.B.1. INTRODUCCIÓN

Además de evaluar el efecto que ocasiona la AC crónica sobre la calidad de la leche, la segunda parte de esta experiencia ha evaluado el efecto que produce la presentación de un brote agudo de AC en un rebaño caprino en producción, considerando la leche producida en el mismo durante los últimos 7 años. Hasta la fecha, no existen trabajos que evalúen el porcentaje de leche que deja de producir un rebaño infectado de forma natural ante un brote clínico de la enfermedad. Estos brotes, suelen acontecer ante la presentación de factores estresantes que ocasionan una bajada general del estado inmunitario del colectivo (De la Fe *et al.*, 2007) o ante la introducción de nuevos animales portadores asintomáticos (Corrales *et al.*, 2007). En este sentido, no debe ser obviado que el movimiento de animales sin control sanitario es una práctica habitual en todo el país, y por ello, en las Islas Canarias (Capote *et al.*, 1992).

Al margen de zoonosis como la brucelosis o la tuberculosis, la AC es considerada como la enfermedad con mayores repercusiones socioeconómicas para el sector caprino lechero. Una de las principales causas son los aparatosos brotes clínicos característicos de la infección, donde una explotación puede ver reducida la producción lechera de forma severa en cuestión de semanas y comprometer así su viabilidad económica (Bergonier *et al.*, 1997; Corrales *et al.*, 2007; Gómez-Martín *et al.*, 2013a). La robusta cuantificación del impacto de las pérdidas de producción lechera en rebaños caprinos afectados por un brote clínico, podría en nuestra opinión ayudar a esclarecer el impacto económico que ocasionan en el sector, favoreciendo la concienciación sobre la necesidad de invertir recursos en el control y prevención de esta enfermedad.

Siendo conscientes de la dificultad de realizar un estudio microbiológico y de producción individual en un rebaño afectado de AC en condiciones

naturales, por el elevado número de factores presentes, el objetivo de esta experiencia fue realizar un análisis de la producción de un rebaño caprino de raza majorera afectado por un doble brote clínico agudo de AC de etiología mixta.

Para tal fin, se han podido recabar datos del rebaño en estudio, tanto de varios años antes como de después de la presentación del primer brote y donde tras su monitorización, se han caracterizado los microorganismos que lo han ocasionado en cada momento, para un total de 7 años de control (2009-2015).

Esta información se complementa con la descripción detallada del episodio clínico (clínica, movimiento de animales, antibioterapia, etc.), lo que podría servir de base para un estudio económico posterior más detallado que trate de evaluar las pérdidas económicas reales de un rebaño afectado por un brote de AC, que obviamente, no se limitan al volumen de leche que deja de producir el mismo, objetivo no abordado en la presente Tesis Doctoral.

E2.B.2 MATERIAL Y MÉTODOS

E2.B.2.1. Características del rebaño seleccionado

La experiencia se ha desarrollado a lo largo de un periodo de 7 años durante los cuales se produjeron dos brotes agudos de AC en un rebaño caprino situado en el municipio de Tinajo, en la isla de Lanzarote. El rebaño está formado por cabras de la raza Majorera y el número de cabezas del rebaño ha oscilado entre 700 y 1300 a lo largo del estudio. Considerando el número de animales presentes en la explotación al final de la misma, la tabla 2 indica la distribución aproximada por edades:

EDAD	Nº ANIMALES	PORCENTAJE SOBRE TOTAL
Animales menores de un año	-150	11.53 %
Entre 1 y hasta los 2 años	-300	23.07 %
Entre 2 y hasta los 4 años	-400	30.76 %
Entre 4 y hasta los 6 años	-150	11.53 %
Entre 6 y 7 años*	-300	23.07 %
Machos	20	

*No suelen permanecer animales mayores de 7 años en la explotación.

Tabla 2: distribución aproximada por edades de los animales presentes en el rebaño estudiado en esta experiencia sobre un total de 1300 individuos.

En referencia a las características sanitarias del rebaño, la explotación en cuestión sigue un programa vacunal dirigido por una Asociación de Defensa Sanitaria (ADS) a través de un veterinario propio, siendo el protocolo del mismo la administración de dos dosis de la vacuna **HEPTAVAC P PLUS** frente a los siguientes patógenos:

Toxoide β de *Clostridium perfringens*

Toxoide ϵ de *Clostridium perfringens*

Toxoide de *Clostridium septicum*

Toxoide de *Clostridium tetani*

Toxoide de *Clostridium novyi*

Clostridium chauvoei inactivado y toxoide

Mannheimia haemolytica inactivado

Pasteurella trehalosi inactivado

Esta vacuna es suministrada dos veces en animales primovacunados y una vez el año posterior. Además, se realiza la vacunación frente a la mamitis gangrenosa utilizando Gangrevac®, vacuna compuesta de anatoxinas estafilocócicas alfa y beta, y que sólo se aplica ante la constancia de infección clínica y en estos casos se aplican dos dosis año separadas 30 días. La desparasitación se realiza utilizando Eprinomectina 0,50% (Eprinex®) producto activo frente a endoparásitos y ectoparásitos que se administra anualmente, el cual no presenta periodo de supresión para el consumo de la leche.

Las provincias de Santa Cruz de Tenerife y Las Palmas fueron declaradas en 2009 por la Comisión Europea como territorios Oficialmente Indemnes frente a la Brucelosis bovina (*Brucella abortus*), que se suma a la ya obtenida desde 1997 que reconoce a Canarias como región Oficialmente Indemne frente a Brucelosis ovina/caprina (*Brucella mellitensis*). La región también está considerada como libre de artritis encefalitis caprina, si bien no existen datos publicados al respecto.

E2.B.2.2. Monitorización de la AC en el rebaño previa al brote clínico y descripción del mismo.

En referencia a la situación del rebaño con respecto a la AC, tenemos constancia de la realización de análisis de leche del tanque mediante cultivo específico en medio PH líquido para detectar la presencia de *Mycoplasma* spp., realizados entre los años 2003 y 2005, y que resultaron negativos, siguiendo una metodología similar a la descrita en la experiencia 1. No obstante, hasta la aparición del problema clínico que describiremos a continuación (Junio de 2012), el ganadero efectuaba la vacunación frente a la AC con una vacuna inactivada comercial frente a *Ma* (Algontex®), la cual se administra por vía subcutánea, con una dosis de 2 ml por animal, realizando la primovacuna a los tres meses de edad y revacunando a los 15 días. La revacunación periódica se realizaba cada seis meses o de treinta a sesenta días antes de cada paridera. Los machos también se vacunaban cada seis meses. Actualmente no incorpora esta vacuna en su programa anual.

Un total de 12 análisis se realizaron a partir de muestras de tanque de leche para la identificación de micoplasmas asociados a la AC durante el periodo 2003 y 2005 (previo a la aparición de evidencias clínicas de AC). Durante este periodo, en el que el tamaño del rebaño osciló en torno a 470 individuos, no se constató la presencia de *Mycoplasma* spp.

Esquemáticamente, y en referencia a la presentación del brote clínico de AC en el rebaño, la tabla 3 presenta la cronología del mismo, los aspectos de

interés de los que tenemos información y los movimientos de animales realizados en ese periodo:

FECHA	MOVIMIENTOS REALIZADOS	SIGNOS CLÍNICOS ASOCIADOS A LA AC	ACTUACIÓN
JUNIO 2009			Administración de vacuna frente a <i>Mycoplasma</i> spp. (2 años)
FEBRERO 2012	Adquisición de 11 hembras	Ninguno	
1 MAYO 2012		Casos puntuales de mamitis clínicas con olor pútrido	
30 MAYO 2012		Ninguno	Administración de Algontex®
JUNIO 2012		Brote agudo de AC (40% del rebaños, a razón de 20 nuevos casos/día aprox.), mamitis clínicas con olor pútrido	Administración de tilosina**
20 JULIO 2012		Mamitis clínica bilateral	Análisis microbiológico 1
AGOSTO 2012		Mamitis clínica bilateral	Análisis microbiológico 2
ENERO 2013		Se estabiliza la presentación de casos clínicos, goteo de mamitis clínicas	Administración de enrofloxacina**
JUNIO 2014	Adquisición de 200 hembras y machos	Ninguno	
JULIO 2014	Adquisición 200 hembras y machos*	Segundo brote clínico de AC, con un 50 % de los animales afectados por mamitis con olor pútrido en la secreción (Con semanas donde se registran 10-12 casos diarios y otras con 3-4 diarios)	Administración de enrofloxacina y tilosina**
OCTUBRE 2014		Estabilización con goteo de mamitis clínicas (2-3/mes)	Análisis microbiológico 3
FEBRERO 2015		Estabilidad del rebaño con goteo constante de mamitis clínicas (2-3/mes)	
MAYO/JUNIO 2015		Estabilización con goteo de mamitis clínicas (2-3/mes)	Análisis microbiológico 4
AGOSTO 2015		Estabilidad del rebaño con goteo constante de mamitis clínicas (2-3/mes)	

*Animales procedentes de rebaños diferentes.

**Dosis de antibioterapia empleada: enrofloxacina 5 mg/kg, tilosina 10 mg/kg.

Tabla 3: Cronología de la monitorización de la AC en el rebaño.

Tal y como viene reflejado en la tabla 4, en febrero 2012, por motivos comerciales y con el objetivo de incrementar la producción láctea del rebaño, se produce la adquisición de la totalidad de un pequeño rebaño de cabras formado por un total de once hembras de raza mayorera en edad de lactación. No se realiza cuarentena del colectivo adquirido ni análisis previos, el rebaño no tenía antecedentes de AC.

Con posterioridad, en junio de 2012 sufre un primer brote clínico agudo de AC, donde se observa un número elevado de animales en estado de lactación que de forma progresiva presentan síntomas de mamitis clínica y agalaxia con la marcada característica de un olor pútrido en la escasa secreción producida por la mama afectada. En algunos casos, la mamitis es bilateral y la pérdida de producción suele ser irreversible. Inicialmente, el empleo de una vacunación de emergencia a todo el colectivo provoca el efecto contrario al deseado, incrementándose la incidencia de casos clínicos diarios. En este momento, el empleo de un tratamiento antibiótico masivo de tilosina y enrofloxacin tiene una baja eficacia en cuanto a la curación bacteriológica, como se evidencia con posterioridad, si bien permite que muchos animales superen el episodio clínico inicial, produciéndose un secado de los mismos y presentando una baja mortalidad.

En ese momento, y conjuntamente al empleo de los antibióticos (Tabla 3), se remiten al laboratorio un número determinado de mamitis clínicas e hisopos auriculares (entre julio y agosto un total de 51 muestras) para su análisis microbiológico (Tabla 4). El material y la metodología seguida para el análisis e identificación de la presencia de *Mycoplasma* spp. mediante cultivo y PCR es similar a la ya descrita en el apartado E1.2. de la presente Tesis Doctoral (Kirchhoff & Rosengarten, 1984), si bien dichos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Sanidad de Rumiantes de la Universidad de Murcia. Además, en este caso, cuando fue necesario se empleo una técnica de PCR específica para el diagnóstico de *Mp* (Peyreaud *et al.*, 2003). El transporte de las muestras se realizó en refrigeración con una duración inferior a las 24 horas.

Además de dichos análisis, se realizan procedimientos microbiológicos estándar para la determinación de los agentes más comunes (bacteriología convencional) asociados a la presentación de mamitis en los pequeños rumiantes, de modo similar a lo ya descrito en el apartado E1.2.1.2.1.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 5 y se amplían a continuación de la misma.

	ANÁLISIS 1	ANÁLISIS 2		ANÁLISIS 3	ANÁLISIS 4
FECHA	20 JULIO 2012	AGOSTO 2012		OCTUBRE 2014	MAYO-JUNIO 2015
Nº DE ANIMALES MUESTREADOS	- 4	- 8 con signos clínicos	- 11 nuevas incorporaciones	- 4	- 15
Nº DE MUESTRAS TOTALES	- 8 (una por glándula mamaria)	-16 hisopos auriculares -8 muestras de mamitis clínicas	- 22 hisopos auriculares - 7 muestras de leche	- 4 muestras de mamitis clínicas	- 15 muestras de mamitis clínicas - 1 muestra de tanque de leche
Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	- 7 a <i>Mp.</i>	- 6 hisopos a <i>Mp.</i> - 7 mamitis a <i>Mp.</i>	- 0 (todas negativas)	- 2 a <i>Mp.</i> - 1 a <i>Mcc.</i>	- 3 a <i>Mp.</i> - 9 a <i>Mcc.</i> - 1 tanque a ambas especies
SINTOMATOLOGIA	Mamitis clínica bilateral	Mamitis clínica bilateral con reducción de la morbilidad		Estabilización con goteo de mamitis clínicas	Estabilización con goteo de mamitis clínicas

Mp : *M. putrefaciens*.

Mcc : *M. capricolum* subsp. *capricolum*.

Tabla 4. Cronograma del muestreo específico de *Mycoplasma* spp. y resultados obtenidos en los análisis microbiológicos.

Tras el primer análisis, los resultados confirman la presencia de *Mp* como agente causal del brote clínico. La sintomatología clínica se presenta principalmente en las cabras que ya estaban en el rebaño. Las cabras incorporadas permanecen aparentemente sin síntomas clínicos. El segundo análisis, realizado tanto en 8 cabras del rebaño que ya estaban en el mismo (afectadas) como de las 11 cabras incorporadas (muestra de leche e hisopos auriculares de todas las incorporadas, n=8) evidencia que el agente sólo se aísla de las cabras afectadas. No se detecta ningún portador en las cabras introducidas. Sí se determina la existencia de algunos animales infectados por *Mmc* en el rebaño, determinándose la presencia de portadores auriculares del microorganismo, no detectándose su presencia en ninguna de las muestras de mamitis clínica analizada.

En 2013, se estabiliza la presentación de nuevos casos clínicos, mostrando una marcada reducción de la morbilidad (2-3 mamitis clínicas al mes) aunque era patente una preocupación del ganadero ante la pérdida productiva lechera que se reflejaba en el rebaño de forma general. En este periodo, no se detectan nuevos casos de mamitis clínicas de modo diario, limitándose al goteo esporádico de animales afectados ya mencionado. Así, en julio de 2014 y haciendo caso omiso de las recomendaciones expresadas por los veterinarios tanto de la ADS como del equipo de Sanidad de Rumiantes de la Universidad de Murcia, compra un rebaño de aproximadamente unas 200 cabras de raza majorera, motivado por la falta de producción que tiene en ese momento. Con posterioridad, un mes después, adquiere un segundo rebaño de un número similar de animales. En ambos casos, no se realiza cuarentena del colectivo adquirido ni análisis previos. Aunque desconocemos el estatus sanitario del rebaño respecto a la AC, como ya hemos observado en la experiencia 1, el número de rebaños infectados en la isla es superior al 50%, lo que implica que la presencia de la infección en el rebaño era probable.

En un breve espacio de tiempo (aproximadamente un mes desde la introducción del nuevo rebaño de 200 cabezas) sufre un nuevo brote clínico con los mismos síntomas que en anterior brote pero esta vez no todos los casos presentan el olor putrefacto en la secreción mamaria y a diferencia del

anterior, el brote clínico se presenta con una alta mortalidad (más del 10%) que no responde a la antibioterapia aplicada con anterioridad. En esta ocasión, se detectan más casos de poliartritis, incluso en los sementales. Al igual que anteriormente, la sintomatología clínica se presenta principalmente en las cabras que ya estaban en el rebaño. Las cabras incorporadas permanecen aparentemente sin síntomas clínicos o los animales incorporados afectados son pocos en comparación al número total. Las cabras que se recuperan con el empleo de antibióticos vuelven a evidenciar signos de mamitis clínicas 2 o 3 semanas después, evidenciando la ausencia de curación bacteriológica.

