



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE VETERINARIA

Evaluación de la Susceptibilidad Antimicrobiana y del Tratamiento del Calostro para el Control de las Infecciones por *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

**Dña. Ana M<sup>a</sup> Paterna Morán**  
**2016**

*Animals don't hate,  
and we're supposed  
to be better than them.*

Elvis Presley





## INFORME JUSTIFICATIVO DE LOS DIRECTORES PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

D. Christian de la Fe Rodríguez y D. Antonio Sánchez López, profesores titulares del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, JUSTIFICAN que los artículos aquí mencionados están relacionados entre si y constituyen todos una unidad que formará parte de la Tesis Doctoral que Dña. Ana Paterna Morán, doctoranda del Grupo de Investigación de Sanidad de Rumiantes, tiene intención de defender próximamente en la modalidad de compendio de publicaciones.

**PATERNA, A., GÓMEZ-MARTÍN, A., AMORES, J., PRATS VD HAM, M., TATAY-DUALDE, J., CORRALES, J.C., DE LA FE, C., CONTRERAS, A., SÁNCHEZ, A.** 2013. Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino. *Anales de veterinaria de Murcia* 29, 23-37

**PATERNA, A., SÁNCHEZ, A., AMORES, J., GÓMEZ-MARTÍN, A., CORRALES, J.C., CONTRERAS, A., DE LA FE, C.** 2013. Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum. *The Veterinary Journal* 192, 263-265

**PATERNA, A., SÁNCHEZ A, GÓMEZ-MARTÍN A, CORRALES JC, DE LA FE C, CONTRERAS A, AMORES J.** 2013. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats. *Journal of Dairy Science* 96, 7073-6

**PATERNA, A., CONTRERAS, A., GÓMEZ-MARTÍN, A., AMORES, J., TATAY-DUALDE, J., PRATS-VAN DER HAM, M., CORRALES, J.C., SÁNCHEZ, A., DE LA FE, C.** 2014. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. *Small Ruminant Research* 121, 36-41.

**PATERNA, A., AMORES, J., GÓMEZ-MARTÍN, A., CORRALES, J.C., PRATS VD HAM, M., TATAY-DUALDE, J., CONTRERAS, A., DE LA FE, C., SÁNCHEZ, A.** 2015. Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en

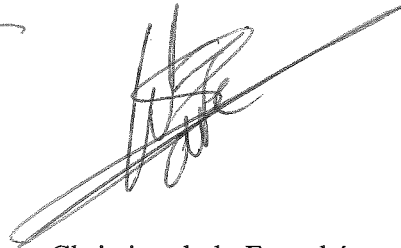
calostro caprino. Anales de Veterinaria de Murcia, publicación aceptada (I.S.S.N: 0213-5434).

**PATERNA, A., TATAY-DUALDE, J., AMORES, J., PRATS VD HAM, M., SÁNCHEZ, A., DE LA FE, C., CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., GÓMEZ-MARTÍN, A.** 2016. *In vitro* assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Aceptado para su publicación en The Veterinary Journal (doi: 10.1016/j.tvjl.2016.05.010.)

Y para que conste donde proceda, los directores de tesis lo firman en Murcia a 18 de Mayo de 2016.



Antonio Sánchez López



Christian de la Fe Rodríguez



## INFORME DEL DOCTORANDO

Dña. Ana M<sup>a</sup> Paterna Morán, doctoranda del Grupo de Investigación de Sanidad de Rumiantes del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia, expone mediante el presente informe que su labor en los siguientes artículos científicos, que formarán parte de su tesis doctoral, ha sido:

**PATERNA, A., CONTRERAS, A., GÓMEZ-MARTÍN, A., AMORES, J., TATAY-DUALDE, J., PRATS-VAN DER HAM, M., CORRALES, J.C., SÁNCHEZ, A., DE LA FE, C. 2014. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. *Small Ruminant Research* 121, 36-41.**

Revisión de la bibliografía y redacción del artículo

**PATERNA, A., SÁNCHEZ, A., AMORES, J., GÓMEZ-MARTÍN, A., CORRALES, J.C., CONTRERAS, A., DE LA FE, C. 2013. Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum. *The Veterinary Journal* 192, 263-265**

Diseño del estudio, ejecución de los análisis laboratoriales, análisis de los resultados y redacción del artículo.

**PATERNA, A., AMORES, J., GÓMEZ-MARTÍN, A., CORRALES, J.C., PRATS VD HAM, M., TATAY-DUALDE, J., CONTRERAS, A., DE LA FE, C., SÁNCHEZ, A. 2015. Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en calostro caprino. *Anales de veterinaria de Murcia*, publicación aceptada (I.S.S.N: 0213-5434).**

Diseño del estudio, ejecución de los análisis laboratoriales, análisis de los resultados y redacción del artículo.

**PATERNA, A., GÓMEZ-MARTÍN, A., AMORES, J., PRATS VD HAM, M., TATAY-DUALDE, J., CORRALES, J.C., DE LA FE, C., CONTRERAS, A., SÁNCHEZ, A. 2013. Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino. *Anales de veterinaria de Murcia* 29, 23-37**

Revisión de la bibliografía y redacción del artículo

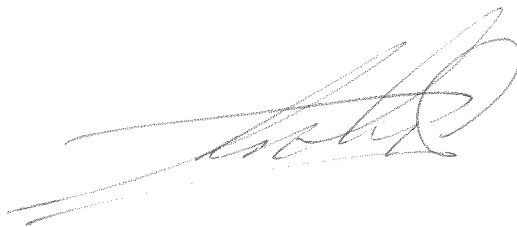
**PATERNA, A., SÁNCHEZ A, GÓMEZ-MARTÍN A, CORRALES JC, DE LA FE C, CONTRERAS A, AMORES J. 2013. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats. Journal of Dairy Science 96, 7073-6**

Diseño del estudio, ejecución de los análisis laboratoriales, análisis de los resultados y redacción del artículo.

**PATERNA, A., TATAY-DUALDE, J., AMORES, J., PRATS VD HAM, M., SÁNCHEZ, A., DE LA FE, C., CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., GÓMEZ-MARTÍN, A. 2016. In vitro assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. The Veterinary Journal, publicación aceptada (doi: 10.1016/j.tvjl.2016.05.010.)**

Diseño del estudio, ejecución de los análisis laboratoriales, análisis de los resultados y redacción del artículo.

Y para que conste donde proceda, los directores de tesis lo firman en Murcia a 18 de Mayo de 2016.



Antonio Sánchez López



Christian de la Fe Rodríguez

*CERTIFICADO DE ESTANCIA EN INSTITUCIÓN EXTRANJERA O  
ESPAÑOLA  
RESEARCH STAY CERTIFICATE IN A FOREIGN INSTITUTION*

**Datos personales/Personal particulars:**

Nombre/Name: PATERNA MORÁN, ANA MARÍA

DNI/National Identity Card: 53149651-D

Organismo de origen/Home Institution: UNIVERSIDAD DE MURCIA (Facultad de Veterinaria)

**Centro receptor/Host Institution:**

Nombre/Name ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA

Dirección/Address: VIA VIENNA 2, 07100. SASSARI

País/Country: ITALIA

**Persona responsable del centro receptor/Person in charge in the host institution:**

Nombre/Name SEBASTIANA TOLA

Dirección/Post VIA VIENNA 2, 07100. SASSARI

La presente es para certificar que la persona mencionada anteriormente ha cumplido su estancia en esta institución en las fechas:/This is to certify that the above mentioned person has performed a stay in this institution in the following dates:

Principio/From 1 de Octubre de 2013

Final/To 31 de Diciembre de 2013

Lugar y Fecha: Sassari, 21 de Diciembre de 2013

City and date:

Firma y sello / Signature & stamp

*Sebastiane Tola*





*CERTIFICADO DE ESTANCIA EN INSTITUCIÓN EXTRANJERA*  
*RESEARCH STAY CERTIFICATE IN A FOREIGN INSTITUTION*

**Datos personales/Personal particulars:**

Nombre/Name PATERNA MORÁN, ANA MARÍA  
DNI/National Identity Card 53149651-D  
Organismo de origen/Home Institution UNIVERSIDAD DE MURCIA

