

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Nuevas aproximaciones en el control de problemas de fertilidad de origen
infeccioso en ganado bovino de régimen extensivo

New Approaches In The Control Of Infectious Fertility Problems In Extensive
Cattle

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Coral Polo Vaquero

DIRECTORAS

**Marta Pérez Sancho
Teresa García-Seco Romero**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA

Servicio de Caracterización e Identificación Microbiana



TESIS DOCTORAL

NUEVAS APROXIMACIONES EN EL CONTROL DE PROBLEMAS DE FERTILIDAD DE ORIGEN INFECCIOSO EN GANADO BOVINO DE RÉGIMEN EXTENSIVO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR CON MENCIÓN DE DOCTORADO
INTERNACIONAL E INDUSTRIAL

PRESENTADA POR

Coral Polo Vaquero

DIRECTORAS

Marta Pérez Sancho

Teresa García-Seco Romero



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Dña. Marta Pérez Sancho, Doctora en Veterinaria y Profesor Contratado Doctor Interino en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y, Dña. Teresa García-Seco Romero, Doctora en Veterinaria y Jefe de Laboratorio del Servicio de Ensayos Clínicos del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid. En calidad de directoras de la presente Tesis,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “NUEVAS APROXIMACIONES EN EL CONTROL DE PROBLEMAS DE FERTILIDAD DE ORIGEN INFECCIOSO EN GANADO BOVINO DE RÉGIMEN EXTENSIVO” ha sido realizada por la graduada en Ciencias Biológicas Dña. Coral Polo Vaquero en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) en colaboración con la empresa MAEVA SERVET S.L. bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor Internacional e Industrial por la Universidad Complutense de Madrid.

Fdo.: Marta Pérez Sancho

Fdo.: Teresa García-Seco Romero

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a:

LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS HA SIDO POSIBLE GRACIAS A LA AYUDA PARA
LA REALIZACIÓN DE DOCTORADOS INDUSTRIALES EN LA COMUNIDAD DE
MADRID CON REFERENCIA IND2018 / BIO-9246.

https://www.bocm.es/boletin/cm_orden_bocm/2018/12/19/bocm-20181219-36.pdf

CONTRATO LABORAL DE LA DOCTORANDA CORAL POLO VAQUERO EN CALIDAD
DE BIÓLOGA POR LA EMPRESA MAEVA SERVET S.L.

<http://maevaservet.es/>

“Como no estás experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles.”

Don Quijote de la Mancha.
Miguel De Cervantes Saavedra.

AGRADECIMIENTOS

Seré muy breve, para mí la realización de esta tesis doctoral ha sido un proceso de aprendizaje y crecimiento personal altamente significativo. En primer lugar agradezco una y mil veces a mi familia por el apoyo incondicional y amigos por todas las veces que me han animado.

La realización de este trabajo y todo lo que ha implicado, no habría sido posible sin la guía de Lucas, Marta y Teresa a los cuales les estaré agradecida siempre por esta oportunidad, y a los cuales llevo en el recuerdo con cariño. En especial a Marta y a Teresa, quienes se han implicado en esta tesis de una forma que jamás habría podido imaginar. También me gustaría hacer especial mención a Alberto, sin el cual este trabajo de tesis tampoco podría haberse materializado. Tampoco se me olvida Nerea, si no me hubiera propuesto como candidata para la realización de la tesis, difícilmente habría tenido esta oportunidad.

¡Y no menos importante! el ambiente de trabajo en el que mis compañeros visavetianos han contribuido a hacer de la realización de esta tesis una experiencia única y divertida, en especial mis compañeros de despacho Victor y Clara, con quienes (entre doctorandos) he reído y llorado tanto.

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis es un compendio de estudios (un artículo de revisión sistemática y cuatro artículos de investigación originales) enfocados en la evaluación del toro como agente responsable de problemas de infertilidad de origen infeccioso en rebaños criados en régimen extensivo llevados a cabo en el marco de las Ayudas para la realización de Doctorados Industriales en la Comunidad de Madrid, convocatoria de 2018, con referencia IND2018/BIO-9246. El presente estudio es fruto de la colaboración entre la empresa MAEVA SERVET S.L., que presta sus servicios de consultoría, asesoramiento y formación en explotaciones ganaderas, así como el diseño y la ejecución de programas sanitarios en las mismas, y la Universidad Complutense de Madrid a través del Centro de Vigilancia Veterinaria Sanitaria (VISAVET), dedicado al estudio y control de enfermedades infecciosas presentes en ganado y fauna salvaje, entre otras actividades.

Los artículos de investigación publicados corresponden con el plan de investigación presentado en el actual programa de Doctorado en Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (aprobado por Resolución de 28 de febrero de 2014, BOE 11 de marzo de 2014), siendo producto del trabajo de la doctoranda durante el tiempo de permanencia de esta en dicho programa. La decisión de publicar la presente memoria de tesis en formato de publicaciones se debe a que estos cinco artículos de investigación (cuatro publicados y uno en proceso de revisión) exhiben una cohesión temática, profundizando en el abordaje de la identificación, detección y diagnóstico de distintos microorganismos causantes de infertilidad en ganado bovino, en concreto en el toro empleado como semental en monta natural. La publicación de dichos trabajos científicos denota que la doctoranda, a lo largo de la realización de la presente tesis doctoral, ha adquirido habilidades para el diseño, el desarrollo y puesta a punto de distintas técnicas de laboratorio y el consiguiente análisis de los resultados, así como la aplicación de herramientas informáticas empleadas en el diagnóstico y caracterización de microorganismos. Para la publicación de dichos artículos científicos y el correcto análisis de los resultados de laboratorio, la doctoranda ha complementado su formación previa con el aprendizaje del uso de programas bioinformáticos a través de la Diplomatura y Máster en Análisis Bioinformático impartido de forma *on line* por la

Universidad Pablo de Olavide (Sevilla), cursado durante la realización de la presente tesis. Así mismo, ha colaborado con investigadores del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León en Valladolid y la Universidad de Burgos, en colaboración con los cuales se han publicado algunos de los artículos de investigación presentados en esta memoria. Por último, la doctoranda ha colaborado con el Departamento de Ciencias Paraclínicas de la Facultad de Veterinaria de la *Norwegian University of Life Sciences* (NMBU) durante una estancia de 3 meses (desde el 1 de agosto hasta el 31 de octubre de 2022) y cuyo trabajo de colaboración corresponde a estudios realizados sobre muestras seminales de toros empleados para la cría, relacionado con el tema principal de la presente tesis doctoral.

A continuación, se presenta un listado con las referencias completas de los estudios incluidos en esta tesis doctoral:

- Artículo 1. Estudio titulado “*What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds*”. Coral Polo, Teresa García-Seco, Alberto Díez-Guerrier, Lucas Domínguez, Marta Pérez-Sancho. Publicado como artículo de revisión por la revista *Veterinary and Animal Science*, en el año 2023, con la referencia DOI: 10.1016/j.vas.2023.100284
- Artículo 2. Estudio titulado “*Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds*”. Coral Polo, Marta Hernández, Teresa García-Seco, Víctor Fernández, Víctor Briones, Alberto Díez-Guerrier, David Abad, David Rodríguez-Lázaro, Lucas Domínguez, Marta Pérez-Sancho. Publicado como trabajo de investigación original por la revista *Research in Veterinary Sciences*, en el año 2022, volumen 150, con la referencia DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.04.019
- Artículo 3: Estudio titulado “*Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples*”. Coral Polo, Teresa García-Seco, Marta Hernández, Víctor Fernández, David Rodríguez-Lázaro, Joaquín Goyache, Lucas Domínguez, Marta Pérez-Sancho. Publicado como trabajo de

investigación original por la revista *Theriogenology*, en el año 2021, volumen 172, con la referencia DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.06.020

- Artículo 4: Estudio titulado “*Molecular detection of Tritrichomonas foetus in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting EF1-alpha-Tf1 and a comparative study of published PCR techniques*”. Coral Polo, Teresa García-Seco, Víctor Fernández, Marta Hernández, Víctor Briones, Alberto Díez-Guerrier, Lucas Domínguez, Marta Pérez-Sancho. Publicado *on line* como trabajo de investigación original por la revista *Parasitology Research* en el año 2022, con la referencia DOI: 10.1007/s00436-022-07487-7
- Artículo 5. Estudio titulado “*Time, temperature and media: the three keys to improve the recovery of Campylobacter fetus subsp. venerealis from preputial bull samples*”. Polo C, García-Seco T, Fernández V, Briones V, Díez-Guerrier, A, Álvarez, J, Domínguez, L, Pérez-Sancho M. En revisión.

RESUMEN

La ganadería bovina extensiva en España es un sector caracterizado por su orientación prioritaria a la producción de carne y cuyo objetivo principal desde un punto de vista productivo es maximizar la producción de terneros por vaca y año. Los sistemas de explotación extensivos pueden ser capaces de emplear los recursos naturales del entorno contribuyendo al mantenimiento de ecosistemas resilientes siempre que se emplee un manejo adecuado de los mismos. España fue el tercer país en producción de vacuno de carne en la Unión Europea (UE) en 2020, habiendo generado el 24% de la carne de ternera. No obstante, los índices de fertilidad anual media de este sector en España son menores en comparación al resto de la UE (69% vs. 80%, respectivamente, en el año 2020), lo que repercute negativamente en la eficiencia de la producción. La infertilidad de etiología infecciosa es especialmente relevante en ganado bovino criado en extensivo, donde el macho desempeña un papel importante ya que un único macho (o un grupo muy reducido) puede emplearse para la cubrición de varias hembras.

La presencia de patógenos causantes de infertilidad en machos y la transmisión venérea de patógenos asociados a infertilidad por los machos son dos elementos esenciales para entender el papel que tiene el toro en la infertilidad infecciosa a nivel de rebaño. El objetivo de la presente Tesis es la mejora en el conocimiento sobre el papel del toro como elemento clave en los problemas de infertilidad de origen infeccioso en rebaños bovinos en extensivo, mediante el estudio de los patógenos asociados a infertilidad en el macho, así como la evaluación y/o desarrollo de herramientas diagnósticas de última generación y tradicionales, con especial atención a aquellas más comúnmente empleadas, como son el cultivo y la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para la detección de *Campylobacter fetus* y *Tritrichomonas foetus*. Estos son dos patógenos asociados a infertilidad en bovino de reconocida importancia, tanto en España como a nivel mundial, para los cuales no existen tratamientos eficaces y que suelen cursar con infecciones asintomáticas en los toros que pueden actuar como portadores pasando fácilmente desapercibidos y dificultando su control.

En este contexto, en la presente Tesis se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura científica mediante cadenas de búsqueda en PubMed, Scopus y Web of Science. Fueron seleccionados 38 artículos (de un total de 2.224) desde 1966 hasta 2022 en los cuales se relacionaba la presencia de 27 patógenos diferentes con problemas reproductivos en rebaños compuestos por machos o ambos sexos. Los patógenos más frecuentemente detectados fueron: Herpesvirus bovino (BoHV) (identificado por el 26,3% del total de trabajos seleccionados), *C. fetus* (23,7%), *T. foetus* (18,4%), y el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), *Ureaplasma* spp., y *Mycoplasma* spp. (10,5%). Destacó la ausencia de algunos patógenos con capacidad reconocida para producir problemas reproductivos en bovino como *Histophilus somni*, *Aspergillus* spp. o *Candida* spp.

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre microorganismos relacionados con la infertilidad en toros, se realizó un estudio metagenómico en 1029 muestras de lavados prepuciales de machos criados en régimen extensivo en España (una muestra por toro, donde 944 procedían de animales procedentes de rebaños con bajas tasas de fertilidad y 85 de animales procedentes de rebaños reproductivamente sanos). El estudio se realizó mediante el análisis de la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr bacteriano. Se puso de manifiesto la ausencia de poblaciones bacterianas potencialmente asociadas a infertilidad: i) diversidad alfa de los índices Shannon (p-valor = 0,745) y Simpson (p-valor = 0,403), y ii) diversidad beta mediante el índice Bray-Curtis que no mostró diferenciación de grupos en base a diferencias en el éxito reproductivo. No obstante, el análisis individual de las unidades taxonómicas operativas (*Operational Taxonomic Unit*, OTU) mostró la presencia de un género, *Mycoplasma* spp. significativamente asociado a infertilidad (p-valor < 0,001). Así mismo, se identificó *C. fetus* en el 2,75% de las muestras, todas ellas procedentes de rebaños con bajos índices de fertilidad. Por el contrario, otros microorganismos, como *Ureaplasma diversum*, fueron detectados en un alto porcentaje de animales de ambos grupos muestrales, evidenciando la necesidad de profundizar en el conocimiento del verdadero papel de patógenos oportunistas así como sobre los factores que desencadenan su potencial capacidad patógena. Por último, este estudio subrayó el potencial que tienen nuevos abordajes metodológicos disponibles actualmente, como la metagenómica, en el estudio de la infertilidad bovina de carácter

infeccioso para la detección de microorganismos que puedan estar pasando desapercibidos en controles rutinarios o cuyo papel en infertilidad sea desconocido.

Con respecto a la mejora de las técnicas diagnósticas de microorganismos de conocido efecto sobre la fertilidad bovina, esta tesis se centró en dos patógenos, *C. fetus* y *T. foetus*. Respecto al diagnóstico de *C. fetus* mediante la técnica PCR, se realizó un estudio comparativo de protocolos dirigidos sobre diez dianas moleculares: i) los genes *16S* del ARNr, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* y *nahE* para la identificación de la especie *C. fetus*, y ii) los genes *ISCfe1*, *sapB2*, *parA* y *virB11* para la diferenciación de las subespecies *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) y *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff). Se propuso una nueva técnica de PCR en tiempo real basada en un protocolo de pirosecuenciación sobre el gen *gyrB* que mejoraba las ratios de detección de *C. fetus* en muestras prepuciales de toros (siendo capaz de detectar el 95,1% de las muestras positivas) en comparación con otros protocolos de PCR previamente publicados. La diferenciación de subespecies de *C. fetus* es importante para el diagnóstico de la campilobacteriosis genital bovina (CGB), enfermedad de declaración obligatoria causada por Cfv, sin embargo, los resultados del trabajo demostraron la dificultad para la discriminación de subespecies mediante las técnicas PCR evaluadas.

Respecto a *T. foetus* (causante de la tricomonosis, enfermedad de declaración obligatoria en España), se evidenció la escasez de dianas genéticas disponibles para su detección mediante PCR siendo la práctica totalidad de estos protocolos basados en la región que comprende el gen del *18S*, *5.8S*, y *28S* del ARN ribosómico y los espaciadores internos de la transcripción 1 y 2 (ARNr-ITS). Esta región es altamente homóloga en el género *Tritrichomonas*, lo que podría dar lugar a reacciones cruzadas con otras especies. Así, se seleccionaron cinco protocolos publicados basados en esta diana para evaluar su rendimiento diagnóstico. La disponibilidad de dianas alternativas para la confirmación de casos positivos a *T. foetus* en muestras clínicas puede ser de gran interés. Sin embargo, tan solo se han descrito: i) el microsatélite *TjRE* para el que existe publicada una única PCR convencional (también evaluada en este estudio comparativo) y ii) el gen que codifica la beta-tubulina 1 que corresponde a un kit comercial que carece de información publicada. En esta situación, en la presente Tesis, se diseñó y evaluó una nueva técnica PCR basada en el gen *EF1-*

alfa-Tf1. Este protocolo presentó una elevada concordancia (coeficiente kappa de Cohen = 0,967) con la técnica de PCR tomada como referencia [McMillen y Lew, 2016 (señalada por la WOAHA como opción válida para la detección de *T. foetus*). Asimismo, esta nueva técnica fue capaz de detectar 5,75 copias del genoma de *T. foetus* sin mostrar amplificaciones inespecíficas.

Por último, se estableció un protocolo de cultivo (técnica de referencia para el diagnóstico de la CGB) para Cfv a partir de muestras clínicas de toros mediante un estudio comparativo de cinco medios de transporte (Lander, Stuart, Weibridge, Thoman y PBS), tres medios de enriquecimiento (Preston, Brucella y Bolton) y tres medios de aislamiento (Agar sangre, Preston y Skirrow) bajo distintas combinaciones de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 4°C) y tiempo (24h y 48h) para el transporte de las muestras, y diferentes estrategias de cultivo en placa [empleo de filtros (de $0,45\mu\text{m}$ y $0,65\mu\text{m}$ de diámetro de poro) y temperaturas de cultivo (37°C y 42°C)] con el objetivo de limitar el crecimiento de microorganismos que pudieran competir con Cfv para maximizar su recuperación. Los mejores resultados fueron obtenidos con el medio de transporte Lander (donde fue sustituido el 5-fluoracilo por anfotericina B) conservado hasta 24h a una temperatura constante de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, en combinación con el medio de enriquecimiento Preston (cultivado a 37°C durante 48h) y posteriormente sembrado en los medios sólidos Preston o Skirrow incubados a 37°C durante 4 días en microaerofilia.

En conclusión, los resultados de la presente memoria de Tesis doctoral demuestran la necesidad de realizar más estudios acerca de las causas de infertilidad bovina de carácter infeccioso centrados en el verdadero papel del macho, así como de la utilidad de nuevas técnicas moleculares como los análisis metagenómicos, para la detección, estudio, y en última instancia, control de microorganismos que puedan estar pasando desapercibidos mediante herramientas diagnósticas de uso rutinario. De igual modo, en referencia a las técnicas diagnósticas rutinarias más comúnmente empleadas para la detección de *C. fetus* y *T. foetus* (cultivo y PCR), se ha puesto de manifiesto las limitaciones de las opciones actuales y la susceptibilidad de mejora de dichas herramientas en términos de rendimiento diagnóstico, proponiendo nuevos protocolos para este fin.

SUMMARY

In Spain, extensive cattle farming is a sector characterized by its priority orientation towards beef production and whose main objective from a productive point of view is to maximize the number of calves per cow and year. Extensive production systems may be able to use the natural resources of the environment, contributing to the maintenance of resilient ecosystems if they are properly managed. In 2020, Spain generated the 24 % of beef within the European Union (EU), being the third main beef producing country. However, the average annual fertility rates of this sector in Spain are lower compared to the rest of the EU (69% vs. 80%, respectively, in 2020), which has a negative impact on farm efficiency. Infectious infertility is particularly relevant in extensive cattle, where the bulls play an important role since a single male (or a very small group) can be used to breed several females.

The presence of pathogens that cause infertility in males and the venereal transmission of pathogens associated with infertility by males are two essential elements to understand the role of the bull in infectious infertility within the herd. The objective of this thesis is to improve knowledge about the role of the bull as a key element in infertility problems of infectious origin in extensive cattle herds, through the study of pathogens associated with infertility in the male, as well as the evaluation and/or development of new and traditional diagnostic tools, with special attention to those most commonly used, culture and PCR (polymerase chain reaction) technique, for the detection of *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. These are two pathogens of recognized importance associated with bovine infertility, both in Spain and worldwide, for which there are no effective treatments causing frequently asymptomatic infections in bulls that can act as carriers, easily going unnoticed hindering their control.

In this context, a systematic review of the scientific literature was carried out through search strings in PubMed, Scopus, and Web of Science. A total of 38 articles (out of 2,224) were selected from 1966 to 2022, in which the presence of 27 different pathogens was related to reproductive problems in male and male-female herds. The most frequently detected pathogens were: bovine herpesvirus (BoHV) (identified by 26.3% of all selected articles), *C. fetus* (23.7%), *T. fetus*

Summary

(18.4%), and the virus bovine viral diarrhea (BVDV), *Ureaplasma* spp., and *Mycoplasma* spp. (10.5% each), highlighting the absence of some pathogens with a recognized ability to cause reproductive problems in cattle, such as *Histophilus somni*, *Aspergillus* spp. or *Candida* spp.

To complete the knowledge about microorganisms associated with bull's infertility, a metagenomic study was carried out on 1029 samples of preputial washes from males within extensive farms in Spain (one sample per bull, where 944 came from animals from herds with low fertility rates and 85 from animals from reproductively healthy herds). The study was carried out by analysing the hypervariable region V3-V4 of the gene that encodes the *16S* of bacterial rRNA. The absence of bacterial populations potentially associated with infertility was revealed: i) alpha diversity of the Shannon (p-value = 0.745) and Simpson (p-value = 0.403) index, and ii) beta diversity using the Bray-Curtis index which did not show group differentiation based on reproductive success. However, the individual analysis of the operational taxonomic units (*Operational taxonomy Unit*, OTU) showed the presence of one genus, *Mycoplasma* spp. significantly associated with infertility (p-value < 0.001). Likewise, *C. fetus* was identified in the 2.75 % of the samples, all of them from herds with low fertility. On the contrary, other microorganisms, such as *Ureaplasma diversum*, were detected in a high percentage of animals from both sample groups, making evident the need to improve the knowledge about the true role of opportunistic pathogens, as well as factors that trigger their potential pathogenic capacity. Lastly, this study highlighted the potential of new available methodological approaches, such as metagenomics, in the study of bovine infectious infertility for detection of microorganisms that may be going unnoticed in routine controls or whose role in infertility is unknown.

Regard to the improvement of diagnostic techniques for detection of microorganisms with a recognized effect on bovine fertility, this thesis focused on two pathogens, *C. fetus* and *T. foetus*. Regarding the diagnosis of *C. fetus* by PCR, a comparative study of published protocols was carried out on ten molecular targets: i) the *16S* rRNA genes, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* and *nahE* for the identification of the *C. fetus*, and ii) the genes *ISCfe1*, *sapB2*, *parA* and *virB11* for the differentiation of *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) and *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff). A new real-time

PCR technique based on a pyrosequencing protocol on the *gyrB* gene was proposed. This protocol improved the detection rates of *C. fetus* in preputial samples from bulls (being able to detect 95.1% of positive samples) compared to other previously published PCR protocols. The differentiation of *C. fetus* subspecies is important for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis (BGC), a notifiable disease in Spain caused by CfV, however, our results demonstrated the difficulty for subspecies discrimination using the evaluated PCR techniques.

Regarding *T. foetus* (causing trichomonosis, a notifiable disease in Spain), the low number of genetic targets available for its detection by PCR technique was evidenced, where practically all of these protocols are based on the region that includes the *18S* gene, *5.8S*, and *28S* rRNA and the internal transcription spacers 1 and 2 (rRNA-ITS). This region is highly homologous among members of the genus *Tritrichomonas* spp., which could lead cross-reactions with other species. Thus, five published protocols based on this target were selected to evaluate their diagnostic performance. So, the availability of alternative targets for *T. foetus* confirmation cases on clinical samples may be of great interest. However, only the two alternative targets have been described: i) the *TfRE* microsatellite for which a single conventional PCR has been published (also included in this comparative study) and ii) the gene that encodes beta-tubulin 1 that corresponds to a commercial PCR kit without published information. In this context, a new PCR technique based on the *EF1-alpha-Tf1* gene was designed and evaluated in this Thesis. This protocol showed high concordance (Cohen's kappa coefficient = 0.967) with the reference PCR [McMillen and Lew, 2016 (indicated by the WOA as a valid option for the detection of *T. foetus*). Likewise, this new technique was able to detect 5.75 copies of the *T. foetus* genome without non-specific amplifications.

Finally, a culture protocol (reference technique for the diagnosis of BGC) for CfV was established from clinical bulls samples through a comparative study of five transport media (Lander, Stuart, Weibridge, Thoman and PBS), three enrichment media (Preston, Brucella and Bolton) and three agar media (Blood agar, Preston and Skirrow) under different combinations of temperature (21±2 °C and 4 °C) and time (24 h and 48 h) for sample transport, and different plate culture strategies

[filters use (0.45 μm and 0.65 μm pore diameter) and culture temperatures (37 °C and 42 °C)] with the aim of maximizing Cfv recovery and limiting the presence of other fast growing microorganisms that could compete with Cfv. The best results were obtained with Lander's transport medium (where 5-fluorouracil was replaced by amphotericin B) stored up to 24 h at constant temperature of 21 ± 2 °C, in combination with Preston's enrichment medium (cultured at 37 °C for 48 h), and subsequently cultured in Preston or Skirrow agar media incubated at 37 °C during 4 days in microaerophile atmosphere.

In conclusion, the results of this Thesis demonstrate the need for more studies about the causes of bovine infectious infertility focused on the true role of the male, as well as the usefulness of new molecular techniques such as metagenomic analysis for the detection, study, and ultimately, control of microorganisms that may be going unnoticed through diagnostic tools. Similarly, in reference to the diagnostic techniques most used for *C. fetus* and *T. foetus* detection (culture and PCR), the limitations of the current tools and the susceptibility of improving it in terms of diagnostic performance have been showed, proposing new protocols for this goal.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	31
1.1. <i>El sector ganadero y su importancia en el contexto global actual</i>	31
1.2. <i>El sector vacuno de carne y la ganadería extensiva: importancia ambiental y económica</i>	32
1.3. <i>La infertilidad en las explotaciones extensivas bovinas</i>	35
1.4. <i>Causas de infertilidad en ganado bovino.....</i>	37
1.4.1. <i>Causas de infertilidad bovina de carácter no infeccioso</i>	37
1.4.2. <i>Infertilidad bovina de carácter infeccioso</i>	40
1.5. <i>El papel de los machos en los problemas de infertilidad en el rebaño</i>	42
1.5.1. <i>Campylobacter fetus. Características generales del microorganismo y la enfermedad</i>	46
1.5.1.2. <i>Detección de C. fetus en muestras clínicas de toros reproductores.....</i>	48
1.5.2. <i>Tritrichomonas foetus</i>	53
1.5.2.1. <i>Detección de Tritrichomonas foetus en muestras clínicas de toros reproductores</i>	56
1.6. <i>Nuevos abordajes para la detección y el estudio de microorganismos asociados a infertilidad en toros reproductores: secuenciación masiva</i>	60
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
2.1. <i>Hipótesis.....</i>	65
2.2. <i>Objetivo</i>	69
2.2.1. <i>Objetivos específicos</i>	69
3. PLAN DE TRABAJO/METODOLOGÍA.....	73
3.1. <i>Material de estudio.....</i>	73
3.2. <i>Revisión sistemática de la literatura científica</i>	74
3.3. <i>Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas presentes en lavados prepuciales de toros. Análisis estadístico de los resultados.....</i>	78
3.4. <i>Evaluación y mejora de la detección de C. fetus y T. foetus en muestras prepuciales procedentes de toros criados en régimen extensivo mediante la técnica molecular PCR</i>	80
3.4.1. <i>Estudio comparativo para la detección de C. fetus mediante la técnica PCR en lavados prepuciales de toros reproductores</i>	81
3.4.2. <i>Adaptación de un protocolo de pirosecuenciación a un protocolo de PCR en tiempo real sonda específico para la detección de C. fetus.</i>	85
3.4.4. <i>Diseño de una técnica de PCR en tiempo real sonda específica basada en el gen EF1αTfl para la detección de T. foetus en lavados prepuciales de toros</i>	88
3.5. <i>Evaluación y optimización del protocolo de cultivo de C. fetus para el aislamiento de Cfv a partir de lavados prepuciales de toros reproductores criados en régimen extensivo.....</i>	89

4. RESULTADOS	97
Capítulo I	99
4.1 Agentes infecciosos en toros asociados a infertilidad en rebaños bovinos: estudio centrado en el papel de los machos.	99
4.1.1. Artículo 1: What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds	101
4.1.2. Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds.	115
Capítulo II	125
4.3. Estudio para la evaluación y mejora, en su caso, de la técnica PCR para la detección de <i>C. fetus</i> y <i>T. foetus</i> en muestras prepuciales de toros en régimen extensivo.	125
4.3.1. Evaluation of PCR assays for <i>Campylobacter fetus</i> detection and discrimination between <i>C. fetus</i> subspecies in bovine preputial wash samples.	127
4.3.2 Molecular detection of <i>Tritrichomonas foetus</i> in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting <i>EF1-alpha-Tf1</i> and a comparative study of published PCR techniques.....	139
Capítulo III	153
4.4 Time, temperature, and media: the three keys to improve the recovery of <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> from preputial bull samples.....	153
4.4.1. Evaluación de la capacidad de recuperación de <i>Cfv</i> dependiendo de los medios de transporte, enriquecimiento y cultivo empleados.....	155
4.4.2. Evaluación del rendimiento diagnóstico del medio de transporte y enriquecimiento seleccionados con muestras de lavados prepuciales de toros.....	159
5. DISCUSIÓN	163
6. CONCLUSIONES	199
7. CONCLUSIONS	201
8. REFERENCIAS	203
9. ANEXOS	221
9.1. Lista de acrónimos y abreviaturas.....	221
9.2. Lista de tablas	222
9.3. Lista de figuras.....	223
9.4. Estancias nacionales e internacionales	227
9.5. Comunicaciones orales en congresos	227
9.6. Comunicaciones mediante póster en congresos.....	228
9.7. Premios	228
9.8. Colaboración en tareas docentes.....	228
9.9. Organización de eventos científicos.....	229
9.10. Formación adicional	229

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sector ganadero y su importancia en el contexto global actual

El informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), titulado “How to Feed the World in 2050” (Le Mouél y Forslund 2017) prevé que la población mundial se sitúe en una cifra en torno a los 9.000 millones de personas para el año 2050. Para cubrir las necesidades alimentarias de la población futura, la FAO estima que es necesario aumentar la producción total de alimentos aproximadamente un 70% con respecto a la producción actual, donde la producción de carne debería aumentar en más de 200 millones de toneladas anuales (Le Mouél y Forslund 2017). Esta perspectiva de futuro, unida a la necesidad de establecer sistemas productivos capaces de adaptarse al cambio climático que se viene registrando desde hace décadas, de acuerdo a lo expuesto en última Cumbre Mundial por el Cambio Climático (Laybourn-Langton et al. 2022), hace que sea necesario plantear una mejora de la eficiencia de los sistemas productivos. En este contexto, diferentes autores han subrayado la necesidad de incrementar la inversión en investigación y desarrollo para un crecimiento productivo cuya huella ambiental sea la mínima posible (Peyraud y Macleod 2020).

Del mismo modo, este crecimiento en la producción animal está contemplado en un informe de la Comisión Europea de 2020 titulado “*Future of EU livestock: how to contribute to a sustainable agricultural sector?*” (Peyraud y Macleod 2020) que recoge información sobre cómo la ganadería en la actualidad afecta de forma negativa al entorno a través del consumo de recursos y la alteración de flujos físico-químicos tan importantes para la vida en el planeta como son el ciclo de los nutrientes, los gases de efecto invernadero o las sustancias tóxicas que tienen a su vez un impacto negativo en la salud humana y animal así como en el funcionamiento de los ecosistemas de los que dependemos (Peyraud y Macleod 2020). En concreto, se ha estimado, entre otros aspectos negativos, que el sector bovino genera más del 70% de las emisiones de gases de efecto invernadero (Cusack et al. 2021), contribuye a la contaminación de aguas mediante la

acumulación de nitratos y fosfatos (Cesoniene et al. 2019), y presenta una baja eficiencia con respecto a la conversión de recursos naturales (como el uso de agua y de suelo) en productos comestibles (Gerber et al. 2015). En este contexto, las actuales demandas del mercado y la previsión futura sobre la producción de alimentos necesarios en este planeta (que se encuentra bajo los efectos del calentamiento global registrados) refuerzan la necesidad de un cambio dirigido hacia sistemas más competitivos y eficaces con un impacto ambiental mínimo (Greenwood 2021; Laybourn-Langton et al. 2022).

En términos generales, el sector bovino se puede diferenciar en dos grupos principales en función de su aptitud: i) el destinado a la producción de leche donde la producción se lleva a cabo, principalmente, a través de sistemas intensivos y ii) el destinado a la producción de carne donde existen explotaciones de vacas nodrizas y toros reproductores, cuyo principal objetivo es maximizar la producción de terneros por vaca y año, y que suelen ser criados en sistemas de producción extensivos (Gonzalez-Rodriguez 2016; Endres y Schwartzkopf-Genswein 2017; MAPA 2020). No obstante, es importante considerar que en España existen cebaderos para el engorde de los terneros destetados, en una fase previa a la comercialización de su carne y otros productos, que siguen un modelo de explotación intensiva (MAPA 2020).

1.2. El sector vacuno de carne y la ganadería extensiva: importancia ambiental y económica

Frecuentemente, hablar de ganadería extensiva en España equivale a hablar de explotaciones gestionadas por núcleos familiares ligados a espacios rurales (Gonzalez-Rodriguez 2016), con un número reducido de cabezas de ganado por explotación destinadas fundamentalmente a la cría de terneros (MAPA 2018, 2020) y donde rara vez se emplea la inseminación artificial (IA) (Joya et al. 2011) como sistema de reproducción, siendo la monta natural el método más ampliamente empleado (Montoya-Monsalve et al. 2021). Las cubriciones se realizan cuando las nodrizas, tanto vacas como novillas (eralas si son novillas de 2 años y utreras si tienen 3 años), entran en periodos

de celo. El celo suele ser cíclico cada 21 días, aunque en vacas criadas en régimen extensivo, este puede estar ausente debido al estrés ambiental [por ejemplo, debido a la escasez de alimento en determinados periodos del año (D’Occhio et al. 2019), o a la existencia de temperaturas muy elevadas (Rutledge et al. 1999)].