Nuevamente se remiten muestras al laboratorio (tercer análisis), cuyos resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. En esta ocasión, se evidencia la presencia de animales infectados por *M. putrefaciens* y *M. capricolum* subsp. *capricolum*. Se confirma la presencia de ambos microorganismos como responsables de los caso de mamitis clínica y atrofia mamaria que siguen presentándose. Actualmente, y tras no introducir más animales, el rebaño se encuentra en fase de estabilización, con un continuo goteo de casos clínicos. Con posterioridad, los análisis realizados durante un cuarto análisis microbiológico en los animales afectados evidencian la misma situación, confirmándose la presencia de ambos microorganismos en la leche del tanque.

E2.B.2.3. Monitorización del volumen de leche producido y análisis estadístico

En la presente Tesis Doctoral, hemos evaluado el volumen de leche producida diariamente en el rebaño cuya situación epidemiológica respecto a la enfermedad hemos descrito en los apartados anteriores, Para ello, hemos analizado los datos de producción en función del número de animales en ordeño a lo largo de los últimos 7 años (2009-2015), contabilizando tanto la producción del rebaño desde 3 años antes del primer brote clínico de AC (la cual hemos considerado como la producción normal del rebaño), y la producción del mismo desde el año del primer brote clínico (2012), como tras el segundo (2014), todo ello, hasta el momento actual de finalización de la fase experimental de este trabajo (agosto de 2015). La lactación se ha

estandarizado a 300 días, contando noviembre como el primer mes de lactación, siguiendo el manejo reproductivo tradicional de los rebaños de la isla de Lanzarote.

Para determinar estadísticamente las diferencias entre los parámetros evaluados, se siguió el procedimiento PROC MIXED del SAS (SAS Institute, 1998). El estatus en el que se encontraban el rebaño frente a *Mycoplasma spp.* se definió en 3 niveles: Antes del brote, después del primer brote y después del segundo brote. Las variables dependientes incluidas en este modelo fueron: volumen de leche, año y mes.

E2.B.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha pretendido cuantificar una hipotética disminución de la producción lechera en un rebaño caprino lechero que ha estado bajo la influencia de dos brotes clínicos de AC. Para ello, fue realizada una monitorización de la producción lechera antes, durante y tras los brotes acontecidos.

En la tabla 5 mostramos la producción mensual media en litros por animal en el periodo de estudio analizado, mientras que la figura 1 representa gráficamente dichos valores.

Año Mes	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Enero		1,93198353	2,24812121	1,99967742	1,59788018	0,93576639	0,63244624
Febrero	1,66683786	1,94950147	1,96768604	1,96481855	1,64341014	1,01247312	1,15564444
Marzo	2,07515198	2,00357143	2,00916451	1,9455	1,61984694	1,046128	1,21977679
Abril	2,37584077	2,11637341	2,2095835	2,03687258	1,94204762	1,10569235	1,41827957
Mayo	2,58765957	2,21525253	2,25166667	2,11891933	1,8088701	1,21686875	1,42680624
Junio	2,70123542	2,37116325	2,24657258	2,17486748	1,73203458	1,27390323	1,48249042
Julio	2,67503546	2,41257576	2,23033333	1,72555574	1,57609929	1,23193651	1,4760031
Agosto	2,57165408	2,09621648	2,12334677	1,76608871	1,53249576	1,23134339	
Septiembre	2,4273164	2,00730287	2,06395161	1,76552419	1,43140917	1,14667602	
Octubre	2,2264539	1,96911458	1,93811432	1,67719574	1,25617544	0,985625	
Noviembre	2,00741249	1,86483871	1,99314073	1,39546841	1,21147401	0,90672043	
Diciembre	1,81687943	1,85707602	1,95494444	1,53162272	1,01629412	0,68463768	

Producción media mensual de leche por animal.

En rojo aparición del primer brote.

En azul segundo brote clínico.

Tabla 5: Producción mensual media en litros por animal.

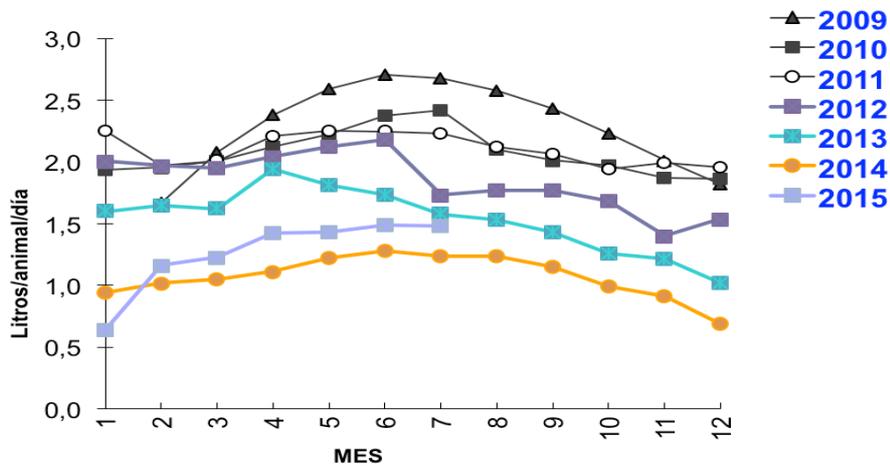


Figura 1: Representación gráfica de la producción mensual media en litros por animal.

Las tablas 6 y 7 indican los resultados del análisis estadístico de la producción del rebaño por lactación. Así podemos observar que las diferencias en el volumen medio de producción por animal y día los años previos al brote no son estadísticamente significativas, un hecho que cambia en 2012, cuarta lactación registrada y donde se presenta el primer brote clínico de la enfermedad. No obstante, los valores medios de producción tampoco difieren en exceso con años anteriores (1.83 frente a 1.91-1.95), si bien es necesario considerar que el brote clínico se desarrolla a mitad de año, momento tras el cual sí se detectan diferencias significativas mensuales de producción de hasta medio litro por animal y día en relación a años precedentes.

AÑO	PA LSMEAN	Estándar	Pr > t
1	2.14023161	0.02935590	<.0001
2	1.91652016	0.02906237	<.0001
3	1.95396999	0.02905368	<.0001
4	1.83268852	0.01739468	<.0001
5	1.54261116	0.02027058	<.0001
6	1.13006909	0.01823657	<.0001
7	1.39098894	0.02828162	<.0001

Tabla 6: Valores medio de producción por lactación registrados en la explotación a estudio.

i/j	1	2	3	4	5	6	7
1		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		0.0506	0.0182	<.0001	<.0001	<.0001
3	<.0001	0.0506		0.0006	<.0001	<.0001	<.0001
4	<.0001	0.0182	0.0006		<.0001	<.0001	<.0001
5	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001
6	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001
7	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	

Tabla 7: Diferencias estadísticamente significativas entre el volumen medio de cada lactación.

Comparando los datos obtenidos de producción media anual entre ellos, encontramos diferencias significativas entre los años de aparición de brotes de AC y los anteriores, así vemos una media anual de 2.00357392 litros de leche por animal en los tres años precedentes a la aparición del primer brote en 2012, durante el cual, y a pesar de producirse en el mes de junio, la media anual descendió a 1.83268852 litros de leche por animal. Dicho descenso es aun más significativo tras el segundo brote clínico, en 2014, donde descendió a 1.13006909 litros de leche por animal, lo cual supone una pérdida de producción para el 2012, año del primer brote, del 8,52 % de media por animal. La pérdida de producción para el 2014, año del segundo brote, en relación a los tres primeros años, se sitúa en del 43,59 % de media por animal.

Analizando algunos datos mensualmente, observamos por ejemplo como la producción media mensual de leche por animal en julio, que fue de 2,43931485 litros en los tres años anteriores a la aparición del primer brote, en julio 2012, desciende hasta 1,72555574 litros en julio de 2012 tras el mismo, y tras el segundo brote clínico, en julio de 2014 es de 1,23193651 litros. El porcentaje de pérdida de producción entre la media de los tres años anteriores y el primer brote es del 29,27 % en el mes en el cual se produce el brote y en el segundo brote es del 49,5 % en el mes en el cual se produce el segundo brote.

Son escasos los trabajos científicos que evalúan las pérdidas producidas en los rebaños afectados de forma natural por un brote clínico de AC, o incluso a nivel individual, más allá de indicar que muchos animales pierden total o parcialmente la capacidad de producir leche (Corrales *et al.*, 2007). En relación con las pérdidas productivas de leche, existen algunos datos recientes en la especie ovina, donde Torado *et al.*, (2015) realizaron la infección experimental de un rebaño de ovejas que fueron monitorizadas sesenta días después del parto. Se diseñaron curvas de lactancia individuales con el fin de estimar el impacto de la infección y los resultados obtenidos permitieron determinar que se produjo una reducción de un 17% en la producción de leche del 41% de los animales, mientras que el 37% restante tuvo una caída de la producción similar durante 2 o 3 semanas pero se recuperó rápidamente, estimándose la pérdida

final en un 3% sobre el total del rebaño. Esta variabilidad individual también se ha observado en estudios realizados en ganado caprino (Castro *et al.*, 2010).

Por otro lado, es conveniente tener presente que varios agentes etiológicos se ha visto involucrados en los brotes acontecidos en el rebaño. Así pues, el agente implicado en la infección descrita durante el primer brote ha sido *M. putrefaciens* mientras que durante el segundo brote tuvo lugar una infección mixta por este microorganismo y *Mcc*. Este aspecto imposibilita la comparación de los resultados de ambos brotes más allá del ámbito descriptivo. La complejidad de la infección en el ganado caprino, la variabilidad etiológica y genómica ya documentada, la amplia existencia de infecciones mixtas o la propia respuesta individual de cada individuo (Gómez-Martín *et al.*, 2013; De la Fe *et al.*, 2012, Ariza De Miguel *et al.*, 2012, Gil *et al.*, 2009, De la Fe *et al.*, 2005) dificulta extremadamente asociar un valor exacto de merma productiva a un determinado agente etiológico o especie de rumiante afectada.

Nuestro estudio permitió monitorizar por primera vez un rebaño entorno al momento de varios brotes de AC. Ello permitió advertir que ambos brotes fueron acontecieron tras la incorporación de individuos aparentemente sanos en un contexto (Tabla 4), como es el archipiélago canario, donde tanto la experiencia 1 de esta tesis como la descripciones de otros autores (Assunção *et al.*, 2004; De la Fe *et al.*, 2005) han corroborado altas prevalencias (38,5%) de rebaños crónicamente infectados. Efectivamente, la hipótesis de que los brotes descritos en esta experiencia se hayan producido como consecuencia de la entrada de una cepa a través de portadores asintomáticos sería coherente con la literatura científica (Bergonier *et al.*, 1997; Corrales *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2013). A pesar de ello, las analíticas llevadas a cabo en muestras de conducto auditivo externo y leche de individuos incorporados no reflejaron el estado de portador. Ello no obstante, no sería suficiente para descartar el estado de portador de estos individuos incorporados ya que se ha comprobado la existencia por ejemplo de machos caprinos portadores asintomáticos con infecciones sistémicas de *Ma* en sistema respiratorio, digestivo o urogenital que no presentaron colonización de conducto auditivo externo (Gómez-Martín *et al.*, 2012a). Es de destacar también, que los

muestreos en años anteriores a la entrada de estos animales, no evidenciaron circulación de agentes etiológicos de la AC en el rebaño.

Los datos obtenidos en referencia al uso de herramientas de control en los rebaños caprinos también coinciden con lo observado en la bibliografía. En referencia a la praxis vacunal, es conveniente considerar que las vacunas actualmente disponibles para el control de la AC no son eficaces para prevenir la infección, ni siquiera de aislamientos de la misma especie (De la Fe *et al.*, 2007), debido entre otros factores que más adelante se discutirán a la elevada variabilidad antigénica ya demostrada (De la Fe *et al.*, 2006). En el presente estudio, el ganadero efectuaba una vacunación frente a la AC con una vacuna inactivada comercial frente a *Ma* (Algontex®), que resultó ineficaz para prevenir el episodio clínico. Efectivamente, además de otros factores que pudieran influenciar en este fallo vacunal, un aspecto a considerar es que los brotes descritos en la presente experiencia tuvieron una etiología diferentes (*Mcc* y *Mp*) para la que se pretendió inmunizar a los animales (*Ma*), lo que refleja la complejidad etiológica de la AC caprina y la importancia de realizar un correcto diagnóstico etiológico antes de empezar a plantear medidas de control o prevención. Las estrategias utilizadas para la vacunación contra la AC han variado poco a lo largo de los años y se siguen utilizando las vacunas monovalentes o las polivalente muertas convencionales que si bien no evitan la infección, en algunos casos son capaces de reducir la clínica y la excreción bacteriana (Gómez-Martín *et al.*, 2013a). En nuestro rebaño monitorizado, lejos de observarse una disminución de la clínica de la enfermedad se pudo constatar y cuantificar una exacerbación de la misma, acompañada de una reducción significativa de la producción lechera.

Continuando con la valoración de la eficacia vacunal, un factor que cobra cada vez más relevancia en los últimos años es la variabilidad genética de las cepas de micoplasmas asociados a la AC. En el caso de *Ma*, De la Fe *et al.*, (2012) observaron la presencia de diferentes clones de cepas caprinas de *Ma* en el sureste peninsular español, diversidad genética que también ha sido evidenciada por otros investigadores en el caso de *Mmc* (Tardy *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2013). Para Tardy y colaboradores (2011), esta diversidad

genética de *Ma* en cabras deberá ser considerada en el diseño de vacunas, un factor no considerado en el diseño de las vacunas comerciales donde no se estudian las cepas circulantes en el rebaño o la zona donde se aplicará la misma. Ante esta situación, las vacunas se muestran ineficaces teniendo en cuenta que, los sistemas genéticos permiten a los micoplasmas una alta frecuencia en la variación de los antígenos de superficie (Glew *et al.*, 2000;. Wise *et al.*, 2006) demostrándose incluso la variación de los perfiles de las lipoproteínas que expresan en superficie (*Vpma*) en cuestión de días, dentro de un mismo hospedador infectado e incluso la coexistencia de múltiples de estos perfiles en ovejas inoculadas experimentalmente (Baranowski *et al.*, 2014).

En referencia a los adyuvantes empleados en la composición de las vacunas frente a la AC, se están realizando estudios clínicos con resultados positivos mediante la utilización de la saponina como un adyuvante o agente de inactivación (De la Fe *et al.*, 2007a, 2007b; Agnone *et al.*, 2013a, 2013b). Estudios experimentales con vacunas vivas atenuadas contra *Ma* (Agnone *et al.*, 2013b) también mostraron una buena protección, aunque por el momento no se encuentran vacunas comerciales que muestren una eficacia demostrada que permitan su recomendación, además de los problemas de seguridad que entraña su uso.

En base a los resultados obtenidos en la presente experiencia no sería por tanto recomendable la vacunación frente a AC durante un brote clínico, ya que como sugieren los resultados obtenidos. Su uso durante el mismo, con la inmunosupresión que puede generar su aplicación, puede provocar como lo observado en este caso, el agravamiento de la sintomatología del rebaño.

Por otro lado, continuando con las estrategias de lucha empleadas durante los brotes estudiados en esta experiencia, el empleo de antibióticos para el control se antoja como la medida más eficaz para el control de los brotes clínicos de AC junto a una serie de medidas complementarias como el sacrificio parcial de los afectados crónicos. En referencia a la primera de esta estrategias, la antibioterapia de elección que han recomendado se recomendado en estudios *in vitro* se fundamenta en el empleo de

fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Loria *et al.*, 2003; Al-Momani *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007a, 2007b, 2008; Paterna *et al.*, 2013). Si bien durante la presente experiencia, en una primera fase se realizó un tratamiento antibiótico masivo combinado con fluoroquinolonas (enrofloxacina), macrólidos (tilosina) y tetraciclinas (oxitetraciclina), el cual presentó una baja eficacia en cuanto a la curación bacteriológica, como se evidencio con posterioridad, sí permitió que muchos animales superen el episodio clínico inicial, produciéndose un secado de los mismos, donde encontramos una baja mortalidad. Estos datos coinciden con lo expuesto por Esnal *et al.*, (1994) donde se indicaba que en el momento de controlar un brote agudo de la enfermedad y una vez descartado un sacrificio masivo, el objetivo será disminuir las manifestaciones clínicas de la enfermedad, intentando alcanzar un estado de cronicidad en el rebaño en el que mejoren las producciones lecheras y los (RCS). Esto se puede conseguir mediante una antibioterapia que será aplicada a todos los individuos del rebaño, en especial aquellos que no hayan mostrado clínica aparente, ya que pueden tratarse de individuos que propaguen la enfermedad activamente de forma asintomática (Corrales *et al.*, 2007).

