

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN DOSIS SEMINALES CAPRINAS PARA EL DESARROLLO DE UN MODELO DE CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL CON *MYCOPLASMA SPP*

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

Gómez-Martín, A¹*, Vieira, L.A²., De Ondiz, A²., Paterna, A¹., Gadea, J²., De la Fe, C¹.

¹ Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes. Departamento de Sanidad Animal.

² Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Campus de Excelencia Internacional Regional “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España.

* **Autor para correspondencia:** Ángel Gómez Martín. Tel.: 34 868887259; fax: +34 868884147, E-mail: angelgomez@um.es.

Historial del artículo:

Recibido: 12 diciembre 2012

Aceptado: 18 de febrero 2013

RESUMEN

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

incubación, respectivamente. En conjunto, este modelo permitiría el desarrollo de contaminaciones experimentales de dosis seminales caprinas con *Mycoplasma* spp. con el fin de evaluar su efecto sobre la viabilidad y motilidad espermática.

Palabras clave: Semen, modelo de contaminación experimental, medio PPLO, micoplasmas.

ABSTRACT

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

Key words: Semen, experimental inoculation model, PPLO medium, mycoplasmas.

INTRODUCCIÓN

La agalaxia contagiosa (AC) es una enfermedad endémica de la cuenca mediterránea que ocasiona importantes pérdidas económicas en el sector de los pequeños rumiantes (Nicholas et al., 1995). En el ganado caprino *Mycoplasma agalactiae* (Ma) es el principal agente etiológico de la enfermedad aunque *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mc) y *Mycoplasma putrefaciens* (Mp) intervienen también en la etiología (Corrales et al., 2007).

Durante años ha sido asumido que los sementales debían jugar un papel en la epidemiología de la enfermedad (Bergonier et al., 1997). Recientemente, se ha podido corroborar estadísticamente que la compra de sementales por parte de las explotaciones supone un riesgo de introducir la infección en las mismas (Al-Momani et al. 2008), como consecuencia de la presencia de sementales portadores asintomáticos que presentan infecciones sistémicas crónicas (Gómez-Martín et al., 2012a). Estos individuos portadores, que a menudo resultan ser seronegativos, pueden estar infectados con cepas de micoplasmas con suficiente capacidad patógena para originar brotes de la enfermedad (Tardy et al., 2011). Estas características epidemiológicas propiciaron la entrada de portadores en centros de inseminación españoles (Amores et al., 2011) demostrándose la difusión de la infección de forma silente a la totalidad de los animales de un centro a partir de unos pocos portadores (De la Fe et al., 2010). El aislamiento de Ma y Mmc en semen de machos caprinos portadores asintomáticos presentes en centros de inseminación de razas lecheras selectas hizo necesario contemplar y evaluar el riesgo de transmisión venérea (De la Fe et al., 2009; Gómez-Martín et al., 2012b), así como probar la eficacia de las medidas terapéuticas. En este sentido, recientemente ha sido evaluada la eficacia del tratamiento sistémico con marbofloxa-

cina en machos caprinos de alto valor genético, llegando a la conclusión de que el tratamiento antibiótico aplicado resulta ineficaz para curar la infección produciendo además descensos significativos en la motilidad espermática de los sementales (Gómez-Martín et al., 2012c).

La presencia de *Mycoplasma* spp. en el semen caprino no sólo supone un riesgo de contagio venéreo de AC, sino que podría interferir en el correcto desarrollo de los programas de mejora genética de razas selectas al producir daños en la calidad espermática de los sementales presentes en los centros de inseminación. Este hecho ha podido ser constatado en el ganado bovino y la especie humana (Díaz-García et al., 2006; Sylla et al., 2005). Por todo ello, es necesario emprender estudios experimentales acerca del posible efecto que los micoplasmas implicados en la AC puedan tener en la calidad espermática caprina.