El impacto de las condiciones ambientales en las explotaciones extensivas ha motivado que los ganaderos frecuentemente monitoricen los celos para realizar las cubriciones en momentos del año muy concretos, de tal modo que el desarrollo embrionario y los partos tengan lugar cuando las condiciones ambientales sean las más idóneas (Griffith et al. 2017; Madruga et al. 2019). Esto se traduce en una dependencia de los sistemas bovinos extensivos con respecto a las características del terreno, las condiciones climáticas y la disponibilidad de recursos naturales donde son criados los animales (Rubio y Roig 2017; Gaitán et al. 2020), p.ej., en España es común que el ganado bovino criado en extensivo se alimente durante casi la totalidad del año de pastos que crecen en el medio (Gonzalez-Rodriguez 2016; Rubio y Roig 2017). Se ha de considerar que España es uno de los Estados miembros de la Unión Europea (UE) con una mayor extensión de terreno y diversidad de sistemas ganaderos en extensivo (basados en el aprovechamiento de pastos) en comparación con el resto de países de la UE (San Miguel Ayanz et al. 2016). Debido a estas características de la producción bovina extensiva en España, este sector es especialmente vulnerable a los efectos del cambio climático en nuestro país.

Pese a los potenciales efectos negativos previamente mencionados de la ganadería bovina en el medio, esta también puede contribuir a reducir los efectos negativos asociados a la producción animal a través de estrategias muy diferentes, como por ejemplo el empleo de los desechos como fertilizantes orgánicos en el sector agrícola o el favorecimiento de sistemas de explotación extensivos, los cuales, mediante un manejo adecuado, pueden ser capaces de aprovechar de una forma eficiente los recursos naturales del entorno (Herrera 2020; Peyraud y Macleod 2020) a la vez que son capaces de soportar ecosistemas resilientes con un elevado grado de biodiversidad (Mearns 1996; Steiner et al. 2014; San Miguel Ayanz et al. 2016; Herrera 2020; Peyraud y Macleod 2020; Rodríguez-Rojo et al. 2022). El mantenimiento de ecosistemas con un alto grado

de biodiversidad supone una serie de beneficios como son, p.ej., mantener un alto grado de fertilidad de los suelos (Franzluebbers et al. 2012; San Miguel Ayanz et al. 2016; Roche-Ramo 2021) o disminuir los efectos negativos relacionados con la presencia de patógenos y enfermedades emergentes (Morand 2020), presumiblemente esta relación puede explicarse mediante la hipótesis empleada en el ámbito de la ecología llamada ‘dilution effect’ con la que poblaciones con un mayor número de especies diferentes, en las que existen multitud de relaciones como p.ej depredador-presa o parásito-hospedador, entorpecen de forma directa o indirecta la transmisión de patógenos (Rohr et al. 2020). Por otra parte, en España, el sector vacuno criado en régimen extensivo se basa en su mayoría en variedades autóctonas y sus cruces (pertenecientes a la especie *Bos taurus*) (Gonzalez-Rodriguez 2016; MAPA 2016), donde las variedades autóctonas están adaptadas al medio y, por consiguiente, permiten obtener una producción más eficiente (de la que se obtendría si los animales se vieran sometidos a estrés ambiental al vivir en entornos para los que no están adaptados) a la vez que representan una valiosa reserva genética (Alonso et al. 2007; Melletti y Burton 2010; Gonzalez-Rodriguez 2016; Sanin et al. 2016; Ahmad et al. 2020), y una estrategia fundamental para la mitigación de los efectos del cambio climático en la ganadería (Herrera 2020).

La ganadería bovina extensiva en España no solo es un sistema de producción potencialmente adecuado para minimizar y mitigar los efectos del cambio climático, sino que, además, resulta ser un sector importante en la economía del país. El sector de vacuno de carne representa aproximadamente el 14,3% de la producción ganadera y el 5,5% de la producción agraria (MAPA 2021). En la UE, España fue en 2020 el tercer país en importancia para el sector de vacuno de carne tras Francia y Alemania, habiendo generado 677 mil toneladas de carne (MAPA 2021), el 24% de la carne de ternera y el 7,6% de la carne de res (Eurostat 2021). En 2020, las exportaciones españolas se incrementaron en 1,9% hasta superar en valor los 1.128 millones de euros, mientras que las importaciones se redujeron en un 23% hasta los 787.2 millones de euros (MAPA 2021). En cuanto a la importancia económica del sector bovino extensivo en España, cabe destacar que el mantenimiento de sistemas de aprovechamiento de pastos mediante la ganadería extensiva

implica la existencia de una actividad económica que produce alimentos de elevada calidad nutricional, la creación de puestos de trabajo en territorios económicamente marginales (p.ej. espacios rurales), el empleo como medida para la prevención de incendios forestales y en la conservación de determinados hábitats y especies (Rubio y Roig 2017), servicios invaluable desde un punto de vista económico.

No obstante, la ganadería bovina extensiva en España, tal cual la conocemos hoy en día, puede ser un sistema poco rentable. Desde 2017 el margen de ganancias para los ganaderos de vacuno de carne presenta una tendencia a la baja debido principalmente al encarecimiento de las materias primas (MAPA 2021). A este encarecimiento de las materias primas, a menudo se suman pérdidas económicas debidas a problemas de infertilidad en los rebaños que se traducen en una disminución del rendimiento productivo (Esslemont et al. 2001; Prevatt et al. 2018; Alzuguren et al. 2020), y que a su vez contribuyen al aumento de la huella ecológica (Peyraud y Macleod 2020). Por todo ello, la mejora de la fertilidad de los rebaños bovinos extensivos en España es una de las estrategias a seguir en pos de la optimización de la eficiencia de estos sistemas de producción así como de la potenciación de la eficiencia económica de los mismos y la disminución de su huella ecológica.

1.3. La infertilidad en las explotaciones extensivas bovinas

Respecto a la definición de infertilidad bovina, cabe destacar la ausencia de un consenso a nivel internacional, pudiéndose considerar similar a la definición establecida en humanos entendida como la incapacidad para la producción de descendencia viable en un periodo determinado de tiempo (Givens 2006; Butler et al. 2020). En consecuencia, entendemos por infertilidad o subfertilidad en bovino, la incapacidad o capacidad reducida, respectivamente, temporal para la producción de descendencia viable. Cuando esta incapacidad de dar lugar a descendencia viable no es temporal si no que es permanente a lo largo de la vida de los animales, se hablaría de

esterilidad. De este modo, los conceptos de infertilidad y subfertilidad abarcan desde la etapa de formación de gametos viables y su capacidad para que tenga lugar la fecundación, hasta la fase de desarrollo embrionario y fetal durante la gestación incluyendo la etapa perinatal de los terneros (Givens 2006). Existen diferentes parámetros mediante los cuales se evalúa la fertilidad de los rebaños bovinos, pero el índice más importante para la medida de la fertilidad en rebaños en extensivo es el porcentaje de terneros destetados por año con respecto al total de vacas nodrizas (MAPA 2018, 2020).

En España, de acuerdo con la publicación de Sanz y colaboradores (Sanz et al. 2013), la fertilidad media de la cabaña de vacas nodrizas en 2013 era del 65,4% mientras que en la UE se situaba en el 82,5%. Posteriormente, un informe sobre la situación de vacuno extensivo en 2016 indicó que la fertilidad media de los rebaños en España se situaba en el 68% mientras que en la UE era del 86% (Gonzalez-Rodriguez 2016). Datos más recientes procedentes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España (MAPA), indican que en el sector vacuno de carne la fertilidad media en 2020 de la cabaña ganadera española [relación entre el número total de terneros registrados en el año (total hijos) y el número de vacas nodrizas presentes (total madres), expresada en porcentaje] fue de un 69,5% (SITRAN 2021). No obstante, la fertilidad varía en función de la variedad bovina a la que hagamos referencia, siendo la variedad Morucha la que mayor fertilidad presenta, con un 77,8%, a la que le sigue muy de cerca la Avileña-Negra Ibérica, con un 75,57% (SITRAN 2021). Estos datos también varían en función de las distintas zonas de producción, donde la zona de dehesa cuenta con un valor medio de 71,5%, situándose por delante de la cornisa cantábrica (68,2%) y el pirineo (65,2%) (SITRAN 2021). Estos datos sugieren que los índices de fertilidad de los rebaños podrían depender del medio en el que son criados los animales, así como la variedad de los mismos. No obstante, también interfieren otros muchos factores como el manejo de la reproducción en explotaciones ganaderas o la presencia de patógenos causantes de infertilidad, pudiendo afirmar, por tanto, que las causas de infertilidad en bovino son múltiples.

1.4. Causas de infertilidad en ganado bovino

En un primer lugar, la fertilidad en bovino implica el correcto desarrollo de diversos procesos fisiológicos que tienen lugar desde el desarrollo embrionario hasta el fin de la pubertad, lo que permitirá, con la implicación de ambos sexos (machos y hembras), llevar la gestación de la descendencia a término con éxito (Kenny et al. 2018). Es por ello que las causas de infertilidad en bovino, no solo son amplias si no que pueden tener su efecto a distintos niveles (p.ej. desde el desarrollo embrionario o puberal de un individuo hasta la preñez en las hembras). En la presente memoria de tesis doctoral, se han dividido las causas de infertilidad bovina en función de su naturaleza en: i) causas no infecciosas, y ii) causas infecciosas.

1.4.1. Causas de infertilidad bovina de carácter no infeccioso

Las causas de infertilidad de carácter no infeccioso abarcan multitud de factores muy diversos. El correcto manejo de los animales es fundamental para obtener buenos índices de fertilidad. Es importante tener en cuenta el peso vivo adulto (PVA) de las nodrizas para determinar cuándo pueden emplearse para la cría (PVA en torno al 65% o superior), ya que dicho índice parece ser un indicativo de fertilidad mucho más adecuado que otros, como por ejemplo, el de la edad (Madruga et al. 2019; Kasimanickam et al. 2021).

De igual modo, la alimentación de la hembra durante el periodo gestacional es crucial para llevar a término con éxito la gestación así como la cría de los terneros (Noya et al. 2019; Zago et al. 2020). Las deficiencias nutricionales durante el periodo de desarrollo y apareamiento en bovinos se han relacionado con un bajo rendimiento reproductivo en el que se ven alterados los niveles de diferentes hormonas (Kenny y Byrne 2018; D'Occhio et al. 2019; Zekarias et al. 2019) que regulan la capacidad reproductiva en hembras [como leptina, IGF-1 y grelina (D'Occhio et al. 2019)] y machos [por ejemplo IGF-1, insulina o leptina (Kenny y Byrne 2018)].

Adicionalmente, en el caso de los animales en extensivo, que comen pastos, pueden ingerir plantas tóxicas como *Datura stramonium* o *Taxus baccata* (Cortinovis y Caloni 2015) que pueden afectar de forma negativa a su estado físico, y en consecuencia a su capacidad reproductiva. A parte de las plantas catalogadas como tóxicas para el ganado, durante periodos de sequía, muchas otras plantas que *a priori* no suponen un peligro, pueden acumular mayor cantidad de nitratos en sus tejidos que no son capaces de eliminar mediante su conversión en amonio, resultando de este modo tóxicas para el ganado (Tokarnia et al. 2002; Riet-Correa et al. 2012).

Por otra parte, existen otros factores de manejo que influyen en el buen estado de salud de los rebaños y que presentan gran relevancia en el mantenimiento de un buen nivel productivo en las explotaciones, p.ej. el empleo de programas de vacunación contra enfermedades de carácter infeccioso (Czerkawski et al. 2013) o, como indican estudios recientes, la importancia que podrían tener las poblaciones microbianas del rumen de hembras empleadas para la cría (Terry et al. 2021). Por supuesto, las enfermedades infecciosas y parasitarias pueden jugar un papel crítico en la fertilidad siendo el principal objetivo de estudio de la presente memoria de tesis doctoral.

Por otra parte existen enfermedades genéticas (congénitas) en el ganado bovino, que si bien son enfermedades poco frecuentes, pueden afectar gravemente a la fertilidad cuando existen, como la hipoplasia gonadal y freemartinismo (Steffen 1997; Zekarias et al. 2019). También es importante tener en cuenta el fondo genético de los animales a través de, p.ej., estudios de rasgos fenotípicos heredables asociados a fertilidad. Este tipo de estudios se han centrado fundamentalmente en las hembras, habiéndose identificado muy pocos rasgos heredables identificados que se asocien a fertilidad en machos (Butler et al. 2020). En las hembras, se ha establecido que los rasgos asociados comúnmente a fertilidad tienen una heredabilidad muy baja (Moorey y Biase 2020; Meier et al. 2021) y parece que podría ocurrir lo mismo en el caso de los machos (Butler et al. 2020). Por ello, actualmente se investiga la existencia de rasgos (y los genes que los codifican), en ambos sexos, que puedan ser asociados a fertilidad y cuya heredabilidad sea más elevada (Butler et al. 2020; Meier et al. 2021) y de este modo mantener, mediante el cruzamiento de

animales portadores de caracteres asociados a fertilidad, elevados índices de fertilidad en la descendencia que a su vez será empleada para la cría.

Otro factor que puede afectar negativamente a la fertilidad de los rebaños son aquellas lesiones que tengan como consecuencia la incapacidad de producir descendencia viable, p.ej., la torsión de útero en las hembras debido a un peso excesivo del feto o parálisis obstétrica (Aubry et al. 2008; Zekarias et al. 2019), así como lesiones genitales producidas durante la monta o la recogida de semen en el caso de los machos (Bellenger 1971; Wolfe 2018).

No menos importante es el efecto que la temperatura y otros elementos climáticos tienen sobre la fertilidad del ganado bovino. El rango de temperatura considerada neutral en ganado bovino (temperatura corporal $\approx 38-39^{\circ}\text{C}$) se sitúa entre 16°C y 25°C . Cuando las temperaturas ambientales suben y la temperatura corporal de los bovinos se eleva por encima de la normal es cuando la fertilidad de dichos animales empieza a verse alterada (Kamal et al. 2018). En países templados, el estrés por calor durante los veranos es un factor importante relacionado con la infertilidad de los rebaños (Rutledge et al. 1999; De Rensis y Scaramuzzi 2003; Morrell 2020). Dicho estrés debido al calor parece reducir la duración e intensidad del estro y aumentar la incidencia del anestro y de ovulación silenciosa (De Rensis y Scaramuzzi 2003). La formación de gametos también es sensible a la temperatura; por ejemplo, en hembras existen evidencias de que el desarrollo de los ovocitos es sensible a la temperatura (Rutledge et al. 1999). De igual modo, en machos el rango de temperatura es importante para una correcta espermatogénesis (Morrell 2020). El ambiente intrauterino también se ve comprometido en vacas sometidas a estrés por calor, habiendo una disminución del flujo sanguíneo al útero y un aumento de la temperatura uterina capaz de inhibir el desarrollo embrionario, aumentando la probabilidad de pérdida embrionaria temprana (Putney et al. 1988; Rivera y Hansen 2001). Menos estudiado, pero igual de importante, es el estrés debido a la exposición a temperaturas muy bajas. Los ambientes muy fríos también alteran el sistema metabólico y endocrino para ayudar a mantener el calor corporal (Gwazdauskas 1985).

1.4.2. Infertilidad bovina de carácter infeccioso

Por otra parte, entre las causas infecciosas de infertilidad en ganado bovino, podemos encontrar multitud de publicaciones científicas sobre agentes infecciosos, pudiéndose diferenciar cuatro grupos de patógenos: i) bacterias, ii) parásitos iii), virus y iv) hongos (Givens 2006; Givens y Marley 2008; Yoo 2010).

Muchos de estos agentes infecciosos son zoonóticos. Por ejemplo, *Campylobacter fetus* es capaz de transmitirse a humanos tanto por el contacto directo con animales infectados como a través del consumo de productos contaminados con esta bacteria (Wagenaar et al. 2014). En este escenario, el estudio de la infertilidad bovina por causas infecciosas no solo es un área de interés en el campo de la sanidad animal sino que también puede serlo en el área de la salud pública ya que los animales pueden ayudar a mantener estos patógenos en circulación y contribuir a su transmisión al hombre.

Algunos de los patógenos asociados a infertilidad bovina se consideran patógenos primarios como *Tritrichomonas foetus*, mientras que otros se clasifican como patógenos oportunistas [como *Aspergillus* spp. (Yoo 2010), o *Ureaplasma diversum* (Díaz et al. 2019; Santos Junior et al. 2021)]. En términos generales, muchas bacterias producen sustancias antimicrobianas que controlan la colonización del medio por parte de otras bacterias en una relación competitiva. Cuando esta población bacteriana se ve alterada, la proliferación excesiva de unas pocas especies normalmente genera síntomas indeseados en los animales. Uno de estos síntomas en bovino, y otras especies de mamíferos, puede ser la infertilidad en hembras por el desarrollo de afecciones como p.ej. la vaginosis debida a disbiosis u otros fenómenos que alteran la composición de las poblaciones microbianas de la vagina (Adnane y Chapwanya 2022).

También han sido descritas coinfecciones y relaciones sinérgicas entre agentes infecciosos. Un ejemplo se presenta en el trabajo de Szenci y colaboradores (Szenci et al. 2016) donde se observó que las coinfecciones causadas por el herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4) y la bacteria

Histophilus somni parecían extender el periodo de servicio de las vacas afectadas. No obstante, esta clase de trabajos es muy escasa por lo que es difícil valorar el impacto de las coinfecciones y relaciones sinérgicas entre patógenos en los problemas de fertilidad del ganado bovino. La implementación de herramientas laboratoriales, como técnicas metagenómicas, que permitan estudiar la composición de poblaciones microbianas en el tracto reproductor de hembras y machos permitiría arrojar luz en este campo.

Dentro del amplio número de patógenos asociados a infertilidad, la patogenia y la manifestación clínica de algunos de ellos puede variar en función de diferentes variables, como el sexo. De este modo, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) produce frecuentemente una infección asintomática en machos [recientemente se ha observado que puede afectar negativamente a la calidad del esperma en experimentos *in vitro* (Cagnoli et al. 2020)], mientras que en hembras, las infecciones por Cfv se traducen en una diversidad de fallos reproductivos como estros irregulares o mortalidad embrionaria y fetal (WOAH 2021). Del mismo modo, *Tritrichomonas foetus* da lugar a una infección normalmente asintomática en machos capaz de mantenerse durante largos periodos de tiempo, mientras que en las hembras es responsable de inflamación genital y muerte embrionaria (Michi et al., 2016).

Para añadir un elemento más en la complejidad del abordaje de la infertilidad infecciosa en bovino, se ha descrito que, dependiendo de la especie microbiana, la infertilidad puede ser uno de los síntomas característicos de la infección o puede ser un síntoma secundario producto de la debilidad del animal y su mal estado fisiológico, por lo que la asociación de algunos patógenos a infertilidad infecciosa en bovino resulta ser un tema controvertido. Dos ejemplos de estas dos situaciones son *Brucella abortus* y *Echinococcus granulosus*, respectivamente. Así, *B. abortus* afecta de forma directa al parénquima testicular en toros disminuyendo la calidad espermática (Joya et al. 2011) lo que se traduce en bajos índices de fertilidad. Por su parte, *E. granulosus* puede causar debilidad y un mal estado fisiológico que derive en problemas reproductivos, entre otros. El parásito *E. granulosus* es el agente etiológico de la hidatidosis, cuyos síntomas dependerán del órgano afectado y del tamaño y número de los quistes a los que dé lugar en

distintas localizaciones (Budke 2002), que normalmente se localizan en el hígado y pulmones en ganado bovino, mientras que en otras especies animales también se han encontrado en testículos y útero (Budke 2002). El desarrollo y aumento del número de los quistes en los órganos afectados desencadena procesos patológicos que desembocan en un desarrollo deficiente de los animales. Como consecuencia, en el ganado bovino afectado es común observar una disminución en la producción de leche y carne así como un menor ratio de nacimientos que pueden relacionarse con la debilidad que infecciones por *E. granulosus* causan en las hembras (WOAH 2011).

1.5. El papel de los machos en los problemas de infertilidad en el rebaño

Cuando se profundiza en el estudio de las causas de infertilidad infecciosa en ganado bovino, tomando como base lo que ha sido previamente publicado en bases de datos científicas, es fácil observar cómo estos estudios suelen centrarse en las hembras, probablemente debido a que de ellas depende prácticamente el total de la producción tanto en la industria láctea (rebaños compuestos por vacas lecheras) como cárnica (rebaños compuestos en su mayoría por nodrizas). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los fallos reproductivos dependen de tres factores principales: la vaca, el toro y el ser humano [por ejemplo, mediante un manejo inadecuado de los animales (Diskin et al. 2018) y el empleo de material contaminado (Truyers et al. 2014)]. En este contexto, resulta llamativa la escasez de datos acerca del papel del macho en relación con la infertilidad de carácter infeccioso a pesar de que diferentes autores han señalado que un porcentaje elevado de fallos reproductivos es atribuible al macho (Butler et al. 2020; Montoya-Monsalve et al. 2021). Una de las principales conclusiones del “*International Bull Fertility Conference*”, que tuvo lugar en 2018 en Irlanda, fue la existencia de claras variaciones de la fertilidad de toros empleados para la cría señalando que un 20-25% de los machos reproductores incluidos en dicho análisis podían ser catalogados como subfértiles, lo que se traducía en bajos índices de fertilidad en rebaños bovinos (Diskin et al. 2018).

Uno de los elementos clave para entender la importancia del macho en el éxito reproductivo de un rebaño bovino es que, comúnmente, un mismo toro es empleado para: i) la cubrición de la totalidad de las vacas de una explotación cuando dicho rebaño es pequeño, o; ii) la generación de multitud de dosis seminales empleadas en IA en el caso de explotaciones grandes. Debido a ello, los problemas de fertilidad de origen infeccioso de un macho, o un conjunto limitado de machos, es un punto determinante en lo que se refiere a la fertilidad de la colectividad (Hopper 2015).

Pese a la evidente importancia de los machos en referencia a la infertilidad de los rebaños, existen importantes lagunas en el conocimiento acerca del verdadero papel que tienen los machos en este campo debido, principalmente, a la falta de estudios dirigidos sobre los mismos, como se ha mencionado previamente. Un ejemplo de ello se presenta en el trabajo de Butler y colaboradores, donde se indica que pese a la optimización de las condiciones ambientales en las que son mantenidas las hembras y la implementación de medidas como la sincronización de celo, IA y transferencia embrionaria en EE.UU., algunas explotaciones ganaderas destinadas a la producción de carne siguen experimentando una probabilidad de concepción baja (por ejemplo del 60% mediante el uso de IA) debido, presumiblemente, al empleo de machos con una calidad espermática pobre, indicando a su vez la falta de estudios orientados a la mejora de la calidad espermática a través del estudio genético de los mismos (Butler et al. 2020).

De igual modo que se ha puesto de manifiesto esta falta de estudios dirigidos a la mejora de la calidad espermática en toros para la mejora de los índices de concepción en las hembras, un trabajo reciente de Montoya-Monsalve y colaboradores ha señalado que, en España, la baja fertilidad de los rebaños criados en régimen extensivo probablemente se deba al hecho de que la importancia del toro se ha pasado por alto, resaltando la importancia que las enfermedades infecciosas como BVD (diarrea bovina causada por el virus de la diarrea vírica bovina, BVDV) e IBR (rinotraqueitis bovina causada por el herpesvirus bovino tipo 1, BoHV-1) podrían estar jugando un papel significativo en los bajos índices de fertilidad en los rebaños extensivos incluidos en su estudio (70%). Estos autores también resaltaron la importancia de realizar controles para la detección de estos patógenos en toros empleados para la cría (Montoya-

Monsalve et al. 2021), ya que los agentes etiologicos de ambas enfermedades pueden ser transmitidos a las hembras de forma venérea donde pueden causar problemas reproductivos (Givens 2018).

Esta limitada disponibilidad de datos actualizados y completos sobre el papel del macho en la infertilidad bovina en el rebaño resulta llamativa, ya que se han descrito multitud de patógenos como potenciales agentes etiológicos de infertilidad en toros, y/o capaces de transmitirse a las hembras donde causan problemas reproductivos p.ej. BVDV, BoHV-1, *B. abortus*, *C. fetus*, *T. foetus*, *U. diversum*, *Leptospira* spp., *H. somni*, *Chlamydia* spp. o *C. burnetii* (Givens y Marley 2008; Yoo 2010; Givens 2018). Con base en los datos publicados hasta el momento, en la presente memoria de tesis doctoral se ha establecido como objetivo prioritario mejorar la comprensión sobre el papel del macho en los problemas de infertilidad infecciosa de los rebaños. Dicho conocimiento es limitado actualmente, algo que es especialmente importante porque el macho puede influir en los problemas de fertilidad de origen infeccioso en los rebaños de dos maneras principales: i) debido a problemas derivados de patógenos que afectan directamente a la capacidad de concepción del toro [p.ej. *B. abortus* (Joya et al. 2011)], y ii) respecto a las alteraciones debidas a la transmisión de patógenos que afectan a la fertilidad de las vacas aunque *a priori* no presenten ningún impacto negativo en los machos, p.ej. *T. foetus* (Michi et al., 2016). De este modo, los estudios dirigidos, de una parte, a la mejora en el conocimiento sobre el papel del toro como elemento clave en los problemas de infertilidad infecciosa en rebaños bovinos, así como, de otra parte, orientados al desarrollo de alternativas para control de patógenos en toros reproductores, resultan ser de importancia para la mejora de la eficiencia productiva de los sistemas de producción de ganado bovino en régimen extensivo.

En este escenario, la revisión sistemática de la literatura científica sobre las causas de infertilidad en rebaños bovinos debido a la presencia de uno o más microorganismos en toros podría ser una herramienta útil para disponer de un compendio actualizado de todos aquellos microorganismos potencialmente presentes en toros que pudieran ser la causa de problemas reproductivos en los rebaños. Esto permitiría tener una visión transversal del conocimiento actual sobre este tema,

poniendo de manifiesto las necesidades prioritarias sobre estudios que permitan esclarecer el verdadero papel del toro como actor principal en los problemas de infertilidad de origen infeccioso en los rebaños. Como se ha comentado previamente, el bajo número de estudios sobre infertilidad de carácter infeccioso en machos reproductores refuerza la idea de que el conocimiento que tenemos acerca de la importancia de determinadas infecciones sobre su capacidad reproductiva y los índices de fertilidad de los rebaños podría ser limitado.

Como se ha señalado previamente en esta memoria, la literatura científica recoge diferentes microorganismos asociados a infertilidad en el toro: BVDV, BoHV-1, *C. fetus*, *T. foetus*, *B. abortus*, *Leptospira* spp., *Mycoplasma* spp., *U. diversum* y *Coxiella burnetii* (Givens y Marley 2008; Givens 2018). Algunos de ellos han sido previamente descritos como microorganismos relevantes debido a que son causa de importantes pérdidas económicas como p.ej. los ya mencionados BVDV y BoHV-1 (Grooms 2004; Montoya-Monsalve et al. 2021) o *C. fetus* y *T. foetus* (Michi et al., 2016; WOAAH, 2018, 2021). Estos dos últimos agentes siguen siendo actualmente responsables de enfermedades de gran importancia en áreas de España donde la producción de ganado bovino se realiza en régimen extensivo y donde la monta natural se utiliza como práctica habitual. Estos patógenos son causantes de enfermedades de declaración obligatoria de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 526/2014, como son la campilobacteriosis genital bovina (CGB) (cuyo agente etiológico es *Cfv*) y la tricomonosis o tricomoniasis bovina (cuyo agente etiológico es *T. foetus*). En este escenario, la mejora de abordajes ya disponibles e implementación de nuevas alternativas para la detección de microorganismos, incidiendo en los patógenos más relevantes en producción en régimen extensivo en nuestro país (*C. fetus* y *T. foetus*), son aproximaciones que pueden contribuir a mejorar de forma relevante el conocimiento acerca del verdadero papel del macho en referencia a los problemas de infertilidad infecciosa en rebaños de ganado bovino criado en extensivo, así como, en última instancia, favorecer la optimización del control de microorganismos causantes de infertilidad mediante su detección y la implementación de medidas preventivas para evitar su dispersión.

1.5.1. *Campylobacter fetus*. Características generales del microorganismo y la enfermedad

Como se ha mencionado previamente, la infección por *C. fetus* en ganado bovino criado en sistemas extensivos es una de las principales causas de infertilidad infecciosa, suponiendo importantes pérdidas económicas para los ganaderos, principalmente debido a infecciones por la subespecie Cfv (Michi et al. 2016; WOAAH 2021). Cfv es el agente etiológico de la CGB, enfermedad de transmisión venérea caracterizada por causar infertilidad, muerte embrionaria temprana y abortos en vacas (WOAH 2021). Como ya se ya citado, en España la CGB es una enfermedad de declaración obligatoria de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 526/2014.

La especie *C. fetus* es una de las 43 especies actualmente registradas dentro del género *Campylobacter* spp. (NCBI 2022). Se trata de un bacilo Gram-negativo de morfología curva y con un flagelo que le confiere movilidad. Esta bacteria requiere de una atmósfera microaerófila para su crecimiento siendo capaz de multiplicarse entre 25 y 37°C, aunque también existen cepas capaces de crecer a 42°C (Wagenaar et al. 2014). El crecimiento de colonias observables a simple vista en cultivo requiere entre 2 y 5 días, siendo estas rosáceas, redondas, convexas, lisas y brillantes, y de borde notablemente regular (WOAH 2021). Hasta la fecha se han identificado tres subespecies: i) *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv), que incluye el biovar *intermedius*, ii) *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) y iii) *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft) la cual no ha sido aislada hasta la actualidad en bovino, siendo los reptiles su reservorio principal (Patrick et al. 2013).

Las subespecies presentes en bovino son Cfv y Cff (WOAH 2021). Mientras que Cfv ha sido identificada como la principal causa de infertilidad en ganado bovino, las infecciones en el tracto reproductivo por Cff resultan ser más anecdóticas (Mshelia et al. 2010; WOAAH 2021), si bien también han sido asociadas a infertilidad en determinados casos (Mshelia et al. 2010), presumiblemente debido a su efecto negativo en la calidad espermática de toros (Cagnoli et al. 2020). El reservorio primario de Cfv son los bovinos y Cff los ovinos [donde Cff es uno de los agentes etiológicos de campilobacteriosis ovina, caracterizada por causar abortos en las hembras (Dorsch et al. 2022)] aunque también ha sido aislado de otros grupos de mamíferos (Van Bergen

et al. 2005), incluyendo a los seres humanos (Holst et al. 1987; Wagenaar et al. 2014), donde puede generar una gran variedad de síntomas, desde diarreas agudas o abortos en mujeres embarazadas, hasta cuadros sistémicos (Wagenaar et al. 2014).

En el toro, *C. fetus* se localiza y multiplica en las criptas prepuciales, siendo la venérea la principal vía de transmisión de este patógeno (Cagnoli et al. 2020). Además, se ha demostrado que Cfv, puede sobrevivir a la criopreservación del esperma (Givens 2018). Aunque no existen evidencias de supervivencia de Cff durante la criopreservación del esperma de toros reproductores, ningún dato publicado hasta la fecha hace pensar que no sea capaz de sobrevivir bajo las mismas condiciones que Cfv. Como ya se ha citado previamente, al generar infecciones asintomáticas en toros, *C. fetus* es capaz de transmitirse de forma silenciosa, lo que facilita que el patógeno circule entre los rebaños durante largos periodos de tiempo (García et al. 1983). Además, a medida que los toros envejecen, el tamaño y el número de las criptas del epitelio prepucial aumentan, aumentando con la edad del toro la probabilidad de tener infecciones crónicas, dificultando de este modo el manejo y eliminación de la enfermedad en el rebaño (Truyers et al. 2014).

En España, la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal del MAPA (MAPA 2019) señala las siguientes medidas de control y manejo de la enfermedad, de acuerdo a su epidemiología: "...en el caso en que se confirme la infección en un macho, no se utilizará para reproducción (monta natural u obtención de dosis seminales). Dada la falta de eficacia de los tratamientos antibióticos en machos mayores de 3 años, se aconseja su sacrificio si tienen más de esa edad y aplicar en los establecimientos programas de vacunación y de manejo reproductivo, como el uso de la inseminación artificial, evitar el uso de pastos de aprovechamiento en común por rebaños infectados, evitar el uso de machos comunales, control periódico de los sementales, uso de machos y novillas vírgenes como reposición, mantener la edad media de los machos tan baja como sea posible, separación de hembras vírgenes para su cubrición por macho vírgenes o negativos...".

Continuando con lo relativo a las medidas de prevención y control de la enfermedad, cabe citar que existe cierta controversia sobre la eficacia del empleo de vacunas como medida de control en

toros infectados por Cfv (Vasquez et al. 1983; Fóscolo et al. 2005; Erickson et al. 2017; Balzan et al. 2020). Los resultados de los estudios llevados a cabo sobre la eficacia de las vacunas como medida profiláctica frente a infecciones por *C. fetus* son difíciles de interpretar debido a que muchos de los trabajos encontrados en toros reproductores carecen de grupos control apropiados o no tienen en cuenta posibles diferencias en los resultados que puede tener el empleo de vacunas comerciales frente al uso de autovacunas producidas a partir de cepas aisladas en la propia explotación en la que se aplican (Erickson et al. 2017).