No obstante, la situación parece cambiar cuando se presenta una infección mixta y un segundo brote, donde los antibióticos se muestran mucho menos efectivos para disminuir los efectos clínicos de la infección. La falta de respuesta a la antibioterapia aplicada con anterioridad, es coherente con los diversos estudios que han determinado los perfiles de resistencia a los antibióticos de las especies de *Mycoplasma* spp. (Loria *et al.*, 2003; Al-Momani *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007a, 2007b, 2008; Paterna *et al.*, 2013), donde se evidencia la elevada variabilidad e incluso la adquisición de resistencias en el genoma (Tavío *et al.*, 2015). Esta falta de respuesta al tratamiento dio lugar a graves pérdidas en la explotación y las cabras que se recuperaron con el empleo de antibióticos volvieron a evidenciar signos de mamitis clínicas 2 o 3 semanas después, evidenciando la ausencia de curación bacteriológica. Este desenlace, apoya la teoría de la antibioterapia empleada para la lucha de la AC, favorece la cronificación de la infección en los rebaños o áreas afectadas (Bergonier *et al.*, 1997). En referencia a este último aspecto, Gómez-Martín *et*

al., (2013b) intentaron aunque sin éxito eliminar el estado de portador auricular en sementales caprinos con marbofloxacina advirtiéndose no obstante, un efecto perjudicial en la motilidad espermática de los individuos tratados durante al menos más de un mes. Debido a que también fueron incluidos en la antibioterapia del rebaño machos caprinos como consecuencia de la clínica que manifestaron, podrían haberse producido mermas en la calidad espermática. Para algunos autores, las implicaciones de la AC en la reproducción podrían estar infravaloradas (Gómez-Martín *et al.*, 2013ab, 2015; Gil *et al.*, 2003), por lo que la cuantificación en las posibles consecuencias de los tratamientos en las tasas de fertilidad y ratio de cabritos destetados deberían ser evaluados en un futuro.

En líneas generales, registramos que un brote de AC supone la pérdida de animales en su periodo productivo, que son los que reportan los beneficios a la explotación y pérdidas en la producción de hasta un 43,59 % de media por animal, a lo que debemos sumar la alta mortalidad superando el 10% del censo de la explotación por la falta de respuesta a la antibioterapia. Las cabras que se recuperan con el empleo de antibióticos vuelven a evidenciar signos de mamitis clínicas 2 o 3 semanas después, evidenciando la ausencia de curación bacteriológica. Generalmente el ganadero descubre bajadas de las producciones lecheras asociadas a mamitis clínicas por AC, junto con llamativas mortalidades que se pueden dar en los brotes agudos de la enfermedad, como ya indicaron Nicholas, (1995) y Bergonier *et al.*, (1997). En este caso concreto, estas pérdidas productivas supusieron un grave riesgo de desaparición para la explotación ganadera, al no poder afrontar en mantenimiento de un ganado tan numeroso con unos ingresos por la venta de leche tan bajos. Esto evidencia la importancia de un control exhaustivo por parte de las asociaciones de ganaderos y organismos públicos de los movimientos de animales entre explotaciones y la concienciación del sector de las repercusiones que los portadores de la AC y otras enfermedades pueden acarrear. También hay que destacar que durante un brote clínico de AC se muestran RCS significativamente más altos (Corrales *et al.*, 2004) lo cual incrementa las pérdidas al realizarse el pago de la leche en función de la calidad de la misma.

E.2 MATERIAL SUPLEMENTARIO.

Datos por granja y muestreo (n=12) obtenidos en la experiencia 2A:

MUESTREO 1

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
1	1	1x10 ⁶	NO		4.25	3.97	13.77	4.47
1	2	1x10 ⁶	SI	200	4.43	3.80	13.84	4.52
1	3							
1	4	1x10 ⁵	SI	150	5.20	4.06	14.98	4.65
1	5	1x10 ⁴	NO		4.75	4.40	14.56	4.26
1	6	1x10 ⁵	NO		4.92	4.01	14.57	4.56
1	7	1x10 ⁷	NO		4.61	3.88	14.25	4.71
1	8	1x10 ⁶	SI	250	4.22	3.75	13.27	4.19
1	9	1x10 ⁷	NO		3.83	3.43	12.87	4.58
1	10	1x10 ⁴	NO		3.04	3.67	12.42	4.67
1	11	1x10 ⁶	NO		4.54	4.34	14.30	4.28
1	12	1x10 ³	NO		3.98	3.89	13.29	4.31
1	13	1x10 ⁷	SI	750	4.17	3.75	13.40	4.40
1	14	1x10 ⁵	NO		3.90	3.34	11.90	3.50
1	15	1x10 ⁵	SI	300	4.19	3.86	13.68	4.55
1	16	1x10 ⁶	SI	400	4.61	3.78	14.09	4.66
1	17	1x10 ⁶	NO		4.50	4.07	14.25	4.59
1	18	1x10 ⁶	NO		4.25	3.74	13.52	4.57
1	19	1x10 ⁶	SI	200	4.67	4.03	14.31	4.52
1	20	1x10 ⁶	NO		4.54	4.05	13.92	4.20
1	21	1x10 ⁵	SI	150	4.62	3.93	14.18	4.55
1	22	1x10 ⁴	NO		4.94	3.83	14.66	4.87
1	23	1x10 ⁵	NO		4.49	3.99	13.92	4.34
1	24							
1	25	1x10 ⁶	SI	250	4.22	3.75	13.27	4.41
1	26	1x10 ⁷	NO		5.89	3.76	15.18	4.49

MUESTREO 2

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
2	1	1.7x10 ⁴	NO		4.14	3.64	13.38	4.55
2	2	1x10 ⁴	SI	1000	3.65	4.02	13.26	4.49
2	3	1x10 ⁴	NO		5.39	4.11	4.45	15.06
2	4	1x10 ⁶	SI	700	5.22	3.93	14.72	4.46
2	5	2x10 ⁵	NO		4.85	4.38	14.43	4.02
2	6	1x10 ⁶	NO		4.72	4.08	14.41	4.51
2	7	1x10 ⁶	NO		4.96	3.63	14.20	4.55
2	8	2.7x10 ⁴	NO		4.34	3.86	13.70	4.38
2	9	1x10 ⁴	NO		4.39	3.89	14.08	4.75
2	10	7.8x10 ⁵	SI	10	4.01	4.13	13.88	4.64
2	11	1x10 ⁶	NO		4.50	4.17	14.10	4.29
2	12	1x10 ³	NO		4.04	3.95	13.58	4.47
2	13	1x10 ⁷	NO		4.11	3.72	13.20	4.24
2	14	2.7x10 ⁴	SI	150	4.32	3.42	12.66	3.79
2	15	2.6x10 ⁴	NO		4.39	3.96	14.03	4.60
2	16	1.1x10 ⁴	SI	530	4.84	3.81	14.41	4.69
2	17	1x10 ⁵	NO		4.66	3.91	14.20	4.54
2	18	5.4x10 ⁴	NO		4.32	3.71	13.60	4.51
2	19	1.9x10 ⁴	NO		4.85	3.86	14.52	4.77
2	20	2x10 ⁴	NO		4.31	3.88	13.68	4.39
2	21	1.3x10 ⁵	NO		4.58	4.12	14.22	4.40
2	22	1x10 ⁴	NO		4.74	3.82	14.20	4,55
2	23	4x10 ⁴	NO		4.71	3.98	13.06	4.23
2	24	1x10 ⁵	NO		5.01	4.24	14.37	3.93
2	25	1x10 ⁶	NO		4.28	3.85	13.78	4.56
2	26	9.5x10 ³	NO		4.31	3.79	13.69	4.50

MUESTREO 3

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
3	1	1.4x10 ⁴	SI	8x10 ³	4.13	3.96	13.70	4.52
3	2	2.11x10 ⁶	SI	3.7x10 ³	3.88	4.01	13.53	4.53
3	3	1.8x10 ⁴	NO		5.29	4.01	14.77	4.37
3	4	4.9x10 ⁴	SI	1.8x10 ⁴	4.87	3.97	14.63	4.73
3	5	7x10 ⁴	NO		4.86	4.40	14.56	4.50
3	6	1.5x10 ⁴	NO		5.03	3.99	14.62	
3	7	9.8x10 ³	NO		4.23	3.63	13.42	4.48
3	8	7.6x10 ⁴	NO		4.56	3.97	14.02	4.39
3	9	7x10 ⁴	NO		4.11	3.66	13.39	4.56
3	10	3.3x10 ⁴	NO		4.82	4.17	14.31	4.18
3	11	1x10 ⁶	SI	3.5x10 ³	4.32	4.23	14.13	4.47
3	12	1x10 ⁶	SI	4x10 ⁴	4.37	3.92	13.76	4.36
3	13	1.6x10 ⁵	SI	2.2x10 ⁴	4.05	3.95	13.52	4.41
3	14	4x10 ⁴	NO		4.96	3.79	13.91	4.03
3	15	1.4x10 ⁴	NO		4.52	4.17	14.50	4.72
3	16	1.4x10 ⁴	SI	1.5x10 ⁴	5.03	3.76	14.58	4.73
3	17	5.2x10 ⁴	NO		4.41	4.00	14.15	4.66
3	18	5.3x10 ³	NO		4.15	3.70	13.44	4,5
3	19	3.8x10 ⁴	NO		4.80	3.89	14.38	4.61
3	20	4.3x10 ⁴	NO		4.04	3.91	13.55	4.51
3	21	3.4x10 ⁶	NO		1.32	4.60	11.45	4.33
3	22	6.5x10 ⁵	NO		4.69	3.88	14.27	4.62
3	23	5.7x10 ³	NO		4.60	4.05	14.13	4.35
3	24	1x10 ⁶	NO		8.33	4.52	17.89	3.83
3	25	3.5x10 ⁵	NO		4.26	3.93	13.52	4.18
3	26	3.1x10 ⁴	NO		4.22	3.83	13.61	4.49

MUESTREO 4

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
4	1	7×10^4	SI	1.3×10^3	3.16	4.09	13.01	4.66
4	2	8.5×10^5	NO		2.73	4.83	13.97	5.32
4	3	1.6×10^5	NO		4.91	4.08	14.29	4.15
4	4	2.7×10^5	SI	8.8×10^3	1.58	5.22	13.97	6.13
4	5	1.1×10^5	NO		1.79	5.81	14.67	5.96
4	6	2.6×10^5	NO		3.01	3.81	4.21	4.21
4	7	3×10^4	NO		5.46	3.57	14.68	4.62
4	8	4.1×10^5	NO		4.93	3.67	14.43	4.81
4	9	1×10^9	NO		4.38	4.10	13.87	4.25
4	10	9.6×10^4	SI	1.4×10^3	1.64	4.92	12.95	5.29
4	11	5.4×10^5	NO		4.13	4.49	14.22	4.45
4	12	1.5×10^4	NO		3.77	3.62	12.48	3.95
4	13	1.4×10^6	SI	1×10^5	4.05	4.00	13.57	4.40
4	14		NO		3.60	3.42	12.09	3.93
4	15	2.2×10^6	NO		4.08	3.78	13.54	4.62
4	16	1.5×10^5	SI	1.6×10^4	4.37	3.77	13.69	4.48
4	17	1×10^4	SI	9.1×10^2	3.76	3.98	13.39	4.56
4	18	6×10^4	NO		3.62	3.77	13.05	4.57
4	19	2.9×10^5	SI	1.5×10^3	4.31	3.86	13.81	4.56
4	20	4×10^5	SI	2.5×10^3	3.86	4.26	13.75	4.49
4	21	2×10^5	NO		3.59	4.20	13.41	4.47
4	22	2.1×10^6	NO		4.58	3.76	13.99	4.57
4	23	6.2×10^5	NO		4.54	4.21	14.12	4.21
4	24	4×10^6	NO		5.00	4.77	14.43	3.35
4	25	1.8×10^5	SI	1.6×10^4	4.08	3.84	13.48	4.47
4	26	1.1×10^5	SI	1×10^3	3.26	4.01	12.91	4.55

MUESTREO 5

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
5	1	4.5x10 ³	NO		4.02	3.98	13.55	4.41
5	2	7.6x10 ⁵	NO		4.32	4.25	14.08	4.34
5	3	8x10 ³	NO		4.98	3.91	14.04	3.97
5	4	2.3x10 ⁵	SI	1.1x10 ⁴	5.16	4.81	15.55	4.37
5	5	4.9x10 ³	SI	1.5x10 ⁴	4.36	4.07	14.06	4.49
5	6	1.8x10 ⁵	NO		4.48	4.09	14.18	4.47
5	7	6.1x10 ⁵	NO		4.95	3.61	14.17	4.54
5	8	1.3x10 ⁶	SI	3.6x10 ³	4.56	3.69	14.01	4.70
5	9	2.5x10 ⁶	NO		4.43	4.15	13.97	4.23
5	10	1.6x10 ⁵	NO		4.62	4.38	14.50	4.35
5	11	2.8x10 ⁶	NO		4.30	4.41	14.23	4.35
5	12	5.1x10 ⁵	SI	2.4x10 ²	3.77	3.62	12.28	3.71
5	13	9x10 ⁴	NO		4.34	3.88	13.66	4.31
5	14	1.1x10 ⁵	NO		6.2	4.42	15.59	3.75
5	15	1.4x10 ⁵	NO		4.2	3.82	13.79	4.70
5	16							
5	17	2x10 ³	SI	4.6x10 ⁴	4.41	4.00	14.12	4.61
5	18	2.1x10 ⁵	SI	4.8x10 ²	4.01	3.85	13.52	4.57
5	19	1x10 ⁵	SI	6.4x10 ²	4.70	4.01	14.42	4.62
5	20	1.4x10 ⁵	NO		4.33	4.12	13.96	4.37
5	21	2.9x10 ⁶	NO		4.37	4.27	14.15	4.36
5	22	5.2x10 ⁶	NO		5.07	3.85	14.37	4.34
5	23	3.5x10 ³	SI	9x10 ²	4.21	4.22	13.93	4.36
5	24							
5	25	3.5x10 ⁶	NO		4.41	3.94	13.98	4.52
5	26	3.8x10 ⁵	NO		4.39	4.13	14.15	4.54

MUESTREO 6

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
6	1	2.8x10 ⁵	SI	1x10 ²	3.91	3.85	13.35	4.50
6	2	1x10 ¹⁰	SI	2x10 ³	4.43	4.02	13.97	4.39
6	3							
6	4	4.2x10 ⁵	NO		5.20	3.91	14.76	4.57
6	5	9.4x10 ⁴	NO		4.59	4.13	13.94	4.05
6	6	2.6x10 ⁵	NO		4.63	4.08	14.25	4.41
6	7	1x10 ⁷	SI	1.5x10 ²	4.80	3.61	13.92	4.42
6	8	1x10 ⁸	NO		4.53	3.61	13.85	4.66
6	9	2.3x10 ⁵	NO		4.34	4.12	14.07	4.50
6	10	4.1x10 ⁵	NO		4.19	3.98	13.72	4.43
6	11	2.0x10 ⁶	NO		4.31	4.05	13.86	4.38
6	12	1.4x10 ⁵	NO		4.16	4.16	14.02	4.60
6	13	3.1x10 ⁶	SI	1x10 ²	4.06	3.80	13.36	4.38
6	14	1x10 ⁷	NO		6.18	4.05	15.06	3.62
6	15	1x10 ⁸	SI	40	5.02	3.82	14.60	4.70
6	16	3.8x10 ⁵	NO		4.29	4.04	14.09	4.64
6	17	1x10 ⁹	NO		0.75	3.97	10.69	4.87
6	18	1x10 ⁶	NO		3.97	3.76	13.30	4.48
6	19	1.4x10 ⁵	NO		4.99	3.97	14.62	4.58
6	20	2.1x10 ⁶	NO		4.24	4.06	13.79	4.36
6	21	3.8x10 ⁵	SI	1.3x10 ²	4.36	4.18	14.21	4.64
6	22	1.2x10 ⁵	NO		5.04	3.74	14.45	4.61
6	23	1.4x10 ⁵	NO		4.31	3.97	13.62	4.21
6	24							
6	25	6x10 ⁵	NO		4.02	4.19	14.08	4.78
6	26	2.4x10 ⁵	NO		4.32	3.92	13.82	4.51