**Centro receptor/Host Institution:**

Nombre/Name ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA  
Dirección/Address VIA VIENNA 2, 07100 - SASSARI (SS)  
País/Country ITALIA

**Persona responsable del centro receptor/Person in charge at the host institution:**

Nombre/Name SEBASTIANA TOLA  
Dirección/Post VIA VIENNA 2, 07100 - SASSARI (SS)  
(Laboratorio Ricerca e Sviluppo)

La presente es para certificar que la persona mencionada anteriormente ha cumplido su estancia en esta institución en las fechas:/This is to certify that the above mentioned person has performed a stay in this institution in the following dates:

Principio/From 7 DE ENERO DE 2014  
Final/To 4 DE ABRIL DE 2014

Lugar y Fecha: Sassari, 4 de Abril de 2014  
City and date:

Firma y sello / Signature & stamp

*Sebastiane Tola*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
della Sardegna



ISTITUTO  
ZOOPROFILATTICO  
SPERIMENTALE  
DELLA SARDEGNA  
"G. Pegreffi"

SASSARI 29.06.2016

Prot. N. \_\_\_\_\_

A los encargados  
de la Universidad de Murcia

Dr.ssa Sebastiana Tola, Jefe del Laboratorio de "Investigación y Desarrollo" (Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Pegreffi" de Cerdeña), Italia  
INFORMA

Que la Tesis Doctoral titulada "Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana y del tratamiento del calostro para el control de las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*." realizada por **Ana M<sup>a</sup> Paterna Morán** en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia, reúne los requisitos de originalidad y calidad científica que avalan la idoneidad requerida para optar al grado de Doctor.

Para que conste, a los efectos de optar a la mención de Doctorado Internacional en virtud a la normativa de la Universidad de Murcia, firma el presente informe en Sassari (Italia) a 29 de junio 2016

Dr.ssa Sebastiana Tola

*Sebastiana Tola*

---

SEDE CENTRALE

SASSARI - Via Duca degli Abruzzi, 8  
Tel. 079/289200 Fax 079/272189  
CF/PI 00095630901

Direzione - Tel. 079/275040

Dipartimenti

Amministrativo  
Igiene Allevamenti  
e Prod. Zootec.  
Igiene Alimenti

Piani e Progetti Speciali  
Produzioni  
Sanità Animale  
Servizi Tecnologici

---

DIPARTIMENTI TERRITORIALI

CAGLIARI - Elmas, Zona Industriale  
Tel. 070/2135058 Fax 070/2135121

ORISTANO - Via Atene, Zona Industriale  
Tel. 0783/351003 Fax 0783/358931

NUORO - Via F.lli Kennedy, 2  
Tel. 0784/30331 Fax 0784/399006

Centro Territoriale  
Tortoli (NU) - Via Aresu, 2  
Tel./Fax 0782/624511

## COMENTARIOS ESPECÍFICOS:

La Tesis Doctoral titulada “Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana y del tratamiento del calostro para el control de las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.” realizada por **Ana M<sup>a</sup> Paterna Morán** en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia consiste de una serie de seis estudios, cada uno de los cuales ha sido publicado en una revista científica internacional.

La temática del trabajo tiene alta importancia para la economía del sector caprino, igual que para la salud de los animales afectados y los rebaños en general. La investigación de la agalaxia se ha realizado en forma sistemática, lógica y eficiente. El revisor destaca los siguientes hallazgos de este trabajo como los más importantes en el contexto europeo:

- ✚ Las implicaciones sanitarias del manejo del colostro en el ganado caprino,
- ✚ La demostración de la viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en el calostro caprino sometido a tratamiento térmico o a la adición de dodecilsulfato de sodio,
- ✚ La evaluación de la susceptibilidad *in vitro* a diferentes antimicrobianos de aislamientos caprinos de *Mycoplasma agalactiae* obtenidos de animales asintomáticos o con sintomatología típica de agalaxia contagiosa,
- ✚ La importancia de un sistema de monitoreo diagnóstico para animales que entran un rebaño,
- ✚ La demostración de la eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en colostro caprino,
- ✚ La evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos caprinos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

El mismo hecho de aceptación de los manuscritos por revistas de alta reputación, que se encuentran entre las más prestigiosas de medicina veterinaria, también confirma la alta calidad del trabajo realizado por el doctorando.

Sebastiana Tola

Dr. Xavier Nouvel, profesor asistente del Servicio de Patología de la Reproducción de la Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Francia) y miembro del grupo de investigación de patogénesis de las micoplasmosis de ruminantes en la unidad ENVT, INRA 1225 sita en dicha institución

## INFORMA

Que la Tesis Doctoral titulada “Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana y del tratamiento del calostro para el control de las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*” realizada por Dña. Ana María Paterna Morán en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, reúne los requisitos de originalidad y calidad científica que avalan la idoneidad requerida para optar al grado de Doctor.

Para que conste, a los efectos de optar a la mención de Doctorado Internacional en virtud a la normativa de la Universidad de Murcia, firma el presente informe en Toulouse (Francia) a 21 de junio de 2016.



Dr. Xavier NOUVEL, DVM, PhD  
Pathologie de la Reproduction,  
Département Elevage et Produits, Santé Publique Vétérinaire  
Unité Mixte de Recherche INRA,ENVT 1225 "Interactions Hôtes-Agents Pathogènes" (IHAP)  
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Ms. Ana María Paterna Morán is presenting a thesis entitled "Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana y del tratamiento del calostro para el control de las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*" in order to obtain the degree of Doctor of the University of Murcia.

Ms. Ana María Morán Paterna has conducted her doctoral thesis work in the Research Group of Ruminant Health of the Veterinary Faculty of the University of Murcia, under the supervision of Dr C. de la Fé and Dr A. Rodríguez Sánchez López.

The manuscript presented is a compilation of four articles published as first author, between 2013 and 2016, in international journals renowned in the field of veterinary medicine (impact factors from 1.125 to 2.573); In addition, 2 articles were published in the journal "Annals of Veterinaria de Murcia" between 2013 and 2015.

These publications, reviewed and validated by the international scientific community, would be alone sufficient to consider that Ms. Ana María Morán Paterna deserves the title of Doctor of the University of Murcia with the “International Doctor” mention.

Ms. Ana María Morán Paterna is also author of 9 oral or poster presentations, 8 in international scientific manifestations and one in a Spanish national conference. She also participates in one Italian national congress with an oral presentation. Finally, Ms. Ana María Morán Paterna is also co-author of 11 papers in international scientific journals.

In the thesis manuscript, the scientific links between articles are introduced by the first pages containing (i) a summary, (ii) the objectives of the project which are clearly exposed, (iii) articles highlights, and (iv) conclusions which are given point by point in a very practical manner.

Yet, I feel the manuscript was missing a deeper explanation on how the papers are connected and a thread that would have taken me through the work. Thus, the following would have been appreciated: an expanded general introduction leading to the various questions, transitions between different parts and overall a general discussion embodying the results, comparing them with available current knowledge and opening on future research perspectives. For example, the part “Published work” leads to an appendix on “publications in progress” in which only abstracts are presented. These parts could have been developed to bring a more general view on Ms. Ana María Morán Paterna scientific problematic and propositions for new scientific concepts or questions to be addressed in the future.

Notwithstanding these remarks, there is no doubt regarding the quality, the abundance of the scientific production and the merits of Mrs. Ana María Morán Paterna. Therefore, I am strongly in favour of Mrs. Ana María Morán Paterna receiving the title of Doctor of the University of Murcia.