Por otra parte, para que las estrategias de manejo previamente mencionadas sean realmente eficaces, diferentes autores han apuntado que estas medidas deben acompañarse de chequeos microbiológicos (Joya et al. 2011; Hopper 2015). No obstante, las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de subespecies, cultivo y PCR, presentan limitaciones en términos de especificidad y sensibilidad (WOAH 2021), por lo que la mejora y el desarrollo de protocolos optimizados resultaría ser de gran utilidad para mejorar el diagnóstico, y en última instancia, para contribuir a la implementación de medidas adecuadas para el control de *C. fetus* en los rebaños de ganado bovino.

1.5.1.2. Detección de *C. fetus* en muestras clínicas de toros reproductores

Según las directrices de la Organización Mundial de Sanidad Animal [OMSA (WOAH en inglés), fundada como OMSA), el método recomendado para la identificación de *C. fetus* es el cultivo microbiológico para el aislamiento de *C. fetus* y su posterior caracterización fenotípica (Tabla 1) (WOAH 2021). No obstante, el aislamiento de *C. fetus* a partir de muestras clínicas, normalmente de lavados o raspados prepuciales, así como a partir de fetos sospechosos, resulta un proceso laborioso que además, en el caso de microorganismos exigentes como *C. fetus*, a menudo muestra una sensibilidad limitada, ya que estas bacterias son fácilmente superadas por bacterias comensales durante el cultivo (Chaban et al. 2013). Independientemente de la presencia de otros microorganismos de rápido crecimiento que actúan como contaminantes, la sensibilidad del

cultivo puede ser limitada debido a la susceptibilidad de *C. fetus* a las fluctuaciones de las condiciones atmosféricas y la temperatura que pueden tener lugar durante el transporte y conservación de las muestras (Koya 2016) y que afectan directamente a su supervivencia. De manera adicional, se ha comprobado mediante microscopía electrónica que las bacterias Gram-negativas (como *C. fetus*) pueden ser susceptibles de sufrir rotura de su pared debido al empleo de asas de Digrafsky durante su siembra en medios sólidos en placa (Hedderich et al. 2011), cuestión importante a tener en cuenta la hora de maximizar la viabilidad de la bacteria durante el manejo de la muestra para su cultivo.

Tabla 1. Técnicas de laboratorio actualmente empleadas para la detección de *C. fetus* en muestras clínicas de toros reproductores. Esta tabla está basada en la información recogida en la OMSA (WOAH 2021) donde se indican las técnicas empleadas para este fin (Técnica): PCR, reacción en cadena de la polimerasa; IFAT, prueba de anticuerpos inmunofluorescentes; Mab-ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas basado en anticuerpos monoclonales.

Técnica	Detección de <i>C. fetus</i>	Diferenciación de subespecies Cfv y Cff
PCR	Basada en la diana genética <i>nahE</i> (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013)	Basada en la diana genética <i>ISCefI</i> (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013)
Cultivo y análisis de los aislados	Recomendado el uso de medio selectivo Skirrow	Recomendado el uso de medio selectivo Skirrow
IFAT	Recomendada (Silveira et al. 2018)	No es un método apropiado
Mab-ELISA	Recomendado el uso del anticuerpo monoclonal M1825 (Devenish et al. 2005)	No se recomienda

El tiempo transcurrido entre la toma de muestras hasta su procesamiento es otra variable que influye en la viabilidad de *C. fetus* (Chaban et al. 2013), pudiendo verse reducida en función del tiempo que transcurra entre ambos pasos (Lander 1990a; Monke et al. 2002). Con el fin de preservar al máximo la viabilidad de *C. fetus* y maximizar las probabilidades de su aislamiento en laboratorio, se han desarrollado diferentes medios de transporte, enriquecimiento y de cultivo (Lander 1990a, b; Hum et al. 1994; Monke et al. 2002; Chaban et al. 2013; Koya 2016). No obstante, hasta el momento, no ha sido establecido un protocolo estandarizado para la toma, el transporte, la conservación y el aislamiento que maximice la recuperación de *C. fetus* a partir de

muestras clínicas de lavados prepuciales, y a su vez minimice la presencia de contaminantes en los cultivos. Así mismo, también se ha publicado información referente a algunos compuestos presentes en los medios de transporte, enriquecimiento y cultivo empleados para el aislamiento de *C. fetus* que parecen limitar su crecimiento (o, al menos, el crecimiento de algunas cepas), como p.ej. la polimixina B, un antibiótico que parece inhibir el crecimiento de Cff (Public Health Laboratory Network 2000) y algunas cepas de Cfv (Ballabene y Terzolo 1992) empleado para la fabricación del medio de enriquecimiento agar Brucella (Marcellino et al. 2015). En base a estos datos, se pone de manifiesto la necesidad de establecer protocolos optimizados que maximicen la recuperación de *C. fetus* a partir de muestras.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas empleadas para la diferenciación de *C. fetus* y sus subespecies de otras especies dentro del género *Campylobacter*. Tabla basada en la información recogida en el informe de la Organización de la Salud Mundial Animal (WOAH 2021), donde “+” y “-“ indican la obtención de resultados positivos y negativos, respectivamente, para las pruebas: i) si presenta o no actividad oxidasa, ii) si presenta o no actividad catalasa, iii) si presenta o no crecimiento en cloruro de sodio al 3,5% (NaCl), iv) si presenta o no crecimiento en presencia de glicina al 1 % y v) si produce o no sulfuro de hidrógeno (H₂S) en un medio que contiene 0,02% de cisteína.

	Actividad oxidasa	Actividad catalasa	NaCl 3.5%	Glicina 1%	H₂S (0,02% cisteína)
<i>Campylobacter fetus venerealis</i>	+	+ / -	-	-/+*	-/+**
<i>Campylobacter fetus fetus</i>	+	+	-	+	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+ / -	-	+ / -	+
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	+	+	-	+ / -	No determinado
<i>Campylobacter sputorum</i>	+	+ / -	+	+	No determinado

* Existen cepas pertenecientes al biovar *intermedius* que son tolerantes (Truyers et al. 2014). ** Existen cepas pertenecientes al biovar *intermedius* que son tolerantes (Van Bergen et al. 2005; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013; Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014).

Con respecto a la identificación de los aislados a través de pruebas bioquímicas, *C. fetus* se caracteriza por presentar una baja actividad bioquímica (Tabla 2), lo que dificulta su diferenciación de otras especies del género *Campylobacter*, así como la diferenciación de subespecies (Schulze et al. 2006). En la Tabla 2 se puede observar cómo la prueba de la oxidasa, la prueba de la catalasa, la prueba de la glicina al 1% y la prueba de generación de H₂S no resultan

ser adecuadas para la diferenciación inequívoca de *C. fetus* con respecto a otras especies como *C. jejuni*, *C. hyointestinalis* o *C. sputorum*. Por otra parte, la ausencia de crecimiento de *C. fetus* en un medio con un 3,5% de NaCl no permite su diferenciación de especies como *C. jejuni* y *C. hyointestinalis*. De igual modo, el perfil bioquímico de las subespecies Cfv y Cff puede ser el mismo (Van Bergen et al. 2005; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013; Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014; Delpiazzo et al. 2021). Es por ello, que la diferenciación de subespecies mediante esta aproximación presenta importantes limitaciones.

Una alternativa para la detección directa de *C. fetus* en muestras clínicas es el empleo de técnicas moleculares como aquellas basadas en la detección del material genético de la bacteria. La OMSA define la PCR como una prueba válida para la identificación de *C. fetus* (Tabla 1), indicando como ejemplo el gen *nahE* como diana molecular para la identificación de esta especie (WOAH 2021). Sin embargo, el estudio comparativo de Van der Graaf-van Bloois y colaboradores (2013) en el que se basa esta observación de la OMSA (WOAH 2021), no incluye el total de dianas genéticas descritas en la bibliografía para técnicas PCR orientadas a la detección de *C. fetus* y la diferenciación de Cfv y Cff, ni una evaluación del rendimiento diagnóstico de estos protocolos empleando muestras clínicas procedentes de toros reproductores. Esto hace que las conclusiones derivadas de dicho trabajo puedan estar sesgadas, siendo útil por ello la realización de un análisis comparativo actualizado y completo.

En la actualidad y de acuerdo a las publicaciones disponibles hasta la fecha, las dianas genéticas empleadas para la identificación de la subespecie de *C. fetus* son: i) *nahE* (Abril et al. 2007; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013), que codifica una proteína de la familia del intercambiador de sodio/hidrógeno, ii) la subunidad 16S del ARN ribosómico (ARNr) (Iraola et al. 2016), implicada en la traducción del ARN mensajero (ARNm) a proteínas, iii) *gyrB* (Persson et al. 2012), que codifica la subunidad B de la ADN girasa implicada en la replicación del ADN, iv) *cpn60* (Chaban et al. 2009), que codifica chaperona 60kDa, v) *cstA* (Hum et al. 1997), que codifica el dominio C-terminal de la proteína A de inanición de carbono cuya función es aún desconocida (referencia

InterPro: IPR025299) y vi) *cdtB* (Kamei et al. 2014), que codifica la toxina de distensión citoletal B, generada por algunas bacterias Gram-negativas y que presenta actividad ADNasa.

Por otra parte, para la diferenciación de la subespecie Cfv se describen en la bibliografía las siguientes dianas genéticas: i) *ISCfe1*, una secuencia de inserción que trunca el gen *nahE* en la subespecie Cfv y que podría estar relacionado con su capacidad infectiva (Abril et al. 2007; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013), ii) *parA* (Hum et al. 1997), que codifica la proteína A de partición plasmídica involucrada en la repartición de los plásmidos entre células madres e hijas y iii) *virB11* (Iraola et al. 2012), que codifica el factor de virulencia B11 implicado en la invasión celular. Sin embargo, solo existe una diana de PCR publicada, *sapB2*, para la identificación de la subespecie Cff, empleada en el trabajo de Wang et al. (2002) que codifica la proteína de superficie B2, cuya función es aún desconocida (Referencia UniProt: O52781).

Se ha de considerar que el uso de algunas de estas dianas genéticas no está exento de inconvenientes. Por ejemplo, recientemente se ha publicado información sobre la ausencia de *virB11* y *parA* en algunas cepas de Cfv (Silva et al. 2021), lo que se puede traducir en falsos negativos para aquellas técnicas basadas en estas dianas para la detección de Cfv. Por otro lado, se ha descrito la presencia de la diana *ISCfe1* en genomas diferentes al de Cfv, lo que puede dar lugar a la obtención de falsos positivos (Silva et al. 2020), aparte de ser una región genómica relativamente variable, lo que podría dar lugar también a falsos negativos (Abdel-Glil et al. 2020). Esto pone de manifiesto la relevancia de disponer de técnicas PCR basadas en dianas específicas, estables y bien representadas en el genoma de *C. fetus* para evitar errores en el diagnóstico y las consecuencias que ello puede conllevar en el manejo de la CGB en las explotaciones.

Así, la dificultad en la detección de *C. fetus* y la diferenciación de subespecies a partir de muestras clínicas mediante la técnica de PCR sigue siendo actualmente un problema que limita el conocimiento sobre la verdadera relevancia de Cfv y Cff en la infertilidad bovina. Algunos autores han señalado que la diferenciación de subespecies de *C. fetus* parece poder llevarse a cabo únicamente mediante la secuenciación completa de genomas, una técnica que en la actualidad no está implementada en los laboratorios diagnósticos, en gran medida, debido al elevado coste de

las técnicas de secuenciación y a la necesidad de que la interpretación de los resultados obtenidos se lleve a cabo por personal especializado (Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014). En este escenario, disponer de un protocolo de PCR que maximice la sensibilidad y especificidad del ensayo de PCR para la detección *C. fetus* y la diferenciación de Cfv y Cff se postula como prioritario y de gran relevancia para el diagnóstico de CGB por parte de los laboratorios clínicos de una forma rápida y económica, así como para el estudio de *C. fetus* como agente etiológico de infertilidad bovina.

Por último, se han desarrollado protocolos que hacen uso de técnicas basadas en inmunoensayos para la detección directa de antígenos del agente infeccioso en muestras clínicas (Tabla 1). Un ejemplo es la prueba de anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT) aplicada sobre muestras prepuciales de toros reproductores. La sensibilidad y especificidad de la técnica es menor en comparación con otras técnicas, como la técnica PCR, a lo que se suma el hecho de que la interpretación de resultados requiere de personal bien entrenado (Silveira et al. 2018). Otro ejemplo es el empleo de anticuerpos monoclonales para la detección de la especie *C. fetus* (anticuerpo M1825) en muestras de lavados prepuciales de toros reproductores. En este caso, Brooks et al. (2004) y Devenish et al. (2005) obtuvieron muy buenos resultados respecto a la especificidad y sensibilidad de la técnica comparada con el cultivo. No obstante, resulta ser menos fiable cuando se trata de discriminar entre subespecies, para lo cual sería necesario el empleo de otras técnicas (WOAH 2021), convirtiéndose de este modo en un protocolo de identificación laborioso y de difícil implementación.

1.5.2. *Tritrichomonas foetus*

En España, otro de los microorganismos de identificada relevancia en referencia a infertilidad infecciosa en bovino extensivo es *T. foetus*, que es el agente etiológico de la tricomonosis bovina, una enfermedad de declaración obligatoria de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto

526/2014. El parásito *T. foetus* es un protozoo flagelado (Taylor et al. 1994) carente de mitocondrias (Figura 1). En su lugar se encuentra un orgánulo característico, el hidrogenosoma (Embley et al. 2003), que regula el metabolismo del parásito (Dąbrowska et al. 2019b). No se ha documentado la formación de quistes en *T. foetus* pero sí ha sido descrita la formación de pseudoquistes bajo condiciones ambientales adversas (Pereira-Neves y Benchimol 2009). Este parásito presenta un citoesqueleto complejo que constituye el sistema mastigonte de este protozoo (de Andrade Rosa et al. 2013) compuesto *a grosso modo*, por tres estructuras principales (Figura 1): i) el cuerpo basal y pelta situados en la región anterior seguida por ii) el axostilo, una estructura tubular que se abre en la región anterior formando el capitulum, atraviesa longitudinalmente a todo el microorganismo y sobresale en la parte posterior, y por último iii) la costa, una estructura que parece ser la responsable del movimiento de la membrana ondulante.

En ganado bovino, como se ha comentado anteriormente, *T. foetus* es el agente etiológico de la tricomonosis bovina (Dąbrowska et al. 2019b), caracterizada por causar infertilidad en vacas mientras que los toros normalmente permanecen asintomáticos causando una infección persistente durante largos periodos de tiempo (Michi et al. 2016). Este parásito es capaz de transmitirse a través de la monta e IA pudiendo sobrevivir a la criopreservación del espermatozoides (Givens 2018).

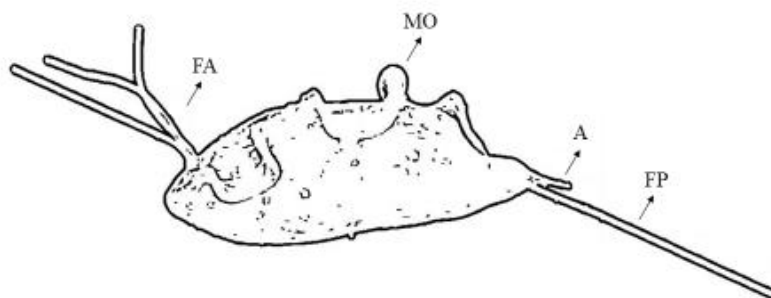


Figura 1. Esquema morfológico de *T. foetus*. Dibujo basado en la imagen tomada por microscopía electrónica publicada en el trabajo (Andrade Rosa et al. 2013). Se muestran los tres flagelos anteriores (FA), la membrana ondulante (MO), el axostilo (A) y el flagelo posterior (FP).

Respecto a otros hospedadores, se han descrito infecciones por *T. foetus* en gatos siendo su diana principal el tracto gastrointestinal, en concreto el intestino grueso. En estos animales, la infección cursa con diarrea con heces de color verde-amarillento (características de la colitis) y que pueden incluir la presencia de sangre y mucosidad, inflamación en la región anal y prolapso rectal (Bastos et al. 2019). También se ha identificado mediante PCR en heces de perros que cursaban un cuadro diarreico (Gookin et al. 2005). Por último, *T. foetus* resulta ser un microorganismo comensal en la cavidad nasal y el tracto gastrointestinal de ganado porcino (Dąbrowska et al. 2019b). No obstante, existe un caso descrito en el que la infección por *T. foetus* en el tracto respiratorio se identificó como la causa de disnea en un lechón de 40 días de edad (Shi et al. 2017).

Con respecto a la clasificación de *T. foetus* en función del hospedador, hay controversia en el grado de diferenciación de los genotipos bovino, felino y porcino. Si bien existen estudios en los que determinadas regiones genómicas no presentan diferencias notables para establecer una clara diferenciación entre genotipos (Šlapeta et al. 2012), también existen otros que describen regiones variables (Pedraza-Díaz et al. 2019) como el gen que codifica para la cisteína proteasa 2 (CP2) (propuesto como posible elemento genético relacionado con la interacción parásito-hospedador) (Šlapeta et al. 2012; Dąbrowska et al. 2020).

En toros, el parásito se ubica específicamente sobre la superficie del epitelio escamoso estratificado del pene y el prepucio proximal en el área del fórnix (Mendoza-Ibarra 2013). Los toros adquieren multitud de nuevos plegamientos de este epitelio con la edad (como ya se ha comentado), aumentando el número de criptas donde se puede desarrollar y albergar *T. foetus* (Rhyan et al. 1999).

En España, de acuerdo al Programa de Vigilancia y Control de la tricomonosis bovina del MAPA, de en el caso en el que se confirme la infección de un toro reproductor por *T. foetus*, se recomienda su sacrificio y la aplicación de medidas de manejo reproductivo que minimicen el contagio de *T. foetus* entre animales (BOE 2014). , como evitar el uso de pastos comunales que sean también

empleados por rebaños positivos a *T. foetus*, evitar el uso de machos comunales, emplear machos y novillas vírgenes como reposición o el chequeo periódico de los sementales (MAPA 2022).

En este contexto, el uso de chequeos microbiológicos resulta ser un abordaje útil para la mejora en el diagnóstico, y en última instancia, para la implementación de medidas adecuadas para el control de *T. foetus* en los rebaños. No obstante, las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas para la detección de *T. foetus* (cultivo seguido de identificación morfológica mediante microscopía y PCR) presentan limitaciones de especificidad y sensibilidad (Midlej et al. 2011; Frey et al. 2017; WOAAH 2018; Dąbrowska et al. 2019a), por lo que la mejora de protocolos disponibles e incluso el desarrollo de nuevos protocolos resulta ser un abordaje útil para la mejora del diagnóstico y la implementación de medidas de manejo de esta enfermedad.

1.5.2.1. Detección de *Tritrichomonas foetus* en muestras clínicas de toros reproductores

La detección de *T. foetus* se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante el análisis morfológico del parásito a través de microscopía directa de las muestras (lavados o raspados prepuciales, lavados vaginales o fetos sospechosos) o de los aislados recuperados previamente mediante cultivo (WOAH 2018). Se ha de considerar que el muestreo y el transporte de muestras clínicas puede impactar de forma negativa en el ratio de detección de *T. foetus* mediante microscopía así como afectar negativamente a la viabilidad de *T. foetus* y, por tanto, a la capacidad de ser cultivado *in vitro* (Yao 2013). Por otra parte, la morfología de *T. foetus* es muy similar a la de otras especies del género *Tritrichomonas* (Midlej et al. 2011), por lo que la correcta observación y diferenciación de especies por microscopía requiere personal entrenado y experimentado, estando sujeta en cualquier caso a limitaciones de especificidad diagnóstica. Por su parte, el ensayo ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) basada en la detección de anticuerpos específicos frente a *T. fetus*, no resulta ser una técnica robusta debido a la débil respuesta inmune humoral detectable

frente a la infección por *T. foetus* en los machos, por lo que se desaconseja su uso para el diagnóstico de esta patología (WOAH 2018).

En este contexto, actualmente muchos laboratorios clínicos optan por la detección de *T. foetus* en muestras diagnósticas a través de técnicas moleculares. La OMSA recoge en el Capítulo 3. 4.15 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de 2018 (WOAH 2018) el uso de la técnica PCR descrita por McMillen y Lew (2006) como una alternativa válida para la detección de *T. foetus* en muestras procedentes del tracto reproductivo en bovino. Dicha técnica está dirigida a la diana ARNr-ITS, una región genómica que comprende los genes que codifican para el 18S, 5.8S, y 28S ARNr y espaciadores internos de la transcripción 1 y 2 (ARNr-ITS) (Figura 2). La diana ARNr-ITS es multicopia (Chakrabarti et al. 1992) y ha sido empleada para el diseño de prácticamente la totalidad de las técnicas de PCR publicadas hasta la fecha para la detección de *T. foetus* en muestras clínicas (Dąbrowska, et al., 2019a; Felleisen, 1997; Ginter Summarell et al., 2018; Gookin et al., 2002, 2005; McMillen y Lew, 2006; Mueller et al., 2015; Nickel et al., 2002).

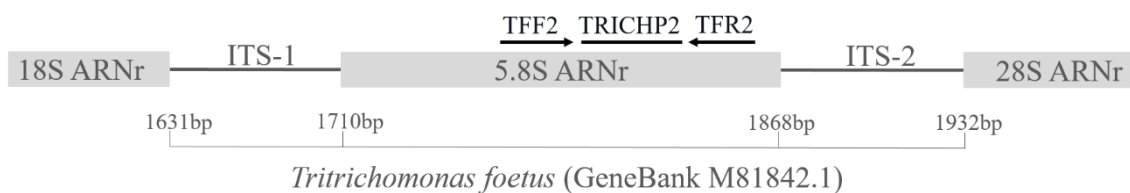


Figura 2. Cebador sentido (TFF2 5'-GCGGCTGGATTAGCTTTCTTT-3'), antisentido (TFR2 5'-GGCGCGCAATGTGCAT-3') y sonda (TRICH2P2 5'-6-FAM-ACAAGTTCGATCTTTG-MGB-BHQ-3') empleadas por el trabajo de McMillen y Lew (2006) para la detección de *Trichostrongylus axei* en muestras clínicas y su localización dentro de la diana ARNr-ITS (18S, 5.8S, y 28S ARNr y los espaciadores internos de la transcripción 1 y 2).

A pesar del número relativamente alto de protocolos de PCR descritos para la detección de *T. foetus*, no se ha publicado ningún estudio comparativo de todos estos protocolos en relación con su rendimiento diagnóstico en muestras prepuciales procedentes de toros reproductores. Un

estudio comparativo a este nivel permitiría valorar la sensibilidad y especificidad analítica de los diferentes protocolos de PCR, así como el rendimiento en muestras clínicas determinando aquel que presente mejores resultados.

Por último, se ha de destacar que se han publicado algunos trabajos que describen reacciones cruzadas con otras especies o géneros filogenéticamente próximos como *Tritrichomonas mobilensis* (Dąbrowska et al., 2019a) o *Simplicimonas* spp. (Frey et al. 2017). Presumiblemente estas reacciones cruzadas serían debidas a la elevada similitud de la región genómica ARNr-ITS en distintas especies de *Tritrichomonas*. Además, *Simplicimonas* spp. se ha descrito en muestras vaginales de vacas y novillas (Frey et al. 2017), lo que se traduce en la potencial obtención de falsos positivos a partir de este tipo de muestras. Es por ello por lo que la existencia de técnicas de PCR diseñadas sobre dianas alternativas a la región genómica ARNr-ITS para la detección de *T. foetus* resultaría ser una herramienta útil para la confirmación de resultados positivos cuando fuera necesario.

Hasta la fecha se han descrito solo dos dianas genéticas alternativas a ARNr-ITS para el desarrollo de protocolos PCR de *T. foetus*: i) microsatélite *TfRE* (Ho et al. 1994), una región *a priori* altamente repetitiva (en tándem) para la que se encuentra poca información publicada, tan solo una referencia en la base de datos GenBank (AY435432.1), correspondiente a una secuencia de 170 pares de bases, y ii) el gen que codifica para la beta-tubulina 1, para el que existe un kit de PCR comercial (WOAH 2018). El trabajo de Ho y colaboradores describe un protocolo de PCR basado en el microsatélite *TfRE*, si bien el número de trabajos que han empleado este protocolo de PCR es escaso (Ho et al. 1994; Riley et al. 1995). Asimismo, en el trabajo de Felleisen y colaboradores (1998) se sugiere que la PCR de Ho y colaboradores parece dar lugar a amplificaciones inespecíficas en una tercera parte de las muestras testadas en un trabajo de tesis previo a la publicación de dicho artículo. Con respecto a la técnica de PCR dirigida sobre el gen *beta-tubulina 1* indicado en el informe de la OMSA (WOAH 2018), también es muy limitada la información científica disponible, no existiendo información publicada sobre la validación de

dicha técnica ni sobre su comparación con otros protocolos de PCR empleados para la detección de *T. foetus*.

Por otro lado, también en el campo del diagnóstico molecular, se ha descrito un método de detección de *T. foetus* alternativo a la técnica PCR: la técnica LAMP (“*Loop-Mediated Isothermal Amplification*”). Esta técnica consiste en la amplificación de cadenas de ácidos nucleicos empleando una temperatura constante a 60 – 65°C y la combinación de seis cebadores (por lo general) y una enzima polimerasa, donde el producto de amplificación puede detectarse a simple vista en función de la presencia de un precipitado de pirofosfato de magnesio, subproducto de la amplificación. Respecto a la detección de *T. foetus*, se han descrito dos técnicas LAMP dirigidas sobre las dianas *beta-tubulina 1* (Dąbrowska, et al., 2019a) y *EF1-alfa-Tf1* (Oyhenart 2018). De acuerdo a un estudio comparativo reciente llevado a cabo en el trabajo de Dąbrowska y colaboradores (2019a) con muestras fecales de gatos que presentaban diarrea, ambos protocolos parecen presentar una menor sensibilidad y las mismas limitaciones de especificidad que las técnicas de PCR diseñadas sobre la región ARNr-ITS, dando resultados positivos tanto para *T. foetus* como para *T. mobilensis* (Dąbrowska, et al., 2019a). No obstante, la especie *T. mobilensis* es una especie que no ha sido aislada en bovino, encontrándose en el intestino de las especies de primates *Saimiri sciureus* y *Saimiri boliviensis* (Scimeca et al. 1989). Pese a los resultados obtenidos en el trabajo de Dąbrowska y colaboradores (2019a) sobre muestras fecales de gato, en el trabajo de Oyhenart (Oyhenart 2018), donde se describió por primera vez el protocolo LAMP dirigido sobre el gen *EF1-alfa-Tf1* para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toro, se presentó una alta sensibilidad analítica (0,5 trofozoítos/mL) y una buena especificidad de la técnica al no obtenerse amplificaciones con muestras portadoras de *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp., protozoos comúnmente confundidos con *T. foetus*.

En este contexto, la diana *EF1-alfa-Tf1* podría ser una diana candidata para el diseño de una técnica PCR alternativa para la confirmación de la presencia de *T. foetus* en muestras prepuciales procedentes de toros reproductores. Hasta el momento, ninguna PCR específica para la detección de *T. foetus* ha sido diseñada sobre esta diana genética, la cual, parece ser una diana alternativa a

la región ARNr-ITS y *beta-tubulina 1*, de gran utilidad en casos donde sea necesario una confirmación de resultados positivos (p.ej. cuando existen dudas de amplificaciones inespecíficas).

1.6. Nuevos abordajes para la detección y el estudio de microorganismos asociados a infertilidad en toros reproductores: secuenciación masiva

La gran mayoría de las publicaciones científicas orientadas a la detección de microorganismos asociados a infertilidad en muestras clínicas procedentes de bovinos se basan en técnicas tradicionales como cultivo, inmunoensayos como ELISA y diferentes variantes de técnicas basadas en la PCR. No obstante, el empleo de estas técnicas tradicionales podría limitar el conocimiento que tenemos acerca de la infertilidad por causas infecciosas en ganado bovino debido a las limitaciones de las propias técnicas empleadas. Por ejemplo, el empleo de los cultivos impide la detección de microorganismos debido a que muchos de ellos no son cultivables (Rappé y Giovannoni 2003). Por su parte, las técnicas analíticas ELISA y PCR suelen estar dirigidas a la detección de microorganismos específicos (o a detección de la respuesta del individuo al contacto con los mismos), por lo que con este tipo de técnicas es posible pasar por alto la presencia de otros microorganismos de importancia en referencia a infertilidad en bovino no considerados en los análisis rutinarios, así como posibles relaciones sinérgicas (considerando tanto microorganismos de asociación demostrada con la infertilidad como a potenciales patógenos que aún no hayan sido asociados a esta).

Por otro lado, para algunos microorganismos relacionados con la infertilidad bovina, aún hoy existen serias limitaciones en relación a la disponibilidad de técnicas para su detección en muestras clínicas debido a la escasez de trabajos donde se establecen protocolos de detección, así como a la falta de controles rutinarios, por ejemplo, de *U. diversum* o *Mycoplasma* spp. En hembras, *U. diversum* puede causar vulvovaginitis granular, salpingitis, endometritis, placentitis y alveolitis fetal, alteraciones que pueden provocar abortos y el nacimiento de terneros débiles

(Santos Junior et al. 2021), En el caso de los machos, *U. diversum* parece afectar de forma negativa a la espermatogénesis y es capaz de adherirse a la membrana espermática de los espermatozoides, lo que afecta a la funcionalidad y movilidad de los espermatozoides (Hobson et al. 2013). Asimismo, esta bacteria también parece estar relacionada con casos de vesiculitis seminal, balanopostitis y epididimitis (Santos Junior et al. 2021). Cabe citar también que *U. diversum*, de igual modo a lo descrito para *C. fetus* y *T. foetus*, puede ser transmitido a través de la monta natural y de la IA (Hobson et al. 2013; Givens 2018). Un caso similar es el de *Mycoplasma bovis*, que pese a haber sido asociado a infertilidad en bovino desde hace años pudiendo causar problemas reproductivos en hembras y pudiendo disminuir la calidad espermática en toros, así como ser transmitido a las hembras (Tourtellotte y Lein 1976; LaFaunce y McEntee 1982; Saed y Al-Aubaidi 1983), aun hoy existen pocos trabajos centrados en su detección en muestras clínicas de toros reproductores.

Actualmente existen abordajes alternativos para la detección y estudio de microorganismos de forma simultánea, así como para el estudio de la dinámica y el comportamiento de poblaciones microbianas en su conjunto, sin la necesidad de emplear cultivos o inmunoensayos (Ferone et al. 2020). Un ejemplo de esta aproximación es la secuenciación masiva, que resulta ser una técnica muy potente en la detección y caracterización de microorganismos. En los últimos años esta técnica ha revolucionado el campo del entendimiento de las enfermedades infecciosas al hacer posible la detección simultánea de multitud de microorganismos presentes en una determinada muestra clínica, así como el estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas mediante el análisis del microbioma, el proteoma o el metaboloma (Van Borm et al. 2015). Así, cabe citar que una técnica de secuenciación masiva para el estudio de la composición de poblaciones de microorganismos presentes en una muestra clínica es la metagenómica (Handelsman et al. 1998).

En la actualidad, los estudios metagenómicos de poblaciones microbianas presentes en muestras clínicas consisten en el análisis del genoma de las diferentes especies a través de análisis bioinformáticos llevados a cabo sobre las secuencias genómicas obtenidas a partir de secuenciación masiva de determinados “*barcodes*” (regiones genómicas altamente conservadas

en términos evolutivos y que a su vez presentan la variabilidad suficiente para la discriminación de especies). Los *barcodes* más comúnmente empleados en la actualidad son: i) para bacterias: la región V3-V4 del gen del *16S* ARNr (Bharti y Grimm 2021), aunque el gen *gyrB* también parece ser un buen candidato (Poirier et al. 2018); ii) para hongos: las regiones ITS (“*internal transcribed spacer*”), con resultados controvertidos (Lücking et al. 2020), y el gen del *18S* ARNr (Tkacz et al. 2018), iii) para virus: se emplea la secuenciación “*Shotgun*” (Roux et al. 2021). Pese a ser un análisis empleado desde hace más de una década como una herramienta para la investigación de microorganismos en el ámbito de la ecología (Tyson et al. 2004), aún no está implementada como técnica diagnóstica en el campo de la veterinaria, en parte, debido al elevado coste que supone su empleo (Kumar, 2019).

Una prometedora alternativa reciente al empleo de *barcodes* o secuenciación *Shotgun* para la clasificación de microorganismos presentes en muestras biológicas de animales parece ser la secuenciación de genomas completos en tiempo real mediante la nueva tecnología que ofrecen los secuenciadores portátiles de última generación (Lamb et al. 2020). Esta nueva tecnología es capaz de secuenciar los genomas presentes en una muestra clínica sin necesidad de generar previamente librerías, abaratando así los costes del ensayo. Las cadenas de nucleótidos atraviesan unos poros proteicos en el secuenciador que actúan como biosensores que van determinando el orden de las bases nitrogenadas en las cadenas nucleotídicas mediante la detección de fluctuaciones en la corriente iónica que se genera con el paso de los nucleótidos por el biosensor (Wang et al. 2021). No obstante, como ya se comenta en este último trabajo, aún quedan aspectos que mejorar sobre las tasas de error en las lecturas de secuencias, que actualmente superan a las obtenidas mediante otras técnicas de secuenciación masiva, como por ejemplo la tecnología empleada para los análisis metagenómicos ya citados (Poirier et al. 2018; Tkacz et al. 2018; Bharti y Grimm 2021; Roux et al. 2021; Wang et al. 2021).