MUESTREO 7

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
7	1	3×10^5	SI	2×10^2	4.27	3.88	13.61	4.32
7	2	3.8×10^5	NO		4.58	4.19	14.35	4.45
7	3	1×10^5	NO		4.70	3.65	14.40	5.07
7	4	6.8×10^5	SI	8×10^3	5.29	3.92	14.80	4.49
7	5	1.1×10^5	NO		4.92	4.47	14.64	4.07
7	6	2.7×10^5	SI	1.6×10^2	5.04	4.65	15.14	4.28
7	7	7.5×10^4	NO		5.10	3.59	14.32	4.57
7	8	1.3×10^6	NO		3.94	3.73	12.73	3.90
7	9							
7	10	3.6×10^5	SI	3.6×10^2	4.25	4.30	14.10	4.42
7	11	2.5×10^6	SI	6.2×10^3	5.03	4.48	14.94	4.27
7	12	1.8×10^6	SI	2.9×10^3	4.29	4.18	14.02	4.43
7	13	2.5×10^4	NO		5.16	4.41	14.99	4.26
7	14							
7	15	1.5×10^5	SI	8×10^2	5.03	4.24	14.94	4.57
7	16	5.3×10^6	NO		4.73	3.93	14.39	4.65
7	17	3.1×10^5	NO		4.64	3.96	14.13	4.42
7	18	7.8×10^5	NO		4.31	3.95	13.67	4.26
7	19	1×10^5	NO		5.30	4.10	14.92	4.40
7	20	2.6×10^5	SI	9.6×10^3	4.26	4.11	13.77	4.24
7	21	1.4×10^6	SI	2.4×10^4	4.48	4.31	14.23	4.27
7	22	5.5×10^5	NO		5.26	3.99	14.80	4.44
7	23	8.2×10^4	NO		4.87	4.33	14.19	4.19
7	24							
7	25	1.3×10^6	NO		4.34	3.87	13.74	4.41
7	26	1×10^9	NO		3.93	3.95	13.50	4.51

MUESTREO 8

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
8	1	2.7x10 ⁵	NO		4.65	4.04	14.04	4.21
8	2	1x10 ⁵	NO		5.33	4.27	15.07	4.33
8	3	2.8x10 ⁵	NO		5.00	3.64	14.49	4.83
8	4	1.4x10 ⁵	SI	4.5x10 ²	5.40	4.08	15.22	4.67
8	5	7x10 ⁴	NO		4.60	4.24	14.01	4.00
8	6	3.2x10 ⁵	SI	2x10 ²	4.87	4.02	14.49	4.50
8	7	3.4x10 ⁵	NO		4.43	3.59	13.85	4.81
8	8	6.5x10 ⁵	NO		3.84	3.98	13.32	4.38
8	9							
8	10	2x10 ⁴	NO		5.72	4.31	15.51	4.34
8	11	1x10 ⁹	NO		5.38	4.45	15.18	4.20
8	12	5x10 ⁴	NO		4.83	4.33	14.65	4.35
8	13	7x10 ³	NO		5.88	4.60	15.77	4.03
8	14							
8	15	1x10 ⁵	NO		4.84	4.29	14.83	4.58
8	16	1x10 ⁵	NO		4.72	3.91	14.35	
8	17	9x10 ⁴	NO		3.78	4.26	13.72	4.55
8	18	7x10 ⁴	SI	3.5x10 ²	4.38	4.06	14.06	4.51
8	19	7x10 ⁵	NO		5.28	4.00	14.90	4.53
8	20	1x10 ⁵	NO		4.30	4.06	13.78	4.28
8	21	1x10 ⁵	NO		4.47	4.34	14.53	4.59
8	22							
8	23	1,1x10 ⁴	NO		4.69	4.21	14.42	4.42
8	24							
8	25	8.1x10 ⁵	SI	4.5x10 ²	4.32	4.08	13.94	4.40
8	26	4x10 ⁴	NO		4.24	4.06	13.78	4.35

MUESTREO 9

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
9	1	4.6x10 ⁵	NO		3.30	3.25	11.85	4.00
9	2	1x10 ⁸	NO		5.78	4.42	15.26	4.07
9	3							
9	4	1x10 ⁷	SI	1.9x10 ³	5.22	4.24	14.97	4.63
9	5	1x10 ⁵	NO		4.99	4.63	14.86	4.22
9	6	1x10 ⁸	NO		5.36	4.57	15.29	4.36
9	7	1x10 ⁸	NO		5.64	4.43	15.65	4.68
9	8	1x10 ⁸	SI	1x10 ³	4.65	3.95	13.80	4.33
9	9							
9	10	8x10 ⁴	NO		4.77	4.83	15.03	4.38
9	11	1.5x10 ⁶	NO		5.24	4.94	15.40	4.09
9	12	4.1x10 ⁵	SI	4.4x10 ⁶	4.27	4.48	14.17	4.46
9	13	9x10 ⁴	NO		5.33	4.34	15.01	4.41
9	14							
9	15							
9	16							
9	17	5.4x10 ⁵	NO		4.96	4.15	14.69	4.73
9	18	3.6x10 ³	NO		4.08	4.63	14.64	5.01
9	19	1.2x10 ⁶	NO		5.33	4.34	15.18	4.61
9	20	1x10 ⁸	NO		4.22	4.20	14.19	4.96
9	21	1x10 ⁹	NO		4.71	4.59	15.06	4.83
9	22							
9	23	7.3x10 ³	NO		4.80	4.21	14.32	4.42
9	24							
9	25	2.2x10 ⁶	NO		4.10	4.37	13.76	4.34
9	26	8.1x10 ⁵	NO		4.61	4.52	14.83	4.81

MUESTREO 10

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
10	1	3.2x10 ⁵	NO		4.89	4.17	14.52	4.61
10	2	4.1x10 ⁶	NO		5.11	4.43	14.98	4.49
10	3	5.7x10 ⁵	NO		4.97	3.77	14.58	5.17
10	4	3.4x10 ⁵	SI	2x10 ³	5.96	4.45	15.97	4.64
10	5	1.7x10 ⁶	NO		4.98	4.80	15.08	4.25
10	6	1.3x10 ⁶	NO		6.10	5.24	16.82	4.34
10	7	4.3x10 ⁴	NO		6.62	4.88	16.85	4.28
10	8	6.9x10 ⁵	NO		5.15	4.09	14.55	4.43
10	9							
10	10	3.6x10 ⁵	NO		5.50	5.36	16.26	4.22
10	11	1.8x10 ⁵	NO		5.23	4.92	15.42	4.00
10	12	4.1x10 ⁶	NO		3.29	4.68	13.45	4.48
10	13	1.3x10 ⁵	NO		6.01	4.59	15.94	4.35
10	14							
10	15	7.9x10 ⁵	NO		5.38	4.26	15.03	4.49
10	16	6.0x10 ⁴	NO		5.78	4.44	15.66	4.53
10	17	8.0x10 ⁵	NO		5.25	4.27	15.21	4.84
10	18	2.7x10 ⁵	NO		4.72	4.25	14.57	4.73
10	19	2.9x10 ⁵	NO		5.34	4.32	15.20	4.61
10	20	2.2x10 ⁶	NO		5.09	4.38	14.76	4.37
10	21	1.5x10 ⁶	NO		4.64	4.51	14.78	4.70
10	22							
10	23	1.9x10 ⁴	NO		5.23	4.30	14.76	4.32
10	24							
10	25	3.6x10 ⁵	NO		4.93	4.39	14.65	4.37
10	26	8.4x10 ⁵	NO		4.52	4.52	14.33	4.58

MUESTREO 11

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
11	1	1.6x10 ⁵	SI	4x10 ³	4.62	4.24	14.32	4.59
11	2	4.9x10 ⁴	NO		5.27	4.44	15.11	4.46
11	3							
11	4	2.9x10 ⁵	SI	3.4x10 ⁴	5.52	4.35	15.41	4.63
11	5	4.2x10 ⁵	NO		4.96	4.59	14.79	4.22
11	6	1.1x10 ⁶	NO		5.97	5.34	16.86	4.38
11	7							
11	8	7.2x10 ⁶	SI	7x10 ³	4.82	3.91	13.90	4.32
11	9							
11	10	1.7x10 ⁵	SI	1.6x10 ³	5.60	5.07	15.85	4.02
11	11	4.4x10 ⁶	SI	1.4x10 ⁴	5.04	5.01	15.25	4.07
11	12	9.8x10 ⁵	NO		3.93	4.43	13.53	4.18
11	13	1.4x10 ⁵	SI	2.1x10 ⁴	5.10	4.46	14.79	4.29
11	14							
11	15							
11	16							
11	17	1.4x10 ⁵	NO		6.77	5.64	17.84	4.14
11	18	1.3x10 ⁶	SI	4x10 ⁴	4.25	3.68	13.49	4.84
11	19	2.9x10 ⁶	NO		5.12	4.27	14.88	4.58
11	20	1.8x10 ⁵	SI	1x10 ⁴	5.33	4.44	15.08	4.36
11	21	1.4x10 ⁶	SI	2.9x10 ⁴	4.92	4.57	14.84	4.35
11	22							
11	23	3.0x10 ³	NO		4.73	4.53	14.78	4.58
11	24							
11	25	1.4x10 ⁵	NO		4.97	4.53	14.83	4.36
11	26	3.9x10 ⁴	NO		4.80	4.33	14.57	4.54

MUESTREO 12

Muestreo	Granja	R. Aerobios	S. aureus	UFC/ml	Grasa	Proteína	E. seco	Lactosa
12	1	5.0x10 ⁴	SI	1x10 ⁴	4.75	4.29	14.50	4.55
12	2	1.5x10 ⁵	NO		5.54	4.50	15.51	4.51
12	3							
12	4	3.7x10 ⁵	SI	2x10 ⁴	7.08	5.54	18.08	4.19
12	5	5.4x10 ⁵	NO		4.52	4.80	14.65	4.27
12	6							
12	7							
12	8	6.1x10 ⁵	NO		5.55	4.31	15.62	4.92
12	9							
12	10							
12	11							
12	12							
12	13							
12	14							
12	15							
12	16							
12	17	3.9x10 ⁵	NO		5.44	4.54	15.63	4.73
12	19							
12	20	4.8x10 ⁵	NO		5.44	4.56	15.54	4.58
12	21	2.2x10 ⁶	NO		5.34	4.47	15.03	4.23
12	22	2.8x10 ⁵	NO		5.16	4.54	15.37	4.73
12	23	2.5x10 ⁶	NO		5.25	4.00	14.84	
12	24							
12	25							
12	26							
12	27	3.1x10 ⁵	SI	4x10 ⁴	3.97	4.51	14.05	4.63



VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

PRIMERA: Se confirma el papel emergente de la agalaxia contagiosa caprina en la presentación de mamitis subclínicas en la isla de Lanzarote.

SEGUNDA: *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, es la especie de micoplasma que más se detecta asociada a la agalaxia contagiosa en la isla de Lanzarote.

TERCERA: La agalaxia contagiosa crónica no tiene efectos significativos en la calidad físico-química de la leche del tanque, independientemente de la presencia de *Staphylococcus aureus* en el rebaño.

CUARTA: La presencia de infecciones subclínicas por *Staphylococcus aureus* en el rebaño caprino puede tener efectos significativos en la calidad físico-química de la leche del tanque.

QUINTA: La presentación de un brote agudo de agalaxia contagiosa caprina ocasiona pérdidas de producción lechera significativas que evidencian la necesidad de controlar la enfermedad y el movimiento de animales con un estatus sanitario desconocido respecto a la infección.



VII. Resumen Summary

VII. RESUMEN

La presente tesis doctoral ha pretendido evaluar el impacto de la agalaxia contagiosa (AC) sobre la calidad y producción lechera caprina en la isla de Lanzarote, Islas Canarias.

En una primera experiencia, se ha realizado un estudio microbiológico en 31 rebaños con el objeto de identificar las especies de micoplasma asociadas a la infección crónica, analizando principalmente muestras individuales de leche. Nuestros resultados indicaron que al contrario de lo que sucede en la Península Ibérica, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* es la especie más frecuentemente aislada (57%), seguida de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (26%) y de *Mycoplasma agalactiae* (10%), lo que habrá de ser tenido en cuenta de cara a implementar estrategias de control y prevención tales como la antibioterapia o la profilaxis vacunal.

En una segunda experiencia, por un lado se estudió el efecto que tiene la AC en la calidad físico-química de la leche producida en rebaños crónicamente infectados en la isla de forma asintomática. Diversos parámetros como el porcentaje de grasa, la proteína total, lactosa y sólidos totales, el recuento de bacterias en placa (SPC) y la presencia de *Staphylococcus aureus*, fueron evaluados en 13 rebaños infectados y 13 considerados como no infectados por *Mycoplasma* spp. en función de los resultados obtenidos en la primera experiencia. Para ello, mensualmente se analizaron entre 9 y 12 muestras de leche de los mismos. Este estudio permitió concluir que la existencia de AC en los rebaños no tuvo ningún efecto significativo en la calidad de la leche de tanque en las condiciones y rebaños estudiados. Tampoco se observaron diferencias significativas en el (SPC) o el estado de los rebaños frente a *S. aureus* que puedan ser atribuibles a la infección por micoplasma. Estos resultados invalidan el empleo indirecto de estos parámetros, habitualmente analizados en los controles lecheros para la identificación de rebaños crónicamente infectados y sugieren que la existencia de rebaños infectados de forma inaparente podría estar infravalorada. Por otro

lado, también se evaluó el efecto que ocasiona un brote clínico de AC en el volumen de leche producida en un rebaño durante los años previos y posteriores al episodio clínico. Para ello, se monitorizó un rebaño afectado por un doble brote clínico ocasionado por *Mycoplasma putrefaciens* y *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. Se observaron así pérdidas de producción significativas superiores al 8,52% del volumen medio anual de leche por animal, lo que supone un considerable impacto económico de la enfermedad en el rebaño afectado por episodios clínicos.

SUMMARY

For this doctoral thesis it has been assessed the impact of contagious agalactia (CA) on quality and production of goat milk in the island of Lanzarote, in the Canary Islands.

For the first experience, a microbiological study has been performed in 31 herds with the aim to identify the mycoplasma species associated to the chronic infection, mainly analysing individual samples of milk. Our results indicated that, contrary to what it happens in the Iberian Peninsula, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* is the most frequently isolated species, (57%), followed by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (26%) and *Mycoplasma agalactiae* (10%), which should be taken into account when applying control and prevention strategies, such as antimicrobial therapy or vaccine prophylaxis.

For the second experience it was studied the effect of CA on physical-chemical quality of milk produced in herds from this island, which were chronically infected but asymptomatic. Several parameters such as fat percentage, total protein, lactose, total solids, standard plate count (SPC) and presence of *Staphylococcus aureus*, were evaluated in 13 infected herds and 13 herds considered as no infected by *Mycoplasma* spp. according to the results of the first experience. For this purpose, between 9 and 12 milk samples from these herds were analysed monthly. The results concluded that the

existence of CA did not have a significant effect on the quality of milk from bulk-tank for these herds and conditions. They were neither observed significant differences in bacterial counts or herds status for *Staphylococcus aureus* that could be attributed to mycoplasma infection. These findings invalidate the indirect use of these parameters, frequently analysed in the official milk tests for the detection of chronically infected herds, and suggest that the existence of asymptotically infected herds would be underestimated. Furthermore, it was also evaluated the effect of a clinical outbreak of CA on the volume of milk produced by a herd during previous and subsequent years to the clinical episode. For this, it was monitored a herd affected by a double clinical outbreak caused by *Mycoplasma putrefaciens* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. Thus, significant production losses over the 8.52 % of the year average milk volume per animal were observed, what supposes a considerable economical impact of this disease in a herd suffering clinical episodes.