**INDEX**

<b>I. INTRODUCTION</b>	1
<b>II. SUMMARY</b>	5
II.1. Objectives.	8
II.2. Study 1. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats.	10
II.3. Study 2. Sanitary involvements of management of colostrum in caprine herds	11
II.4. Study 3. Survival of <i>Mycoplasma agalactiae</i> and <i>Mycoplasma mycoides</i> subspecies <i>capri</i> in heat treated goat colostrum.	12
II.5. Study 4. Efficacy of sodium dodecyl sulfate for the inactivation of mycoplasmas in goat colostrum.	13
II.6. Study 5. <i>In vitro</i> antimicrobial susceptibility of <i>Mycoplasma agalactiae</i> strains isolated from dairy goats	14
II.7. Study 6. <i>In vitro</i> assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> .	15
II.8. Conclusions	16
<b>III. RESUMEN</b>	18
III.1. Objetivos.	21
III.2. Estudio 1. El diagnóstico de la mamitis y la agalaxia contagiosa en cabras lecheras.	23
III.3. Estudio 2. Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino.	24
III.4. Estudio 3. Supervivencia de <i>Mycoplasma agalactiae</i> y <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> en calostro caprino sometido a tratamiento térmico.	25
III.5. Estudio 4. Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en calostro caprino.	26
III.6. Estudio 5. Susceptibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> de cepas de <i>Mycoplasma agalactiae</i> aisladas de cabras lecheras.	27
III.7. Estudio 6. Evaluación <i>in vitro</i> de la susceptibilidad a antimicrobianos de aislamientos caprinos de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> .	28

III.8. Conclusiones	29
<b>IV. PUBLISHED WORKS</b>	31
IV.1. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats (2013). Paterna, A., Contreras, A., Gómez-Martín, A., Amores, J., Tatay-Dualde, J., Prats-van der Ham, M., Corrales, J.C., Sánchez, A., De la Fe, C. Small Ruminant Research 121: 36-41.	32
IV.2. Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino (2013). Paterna, A., Gómez-Martín, A., Amores, J., Prats-van der Ham, M., Tatay-Dualde, J., Corrales, J.C., De la Fe, C., Contreras, A., Sánchez, A. Anales de Veterinaria de Murcia 29: 23-37.	33
IV.3. Survival of <i>Mycoplasma agalactiae</i> and <i>Mycoplasma mycoides</i> subspecies <i>capri</i> in heat treated goat colostrum (2012). Paterna, A., Sánchez, A., Amores, J., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Contreras, A., De la Fe, C. The Veterinary Journal 196: 263-265.	34
IV.4. Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en calostro caprino (2015). Paterna, A., Amores, J., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Prats-van der Ham, M., Tatay-Dualde, J., Contreras, A., De la Fe, C., Sánchez, A. Anales de Veterinaria de Murcia 30: 77-84.	35
IV.5. <i>In vitro</i> antimicrobial susceptibility of <i>Mycoplasma agalactiae</i> strains isolated from dairy goats (2013). Paterna, A., Sánchez, A., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., De la Fe, C., Contreras, A., Amores, J. Journal of Dairy Science 96: 7073-7076.	36
IV.6. <i>In vitro</i> assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (2016). Paterna, A., Tatay-Dualde, J., Amores, J., Prats-van der Ham, M., Sánchez, A., De la Fe, C., Contreras, A., Corrales, J.C., Gómez-Martín, A. The Veterinary Journal 214: 96-101.	37
<b>V. APPENDIX</b>	38
V.I. Publications in progress	39
V.I.1. Mycoplasma excretion in reproductive male and female goats.	39
V.I. 2. In-herd genetic diversity of <i>Mycoplasma agalactiae</i> goat isolates.	40
V.II. Communications to congresses derivated from the present doctoral thesis.	43
V.II.1. Communications to international congresses.	43



V.II.2. Communications to national congresses.	44
V.III. Conferences.	44
<b>VI. ABBREVIATIONS</b>	45
<b>VII. ACKNOWLEDGEMENTS</b>	47

I. INTRODUCTION

## I. INTRODUCTION.

The present doctoral thesis is presented as a compendium of publications, and the PhD student aims for the mention of “International Doctor”, in agreement with the established normative by resolution R-310/2015 of the Rector of the University of Murcia. The thesis is formed by four papers published in international journals indexed in the international data base *Journal Citation Reports* (2014), belonging to the categories *Veterinary Sciences* and *Agriculture, dairy and animal science*. Two scientific papers published in the national journal *Anales de Veterinaria de Murcia* are also included.

All these papers constitute a scientific unit, in the context of the research and development of prevention and control programmes for contagious agalactia (CA) of small ruminants, a disease with serious socio-economic and sanitary consequences, mainly in dairy herds. The direct effects on production together with the tendency of the infection to become chronic lead to hardly calculable losses in the affected herds. Due to the lack of vaccines conferring total protection, and the incomplete efficacy of chemotherapy treatments, it is nowadays impossible to achieve the microbiological cure, being management measures and antimicrobial treatments the best options for the control of the infection. This complicates the management of the disease, specially the clinical outbreaks, and requires great material and economical efforts from the farmers. Moreover, the massive and inadequate use of antimicrobials to control the symptoms supposes a risk for public health, both for the presence of residues in milk and for the appearance of antimicrobial resistant bacterial strains.

The four papers published in international journals that form the thesis are the following:

-Authors: **Paterna, A.**, Sánchez, A., Amores, J., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Contreras, A., De la Fe, C.  
-Title: Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum.  
-Journal: The Veterinary Journal.  
-Publication date: September 2012.  
-Volume: 196.  
-Pages: 263-265.  
-Journal Citation Reports (2012) category: Veterinary Sciences.  
-Impact factor: 2,424.  
-Position: 4 of 143.  
-Five-year impact factor: 2,656.  
-URL:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312003966>

-Authors: **Paterna, A.**, Contreras, A., Gómez-Martín, A., Amores, J., Tatay-Dualde, J., Prats-van der Ham, M., Corrales, J.C., Sánchez, A., De la Fe, C.  
-Title: The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats.  
-Journal: Small Ruminant Research.  
- Publication date: December 2013.  
-Volume: 121.  
-Pages: 36-41  
-Journal Citation Reports (2013) category: Agriculture, dairy and animal science.  
-Impact factor: 1,099.  
-Position: 18 of 52.  
-Five-year impact factor: 1,342.  
-URL:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448813003933>

-Authors: **Paterna, A.**, Sánchez, A., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., De la Fe, C., Contreras, A., Amores, J.  
-Title: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats.  
-Journal: Journal of Dairy Science.  
- Publication date: July 2013.  
-Volume: 96.  
-Pages: 7073-7076.  
-Journal Citation Reports (2013) category: Agriculture, dairy and animal science.  
-Impact factor: 2,550.  
-Position: 2 of 52.  
-Five-year impact factor: 3,080.  
-URL:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213006164>

-Authors: **Paterna, A.**, Tatay-Dualde, J., Amores, J., Prats vd Ham, M., Sánchez, A., De la Fe, C., Contreras, A., Corrales, J.C., Gómez-Martín, A.  
-Title : *In vitro* assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.  
-Journal: The Veterinary Journal.  
- Publication date: August 2016.  
-Volume: 214.  
-Pages: 96-101.  
-Journal Citation Reports (2015) category: Veterinary Sciences.  
-Impact factor: 1,680.  
-Position: 26 of 137.  
-Five-year impact factor: 1,995.  
-URL:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023316300557>

The references to the national articles included in the present thesis are the following:

-Authors: **Paterna, A.**, Gómez-Martín, A., Amores, J., Prats-van der Ham, M., Tatay-Dualde, J., Corrales, J.C., De la Fe, C., Contreras, A., Sánchez, A.  
-Title: Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino.  
- Journal: Anales de Veterinaria de Murcia.  
-Publication year: 2013.  
-Volume: 29.  
-Pages: 23-37.  
-I.S.S.N: 0213-5434.  
-URL: <http://revistas.um.es/analesvet/article/view/208961/166921>

-Authors: **Paterna, A.**, Amores, J., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Prats-van der Ham, M., Tatay-Dualde, J., Contreras, A., De la Fe, C., Sánchez, A.  
-Title: Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en calostro caprino.  
-Journal: Anales de Veterinaria de Murcia.  
- Publication year: 2014.  
-Volume: 30  
-Pages: 77-84  
-I.S.S.N: 0213-5434.

**II. SUMMARY**

## II. SUMMARY

The usefulness of the different diagnostic methods of mastitis in dairy goats, as well as the conditions of the sampling and the analytical conditions of the sample, were addressed in the review article published in the Small Ruminant Research journal, which appears as the first paper of this doctoral thesis (Study 1). In the context of this review, it is also emphasized the importance of the epidemiological status of each herd with respect to CA, a disease which would be the main objective of this thesis. Specifically, the published works focused on the efficacy of some control methods of this disease in goat herds, such as the management of the colostrum intake and the antimicrobial therapy against the two main etiological agents of caprine CA.