Previamente al desarrollo de un protocolo de contaminación experimental seminal, es necesario fijar las condiciones del mismo para poder realizar un correcto diseño. Varios trabajos han realizado la contaminación experimental de semen con *Mycoplasma* spp. en otras especies animales. En ellos las muestras seminales se someten a temperaturas de 37 °C durante al menos dos horas y cuyo control negativo ha de llevar medio específico para el aislamiento de micoplasma (Sylla et al., 2005; Díaz-García et al., 2006). No obstante, no se conoce el efecto de la adición de los medios de cultivo específicos de micoplasmas (medio PPLO) ni en la viabilidad, ni en la motilidad espermática. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si la viabilidad y motilidad espermática de dosis seminales caprinas incubadas a 37 °C se ve afectada por el transporte previo bajo diferentes temperaturas y por la adición de medio PPLO, específico para el aislamiento de micoplasmas. Estos estudios preliminares permitirían el desarrollo de un modelo de contaminación experimental de semen caprino con micoplasmas involucrados en la AC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio. Estudio microbiológico y molecular

Para la realización de este estudio se utilizaron 4 machos caprinos de la raza Murciano-Granadina de entre 2-5 años pertenecientes al centro de sementales del centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) de Lorca. Durante este trabajo, los animales no fueron sometidos a condiciones de estrés o cambios de alimentación siendo albergados, alimentados y sometidos a las medidas sanitarias adecuadas a esta especie según la legislación vigente.

Como paso previo, se realizó un estudio microbiológico para la detección de posibles animales portadores asintomáticos de las cuatro especies de micoplasmas involucradas en la AC con el fin de emplear muestras seminales libres de *Mycoplasma* spp. Para ello se tomaron 15 días antes del estudio 2 hisopos de conducto auditivo externo de cada animal así como una muestra de semen. Todas las muestras fueron sembradas en medio específico para el aislamiento e identificación de micoplasmas (Gómez-Martín et al., 2012a) y se extrajo ADN de las muestras para realizar los correspondientes estudios moleculares mediante análisis de PCRs específicas de Ma, Mmc, Mc y Mp, todo ello según el proceso descrito por Amores et al. (2011).

Estudio de viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales transportadas bajo diferentes condiciones de temperatura

Para esta experiencia se obtuvieron los eyaculados de 4 machos caprinos mediante la utilización de vagina artificial para posteriormente ser diluidos en un medio preparado a base de leche desnatada sin antibiótico, hasta alcanzar una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/ml (Pellicer Rubio et al., 1997). A con-

tinuación fueron enfriados de forma progresiva dentro de una cámara frigorífica hasta una temperatura de 4 °C en 90 minutos y finalmente, fueron mezcladas las muestras de los diferentes machos. Una alícuota de la muestra seminal (400 µl) fue tomada para su cultivo y la realización de PCRs específicas de micoplasmas, según lo descrito en el apartado anterior.

A continuación, se prepararon dos ependorf con 1,5 ml de la muestra seminal que fueron transportados hasta el laboratorio de la Facultad de Veterinaria, en neveras portátiles con temperatura controlada. Uno de ellos se mantuvo entre 4-5 °C mientras que el otro se transportó a 15-16 °C. Tras 60 minutos de transporte, todas las muestras transportadas en ambas condiciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual (T:0) se procedió a evaluar la viabilidad espermática mediante tinción de eosina-negrosina y la motilidad espermática empleando un microscopio de contraste de fases siguiendo la metodología descrita por Pellicer-Rubio et al (1998). Posteriormente, las muestras fueron incubadas en un baño seco a 37 °C. Se evaluó la viabilidad y motilidad espermáticas a los 30, 60 y 120 minutos de iniciada la incubación. Para esta experiencia fueron llevadas a cabo tres réplicas con los mismos machos caprinos, todas ellas durante los meses de invierno. Cada determinación de los parámetros espermáticos fue realizada por duplicado en cada tiempo.