VIII. Agradecimientos

VIII. AGRADECIMIENTOS

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

Al Gobierno de Canarias, que ha financiado parte del trabajo mediante los proyectos IDT-LP-03/026, IDT-LP-03/027 y IDT-LP-04/040.

Al Grupo de Investigación de Sanidad Caprina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por brindarnos la logística necesaria para la realización de parte de los análisis de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Christian De La Fe Rodríguez director de esta Tesis doctoral, por su dedicación a la profesión, su infinita paciencia, su capacidad de transmitir conocimientos y especialmente por ser un gran amigo.

Al Dr. D. Ángel Gómez Martín, director de esta Tesis doctoral, por su apoyo constante, su trabajo, sus consejos y ayuda a la hora de la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Antonio Sánchez López por su ayuda y colaboración en la realización del análisis estadístico de los datos obtenidos.

Al Prof. Dr. D Antonio Contreras de Vera y Al Prof. Dr. D Juan Carlos Corrales Romero por la colaboración y apoyo en la realización del presente trabajo.

A los becarios D. Juan Tatay, Dña. Miranda Prats y Dña. Ana Paterna del Grupo de Investigación de Sanidad de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por su trabajo de laboratorio y colaboración en la realización de la presente Tesis doctoral.

Al resto de compañeros del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia que de alguna u otra forma hayan colaborado en la realización de la presente Tesis doctoral.

A los compañeros Beatriz Flores, Laura Artilles y Rene Betancort, veterinarios de las Agrupaciones de Defensa Sanitaria de la isla de Lanzarote, por su colaboración e inestimable ayuda para la realización de la presente Tesis doctoral.

Agradecer especialmente la colaboración y predisposición de todos los ganaderos de la isla de Lanzarote que han colaborado en la realización de este trabajo, permitiendo la recogida de muestras, a veces, un poco “pesada” por parte de nuestro equipo de trabajo y en especial a los ganaderos Manolo Arbelo y Valentín Elvira por su colaboración a la hora de la realización del presente trabajo.

A todo el equipo de trabajo del Área de Ganadería del Servicio Insular Agrario de la Granja Agrícola Experimental del Excmo. Cabildo Insular de Lanzarote, en especial a Sofía Martínez, Emma Ramos, Hugo Raúl Curbelo, Carmelo Hernández por su apoyo y colaboración.

A todas aquellas personas o instituciones que han colaborado de una u otra manera en la realización del presente trabajo.



IX. Referencias bibliográficas

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adehan, R.K., Ajuwape, A.T.P., Adetosoye A.I., Alaka, O.O., (2006). Characterization of Mycoplasmas isolated from pneumonic lungs of sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 63(1-2), 44-49.

Adler, H.E., DaMassa, A.J., Brooks, D.L., (1980). Caprine mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats. *American journal of veterinary research*. 41, 1677-1679.

Agnone, A., La Manna, M.P., Loria, G.R., Puleio, R., Villari, S., Nicholas, R.A.J., Guggino, G., Sireci, G., (2013a). Timing of activation of CD4⁺ memory cells as a possible marker to establish the efficacy of vaccines against contagious agalactia in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152, 252–259.

Agnone, A., La Manna, M., Sireci, G., Puleio, R., Usticano, A., Ozdemir, U., Nicholas, R., Chiaracane, V., Dieli, F., Di Marco, V., Loria, G., (2013b). A comparison of the efficacy of commercial and experimental vaccines for contagious agalactia in sheep. *Small Ruminant Research*. 112, 230–234.

Al-Momani, W., Nicholas, R.A., Janakat, S., Abu-Basha, E., Ayling, R.D., (2006). The *in vitro* effect of six antimicrobials against *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* isolated from sheep and goats in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*. 38, 1–7.

Allison, J.R., (1985). Antibiotic residues in milk. *British Veterinary Journal*. 141, 9–16.

Amores, J., Sánchez, A., Sierra, D., Luengo, C., Gómez, A., Corrales, J.C., De La Fe C., Contreras, A., Gonzalo, C., (2008). Factores que afectan a los análisis físico-químicos y al diagnóstico en las muestras de leche de cabra. *Pequeños Rumiantes*. 9, 11-20.

Amores, J., Sánchez, A., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Contreras, A., De la Fe, C., (2010a). Viability of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat milk samples stored under different conditions. *Veterinary Microbiology*. 145, 347–350.

Amores, J., Corrales, J.C., Gómez-Martín, A., Sánchez, A., Contreras, A., De la Fe, C., (2010b). Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in ear swabs taken from goats. *Veterinary Microbiology*. 140, 105–108.

Amores, J., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Sánchez, A., Contreras, A., De la Fe, C., (2011a). Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. *Theriogenology*. 75, 1265–1270.

Amores, J., De la Fe, C., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Contreras, A., Sánchez, A., (2011b). Preserved goat milk as a valid sample for the PCR detection of *Mycoplasma agalactiae*. Small Ruminant Research. 99, 61–64.

Amores, J., Sánchez, A., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Contreras, A., De la Fe, C., (2012). Surveillance of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in dairy goat herds. Small Ruminant Research. 102, 89–93.

Andrade-Rocha., F.T., (2003). *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. Urologia internationalis. 71(4), 377- 81.

Antunes, N.T., Tavío, M.M., Assunção, P., Rosales, R.S., Aquili, V., De la Fe, C., Poveda, J.B., (2007a). *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large colony type to 15 antimicrobials. Veterinary Microbiology. 119, 72–75.

Antunes, N.T., Tavío, M.M., Mercier, P., Ayling, R.D., Al-Momani, W., Assunção, P., Rosales, R.S., Poveda, J.B., (2007b). *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma putrefaciens* field isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 5, 3452– 3454.

Antunes, N.T., Tavío, M.M., Assunção, P., Rosales, R.S., Poveda, C., De la Fe, C., Gil, M.C., Poveda, J.B., (2008). *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. The Veterinary Journal. 177, 436–438.

Ariza-Miguel, J., Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., (2012). A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. BMC Veterinary Research. 8, 171.

Ariza-Miguel, J., Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., (2013). Molecular characterization of *Mycoplasma agalactiae* reveals the presence of an endemic clone in Spain. Journal of Clinical Microbiology. 51, 656–660.

Assunção, P., De la Fe, C., Ramirez, A.S., Andrada, M., Poveda, J.B., (2004). Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. The Veterinary record. 154(22), 684–687.

Atalaia, V. y Brandao, E., (1981). Agalaxia em ovinos e caprinos originada po Micoplasmas. Repositório de trabalhos do Instituto Nacional de Veterinária. 13, 79-86.

Atalaia, V., Brandao, E., Machado, M., (1986). Patologia dos pequenos ruminantes. Agalaxia contagiosa em Portugal. Repositório de trabalhos do Instituto Nacional de Veterinária. XVIII, 11-20.

Ak, K., Gurel, A., Hasoksuz, M., Barau, A., Ozturkeler, Y., Ileri, I.K., Minbay, A., (1995). Experimental studies on the effects of *Mycoplasma*

agalactiae on the spermatozoa and genital organs of rams. Pendik veteriner mikrobiyoloji dergisi. 26,139-155.

Bajmocy, E., Turcsanyi, I., Bolske, G., Bacsadi, A. y Kiss, I., (2000). Disease caused by *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* LC in Hungarian goat herds. Acta Veterinaria Hungarica. 48, 277-283.

Ball, H.J., Logan, E.F., Orr, W., (1987). Isolation of mycoplasmas from bovine semen in Northern Ireland. The Veterinary record. 121(14), 322-4.

Bar-Moshe, B., Rapoport, E., Brenner, J., (1984). Vaccination trials against *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* (Large-Colony-Tipe) infection in goats. Israel journal of medical sciences. 20(10), 972-4.

Baranowski, E., Bergonier, D., Sagne, E., Hygonenq, M.C., Ronsin, P., et al., (2014) Experimental infections with *Mycoplasma agalactiae* identify key factors involved in host-colonization. Public Library of Science one. 9(4): e93970. doi:10.1371/journal.pone.0093970.

Baseman, J.B., Reddy, S.P., Dallo, S.F., (1996). Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. American journal of respiratory and critical care medicine. 154, 137–144.

Bashiruddin, J.B., Taylor, T.K., Gould, A.R., (1994). A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. Journal of veterinary diagnostic investigation. 6 (4), 428–434.

Baudry, C. R., De Cremoux, R., Chartier, C., And Perrin, G., (1997). Incidence de la concentration cellulaire du lait de chèvre sur sa production et sa composition. Veterinary research. 28:277-286.

Becker, C.A., Ramos, F., Sellal, E., Moine, S., Poumarat, F., Tardy, F., (2012). Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. Journal of Microbiological Methods. 90, 73–79.

Belaid, B., Le Goff, C. & Lefevre, P.C., (1990). Epidemiologic survey and serodiagnosis of contagious agalactia of small ruminants in Eastern Algeria. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux. 43, 37-41.

Bergonier, D., Gracianette, G., Andrieu, C., And Berthelot, X., (1996). Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse de la brebis: évolution des comptages cellulaires individuels durant trois lactations consécutives. in: R. Rubino (Ed.) Somatic Cells and Milk of Small Ruminants. Wageningen Pers Publ., Wageningen, The Netherlands; 1996:93–97 (EAAP Publ. No. 77).

Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F., (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). 16,

848-873.

Bermúdez, V., Miller, R., Johnson, W., Rosendal, S., Ruhnke, L., (1987). The prevalence of *Mycoplasma* spp and their relationship to reproductive performance in selected equine herds in southern Ontario. Journal of reproduction and fertility. Supplement. 35, 671-673.

Bernabé, A., Contreras, A., Gómez, M.A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Gómez, S., (1988). Polyarthritis in Kids associated with *Klebsiella pneumoniae*. The Veterinary record. 142, 64-66.

Bianchi, L., Bolla, A., Budelli, E., Caroli, A., Casoli, C., Pauselli, M., Duranti, E., (2004). Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. Journal of dairy science. 87, 2401–2408.

Bielanski, A., Devenish, J., Phipps-Todd, B., (2000). Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* in semen on fertilization and association with *in vitro* produced morula and blastocyst stage embryos. Theriogenology, 53(6), 1213-23.

Boom, R., Sol, C.A.J., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim Van Dillen, P. & Van der Noordaa, J., (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology. 28, 495-503.

Bölske, G., Engvall, A., Renström, L.H.M., Wierup, M., (1989). Experimental infections of goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, LC type. Research in Veterinary Science. 46, 247-252.

Bréard, A. & Poumarat, F., (1988). Isolation of *Mycoplasma capricolum* from bull semen. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux. 41(2), 149-50.

Buonavoglia, D., Fasanella, A., Greco, G., Pratelli, A., (1999). A study of an experimental infection of sheep with *Mycoplasma agalactiae*. The new microbiologica. Jan; 22(1), 27-30.

Capote, J.F., Darmanin, N., Delgado, J.V., Fresno, M. & López, J.L., (1992). Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.). Agrocanarias 92. Consejería de Agricultura y Pesca del Gobierno de Canarias.

Carmona, J.A., (1992). Agalaxia contagiosa dos pequenos ruminates. Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias. 87, 226-228.

Castro-Alonso, A., Rodríguez, F., De la Fe, C., Espinosa de los Monteros, A., Poveda, J.B., Andrada, M., (2009). Correlating the immune response with the clinical– pathological course of persistent mastitis experimentally induced by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats. Research in Veterinary Science. 86, 274– 280.

Chambaud, I., Wróblewski, H., Blanchard, A., (1999). Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends in microbiology*. 7, 493-499.

Chavez Gonzalez, Y.R., Ros Bascunana, C., Bolske, G., Mattsson, J.G., Fernandez Molina, C., Johansson, K.E., (1995). *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Veterinary microbiology*. 47(1-2),183-190.

Chazel, M., Tardy, F., Le Grand, D., Calavas, D., Poumarat, F., (2010). Mycoplasmoses of ruminants in France: Recent data from the national surveillance network. *BMC Veterinary Research*. 6, 32.

Chopra-Dewasthaly, R., Baumgartner, M., Gamper, E., Innerebner, C., Zimmermann, M., Schilcher, F., Tichy, A., Winter, P., Jechlinger, W., Rosengarten, R., Spargser, J., (2012). Role of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 63, 307-322.

Citti, C., Nouvel, L.X., Baranowski, E., (2010). Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiology*. 5, 1073-1085.

Consenti, B. y Montagna, C.O., (1989). Profilassi dell' agalassia contagiosa degli ovi-caprini. *Obiettivi Veterinari*. 5, 31-33.

Contreras, A., Corrales, J.C., Salazar, L.M., Marco, J.C., (1993a). Agalaxia contagiosa I: Patogenia y cuadros clínicos. *Ovis*. 29, 49-66.

Contreras, A., Corrales, J.C., Romeo, L., Marco, J.C., (1993b). Agalaxia contagiosa I: Etiología. *Ovis*. 29, 9-25.

Contreras, A., Corrales, J.C., Sanchez, A. & Sierra, D., (1997) Persistence Of Subclinical Intramammary Pathogens In Goats Throughout Lactation. *Journal Of Dairy Science*. 80 2815-2819.

Contreras, A., Luengo, C., Extramiana, B., Sánchez, A., Marco, J.C., (2001). Prevalencia de microorganismos patógenos contagiosos en leche de tanque de rebaños caprinos de la región de Murcia y presencia de inhibidores antimicrobianos. XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Sevilla.

Contreras, A., Sánchez, A., De la Fe, C., Amores, J., Corrales, J.C., (2007). Programa de lucha frente a la agalaxia contagiosa en Castilla y León: una iniciativa interesante. *Acrimur*, 18,42-46.

Contreras, A., Miranda, R.E., Sánchez, A., De la Fe, C., Sierra, D., Luengo, C., Corrales, J.C., (2008). Presence of *Mycoplasma* species and somatic cell counts in goat bulk tank milk. *Small Ruminant Research*. 75(2-3), 247-251.

Corrales, J.C., (1998). Mamitis subclínicas caprinas: Diagnóstico y eficacia del tratamiento antibiótico en el período seco. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Corrales, J.C., Sánchez, A., Luengo, C., Poveda, J.B., Contreras, A., (2004). Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano Granadina goat herds. *Journal of dairy science*. 87(10), 3165–3171.

Corrales, J.C., Esnal, A., De la Fe, C., Sánchez, A., Assunção, P., Poveda, J.B., Contreras, A., (2007). Contagious Agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 68, 154-166.

Cottew, G.S. y Yeats, F.R., (1981). Occurrence of mycoplasmas in clinically normal goats. *Australian veterinary journal*. 57, 52-53.

Cottew, G.S. y Yeats, F.R., (1982). Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. *Australian veterinary journal*. 59, 77-81.

DaMassa, A.J., Brooks, D.L., Adler, H.E., Watt, D.E., (1983). Caprine mycoplasmosis: acute pulmonary disease in newborn kids given *Mycoplasma capricolum* orally. *Australian veterinary journal*. 60, 125-126.

Damassa, A.J., Brooks, D.L., Cordy, D.R., (1984a). Septicemia and pneumonia in *Mycoplasma capricolum* infections in young goats-reply. *Australian veterinary journal*. 61, 202.

Damassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., (1984b). Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Israel journal of medical sciences*. 20, 975-978.

DaMassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., (1986). Induction of mycoplasmosis in goat kids by oral inoculation with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *American journal of veterinary research*. 47, 2084-2089.

Damassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., Moe, A.I., (1987a). Caprine mycoplasmosis: an outbreak of mastitis and arthritis requiring the destruction of 700 goats. *The Veterinary record*. 120, 409-413.

Damassa, A.J., Holmberg, C.A., y Brooks, D.L., (1987b). Comparison of caprine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Israel journal of medical sciences*. 23, 636-640.

Damassa, A.J., y Brooks, D.L., (1991). The external ear canal of the goats and other animals as a mycoplasma habitat. *Small Ruminant Research*. 4, 85–93.

Damassa, A.J., Wakenell, P.S., Brooks, D.L., (1992). Mycoplasmas of goats and sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 4(1), 101-113.

Dedieu, L., Mady, V., Lefevre, P.C., (1995). Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. FEMS microbiology letters. 129 (2–3), 243–249.

Delgado-Pertiñez, M., Alcalde, M.J., Guzmán-Guerrero, J.L., Castel, J.M., Mena, Y., Caravaca, F., (2003). Effect Of Hygiene-Sanitary Management On Goat Milk Quality In Semi-Extensive Systems In Spain. Small Ruminant Research. 47, 51–61.

Déniz, S., Real, F., Acosta, B., Fernández, A., Ramirez, A.S., Poveda, J.B., (1998). Clinical and microbiological findings in Contagious Agalactia cases in the Canary Islands. In: COST 826. Agriculture and biotechnology: Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnosis, epidemiology and molecular genetics 2, pp. 106-109. Edited by Leori, G., Santini, F., Scanziani, E. & Frey, J. Bruselas, European Communities.

De la Fe, C., (2003). Aportaciones al conocimiento de la inmunoprevención frente a la agalaxia contagiosa caprina en la isla de Gran Canaria. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

De la Fe, C., Assunção, P., Antunes, T., Rosales, R.S., Poveda, J.B., (2005). Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. The veterinary journal. 170(2), 257–259.

De la Fe, C., Assunção, P., Rosales, R.S., Antunes, T., Poveda, J.B., (2006). Characterisation of protein and antigen variability among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. The veterinary journal. 171, 532–538.

De la Fe, C., Gutiérrez, A., Poveda, J.B., Assunção, P., Ramírez, A.S., Fabelo, F., (2007a). First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum*, one of the agents of caprine contagious agalactia, on the island of Lanzarote (Spain). The veterinary journal. 173(2), 440-442.

De la Fe, C., Corrales, J.C., Ruiz, I., Sánchez, A., Gómez Martín, A., Contreras, A., (2007b). *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.

De la Fe, C., Corrales, J.C., Amores, J., Gómez Martín, A., Sánchez, A., Contreras, A., (2008). Evaluación del cultivo y de la PCR para el diagnóstico de cabras portadores del grupo *Mycoplasma mycoides* en el conducto auditivo externo. XXXIII Jornadas Científicas y XII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 317-320, 295-298.

De la Fe, C., Sánchez, A., Gutiérrez, A., Contreras, A., Corrales, C.J., Assunção, P., Poveda, C., Poveda, J.B., (2009a). Effects on goat milk quality of the presence of *Mycoplasma* spp. In herds without symptoms of contagious agalactia. The Journal of dairy research. 76(1), 20-23.

De la Fe, C., Amores, J., Gómez Martín, A., Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J.C. (2009b). *Mycoplasma agalactiae* detected in the semen of goat bucks. *Theriogenology*. 72, 1278-1281.

De la Fe, C., Gómez-Martín, A., Amores, J., Corrales, J.C., Sánchez, A., Poveda, J.B., Contreras, A., (2010). Latent infection of male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* at an artificial insemination centre. *The Veterinary Journal*. 186, 113–115.

De la Fe, C., Castro-Alonso, A., Herráez, P., Poveda, J.B., (2011). Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from the ears of goats experimentally infected by the intramammary route. *The Veterinary Journal*. 190, 94–97.

De la Fe, C., Amores, J., Tardy, F., Sagne, E., Nouvel, L.X., Citti, C., (2012). Unexpected genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. *BMC Veterinary Research*. 27, 146.

De La Fuente, R. & Orden, J.A., (2002). Género *Staphylococcus*. En manual de microbiología veterinaria. Vadillo, S., Píriz S. Y Mateos E.M. Ed. Mcgraw-Hill/Interamericana de España S.A.U., Madrid. Pp. 431-439.

Delgado-Pertiñez, M., Alcalde, M.J., Guzmán-Guerrero, J.L., Castel, J.M., Mena, Y., Caravaca, F., (2003). Effect Of Hygiene-Sanitary Management On Goat Milk Quality In Semi-Extensive Systems In Spain. *Small Ruminant Research*. 47, 51–61.

Dewdney, J.M., Maes, L., Raynaud, J.P., Blanc, F., Scheid, J.P., Jackson, T., Lens, S., Verschueren, C., (1991). Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food and Chemical Toxicology*. 29,477–483.

Di Provvido, A., Scacchia, M., Varasano, V., Churchward, C., De Caro, C., Al-Momani, W., Di Francesco, G., Ayling, R.D., Lelli, R., Nicholas, R.A., (2009). Experimental infection of goats with an unusual strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolated in Jordan. *Journal of Comparative Pathology*. 141, 121–126.

Dramsi, S., Dehoux, P., Cossart, P., (1993). Common features of gram-positive bacterial proteins involved in cell recognition. *Molecular microbiology*. 9, 1119–1121.

Eaglesome M.D., Garcia M.M., (1990). The effect of *Mycoplasma bovis* on fertilization processes *in vitro* with bull spermatozoa and zona-free hamster oocytes. *Veterinary Microbiology*. 21(4), 329-37.

Egwu, G.O., Ameh, J.A., Aliyu, M.M. & Mohammed, F.D., (2001). Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. *Small Ruminant Research*. 39, 87-91.

El Idrissi, A.H., Benkirane, A. & Zardoune, M., (1994). Studies on subclinical mastitis in caprine dairy herds in Morocco. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.* 47, 5-287.

Esnal, A., Adúriz, J.J., Romeo, M., Juste, R.A., Contreras, A., (1994). Agalaxia contagiosa: control. *Ovis.* 30, 35-62.

Friis, N.F., Ahrens, P., Hagedorn-Olsen, T., Nielsen, E.O., Kokotovic, B. (2003). *Mycoplasma hyopharyngis* isolation from swine. *Acta veterinaria Scandinavica.* 44(1-2), 103-4.

Fernández, A., Martín de las Mulas, J., Villalba, E., Poveda, J.B., Molleda, M., Garrido, A., (1989). Brote de queratoconjuntivitis ovina (QCO) asociada a *M. agalactiae*. XIV Jornadas científicas de la SEOC. Jaén.

Fitzmaurice, J., Sewell, M., Manso-Silván, L., Thiaucourt, F., McDonald, W.L., O'Keefe, J.S., (2008). Real-time polymerase chain reaction assays for the detection of members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *New Zealand Veterinary Journal.* 56, 40–47.

Flitman-Tene, R., Levisohn, S., Lysnyansky, E., Rapoport, E., Yogev, D., (2000). A chromosomal region of *Mycoplasma agalactiae* containing vsp-related genes undergoes in vivo rearrangement in naturally infected animals. *FEMS microbiology letters.* 191, 205-212.

Foggie, A., Etheridge, J.R., Erdag, O., Arisoy, F., (1970). Contagious agalactiae of sheep and goats. A comparison of 2 turkish strains of *Mycoplasma agalactiae* by cross protection tests in goats. *Research in veterinary science.* 11, 479-481.

Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R., & Stradiotto, K., (2002). Microbial Composition, Including The Incidence Of Pathogens, Of Goat Milk From The Bergamo Region Of Italy During A Lactation Year. *Journal Of Dairy Research.* 69, 213–225.

Fox, L.K., Hancock, D.D., Mickelson, A. And Britten, A., (2003). Bulk Tank Milk Analysis: Factors Associated With Appearance Of *Mycoplasma* Sp. In Milk. *Journal of veterinary medicine.* B 50, 235–240.

Fox, L.K., Kirk, J.H., Britten, A.,(2005). *Mycoplasma* Mastitis: A Review Of Transmission And Control. *Journal of veterinary medicine.* B, Infectious diseases and veterinary public health. 52(4), 153-60.

Fox, Lk., (2012). *Mycoplasma* Mastitis: Causes, Transmission, And Control Review Article *Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice.* 28, 2, 225-237.

Freundt, E.A., (1983). Film and Spot production. En: *Methods in Mycoplasmology*, Vol. I. Eds. S. Razin y J. G. Tully. 373-374. Academic Press, INC.

Furneri, P.M., Rappazzo, G., Musumarra, M.P., Di Pietro, P., Catania, L.S., Roccasalva, L.S., (2001). Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16- membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 2958–2960.

Gaillard-Perrin, G., Picavet, D.P., Perrin, G., (1985). Isolement de *Mycoplasma putrefaciens* dans deux troupeaux de chèvres présentant des symptômes d'agalactie. *Revue de médecine vétérinaire*. 137, 67-70.

Gaillard-Perrin, G. y Lenfant, D., (1987). The importance of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in caprine mammary disease in France. In *Agriculture: Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants*, pp. 59-69. Edited by Jones, G.E. Luxembourg, European Communities.

Garrido, F. y León, L., (1982). Micoplasmosis mayores de los pequeños rumiantes. Situación actual en España. VII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia. 257-262.

Garrido, F., León, L., Laredo, J.L., Cuellar, L., Díaz, M.A., (1987). Contagious agalactia in Spain. In *Agriculture: Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants*, pp. 1-5. Edited by Jones, G. E. Luxembourg, European Communities.

Gianidis, Nd., Panousis, N., Petridou, Ej., Siarkou, Vi., Lafi, Sq., Pourliotis, K., Hatzopoulou, E., Fthenakis, Gc., (2011). Selenium, Vitamin E And Vitamin A Blood Concentrations In Dairy Sheep Flocks With Increased Or Low Clinical Mastitis Incidence. *Small Ruminant Research*. 95, 193-196.

Giangaspero, M., Orusa, R., Nicholas, R.A.J., Harasawa, R., Ayling, R.D., Churchward, C.P., Whatmore, A., Bradley, D., Robetto, S., Sacchi, L., Domenis, L., (2010). Characterization of *Mycoplasma* isolated from an ibex (*Capra ibex*) suffering from keratoconjunctivitis in northern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*. 46, 1070–1078.

Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M., Alonso, J.M., Rey, J., Poveda, J.B., Hermoso de Mendoza, J., (1999a). Mastitis caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (large colony type) in goat flocks in Spain. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*. 46(10), 741–743.

Gil, M. C., Hermoso de Mendoza, M., Rey, J., Alonso, J.M., Poveda, J.B., Hermoso de Mendoza, J., (1999b). Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extremadura, Spain. *The Veterinary record*. 144, 24-25.

Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M., Rey, J., Alonso, J.M., Poveda, J.B., Hermoso de Mendoza, J., (1999c). Isolation of *Mycoplasmas* from the External Ear Canal of Goats Affected with Contagious Agalactia. *The veterinary journal*. 158, 152–154.

Gil, M.C., Pena, F.J., Hermoso, D.M., Gomez, L., (2003). Genital lesions in an

outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health. 50(10), 484–487.

Glew, M.D., Papazisi, L., Poumarat, F., Bergonier, D., Rosengarten, R., Citti, C., (2000). Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. Infection and Immunity. 68, 4539–4548.

Gómez Martín, A., Amores, J., De la Fe, C., Moya, F., Martínez, P., Corrales, J.C., Contreras, A., Sánchez, A., (2008a). Vigilancia epidemiológica de las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* en los rebaños caprinos del núcleo de control lechero de la región de Murcia. XXXIII Jornadas Científicas y XII Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Producción ovina y caprina nº XXIX SEOC (Alcalde y cols). 322-327. Almería.

Gómez Martín, A., De la Fe, C., Amores, J., Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J.C., (2008b). Artritis caprina producida por *Mycoplasma arginini*. XXXIII Jornadas Científicas y XII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Producción ovina y caprina nº XXIX SEOC (Alcalde y cols). 317-320. Almería.

Gómez Martín, A., Corrales, J.C., Sánchez, A., Amores, J., Martínez Parra, J., Contreras, A., De la Fe, C., (2008c). Estudio microbiológico de sementales caprinos portadores auriculares asintomáticos de *Mycoplasma* spp. XXXIII Jornadas Científicas y XII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. (SEOC). Producción ovina y caprina nº XXIX SEOC (Alcalde y cols): 309-312. Almería.

Gómez Martín, A., Amores, A., Corrales, J.C., Sánchez, A., Contreras, A., De la Fe, C., (2009). El semental caprino como factor de sanidad colectiva: consideraciones sobre su participación en la transmisión de la Agalaxia Contagiosa Caprina. Acrimur. (Artículo en prensa).

Gómez-Martín, A., De la Fe, C., Amores, J., Sánchez, A., Contreras, A., Paterna, A., Buendía, A.J., Corrales, J.C., (2012a). Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers. Veterinary Microbiology. 157, 355–362.

Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Amores, J., Sánchez, A., Contreras, A., Paterna, A., De la Fe, C., (2012b). Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen. Theriogenology. 77, 1252–1256.

Gómez-Martín, A., Amores, A., Paterna, A., De la Fe, C., (2013a). Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. The Veterinary Journal. 198 48–56.

Gómez-Martín, A., Sánchez, A., Amores, J., Corrales, J.C., Contreras, A., De la Fe, C., (2013b). Effect of marbofloxacin on *mycoplasma* carrier state and

sperm quality in goat bucks. *Small Ruminant Research*. 112, 186–190.

Gómez-Martín, A., Uc, N., Vieira, L.A., Gadea, J., Cadenas, J., Sánchez, A., De la Fe, C., (2015). Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. *Theriogenology*. 83, 911–919.

Gonzalez, R.N., And Wilson, D.J., (2003). *Mycoplasma* Mastitis In Dairy Herds. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 19, 199-221.

Gonzalo, C., Carriedo, J.A., Baro, J.A., San Primitivo, F., (1994). Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat, and protein in dairy sheep. *Journal of dairy science*. 77, 1537–1542.

Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J. A. And San Primitivo, F., (2002). Mammary pathogens and their relationship with somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of dairy science*. 85,1460–1467.

Gonzalo, C., Carriedo, J.A., Blanco, M.A., Beneitez, E., Juarez, M.T., De La Fuente, L.F., Primitivo, F.S., (2005). Factors of variation influencing bulk tank somatic cell count in dairy sheep. *Journal of dairy science*. 88 (3), 969–974.

Gonzalo, C., Carriedo, J.A., Beneitez, E., Juarez, M.T., De La Fuente, L.F. & San Primitivo, F., (2006). Bulk tank total bacterial count in dairy sheep: factors of variation and relationship with somatic cell count. *Journal Of Dairy Science*. 89 549–552.

Gonçaves, R., (1884). Mycoplasmoses des caprins au Portugal. Les maladies de la chèvre. Ed. INRA. 28, 279-286.

Goltz, J.P., Rosendal, S., Mccraw, B.M., Ruhnke, H.L., (1986). Experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats. *Canadian journal of veterinary research*. 50, 59-67.

Gutiérrez, C., Rodríguez, C, J.L., Montoya, J.A., Fernández, A., (1999). Clinico-pathological and haematological findings in goat kids experimentally infected simultaneously with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony-type). *Small Ruminant Research*. 31, 187-192.

Harmon, R.J., Eberhart, R.J., Jasper, D.E., Langlois, B.E., & Wilson, R.A., (1990). *Microbiological Procedures For The Diagnosis Of Bovine Udder Infection*. 3rd Edition. Arlington Va, Usa: National Mastitis Council.

Hasso, S.A., Al-Aubaidi, J.M., Al-Darraji, A.M., (1993). Contagious agalactiae in goats: its severity as related to the route of infection and pregnancy. *Small Ruminant Research*. 10, 263-275.

Hasso, S.A., Aldarraji, A.M., Alaubaidi, J.M. (1994). Pathology of experimentally-induced contagious agalactia in goats. *Small Rumin. Res.* 13, 79–84.