Concerning the conditions of the colostrum intake, a literature review was performed, in which they were considered species of the genus *Mycoplasma* spp. and other agents able to infect the offspring through this via, and the methods employed for their inactivation considering their effects over colostrum composition (Study 2). Amongst inactivation methods for pathogens in colostrum, it has been commonly employed the heat treatment, as it has been proved its efficacy in the neutralization of different bacterial and viral species, though its effect over CA causing mycoplasmas in goat colostrum was unknown. For this reason, it was evaluated the viability of *Mycoplasma agalactiae* (Ma) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), the main agents of this disease in the goat, in goat colostrum subjected to different heat treatments (Study 3). Nevertheless, it is known that the application of heat exerts a harmful effect over the immunological properties of colostrum, for what alternatives to this method have been suggested. One of them, the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS), has demonstrated to be effective for the inactivation of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) in infected human colostrum, and for the reduction

of the total bacterial load in goat colostrum, being innocuous for the animals. So, in the Study 4 it was evaluated the viability of Ma and Mmc in goat colostrum treated with SDS.

With regard to the antimicrobial treatment of CA, the scarce studies of sensitivity of the mycoplasma species involved in this syndrome, together with the recent appearance of resistances in other species of veterinary concern, motivated the development of studies 5 and 6. In these studies it was assessed the *in vitro* susceptibility of Ma and Mmc to different antimicrobials. In the case of Mmc, the study was also complemented with the comparison of two antimicrobial susceptibility determining methods and with the evaluation of potential genetic mutations in quinolone resistance determining regions.

The correct diagnosis of CA depending on the epidemiological status of each herd, the hypothesis that colostrum supposes the main source of contagion of the disease to the replacement animals, and the need to know the most effective antimicrobials against its causal agents, motivated the objectives of the present doctoral thesis.



### III.1. Objectives

#### FIRST:

To review and discuss the validity of the available diagnostic methods for caprine mastitis and contagious agalactia in dairy goats, according to the epidemiological situation of the herds.

#### SECOND:

To review and explain the goat pathogens potentially transmissible through the colostrum intake, the available methods for their inactivation and their effects over the quality of colostrum.

#### THIRD:

To study the viability of *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat colostrum subjected to heat treatment or added with sodium dodecyl sulfate.

#### FOURTH:

To study *in vitro* the antimicrobial susceptibility to different antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma agalactiae* obtained from asymptomatic animals or showing signs of contagious agalactia.

#### FIFTH:

To study *in vitro* the antimicrobial susceptibility to different antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* obtained from different anatomic locations

SIXTH:

To compare the results of antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* caprine isolates, obtained by two different methods.

SEVENTH:

To study the presence of mutations in quinolone resistance determining regions in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* field isolates showing a low susceptibility to these compounds.

## II.2. Study 1. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats.

This article reviews the diagnosis of mastitis in dairy goats. The benefits and shortcomings are discussed of both indirect diagnostic methods, such as the California mastitis test and somatic cell counts, and direct strategies, such as bacteriologic isolation and PCR identification. The important role of mycoplasmas in causing mastitis in regions where CA is endemic makes their detection mandatory in routine diagnostic practice, despite complicating and lengthening protocols. In this context, we discuss both the conditions to be met prior to sampling and the analytical conditions of the sample along with the features of each diagnostic method.

### II.3. Study 2. Sanitary involvements of management of colostrum in caprine herds.

Colostrum represents the first source of immunity for the ruminants, and thus determines its resistance to disease during the first hours of life. However, colostrum intake could be itself the way of transmission of several diseases, as paratuberculosis, caprine arthritis-encephalitis, or micoplasmosis like CA. This risk could be avoided by means of an artificial rearing program which should include correct management practices for colostrum. Between them, the treatment of colostrum represents a critical point. In this sense, thermic treatments have been used to sanitise colostrum, showing different results about microorganism viability. Nevertheless, it should be considered the negative effect of these treatments over nutritional components of colostrum, particularly the loss of immunoglobulins. As an alternative to thermic treatments, there have been experimentally assayed other methods as the addition of sodium SDS, which inactivates HIV-1 in breast milk, and others as liophilization or high pression methods. In this works, apart from the effect of the treatment should be also taken into account its economical viability and on-farm feasibility.

II.4. Study 3. Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum.

The viability of Ma and Mmc was assessed in goat colostrum treated at different temperatures. Samples of colostrum were inoculated with reference strains of Ma (PG2) and Mmc (PG3) and heated at 56 °C or 60 °C for 0, 30, 60, 90 or 120 min. Viable colonies of Ma were recovered after all treatments and there was a significant reduction in the concentration of viable Ma after 30 min at 56 °C and 60 °C. No viable colonies of Mmc were observed after 60 min at 60 °C.

II.5. Study 4. Efficacy of sodium dodecyl sulfate for the inactivation of mycoplasmas in goat colostrum.

In small ruminant herds chronically affected with CA, replacement animals acquire the infection by suckling the milk and colostrum of infected dams that show no symptoms of the disease. As an alternative to traditional heat treatments such as pasteurisation, this study examines the effect of different concentrations of SDS on the viability of Ma and Mmc in goat colostrum. After the treatment and before incubating contaminated colostrum samples, SDS was removed or not from the samples to assess the effect of prolonged treatment during the incubation period. Ten minutes of treatment with 0.1% SDS were ineffective against both species of mycoplasma. When SDS was used at 1%, no growth was observed when the detergent was present during the incubation period yet viable colonies appeared when SDS was removed just before this period. Our findings indicate that the duration of colostrum SDS treatment is critical for its inactivation effect on these mycoplasmas.

II.6. Study 5. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats.

This study examined the susceptibility to several antimicrobials of 28 isolates of Ma obtained from goats in a region (south-eastern Spain) where CA is endemic. For each isolate, the minimum inhibitory concentration (MIC) against 12 antimicrobials of the quinolone, macrolide, aminoglycoside and tetracyclines family was determined. The antimicrobials with the lowest MIC were enrofloxacin, ciprofloxacin, tylosin and doxycycline, all with MIC<sub>90</sub> (concentration at which growth of 90 % of the isolates is inhibited) < 1 µg/mL. Norfloxacin (a quinolone) showed a wide MIC range (0.1–12.8 µg/mL) suggesting a resistance mechanism towards this antimicrobial not elicited by enrofloxacin or ciprofloxacin (to other quinolones tested). Erythromycin showed the highest MIC<sub>90</sub> such that its use against Ma is not recommended. Finally, Ma isolates obtained from goat herds with clinical symptoms of contagious agalactia featured higher MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> (concentration at which growth of 50 % of the isolates is inhibited) values for many of the antimicrobials compared with isolates from asymptomatic animals. The relationship between use of the extensive use of antimicrobials in herds with clinical CA and variations in MIC values requires further study.

II.7. Study 6. *In vitro* assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

The MIC and minimum mycoplasmacidal concentration (MMC) of 17 antimicrobials against 41 Spanish caprine isolates of Mmc obtained from different specimens (milk, external auricular canal and semen) were determined using a liquid microdilution method. For half of the isolates, the MIC was also estimated for seven of the antimicrobials using an epsilometric test (ET), in order to compare both methods and assess the validity of ET. Mutations in genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* conferring fluoroquinolone resistance, which have been recently described in Mmc, were investigated using PCR.

The anatomical origin of the isolate had no effect on its antimicrobial susceptibility. Moxifloxacin and doxycycline had the lowest MIC values. The rest of the fluoroquinolones studied (except norfloxacin), together with tylosin and clindamycin, also had low MIC values, although the MMC obtained for clindamycin was higher than for the other antimicrobials. For all the aminoglycosides, spiramycin and erythromycin, a notable level of resistance was observed. The ET was in close agreement with broth microdilution at low MICs, but not at intermediate or high MICs. The analysis of the genomic sequences revealed the presence of an amino acid substitution in codon 83 of the gene *gyrA*, which has not been described previously in Mmc.



## II.8. Conclusions

### FIRST

The pasteurization of goat colostrum at 56 °C or 60 °C significantly reduces the concentration of *Mycoplasma agalactiae*, and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* is inactivated after 60 minutes at 60 °C.