Los estudios metagenómicos en veterinaria aún son muy escasos siendo especialmente limitados en lo que respecta al análisis de muestras prepucciales de toros reproductores (Wickware et al. 2020). Hasta nuestro conocimiento, existe un único trabajo publicado en esta área determinándose

que la composición de las poblaciones bacterianas de muestras prepucales de toros no se diferencian de manera significativa en función de variables como la alimentación, el uso de antibióticos o el historial de cría (Wickware et al., 2020). La ausencia de estudios de este tipo limita el conocimiento acerca de las poblaciones microbianas potencialmente asociadas a infertilidad bovina presentes en toros reproductores tanto para la identificación de microorganismos asociados a patologías reproductivas desconocidos hasta la fecha como para la determinación de relaciones sinérgicas y coinfecciones de agentes infecciosos asociados a problemas de fertilidad en toros.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. *Hipótesis*

El sector vacuno de carne tiene una gran relevancia en España representando, aproximadamente el 15,3% de la producción ganadera y el 5,8 % de la producción agraria [datos de 2020, (MAPA de España, 2021)]. Además, España es el tercer país de la UE en importancia respecto al sector de vacuno de carne generando, 677.000 toneladas de carne en 2020 (MAPA 2021). El sistema productivo que soporta el grueso de esta producción en España se corresponde con sistemas ganaderos extensivos donde la fertilidad es crucial para el adecuado rendimiento de esta producción. Sin embargo, estos sistemas suelen presentar bajos porcentajes de fertilidad (69,5% de media en 2020) (SITRAN 2021) en comparación al valor medio registrado en la Unión Europea (superior al 80%) [dichos índices estiman la relación entre el número de terneros registrados en un año (total hijos) y el número de vacas nodrizas presentes (total madres), expresado en porcentaje] (González-Rodríguez 2016; SITRAN 2021). Este índice es un factor esencial que determina el coste de una vaca para una explotación, lo que impacta de forma directa en la viabilidad económica de la misma, además de las repercusiones a nivel productivo que ello acarrea.

La infertilidad debida a agentes infecciosos es uno de los puntos clave en los bajos índices de fertilidad que frecuentemente se observan en sistemas bovinos extensivos, donde además algunos de los patógenos responsables de infertilidad tienen un carácter zoonótico. Resulta de especial importancia considerar el papel de los machos en relación con la infertilidad de origen infeccioso ya que existen muchas limitaciones en el conocimiento sobre el impacto que determinados microorganismos tienen en la fertilidad de los machos empleados para la cría y el papel de los toros en la transmisión venérea de patógenos. A esta limitación en el conocimiento se le suma el limitado número de controles microbiológicos rutinarios que se llevan a cabo en machos reproductores para multitud de patógenos potencialmente relevantes, pese a que, en sistemas

bovinos extensivos, un mismo macho puede ser empleado para la cubrición de varias hembras a través de la monta (práctica habitual en estos sistemas, pero de especial riesgo en la transmisión venérea).

Pese a la escasa información publicada sobre microorganismos que puedan afectar a la fertilidad de los toros (que puede pasar desapercibidos en los controles rutinarios), en España (y a nivel mundial) se han identificado dos patógenos primarios de importancia en las poblaciones de toros criados en régimen extensivo y empleados como reproductores: *C. fetus* y *T. foetus*. Existen una serie de factores que permiten entender la relevancia de estos patógenos y las dificultades que presentan para su control. En primer lugar, no existe un tratamiento eficaz para su control en toros reproductores (Vasquez et al. 1983; Fóscolo et al. 2005; Michi et al. 2016; Erickson et al. 2017; MAPA 2019, 2022; Balzan et al. 2020). En segundo lugar, ambos patógenos son capaces de transmitirse de machos a hembras a través de la monta y la inseminación artificial (Givens 2018), donde los machos pueden actuar como reservorios debido a que en ellos las infecciones resultan asintomáticas, pasando fácilmente desapercibidas (Michi et al. 2016). Por último, muchas de las técnicas diagnósticas empleadas de manera rutinaria para la detección de estos microorganismos en lavados prepuciales (muestra de elección) no están exentas de limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad, lo que podría estar comprometiendo el rendimiento diagnóstico y por tanto dificultando su detección en los rebaños (Lander 1990a; Monke et al. 2002; Midlej et al. 2011; Chaban et al. 2013; Yao 2013; Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014; Frey et al. 2017; WOA 2018, 2021).

Como se ha mencionado anteriormente, existe un bajo número de estudios publicados sobre el estudio de patógenos causantes de infertilidad en toros, especialmente estudios que aborden el impacto de patógenos oportunistas (como *Mycoplasma* spp.) y microorganismos causantes de infertilidad en hembras que pueden ser transmitidos de forma venérea causando una infección silente en los machos. Todo ello se traduce en que el conocimiento que tenemos acerca del papel del toro en los problemas de infertilidad bovina de origen infeccioso en el rebaño en explotaciones de régimen extensivo sea muy limitado y, por tanto, sea muy difícil dimensionar las medidas

necesarias que han de tomarse en los toros para mejorar los índices de fertilidad en este tipo de granjas.

En este contexto, la mejora y la optimización de las técnicas empleadas en el diagnóstico de causas de infertilidad bovina de origen infeccioso y la implementación de nuevas tecnologías en este campo, como la secuenciación masiva, brindan la posibilidad de estudiar el verdadero papel de agentes infecciosos identificados como patógenos primarios a este nivel así como de las poblaciones microbianas totales presentes en una muestra clínica, permitiendo tener una visión integradora sobre qué microorganismos potencialmente causantes de infertilidad en las poblaciones de toros reproductores están presentes en una muestra, así como otros microorganismos que pueden estar pasando desapercibidos con el uso de técnicas convencionales (que suelen estar más dirigidas a patógenos específicos). La aplicación de nuevas metodologías permitiría tener una visión más amplia de los posibles patógenos primarios y oportunistas asociados a infertilidad en el macho, así como su posible relación con el microbioma presente en muestras prepuciales de toros reproductores.

En base al conocimiento actual sobre el papel del macho en la infertilidad bovina de carácter infeccioso en explotaciones extensivas, se plantean las siguientes hipótesis generales:

- A. *Hipótesis 1: existen microorganismos que juegan un papel importante (primario/secundario) en los problemas de fertilidad de origen infeccioso en toros de régimen extensivo que no se conocen o que no se consideran en los análisis microbiológicos realizados en el diagnóstico rutinario de esta patología.*
- B. *Hipótesis 2: existe un limitado conocimiento acerca del verdadero papel del macho en la infertilidad infecciosa bovina en el rebaño, seguramente asociado al bajo número de estudios realizados en machos reproductores en extensivo sobre los patógenos causantes de infertilidad en toro que pueden ser transmitidos de forma venérea a las hembras en las que causan problemas de fertilidad.*
- C. *Hipótesis 3: El análisis sistemático de la literatura científica es una herramienta útil para reconocer los patógenos descritos asociados a infertilidad en toros permitiendo*

identificar las posibles limitaciones más relevantes respecto al conocimiento que tenemos sobre el posible impacto del toro en la fertilidad de los rebaños por causas infecciosas, de utilidad para sentar las bases de planes de control y prevención de agentes infecciosos causantes de infertilidad en toros.

- D. *Hipótesis 4: El empleo de análisis metagenómicos sobre muestras clínicas procedentes de toros reproductores es una herramienta adecuada para avanzar en el conocimiento sobre el papel del toro en los problemas de infertilidad de etiología infecciosa, permitiendo identificar patógenos asociados a problemas de fertilidad en los rebaños así como sus dinámicas de infección, especialmente en el caso de aquellos potenciales patógenos que escapan a los controles rutinarios, así como arrojar información sobre la presencia de microorganismos desconocidos hasta la fecha que pudieran estar afectando, ya sea de forma primaria o secundaria.*
- E. *Hipótesis 5: Las herramientas moleculares actualmente implementadas en la detección de *C. fetus* y *T. foetus* presentan un margen de mejora que repercutiría en las medidas de control y manejo de estas patologías infecciosas en el toro.*
- F. *Hipótesis 6: La detección de *C. fetus* y la diferenciación de las subespecies *Cfv* y *Cff* en muestras prepuciales de toros mediante el empleo de protocolos de PCR presenta limitaciones en cuanto a sensibilidad y/o especificidad que impactan en los ratios de detección de *C. fetus* en lavados prepuciales, disminuyendo el rendimiento diagnóstico para detección y diferenciación de subespecies de *C. fetus* en muestras clínicas.*
- G. *Hipótesis 7: El empleo de protocolos de PCR para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros reproductores (técnica comúnmente empleada por laboratorios diagnósticos), presenta limitaciones en cuanto a su especificidad debido a que la mayoría emplean como diana en una región homóloga (ARNr-ITS) en otras especies de *Trichomonas* potencialmente presentes en muestras clínicas, lo que se podría traducir en la potencial aparición de falsos positivos. Por ello, el diseño de protocolos de PCR sobre dianas genéticas alternativas como herramienta de confirmación de infecciones por *T.**

foetus en lavados prepuciales de toro supondría una mejora del rendimiento diagnóstico mediante PCR.

- H. *Hipótesis 8: El cultivo bacteriológico de Cfv, considerado la técnica de referencia en el diagnóstico de CGB, es una técnica muy poco eficiente debido a las limitaciones técnicas de esta aproximación así como a las particularidades de C. fetus, por lo que el establecimiento de un protocolo para el transporte, enriquecimiento, cultivo y aislamiento que mejore la sensibilidad de los análisis bacteriológicos de Cfv a partir de muestras de lavados prepuciales sería una herramienta clave para la mejora en su rendimiento diagnóstico en toros reproductores.*

2.2. Objetivo

El objetivo general de la presente memoria de tesis doctoral es la mejora del conocimiento sobre el papel del toro como elemento clave (y hasta la fecha poco estudiado) en los problemas de infertilidad de origen infeccioso en rebaños bovinos criados en régimen extensivo a través del estudio de los patógenos asociados a infertilidad en el toro, así como mediante la evaluación y desarrollo de herramientas diagnósticas de última generación y tradicionales, poniendo especial atención a las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas para la detección de dos patógenos de importancia en explotaciones extensivas en España: *C. fetus* y *T. foetus* (Figura 3).

2.2.1. Objetivos específicos

1. Llevar a cabo una evaluación sistemática de las principales causas de infertilidad en ganado bovino criado en régimen extensivo debido a agentes infecciosos y la potencial presencia de agentes predisponentes asociados a infertilidad en bovino a través del estudio pormenorizado de microorganismos identificados causantes de infertilidad en ganado

bovino así como de agentes asociados a infertilidad recogidos en la bibliografía científica. Se realizará mediante una revisión sistemática de la literatura científica sobre trabajos realizados en explotaciones bovinas que relacionen problemas de fertilidad y la presencia de microorganismos causantes de infertilidad en bovino o potencialmente causantes de problemas de fertilidad en los rebaños sometidos a estudio, centrándose en el papel del macho infértil o subfértil así como portador de microorganismos causantes de infertilidad en hembras (Figura 3).

2. Llevar a cabo un análisis diferencial entre las poblaciones bacterianas presentes en lavados prepuciales de toros empleados para la cría con bajas tasas de fertilidad y machos sanos desde un punto de vista reproductivo, con el fin de explorar la asociación entre determinadas poblaciones bacterianas (así como la presencia de bacterias individuales) y problemas de infertilidad bovina. Para ello, se llevará a cabo la identificación y cuantificación de patógenos primarios conocidos así como oportunistas asociados a infertilidad bovina mediante un análisis metagenómico y estadístico. Dichos análisis perseguirán como fin contribuir a la mejora del conocimiento sobre las causas infecciosas de infertilidad en bovino extensivo mediante el estudio del microbioma bacteriano de muestras prepuciales procedentes de toros reproductores con bajos índices de fertilidad (inferiores al 80%) y machos sanos, identificando aquellas bacterias asociadas a problemas reproductivos (Figura 3).
3. Evaluar diferentes protocolos de PCR publicados en la literatura científica para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de las subespecies Cfv y Cff en lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo con el fin de desarrollar y establecer un protocolo de detección mediante PCR que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica, y en consecuencia, permita la identificación de toros portadores para llevar a cabo la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas de ganado bovino (Figura 3).

4. Evaluar diferentes protocolos de PCR publicados en la literatura científica para la detección de *T. foetus* en lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo así como diseñar un nuevo protocolo de PCR basado en nuevas dianas genéticas alternativas a aquellas diseñadas sobre la región ARNr-ITS, utilizada por excelencia para este objetivo, con el fin de desarrollar y establecer un protocolo de detección que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica que pueda aplicarse en la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino (Figura 3).
5. Evaluar diferentes protocolos de cultivo publicados en la literatura científica para el aislamiento de Cfv a partir de muestras de lavados prepuciales de toros reproductores criados en régimen extensivo con el fin de establecer el protocolo de aislamiento que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica, y en consecuencia, permita la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino así como el estudio de Cfv en toros reproductores (estudios de sensibilidad antibiótica, epidemiología molecular, etc.) (Figura 3).

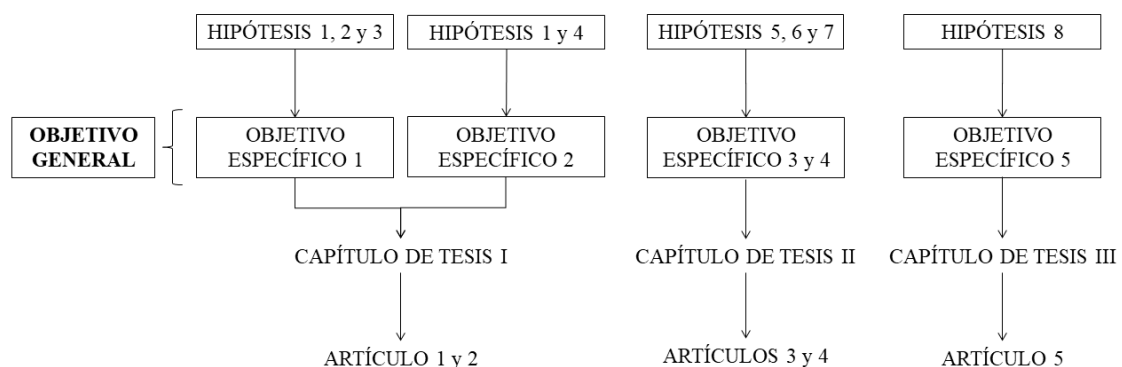


Figura 3. Relación del objetivo general y las hipótesis y objetivos específicos de la presente tesis con los diferentes capítulos y artículos llevados a cabo para alcanzar dichos objetivos que den respuesta a las hipótesis planteadas. La HIPÓTESIS 1 plantea que existen microorganismos causantes de infertilidad en toros en extensivo que no se conocen o que no se consideran en los análisis diagnósticos rutinarios, a su

vez la HIPÓTESIS 2 plantea el escaso número de trabajos dirigidos sobre el toro como causa de infertilidad infecciosa en rebaños, mientras que la HIPÓTESIS 3 plantea que la revisión sistemática de la literatura científica resultaría una herramienta útil para listar los patógenos descritos hasta la fecha asociados a infertilidad en toros e identificar las posibles limitaciones respecto al conocimiento sobre la importancia del toro en la fertilidad de los rebaños por causas infecciosas. Por ello se plantea el OBJETIVO ESPECÍFICO 1 para el cual se realizó el trabajo recogido en el ARTÍCULO 1 del CAPÍTULO I, en el que se realiza una búsqueda sistemática de la literatura para elaborar un *ranking* de microorganismos asociados a infertilidad (en explotaciones bovinas compuestas por machos o ambos sexos) y establecer potenciales puntos clave en las lagunas sobre el conocimiento acerca del verdadero papel del macho en relación a infertilidad infecciosa. En el mismo capítulo de tesis (CAPÍTULO I), se muestra el ARTÍCULO 2 en el que se realiza el estudio metagenómico (basado en el gen del *16S* del ARNr) de 1029 lavados prepuciales para la clasificación bacteriana de microorganismos potencialmente asociados a bajos índices de fertilidad en los rebaños, un trabajo enmarcado dentro del OBJETIVO ESPECÍFICO 2 orientado a dar respuesta a la HIPÓTESIS 1 y la HIPÓTESIS 4 que plantea que el empleo del análisis metagenómico sobre muestras clínicas de toros reproductores podría ser una herramienta adecuada para la identificación de patógenos asociados a problemas de fertilidad, incluyendo aquellos que escapan a los controles rutinarios. La HIPÓTESIS 5 plantea que las herramientas moleculares actualmente implementadas en la detección de *C. fetus* y *T. foetus*, (cultivos y PCR) presentan actualmente margen de mejora, donde la HIPÓTESIS 6 plantea las limitaciones y susceptibilidad de mejora de la PCR para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de Cfv y Cff en muestras prepuciales, mientras que la HIPÓTESIS 7 plantea las limitaciones para la detección de *T. foetus* mediante PCR. Por ello se establecen los OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3 y 4 para los cuales se realizaron los trabajos recogidos en los ARTÍCULOS 3 y 4 del CAPÍTULO II, en el que se realizaron estudios comparativos de protocolos modificados a partir de protocolos previamente publicados, así como de nuevos protocolos de PCR que mejoren el rendimiento diagnóstico de *C. fetus* (y diferenciación de Cfv y Cff) (ARTÍCULO 3) y *T. foetus* (ARTÍCULO 4) mediante PCR a partir de lavados prepuciales. Por último, la HIPÓTESIS 8 plantea las limitaciones del cultivo para la detección de Cfv y por tanto de la susceptibilidad de mejora en el diagnóstico de la CGB mediante esta técnica. Por ello, contemplado dentro del OBJETIVO ESPECÍFICO 5, se realizó el trabajo recogido en el ARTÍCULO 5 del CAPÍTULO III, en el que se realizó un estudio comparativo de diferentes medios y estrategias de cultivo para la recuperación de Cfv a partir de muestras prepuciales.

3. PLAN DE TRABAJO/METODOLOGÍA

3.1. Material de estudio

El material de estudio consistió, por una parte, en un total de 87 publicaciones científicas con las que se realizó el estudio incluido en el Artículo 1 (“*What about the bull? A systematic review about the role of males regarding to bovine infectious infertility within cattle herds*”) incluido en el Capítulo I. Dicho estudio consistió en una revisión sistemática de aquellos trabajos publicados hasta el 4 de agosto de 2021 que asociaban la presencia de microorganismos en rebaños compuestos en su totalidad por machos o por machos y hembras, con problemas de fertilidad en dichos rebaños (ver sección 3.2. *Revisión sistemática de la literatura científica*).

Por otra parte, se analizaron lavados prepuciales de 1309 toros reproductores criados en régimen extensivo en ecosistemas de dehesa y montaña en España, muestreados en el contexto de análisis realizados para el diagnóstico rutinario de *C. fetus* y *T. foetus*. Los lavados prepuciales se obtenían mediante el uso de un raspador prepucial mediante el cual se tomaba la muestra del prepucio del toro, que a continuación se resuspendía en 15 mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril. Sobre dichos 15 mL se realizó una centrifugación a 1512 g durante 10 min para la obtención de un *pellet* que se conservó en congelación a -80°C hasta la extracción de ADN. Del total de 1309 lavados prepuciales:

- i) Se emplearon 1029 lavados en el estudio mostrado en el Artículo 2 (“*Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds*”), de los cuales, además:
 - o Se emplearon 289 al azar para la realización del estudio mostrado en el Artículo 3 (“*Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples*”), seleccionados con base en los resultados metagenómicos del Artículo 2,

- Se emplearon 466 para la realización del estudio mostrado en el Artículo 4 (*“Molecular detection of Tritrichomonas foetus in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting EF1-alpha-Tf1 and a comparative study of published PCR techniques”*), seleccionados con base con base en los resultados previos de PCR frente a la detección de *T. foetus*.
- ii) Se emplearon 32 lavados preputiales para la realización del estudio recogido en el Artículo 5 (*“Time, temperature and media: the three keys to improve the recovery of Campylobacter fetus subsp. venerealis from preputial bull samples”*), seleccionados a partir de toros con resultados negativos de PCR frente a detección de *C. fetus*.

Con respecto al material de laboratorio, equipos e infraestructuras empleados en el desarrollo de los estudios, la fase experimental ha sido realizada en los laboratorios del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET-UCM), el Instituto Tecnológico Agrario de la Comunidad de Castilla y León (ITACyL) y la Universidad de Burgos, equipados con la tecnología y el material necesarios para la realización de los estudios llevados a cabo en la presente memoria de tesis doctoral.

3.2. Revisión sistemática de la literatura científica

Para el estudio pormenorizado de los agentes infecciosos causantes o asociados a infertilidad bovina identificados en la bibliografía se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura científica (Artículo 1 *“What about the bull? A systematic review about the role of males regarding to bovine infectious infertility within cattle herds”*) mediante cadenas de búsqueda en diferentes bases de datos [Pubmed ‘((((“Infection”[Mesh]) OR “Reproductive Tract Infections”[Mesh]) AND “Fertility”[Mesh]) OR “Infertility”[Mesh]) AND “Cattle”[Mesh]’; Scopus ‘TITLE-ABS-KEY (“In fection” AND (“Fertility” OR “Infertility”) AND “Cattle”)’; Web of Science ‘TS=(“Infection” AND (“Fertility” OR “Infertility”) AND “Cattle”)’], y siguiendo un flujo de

trabajo PRISMA (PRISMA 2022) (Figura 4). Los resultados se filtraron mediante los siguientes criterios de inclusión y exclusión: i) los trabajos debían tratarse de estudios originales de investigación, excluyendo reseñas, cartas, editoriales, conferencias y ensayos de vacunación, ii) los trabajos debían tratarse de estudios de campo, excluyendo estudios de investigación básica, iii) los análisis debían haberse realizado sobre muestras procedentes de granjas y mataderos tomadas directamente de los animales, excluyendo muestras de suelos, aguas, alimentos, etc., iv) el resumen de los trabajos debía identificar la presencia de uno o más microorganismos como causa de la infertilidad en los rebaños, excluyendo aquellos que señalaban como causa otros factores como la dieta, v) los trabajos debían haber sido llevados a cabo en rebaños compuestos exclusivamente por machos o por ambos sexos, excluyendo aquellos estudios llevados a cabo exclusivamente en rebaños compuestos por hembras, y vi) los trabajos debían estar publicados en inglés, excluyéndose trabajos publicados en otros idiomas.

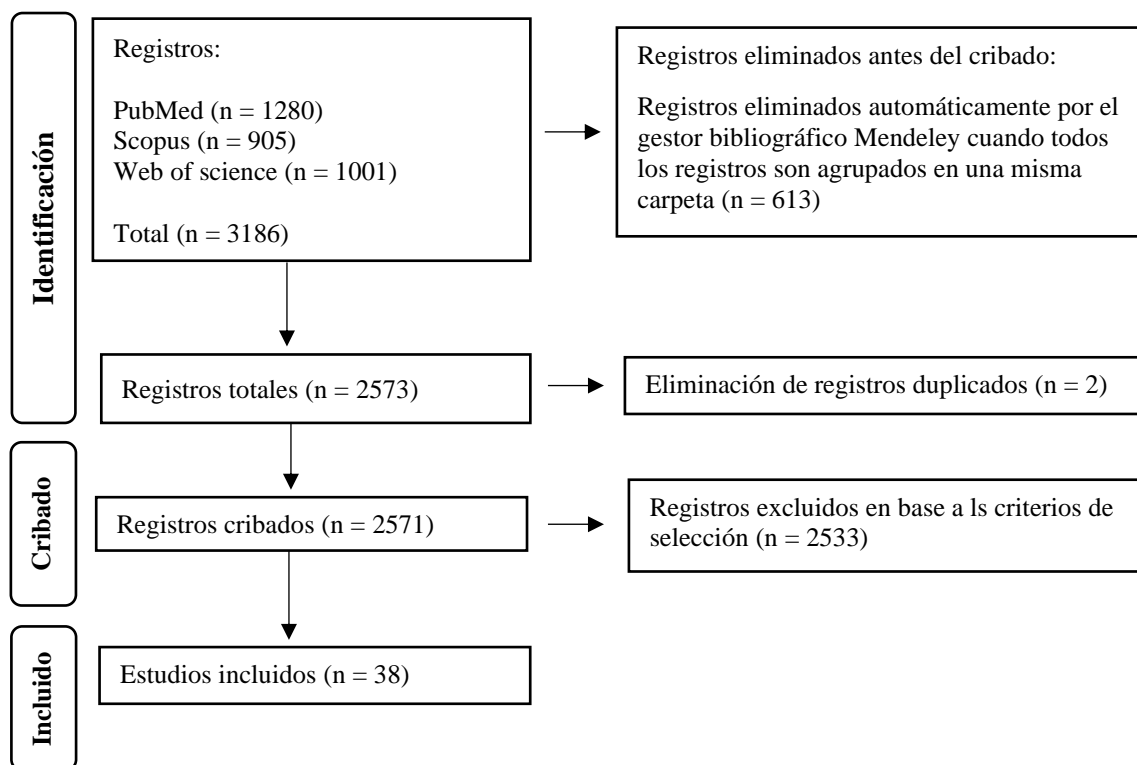


Figura 4. Flujo de trabajo PRISMA para la revisión sistemática de la literatura a partir de registros procedentes de bases de datos (PRISMA 2022) haciendo uso del gestor bibliográfico Mendeley Desktop 1.19.8 (ELSEVIER 2021).

La información recogida a partir de los trabajos seleccionados fue la siguiente: i) año y país del estudio; ii) tipo de explotación ganadera; iii) censo de la explotación, iv) edad y variedad de los animales; v) tipo de alimentación y peso de los animales; vi) tipo de muestra tomada, vii) ensayo diagnóstico empleado; viii) patógenos identificados; ix) número de animales con resultado positivo a los microorganismos estudiados en cada trabajo; y x) tipo de grupo control y tipo de prueba estadística empleada (si aplica).

Por otro lado, en el marco del Artículo 3, titulado “*Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples*”, también se realizó una búsqueda sistemática mediante cadenas de búsqueda para la revisión de la información publicada en diferentes bases de datos sobre la detección de *C. fetus* mediante la técnica PCR [PubMed ‘(“(Campylobacter fetus”[Mesh]) AND “PCR”[Mesh])’]; Web of Science ‘TS=((“Campylobacter fetus” AND “PCR”))’; y Scopus ‘TITLE-ABSKEY ((“Campylobacter fetus” AND “PCR”)]’. Los resultados se filtraron mediante los siguientes criterios de inclusión: i) los trabajos debían incluir la secuencia completa de los cebadores empleados, ii) los trabajos debían incluir la secuencia completa de las sondas en el caso de tratarse de protocolos de PCR en tiempo real, iii) debía confirmarse la especificidad del conjunto de cebadores y sonda *in silico* mediante BLAST 2.11 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) considerándose como válidos aquellos cebadores cuya identidad con secuencia de referencia de GeneBank para *C. fetus* fuera del 100% y a su vez que esto no ocurriera con secuencias de otros patógenos asociados a infertilidad en bovino y/o otros microorganismos potencialmente presentes en muestras prepuciales de toros, iv) la sonda debía tener un 100% de identidad con secuencias correspondientes a *Campylobacter* spp., y v) debían estar descritas las condiciones del protocolo de amplificación de PCR.

Debido al alto número de dianas de PCR descritas, cuando varios protocolos de PCR se dirigían sobre la misma diana, se aplicaron los siguientes criterios de preferencia: i) aquellos protocolos cuya sensibilidad y especificidad analítica (y diagnóstica si aplicaba) estuvieran evaluados y validados por diferentes publicaciones científicas, ii) aquellos protocolos empleados sobre

muestras clínicas y cuya sensibilidad, especificidad y otros ratios de detección indicaran que se trataban de protocolos de detección con bajas tasas tanto de falsos positivos como de falsos negativos entre sus resultados, y finalmente, iii) se priorizaron protocolos de PCR en tiempo real frente a protocolos de PCR convencional.

Por último, se realizó una búsqueda sistemática mediante cadenas de búsqueda para la revisión de la información publicada sobre la detección de *T. foetus* mediante la técnica PCR, trabajo recogido en el Artículo 4 (*“Molecular detection of Tritrichomonas foetus in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting EF1-alpha-Tf1 and a comparative study of published PCR techniques”*) empleando tres motores de búsqueda: PubMed [‘(Tritrichomonas foetus) AND (PCR)’], Web of Science [‘TS=(Tritrichomonas AND foetus AND PCR)’]; y Scopus [‘TITLE-ABS-KEY (“Tritrichomonas foetus”) AND (“PCR”)’]. Los resultados se filtraron mediante los siguientes criterios de inclusión y exclusión: i) los trabajos debían incluir información acerca de la diana genética sobre la que se dirigía el protocolo de PCR, ii) se debía indicar la secuencia completa de cebadores y sonda (en el caso de que el protocolo hiciera uso de esta), iii) las condiciones de PCR debían estar incluidas en el manuscrito, y iv) las técnicas PCR debían estar basadas en la detección de ADN (y no de ARN, debido a la fragilidad de esta molécula en muestras de campo) y, en el caso de protocolos de PCR en tiempo real, los sistemas de fluorescencia empleados debían ser los más comúnmente empleados como SYBR green o sondas TaqMan, debido a las limitaciones técnicas de muchos laboratorios diagnósticos. Cuando distintos trabajos hacían uso del mismo set de cebadores, se seleccionó el protocolo que hubiese sido empleado sobre muestras clínicas con resultados satisfactorios y/o aquellos protocolos adaptados al formato de PCR en tiempo real, dando prioridad, a su vez, a aquellos protocolos que emplearan sondas específicas.

3.3. Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas presentes en lavados prepuciales de toros. Análisis estadístico de los resultados.

En el marco del Artículo 2 (“*Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds*”) se analizaron mediante metagenómica como ya se ha citado, un total de 1029 lavados prepuciales de toros empleados para la cría en régimen extensivo en España (una muestra por toro). El grupo problema se compuso de 944 muestras procedentes de toros diagnosticados con bajos índices de fertilidad [fertilidad de los rebaños de los que procedían inferior al 80%, calculada como la relación entre el número de terneros registrados en un año (total hijos) y el número de vacas nodrizas presentes (total madres), expresada en porcentaje], mientras que el grupo control de 85 muestras correspondientes a toros sanos desde un punto de vista reproductivo (porcentajes de fertilidad de los rebaños de los que procedían iguales o superiores a 80%). Como se citaba previamente, las muestras consistieron en lavados obtenidos a partir de raspados prepuciales resuspendidos en 15 mL de tampón PBS, que se centrifugaron a 1512 g durante 10 min. El precipitado obtenido tras la centrifugación se resuspendió en un buffer de lisis [20 mM Tris-Cl (pH 8), 2 mM EDTA sódica, 1.2% Tritón X-100 y 20 mg/mL lisozima en un volumen final de 360 mL] y fue incubado durante 1h a 37°C. Posteriormente, el DNA fue extraído de acuerdo con las indicaciones del kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania).

El análisis metagenómico llevado a cabo consistió en la secuenciación masiva de la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr en procariotas. Por ello, todos aquellos organismos procariotas portadores de este gen en cada una de las muestras biológicas incluidas en el estudio eran susceptibles de ser identificados mediante la comparación de sus secuencias V3-V4 del *16S*, previamente obtenida mediante PCR, con las secuencias genómicas registradas en la base de datos SILVA (<https://www.arb-silva.de/>). En el presente estudio, el protocolo de amplificación del *16S* y la formación de librerías se llevó a cabo bajo las directrices de Illumina tomando como referencia su guía titulada “*16S Metagenomic Sequencing*

Library Preparation” (Illumina 2013). Por otra parte, el análisis bioinformático de las más de 100.000.000 secuencias obtenidas, fue llevado a cabo mediante el *pipeline* QIIMERreporter (<https://github.com/dabadgarcia/qiimereporter>), que emplea comandos del *software* QIIME2 (Bolyen et al. 2019) y el lenguaje de programación R 3.4.1 (R Core Team 2021).

A continuación, se resume brevemente el proceso de tratamiento de datos aplicado: las secuencias crudas pasan por un filtro de calidad en el que se eliminan aquellas cuya secuenciación es deficiente. Después las secuencias se unen por pares (las secuencias sentido y antisentido), se eliminan quimeras y se asigna a cada secuencia par una variante de secuencia (ASV, “*Amplicon sequence variant*”) que pueden ser consideradas como unidades taxonómicas operacionales (OTU, “*Operational Taxonomic Unit*”) al agruparse en clústeres de secuencias que comparten un 100% de identidad. Por último, mediante el uso de un clasificador Naïve Bayes previamente entrenado (Wang et al. 2007), se asigna a cada OTU una clasificación taxonómica tomando como referencia la base de datos SILVA (versión 132) (Quast et al. 2013). Así se obtuvo una tabla con la composición bacteriana de cada una de las muestras, gracias a la cual se pudieron comparar los índices de diversidad alfa y beta de ambos grupos muestrales (problema y control) así como los taxones más abundantes en cada uno de ellos. Esto permitió detectar diferencias y similitudes de las poblaciones bacterianas que conforman el microbioma del prepucio de los toros sometidos a estudio y su relación con problemas de fertilidad.