Adición de medio específico para el aislamiento e identificación de *Mycoplasma spp.* en semen diluido

Cuatro eyaculados de los mismos machos caprinos fueron obtenidos mediante vagina artificial durante los meses de invierno y fueron diluidos en un medio preparado a base de leche desnatada sin antibiótico hasta alcanzar una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/ml (Pellicer Rubio et al., 1997). Tras ser enfriados de forma progresiva hasta 4 °C

a lo largo de 90 minutos dentro de una cámara frigorífica, se preparó una mezcla con las 4 muestras seminales. Por una parte, una alícuota fue destinada al cultivo y PCR específicos de micoplasma y además se prepararon dos alícuotas de 1500 µl de semen diluido. Tras 60 minutos refrigerados a 4 °C, las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 10 minutos. De una de las muestras se extrajeron 40 µl de semen diluido y se sustituyeron por el mismo volumen de medio PPLO, mientras que la otra quedó como muestra control. Estas muestras fueron incubadas a 37 °C en un bloque seco y se determinó la motilidad y la viabilidad espermática en los tiempos 0, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 minutos posteriores al inicio de la incubación, de igual forma que en el apartado anterior. Este proceso fue repetido tres veces con los mismos machos caprinos durante los meses de invierno.

Tres réplicas más fueron llevadas a cabo en el mes de mayo con semen de los mismos machos caprinos, llevando a cabo un protocolo similar al descrito anteriormente para la elaboración de la condición inoculada con medio PPLO. En este caso, sólo se procedió a evaluar la motilidad espermática con el sistema CASA (ISAS, Proiser, Valencia, España) a los 0, 30 y 60 minutos de la incubación.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el modelo lineal general del programa SAS 6.11 (1996). La viabilidad (%) y motilidad (%) espermática fueron consideradas variables dependientes en sendos modelos, en los que se incluyeron los efectos de la temperatura de almacenamiento (dos niveles: 4-5 °C vs. 15-16 °C) y la adición o no de medio PPLO (dos niveles: control vs. medio PPLO). En los dos modelos citados, se consideraron los efectos de la muestra ($n = 3$), el tiempo (cuatro niveles: 0, 30, 60 y 120 minutos para el estudio de temperaturas de transporte y nueve: 0, 45, 60, 75, 90, 105, 120,

135 y 150 minutos para la evaluación del efecto de medio PPLO) y las correspondientes interacciones de la temperatura de almacenamiento y la adición de medio PPLO con el tiempo.

RESULTADOS

Todas las muestras de hisopos auriculares y semen analizadas durante las experiencias del presente trabajo resultaron negativas tanto al cultivo microbiológico como a la detección molecular mediante el análisis de PCR específico de *Mycoplasma* spp.

Viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales transportadas bajo dos condiciones de transporte

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de viabilidad espermática de las dosis seminales transportadas a 4-5 °C y a 15-16 °C. Por el contrario, si se observó un efecto significativo de la temperatura de transporte sobre los valores de la motilidad espermática total, con mejores resultados en las muestras transportadas a 4 °C que a 15 °C (Tabla 1, $p < 0,001$). También se observó un efecto del tiempo de incubación

Tabla 1: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad y motilidad seminal

Factor	gl	Viabilidad		Motilidad	
		F	P	F	P
Muestra	2	23,38	<0,001	0,50	NS
Temperatura de almacenamiento	1	0,21	NS	91,59	<0,001
Tiempo incubación	3	28,37	<0,001	135,71	<0,001
Temperatura x tiempo	3	7,71	<0,001	20,41	<0,001

NS: no significativo

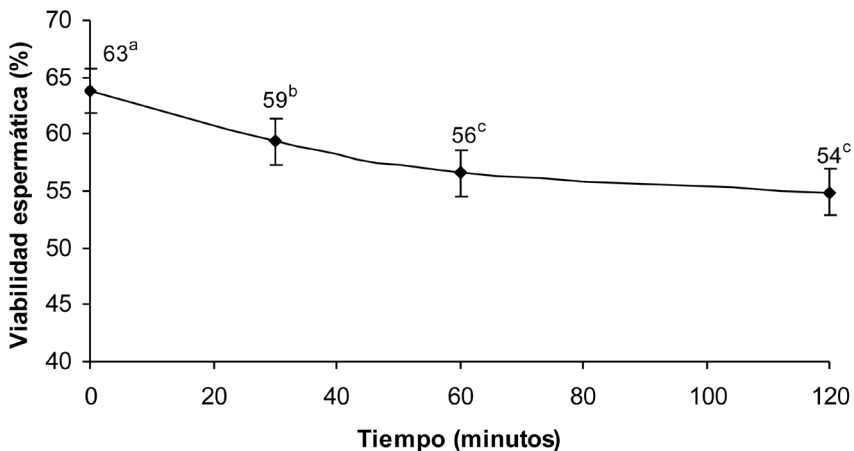


Figura 1: Viabilidad espermática media en dosis seminales mantenidas a 37 °C

^{a,b,c} Medias con diferentes superíndices presentan diferencias significativas ($P < 0,001$).