### SECOND

The treatment of goat colostrum with sodium dodecyl sulfate at 0,1 % or 1 % for 10 minutes is insufficient to achieve the inactivation of *Mycoplasma agalactiae* or *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

### THIRD

The most effective antimicrobials against *Mycoplasma agalactiae in vitro* are fluoroquinolones, tetracyclines and macrolides, with the exception of erythromycin and spyramicin in the latter group, to which it seems to be resistant.

### FOURTH

*Mycoplasma agalactiae* isolates obtained from animals with symptoms of contagious agalactia feature higher MIC<sub>90</sub> values for most of the antimicrobials, with respect to those obtained from asymptomatic animals.

### FIFTH

Enrofloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, danofloxacin, moxifloxacin, doxycycline, tylosin and clindamycin are the most effective agents *in vitro* against

*Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Aminoglycosides, spiramycin and erithromycin seem not to be useful in the treatment of contagious agalactia caused by *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

#### SIXTH

The epsilometric test estimates the minimum inhibitory concentration in good agreement with the microdilution method for those antimicrobials with a low minimum inhibitory concentration, but the agreement decreases when this value, obtained by means of the microdilution method, is intermediate or high.

#### SEVENTH

For the first time, it is confirmed the presence of mutations in quinolone resistance determining regions of the gene *gyrA* of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* field isolates.

III. RESUMEN

### III. RESUMEN.

La validez de los distintos métodos diagnósticos de mamitis en cabras lecheras, así como las condiciones previas al muestreo y las condiciones analíticas de la muestra, fueron abordadas en el artículo de revisión publicado en la revista *Small Ruminant Research* y que figura como primer artículo de la presente tesis doctoral (Estudio 1). En el contexto de dicha revisión, además se hace especial hincapié en la situación epidemiológica de cada rebaño respecto a la agalaxia contagiosa (AC), enfermedad que sería el principal objeto de estudio de esta tesis. En concreto, los trabajos publicados se centraron en la eficacia de algunas medidas de control de esta enfermedad en el ganado caprino, como lo son el manejo del encalostamiento y el uso de la terapia antimicrobiana frente a las dos principales especies causantes de AC en esta especie de abasto.

Respecto a las condiciones del encalostamiento, se realizó una revisión bibliográfica (Estudio 2) donde se consideraron, además de especies del género *Mycoplasma* spp., otros agentes susceptibles de transmitirse a la descendencia a través de esta vía, los métodos empleados para su inactivación y sus efectos sobre la composición del calostro. Dentro de los métodos de inactivación de patógenos en calostro, comúnmente se han empleado los tratamientos térmicos, ya que han demostrado ser eficaces en el caso de diversas especies bacterianas y víricas, si bien no era conocido su efecto sobre los micoplasmas asociados a la AC en calostro caprino. Por ello, se evaluó la viabilidad de Ma y Mmc, principales agentes de la enfermedad en la cabra, en calostro caprino sometido a diferentes tratamientos térmicos (Estudio 3). No obstante, se sabe que la aplicación de calor ejerce un efecto nocivo sobre las propiedades inmunológicas del calostro, por lo que se han planteado alternativas a este método. Una de ellas, la adición al calostro de dodecil sulfato de sodio (DSS), ha

demostrado ser eficaz para la inactivación del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) en leche de madres infectadas, y para disminuir la carga bacteriana total del calostro caprino, siendo inocuo para los animales. Por ello, en el Estudio 4 se evaluó la viabilidad de Ma y Mmc en calostro caprino tratado con dodecil sulfato de sodio.

Respecto al tratamiento con antimicrobianos de la AC, los escasos estudios de sensibilidad de las especies de micoplasmas implicadas en este síndrome, junto con la reciente aparición de resistencias en otras especies de interés veterinario, motivaron el desarrollo de los estudios 5 y 6. En estos, se evaluó la sensibilidad *in vitro* de Ma y Mmc a distintos antimicrobianos. En el caso de Mmc, además se complementó el estudio con la comparación de dos métodos de determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos y la evaluación de posibles mutaciones en regiones determinantes de resistencia a quinolonas.

El correcto diagnóstico de la AC en función de la situación epidemiológica de cada rebaño, la hipótesis de que el calostro supone la principal fuente de contagio de la enfermedad a la cría, y la necesidad de conocer los antimicrobianos más efectivos frente a sus agentes causales, motivaron los objetivos de la presente tesis doctoral.

### III.1. Objetivos

#### PRIMERO:

Realizar una revisión bibliográfica donde se discuta la validez de los métodos diagnósticos disponibles para las mamitis caprinas y agalaxia contagiosa en cabras lecheras en función de la situación epidemiológica de los rebaños.

#### SEGUNDO:

Realizar una revisión donde se expongan los patógenos del ganado caprino potencialmente transmisibles mediante la ingestión del calostro, así como los métodos disponibles para su inactivación y las consecuencias que estos tienen sobre la calidad del calostro.

#### TERCERO:

Estudiar la viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en el calostro caprino sometido a tratamiento térmico o a la adición de dodecil sulfato de sodio.

#### CUARTO:

Evaluar la susceptibilidad *in vitro* a diferentes antimicrobianos de aislamientos caprinos de *Mycoplasma agalactiae* obtenidos de animales asintomáticos o con sintomatología típica de agalaxia contagiosa.

#### QUINTO:

Evaluar la susceptibilidad *in vitro* a diferentes antimicrobianos de aislamientos caprinos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* obtenidos de diferentes localizaciones anatómicas.

SEXTO:

Comparar los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos caprinos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* obtenidos mediante dos métodos diferentes.

SÉPTIMO:

Estudiar la presencia de mutaciones en regiones determinantes de resistencia a quinolonas en aislamientos de campo de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* con baja susceptibilidad a estos compuestos.

### III.2. Estudio 1. El diagnóstico de la mamitis y la agalaxia contagiosa en el caprino lechero.

Este artículo hace una revisión sobre el diagnóstico de la mamitis en cabras lecheras. Se discuten las ventajas y limitaciones de los métodos indirectos, como el test de California o el recuento de células somáticas, y de los métodos directos como el aislamiento microbiológico o la identificación mediante PCR. El importante papel de los micoplasmas como causa de mamitis en regiones donde la AC es endémica, hace que su detección sea de obligado cumplimiento en la práctica diagnóstica rutinaria, a pesar de que supone la aplicación de protocolos lentos y complicados. En este contexto, discutimos las condiciones del muestreo en función del objetivo del estudio y estado sanitario del rebaño, las condiciones analíticas de la muestra y las características de cada método diagnóstico.



### III.3. Estudio 2. Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino.

El calostro supone la primera fuente de inmunidad para el rumiante, y por tanto determina su resistencia a enfermedades durante las primeras horas de vida. No obstante, la ingesta de calostro puede suponer en sí misma la vía de transmisión de diversas enfermedades, como la paratuberculosis, la artritis-encefalitis caprina o la AC. Este riesgo puede evitarse siguiendo un régimen de lactancia artificial con unas adecuadas pautas de manejo de este calostro. Entre dichas pautas, el tratamiento del calostro supone un punto crítico. En este sentido, se han empleado los tratamientos térmicos para higienizar el calostro, observándose resultados diversos en la viabilidad de distintos microorganismos. Al mismo tiempo, se debe considerar el efecto negativo del calor sobre la composición nutricional del calostro, principalmente la pérdida de inmunoglobulinas. Como alternativa a los tratamientos térmicos, a nivel experimental, se han empleado métodos como la adición de DSS, capaz de inactivar el VIH-1 en leche, y otros procesos como la liofilización o el uso de altas presiones. Previamente a la aplicación práctica de las diferentes opciones de tratamiento del calostro se deberá considerar su viabilidad económica y su factibilidad en la explotación.

III.4. Estudio 3. Viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subespecies *capri* en calostro caprino sometido a tratamiento térmico.

Se evaluó la viabilidad de Ma y Mmc en calostro caprino tratado a diferentes temperaturas. Las muestras de calostro fueron inoculadas con las cepas de referencia de Ma (PG2) y Mmc (PG3), y calentadas a 56 °C o 60 °C durante 0, 30, 60, 60 y 120 minutos. Se recuperaron colonias viables de Ma después de todos los tratamientos, aunque hubo una reducción significativa en la concentración de esta especie después de 30 minutos a 56 °C o 60 °C. No se observaron colonias viables de Mmc después de 60 minutos a 60 °C.