Por último, se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos en el grupo problema y en el grupo control, de la presencia de especies y géneros bacterianos previamente asociados a infertilidad basado en el ranking de microorganismos asociados a infertilidad bovina del estudio recogido en el Artículo 1 (“*What about the bull? A systematic review about the role of males regarding to bovine infectious infertility within cattle herds*”) de la presente memoria de tesis doctoral. Mediante el análisis chi-cuadrado realizado con el *software* SPSS (IBM SPSS Statistics 25.0), y el estudio de la corrección de los resultados mediante el método Holm-Bonferroni (Holm 1979), se estudió la posible correlación entre la presencia de determinadas especies y géneros bacterianos y la existencia de bajos índices de fertilidad en los toros sometidos a estudio.

3.4. Evaluación y mejora de la detección de *C. fetus* y *T. foetus* en muestras prepuciales procedentes de toros criados en régimen extensivo mediante la técnica molecular PCR

Para la evaluación de las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas en lavados prepuciales para la detección de *C. fetus* y *T. foetus*, esto son, protocolos de PCR (seleccionados en base a la revisión bibliográfica previa, ver sección 3.2. *Revisión sistemática de la literatura científica*), se llevaron a cabo una serie de estudios comparativos empleando como técnicas de referencia: i) la secuenciación de la región V3-V4 del gen del 16S del ARNr mediante secuenciación masiva en el caso de *C. fetus*, y ii) la PCR indicada por la OMSA (WOAH 2018) del trabajo de McMillen y Lew (2006) para *T. foetus*, ya empleada como técnica de referencia previamente (Meggiolaro et al. 2019).

Con los resultados de dichos estudios se desarrollaron y compararon protocolos de PCR para la detección de *C. fetus* (para identificación de especie y subespecie, 3.4.1. *Estudio comparativo para la detección mediante PCR de C. fetus en lavados prepuciales de toros*) y de *T. foetus* (para identificación de especie, 3.4.3. *Estudio comparativo para la detección de T. foetus en lavados prepuciales*).

Cabe citar que para el estudio comparativo detección de *C. fetus* mediante PCR, se incluyó, además de los protocolos de PCR previamente publicados, un protocolo de PCR en tiempo real sonda específico adaptado para este estudio a partir de un protocolo de pirosecuenciación publicado con anterioridad (Persson et al. 2012) (ver sección 3.4.2. *Adaptación de un protocolo de pirosecuenciación a PCR en tiempo real sonda específica para la detección de C. fetus*).

Por su parte, en el caso del estudio de detección de *T. foetus* mediante PCR, de manera adicional al estudio comparativo también se diseñó y evaluó un nuevo protocolo de PCR en tiempo real basado en una sonda específica dirigida al gen *EF1-alfa-Tf*. Esta diana ha sido previamente identificada y caracterizada como una región genómica conservada entre miembros del género *Trichostrongylus* spp. pero variable entre distintas especies (Reinmann et al. 2012), lo que lo convierte en una diana de PCR alternativa a ARNr-ITS para la detección de *T. foetus* (ver

sección 3.4.4. *Diseño de una PCR real-time sonda específica basada en el gen EF1aTf1 para la detección de T. foetus en lavados prepuciales de toros*).

3.4.1. *Estudio comparativo para la detección de C. fetus mediante la técnica PCR en lavados prepuciales de toros reproductores*

Para la realización de este estudio comparativo, en primer lugar se realizó una revisión bibliográfica sistemática con cadenas de búsqueda en diferentes bases de datos. Los artículos obtenidos se revisaron y seleccionaron en base a criterios de inclusión y exclusión (ver sección 3.2. *Revisión sistemática de la literatura científica*). De este modo, se seleccionaron un total de 34 publicaciones desde 1996 hasta 2020 que presentaban protocolos de PCR basados en un total de 10 dianas genéticas diferentes, donde 6 estaban dirigidos a la identificación de la especie *C. fetus* (*16S* rRNA, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* y *nahE*) y 4 estaban dirigidos a la identificación de la subespecie (*ISCfe1*, *parA*, *sapB2* y *virB11*). Las secuencias de los cebadores y las sondas empleadas en cada uno de los protocolos comparados, así como las condiciones de amplificación de cada técnica de PCR se resumen en la Tabla 3.

El análisis de su especificidad y sensibilidad analítica de todos los protocolos de PCR se realizó de acuerdo a las directrices de la OMSA expuestas en el informe titulado “*Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases*” (WOAH 2019). La especificidad fue analizada empleando una batería de aislados de otras especies de microorganismos potencialmente presentes en los lavados prepuciales [p.ej. *T. foetus* (referencia cepa tipo: ATCC 30232), *Brucella abortus* o *Escherichia coli*] y/o filogenéticamente próximos a *C. fetus* (p.e. *Campylobacter coli* o *Campylobacter jejuni*), incluidas todas las subespecies conocidas hasta el momento: Cfv (referencia interna ICM18/00036 e ICM17/02263), Cff (ATCC 27374^T) y Cft (ATCC BAA 2539^T).

Tabla 3. Protocolos de PCR para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de subespecies CfV y Cff incluidos en el estudio comparativo recogido en el Artículo 3 de la presente memoria de tesis doctoral.

Especie o subespecie	Diana	Tipo de PCR	Referencia	Código ^a	Cebadores y sonda	Condiciones de PCR ^b											
						vol mix (µl)	vol (µl)	Fw (µM)	Rv (µM)	Pr	ID. (C°/min)	D. (C°/s)	A. (C°/s)	E. (C°/s)	N° (C°/min)	FE. AS. (C°/min) (bp)	
<i>I65r</i> <i>RNA</i>	Tiempo real (sonda)	I16	(Iraola et al. 2016)	I16	16SRw 5'-GCACCTGTCTCAACTTC-3'	25	5	0.9	0.9	0.2	95/5	95/15	60/60	-	35	70/5	42
					16SRv 5'-CCTTACCTGGCTTGAT-3'												
					16SPb 5'-VIC-ATCTCTAAAGAGATTAGTTG-MGB-NFQ-3'												
<i>cdtB</i>	Convencional	K16	(Kamei et al. 2016)	K16	Cf-spBU6 5'-GGCTTGGCAAAACCGAAG-3'	50	12.5	0.2	0.2	-	95/5	94/20	56/90	72/90	30	72/10	553
					Cf-spBR3 5'-CAAGAGTTCCTCTAAACTC-3'												
<i>nahE</i>	Tiempo real (sonda)	G13	(Van der Graaf-van Bloois et al. 2013)	G13	nahE-F 5'-TGTATGGTGATCAAAATAGCTGTG-3'	20	5	0.6	0.6	0.2	95/15	60/45	-	-	40	-	27
					nahE-R 5'-GAGCTGTTTTATGGTACTACTTTTTTA-3'												
					nahE-P 5'-6-FAM-TGTATATGCACCTTTAGCAACTT-NFQ-3'												
<i>gyrB</i>	Tiempo real (sonda)	P12	(Persson et al. 2012)	P12	gyrB-E3 5'-CTGTAAAGAAAACGTCCAGGAATGT-3'	25	5	0.4	0.4	0.2	95/5	95/15	60/60	-	50	-	52
					gyrB-R2 5'-CCATAGATTCGTATAGAGTTATCA-3'												
					gyrB-P1 5'-6-FAM-CWACTTCAATAAATCATATGATGAAG-MGB-NFQ-3'												
<i>env60</i>	Tiempo real (SYBR)	C09	(Chaban et al. 2009)	C09	JH0087 5'-TGAGGCTGTTACAGGGAGTTA-3'	25	12.5	0.2	0.2	-	95/5	95/15	62.5	72/15	40	95/1	100
					JH0088 5'-TGAGGCTATCGCTATTTGGCTGAA-3'												
<i>csfA</i>	Convencional	H97	(Hum et al. 1997) ^{cd}	H97	MG3F 5'-GGTAGCCGAGCTGCTAAGAT-3'	25	12.5	0.5	0.5	-	95/15	96/15	60/60	72/90	35	72/10	764
					MG4R 5'-TAGCTACAATAACGCAACT-3'												
<i>ISCJe</i> <i>I</i>	Tiempo real (sonda)	G13 (ISC1)	(Van der Graaf-van Bloois et al. 2013) ^c	G13 (ISC1)	ISC1-F 5'-AGGCGAAGAGAAATGTTAAATTGAA-3'	20	5	0.6	0.6	0.2	95/5	95/15	60/45	-	40	-	34
					ISC1-R 5'-CCATAAAGCTAGCTGAAAAAAGCTG-3'												
					ISC1-P 5'-VIC-CCAAAAGATGCTTAGAAAATA-NFQ-MGB-3'												
<i>virB1</i> <i>I</i>	Convencional	I12	(Iraola et al. 2012) ^d	I12	ISC2-F 5'-TTCAAAAGCTCTGGGGTTAC-3'	20	5	0.6	0.6	0.2	95/5	95/15	60/45	-	40	-	208
					ISC2-R 5'-AAAGCTTGTAGAACAAATAAATC-3'												
					ISC2-P 5'-VIC-ACTCGTGGTGAGAGCGCTAG-NFQ-MGB-3'												
<i>parA</i>	Convencional	H97 (VenS)	(Hum et al. 1997) ^{cd}	H97 (VenS)	nc1165g4F 5'-AGGACACAAATGGTAACTGG-3'	20	10	0.38	0.38	-	95/15	96/15	60/60	72/90	35	72/10	233
					nc1165g4R 5'-GATTGATAGCGGACTTTGC-3'												
<i>sapB2</i> <i>subsp. fetus</i>	Convencional	W02	(Wang et al. 2002) ^c	W02	VenSF 5'-CTTAGCAGTTTGGGATATGGCAIT-3'	25	12.5	0.5	0.5	-	95/15	96/15	60/60	72/90	35	72/10	142
					VenSR 5'-GCTTTTGGATACAAATAAGAGCTT-3'												
<i>sapB2</i> <i>subsp. fetus</i>	Convencional	W02	(Wang et al. 2002) ^c	W02	CFF 5'-GCCAAATATAAATGTAAGCGGAGAG-3'	25	12.5	0.5	0.5	-	95/15	95/30	59/90	72/30	30	72/10	435
					CFR 5'-TGCAGCGGCCCACTAT-3'												

El Código hace referencia al nombre asignado a cada protocolo de PCR. ^b Condiciones de PCR: vol(μ l) volumen final de la reacción de PCR; vol.mix (μ l), volumen de 5x QuantiFast Pathogen Master Mix para PCR en tiempo real (con sonda específica), 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master mix para PCR en tiempo real (SYBR) y 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix para PCR convencional; Fw(μ M), concentración final del cebador sentido; Rv(μ M), concentración final del cebador anti sentido; Pr(μ M) concentración final de sonda; ID. ($^{\circ}$ C/min), desnaturalización inicial; D. ($^{\circ}$ C/s), fase de desnaturalización dentro de cada ciclo; A. ($^{\circ}$ C/s), fase de hibridación dentro de cada ciclo; E. ($^{\circ}$ C/s), fase de elongación dentro de cada ciclo; N^o, número de ciclos; FE. ($^{\circ}$ C/min), elongación final; AS.(bp), longitud del amplicón en pares de bases. La concentración de MgCl₂ es aquella indicada por defecto por cada uno de reactivos comerciales de PCR (todos de Qiagen, Alemania). ^c El trabajo de Graaf et al (2013) analizó la sensibilidad y especificidad de PCR con un total de 155 aislados *C. fetus*: se registró una sensibilidad y especificidad del 100% para *nahE*; 97% de sensibilidad y 100% de especificidad para los cebadores ISCfe1-ISC1 y 100% de sensibilidad y 98% de especificidad para los cebadores ISCfe1-ISC2; 100% de sensibilidad y especificidad para *cstA*; 58% de sensibilidad y 83% de especificidad para *parA*; 76% de sensibilidad y 72% de especificidad para *sapB2*. ^d La PCR múltiple descrita en el trabajo de Hum et al. (1997) mostró un elevado grado de inespecificidades de acuerdo a los resultados obtenidos con muestras de campo en el presente trabajo, similar a lo obtenido con la PCR múltiple descrita en el trabajo de Iraola et al. (2012) que empleaba el mismo set de cebadores que Hum et al. (1997) para la detección de *C. fetus*. Por tanto, se decidió emplear las condiciones de PCR descritas en el trabajo de Schulze et al. (Schulze et al. 2006), donde se da solución a este problema.

Por otra parte, la sensibilidad analítica de cada protocolo se evaluó mediante el uso de diluciones seriadas en base 10 de una concentración conocida de ADN (1ng/ μ L) de *C. fetus* previamente extraído y purificado (de acuerdo a las directrices del protocolo de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) siguiendo las directrices de la OMSA para la correcta determinación del límite de detección (LOD, “*limit of detection*”) y su intervalo de confianza (CI, “*confidence interval*”) [se prepararon 20 réplicas de la misma dilución de ADN donde la amplificación de las 20 réplicas corresponde a un CI del 100% y la amplificación de 19/20 corresponde a un CI del 95% (WOAH 2019)]. El punto de corte de las técnicas de PCR en tiempo real se estableció determinando el valor medio aritmético de los Ct en el LOD cuyo CI fue igual o superior al 95% para cada protocolo de PCR. Por su parte, en el caso de las técnicas convencionales, se diferenció entre amplificaciones positivas y negativas de forma visual en gel de agarosa al 2%, empleando en caso de duda el *software* ImageJ 1.53 (Rasband 2018) del NIH (National Institutes of Health, EE.UU.).

Por último, todos los protocolos de PCR se evaluaron en muestras de lavados prepuciales de 289 toros reproductores criados en régimen extensivo sometidos a un protocolo de extracción y purificación de ADN de acuerdo a lo referido en la sección 3.3., que, se seleccionaron con base en los obtenidos mediante secuenciación masiva en esas mismas muestras (considerada la técnica de

referencia en el Artículo 3 “*Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples*”, ver sección 3.3. *Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas presentes en lavados prepuciales de toros. Análisis estadístico de los resultados*) por la cual se amplificó el gen del 16S ARNr en un análisis metagenómico de las muestras, empleando estos resultados como los resultados de referencia para la identificación de la especie *C. fetus*. Con los resultados se calculó el porcentaje de concordancia de ambas técnicas.

De este modo, se evaluó el rendimiento diagnóstico de los 6 protocolos de PCR seleccionados para la detección de *C. fetus* en muestras prepuciales de toros reproductores. De manera adicional, se evaluó:

- 1) El porcentaje de muestras positivas a *C. fetus* identificadas como Cfv, considerando como válido el resultado de identificación de la subespecie solo cuando: i) dos o más protocolos de PCR dirigidos sobre dianas de subespecie Cfv hubieran mostrado resultados positivos en la muestra problema y ii) que dicha muestra hubiera resultado positiva previamente a PCR de especie.
- 2) El porcentaje de muestras positivas a *C. fetus* identificadas como Cff, considerando como válido el resultado de identificación de subespecie cuando la PCR dirigida sobre la diana específica de Cff (Wang et al., 2002) hubiera mostrado un resultado positivo en la muestra problema y ii) que dicha muestra hubiera resultado positiva previamente a PCR de especie.
- 3) El porcentaje de inespecificidades detectadas en los protocolos de PCR destinados a la diferenciación de subespecies (se consideraron inespecificidades aquellas muestras negativas a *C. fetus* -PCR de especie- y que mostraron resultados positivos en cualquier PCR para la detección de Cfv y Cff -PCR de subespecie).

3.4.2. Adaptación de un protocolo de pirosecuenciación a un protocolo de PCR en tiempo real sonda específico para la detección de C. fetus.

El protocolo de PCR descrito por Persson y colaboradores se basaba en el empleo de los cebadores gyrB-F3 y gyrB-R2 y de la sonda gyrB-P1 siendo su diana genética el gen *gyrB* (Persson et al. 2012). Originalmente, esta técnica se diseñó como una técnica de PCR múltiple que amplificaba un fragmento pequeño del gen *gyrB* de *Campylobacter* spp. que, tras su secuenciación, permitía la diferenciación de las especies *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. upsalensis* y *C. fetus* en muestras de heces procedentes de pacientes con diarrea (Persson et al. 2012). La combinación de las secuencias de los cebadores para la amplificación de *C. fetus* y sonda para la amplificación de *Campylobacter* spp. fue evaluada *in silico* mediante el *software online* BLAST 2.11 (NCBI 2021). En el presente trabajo, se tomaron los cebadores específicos para la amplificación de *C. fetus* junto a la sonda gyrB-P1 y se confeccionó un protocolo de PCR bajo las recomendaciones del kit de PCR QuantiFast Pathogen PCR +IC (Qiagen, Alemania) al que fue añadido el control interno de reacción de PCR que proporciona el propio kit. Debido a que el fundamento para la amplificación de la diana secuenciada mediante pirosecuenciación es el mismo que el de la técnica PCR, el protocolo de amplificación indicado en el trabajo de Person y colaboradores se ajustó a los criterios de selección mostrados en el apartado 3.2.

Revisión sistemática de la literatura científica. La especificidad, la sensibilidad y el rendimiento diagnóstico de esta nueva PCR se evaluó de acuerdo con lo descrito en 3.4.1. *Estudio comparativo para la detección mediante PCR de C. fetus en lavados prepuciales de toros reproductores.*

3.4.3. Estudio comparativo para la detección de T. foetus mediante la técnica PCR en lavados prepuciales de toros reproductores.

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática mediante cadenas de búsqueda en PubMed, Scopus y Web of Science (3.2. *Revisión sistemática de la literatura científica*). El

total de publicaciones obtenidas (n = 614) fueron filtradas de acuerdo con criterios de inclusión y exclusión (ver sección 3.2. *Revisión sistemática de la literatura científica*).

Se seleccionaron 6 protocolos de PCR diferentes, de los cuales 5 empleaban como diana genética la región ARNr-ITS (Gookin et al. 2002, 2005; Nickel et al. 2002; McMillen y Lew 2006; Mueller et al. 2015) y uno empleaba como diana una región microsatélite, *TfRE*, de *T. foetus* (Ho et al. 1994). Las secuencias de los cebadores y sondas empleados, así como las condiciones de PCR de los protocolos comparados se resumen en la Tabla 4. Los resultados referentes a la especificidad y sensibilidad analítica, así como el rendimiento diagnóstico de los protocolos de PCR seleccionados se compararon entre sí con el objetivo de determinar el protocolo que presentaba los mejores resultados para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros reproductores. La especificidad analítica se probó sobre una batería de aislados de otras especies de microorganismos presentes o potencialmente presentes en los lavados prepuciales p.ej. *E. coli* o *C. fetus* incluyendo las subespecies *Cfv* (ICM18/00036) y *Cff* (ATCC 27374^T).

La sensibilidad analítica fue analizada mediante diluciones seriadas en base 10 de una concentración inicial de 1ng/μL de ADN previamente extraído de la cepa tipo de *T. foetus* 30232 (ATCC, EE.UU.) de acuerdo a las directrices de la OMSA para la correcta determinación del LOD y de los IC (WOAH 2019). El punto de corte de las técnicas de PCR en tiempo real se estableció del mismo modo al descrito en la sección 3.4.1. *Estudio comparativo para la detección de C. fetus mediante la técnica PCR en lavados prepuciales de toros reproductores*.

Por último, el rendimiento diagnóstico de todos los protocolos de PCR seleccionados se analizó sobre una selección de 466 muestras de lavados prepuciales (una muestra por toro), que, como se indicaba en la sección 3.1. *Material de estudio*, se clasificaron como positivas o negativas en base a los resultados de la PCR descrita por (McMillen y Lew (2006), (identificada en este trabajo como M06, Tabla 4) indicada por la OMSA para la detección de *T. foetus* en lavados prepuciales (WOAH 2018) y considerada como técnica de referencia en trabajos previos (Meggiolaro et al. 2019). El coeficiente kappa de Cohen se calculó mediante el *software* SPSS (IBM SPSS Statistics 22.0), así como los valores predictivos positivo (PPV) y negativo (NPV).

Tabla 4. Protocolos de PCR incluidos para la detección de *T. foetus* incluidos en el estudio comparativo recogido en el Artículo 4 de la presente Tesis.

Diana ^a	Tipo de PCR	Referencia (código ^b)	Cebadores y sondas (5' a 3')	Condiciones de PCR ^c									
				Fw (μM)	Rv (μM)	Pr (μM)	ID ₁ (C°/ min)	D. (C°/s)	A. (C°/s)	E. (C°/s)	N° FE ₁ (C°/ min)	AS. (bp)	
ITS	Tiempo real (sonda)	McMillen y Lewis 2006 (M06)	TF2: GCGGCTGGATTAGCTTCTTT	0.90	0.90	0.08	95/5 ^d	95/20	60/45	40	57		
			TF2: GCGCGCAATGTGCAT										
			TRICHP2: 6-FAM-ACAAG TTCGATCTTTG-MGB-BHQ										
ITS	Tiempo real (SYBR)	Mueller et al. 2015 (M15)	TFR3: CGGGTCTTCCTATAT GAGACAGAACC	0.20	0.20		95/5	95/30	63/20	40	348		
			TFR4: CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA										
EF	Tiempo real (sonda)	Presente estudio (V21)	Frf_EF1A1: AGTCCGCCGCC AAATCAA	0.50	0.50	0.40	95/5	95/20	61/35	45	76		
			Rrf_EF1A1: CTCTTCAAACCTCGGCTGTGA										
			Pfr_EF1A1: 6-FAM-ATCATCAAGTACGGCTCAGT-MGB-NFQ										
ITS	Convencional (anidada) ^e	Gookin et al. 2002 (G02)	TFR3: CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC	1.25	1.25		95/15	95/30	57/30	72/30	50	72/10	347
			TFR4: CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA										
ITS	Convencional	Gookin et al. 2005 (G05)	TFITS-F: CTGCCGTTGGATCAGTTTCG	2.50	2.50							208	
			TFITS-R: GCAATGTGCATTCAAAGATCG										
			499F: GCTCGTAGTCAGAACTGC	0.30	0.30		95/15	95/60	60.1	72/120	35	72/10	642
ITS	Convencional	Nickel et al. 2002 (N02)	I140R: CCCAATTAGAACTCT ATCTC						/60				
			TF211A: CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTA	0.20	0.20		95/15	94/60	60/60	72/60	35	72/10	211
TFIRE	Convencional	Ho et al. 1994 (H94)	TF211B: GCGCAATGTGCATTCAAAGATTCG										
			TF1: CATTATCCCAAATGGTATAAC	0.38	0.365		95/15	94/60	45/60	72/120	41	72/10	162
			TF2: GTCATTAAGTACATAAATTC										

^a Región genómica que comprende los genes *I8S*, *5.8S* and *28S* del ARNr y los espaciadores internos de transcripción 1 y 2 de *T. foetus* (ITS), el gen *EF1-alpha-Tf1* gene (EF) y la región microsatélite TFIRE (TFIRE). ^b Código mediante el cual ha sido nombrado cada protocolo de PCR en el presente estudio. ^c Los protocolos de PCR M06, V21, G02, G05, N02 y H94 se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μL y el protocolo M15 en 20 μL; Fw(μM), concentración final del cebador sentido; Rv(μM), concentración final del cebador anti sentido; Pr(μM) concentración final de la sonda; ID₁(°C/min), desnaturalización inicial; D:(°C/s) fase de desnaturalización en cada ciclo de PCR; A:(°C/s), fase de hibridación en cada ciclo de PCR; E:(°C/s) fase de elongación en cada ciclo de PCR; N°, número de ciclos; FE. (°C/min), elongación final; AS.(bp), longitud del producto de PCR en pares de bases. ^d Se realizó un paso previo de 50 °C durante 2 min. ^e Se trata de una PCR anidada de un solo paso.

3.4.4. Diseño de una técnica de PCR en tiempo real sonda específica basada en el gen *EF1 α Tf1* para la detección de *T. foetus* en lavados prepuciales de toros

Debido a que las técnicas de PCR dirigidas sobre la región ARNr-ITS podrían dar amplificaciones inespecíficas con otros microorganismos potencialmente presentes en muestras procedentes del tracto reproductivo en ganado bovino, como *Simplicimonas* spp. (Frey et al. 2017), y considerando el bajo número de técnicas de PCR diseñadas sobre dianas alternativas a este fragmento genético para la confirmación de casos positivos a *T. foetus* en muestras prepuciales, en la presente tesis se diseñó una nueva PCR en tiempo real sonda específica basada en el gen *EF1- α Tf1*.

En el trabajo de Oyhenart se diseñó y puso a punto una técnica LAMP cuya diana era el gen *EF1- α Tf1* (Oyhenart 2018). De acuerdo al citado trabajo, esta técnica LAMP presentaba una elevada sensibilidad (capaz de detectar 0,5 trofozoítos/mL) así como una alta especificidad al ser empleada sobre muestras prepuciales de toros (no se obtuvieron amplificaciones inespecíficas al ser aplicada en muestras que contenían *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp., protozoos comúnmente confundidos con *T. foetus*) (Oyhenart 2018).

El diseño de la técnica de PCR en tiempo real basada en el gen *EF1- α Tf1* se realizó utilizando el *software* Oligo 7 (Oligo 7 Cebador Analysis Software) (Rychlik 2007) y la secuencia de *T. foetus* referencia HM217356.1 de la base de datos GeneBank, la única secuencia disponible y la misma empleada para el diseño de la técnica LAMP en el trabajo de Oyhenart (Oyhenart 2018). La especificidad de los cebadores y la sonda se verificó *in silico* mediante blastn (Johnson et al. 2008) con el *software online* BLAST 2.12 (NCBI 2021). Los cebadores fueron sintetizados por Eurofins Genomics (Eurofins Genomics, GmbH, Alemania), y la sonda TaqMan-MGB fue sintetizada por ThermoFisher (Applied Biosystems, Reino Unido). De manera adicional, se incluyó un control interno para comprobar la ausencia de inhibición de la reacción de PCR con el fin de minimizar el porcentaje de obtención de falsos negativos al ser aplicada sobre muestras biológicas. Finalmente, este protocolo fue incluido en el estudio comparativo realizado con los seis protocolos de PCR para la detección de *T. foetus* en lavados prepuciales de toro previamente seleccionados y evaluados

(3.3.4. *Estudio comparativo para la detección de T. foetus en lavados prepuciales*), estudio recogido en el Artículo 5 y la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de cada medio de transporte incluido en el estudio comparativo en un volumen final de 250 mL. Todos los compuestos fueron disueltos en agua destilada. Se indica de izquierda a derecha: Weybridge (We), Lander (La), Thomann (Th), Stuart (St) y PBS (P) con un pH final de 7,4 y la referencia del producto y su casa comercial (c.comercial).

Compuesto	We	La	Th	St	P	Referencia (c. comercial)
Polvo de carbon activado (g)	1,25	1,25				05105A (Sigma)
Infusión de caldo de ternera (g)	6,25					11748812 (Fisher)
Sangre de caballo lacada (mL)	17,5	17,5				SR 0048 (Oxoid)
Suplemento selectivo Campylobacter	1 vial	1 vial	3/8 vial*			SR 0069 (Oxoid)
Anfotericina B** (mL)	10	10	10			A-2942 (Sigma)
Caldo Mueller-Hinton (g)		5,25				0757-17-6 (DIFCO)
Suplemento de crecimiento Campylobacter		1/2 vial	1/2 vial			SR 00232 (Oxoid)
NaCl (g)					2	131659 (Panreac)
KCl (g)					0,05	131494 (Panreac)
Na ₂ HPO ₄ (g)					0,36	131679 (Panreac)
K ₂ HPO ₄ (g)					0,06	131509 (Panreac)
Stuart (modified) (g)				4	1	CM0111 (Oxoid)
Nutrient broth N°2 (g)			6.25			CM 0067 (Oxoid)

*Usar 3/8 de un vial es poco práctico, por ello recomendamos la fabricación de al menos 333,3 mL de medio para emplear 1/2 del vial. **En el medio Weybridge, el 5- fluorouracilo y la cicloheximida fueron sustituidos por anfotericina B, mientras que en el medio Lander el 5- fluorouracilo fue sustituido por anfotericina B. Estas modificaciones se realizaron en base a lo publicado en los trabajos de Martin et al. (2002), Murinda et al. (2006) y Koya (2016), debido a que se ha señalado que el 5- fluorouracilo y la cicloheximida pueden ser tóxicos para *C. fetus*, interfiriendo en su crecimiento.

3.5. Evaluación y optimización del protocolo de cultivo de *C. fetus* para el aislamiento de *Cfv* a partir de lavados prepuciales de toros reproductores criados en régimen extensivo

El lavado prepucial de toros reproductores obtenido mediante raspado es una de las muestras de referencia empleadas para el aislamiento de *Cfv* para el diagnóstico de CGB mediante cultivo (técnica de referencia) (WOAH 2021). El aislamiento de *Cfv* a partir de muestras prepuciales de

toros criados en régimen extensivo, no solo permite el diagnóstico de la CGB sino que también permite, por ejemplo, el desarrollo de autovacunas, el estudio de la susceptibilidad y patrones de resistencia a antibióticos, el desarrollo de estudios epidemiológicos, etc. No obstante, la sensibilidad del cultivo puede ser reducida en algunos escenarios epidemiológicos (WOAH 2021). En este contexto y con la finalidad de evaluar las variables que pueden afectar al rendimiento diagnóstico del cultivo de *C. fetus* a partir de muestras de lavados prepuciales, se realizó una revisión bibliográfica de distintos protocolos de cultivo de Cfv (desde la recogida de la muestra hasta su aislamiento en el laboratorio) con el fin de establecer las condiciones óptimas para el aislamiento del patógeno, evaluándose en muestras de campo.

Los criterios de selección de los medios de transporte, enriquecimiento y aislamiento se basaron en los siguientes puntos: i) que el resumen del artículo, capítulo de libro o informe debía incluir la composición o el nombre del medio de transporte, enriquecimiento y/o de cultivo empleado para el aislamiento de *C. fetus* en muestras de campo (priorizando aquellos trabajos que incluyeran comparativas entre medios y/o diferentes técnicas de cultivo), ii) que se trate de trabajos donde los protocolos de cultivo sean empleados específicamente para el aislamiento de Cfv a partir de muestras procedentes del tracto reproductivo en bovino. Por otro lado, se excluyeron trabajos previos al trabajo de Clark y colaboradores (1974) debido a las potenciales limitaciones asumidas en relación a la correcta clasificación de Cfv, el cual pertenecería hasta esa fecha a la especie anteriormente nombrada como *Vibrio fetus*, sin una diferenciación clara de las actuales subespecies de *C. fetus* (Cfv, Cff y Cft).

En base a la literatura científica seleccionada, el aislamiento de *C. fetus* puede basarse en un sistema de hasta tres fases: i) empleo de un medio de transporte para la muestra desde su recogida hasta su llegada al laboratorio, ii) el empleo de un medio de enriquecimiento previo al cultivo en placa para maximizar las posibilidades de aislamiento de Cfv y iii) el empleo de medios de aislamiento en placa con el uso, en ocasiones, de filtros. Además de los medios, se evaluaron otras variables que pueden impactar en la probabilidad de aislamiento de *C. fetus* a partir de muestras de lavado prepucial: i) tiempo desde la toma de muestra hasta su procesamiento en laboratorio, ii) temperatura

de conservación durante el transporte y iii) el uso de filtros como parte del protocolo de aislamiento en placa para minimizar la presencia de colonias pertenecientes a otras especies de microorganismos (contaminantes) en las placas de cultivo.

Tras la selección de los medios más comúnmente empleados (medios de transporte, enriquecimiento y de aislamiento), se realizó un estudio comparativo dividido en dos etapas:

- i) Evaluación comparativa de los medios de transporte, enriquecimiento y cultivo. La comparativa fue llevada a cabo mediante la contaminación artificial con *Cfv* de los distintos medios de transporte y enriquecimiento para su posterior cultivo en placa. En los medios de transporte se evaluaron las dos citadas variables que podían impactar en la viabilidad de *C. fetus*: i) el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta su llegada al laboratorio donde es procesada, y ii) la temperatura durante el transporte de la muestra. Tras la conservación de los medios de transporte contaminados artificialmente durante 24 h y 48 h a diferentes temperaturas (Figura 5A), se realizó un recuento bacteriano en placa y se compararon los resultados en términos de UFC (unidades formadoras de colonias) (experimento 1). Se seleccionó el medio de transporte que presentó los mejores resultados (mayor número de UFC recuperadas) para la evaluación de diferentes medios de enriquecimiento y de cultivo (Figura 5B) (experimento 2).
- ii) Determinación del protocolo de recuperación de *C. fetus* con mayor rendimiento diagnóstico a partir de 32 lavados prepucales de toros reproductores (una muestra por toro) criados en extensivo contaminados artificialmente con *Cfv*. Con el fin de establecer las condiciones de cultivo que maximizasen la recuperación de *Cfv* y minimizasen el crecimiento de otros microorganismos, se evaluaron diferentes estrategias combinando distintas temperaturas de cultivo (42 °C y 37 °C), uso de filtros (0,65 µm y 0,45 µm) y uso de medios sólidos de cultivo (selectivo y general) (experimento 3).