Tabla 2: Media de mínimos cuadrados¹ de la motilidad espermática (%) según la temperatura y tiempo de almacenamiento

Tiempo (minutos)	Temperatura de almacenamiento (°C)		P
	15-16	4	
0	51,00 ^a	78,00 ^a	<0,001
30	49,17 ^{ab}	63,00 ^b	<0,001
60	44,17 ^b	42,83 ^c	NS
120	25,00 ^c	35,00 ^d	<0,001

¹ Media del error estándar = 1,829

a, b, c, d: Medias con distinto superíndice en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05). NS: no significativo

sobre ambos parámetros de calidad espermática (Tabla 1, p <0,001). En concreto, se pudo observar un descenso significativo de la viabilidad espermática durante los primeros 60 minutos de incubación a partir de los cuales la viabilidad se estabilizó hasta los 120 minutos (Figura 1). Los valores medios de motilidad espermática en muestras transportadas a 4 °C (54,7%) resultaron estadísticamente superiores (p<0.001) a los observados bajo un transporte a temperatura de 15-16 °C (42,3%) . El porcentaje de espermatozoides móviles totales en cada uno de los tiempos de las dos condiciones de transporte previas a la incubación vienen reflejados en la Tabla 2.

Viabilidad y motilidad espermática en dosis seminales con medio específico para el aislamiento e identificación de *Mycoplasma* spp.

La viabilidad y motilidad espermáticas no se vieron afectadas por la incorporación del medio PPLO en las dosis seminales (Tabla 3, Fig 2 y 3, p>0,05), mientras que si se vieron afectados por el tiempo de incubación a 37 °C (Tabla 3, Fig 2 y 3, p<0,001). Se registró una viabilidad espermática media del 73% a lo largo de las dos horas y media de incubación así como valores medios de motilidad espermática del 29% durante el mismo. Los valores de espermatozoi-

Tabla 3: Efecto de la adición de medio PPLO sobre la viabilidad y motilidad espermática

Factor	gl	Viabilidad		Motilidad	
		F	P	F	P
Muestra	2	7,38	<0,01	31,86	<0,001
Adición de medio PPLO	1	1,96	NS	1,03	NS
Tiempo	8	11,10	<0,001	767,01	<0,001
Adición de medio PPLO x tiempo	8	4,14	<0,001	0,20	NS

NS: no significativo.

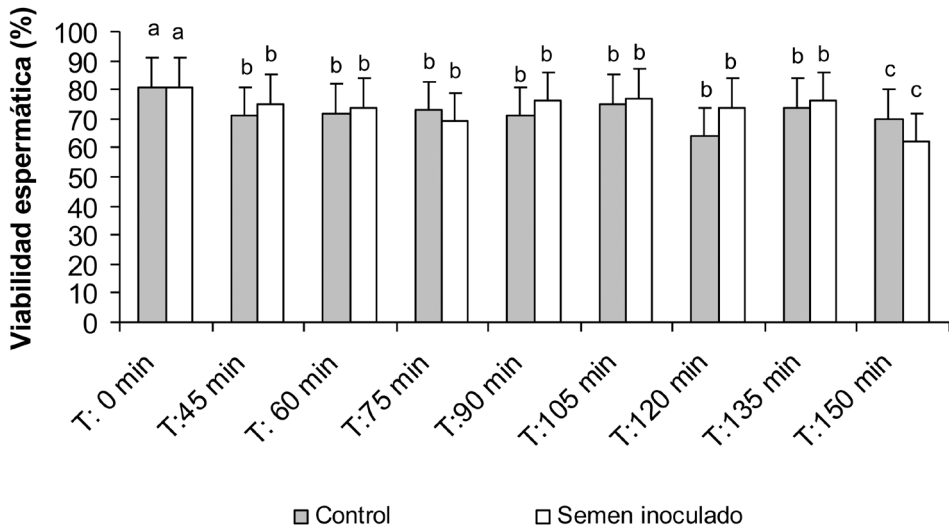


Figura 2: Viabilidad espermática en dosis seminales control y con medio PPLO a 37 °C

^{a,b,c} Medias con diferencias significativas a lo largo del tiempo (P<0,001).