Hazell, S.L., Carrigan, M.J., Cockram, F.A., (1985). *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in the ears of goats associated with an outbreak of systemic mycoplasmosis. *Australian veterinary journal.* 62, 421–2.

Hotzel, H., Sachse, K., Pfutzner, H., (1996). A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Veterinary microbiology.* 49(1–2), 31–43.

Hotzel, H., Frey, J., Bashiruddin, J., Sachse, K., (2003). Detection and differentiation of ruminant mycoplasmas. In *Methods in Molecular Biology*, Vol 216: PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols, pp 231–245. Edited by Sachse, K. and Frey, J. Totowa, USA. Humana Press Inc.

Jaeggi, J.J., Govindasamy-Lucey, S., Berger, Y.M., Johnson, M.E., Mckusick, B.C., Thomas, D.L., Wendorff, W.L., (2003). Hard Ewe's Milk Cheese Manufactured From Milk Of Three Different Groups Of Somatic Cell Counts. *Journal Of Dairy Science.* 86 10, 3082-3089.

Jasper, D.E., (1980). Prevalence Of Mycoplasmal Mastitis In The Western States. *California Veterinarian,* 43. 24-26.

Jaubert, G., Gay Jacquin, M.F., Perrin, G., (1996). Numerations cellulaires et caractéristiques biochimiques et technologiques du lait de chèvre (Somatic cell counts and biochemical and technological characteristics of goat milk). In: Rubino, R. (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants.* EAAP Publication No. 77, Wageningen Pers, Bella, Italy, September 25–27, 1994, pp. 263–268.

Johansson, K.E., Berg, L.O., Bölske, G., Déniz, S., Mattsson, J.G., Persson, M., Pettersson, B., (1996). Specific PCR systems based on the 16S rRNA genes of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*. In: Frey, J., Sarris, K. (Eds.), *COST 826, Agriculture and Biotechnology: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics 1.* European Communities, Brussels. Pp, 88–90.

Jones, G.E., (1986). The pathogenicity of some ovine or caprine mycoplasmas in the lactating mammary gland of sheep and goats. *Journal of comparative pathology.* 95, 305-318.

Jurado, J.J., Castillo Gómez, J., (2005). Programa de selección genética de la raza caprina Murciana-granadina. XXX Jornadas Científicas y IX Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Granada. pp. 131-134.

Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N., (1985). Pathology of Domestic Animals. London Academic Press. P, 65.

Kahane, I., (1991). Mechanisms of adherente and pathogenicity of micoplasmas. En: Laboratory Course on Rapid Diagnosis of Mycoplasma. 59-60.

Kidanemariam, A., Gouws, J., Van Vuuren, M., Gummow, B., (2005a). Ulcerative balanitis and vulvitis of Dorper sheep in South Africa: A study on its aetiology and clinical features. Journal of the South African Veterinary Association. 76, 197–203.

Kidanemariam, A., Gouws, J., Van Vuuren, M., Gummow, B., (2005b). *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma mycoides mycoides* large colony and Arcanobacterium pyogenes isolated from clinical cases of ulcerative balanitis and vulvitis in Dorper sheep in South Africa. Journal of the South African Veterinary Association. 76, 204–208.

Kinde, H., DaMassa, A.J., Wakenell, P.S., Petty, R., (1994). *Mycoplasma* infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 6, 423–427.

Kinde, H., DaMassa, A.J., Wakenell, P.S., Petty, R., (2004). *Mycoplasma* infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). Journal of veterinary diagnostic investigation. 6(4), 423-7.

Kirchhoff, H., Rosengarten, R., (1984). Isolation of a motile mycoplasma from fish. Journal of general microbiology. 130(9), 2439-2445.

Kirk, J.H., Glenn, K., Ruiz, L., et al., (1997). Epidemiologic Analysis Of *Mycoplasma* Spp Isolated From Bulk-Tank Milk Samples Obtained From Dairy Herds That Were Members Of Milk Cooperative. Journal of the American Veterinary Medical Association. 211, 1036-1038.

Kirkbride., (1987). Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice. 3(3), 575-91.

Königsson, M.H., Bölske, G., Johansson, K.E., (2002). Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. Veterinary Microbiology. 85, 209–220.

Lamber, M., (1987). Contagious agalactia of sheep and goats. Mycoplasmosis of ruminants. Revue scientifique et technique / Office international des épizooties. 6, 699-711.

Las Heras, A., (2002). Aportaciones al estudio de las mastitis en los pequeños rumiantes de aptitud lechera. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de

Madrid.

Lebret, P., (1989). Rapport Pyrenées Atlantiques. Syndrome Agalaxie Contagieuse des petits ruminants. Thèse. Ecole National de Vétérinaire de Toulouse.

Leitner, G., Merin, U., Lavi, Y., Egber, A. & Silanikove, N., (2007). Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. The Journal of dairy research. 74, 186–193.

León, L., Garrido, F., Cubero, M.J., Ayala, J.A., Oliver, P., (1993). Enfermedades caprinas causadas por micoplasmas en la Región de Murcia. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Albacete, 23-25 de septiembre.

León Vizcaíno, L., Garrido Abellán, F., Cubero Pablo, M.J., Ayala Cutillas, J.A. & Oliver Martínez, P., (1994). Enfermedades caprinas causadas por micoplasmas en la región de Murcia. *XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*. pp. 103-106.

León Vizcaíno, L., Garrido Abellán, F., Cubero Pablo, M.J. & Perales, A., (1995). Immunoprophylaxis of caprine contagious agalaxia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. The Veterinary record. 137, 266-269.

Levisohn, S., Davidson, I., Caro Vergara, M.R., (1991). Use of an ELISA for differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* (LC) in naturally infected goat herds. Research in veterinary science. 51, 66-71.

Lilenbaum, W., Vargas, R., Brandao, P.E, Rinchtzenhain, L.J., Vasconcellos, S.A., (2008). Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. Theriogenology. 69, 837-842.

Loria, G.R., Sammartino, C., Nicholas, R.A., Ayling, R.D., (2003). *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin–spectinomycin. Research in Veterinary Sciences. 75, 3–7.

Macowan, K.J., Brand, T.F., McGillveray, N., Hunter, A.R., (1984). Experimental infection of castrated lambs with *Mycoplasma agalactiae*. The Journal of hygiene. 93(3), 455-63.

Madanat, A., Zendulkova, D., Pospisil, Z., (2001). Contagious agalactia of sheep and goats. A review. Acta veterinaria Brno. 70, 403-412.

Maisi, P. & Riipinen, I., (1991). Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. The British veterinary journal. 147, 126-132.

Mändar, R., Raudas, E., Türk, S., Korrovits, P., Punab, M., (2005). Micoplasmas in semen of chronic prostatitis patients. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 39(6), 479-82.

Manso-Silván, L., Perrier, X., Thiaucourt, F., (2007). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2247–2258.

Manso-Silván, L., Vilei, E.M., Sachse, K., Djordjevic, S.P., Thiaucourt, F., Frey, J., (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 1353–1358.

Marco, J.C., (1988). Agalaxia contagiosa: cuadro clínico y lesional. II Jornadas técnicas de Agalaxia Contagiosa. 22-24 junio. Almería.

Marco, J.C., Adúriz, J.J., Romeo, M., Juste, R.A., Contreras, A., (1994). Diagnóstico de la agalaxia contagiosa. *Ovis*. 30, 9-33.

Mattsson, J.G., Gersdorf, H., Göbel, U.B., Johansson, K.E., (1991). Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by oligonucleotide probes complementary to 16s rRNA. *Molecular and cellular probes*. 5, 27-35.

McAuliffe, L., Churchward, C., Lawes, J.R., Loria, G., Ayling, R.D., Nicholas, R., (2008). VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *M. Agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. *BMC Microbiology*. 8, 193.

McAuliffe, L., Gosney, F., Hlusek, M., De Garnica, M.L., Spargser, J., Kargl, M., Rosengarten, R., Ayling, R.D., Nicholas, R.A., Ellis, R.J., (2011). Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *Journal of Medical Microbiology*. 6, 803–811.

McDougall, S., Murdough, P., Pankey, W., Delaney, C., Barlow, J. & Scruton, D., (2001). Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*. 40, 245-254.

Mercier, P., Pellet, M., Morignat, E., Calavas, D., Poumarat, F., (2007). Prevalence of mycoplasmas in external ear canal of goats: Influence of the sanitary status of the herd. *Small Ruminant Research*. 73, 296–299.

Miles and Nicholas., (1998). Introduction. En : Miles, R., Nicholas, R. (Eds.), *Methods in molecular biology*, vol. 104: *Mycoplasma* protocols. 1-7. Humana Press Inc. ISBN 0-89603-525-5.

Miranda Morales, R.E., Luengo Retamosa, C., García Muñoz, D., Jiménez Mateo, J., Contreras, A., (2000). Seguimiento de la infección por micoplasma en leche de tanque de explotaciones caprinas. XXV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Pp. 369-372.

Miege, R., (1978). Le foyer d'agalaxie contagieuse des chevres des Deux Savoies. Revue de médecine vétérinaire. 129, 247- 259.

Monnerat, M.P., Thiaucourt, F., Nicolet, J., Frey, J., (1999). Comparative analysis of the *lppA* locus in *Mycoplasma capricolum* subs. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. Veterinary Microbiology. 69, 157–172.

Mourot, D., Loussouarn, S., (1981). Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. Recueil de Médecine Vétérinaire. 157, 175–177.

Muehlerr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J.E. & Stephan, R., (2003). Microbiological Quality Of Raw Goats' And Ewes' Bulk-Tank Milk In Switzerland. Journal Of Dairy Science. 86, 3849–3856.

Nayak, N.C. y Bhowmik, M. K., (1990). Pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* (large colony type) for goat kids. Small Ruminant Research. 5, 155-167.

Ndegwa, E.N., Mulei, C.M., & Munyua, J.M., (2000). Risk factors associated with subclinical subacute mastitis. Israel Journal of Veterinary Medicine.

Ndegwa, E.N., Mulei, C.M. & Munyua, S.J., (2001). Prevalence of microorganisms associated with udder infections in dairy goats on small-scale farms in Kenya. Journal of the South African Veterinary Association. 72, 97-98.

Nicolet, J., (1996). Animal mycoplasmoses: a general introduction. Revue scientifique et technique / Office international des épizooties. 15, 1233-1240.

Nicholas, R., (1995). Contagious agalactia. State Veterinary Journal. 5, 13-15.

Nicholas, R.A., And Ayling, R.D., (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Research in Veterinary Science. 74, 105-112.

Nicholas, R., Ayling, R., MacAuliffe, L., (2008). *Mycoplasma* Diseases of Ruminants. CAB International, Oxfordshire, UK, 239 pp.

Nouvel, L.X., Sirand-Pugnet, P., Marena, M., Sagné, E., Barbe, V., Mangenot, S., Schenowitz, C., Jacob, D., Barré, A., Claverol, S., Blanchard, A., Citti, C., (2010). Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: Clues to the macro- and micro-events that are shaping *mycoplasma* diversity. BMC Genomics. 11, 86.

Nouvel, L.X., Marenda, M.S., Glew, M.D., Sagné, E., Giammarinaro, P., Tardy, F., Poumarat, F., Rosengarten, R., Citti, C., (2012). Molecular typing of *Mycoplasma agalactiae*: Tracing European-wide genetic diversity and an endemic clonal population. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 35, 487–496.

OIE., (Oficina Internacional de Epizootias) (2008). Código Sanitario para los animales terrestres. Volumen 1, Título 4, Artículo 4.5.6: Condiciones aplicables a los controles sanitarios de los moruecos, machos cabríos y animales excitadores.

Ojo, M.O., (1976). Caprine pneumonia. IV. Pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* and caprine strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* for goats. *Journal of comparative pathology*. 86, 519-529.

Ojo, M.O., China, J.C., Erno, H., (1992). Mollicutes isolated from cases of caprine vulvovaginitis in Nigeria. *Program and Abstracts of International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology*. 172. August 2-7. Ames (Iowa). U.S.A.

Oravcová, K., López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., (2009). *Mycoplasma agalactiae* p40 Gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: Assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 445–450.

Orós, J., Fernández, A., Rodríguez, J.L., Rodríguez, F., Poveda, J.B. (1997). Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats. *Zentralbl Veterinarmed B*. 44(2), 99-104.

Ostrowski, S., Thiaucourt, F., Amirbekov, M., Mahmadshev, A., Manso-Silván, L., Dupuy, V., Vahobov, D., Ziyoev, O., Michel, S., (2011). Fatal outbreak of *Mycoplasma capricolum* pneumonia in endangered markhors. *Emerging Infectious Diseases*. 17, 2338–2341.

Paape, M.J., Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J.C., Capuco, A.V., (2001). Milk Somatic Cells And Lactation In Small Ruminants. *Journal Of Dairy Science*. 84, E237-E244.

Paterna, A., Sánchez, A., Amores, J., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Contreras, A., De la Fe, C., (2012). Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum. *The Veterinary Journal*. 196, 263–265.

Paterna, A., Sánchez, A., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., De la Fe, C., Contreras, A., Amores, J., (2013). Short communication: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats. *Journal Of Dairy Science*. 96, 7073–7076.

Pepin, M., Dufour, P., Lambert, M., Aubert, M., Valognes, A., Rotis, T., Van De, W.A., Bergonier, D., (2003). Comparison of three enzymelinked immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation.* 15 (3), 281–285.

Pérez Gómez, S., San Martín, M., Arriaga, A., (1996). Situación epidemiológica de la agalaxia contagiosa ovina en el ovino lacho de la Comunidad Autónoma de Navarra. *Medicina veterinaria.* 13, 55-60.

Perreau, P., (1977). Les mycoplasmoses des petits ruminants en France-Données actuelles. III Journées Rech. Ovine et Caprine. 228-237. Eds. ITOVIT-SPEOC :Paris.

Perreau, P., (1979). Les mycoplasmoses de la chèvre. *Les Cahiers de médecine vétérinaire.* 48, 71-85.

Perrin, J., Müller, M., Zangger, N., Nicolet, J., (1994). Infection with *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC (large colony type) in bezoar goat kids (*Capra aegagrus cretica*) in the Bern (Switzerland) Zoo. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 136(8), 270-4.

Pettersson, P., Leitner, T., Ronaghi, M., Bölske, G., Uhlen, M., Johansson, K.E., (1996). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *Journal of bacteriology.* 178(14), 4131–4142.

Peyraud, A., Woubit, S., Poveda, J.B., De la Fe, C., Mercier, P., Thiaucourt, F., (2003). A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Molecular and cellular probes.* 17(6), 289–294.

Picavet, D.P., (1984). Evolution de deux foyers d'agalactie contagieuse caprine en Ariège *Revue. Méd. Vét.* 135, 517-525.

Pilo, P., Martig, S., Frey, J., Vilei, E.M., (2003). Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein lppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Veterinary research.* Nov-Dec. 34(6), 761-75.

Pinho, L., Thompson, G., Machado, M., Carvalheira, J., (2013). Management Practices Associated With The Bulk Tank Milk Prevalence Of *Mycoplasma* Spp. In Dairy Herds In Northwestern Portugal *Preventive Veterinary Medicine.* 108 21–27.

Pirisi, A., Lauret, A. & Dubeuf, J.P. (2007). Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research.* 68, 167–178.

Pisoni, G., Fusi, E., Cheli, F., Rebucci, R., Moroni, P., Baldi, A., (2004). Mammary gland health status and plasmin–plasminogen system in dairy goat. In: *Book of Abstracts of the Eighth International Conference on Goats, South*

Africa. July 4–9, 2004, p. 90.

Poumarat, F., Le Grand, D., Gaurivaud, P., Gay, E., Chazel, M., Game, Y., Bergonier, D., (2012). Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by *Mycoplasma agalactiae*. BMC Veterinary Research. 8, 109.

Poutrel, B., De Cremoux, R., Ducelliez, M. & Verneau, D., (1997). Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell counts. Journal of animal science. 75, 566-70.