Los ensayos para la evaluación de los medios de transporte, medios de enriquecimiento y aislamiento se llevaron a cabo mediante contaminaciones de laboratorio empleando la ya citada cepa control ICM18/00036, que había sido previamente clasificada mediante los protocolos de PCR

publicados en el estudio previo mostrado en el Artículo 3 (Polo et al. 2021), siendo positiva para las técnicas de PCR específicas de la especie *C. fetus* (basadas en los genes *gyrB*, *nahE*, *16S* ARNr, *cpn60*, *cstA* y *cdtB*), y para las específicas de subespecie Cfv (basadas en los genes *ISCfe1*, *parA* y *virB11*) y negativa para la de Cff (basada en el gen *sapB2*).

Como se ha explicado anteriormente, en primer lugar (experimento 1) se evaluó un total de cuatro medios de transporte (cuya composición se detalla en la Tabla 5): i) Weybridge (de Lised et al. 1982) donde el 5-fluorouracilo y la cicloheximida (compuestos que pueden comprometer el crecimiento de *C. fetus*) se sustituyeron por anfotericina B como se ha descrito previamente (Martin et al. 2002; Murinda et al. 2006; Koya 2016), ii) Lander (Lander 1990b) donde el 5- fluorouracilo se sustituyó por anfotericina B tal y como se ha descrito previamente (Martin et al. 2002; Murinda et al. 2006; Koya 2016), iii) Thomann (Harwood et al. 2009), iv) Stuart (Thermo Fisher Scientific, España), y v) tampón PBS, que fue usado como medio de control para determinar la viabilidad de Cfv en un medio carente de nutrientes y antibióticos.

Cada medio de transporte se inoculó con 300 uL un inóculo de Cfv en PBS a una concentración final de $\approx 10^5$ UFC/mL, concentración comúnmente observada en lavados prepuciales de toros reproductores infectados por Cfv (Indjein 2013), obteniendo una concentración final en los de $\approx 3 \times 10^4$ UFC/mL en 10 mL.

Dichos medios contaminados fueron almacenados durante 24 h en diferentes escenarios: i) 12h en refrigeración (4°C) y 12h a temperatura ambiente (21±2°C), ii) 12h a 21±2°C y 12h a 4°C, iii) 24h a 4°C, y iv) 24h a 21±2°C (Figura 5A).

Finalmente, un volumen de 100 µL de cada medio de enriquecimiento fue sembrado por duplicado en masa en placas de medio sólido Skirrow (Skirrow 1977) mediante empleo de asa Digrafsky, con excepción del medio Stuart, único semisólido, cuya siembra se realizó mediante un hisopo. Las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 4 días. El experimento se repitió 8 veces a lo largo de tres días. Asimismo, también se evaluaron las mismas combinaciones de temperatura con un tiempo total de conservación de 48h, en intervalos de 24h en lugar de 12h (Figura 5A). Los recuentos de UFC obtenidos para cada medio de transporte y combinaciones

temperatura-tiempo se compararon mediante un modelo de Poisson que incluyó los distintos medios de transporte y la combinación temperatura-tiempo como variables explicativas. No se analizaron mediante este modelo los resultados de los ensayos hechos durante 48 ya que el crecimiento de Cfv fue muy limitado (ver sección 4.4.1).

Tabla 5. Composición de cada medio de enriquecimiento y de cultivo empleado en un volumen final de 250 mL. Todos los compuestos fueron disueltos en agua destilada. Los medios de enriquecimiento fueron dispensados en tubos (12 mL) mientras que los medios de cultivo fueron dispensados en placas de Petri. Se indica de izquierda a derecha: medio de enriquecimiento Preston (Pr), medio de enriquecimiento Brucella (Br), medio de enriquecimiento Bolton (Bo), medio de cultivo Skirrow (Sk), medio de cultivo Preston (Pr-ag) y medio agar sangre con sangre de cordero al 5% (SBA).

Compuesto	Pr	Br*	Bo	Sk	Pr-ag	SBA	Referencia (casa comercial)
Caldo nutriente NO.2 (g)	6.25					**	CM0067 (Oxoid)
Base agar sangre (g)				9.75		**	CM0331B (Oxoid)
Base agar Campylobacter (g)					9.25	**	CM0689 (Oxoid)
Caldo Brucella deshidratado (g)		7				**	R452662 (Remel)
Agar bacteriológico (g)		0.4				**	A01718 (Condalab)
Caldo Bolton (g)			6.9			**	CM0983 (Oxoid)
Sangre lacada de caballo (mL)	12.5		12.5	12.5	12.5	**	SR 0048 (Oxoid)
Suplemento selectivo Campylobacter				½ vial		**	SR 0069 (Oxoid)
Medio selectivo Campylobacter Preston	½ vial				½ vial	**	SR 0204 (Oxoid)
Suplemento de crecimiento Campylobacter	½ vial				½ vial	**	SR 00232 (Oxoid)
Suplemento selectivo Bolton			½ vial			**	SR0183 (Oxoid)
Bacitracina (g)		0.05				**	11702-5g (Sigma)
Novobiocina (g)		0.0013				**	N1628 (Sigma)
Anfotericina B (mL)		10				**	A-2942 (Sigma)

* En el medio de enriquecimiento Brucella (Br), la cicloheximida fue sustituida por anfotericina B de acuerdo a los trabajos de Martin et al. (2002), Murinda et al. (2006) y Koya (2016), debido a que se ha indicado que la cicloheximida puede ser tóxica para *C. fetus*. La polimixina B fue eliminada debido a que parece inhibir el crecimiento de *C. fetus* subsp. *fetus* (Public Health Laboratory Network 2000) y algunas cepas *C. fetus* subsp. *venerealis* (Ballabene and Terzolo 1992). **Medio comercial (Biomérieux 2022).

A continuación, con el medio de transporte y las condiciones de almacenamiento que ofrecieron mejores resultados se hizo una comparativa de medios de enriquecimiento y medios de cultivo (experimento 2). Los medios de transporte evaluados (cuya composición se detalla en la Tabla 5) fueron los siguientes: i) Preston (Bolton y Robertson 1982), ii) Brucella (Marcellino et al. 2015)

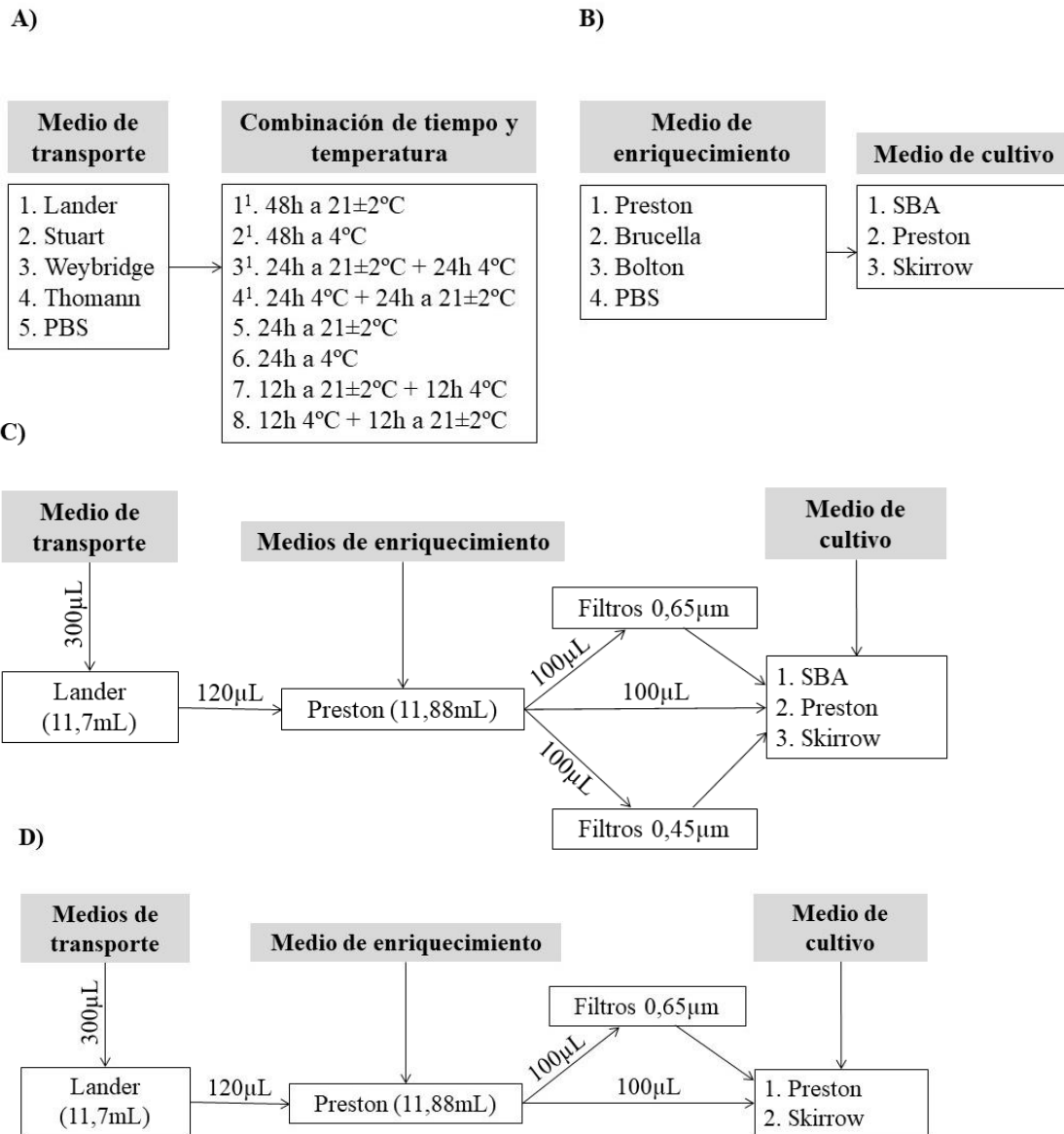
donde se sustituyó la cicloheximida por anfotericina B (Martin et al. 2002; Murinda et al. 2006; Koya 2016) y se eliminó la polimixina B debido a que podría inhibir el crecimiento de algunas cepas de Cfv de acuerdo a lo indicado en trabajos previos (Ballabene and Terzolo 1992), iii) Bolton (Hunt et al. 2021), y iv) tampón PBS.

Dicho medio de transporte se contaminó artificialmente con un inóculo de Cfv en PBS preparado de igual manera al descrito para el ensayo anterior, y 120 uL del mismo se inocularon en cada medio de enriquecimiento en estudio en un volumen final de 12 mL (empleando tubos de 12,5 mL para mantener las condiciones de microerofilia). Los medios de enriquecimiento que se incubaron a 37°C durante 48 h.

Finalmente, un volumen de 100 µL de cada medio de enriquecimiento fue sembrado en masa placas de cultivo (cuya composición se detalla en la Tabla 5), mediante empleo de asa Digrafsky: i) Skirrow (Skirrow 1977), ii) Preston (Bolton y Robertson 1982), y iii) Agar de sangre de oveja al 5% (sheep blood agar, SBA) (Biomérieux 2022). Las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 4 días (Figura 5B).

El experimento se repitió en tres días diferentes, lo que generó seis observaciones para cada combinación de medios de enriquecimiento y cultivo. Los resultados de cada combinación se compararon utilizando un modelo de Poisson como en el anterior ensayo, empleando los medios de enriquecimiento y de cultivo como covariables para identificar la combinación que daba lugar a los recuentos más altos de Cfv, de cara al diseño del siguiente ensayo, dirigido a evaluar el rendimiento del diagnóstico del protocolo seleccionado (medio de transporte + medio de enriquecimiento) utilizando muestras de lavados prepuciales de toros.

La combinación de medios y condiciones de cultivo que mejores resultados mostraron en los experimentos 1 y 2 se evaluó en muestras de campo, empleándose 32 lavados prepuciales de toro en PBS (5 mL) obtenidos mediante raspado prepucial. Todas las muestras fueron clasificadas previamente como negativas a *C. fetus* mediante PCR (GPS, España). Por cada muestra, 4,5 mL de la misma se contaminó artificialmente con 500 uL de una suspensión de Cfv con una concentración aproximada de 10⁵ UFC/mL.



¹ Datos no mostrados. Los resultados son comentados en la discusión.

Figura 5.A) Esquema del experimento realizado para la comparación de medios de transporte (volumen final del medio de transporte de 10 mL y con una concentración final de $\approx 3 \times 10^3$ UFC/mL de Cfv). B) Medios de enriquecimiento y cultivo comparados, donde cada medio de enriquecimiento se evaluó en paralelo con cada medio de cultivo: cada medio de enriquecimiento (con un volumen final de 12 mL) fue inoculado con 120 μ L del medio de transporte (con una concentración final aproximada de 3×10^4 UFC/mL de Cfv), e incubado a 37°C durante 48 h. Posteriormente 100 μ L del medio de enriquecimiento fueron sembrados en las diferentes placas de medios de cultivo, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 4 días en microaerofilia. C) Grupo 1 de muestras de lavados prepucciales de toro ($n = 12$), inoculadas experimentalmente (500 μ L de una suspensión de Cfv en PBS con una concentración aproximada 10^5 UFC/mL en 4,5 mL de lavado prepuccial) para evaluar la tasa de recuperación de Cfv bajo diferentes temperaturas de cultivo (37°C y 42°C durante 4 días en microaerofilia) filtrando previamente las muestras con filtros de 0,65 μ m y 0,45 μ m de diámetro de poro así como sin el uso de filtros; D) Grupo 2 de muestras ($n = 20$) contaminadas experimentalmente (10^4 UFC/mL de Cfv) para evaluar la recuperación de Cfv bajo diferentes temperaturas de cultivo (37°C y 42°C durante 4 días en microaerofilia) filtrando previamente las muestras con filtros de 0,65 μ m y sin el uso de filtros en los medios de cultivo selectivos Preston y Skirrow. En este grupo de muestras, el medio de transporte inoculado con Cfv es almacenado durante 24h a 21±2°C.

Se utilizó un primer grupo de muestras (Grupo 1, n=12) para evaluar la tasa de recuperación de Cfv en presencia de posibles microorganismos contaminantes presentes de forma natural en las muestras, considerando diferentes condiciones de procesamiento (Figura 5A): i) cultivo temperatura de 37 °C vs. 42 °C [la mayoría de las cepas de Cfv son capaces de crecer a 42 °C (OMSA 2021)], ii) aplicar o no un paso de filtración pasiva previo al cultivo en medio sólido [ausencia de uso de filtros frente a empleo de filtros con tamaño de poro de 0,65 µm o de 0,45 µm de acuerdo a Chaban et al. (2013)] y iii) uso de distintos medios de cultivo sólidos [no selectivos (SBA) o selectivos (Skirrow y Preston)]. Se seleccionó el mejor protocolo basado en la combinación de temperatura, uso de filtro y medio de cultivo en base a un modelo de regresión logística que incluía estas tres variables como covariables y el aislamiento de Cfv (sí/no) como resultado. En caso de que se observase crecimiento de microorganismos contaminantes en toda la superficie de la placa de cultivo, esta se clasificaba como negativa, mientras que en caso de que se pudiera observar Cfv en presencia de otras colonias no específicas, la placa se consideraba positiva.

Con base en los resultados del primer grupo de muestras, se analizó un segundo grupo (Grupo 2, n=20) para determinar forma precisa cual de las siguientes condiciones de procesamiento ofrecía mejores resultados para el aislamiento Cfv a partir de muestras de campo después del almacenamiento del medio de transporte inoculado durante 24h a temperatura ambiente (de acuerdo a los resultados del experimento 1): 37 °C vs. 42 °C, uso o no de filtración pasiva (usando filtros con tamaño de poro de 0,65 µm) y dos medios de cultivo selectivos (Preston vs. Skirrow) (Figura 5B).

4. RESULTADOS

En esta sección se recogen los principales resultados obtenidos que responden a los objetivos planteados en la presente memoria de tesis doctoral y que se han alcanzado aplicando la metodología explicada brevemente en la sección anterior. La consecución de los objetivos propuestos se ha materializado a través de la publicación de cuatro artículos científicos y un trabajo redactado a modo de publicación científica en proceso de publicación, que se presentan a continuación en un total de tres capítulos. Además, se han generado otros resultados que se contemplan en el apartado de Anexos.

Capítulo I

4.1 Agentes infecciosos en toros asociados a infertilidad en rebaños bovinos: estudio centrado en el papel de los machos.

Para llevar a cabo la evaluación sistemática de las principales causas de infertilidad en ganado bovino criado en régimen extensivo debido a agentes infecciosos y la potencial presencia de agentes predisponentes o que puedan pasar desapercibidos en los controles rutinarios asociados a infertilidad en bovino (Objetivo específico 1 de la presente tesis), se llevó a cabo una revisión sistemática de la bibliografía científica de microorganismos asociados a infertilidad en este ganado (Artículo 1. “*What about the bull? A systematic review about the role of males regarding to bovine infectious infertility within cattle herds*”). La escasez de revisiones sistemáticas y/o metaanálisis sobre las causas infecciosas de infertilidad en toros motivó también el desarrollo de este trabajo. Los resultados de dicho artículo pusieron de manifiesto el bajo número de trabajos dirigidos a estudiar los agentes infecciosos que causan infertilidad en el macho, así como las limitaciones en el conocimiento acerca del verdadero papel de los toros como responsables de las bajas tasas de fertilidad de origen infeccioso en rebaños bovinos.

El papel del toro en infertilidad bovina de carácter infeccioso puede tener lugar en dos formas: i) debido a la presencia de microorganismos en los machos que afectan directamente a la fertilidad de estos, y/o ii) debido a la presencia de microorganismos en los toros que puedan ser transmitidos a las hembras donde sean la causa de problemas reproductivos, tomando especial importancia aquellos microorganismos cuyas infecciones suelen cursar de manera asintomática en los machos. Existen patógenos (primarios y secundarios/opportunistas) causantes de infertilidad en bovino de distinta naturaleza: bacterias, parásitos, virus y hongos.

Ante la falta de información en la literatura científica en referencia a las posibles sinergias entre las distintas especies que conforman las poblaciones microbianas presentes en el tracto reproductor en bovino, en especial en machos y su relación con problemas de fertilidad, uno de

los objetivos específicos de la presente tesis (Objetivo específico 2) ha sido el análisis diferencial de las poblaciones bacterianas (uno de los grupos más diversos de acuerdo a los resultados del Artículo 1 “*What about the bull? A systematic review about the role of males regarding to bovine infectious infertility within cattle herds*”) presentes en lavados prepuciales de toros reproductores con bajos índices de fertilidad, así como machos sanos desde un punto de vista reproductivo. La finalidad de dicho trabajo fue contribuir a la mejora del conocimiento sobre las causas infecciosas de infertilidad en bovino extensivo mediante el estudio comparativo del microbioma bacteriano presente en muestras de lavados prepuciales en machos reproductores criados en régimen extensivo con bajos índices de fertilidad [fertilidad de los rebaños de los que proceden inferior al 80%, expresada como la relación entre el número de terneros registrados en un año (total hijos) y el número de vacas nodrizas presentes (total madres), expresada en porcentaje] y en toros reproductores ‘control’ (porcentajes de fertilidad de los rebaños de los que proceden iguales o superiores a 80%), y observar la posible asociación de diferentes poblaciones bacterianas y dichos problemas reproductivos. Para ello, se llevó a cabo un estudio metagenómico basado en la secuenciación de la región hipervariable V3-V4 del gen del *16S* del ARNr, y el posterior análisis de los resultados mediante herramientas bioinformáticas y estadísticas (Artículo 2 “*Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds*”). Así mismo, se evaluó la utilidad de esta técnica como herramienta diagnóstica para la detección de microorganismos potencialmente patógenos asociados a infertilidad en bovino que están poco estudiados en la actualidad y para los cuales no se realizan chequeos de rutina en las explotaciones de bovino en régimen extensivo, siendo por tanto microorganismos potencialmente desatendidos en el estudio reproductivo. Por tanto, este capítulo I comprende dos estudios materializados en dos artículos:

- i. Artículo 1: publicado por la revista *Veterinary and Animal Science* [Índice de impacto (JCR): N/A – 2021 (53/168; Q2)]

- ii. Artículo 2: publicado por la revista *Research in Veterinary Science*, [factor de impacto JCR: 2.554 – 2021 (cuartil Q1), factor de impacto SJR: 0.58 – 2021, (cuartil Q1)] con la referencia <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.04.019>

4.1.1. Artículo 1: What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds

Autores: **Polo, C.**, García-Seco, T., Díez-Guerrier, A., Briones, V., Domínguez, L., Pérez-Sancho, M.

Título: *What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds*

Revista: *Veterinary and Animal Science*

Año: 2023

Volumen: Online

Páginas: 1-9

DOI: doi.org/10.1016/j.vas.2023.100284

La mayoría de los estudios sobre microorganismos causantes de infertilidad en bovino se centran en las hembras, hecho probablemente asociado a que son estas las que soportan el grueso de la producción al ser ellas el principal componente de las explotaciones ganaderas en sistemas para la producción de carne. En explotaciones de régimen extensivo el sistema de reproducción principal es la monta natural, donde los machos comúnmente son empleados para la cubrición de varias hembras (y en ocasiones comparten espacios con distintos grupos de hembras durante gran parte del año), lo que puede suponer un alto riesgo de diseminación de patógenos en dichas explotaciones. En este tipo de producciones, los machos pueden desempeñar un papel importante en relación con la fertilidad de dichos rebaños. En primer lugar, de manera directa, asociado a patógenos que afectan a la capacidad reproductiva del propio macho, p.ej. patógenos que afectan a la calidad espermática como BoHV-1 (Givens 2018). En segundo lugar, de manera indirecta, al actuar como transmisores de patógenos que afectan a la fertilidad de las hembras mientras en los

Resultados

machos pueden causar infecciones asintomáticas p.ej. *C. fetus* (Givens 2018). Esta limitada información disponible sobre los machos reproductores dificulta determinar el verdadero impacto de los toros en la sanidad animal a nivel reproductivo y la producción ganadera en régimen extensivo, más aún cuando se ha observado que la cantidad de patógenos potencialmente causantes de infertilidad es muy amplia en ganado bovino, incluyendo patógenos zoonóticos como *C. fetus*.

Como se ha comentado previamente, tanto la fertilidad (entendida como capacidad reproductiva) como la presencia de patógenos causantes de infertilidad en el ganado bovino pueden tener un mayor impacto en el rebaño en un toro individual que en una vaca. De este modo, la existencia de toros subfértiles y toros portadores de patógenos causantes de infertilidad bovina se traduce en potenciales pérdidas económicas y un aumento de la huella ecológica de la producción ganadera.

Ante la acusada escasez de revisiones sistemáticas y estudios de metaanálisis sobre las causas infecciosas de infertilidad bovina en toros, y el escaso conocimiento acerca del verdadero papel del macho en este campo, este trabajo planteó como objetivo recopilar y analizar las causas infecciosas, descritas hasta la fecha (diciembre de 2022), asociadas a problemas de infertilidad bovina, centrándose en el papel del macho como causa de fallos reproductivos tanto de forma directa como indirecta. Además, se pretendía destacar posibles aspectos clave aún no determinados de la relevancia de los toros en la aparición de problemas de infertilidad de origen infeccioso en los rebaños bovinos.

Así, en el presente estudio se hizo una revisión bibliográfica sistemática utilizando las bases de datos PubMed, *Web of Science* y Scopus (hasta el 9 de diciembre de 2022) empleando las siguientes cadenas de búsqueda: i) Pubmed ‘((((("Infection"[Mesh]) OR "Reproductive Tract Infections"[Mesh]) AND "Fertility"[Mesh]) OR "Infertility"[Mesh]) AND "Cattle"[Mesh]’; ii) Scopus ‘TITLE-ABS-KEY (("In fection" AND ("Fertility" OR "Infertility") AND "Cattle"))’; iii) *Web of Science* ‘TS=((("Infection" AND ("Fertility" OR "Infertility") AND "Cattle"))’. Se revisaron un total de 2224 registros bibliográficos de los cuales 38 artículos, desde el año 1966, fueron analizados en base a los siguientes criterios de selección: i) estudios realizados sobre

muestras de campo procedentes de rebaños bovinos con problemas de fertilidad, ii) estudios que hubieran identificado uno o más microorganismos como la posible causa de la baja tasa de fertilidad de dichos rebaños, y iii) estudios realizados en rebaños compuestos exclusivamente por machos o mixtos (presencia de toros y vacas).

De este modo, se identificaron 27 microorganismos diferentes agrupados en: i) seis géneros y 18 especies de bacterias, ii) cinco especies de virus y iii) cuatro especies de parásitos. No se identificaron hongos en los estudios incluidos. Los patógenos más frecuentemente descritos fueron BoHV (descrito por el 26,3% del total de publicaciones), *Campylobacter fetus* (23,7%), *Tritrichomonas foetus* (18,4%), y BVDV, *Ureaplasma* spp., y *Mycoplasma* spp. (10,5% cada uno). Se encontraron patógenos de los que apenas se han publicado estudios en referencia a cómo afectan a la fertilidad de los machos o el mecanismo de transmisión a las hembras (p.ej. *Staphylococcus* spp., o BoHV-4). La distribución de los patógenos incluidos en el presente trabajo, presentan una distribución mundial.

De acuerdo con los resultados de la presente revisión sistemática, se observa una tendencia general hacia un número creciente de publicaciones enfocadas al estudio de los problemas de infertilidad en toros, lo que podría estar indicando que el impacto de las infecciones presentes en machos que afectan negativamente a la fertilidad de los rebaños genera una creciente preocupación que suscita un interés en aumento en esta materia.

Uno de los resultados más sorprendentes de esta revisión fue la ausencia de patógenos (de transmisión venérea confirmada o posible) ampliamente reconocidos como causantes de problemas reproductivos en vacas. Algunos ejemplos son *H. somni*, *Pasteurella* spp., *Enterococcus* spp., *Aspergillus* spp. o *Candida* spp. Esto es especialmente sorprendente cuando se ha demostrado el papel directo que algunos de ellos pueden tener en la capacidad reproductiva del toro. Un ejemplo de ello es *Enterococcus faecium*, cuya capacidad para causar el deterioro de la calidad espermática en toros se ha demostrado mediante infecciones experimentales (Ďuračka et al. 2021). En el caso de *Candida* spp. se ha observado que las infecciones en el tracto reproductivo de vacas podrían ser causa de problemas reproductivos (Foley y Schlafer 1987;

Henker et al., 2022; Yoo, 2010), no obstante, no se encuentra información en la literatura científica acerca de si podría o no transmitirse de machos a hembras a través de la monta natural e inseminación artificial ni de su posible efecto sobre la fertilidad del propio macho pese a haberse descrito que en búfalos (*Bubalus bubalis*), los machos son una posible fuente de infección de *Candida* spp. para las hembras (Perumal et al. 2013). Con base en estos datos, se puede asumir la existencia de importantes limitaciones en el conocimiento sobre los patógenos primarios y oportunistas que pueden afectar a la fertilidad del toro y, en consecuencia, en la comprensión sobre la importancia del macho en la fertilidad de los rebaños.

Por último, cabe citar que las publicaciones incluidas en el presente estudio de revisión empleaban inmunoensayos (como la técnica ELISA), cultivo (y en ocasiones observación directa del patógeno mediante microscopía) y PCR. Más allá de las limitaciones técnicas que puedan presentar estas aproximaciones diagnósticas para la identificación de los agentes causantes de infertilidad en los rebaños, todas presentan un inconveniente común: suelen estar diseñadas exclusivamente para el diagnóstico dirigido a microorganismos específicos (p.e. microorganismos cultivables o uso de medios selectivos en el caso del cultivo y técnicas de PCR especie-específicas en el caso del diagnóstico molecular). Sin embargo, actualmente existen herramientas más novedosas, como el empleo de la secuenciación masiva en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, que brindan la posibilidad de estudiar la población completa de microorganismos presentes en una muestra, lo que permite evaluar la importancia de patógenos potencialmente desatendidos o que no son identificados rutinariamente por los laboratorios diagnósticos. Esto permitiría complementar el conocimiento sobre microorganismos potencialmente asociados a infertilidad en toros contribuyendo a la confirmación de la HIPÓTESIS 4 (*El empleo de análisis metagenómicos sobre muestras clínicas procedentes de toros reproductores es una herramienta adecuada para avanzar en el conocimiento sobre el papel del toro en los problemas de infertilidad de etiología infecciosa, permitiendo identificar patógenos asociados a problemas de fertilidad en el rebaño así como sus dinámicas de infección, especialmente en el caso de aquellos potenciales patógenos que escapan a los controles rutinarios así como arrojar información sobre*

la presencia de microorganismos desconocidos hasta la fecha que pudieran estar afectando, de forma primaria o secundaria) de la presente memoria de tesis doctoral. Este escenario se ha abordado en el Artículo 2 (*“Exploiting rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds”*) del presente capítulo (que se presenta más adelante). En definitiva, el Artículo 1 puso de manifiesto: i) la necesidad de establecer claramente el papel de algunos microorganismos identificados en el presente estudio (y que tradicionalmente no se han asociado con problemas reproductivos) en la infertilidad del toro como p.e. *Staphylococcus* spp., y ii) la necesidad de realizar más estudios en toros reproductores con el fin de evaluar su verdadero papel en referencia a la infertilidad bovina y de este modo, poder establecer programas adecuados para el control de microorganismos causantes de infertilidad que puedan estar pasando desapercibidos. En base a las conclusiones del trabajo plasmado en el Artículo 1, los resultados del mismo apoyan la HIPÓTESIS 1 (*existen microorganismos que juegan un papel importante (primario/secundario) en los problemas de fertilidad de origen infeccioso en toros de régimen extensivo que no se conocen o que no se consideran en los análisis microbiológicos realizados en el diagnóstico rutinario de esta patología*), HIPÓTESIS 2 (*Existe un limitado conocimiento acerca del verdadero papel del macho en la infertilidad infecciosa bovina de rebaño seguramente asociado al bajo número de estudios realizados en machos reproductores en extensivo sobre los patógenos causantes de infertilidad en toro que pueden ser transmitidos de forma venérea a las hembras en las que causan infertilidad*), y la HIPÓTESIS 3 (*El análisis sistemático de la literatura científica es una herramienta útil para reconocer los patógenos descritos asociados a infertilidad en toros permitiendo identificar las posibles limitaciones más relevantes respecto al conocimiento que tenemos sobre el posible impacto del toro en la fertilidad de los rebaños por causas infecciosas, lo que permitirá sentar las bases de un plan de control y prevención de agentes infecciosos causantes de infertilidad en toros*) de la presente memoria de tesis doctoral.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary and Animal Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vas

What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds

Coral Polo ^{a,b}, Teresa García-Seco ^a, Alberto Díez-Guerrier ^{b,c}, Víctor Briones ^c, Lucas Domínguez ^{a,c}, Marta Pérez-Sancho ^{a,c,*}

^a VISAVET Health Surveillance Center, Universidad Complutense de Madrid, Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^b MAEVA SERVET S.L., Calle de la Fragua 3, 28749 Alameda del Valle, Madrid, Spain

^c Department of Animal Health, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Cattle infertility
Breeding bulls
Systematic review
Infectious infertility

ABSTRACT

Numerous pathogens affect cow fertility. Nevertheless, little information has been published about microorganisms associated with cattle infertility focusing on bulls. The present review offers a current analysis and highlights potential key aspects on the relevance of bulls in the emergence of infertility problems of infectious origin within herds that are still not completely determined. The present systematic review was conducted using the PubMed, Web of Science, and Scopus databases on December 9, 2022. In total, 2,224 bibliographic records were reviewed and, according to strict inclusion criteria, 38 articles were selected from 1966 to 2022, from which we ranked more than 27 different microorganisms (fungi were not identified). The most cited pathogens were BoHV (described by 26.3% of the papers), *Campylobacter fetus* (23.7%), *Trichostrongylus axei* (18.4%), and BVDV, *Ureaplasma* spp., and *Mycoplasma* spp. (10.5% each). Despite the general trend towards an increasing number of publications about bull-infertility problems, a number of pathogens potentially transmitted through both natural breeding and seminal doses given to females and associated with infertility within herds were not ranked in the study (e.g., *Chlamydia* spp.). This work highlights i) the need to clearly establish the role of certain microorganisms not traditionally associated with reproductive problems in bull infertility (e.g., *Staphylococcus* spp. or BoHV-4) and ii) the need to perform additional studies on breeding bulls to clarify their role in infertility problems within herds. This would allow monitoring for pathogens that have gone unnoticed and those that are fastidious to diagnose and/or potentially transmitted to females.

1. Introduction

The global population is rapidly increasing. The United Nations and FAO estimate that the world population will reach 9.8 billion people in 2050, necessitating an increase in global food production of 70% (Le Mouél & Forslund, 2017). Such an increase in food production will require an improvement in livestock management, which is inherently accompanied by a multitude of factors, such as better fodder manufacturing, decreasing gas emissions and waste, and enhanced longevity, health, and fertility within herds (European Union, 2013). Indeed, cattle infertility is an important economic factor in cattle farming (Bellows, Ott & Bellows, 2002; European Union, 2013; Kastelic, 2013), which is interpreted in the livestock sector as a decreased number of calves weaned per year per cow (Titterton et al., 2017) and infectious infertility understood as those infectious that cause a decrease

in the number of pregnancies and successful births in a herd (Givens, 2006).