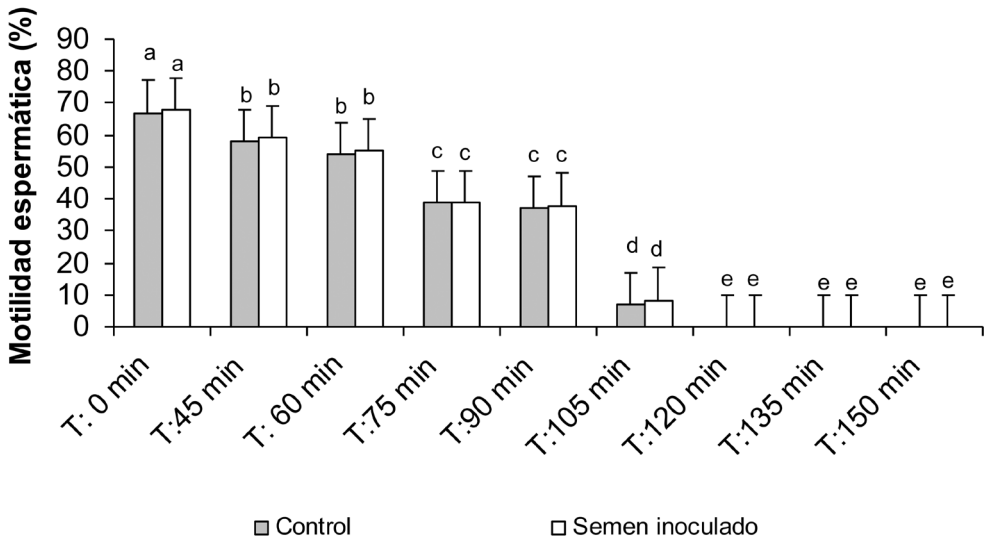


Figura 3: Motilidad espermática total en dosis seminales control y con medio PPLO a 37 °C.

^{a,b,c,d,e} Medias con diferentes superíndices presentan diferencias significativas (P<0,001) entre los tiempos estudiados.

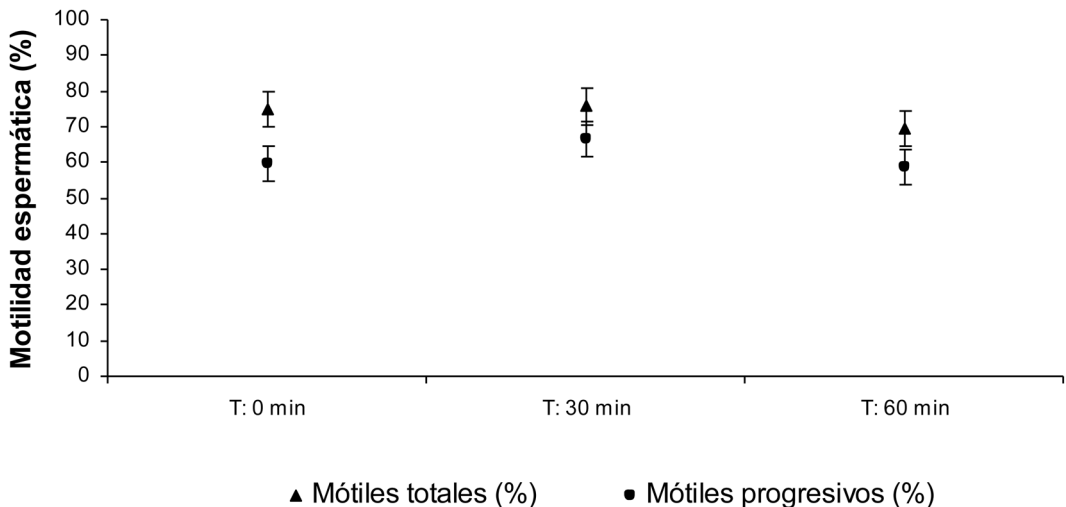


Figura 4: Valores de motilidades obtenidas mediante el sistema CASA en dosis seminales control y con medio PPLO.

des mótiles totales y progresivos obtenidos mediante el empleo de un sistema CASA en dosis seminales con medio PPLO pueden observarse en la Figura 4. Así, se pudieron evidenciar motilidades totales y progresivas medias del 73% y 61%, respectivamente a los 60 minutos de incubación estudiados.