Poveda, J.B. Y Nicholas, R., (1998). Serological Identification Of Mycoplasmas By Growth And Metabolic Inhibition Tests. In: Miles, R., Nicholas, R. (Eds.), Biochemical Characteristics In *Mycoplasma* Identification. In Methods In Molecular Biology, Vol. 104, Mycoplasma Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Pp. 69–78.

Poveda, J.B. y Nicholas, R., (1998). Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests. In: Miles, R., Nicholas, R. (Eds.), Methods in Molecular Biology, Vol.104: Mycoplasma Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Pp.105–111.

Poveda, J.B., (2003). Etiología de las mastitis caprinas en las Islas Canarias. 1992-2002. Datos no publicados.

Ramírez, A., (1999). Development of two culture media to the replication of Mollicutes caele microorganisms. Doctoral thesis. University of Las Palmas de Gran Canaria, 214 pp.

Rapaport, E. y Levisohn, S., (1993). Mycoplasmas udder pathogens. Symposium de ordeño mecánico, Budapest, Hungría.

Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., Crémoux, R., Gonzalo, C., (2007). Somatic Cells Of Goat And Sheep Milk: Analytical, Sanitary, Productive And Technological Aspects Original Research Article. Small Ruminant Research. 68 126-144.

Razin, S., (1978). The *mycoplasma*. Microbiological reviews. 42, 414-470.

Razin, S., (1994). DNA probes and PCR in diagnosis of *Mycoplasma* infections. Molecular and cellular probes. Mol. 8(6), 497-511.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiology and molecular biology reviews. 62, 1094- 1156.

Razin, S., (1999). Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. Bioscience reports. 19(5), 367-72.

Rodríguez, J.L., Gutiérrez, C., Orós, J., Poveda, J.B., Quezada, M., Fernández, A., (1993). Infección por *Mycoplasma putrefaciens* en chivos. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Pp. 99-102.

Rodríguez, J.L., Poveda, J.B., Gutiérrez, C., Acosta, B., Fernández, A., (1994a). Polyarthrititis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. The Veterinary record. 135, 406- 407.

Rodríguez, J.L., Gutierrez, C., Herráez, P., Fernández, A., Poveda, J.B., (1994b). Micoplasmosis caprinas. O. Medico veterinario. 41, 37-50.

Rodríguez, J.L., Orós, J., Brooks, D., DaMassa, A., Poveda, J.B., Fernández, A., (1997). Abortion in goats associated with *Mycoplasma* spp. In COST 826. Agriculture and biotechnology: *Mycoplasmas* of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics 1, pp. 170-172. Edited by Frey, J. and Sarris, K. Bruselas, European Communities.

Rodríguez, F., Sarradell, J., Poveda, J.B., Ball, H.J., Fernández, A., (2000). Immunohistochemical Characterization of Lung Lesions Induced Experimentally by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in Goats. Journal of Comparative Pathology. 123, 285-293.

Rodríguez, F., Ramírez, G.A., Ramírez, A.S., Ball, H.J., Espinosa De Los Monteros, A., Fernandez, A., (2002). Immunohistochemical detection of *Mycoplasma agalactiae* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from naturally and experimentally infected goats. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health. 49(5), 226-9.

Rosendal, S., (1981). Experimental infection of goats, sheep and calves with the large colony type of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides*. Veterinary pathology. 18, 71-81.

Rosendal, S., (1983). Susceptibility of goats and calves after experimental inoculation or contact exposure to a Canadian strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* isolated from a goat. Canadian journal of comparative medicine. 47,484-490.

Rosendal, S., (1984). Effect of the caprine variant of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* on endothelium, monocytes, and complement of guinea pig, calf, sheep and goat serum. American journal of veterinary research. 45, 2396-2402.

Ruhnke, H.L., Rosendal, S., Goltz, J., Blackwell, T.E., (1983). Isolation of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* from polyarthrititis and mastitis of goats in Canada. The Canadian veterinary journal. 24, 54-56.

Samra, Z., Soffer, Y., Pansky, M. (1994). Prevalence of genital chlamydia and *mycoplasma* infection in couples attending a male infertility clinic. European

journal of epidemiology. 10(1), 69-73.

Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J.C., (1997). Mamitis caprina I: Aspectos epidemiológicos de las mamitis caprinas en relación con los programas de control. Ovis. 53, 67-92.

Sánchez, A., Sierra, D., Luengo, C., Corrales, J.C., Morales, C.T., Contreras, A., Gonzalo, C., (2005). Influence Of Storage And Preservation On Fossomatic Cell Count And Composition Of Goat Milk. Journal Of Dairy Science. 88, 3095-3100.

Sanchis, R., Abadie, G., Lambert, M., Guibert, J.M., Calamel, M., Dufour, O., Vitu, C., Vignoni, M., Pepin, M., (1998). Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* on lambs. Small Ruminant Research. 27, 31-39.

Sanchis, R., Abadie, G., Lambert, M., Cabasse, E., Dufour, P., Guibert, J.M., Pepin, M., (2000). Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains. Veterinary research. 31, 329-337.

Salih, B.A and Rosenbusch, R.F., (2001). Cross-reactive proteins among eight bovine mycoplasmas detected by monoclonal antibodies. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 24, 103-111.

Schmid, D., Fretz, R., Winter, P., Mann, M., Höger, G., Stöger, A., Ruppitsch, W., Ladstätter, J., Mayer, N., De Martin, A., Allerberger, F., (2009). Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. Wien Klin Wochenschr. 121(3-4), 125-31.

Schubert, E., Sachse, K., Jores, J., Heller, M., (2011). Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Small colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. BMC Veterinary Research. 7, 72.

Shahram, M., Nicholas, R.A., Wood, A.P., Kelly, D.P., (2010). Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* large colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. Systematic and Applied Microbiology. 33, 20–24.

Sierra, D., Contreras, A., Sánchez, A., Luengo, C., Corrales, J.C., Morales, C.T., De La Fe, C., Guirao, I., Gonzalo, C., (2009). Detection limits of non-beta-lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests. Journal of Dairy Science. 92, 4200–4206.

Singh, N., Rajya, B.S., Mohanty, G.C., (1974). Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. The Cornell veterinarian. 64, 435-442.

Silanikove, N., Merin, U., Leiter, G., (2014a). On Effects Of Subclinical Mastitis And Stage Milk Quality In Goats. *Small Ruminant Research*. 122, 76–82.

Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F., Leiter, G., (2014b). Subclinical In Goats Is Associated With Upregulation Of Nitric Oxide-Derived Oxidative Stress That Causes Reduction Of Milk Antioxidative Properties And Impairment Of Its Quality. *Journal Of Dairy Science*. 97, 3449–3455.

Singh, N., Raiya, B.S., Mohanty, G.C., (1975). Pathology of *Mycoplasma agalactiae* induced granular vulvovaginitis (GVV) in goats. *The Cornell veterinarian*. 65(3), 363- 73.

Singh, Y., Garg, D.N., Kapoor, P.K., Mahajan, S.K. (2004). Isolation of *Mycoplasma bovoculi* from genitally diseased bovines and its experimental pathogenicity in pregnant guinea pigs. *Indian journal of experimental biology*. 42(9), 933-6.

Skapski, A., Hygonenq, M.C., Sagné, E., Guiral, S., Citti, C., Baranowski, E., (2011). Genome-scale analysis of *Mycoplasma agalactiae* loci involved in interaction with host cells. *PLoS One*. 6, e25291.

Spergser, J., Aurich, C., Aurich, J.E., Rosengarten, R., (2002). High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary microbiology*. 87,119-29.

Sprecher, D.J., Coe, P.H., Walker, R.D., (1999). Relationships among seminal culture, seminal white blood cells, and the percentage of primary sperm abnormalities in bulls evaluated prior to the breeding season. *Theriogenology*. 51(6),1197-206.

Stellrecht, K.A., Woron, A.M., Mishrik, N.G., Venezia, R.A., (2004). Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital *mycoplasmas*. *Journal of clinical microbiology*. 42, 1528-1533.

Stradaioli, G., Sylla, L., Mazzarelli, F., Zelli, R., Rawadi, G., Monaci, M., (1999). *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC identification by PCR in sperm of seminal vesiculitis-affected bulls. *Veterinary research*. 30(5),457-66.

Subramaniam, S., Bergonier, D., Poumarat, F., Capaul, S., Schlatter, Y., Nicolet, J., Frey, J., (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Molecular and cellular probes*. 12, 161–169.

Svenstrup, H.F., Fedder, J., Abraham-Peskir, J., Birkelund, S., Christiansen, G., (2003). *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Human reproduction*. 18(10), 2103-9.

Sylla, L., Stradaioli, G., Manuali, E., Rota, A., Zelli, R., Vincenti, L., Monaci, M., (2005). The effect of *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC of bovine

origin on *in vitro* fertilizing ability of bull spermatozoa and embryo development. *Animal reproduction science*. 85(1-2), 81-93.

Szeredi, L., Tenk, M., Dan, A., (2003). Infection of two goat herds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 50(4), 172–177.

Talavera, J., (1980). Estudio sobre la agalaxia contagiosa de la oveja y de la cabra en España. Identificación de tres especies del género *mycoplasma* cuyo origen corresponde a focos clínicamente diagnosticados de agalaxia contagiosa. Ministerio de Agricultura. Comunicaciones I.N.I.A. Serie: Higiene y sanidad animal 4.

Talavera, J. y Goncer, A., (1983). Contribución al estudio de la agalaxia contagiosa de la oveja y de la cabra en España. 2) Frecuencia de los agentes etiológicos. III Symposium Internacional de ordeño mecánico de pequeños rumiantes. Valladolid, España.

Taoudy, A., Johnson, D.W., Kheyyali, D., Kirchhoff, H., (1987). Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* in sheep after experimental infection. *Veterinary Microbiology*. 14, 137-144.

Tardy, F., Mercier, P., Solsona, M., Saras, E., & Poumarat, F., (2007). *Mycoplasma Mycoides* Subsp. *Mycoides* Biotype Large Colony Isolates From Healthy And Diseased Goats: Prevalence And Typing. *Veterinary Microbiology*. 121, 268–277.

Tardy, F., Maigre, L., Tricot, A., Poumarat, F., Nguyen, L., Le Grand, D., (2011). Comparison of isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* from asymptomatic and septicaemic goats. *Journal of Comparative Pathology*. 144, 70–77.

Tardy, F., Baranowski, E., Nouvell, L.X., Mick, V., Manso-Silván, L., Thiaucourt, F., Thébault, P., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., Blanchard, A., Garnier, A., Gibert, P., Game, Y., Poumarat, F., Citti, C., (2012). Emergence of atypical *Mycoplasma agalactiae* strains harboring a new prophage and associated with an alpine wild ungulate mortality episode. *Applied and Environmental Microbiology*. 78, 4659– 4668.

Taylor-Robinson, D., Addey, J.P., Hare, M.J., Dunlop, E.M., (1969). Mycoplasmas and "non-specific" genital infection. I. Previous studies and laboratory aspects. *The British journal of venereal diseases*. 45(4), 265-73.

Taylor, T.K., Bashiruddin, J.B., Gould, A.R., (1992). Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *International journal of systematic bacteriology*. 42(4), 593–601.

Thiaucourt, F. y Bölske, G., (1996). Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Revue Scientifique et Technique O.I.E.* 15, 1397-414.

Thrusfield, M., Ortega, C., De Blas, I., Noordhuizen, J.p., & Frankena, K., (2001). Win Episcopo 2.0: Improved Epidemiological Software For Veterinary Medicine. *Veterinary Record.* 148, 567–572.

Travassos, C., Benoît, C., Valas, S., Da Silva, A., Perrin, G. (1998). Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. *Veterinary researchVet.* 29, 579-584.

Travassos, C.E., Benoît, C., Valas, S., Da Silva, A.G., Perrin, G., (1999). Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research.* 32, 101-106.

Trichard, C.J., Jordaan, P., Prozesky, L., Jacobsz, E.P., Henton, M.M., (1993). The identification of *Mycoplasma mycoides mycoides* LC as the aetiological agent of balanoposthitis and vulvovaginitis in sheep in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research.Onderstepoort.* 60 (1), 29-37.

Todaro, M., Puleio, R., Sabelli, C., Scatassa, M.L., Console, A., Loria, G.R., (2015). Determination of milk production losses in Valle del Belice sheep following experimental infection of *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Research.* 123, 167–172.

Tola, S., Rizzu, P., Leori, G., (1994). A species-specific DNA probe for the detection of *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Microbiology.* 41(4), 355–361.

Tola, S., Idini, G., Manunta, D., Casciano, I., Rocchigiani, A.M., Angioi, A., Leori, G., (1996). Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. *FEMS microbiology letters.* 143(2–3), 259–265.

Tola, S., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Angioi, P.P., Rocchigiani, A.M. & Leori, G., (1996). Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology.* 51, 77–84.

Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Leori, G., (1997). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology.* 54, 17-22.

Tola, S., Manunta, D., Rocca, S., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Angioi, P.P., Leori, G., (1999). Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine.* 16, 2764–2768.

Tomazi, T., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Arcari, M.A., Dos Santos M.V., (2015). Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal Of Dairy Science.* 98, 1-8.

Valdivieso-García, A., Rosendal, S., Allen, O.B., (1989). Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* for cultured endothelial cells. Zentralblatt für Bakteriologie. 272 (2), 202-209.

Verbisck, G., González Candela, M., Galián, J., Cubero Pablo, M.J., Martín Atance, P., León Vizcaíno, L., (2008). Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* infection in free-ranging Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Andalusia, Southern Spain. Journal of Wildlife Disease. 44, 369–380.

Villalba, E.J., Poveda, J.B., Garrido, A., Garrido, F., Fernández, A., (1991). Inmunización de cabras contra *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* (LC) en un caso de agalaxia persistente. XIV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Pp. 377-381.

Villalba, E.J., Poveda, J.B., Fernandez, A., Rodriguez, J.L., Gutierrez, C., Gómez-Villamandos, J., (1992). An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Islands. The Veterinary record. 130(15), 330–331.

Villemot, J.M., Provost, A., Queval, R., (1962). Endotoxin from *Mycoplasma mycoides*. Nature. 193, 906-907.

Visser, I.J., Ter Laak, E.A., Jansen, H.B., (1999). Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. Theriogenology. 51(4), 689-97.

Walz, P.H., Mullaney, T.P., Render, J.A., Walker, R.D., Mosser, T., Baker, J.C., (1997). Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 9, 250–254.

Waage, S., Vatn, S., (2008). Individual animal risk factors for clinical mastitis in meat sheep in Norway. Preventive veterinary medicine. 87, 229-243.

Wise, K.S., Foecking, M.F., Röske, K., Lee, Y.J., Lee, Y.M., Madan, A., Calcutt, M.J., (2006). Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation-based phase variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster. Journal of Bacteriology. 188, 4926–4941, Erratum in: Journal of Bacteriology. 2006, 188, 6716–6717.

Zavagli, V., (1951). L'Agalactiae Contagieuse des brebis et des chèvres. Bulletin - Office international des épizooties. 36, 336-362.

Zeng, S.S., Escobar, E.N., (1996a). Factors affecting somatic cell count of goat milk throughout lactation: parity and milk production. In: Rubino, R. (Ed.), Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants. EAAP Publication No. 77, Wageningen Pers, Bella, Italy. September 25–27, 1994, pp. 157–160.

Zeng, S.S., Escobar, E.N., (1996b). Effects of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Small Ruminant Research*. 19, 169–175.

Ziv, G., y Soback, S., (1989). Pharmacotherapeutics of newer antibacterial agents in lactating ewes and goats: a review. In *Proc. 4th International Symposium on machine milking of small ruminants*, pp. 408-423. Edited by Eitam M. Tel Aviv, Lachamn-Printers, Ltd.

Zweifel, C., Muehlherr, J.E., Ring, M. & Stephan, R., (2005). Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminants' bulk-tank milk in Switzerland. *Small Ruminant Research*. 58, 63–70.