Numerous infectious agents can affect cattle reproduction at different levels with different symptoms (Yoo, 2010), negatively affecting the fertility of females due to their inability to become pregnant and successfully carry the pregnancy to term (Adnane & Chapwanya, 2022; Moore et al., 2021). In addition, several pathogens may have a negative impact on the fertility of bulls (Givens & Marley, 2008). Furthermore, there are microorganisms that apparently do not affect the fertility of bulls but that can be transmitted to females, in which they cause reproductive problems (Givens, 2018). For example, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* causes a bacterial infection in bulls traditionally considered to be asymptomatic that can be transmitted to females, where it translates into a diversity of reproductive problems, such as irregular estrus and early embryonic and fetal mortality (Michi

* Corresponding author at: VISAVET Health Surveillance Center, Universidad Complutense de Madrid, Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.
E-mail address: maperezs@ucm.es (M. Pérez-Sancho).

<https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100284>

Available online 4 January 2023

2451-943X/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

et al., 2016). Similarly, opportunistic pathogens ubiquitously present in the environment or as part of the animal microbiota can be found associated with bovine infertility, e.g., fungal species within the genera *Aspergillus*, *Mucor*, or *Candida* (Perumal et al., 2013) or bacteria such as *Ureaplasma diversum* (Buzinhaní et al., 2011). In addition, several pathogens linked to cattle infertility are zoonotic and may pose a risk to public health (Yoo, 2010).

Males play an important role in infectious cattle infertility within the herd in two ways: directly (by which pathogens affect the reproductive potential of bulls or sperm quality (Carli et al., 2022; Givens, 2018)) or indirectly (by which microorganisms are transmitted from males to females through natural breeding and artificial insemination but are potentially asymptomatic for bulls (Carli et al., 2022; Givens, 2018; Michi et al., 2016)). Consequently, the impact of certain microorganisms potentially present in bulls on fertility must be considered to avoid problems such as delayed conception in females, which prolongs the calving season and increases the number of culled animals, resulting in a reduction in the efficiency of production and, consequently, economic losses (Carli et al., 2022; Kastelic, 2013). Indeed, certain authors have suggested that low fertility in extensive herds is probably due to the fact that the importance of the bull has been overlooked, for example, in terms of the importance that infectious diseases, such as bovine diarrhoea (caused by BVDV) and bovine rhinotracheitis (caused by BoHV-1), may play in the low fertility rates of female herds, in which these etiological agents could be transmitted from males (Montoya-Monsalve et al., 2021). For these reasons, it is necessary to clarify the role of bulls in infertility problems within a herd, particularly concerning pathogens that directly affect the reproductive potential of bulls. In this context, the detection and monitoring of infectious agents in bulls associated with cattle infertility has become a key element in establishing accurate diagnoses and, consequently, appropriate disease prevention management. There are various techniques for the detection of microorganisms, from cultures to advanced molecular analysis based on massive sequencing. Techniques based on massive sequencing may provide an overall picture of all known microorganism, e.g., bacterial populations (Cojkic et al., 2021; Polo et al., 2022) present in clinical samples, providing extensive knowledge of the infectious agents potentially associated with cattle infertility.

Despite the information published in journals and scientific databases about bull infertility, for example the work of Givens and Marley (2008), no systematic analysis has been published about infectious agents associated with cattle infertility focusing on the role of the bull. In this context, this study provides a detailed bibliographical analysis of the available information on this subject and establishes a powerful tool for analyzing the relevance of various potential etiological agents of infertility, ranking the main pathogens that cause fertility problems in bulls. In addition, certain pathogens that may be transmitted to females (traditionally considered asymptomatic in males) that cause reproductive problems were also included in the ranking. Finally, evaluation of the information about coinfections and the techniques used for diagnosis in bulls over time are also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Information collection

We conducted a systematic review of the literature using the PubMed, Web of Science (WOS), and Scopus databases on December 9, 2022. The search strings used for each database were: i) for the PubMed database ‘(“Infection”[Mesh]) OR “Reproductive Tract Infections”[Mesh]) AND “Fertility”[Mesh]) OR “Infertility”[Mesh]) AND “Cattle”[Mesh]’; ii) for the Scopus database ‘TITLE-ABS-KEY (“Infection” AND (“Fertility” OR “Infertility”) AND “Cattle”); and iii) for the Web Of Science database ‘TS=(“Infection” AND (“Fertility” OR “Infertility”) AND “Cattle”)’. Using these strings, a total of 3186 bibliographic records were imported into the bibliographic manager Mendeley Desktop

1.19.8 software in such a way that 613 records were automatically removed (Fig. 1). In total, 2224 records were independently screened using strict inclusion and exclusion criteria (Table 1) to select articles focusing on bull fertility (or those including mixed herds in which bulls were assessed). According to these criteria, studies carried out exclusively in female herds or those carried out on both males and females, but for which the results were not sex-defined, were excluded (Table 1). Finally, 38 articles were included in the present study.

2.2. Information processing

The extracted information was collected in an Excel spreadsheet to standardize the process with a description of the following variables: reference; country in which the study took place and year of data publication, pathogens identified, and diagnostic tests used to evaluate the presence of microorganisms. The following collected variables were not further evaluated due to the low number of papers that detailed these points: production type, breed, feeding, age, type of sample, fertility ratio, and statistical tests.

2.3. Database management

The data search in the Excel spreadsheet resulting from the bibliographic information processing was carried out using tools integrated in Microsoft Excel 2016 and the R programming language (R studio 4.1.2 software).

3. Results and discussion

3.1. Ranking of identified microorganisms

Overall, information about more than 3000 bulls from 38 publications from 1966 to 2022 were included in this analysis. It is important to consider that the present review was focused on infectious causes of bull infertility, although several studies derived from studies carried out on mixed herds (cows + bulls, in which bulls were analyzed) with fertility problems were also included. The highly strict search parameters (through the search strings indicated in section ‘2.1. Information collection’ focused on infertility), and the selection criteria (indicated in Table 1) may have excluded certain studies, for example, those exclusively focused on the study of pathogens that cause infertility problems in females that can be transmitted by bulls. All the pathogens associated with infertility in bulls are summarized in Table 2, which also summarizes the impact of these microorganisms on bull infertility. Eighteen publications (47.4% of all papers) identified bacteria as the causative agent of infertility, 15 (39.5%) identified viruses, 11 (29%) identified parasites, and none identified a fungus. The set of 38 selected papers described 18 species and six genera of bacteria, five species of viruses, and four species of parasites. Our review identified microorganism not traditionally associated with cattle infertility, e.g. BoHV-5 (Marin et al., 2020) (Table 2). Thus, it is necessary to investigate the true impact of these microorganisms, which may act as primary or secondary agents, on bull infertility and the potential role of bulls as carriers in certain cases.

3.1.1. Bacteria

Campylobacter spp. was identified in 23.7% of the papers. All papers that described *Campylobacter* spp. identified the species *C. fetus*, although other species were also described: *C. jejuni* and the related bacteria *Arcobacter cryaerophilus* (McFadden et al., 2004). Concerning *C. fetus* species, two subspecies, i) *C. fetus* subsp. *veneralis* and ii) *C. fetus* subsp. *fetus*, were identified in the same proportion of papers (10.5%). *C. fetus* subsp. *veneralis* is responsible for bovine genital campylobacteriosis, a venereal disease of cattle that is frequently asymptomatic for males and that can be infective for humans (Wagenaar et al., 2014). It is considered to be one of the relevant causes of reproductive failure in

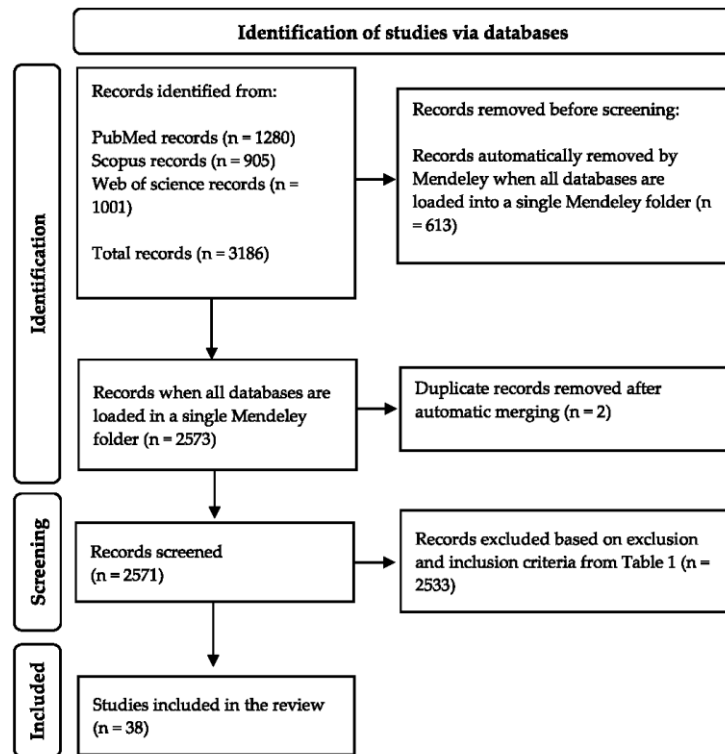


Fig. 1. PRISMA flowchart of literature for the selection of papers included in the current study about bull infertility due to infectious causes.

Table 1
Publication criteria selection.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Original work	Reviews, letters, editorials, conference abstracts, and vaccination trials
Field/experimental studies: diagnosis, prevalence, and epidemiology	Lab/bench studies (basic research)
Studies performed on samples from farms or slaughterhouses	All other locations
Direct samples from animals	Others, such as surfaces, food, water, etc.
Infectious causes related to infertility	Other causes related to infertility (e.g., nutritional deficiencies (Kenny & Byrne, 2018))
Studies performed in herds of males or both males and females (in which bulls were analyzed)	Study performed exclusively in female herds or mixed herds in which the results were not sex-defined were excluded
English language	Other languages

cows in many countries, especially when natural breeding is practiced (Balzan et al., 2020; OIE, 2021; Pena-Fernández et al., 2021). On the contrary, *C. fetus* subsp. *fetus* is described as a sporadic pathogen in the reproductive tract of cattle, where it may cause infertility (OIE, 2021). It can also be isolated from humans (Holst et al., 1987). According to our results (Table 2), the potential role of *C. fetus* subsp. *fetus* as an

etiologic agent of infertility within herds may be underestimated, as previously suggested (Polo et al., 2021).

Finally, both subspecies are clearly related to reproductive failure in females (Michi et al., 2016; Mshelia et al., 2010) and the recent study of Cagnoli et al. observed how both *C. fetus* subspecies can negatively affect the sperm quality of bulls in experimental studies (Cagnoli et al., 2020), which would mean that *C. fetus* may also affect the fertility of the bull.

In addition, it is important to highlight that the identification of *C. fetus* at the subspecies level by techniques commonly used in diagnostic laboratories may be hampered by the limitations of certain techniques, such as culture or PCR (Chaban et al., 2013; Polo et al., 2021), making it difficult to establish the true role of *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. fetus* subsp. *venerealis* in relation to low fertility rates in bulls.

Other bacteria identified in a lower percentage of publications included *Mycoplasma* spp. (identified by 10.5%), in which the species *M. bovis*, *M. suis*, *M. wenyonii*, and *M. bovis* were described (in our ranking, Table 2). *Mycoplasma* spp. are already known to be associated with potential reproductive problems in bulls (Parker et al., 2018), whereas *M. bovis* and *M. bovis* appear to be carried by breeding bulls (Carli et al., 2022; Dudek et al., 2020). In females, infections by *Mycoplasma* spp. translates onto reproductive disorders, such as vulvovaginitis, endometritis, dystocia (Parker et al., 2018), earlier return to estrus, and sporadic abortion (Carli et al., 2022), whereas the pathogenesis in bulls has been less studied (Carli et al., 2022) and the absence of symptoms could be common (Parker et al., 2018). *Ureaplasma*

Table 2

Pathogens described within cattle herds with reproduction failure by the 38 papers included in the current study. Indicated from left to right: Pathogen; the effect of the pathogen infection in bull fertility and whether it is able to be transmitted to females (T) through both natural breeding (NB) and/or seminal doses (AI) in which it is associated with reproductive problems in cows;% , percentage of total papers in which the pathogen has been described; Zoonotic; Classification: for bacteria, whether they are gram-positive/negative or without a cell wall is indicated; for parasites, the kingdom or infrakingdom is indicated; and for viruses, the Baltimore classification (Baltimore, 1971) is indicated.

Pathogen	Effect in bull fertility	T	%	Zoonotic	Classification
Bovine herpesvirus (BoHV)			26.3	No	
BoHV serovar 1	Affects sperm quality due to the weakness of the infected bull (Givens, 2018). Nevertheless, the presence of the virus in bull semen appears to decrease sperm concentration, viability, and motility and increase sperm abnormalities (B-Mohamady et al., 2020).	NB, AI (Givens, 2018)	21.1	No	virus (Group I: dsDNA)
BoHV serovar 4	*	*	5.3	No	virus (Group I: dsDNA)
BoHV serovar 5	*	*	2.6	No	virus (Group I: dsDNA)
<i>Campylobacter</i> spp.			23.7	Yes	bacteria (gram-negative)
<i>Campylobacter fetus</i>			23.7	Yes**	bacteria (gram-negative)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	In experimental work, the bacteria is able to irreversibly bind to bull spermatozoa and negatively affect sperm quality, altering the structure and functionality of the sperm plasma membrane (Cagnoli et al., 2020).	*	10.5	Yes	bacteria (gram-negative)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>veneralis</i>	In experimental work, the bacteria is able to irreversibly bind to bull spermatozoa and negatively affect sperm quality, altering the structure and functionality of the sperm plasma membrane (Cagnoli et al., 2020).	NB, AI (Givens, 2018)	10.5	Yes	bacteria (gram-negative)
<i>Campylobacter jejuni</i>	*	*	2.6	Yes	bacteria (gram-negative)
<i>Campylobacter cryaerophilus</i>	*	*	2.6	Yes	bacteria (gram-negative)
<i>Trichostrongylus axei</i>	Appears to be able to adhere to sperm, decreasing sperm quality, damaging the sperm cell, and causing its death (Benichimol et al., 2008).	NB, AI (Givens, 2018)	18.4	Yes	parasite (Protista)
Bovine viral diarrhoea virus	The virus can infect the testicles, where it negatively affects sperm quality, decreasing sperm concentration, viability, and motility and increasing sperm abnormalities (B-Mohamady et al., 2020).	NB, AI (Givens, 2018)	10.5	No	virus (Group IV: +ssRNA)
<i>Mycoplasma</i> spp.			10.5	No	bacteria (no cell wall)
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	In experimental work, the bacteria is able to infect the upper genital tract of bulls where it appears to decrease sperm motility. (Panangila et al., 1981).*	*	2.6	No	bacteria (no cell wall)
<i>Mycoplasma suis</i>	*	*	2.6	No	bacteria (no cell wall)
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	*	*	2.6	No	bacteria (no cell wall)
<i>Mycoplasma bovis</i>	*	NB, AI* (Dudek et al., 2020)	2.6	No	bacteria (no cell wall)
<i>Ureaplasma</i> spp.			10.5	Yes**	bacteria (no cell wall)
<i>Ureaplasma diversum</i>	The bacteria can infect the testicles where it negatively affects sperm quality through morphological and functional changes of the sperm (Santos Junior et al., 2021).	NB, AI (Givens, 2018)	7.9	No	bacteria (no cell wall)
<i>Besnoitia besnoiti</i>	The parasite can produce severe alterations in the reproductive tract, causing permanent infertility (Cortes et al., 2005).	*	5.3	No	parasite (Alveolata)
<i>Coxiella burnetii</i>	*	NB, AI (Givens, 2018)	2.6	Yes	bacteria (gram-negative)
<i>Noospora caninum</i>	Appears to not affect sperm quality (Kemel et al., 2022; van Velsen, 2021).	NB* (Givens, 2018; van Velsen, 2021)	2.6	Potential	parasite (Alveolata)
<i>Bacillus</i> spp.	*	*	2.6	No	bacteria (gram-positive)
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	*	NB, AI (Givens, 2018)	2.6		bacteria (gram-positive)
<i>Staphylococcus</i> spp.	Appears to decrease sperm motility (Duračka et al., 2021).	NB, AI* (Cojkic et al., 2021)	2.6	Yes**	bacteria (gram-positive)
Bluetongue virus	Serotype 8 decreases the motility of sperm and increases the percentage of sperm with morphological abnormalities (De Clercq et al., 2021).	NB, AI (Givens, 2018)	2.6	No	virus (Group III: dsRNA)
Bovine enterovirus serotype I	*	*	2.6	Potential	virus (Group IV: +ssRNA)
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	*	*	2.6	Yes	bacteria (gram-positive)
<i>Fasciola</i> spp.	*	*	2.6	Yes**	parasite (Animalia)
<i>Helicobacter cinaedi</i>	*	*	2.6	Potential	bacteria (gram-negative)
Parainfluenza III Virus	*	*	2.6	Potential	virus (Group V: -ssRNA)
<i>Streptococcus</i> spp.	*	*	2.6	Yes**	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Pathogen	Effect in bull fertility	T	%	Zoonotic	Classification
<i>Trueperella pyogenes</i>	*	NR, AI* (Cojkic et al., 2021)	2.6	Yes	bacteria (gram-positive) bacteria (gram-positive)

* Not clarified. ** Some species within the genus are zoonotic pathogens.

spp. were also identified (10.5% of the publications), in which *U. diversum* was the only described species (identified in 7.9% of the publications) able to adversely affect the fertility of males (Buzinhan et al., 2011; Hobson et al., 2013). Infections in bulls can induce seminal vesiculitis, balanoposthitis, epididymitis, and other pathologies caused by morphological and functional changes in sperm (Santos Junior et al., 2021). Other bacteria are also identified in our ranking list in a lower percentage of papers (summarized in Table 2).

3.1.2. Viruses

Two predominant viruses were noted: i) bovine herpesvirus (BoHV) (identified in 26.3% of the publications) and ii) bovine viral diarrhoea virus (BVDV) (identified in 10.5% of the publications). BoHV and BVDV are viruses that cause a wide variety of reproductive syndromes (Newcomer & Givens, 2016). Three serovars were identified in the current analysis: BoHV serovars 1 (BoHV-1), 4 (BoHV-4), and 5 (BoHV-5). According to our review, BoHV-1 was identified in 21.1% of the papers that described BoHV, BoHV-4 by 5.3%, and BoHV-5 by 2.6%.

BoHV-1 is a ubiquitous microorganism and can remain latent for long periods of time in cattle populations, in which infections appear to affect the sperm quality of bulls, decreasing the sperm concentration, viability, and motility and increasing sperm abnormalities (El-Mohamady et al., 2020) (Table 2). In females, BoHV-1 induces abortions at the end of embryonic development or newborn death during the first week of life (Newcomer & Givens, 2016). The virus can be transmitted by males, including through artificial insemination (Givens, 2018). For BoHV-4, there is a strong correlation of virus infection with postpartum metritis and abortion (Kruger et al., 2015), whereas BoHV-5 is responsible for meningoencephalitis in calves (Marín et al., 2020). There is a lack of information concerning the exact role of BoHV-4 and BoHV-5 in bull infertility or their transmission to females by natural breeding or artificial insemination (Table 2), despite the fact that they were described as the cause of infertility in certain papers (Aslan et al., 2015). Similarly to BoHV-1, BVDV infections result in a reduction in sperm density and motility and an increase in sperm abnormalities in males (El-Mohamady et al., 2020) (Table 2). In females, these infections cause abortions (Grooms, 2004). The virus can be transmitted by males, including through artificial insemination (Givens, 2018).

3.1.3. Parasites

There is a remarkable predominance of the species *Tritrichomonas foetus* (identified in 18.4% of the publications). *T. foetus* causes trichomoniasis in cattle and is a traditionally considered agent of asymptomatic long-term infections in bulls. Nevertheless, Benchimol et al. showed that *T. foetus* is able to adhere to and damage sperm cells in vitro, causing their death (Benchimol et al., 2008), which suggests that this parasite could be a potential etiological agent of fertility problems in bulls. In females, this protozoan is responsible for genital inflammation and embryonic death (Michi et al., 2016). The major ranked microorganisms (Table 2) are present in most continents (data not shown) and are therefore of worldwide relevance. Other parasites are described in a smaller proportion of papers, such as *Neospora caninum* (2.6%)

(Table 2). In bulls, infections by *N. caninum* appear to affect sperm viability and motility, but this is still debated and the negative affect on fertility is not clear due to some naturally infected bulls showing high conception rates (van Velsen, 2021).

3.1.4. Fungi

We found no fungi associated with infertility in bulls in the publications included in this study, despite fungi sometimes being present in bull semen (Joya et al., 2011). It is known that fungi can cause fertility disturbances in cattle (Mingoas et al., 2009). For example, *Aspergillus fumigatus* and *Candida* spp. cause abortions and other reproduction problems in females (Foley & Schlafer, 1987; Henker et al., 2022; Yoo, 2010). Although knowledge concerning the pathogenesis of bacteria, parasites, and viruses in cattle is generally extensive, data related to the pathogenesis of fungal infections are limited. A low number of fungi are sufficiently virulent to be considered primary pathogens in immunocompetent individuals. Nonetheless, opportunistic pathogenic infections are mainly due to periods of immune deficiency of the animal or because the protective barriers of the skin and mucous membranes have been altered (Dixon et al., 1996; Seyedmousavi et al., 2018). Fungal infections are indeed rare events that can easily go unnoticed or be under-diagnosed and thus they are not present in the current review.

3.2. Time, techniques, and co-infections

Over time, there has been a general trend towards an increasing number of publications (Fig. 2), indicating a growing concern about the relevance of considering males for the diagnosis, management, and control of infertility problems of infectious origin within bulls and herds composed of both males and females.

According to our results, the main microorganism detection techniques used have been immunoassays (22 of the 38 selected publications used them) and culture and identification by microscopy as the direct detection technique (19/38) (Fig. 3). Detection by PCR has also been widely used as a direct molecular detection method (13/38) (Fig. 3). There are still situations in which establishing the cause of a reproductive disease or set of symptoms in cows is challenging using conventional techniques. For example, a study by Petit et al. conducted on cervical swabs from cows with reproductive problems indicated that a potential pathogen could be identified through conventional techniques in less than 30% of cases (Petit et al., 2009).

Massive sequencing allows the simultaneous identification and characterization of known organisms in a sample at a genomic level. Through techniques such as the metagenomic analysis of populations of microorganisms, it is possible to obtain information about the relative abundance of taxa, as well as relate the composition of these populations with certain conditions (Humières et al., 2021). With the implementation of new techniques and increasingly sophisticated data management in the coming years, the number of microorganism known to be associated with infectious cattle infertility will likely increase, as well as information about the composition of the microbiome and the association between microorganisms, including in seminal and preputial

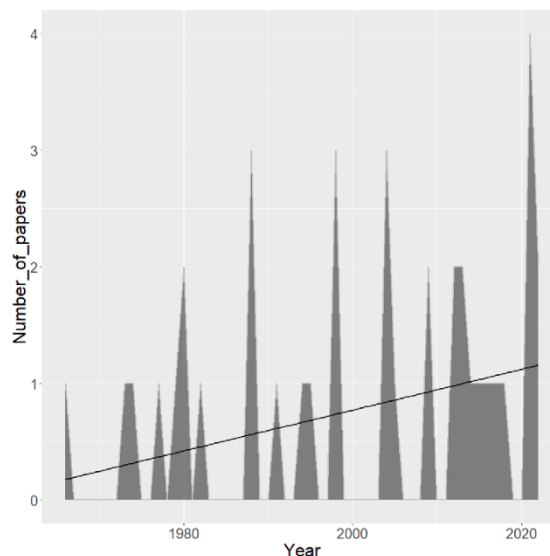


Fig. 2. Temporal representation of the number of papers (Y axis) published per year (X axis). The continuous black line represents the line of regression.

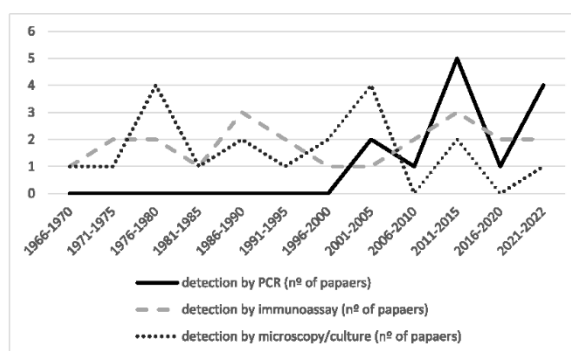


Fig. 3. Commonly used techniques for microorganism identification. The continuous black line represents the number of papers (X axis) over time (Y axis) that used PCR as the diagnostic tool, the discontinuous gray line refers to indirect methods (different immunoassays), and the dotted black line refers to cultures and direct detection by microscopy.

(Cojkic et al., 2021; Polo et al., 2022; Wickware et al., 2020) samples from bulls.

As mentioned above, there are many microorganisms of varying nature (from primary pathogens, such as *C. fetus*, to opportunistic pathogens, such as *U. diversum*) associated with cattle infertility (Table 2) shown by studies performed in bulls and mixed herds. However, only a small proportion of the selected papers (10/38, 26.3%) identified more than one microorganism as an etiological agent of infertility problems. For example, Carli et al. showed the possible effect of coinfections on fertility, e.g., *U. diversum* and *M. bovis* present in 19.5% of bulls with low fertility rates (Carli et al., 2022). However, coinfections and synergy between microorganisms could be more

common than expected, as suggested by recent studies, which have characterized microbial populations by massive sequencing. For example, Koziol et al. observed a potential synergy between *Campylobacter* spp. and *Pusobacterium* spp. with other microorganisms in bulls with low sperm quality (Koziol et al., 2022). These data highlight the need to carry out more studies about the true infectious causes of bovine infertility focusing on males, given that more than one etiological agent could be involved.

3.3. Key aspects about breeding bulls

One of the most striking aspects of our results (Table 2) is the number

of microorganisms identified in bulls with infertility problems by the selected papers but not traditionally considered to be etiological agents in the differential diagnosis of infectious infertility in bulls (e.g., BoHV-4 or *Mycoplasma* spp.).

Another of our important key findings is the absence of relevant pathogens that cause reproductive failure in females that can be transmitted by males (e.g. *Chlamydia* spp. (Givens, 2018; Teankum et al., 2007)) (Table 2). This may be due to the string search and inclusion criteria used in the present study, which focused on pathogens that affect bull fertility. The limited information about fertility problems caused by infectious agents in bulls could be associated with the low number of studies focusing on males and the limited information about the epidemiological data on the presence of these microorganisms in bulls, e.g., Chlamydiae (Kauffold et al., 2007). Indeed, there are approximately twice as many studies published in the literature that associate the presence of various microorganisms with fertility problems in females than males (data not shown), likely due to the higher number of females bred than males.

The presence of pathogens related to cattle infertility in one bull may have a more relevant impact on fertility rates at the herd level than pathogens in one cow, as one bull can be used to breed with several females by natural servicing or artificial insemination. Thus, sub-fertile bulls or those carrying a pathogen associated with cow infertility could result in economic losses (Kastelic, 2013) and increase the ecological footprint of cattle production (European Union, 2013). In this scenario, undetected microorganisms in bulls and their seminal doses, especially those that cause asymptomatic infections in bulls (e.g., *T. foetus* (Yoo, 2010)), have been an important obstacle to the eradication of pathogens that cause a reduction in the number of calves per year from cattle herds.

With this study, we intended to highlight the fact that studies carried out in bull populations from herds with low fertility ratios are scarce, even those concerning recognized microorganisms associated with infertility in males as primary pathogens and/or those transmitted to females (although traditionally considered asymptomatic in bulls). For example, *Chlamydia* spp. can be transmitted from males to females through semen (Givens, 2018) and cause reproductive problems in females and males (Yoo, 2010). Nevertheless, *Chlamydia* spp. are missing from our results (Table 2). Other pathogens associated with cattle infertility described in females are also missing in our ranking (Table 2), e.g., *H. somni*, as well as *Enterococcus* spp., in which experimental infections in bulls have demonstrated decreased fertility in bulls through the deterioration of sperm quality (Duračka et al., 2021). Other microorganisms ranked in the present study are unknown as etiological agents of bull infertility because studies are lacking about their role in bull fertility, such as for BoHV-4 (Table 2). Thus, further studies are required to establish a real-life view of the etiological causes of infertility in bull populations, the economic impact of infected bulls in the livestock sector, and as a fundamental tool to establish the true role of bulls in cattle infertility for the implementation of prevention and control measures that contribute to improve the fertility ratio of herds. In addition, the implementation of new techniques, e.g. metagenomic studies (Cojkie et al., 2021; Polo et al., 2022; Wickware et al., 2020) opens the possibility of studying the importance of pathogens that have been neglected or that are not routinely identified by diagnostic laboratories through conventional techniques such as PCR or culture.

4. Conclusions

Infections that negatively affect the fertility of bulls and, consequently, the fertility of herds and their impact on production, as reflected by the increasing number of publications, appear to have been of increasing concern over the last several years. Fertility, and the presence of pathogens related to cattle infertility, may be more important in an individual bull than a cow, as one bull can be used to breed

with several females. Thus, fertility problems of bulls and their role as pathogen carriers related to cattle infertility translates onto potential economic losses and an increase in the ecological footprint of cattle production. According to our study, a total of six bacterial genera (13 different species), five virus species, and four parasite species have been shown to be associated with infertility in bulls and mixed herds (where bulls were analyzed), in which the most frequently described pathogens were BoHV1, *C. fetus*, *T. foetus*, BVDV, *Ureaplasma* spp., and *Mycoplasma* spp. These major pathogens associated with infertility have been widely identified throughout the world. There are many species that were described in a lower proportion of papers that have been barely studied in relation to bull infertility and potential transmission to females, e.g., *Staphylococcus* spp. or *Bacillus* spp. A number of pathogens known to be associated with infertility in females are missing in our ranking, despite their having been experimentally demonstrated to induce decreased fertility in bulls through the deterioration of sperm quality (e.g., *Enterococcus faecium*) and/or that they can be transmitted from males to females through both natural breeding and seminal doses (e.g., *Candida* spp.). This is likely due to the strict selection of publications (focusing on bull infertility problems), the low number of studies focusing on bulls, and the limited information about the epidemiological data on the presence of certain microorganism in bulls (e.g., Chlamydiae). In this scenario, further studies carried out on breeding bulls using next generation techniques for microorganism detection may provide data about the importance of potentially neglected pathogens or those that are not routinely identified by diagnostic laboratories using conventional techniques of relevance for bull fertility and, thus, bovine herd fertility.

Ethical statement

In the present study, only data from previous publications from the Pubmed, Scopus and Web of Science databases were used. No animals were used.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was partially funded by the Region of Madrid (Spain) (IND2018/BIO-9246).