DISCUSIÓN

El presente trabajo estudia la viabilidad y motilidad espermática de dosis seminales caprinas sometidas a un protocolo de transporte y posterior incubación en medio específico para el crecimiento de *Mycoplasma* spp. Previamente al desarrollo de un protocolo de contaminación experimental seminal, es necesario fijar las condiciones del mismo para poder realizar un correcto diseño. El punto de partida es contar con machos caprinos cuyo semen esté libre de micoplasmas. Debido al carácter intermitente de la excreción observado a través de la vía seminal (De la Fe et al., 2009), es necesario realizar varios muestreos de semen para la de-

tección de animales portadores asintomáticos (Gómez-Martín et al., 2012b). El análisis de la totalidad de las muestras utilizadas en este trabajo confirmó la ausencia de las 4 especies de micoplasmas involucrados en la AC en el semen de los animales empleados.

El hecho de que el centro de inseminación artificial en el que se elaboran las dosis seminales se encuentre distanciado del laboratorio de contaminación experimental, hace necesario evaluar las condiciones de transporte más idóneas que garantizan las viabilidades y motilidades espermáticas óptimas durante la incubación. A lo largo de 120 minutos de incubación a 37 °C, la viabilidad espermática del semen no se vio influenciada por la temperatura del transporte previo a la que es sometido (4-5 °C o 15-16 °C; Tabla1) observándose valores medios del 58% a las dos horas de incubación (Figura 1). Estos valores se mantuvieron constantes y superiores al 50% hasta al menos las 2 horas de incubación de igual forma a lo observado en los controles negativos de Díaz-García et al. (2006) con semen humano. No obstante, sí se observó

un descenso significativo de la motilidad espermática cuando las muestras se transportan a 15-16 °C (Tabla 1). En efecto, la temperatura de transporte puede afectar a la calidad seminal (Leboeuf et al., 2000) y las altas temperaturas están asociadas a severas degeneraciones de la misma (Corteel, 1981).

Debido a la necesidad de emplear medio PPLO para la elaboración de los controles negativos en un modelo experimental de contaminación seminal (Sylla et al., 2005), evaluamos su posible efecto sobre la viabilidad y motilidad espermática de dosis seminales caprinas. Nuestros resultados confirman que este medio enriquecido (Gómez-Martín et al., 2012b) no ejerce ninguna influencia sobre ambos parámetros espermáticos. Así, la contaminación de semen caprino con *Mycoplasma* spp. vehiculado en dicho medio permitiría aproximar de forma eficiente lo acontecido en una infección natural, aumentando el alcance de la inferencia del diseño experimental, lo cual constituye una de las principales funciones de los mismos (Steel et al., 1997).

Se pudo evidenciar un descenso significativo en la viabilidad espermática ($P < 0,001$) a lo largo del tiempo de incubación similar al observado por otros autores en semen humano. Ello, ha sido atribuido a la acidificación del medio como consecuencia de la actividad glucolítica espermática (Díaz-García et al., 2006). En este sentido, se obtuvo una viabilidad media superior al 50% (73%) durante las dos horas y media de incubación, de igual forma a lo observado en el estudio anteriormente citado. Este hecho nos permitiría evaluar el efecto de *Mycoplasma* spp. sobre este parámetro espermático.