### III.5. Estudio 4. Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en calostro caprino.

En los rebaños de pequeños rumiantes crónicamente afectados de AC, los animales de reposición adquieren la infección a través de la ingestión de leche y calostro procedente de hembras infectadas que no muestran síntomas de la enfermedad. Como alternativa a los tradicionales métodos térmicos como la pasteurización, este estudio examina el efecto de diferentes concentraciones de DSS sobre la viabilidad de Ma y Mmc en calostro caprino. Posteriormente al tratamiento y antes de incubar las muestras de calostro contaminado, el DSS fue extraído o no de las muestras para evaluar el efecto de la prolongación del tratamiento durante el periodo de incubación. El tratamiento durante diez minutos con DSS al 0,1% fue inefectivo contra ambas especies de micoplasmas. Tratando el calostro con DSS al 1% no se observó crecimiento cuando el detergente estuvo presente durante el periodo de incubación, mientras que se mantuvo la viabilidad de los micoplasmas cuando el DSS fue extraído justo antes de este periodo. Nuestros hallazgos indican que la duración del tratamiento del calostro con DSS es crítico para su efecto de inactivación sobre estos micoplasmas.

III.6. Estudio 5. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Mycoplasma agalactiae* aisladas de cabras lecheras.

Este estudio examinó la susceptibilidad a varios antimicrobianos de 28 aislamientos de Ma obtenidos de cabras en una región (sureste de España) donde la AC es endémica. Para cada aislamiento, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 12 antimicrobianos de la familia de las quinolonas, macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas. Los antimicrobianos con la CMI más baja fueron la enrofloxacina, ciprofloxacina, tilosina y doxiciclina, todas con una CMI<sub>90</sub> (concentración a la que son inhibidos el 90 % de los aislamientos) < 1 µg/ml. La norfloxacina (una quinolona) mostró un amplio rango de CMI (0,1-12,8 µg/ml), sugiriendo la existencia de un mecanismo de resistencia a este microorganismo, no manifestado por la enrofloxacina y ciprofloxacina (las otras quinolonas estudiadas). La eritromicina mostró la CMI<sub>90</sub> más alta, por lo que su uso contra Ma no está recomendado. Finalmente, los aislamientos de Ma obtenidos de cabras con signos de AC mostraron mayores valores de CMI<sub>90</sub> y CMI<sub>50</sub> (concentración a la que son inhibidos el 50 % de los aislamientos) para algunos de los antimicrobianos, en comparación con los aislamientos de animales asintomáticos. La relación entre el uso masivo de antimicrobianos en rebaños con clínica de AC y las variaciones en la CMI requieren un estudio más profundo.

### III.7. Estudio 6. Evaluación *in vitro* de la susceptibilidad a antimicrobianos de aislamientos caprinos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

La CMI y concentración mínima micoplasmacida (CMM) de 17 antimicrobianos para 41 aislamientos españoles de Mmc obtenidos de diferentes muestras (leche, conducto auditivo externo y semen) fue determinada mediante un método de microdilución en medio líquido. Para la mitad de los aislamientos, la CMI también se determinó para 7 antimicrobianos usando un test epsilométrico (TE), con el objetivo de comparar ambos métodos y evaluar la validez del TE. Se investigó, mediante PCR, la presencia de mutaciones recientemente descritas en Mmc que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*.

El origen anatómico del aislamiento no tuvo efecto significativo en su susceptibilidad antimicrobiana. La moxifloxacina y doxiciclina tuvieron los valores más bajos de CMI. El resto de las fluoroquinolonas estudiadas (excepto la norfloxacina), junto con la tilosina y la clindamicina, también presentaron valores bajos de CMI, aunque la CMM de la clindamicina fue mayor que para los otros antimicrobianos. Para todos los amiglucósidos, la espiramicina y la eritromicina, se observó un notable grado de resistencia. El TE presentó concordancia con el método de microdilución a CMIs bajas, pero no con valores intermedios o altos de CMI. El análisis de las secuencias genómicas reveló la presencia de la sustitución de un aminoácido en el codón 83 del gen *gyrA* que no ha sido previamente descrita en Mmc.

### III.8. Conclusiones

#### PRIMERA

La pasteurización del calostro caprino a 56 °C o 60 °C reduce significativamente la concentración de *Mycoplasma agalactiae*, y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* se inactiva tras el tratamiento a 60 °C durante 60 minutos.

#### SEGUNDA

El tratamiento del calostro caprino con dodecil sulfato de sodio al 0,1 % o al 1 % durante 10 minutos es insuficiente para conseguir la inactivación de *Mycoplasma agalactiae* o *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

#### TERCERA

Los antibióticos que se muestran más eficaces frente a *Mycoplasma agalactiae* son las fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos, exceptuando dentro de este último grupo la estreptomina y la tilosina, a los que se parece ser resistente.

#### CUARTA

Los aislamientos de *Mycoplasma agalactiae* obtenidos de animales con clínica de agalaxia contagiosa presentan valores más elevados de CMI<sub>90</sub> para la mayoría de los antimicrobianos respecto de los obtenidos de animales asintomáticos.

#### QUINTA

La enrofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina, danofloxacina, moxifloxacina, doxiciclina, tilosina y clindamicina son los agentes más efectivos *in*

*vitro* frente *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Los aminoglucósidos, la espiramicina y la eritromicina parecen no ser útiles en el tratamiento de la agalaxia contagiosa causada por *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

#### SEXTA

El test epsilométrico estima la concentración mínima inhibitoria en buena concordancia con el método de microdilución para aquellos antimicrobianos con una concentración mínima inhibitoria baja, pero esta concordancia es menor cuando la concentración mínima inhibitoria, obtenida mediante el método de microdilución, es intermedia o alta.

#### SEPTIMA

Se confirma por primera vez la presencia de mutaciones en regiones determinantes de resistencia a quinolonas del gen *gyrA* en aislamientos de campo de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

#### IV. PUBLISHED WORKS



V.1. Study 1: The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats.



- Journal: Small Ruminant Research.

- Abstract:

This article reviews the diagnosis of mastitis in dairy goats. The benefits and shortcomings are discussed of both indirect diagnostic methods, such as the California mastitis test and somatic cell counts, and direct strategies, such as bacteriologic isolation and PCR identification. The important role of mycoplasmas in causing mastitis in regions where CA is endemic makes their detection mandatory in routine diagnostic practice, despite complicating and lengthening protocols. In this context, we discuss both the conditions to be met prior to sampling and the analytical conditions of the sample along with the features of each diagnostic method.

- URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448813003933>

## V.2. Study 2: Implicaciones sanitarias del manejo del calostro en el ganado caprino.



- Journal: Anales de Veterinaria de Murcia

- Abstract:

El calostro supone la primera fuente de inmunidad para el rumiante, y por tanto determina su resistencia a enfermedades durante las primeras horas de vida. No obstante, la ingesta de calostro puede suponer en sí misma la vía de transmisión de diversas enfermedades, como la paratuberculosis, la artritis-encefalitis caprina o la AC. Este riesgo puede evitarse siguiendo un régimen de lactancia artificial con unas adecuadas pautas de manejo de este calostro. Entre dichas pautas, el tratamiento del calostro supone un punto crítico. En este sentido, se han empleado los tratamientos térmicos para higienizar el calostro, observándose resultados diversos en la viabilidad de distintos microorganismos. Al mismo tiempo, se debe considerar el efecto negativo del calor sobre la composición nutricional del calostro, principalmente la pérdida de inmunoglobulinas. Como alternativa a los tratamientos térmicos, a nivel experimental, se han empleado métodos como la adición de DSS, capaz de inactivar el VIH-1 en leche, y otros procesos como la liofilización o el uso de altas presiones. Previamente a la aplicación práctica de las diferentes opciones de tratamiento del calostro se deberá considerar su viabilidad económica y su factibilidad en la explotación.

-URL: <http://revistas.um.es/analesvet/article/view/208961/166921>

V.3. Study 3: Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum.



- Journal: The Veterinary Journal.