En cuanto a la evaluación de la motilidad espermática en dosis seminales incubadas con medio PPLO, hay que tener en cuenta que la incubación a 37 °C impide la evaluación de este parámetro a lo largo de amplios periodos. En este sentido, registramos de forma preliminar valores superiores al 50% sólo durante los primeros 60 minutos en las dosis seminales in-

cubadas con medio PPLO. La evaluación de estos parámetros espermáticos en semen inoculado con *Mycoplasma* spp. debería por tanto centrarse en lo acontecido durante la primera hora de incubación. Otras incubaciones que han empleado el mismo medio con semen bovino (Sylla et al., 2005), evaluaron la motilidad espermática sólo dentro de los primeros 30 minutos de incubación, observándose valores totales del 54%. Los resultados que nosotros obtuvimos con el sistema CASA corroboraron los valores de espermatozoides mótils totales superiores al 50% durante los primeros 60 minutos (Figura 4). El ligero aumento en las motilidades espermáticas observadas en verano con respecto a las de invierno, está en consonancia con los aumentos estacionales de la motilidad espermática acontecidos en los machos caprinos Murciano-Granadinos tras el invierno en la Región de Murcia (Roca et al., 1992).

En conclusión, nuestros resultados han permitido desarrollar un modelo de incubación experimental de dosis seminales caprinas con medio PPLO, específico para el aislamiento micoplasmas, sin ejercer un efecto significativo en la viabilidad y la motilidad espermática. Dicho modelo, permite obtener valores óptimos de dichos parámetros de calidad espermática posibilitando futuras inoculaciones experimentales con *Mycoplasma* spp.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado a través de fondos de la Fundación SENECA (Agencia Regional de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, Proyecto 11785/PI/09). Los autores quieren agradecer la colaboración de la Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR) por aportar las dosis seminales libres de *Mycoplasma* spp. empleadas en el presente trabajo. Destacar también el apoyo recibido de los técnicos Silvia Porras, Daniel Riquelme, José Martínez y Dario Abril así como del asesoramiento de Fernan-

do Rabal. El primer autor disfruta de una beca predoctoral FPU de la Universidad de Murcia.

REFERENCIAS

- AMORES J., GÓMEZ-MARTÍN A., CORRALES J.C., SÁNCHEZ A., CONTRERAS A., DE LA FE C. 2011. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. *Theriogenology* 75: 1265-1270.
- AL-MOMANI W., NICHOLAS RA, ABO-SHEHADA MN. 2008. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* 83: 1-10.
- BERGONIER D., BERTHELOT X., POUMARAT F. 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16: 848-873.
- CORTEEL J.M. 1981. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: C. Gall (Editor), *Goat production*. Academic Press, London, pp. 171-191.
- 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 Rum. Res.* 68: 154-166.
- DE LA FE C., AMORES J., MARTIN A.G., SÁNCHEZ A., CONTRERAS A., CORRALES J.C. 2009. *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. *Vet. J.* 186: 113-115.
- DÍAZ-GARCÍA F.J., HERRERA-MENDOZA A.P., GIONO-CEREZO S., GUERRA-INFANTE FM. 2006. *Mycoplasma hominis* attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 21: 1591-1598.
- 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. *Vet. Microbiol.* 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., SÁNCHEZ A., AMORES J., CORRALES J.C., CONTRERAS A., DE LA FE C. 2012c. Effect of marbofloxacin on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks. *Small Rum. Res. In Press*.
- LEBOEUF B., RESTALL B., SALAMON S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- PELLICER-RUBIO M.T., COMBARNOUS Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 112: 95-105.
- PELLICER-RUBIO M.T., MAGALLON T., COMBARNOUS Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57: 1023-1031.
- ROCA J., MARTÍNEZ E., VÁZQUEZ J.M., COY, P. 1992. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim. Reprod. Sci.* 29: 255-262.

- NICHOLAS R. 1995. Contagios agalactia. State Veterinary Journal 5: 13-15.
- TARDY F., MAIGRE L., TRICOT A., POU-MARAT F., NGUYEN L., LE, G.D. 2011. Comparison of isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* from asymptomatic and septicaemic goats. J. Comp. Pathol. 144: 70-77.
- SAS/STAT Software. 1996. Changes and enhancements through release 6.11. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- STEEL R., TORRIE J., DICKEY D. 1997. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, 3rd ed. McGraw-Hill, NY.
- 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. Anim. Reprod. Sci. 85: 81-93.