- Abstract:

The viability of Ma and Mmc was assessed in goat colostrum treated at different temperatures. Samples of colostrum were inoculated with reference strains of Ma (PG2) and Mmc (PG3) and heated at 56 °C or 60 °C for 0, 30, 60, 90 or 120 min. Viable colonies of Ma were recovered after all treatments and there was a significant reduction in the concentration of viable Ma after 30 min at 56 °C and 60 °C. No viable colonies of Mmc were observed after 60 min at 60 °C.

-URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312003966>

#### IV.4. Study 4: Eficacia del dodecil sulfato de sodio para la inactivación de micoplasmas en calostro caprino.



- Journal: Anales de Veterinaria de Murcia

- Abstract:

En los rebaños de pequeños rumiantes crónicamente afectados de AC, los animales de reposición adquieren la infección a través de la ingestión de leche y calostro procedente de hembras infectadas que no muestran síntomas de la enfermedad. Como alternativa a los tradicionales métodos térmicos como la pasteurización, este estudio examina el efecto de diferentes concentraciones de DSS sobre la viabilidad de Ma y Mmc en calostro caprino. Posteriormente al tratamiento y antes de incubar las muestras de calostro contaminado, el DSS fue extraído o no de las muestras para evaluar el efecto de la prolongación del tratamiento durante el periodo de incubación. El tratamiento durante diez minutos con DSS al 0,1% fue inefectivo contra ambas especies de micoplasmas. Tratando el calostro con DSS al 1% no se observó crecimiento cuando el detergente estuvo presente durante el periodo de incubación, mientras que se mantuvo la viabilidad de los micoplasmas cuando el DSS fue extraído justo antes de este periodo. Nuestros hallazgos indican que la duración del tratamiento del calostro con DSS es crítico para su efecto de inactivación sobre estos micoplasmas.

- URL: <http://revistas.um.es/analesvet/issue/archive>

IV.5. Study 5: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats.



- Journal: Journal of Dairy Science

-Abstract:

This study examined the susceptibility to several antimicrobials of 28 isolates of Ma obtained from goats in a region (south-eastern Spain) where CA is endemic. For each isolate, the minimum inhibitory concentration (MIC) against 12 antimicrobials of the quinolone, macrolide, aminoglycoside and tetracyclines family was determined. The antimicrobials with the lowest MIC were enrofloxacin, ciprofloxacin, tylosin and doxycycline, all with MIC<sub>90</sub> (concentration at which growth of 90 % of the isolates is inhibited) < 1 µg/mL. Norfloxacin (a quinolone) showed a wide MIC range (0.1–12.8 µg/mL) suggesting a resistance mechanism towards this antimicrobial not elicited by enrofloxacin or ciprofloxacin (the other quinolones tested). Erythromycin showed the highest MIC<sub>90</sub> such that its use against Ma is not recommended. Finally, Ma isolates obtained from goat herds with clinical symptoms of contagious agalactia featured higher MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> (concentration at which growth of 50 % of the isolates is inhibited) values for many of the antimicrobials compared with isolates from asymptomatic animals. The relationship between use of the extensive use of antimicrobials in herds with clinical CA and variations in MIC values requires further study.

-URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213006164>

IV.6. Study 6: *In vitro* assessment of the susceptibility to antimicrobials of caprine isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.



- Journal: The Veterinary Journal

-Abstract:

The MIC and minimum mycoplasmacidal concentration (MMC) of 17 antimicrobials against 41 Spanish caprine isolates of Mmc obtained from different specimens (milk, external auricular canal and semen) were determined using a liquid microdilution method. For half of the isolates, the MIC was also estimated for seven of the antimicrobials using an epsilometric test (ET), in order to compare both methods and assess the validity of ET. Mutations in genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* conferring fluoroquinolone resistance, which have been recently described in Mmc, were investigated using PCR.

The anatomical origin of the isolate had no effect on its antimicrobial susceptibility. Moxifloxacin and doxycycline had the lowest MIC values. The rest of the fluoroquinolones studied (except norfloxacin), together with tylosin and clindamycin, also had low MIC values, although the MMC obtained for clindamycin was higher than for the other antimicrobials. For all the aminoglycosides, spiramycin and erythromycin, a notable level of resistance was observed. The ET was in close agreement with broth microdilution at low MICs, but not at intermediate or high MICs. The analysis of the genomic sequences revealed the presence of an amino acid substitution in codon 83 of the gene *gyrA*, which has not been described previously in Mmc.

-URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023316300557>

V. APPENDIX

## V.I. Publications in progress

V.I.1 : The results of this work have been submitted for further publication in the Japanese Journal of Veterinary Research.

### **Mycoplasma excretion in reproductive male and female goats.**

Ana Paterna, Ángel Gómez-Martín, Miranda Prats-van der Ham, Juan Tatay-Dualde, Joaquín Amores, Juan C. Corrales, Antonio Sánchez, Antonio Contreras, Christian De la Fe\*.

Ruminant Health Research Group, Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum”, University of Murcia, Campus de Espinardo s/n., 30100 Murcia, Spain

\* Tel.: +34 868887259; Fax: +34 868884147. [cdelafe@um.es](mailto:cdelafe@um.es)

### **ABSTRACT**

The understanding of the excretion of mycoplasmas is essential to control contagious agalactia in breeding goats. Three experiments were designed to better know the excretion routes of mycoplasmas in chronically infected goat populations, comparing the results of external auricular canal (EAC) swabs versus: 1) nasal swabs in 95 bucks; 2) conjunctival swabs in 85 bucks; 3) milk and vaginal swabs in 23 goats. Serology to detect *Mycoplasma agalactiae* (Ma) antibodies was conducted in all the animals. A phylogenetic analysis based on the *fusA* gene was performed on *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) isolates. Out of 1061 samples analyzed, 47 were positive (4,4%), confirming the presence of Ma, Mmc and Mcc in 25, 20 and 5 samples, respectively, including 3 mixed infections. Twenty four infected bucks and 7 goats were detected: the analysis of the EAC swabs detected 21 bucks (87.5%) and 4 goats (57.1%) which were



infected; conjunctival or nasal swabs were necessary to increase the infected animals detected (2 bucks and 1 goat, and 1 additional buck, respectively); analysis of conjunctival swabs, vaginal swabs or milk detected 3 of the infected goats. Genetic assays proved the existence of different clones of Mmc.

Additional sampling allowed detecting further infected animals compared to the sole sampling of the EAC and serum. The colonization of the vagina by Ma and Mcc in asymptomatic goats was described for the first time. The genomic plasticity of Mmc and its consequences on the control of contagious agalactia should be considered.

**Keywords:** contagious agalactia, control programs, *fusA* gene, goat, reproduction.

V.I.2.

**In-herd genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* goat isolates.**

Ana Paterna, Ángel Gómez-Martín, Miranda Prats-van der Ham, Juan Tatay-Dualde, Joaquín Amores, Juan C. Corrales, Antonio Sánchez, Antonio Contreras, Christian De la Fe\*.

Ruminant Health Research Group, Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum”, University of Murcia, Campus de Espinardo s/n., 30100 Murcia, Spain

\* Tel.: +34 868887259; Fax: +34 868884147. [cdelafe@um.es](mailto:cdelafe@um.es)

**ABSTRACT**

The genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* goat isolates within a region has been recently demonstrated to be notably higher compared to the ovine isolates. The genomic diversity of the *M. agalactiae* isolates obtained from two goat herds chronically affected of contagious agalactia was assessed. For this purpose, 30 isolates from the herd and 23 isolates from the herd 2, collected at different years, were studied. The characterization methods employed were based in the analysis of variable number of tandem repeats (VNTR) and the detection of the presence of mobile genetic elements, such as insertion sequences (IS) and integrative-conjugative elements (ICE). The analysis of VNTR17 showed up to five profiles, with two different profiles being clearly predominant in each herd. The presence of the IS 1 of *M. agalactiae* (ISMag1), was constant along the years in herd 1, except for two isolates. However, it was detected only in three isolates of the herd 2. No presence of the ISMag2 nor ICEs was detected in the herds.

This work supposes the first in-herd genetic characterization of *M. agalactiae* goat isolates. The results revealed even a higher plasticity than observed at a regional level. It also reveals a possible exchange of genetic material between clones through mobile elements. This could be explained by animal movement and may explain the appearance of new outbreaks of the disease in a herd, though further research is required.

V.II. Communications to congresses derivated from the present doctoral thesis.

V.II.1. Communications to international congresses:

**PATERNA, A.; AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J.C.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C., SÁNCHEZ, A.** 2011. Efecto de la pasteurización del calostro caprino sobre la viabilidad de *Mycoplasma agalactiae*. XXXVI Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Publicación: XXXVI Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, pp. 391-394. Donostia-San Sebastián, 6-7 de octubre de 2011.

**PATERNA, A.; AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J.C.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C., SÁNCHEZ, A.** 2011. Viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* en calostro caprino tratado con sodium dodecyl sulfate. XXXVI Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Publicación: XXXVI Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, pp. 413-416. Donostia-San Sebastián, 6-7 de octubre de 2011.

**PATERNA, A.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; AMORES, J.; CORRALES, J.C.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C., SÁNCHEZ, A.** 2012. Decrease of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat colostrum subjected to pasteurization or SDS treatment. XI International conference on goats. Las Palmas de Gran Canaria, Canarias, España. Septiembre 2012.

**PATERNA, A., GÓMEZ-MARTÍN, A., TATAY-DUALDE, J., ANDRADE, J.D., AMORES, J., SÁNCHEZ-BARÓ, A., CORRALES, J.C, SÁNCHEZ, A., CONTRERAS, A., DE LA FE, C.** 2013. Surveillance program of *Mycoplasma* spp. in goats herds and bucks of malagueña breed. XXXVIII Jornadas científicas y XIV Conferencia internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Publicación: XXXVIII Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, pp. 584-590. Málaga, 18-20 de septiembre de 2013.

**PATERNA, A., TATAY-DUALDE, J., PRATS-VAN DER HAM, M., GÓMEZ MARTÍN, A., AMORES, J., CORRALES, J.C., CONTRERAS, A., DE LA FE C., SÁNCHEZ, A.** 2015. Concentración mínima inhibitoria de 17 antimicrobianos en aislamientos caprinos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. XL Congreso Nacional y XVI Congreso internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Publicación: XL Congreso Nacional y XVI Congreso internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, pp. 408-413. Castellón de la Plana, 16-18 de septiembre de 2015.

**PATERNA, A., DE LA FE, C., PETARO, F., TATAY-DUALDE, J., PRATS-VAN DER HAM, M., MARTINEZ PARRA, J., GÓMEZ-MARTÍN, A.** Presencia de micoplasmas en rumiantes silvestres abatidos en montería: consideraciones zoonóticas. III Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. Murcia, 25-27 de noviembre de 2015.

**PATERNA, A., PRATS-VAN DER HAM, M., TATAY-DUALDE, J., GÓMEZ-**

MARTÍN, A., DE LA FE, C., CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., SANCHEZ, A. Evaluación de la epsilometría y microdilución para la determinación de la susceptibilidad antibiótica de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. III Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. Murcia, 25-27 de noviembre de 2015.

PATERNA, A., TATAY-DUALDE, J., GÓMEZ-MARTÍN, A., PRATS-VAN DER HAM, M., SANCHEZ, A., CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., DE LA FE, C. Descripción de una nueva mutación en el gen *gyrA* relacionada con la resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos de campo de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. III Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. Murcia, 25-27 de noviembre de 2015.

#### V.II.2. Communications to national congresses:

MAROGNA, G., FIORI, A., LONGHEU, C., PATERNA, A., TOLA, S., SCHIANCHI, G. 2014. Produzione, innocuità e utilizzo di un vaccino stabulogeno sperimentale per la profilassi delle infezioni da *Mycoplasma capricolum* sub. *capricolum* in pecore Sarde. XXI Congresso Nazionale SIPAOC (Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e Caprini). 9-12 Septiembre 2014, Fuggia (Italia).

#### V.III. Conferences:

PATERNA, A. Control de la agalaxia contagiosa y otras enfermedades caprinas mediante el manejo del encalostramiento. IV Foro Nacional del Caprino. Almería, 2013

VI. ABBREVIATIONS

## VI. ABBREVIATIONS

- **CA (AC):** contagious agalactia (agalaxia contagiosa).
- **ET (TE):** epsilometric test (test epsilométrico).
- **HIV-1 (VIH-1):** human immunodeficiency virus 1 (virus de la inmunodeficiencia humana 1).
- **Ma:** *Mycoplasma agalactiae*.
- **MIC (CMI):** minimum inhibitory concentration (concentración mínima inhibitoria).
- **MMC (CMM):** minimum mycoplasmacidal concentration (concentración mínima micoplasmacida)
- **Mmc:** *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.
- **SDS (DSS):** sodium dodecyl sulfate (dodecyl sulfato de sodio).

**VII. ACKNOWLEDGEMENTS**



## **VII. ACKNOWLEDGEMENTS**

Este estudio fue financiado por el proyecto AGL2013-44771-R, co-financiado por fondos FEDER, concedido por el Ministerio de Economía del gobierno de España. Ana Paterna Morán fue beneficiaria del programa de becas predoctorales (F.P.U.) de la Universidad de Murcia.

Al Grupo de Investigación de Sanidad de Rumiantes por depositar su confianza en mí desde el principio y darme la oportunidad de iniciarme en la investigación y en el conocimiento del sector de los pequeños rumiantes. A Antonio Sánchez, Christian de la Fe, Antonio Contreras y Juan Carlos Corrales (que han sido más compañeros y amigos que jefes propiamente dichos), por la confianza, las aportaciones, todas sus enseñanzas y apoyo académico, pero sobre todo por su espíritu de compañerismo dentro y fuera del departamento, además del maravilloso trato que ofrecen a todos los becarios.

A Luis León Vizcaíno y Maria José Cubero Pablo, por su amabilidad y ayuda prestada en cualquier momento requerido, además de haber contribuido en parte a despertar mi interés en otro de los muchos campos de la profesión veterinaria: la fauna silvestre.

A mis compañeros becarios (por el camino algunos nuevos doctores) en el grupo de investigación: Ángel Gómez, Joaquín Amores, Estefanía Bueno, Miranda Prats y Juan Tatay. Porque la palabra “grupo” lo dice todo: esta tesis es fruto del trabajo de todos, de vuestra calidad como investigadores pero sobre todo como compañeros. Gracias también por los ratos y las risas al acabar el trabajo.

## *VII. Acknowledgements*

A los técnicos del grupo: a José Martínez-Parra, por sacarme de algún que otro apuro y por tu enorme amabilidad; a Daniel Riquelme, por su ayuda en las experiencias de laboratorio y su amistad; a Silvia Porras, por su confianza y amistad desde el primer día, además del apoyo en los peores momentos.

Al laboratorio “ricerca e sviluppo” del Istituto Zooprofilattico della Sardegna (Sassari). Aa su directora Sebastiana Tola por la oportunidad brindada de conocer nuevas fronteras en investigación y por todo su cariño, y a Maria Grazia Cillara, por su gran calidad humana, toda la ayuda prestada, y por las excursiones por “la isola”.

A los veterinarios y ganaderos del Núcleo de Control Lechero de la Región de Murcia, la Asociación Española de la cabra Murciano-Granadina y la Asociación Nacional de la Cabra Malagueña, por su buena disposición para colaborar siempre y ponernos “los pies en la tierra”.

Al Dr. Daniel Sierra, por el asesoramiento ofrecido en los trabajos de antibióticos.

A mis amigos y amigas, aquellos manchegos, murcianos, andaluces, valencianos, etc, que se reconocen al leer estas líneas. Gracias por quererme y apoyarme siempre para continuar y creer en mí misma, porque saben lo que significa para mí esta profesión.

## *VII. Acknowledgements*

A mis padres, que me han puesto donde estoy ahora sin cuestionarme nunca. Gracias por ayudarme siempre a alcanzar mi sueño de ser (y continuar siendo) veterinaria. A mi familia, por preocuparse siempre por mí.

A mi familia “política”, aunque este apelativo no me convenza, por todo su cariño.

A Ángel. Gracias. Por las buenas y por las malas. Por estar siempre ahí y por todo lo que compartimos. Máktub.