References

- Adnane, M., & Chapwanya, A. (2022). A review of the diversity of the genital tract microbiome and implications for fertility of cattle. *Animals*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ani12040460>
- Astan, M. E., Azkar, A. K., & Gazıyagci, S. (2015). Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and *Brucella* spp. infections in cattle in turkey. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(11), 1371–1377. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0657>
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35, 235–241. <https://doi.org/10.1128/mmr.35.3.235-241.1971>
- Balzan, C., Ziech, R. E., Gressler, L. T., & de Vargas, A. P. C. (2020). Bovine genital campylobacteriosis: Main features and perspectives for diagnosis and control. *Ciência Rural*, (3), 50. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190272>
- Bellows, D. S., Ott, S. L., & Bellows, R. A. (2002). Review: Cost of reproductive diseases and conditions in cattle. *The Professional Animal Scientist*, 18(1), 26–32. [https://doi.org/10.15232/s1080-7446\(15\)31480-7](https://doi.org/10.15232/s1080-7446(15)31480-7)
- Benchamol, M., De Andrade Rosa, I., Da Silva Fontes, R., & Butfa Dias, A. J. (2008). *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: Adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitology Research*, 102(4), 597–604. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0793-3>
- Buziniani, M., Yamaguti, M., Oliveira, R. C., Cortez, B. A., Marques, L., MacHado-Santelli, G. M., Assumpção, M. E., & Timenetsky, J. (2011). Invasion of *Ureaplasma*

- diversum* in bovine spermatozooids. *BMC Research Notes*, 4, 0–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-455>
- Cagnoli, C. L., Chiapparrone, M. L., Cacciato, C. S., Rodríguez, M. G., Aller, J. F., & Catena, M. del. C. (2020). Effects of *Campylobacter fetus* on bull sperm quality. *Microbial Pathogenesis*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104486>
- Carli, S. D., Dias, M. E., da Silva, M. E. R. J., Breyer, G. M., & Siqueira, F. M. (2022). Survey of beef bulls in Brazil to assess their role as source of infectious agents related to cow infertility. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(1), 54–60. <https://doi.org/10.1177/10406387211050636>
- Chaban, B., García Guetra, A., Hendrick, S. H., Waldner, C. L., & Hill, J. E. (2013). Isolation rates of *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* from bovine preputial samples via passive filtration on nonselective medium versus selective medium, with and without transport medium. *American Journal of Veterinary Research*, 74(8), 1066–1069. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.8.1066>
- Cojkic, A., Niaz, A., Guo, Y., Hallap, T., Padrik, P., & Morrell, J. M. (2021). Article identification of bull semen microbiome by 16S sequencing and possible relationships with fertility. *Microorganisms*, 9(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122431>
- Cortes, H., Leitão, A., Vidal, R., Vila-Viçosa, M. J., Ferreira, M. L., Castro, V., & Hjerpe, C. A. (2005). Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Veterinary Record*, 157(9), 262–264. <https://doi.org/10.1136/vr.157.9.262>
- De Clerck, K., Vandaele, L., Vanbinst, T., Riou, M., Deblauwe, I., Wessingh, W., ... De Leeuw, V. (2021). Transmission of bluetongue virus serotype 8 by artificial insemination with frozen-thawed semen from naturally infected bulls. *Viruses*, 13(4), 652. <https://doi.org/10.3390/v13040652>
- Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G., & La Montagne, J. R. (1996). Fungal infections: A growing threat. *Public Health Reports (Washington, D.C.: 1974, 111(3))*, 226–235.
- Dudek, K., Hichóas, R. A. J., Szacawa, E., & Bednarek, D. (2020). *Mycoplasma bovis* infections—Occurrence, diagnosis and control. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080640>
- Duračka, M., Belić, L., Tokárová, K., Žiarovská, J., Kačaniová, M., Lukáč, N., & Týrdá, E. (2021a). Bacterial communities in bovine ejaculates and their impact on the semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 67(6), 438–449. <https://doi.org/10.1080/19396368.2021.1958028>
- Duračka, M., Galovičová, L., Kačaniová, M., Lukáč, N., & Týrdá, E. (2021b). The effect of *Enterococcus faecium*-induced in vitro infection in bovine semen. *Animal Science and Biotechnology*, 54(1), 80–85.
- El-Mohamady, R. S., Behour, T. S., & Rawash, Z. M. (2020). Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 8(1), 106–114. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850197>
- European Union. (2013). *Animal production: A decade of production research*. European commission.
- Foley, G. L., & Schaefer, D. H. (1987). Candida abortion in cattle. *Veterinary Pathology*, 24(6), 532–536. <https://doi.org/10.1177/030098588702400610>
- Givens, M. D. (2006). A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, 66(3), 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.021>
- Givens, M. D. (2018). Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 12(s1), s165–s171. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>
- Givens, M. D., & Matley, M. S. D. (2008). Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology*, 70(3), 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.033>
- Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 20(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.evia.2003.11.006>
- Henker, L. C., Lorenzetti, M. P., Lopes, B. C., Dos Santos, I. R., Bandinelli, M. B., Bassuino, D. M., Jufo, G. D., Antonassi, N. A. B., Pescador, C. A., Sonne, L., Diemeier, D., & Pavarini, S. P. (2022). Pathological and etiological characterization of cases of bovine abortion due to sporadic bacterial and mycotic infections. *Brazilian Journal of Microbiology* : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 53(4), 2251–2262. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00853-8>
- Hobson, N., Chousalkar, K. K., & Chenoweth, P. J. (2013). *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: Its detection and potential effects. *Australian Veterinary Journal*, 91(11), 469–473. <https://doi.org/10.1111/avj.12113>
- Holt, E., Wathne, B., Hovdén, B., & Mårdh, P. A. (1987). Bacterial vaginosis: Microbiological and clinical findings. *European Journal of Clinical Microbiology*, 6(5), 536–541. <https://doi.org/10.1007/BF02014242>
- Huñares, C., Salmons, M., Dellière, S., Leo, S., Rodríguez, C., Angebault, C., Alanio, A., Fourati, S., Lazarovic, V., & Woertter, P. L. (2021). The potential role of clinical metagenomics in infectious diseases: Therapeutic perspectives. *Drugs*, 81(13), 1453–1466. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01572-4>
- Joya, M. A. P., Góngora, A., & Jiménez, C. (2011). Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(4), 634–646.
- Kastelic, J. P. (2013). Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers*, 3(4), 20–25. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0029>
- Kaufhold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotz, H., & Metzler, F. (2007). The prevalence of Chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Animal Reproduction Science*, 102(1–2), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.013>
- Kemel, C., Salamone, M., Van Loo, H., Latour, C., Vandeputte, S., Callens, J., Hostens, M., & Opsomer, G. (2022). Unaffected semen quality parameters in *Neospira caninum* seropositive Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, 191, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.07.013>
- Kenny, D. A., & Byrne, C. J. (2018). Review: The effect of nutrition on timing of pubertal onset and subsequent fertility in the bull. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 12(s1), s36–s44. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000514>
- Kozioł, J. H., Sheets, T., Wickware, C. L., & Johnson, T. A. (2022). Composition and diversity of the seminal microbiota in bulls and its association with semen parameters. *Theriogenology*, 182, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.01.025>
- Kruger, E. R., Penha, T. R., Regina, D., Stoffo, E., Roehs, P. M., Ribeiro, M. C., Soccol, V. T., Diagnostics, C. De, & Enrietti, M. (2015). Bovine herpesvirus 4 in Paraná State, Brazil : Case report, viral isolation, and molecular identification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 28(3), 279–283. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130949>
- Le Mouél, C., & Forlund, A. (2017). How can we feed the world in 2050? A review of the responses from global scenario studies. *European Review of Agricultural Economics*, 44(4), 541–591. <https://doi.org/10.1093/erae/ebx006>
- Marín, M., Burucúa, M., Rensetti, D., José, J., Odeón, A., & Pérez, S. (2020). Distinctive effects of bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 and the virus - host interactions that might influence clinical outcomes. *Archives of Virology*, 165(2), 285–301. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04494-5>
- McPadden, A. M., Heuer, C., Jackson, R., West, D. M., & Patkinson, T. J. (2004). Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 53(1), 45–52. <https://doi.org/10.1080/00480169.2005.36468>
- Mitchell, A. N., Favetto, P. H., Kastelic, J., & Cobo, E. R. (2016). A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology*, 85(5), 781–791. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.037>
- Mingos, J., Tchoumoue, J., & Awah-Hdukum, J. (2009). An abattoir survey of bacterial and fungal infections of cattle reproductive tract in Cameroon highlands. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 4(2), 75–79. <https://doi.org/10.4314/cjeb.v4i2.37978>
- Montoya-Monsalve, G., Sánchez-Calabuig, M.-J., Blanco-Murcia, J., Hviria, L., Gutiérrez-Adán, A., & Ramos-Ibeas, P. (2021). Impact of overuse and sexually transmitted infections on seminal parameters of extensively managed bulls. *Animals*, 11(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani11030821>
- Moore P, D., Cantón J, G., & Louge Uriarte, L. E. (2021). Editorial: Infectious diseases affecting reproduction and the neonatal period in cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 679007. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.679007>
- Mshelia, G. D., Amin, J. D., Woldehivet, Z., Murray, R. D., & Egwu, G. O. (2010). Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: Geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), 45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01546.x>
- Newcomer, B. W., & Givens, D. (2016). Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 32(2), 425–441. <https://doi.org/10.1016/j.evia.2016.01.011>
- OIE. (2021). Bovine genital campylobacteriosis. Chapter 3.4.4. 1–12. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf. Accessed December 23, 2022.
- Panangala, V. S., Winter, A. J., Wijesinha, A., & Foote, R. H. (1981). Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovigenitalium*. *American Journal of Veterinary Research*, 42(12), 2090–2093.
- Parker, A. M., House, J. K., Sheehy, P. A., Hazleton, M. S., & Bosward, K. L. (2018). A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1241–1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>
- Pena-Fernández, N., Cano-Terriza, D., García-Bocanegra, L., Horecjo, P., Vázquez-Arbaizar, P., Ceolfe-Resta, D., Pérez-Arroyo, B., Ortega-Mora, L. M., & Collantes-Fernández, E. (2021). Prevalence of Bovine genital campylobacteriosis, associated risk factors and spatial distribution in Spanish beef cattle based on veterinary laboratory database records. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.750183>
- Perumal, P., Kiran Kumar, T., & Srivastava, S. K. (2013). Infectious causes of infertility in buffalo bull (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bulletin*, 32(2), 71–82.
- Petit, T., Sperger, J., Rosengarten, R., & Amiel, J. (2009). Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1), 88–91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01002.x>
- Polo, C., García-Seco, T., Hernández, M., Fernández, V., Rodríguez-Lázaro, D., Goyache, J., Domínguez, L., & Pérez-Sancho, M. (2021). Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples. *Theriogenology*, 172, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.020>
- Polo, C., Hernández, M., García-Seco, T., Fernández, V., Briones, V., Díez-Guerrero, A., Abad, D., Rodríguez-Lázaro, D., Domínguez, L., & Pérez-Sancho, M. (2022). Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds. *Research in Veterinary Science*, 150, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.04.019>
- Santos Junior, M. N., Neres, Macêdo, de, N. S., Campos, G. B., Bastos, B. L., Timenetsky, J., & Marques, L. M. (2021). A Review of *Ureaplasma diversum*: A representative of the Mollicute class associated with reproductive and respiratory

- disorders in cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.572171>
- Seyedmousavi, S., Bosco, S., De Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R., Jacobsen, I. D., Martel, A., Mignon, B., Pasmans, F., Piecková, E., Rodrigues, A. M., Singh, K., Vicente, V. A., Wibbelt, G., Wiederhold, N. P., & Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. *Medical Mycology*, 56, S165–S187. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>
- Teankum, K., Pospisil, A., Janett, F., Brugnera, E., Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., Weilenmann, R., Zimmermann, D. R., Gebet, A., Polkinghorne, A., & Borel, N. (2007). Prevalence of Chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology*, 67(2), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.012>
- Titterton, F., Livdy, F., Dawson, S., Gordon, A., & Morrison, S. (2017). The effects of breed, month of parturition and sex of progeny on beef cow fertility using calving interval as a measure. *Advances in Animal Biosciences*, v., 8(s1), 867. <https://doi.org/10.1017/S2040470017001741>
- van Velsen, C. M. (2021). Neosporosis in bulls: Potential for venereal transmission, and effect on semen quality and production. *New Zealand Veterinary Journal*, 69(4), 193–200. <https://doi.org/10.1080/00480169.2020.1854883>
- Wagenaar, J. A., Van Bergen, M. A. P., Blaser, M. J., Tauxe, R. V., Newell, D. G., & Van Putten, J. P. M. (2014). *Campylobacter fetus* infections in humans: Exposure and disease. *Clinical Infectious Diseases*, 58(11), 1579–1586. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu085>
- Wickware, C. L., Johnson, T. A., & Koziol, J. H. (2020). Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls. *Theriogenology*, 145, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.002>
- Yoo, H. S. (2010). Infectious causes of reproductive disorders in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 56. <https://doi.org/10.1262/jrd.1056853>. SUPPL.

4.1.2. *Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds.*

Autores: **Polo, C.**, Hernández, M., García-Seco, T., Fernández, V., Briones, V., Díez-Guerrier, A., Abad, D., Rodríguez-Lázaro, D., Domínguez, L., & Pérez-Sancho, M.

Título: *Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds.*

Revista: *Research in Veterinary Science*

Año: 2022

Volumen: 150

Páginas: 52-57

DOI: doi:10.1016/j.rvsc.2022.04.019

La falta de información sobre las características de la población bacteriana del sistema reproductivo en bovinos, especialmente en toros empleados para la cría, podría estar limitando una comprensión holística de las patologías reproductivas de origen infeccioso y el papel que el microbioma prepucial de toros reproductores criados en sistemas extensivos podría estar teniendo en el desarrollo de estas. Hasta la realización del estudio publicado en el Artículo 2 mostrado en el presente capítulo, no había sido publicado ningún trabajo que realizara un estudio comparativo de las poblaciones bacterianas presentes lavados prepuciales de toros empleados para la cría diagnosticados como sanos desde un punto de vista reproductivo y toros catalogados como subfértiles o con bajos índices de fertilidad relacionando la presencia de determinadas bacterias a su fertilidad. La publicación del Artículo 2 se encuentra muy próximo a la publicación de dos artículos relacionados con la materia, el publicado por Wickware y colaboradores en 2020 y el publicado por Cojkic y colaboradores en 2021. El primero exploró cómo diferentes variables (tipo de alimentación, historial reproductivo, variedad y uso de antibióticos) afectaban a la composición del microbioma prepucial de toros (no catalogados como fértiles, subfértiles o infértiles) llegando a la conclusión de que ninguna de las variables estudiadas se correlacionaba de manera significativa con diferencias en las poblaciones bacterianas observadas (Wickware et al. 2020).

Resultados

Por el contrario, el segundo trabajo sí sugiere la existencia de diferencias de la microbiota seminal asociadas a infertilidad en toros reproductores (Cojkic et al. 2021).

En el presente trabajo se realizó un estudio diferencial metagenómico basado en la amplificación y secuenciación de la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica la subunidad *16S* del ARNr bacteriano. El análisis se llevó a cabo en 1029 muestras prepuciales de toros criados en régimen extensivo en España (una muestra por toro). El material de estudio se dividió en un total de 944 muestras que correspondían a animales procedentes de rebaños con bajos índices de fertilidad [grupo problema con porcentajes de fertilidad inferiores al 80%, siendo esta la relación entre el número de terneros registrados en un año (total hijos) y el número de vacas nodrizas presentes (total madres), expresada en porcentaje], y 85 muestras que correspondían a animales procedentes de rebaños reproductivamente sanos (grupo control, con porcentajes de fertilidad iguales o superiores al 80%).

Los resultados de la secuenciación de la región V3-V4 del *16S* del ARNr en cada una de las muestras fueron analizados mediante herramientas bioinformáticas (Qiime2) y estadísticas (R 4.0 Studio y IBM SPSS Statistics 25.0). Se analizaron los taxones más representativos en el grupo problema y el grupo control, las Diez familias bacterianas más abundantes y la diversidad alfa y beta de las poblaciones bacterianas mediante los índices Simpson y Shannon (para la diversidad alfa) y Bray-Curtis (para la diversidad beta).

Los resultados del análisis de las poblaciones bacterianas no mostraron diferencias significativas entre el grupo problema y el grupo control, siendo similares las abundancias de los taxones más representativos en ambos grupos de muestras. Las Diez familias más abundantes presentaron una distribución similar, del mismo modo que la diversidad alfa y beta de las poblaciones bacterianas fueron similares en ambos grupos donde no se observaron diferencias significativas en las medias de los valores de diversidad alfa de los índices Shannon y Simpson empleados (índice de Shannon, p-valor = 0,745; índice Simpson, p-valor = 0,403). Los resultados para ambos índices sugieren una alta diversidad de las poblaciones bacterianas presentes en las muestras independientemente del grupo muestral observado (valor de Shannon = 3-4, valor de Simpson \approx 1).

El análisis del índice Bray-Curtis mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) explicó solo el 23,4% de varianza de las diferencias entre las muestras. La función 'Adonis' indicó que solo el 0,8% ($R^2 = 0,00829$) de la variación de resultados observada se explicaba debido al agrupamiento de muestras planteado (p -valor = 0,001). Todos estos resultados se tradujeron en la ausencia de diferencias significativas en las poblaciones bacterianas en relación con su estatus reproductivo, esto es, la diferenciación entre toros catalogados como bajos índices de fertilidad frente a sanos desde un punto de vista reproductivo.

El análisis individual de las OTU mostró la presencia de un género, *Mycoplasma* spp., significativamente asociado a infertilidad en el conjunto de toros sometidos a estudio (76% de toros positivos en el grupo problema frente al 43% de positivos en el grupo control; p -valor < 0,001). Pese a tratarse de un género poco estudiado en relación con infertilidad bovina, diferentes especies de dicho género (*M. bovis* y *M. bovigenitalium*) han sido descritas como patógenos que parecen causar infertilidad en bovino (Panangala et al. 1981, Dudek et al. 2020). Curiosamente, en el caso de patógenos primarios previamente asociados a infertilidad bovina (p.ej. *C. fetus*) no se observó una asociación estadísticamente significativa con bajos índices de fertilidad. En este punto es importante señalar que, p.ej. *C. fetus* (cuya correlación con los problemas de fertilidad mostró un p -valor de 1) solo se detectó en las muestras del grupo problema (en el 2,75% de las muestras totales) lo que podría indicar que existen patógenos que, aunque no se hayan asociado significativamente mediante en el análisis estadístico realizado, podrían estar jugando un papel importante en referencia a infertilidad bovina. Por otra parte, ciertos patógenos oportunistas asociados a infertilidad, como *U. diversum*, fueron detectados en un alto porcentaje de animales de ambos grupos, esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar más estudios sobre el verdadero papel de *U. diversum* en la infertilidad del ganado y los factores que desencadenan su potencial capacidad patógena en ciertos escenarios. Por tanto, los resultados del presente estudio confirman la HIPÓTESIS 1: *existen microorganismos que juegan un papel importante (primario/secundario) en los problemas de fertilidad de origen infeccioso en toros de régimen*

extensivo que no se conocen o que no se consideran en los análisis microbiológicos realizados en el diagnóstico rutinario de esta patología) de la presente memoria de tesis doctoral.

Finalmente, el trabajo presentado en este capítulo pone de manifiesto el potencial que tiene la aplicación de técnicas de secuenciación masiva para la detección de microorganismos, en este caso bacterias, que puedan estar pasando desapercibidas en los controles rutinarios o sean desconocidas como posible causa de bajos ratios de fertilidad en rebaños bovinos en extensivo. De este modo, se refuerza la idea planteada en la HIPÓTESIS 4: *El empleo de análisis metagenómicos sobre muestras clínicas procedentes de toros reproductores es una herramienta adecuada para avanzar en el conocimiento sobre el papel del toro en los problemas de infertilidad de etiología infecciosa, permitiendo identificar patógenos asociados a problemas de fertilidad en el rebaño así como sus dinámicas de infección, especialmente en el caso de aquellos potenciales patógenos que escapan a los controles rutinarios, así como arrojar información sobre la presencia de microorganismos desconocidos hasta la fecha que pudieran estar afectando, de forma primaria o secundaria.*

El potencial de este tipo de análisis metagenómico reside en su capacidad teórica de revelar la presencia de todos los microorganismos de una muestra de manera simultánea permitiendo revelar las dinámicas de circulación microbiana, la coexistencia o sinergia de determinados patógenos, la presencia de microorganismos que escapan a técnicas diagnósticas exclusivamente dirigidas sobre patógenos específicos ya reconocidos como causantes de infertilidad, etc.



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds

Coral Polo^{a,b}, Marta Hernández^c, Teresa García-Seco^a, Víctor Fernández^d, Víctor Briones^e, Alberto Díez-Guerrier^{b,e}, David Abad^c, David Rodríguez-Lázaro^f, Lucas Domínguez^{a,e}, Marta Pérez-Sancho^{a,e,g}

^a VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^b MAEVA SERVET S.L., Calle de la Fragua 3, 28749 Madrid, Spain

^c Molecular Biology and Microbiology Laboratory, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Av. Burgos, 47071 Valladolid, Spain

^d Zootecnia Análisis Clínicos Veterinarios S.L.P., Calle Tierra de Campos 24-26, 37008 Salamanca, Spain

^e Department of Animal Health, Faculty of Veterinary, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^f Microbiology Area, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, Pza. Miscal Bañuelos s/n, 09001 Burgos, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Bovine infertility
16S rRNA-based metagenomics
Neglected pathogens
Mycoplasma spp.
Breeding bull

ABSTRACT

Bovine infectious infertility represents a problem due to the high impact on animal production and, in many cases, in public health. A lack of information on the characteristics of the bacterial population of the bovine reproductive system can hamper a comprehensive understanding of reproductive pathologies and the role that the microbiome could play. A metagenomic study based on the V3-V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene was performed in 1029 preputial samples from bulls raised in an extensive regimen in Spain (944 from herds with low fertility rates -case group-, and 85 samples from reproductively healthy herds -control group-). The most representative phyla as well as the most 10 abundant bacterial families and their abundance did not show significant differences in both case and control groups. Similarly, the (alpha and beta) diversity of the bacterial populations was similar in both type of herds: the Shannon and Simpson indices show a high diversity of species, while the Bray-Curtis dissimilarity index did not show relevant differences in the bacterial communities. A deeper analysis of the operational taxonomic units showed the presence of one genera, *Mycoplasma* spp. significantly associated with fertility problems. Our study highlights the promising potential that the application of sequencing techniques (e.g. 16S rRNA-based metagenomics) possesses in examining bovine infertility, as they are able to reveal different pathogens that could go unnoticed using diagnostic approaches for only the main known pathogens.

1. Introduction

Bovine infectious infertility represents a serious problem in the livestock sector due to the impact on animal production and, in many cases, in public health (Yoo, 2010). Different types of microorganisms can be associated with bovine infertility; primary or opportunistic pathogens such as *Campylobacter fetus* (Mshelia et al., 2010) or *Trueperella pyogenes*, respectively (Rzewuska et al., 2019), or microorganisms ubiquitous in the environment such as *Proteus* spp. (Drzewiecka, 2016). Many of microorganism associated with cattle infertility can be

sexually transmitted through natural breeding and artificial insemination (Givens, 2018); especially problematic being those such as *C. fetus* which produce asymptomatic infections in males that may go unnoticed within herds (Mshelia et al., 2010). In spite of the large number of pathogens associated with bovine infertility, scarce information on the bacterial population of the bovine reproductive bull system is available, which hampers the understanding of the association between microbiome and reproductive pathologies described in other species, e.g., vaginal bacteriosis in humans due to dysbiosis (Ling et al., 2010).

Due to the limitation of some microorganisms to be cultivated, high

* Corresponding author at: VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.
E-mail address: maperezs@ucm.es (M. Pérez-Sancho).

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.04.019>

Received 26 November 2021; Received in revised form 4 April 2022; Accepted 5 April 2022

Available online 2 July 2022

0034-5288/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

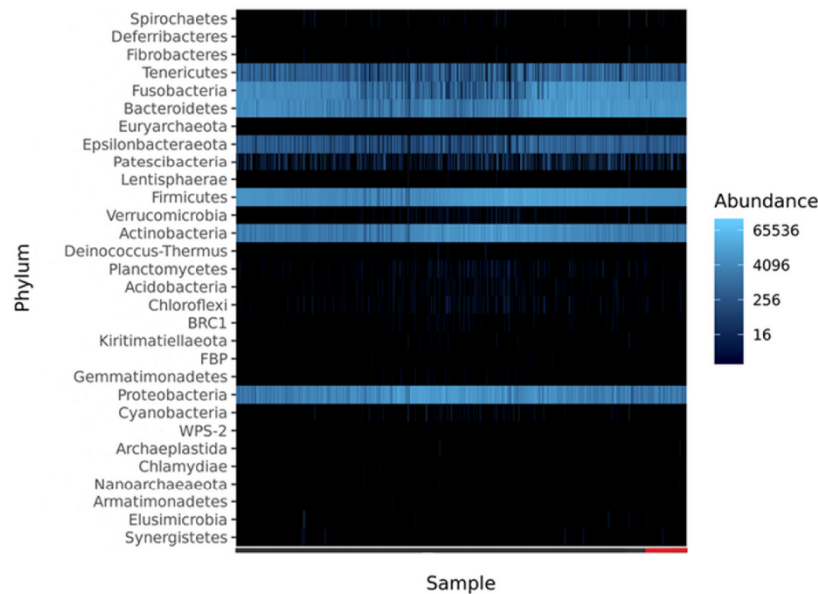


Fig. 1. Heatmap of the most abundant taxa detected in the bovine preputial samples of the study. Black bar (at the bottom) represents the case group samples and red bar the control group samples. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

throughput sequencing has become a fundamental molecular tool for the study of the microbial populations and their dynamics (Alves et al., 2018; Weinstock, 2012), and 16S rRNA gene deep sequencing used as standard for microbial typing (Bharti and Grimm, 2021).

The present study aimed at performing a characterization of bacterial populations in bull preputial samples from Spanish extensive production herds with low fertility rates and healthy herds via the deep sequencing of the V3-V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene, and we correlated the operational taxonomic units (OTUs) obtained to previously describe primary and/or opportunistic pathogens associated with bull infertility.

2. Material and methods

2.1. Preputial samples recovered from bulls

A total of 1029 preputial samples from bulls (one sample per bull) from Spanish herds were selected and included in the present study: 944 samples from herds diagnosed with low fertility rates (case group, fertility rates under 80%), and 85 samples from reproductive healthy herds (control group). Bulls belong to herds from central Spain, with mediterranean-continental climate, raised in extensive regimen based in grazing areas according to "dehesa" system ("dehesa" is defined as an ecosystem featuring scattered holm and cork oak trees throughout the landscape), most of them with all-year breeding season, with 100 cows average herd size and mainly composed by crossbreed animals (Spanish breeds as Avileña and other beef breeds as Limousin and Charolais). Samples had been submitted for routine diagnostics for *C. fetus* and *Trichostrongylus axei*. The samples consisted of 15 mL of preputial washings in PBS subjected to centrifugation at 1512 ×g for 10 min. The pellets were stored at -80 °C until analysis.

2.2. Total DNA extraction, 16S rRNA gene amplicon library preparation and sequencing

Total DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany). A first cellular lysis buffer [20 mM of Tris-Cl (pH 8), 2 mM of sodium EDTA, 1.2% Triton X-100 and 20 mg / mL of lysozyme in a 360 µL of final volume] was added to the pellet and incubated at 37 °C for 1 h, and afterwards subsequent steps were performed according to manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined using a Qubit fluorimeter 4 (Invitrogen). Microbial diversity was studied by sequencing the amplified V3-V4 region of the 16S rRNA gene using primers and PCR conditions previously reported (Klindworth et al., 2013). Sample multiplexing, library purification, and sequencing were carried out as described in the "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" guide by Illumina. Libraries were sequenced on a MiSeq Illumina platform at the Universidad de Burgos (UBU, Burgos, Spain), leading to 460 bp, paired-end reads.

2.3. Bioinformatics and data analysis

>100,000,000 raw reads were analysed using different bioinformatics tools. Raw demultiplexed sequence data was processed using QIIME2 pipeline (<https://github.com/dabadgarcia/qiime2-reporter>). This straightforward pipeline for the analysis of amplicon sequences integrates basic QIIME2 commands (Bolyen et al., 2019) with R programming language. In brief, the DADA2 package (Callahan et al., 2016) was used to quality filter reads, merge paired ends, remove chimeras and assign amplicon sequence variants (ASV). ASVs rely on single nucleotide differences between sequences and can be considered as Operational Taxonomic Units (OTUs) clustered at 100% identity threshold. A pre-trained Naive Bayes classifier (Wang et al., 2007) was used to obtain the taxonomic assignment of the ASVs, using the SILVA

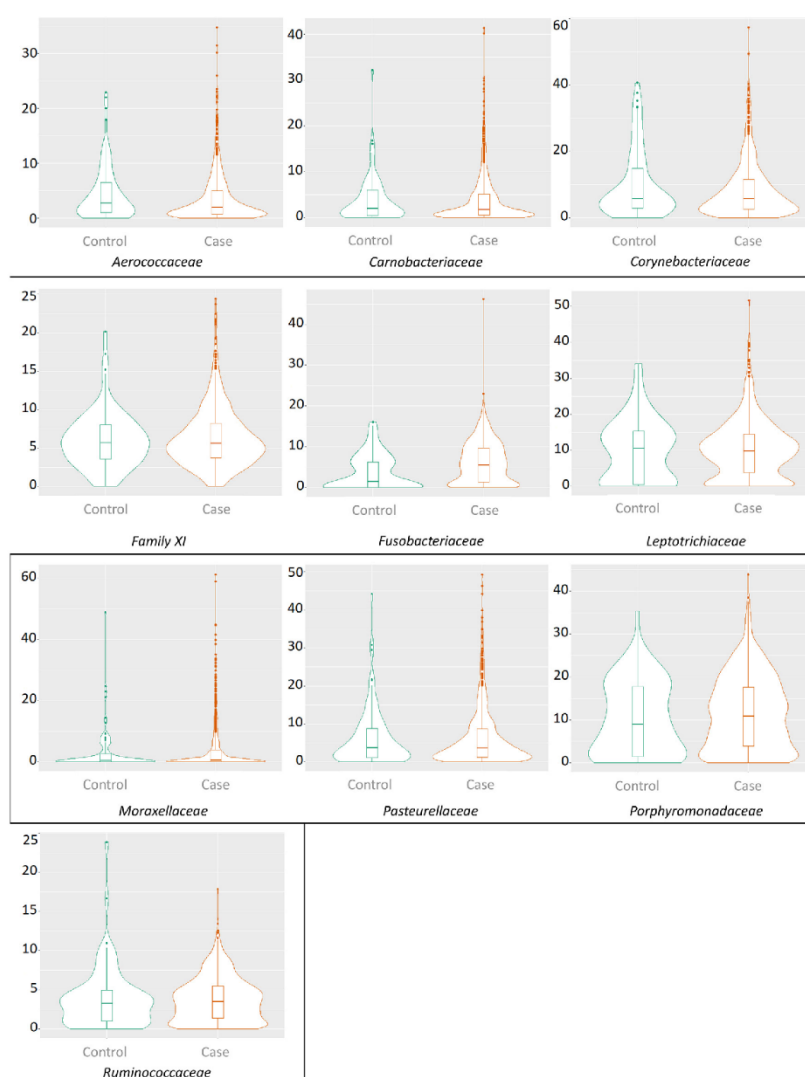


Fig. 2. The 10 most abundant bacterial families detected in the bovine preputial samples of the study. The Y axis corresponds to the abundance (relativized between 0 and 100 values). In the X axis is indicated the control and case samples.

database version 132 (Quast et al., 2013) as reference, which resulted in a table containing the microbial composition for each of the samples. Alpha- and beta-diversity were analysed by using diversity (<https://docs.qiime2.org/2018.4/plugins/available/diversity/>) and taxa (<https://docs.qiime2.org/2018.4/plugins/available/taxa/>) plugins. For beta-diversity studies, samples were rarefied to 23,761 reads per sample, in order to avoid biases due to different sequencing depths, and weighted

UniFrac distances (Lozupone and Knight, 2005) were calculated. Plotting was carried out in R (R Core Team, 2021) using packages *plyr* (Wickham et al., 2021), *ggplot2* (Wickham, 2016), *made4* (Culhane et al., 2005) and *reshape2* (Wickham, 2007) packages.

In order to establish the most abundant phyla in the total samples, a heatmap is included in the report resulting from the QIIMEreporter pipeline performed which provided information about the alpha

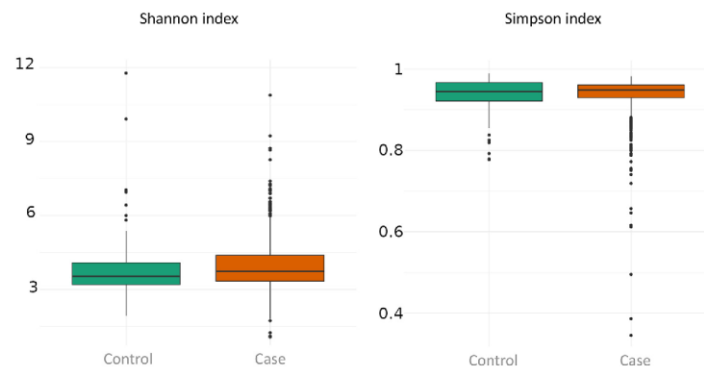


Fig. 3. Alpha biodiversity in the samples tested. Representation of Shannon and Simpson index values (Y axis) for the control and case samples (X axis) where no significant differences in means were noted (p -value = 0.745 and 0.403 respectively).

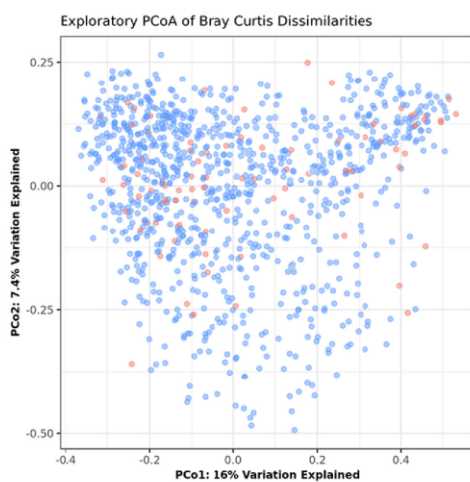


Fig. 4. Beta biodiversity in the samples tested. Representation of Bray-Curtis Dissimilarities where the blue circles correspond to animals from infertile herds (case group) and the pink circles correspond to bulls from healthy herds (control group). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

diversity measured using the Simpson and Shannon index metrics, and beta diversity estimated by computing Bray-Curtis distances abundance profiles. Bray-Curtis distances were used for Principal Coordinates Analysis (PCoA), and the significance of separation was tested by permutational multivariate analysis of variance using the function “Adonis” that consist in an analysis of variance using distance matrices based on the work of Anderson (2001). On the other hand, the ten most abundant families are analysed through the OTU tables on R implemented with the R package MicrobeR (<https://github.com/jbisanz/MicrobeR>) and Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>).

The OTU table was analysed at the species or at least genus level using R by *phyr* package, showing the presence/absence of bacterial

species and genus previously associated from literature with bovine infertility in the preputial samples included in the study (in both problem and control samples). Association between the detection of each bacterial species and infertility in the herd of origin of the sampled animal was assessed using chi-square tests corrected for multiple comparisons using Holm’s method in R (Holm, 1979). Significance level is set to 0.05 throughout the paper.

3. Results and discussion

3.1. Bacterial population in preputial samples in infertility-related and healthy herds

The most representative phyla and their abundance in the total of the samples are shown in Fig. 1. Our data suggests a similar abundance in both infertility-related and healthy herds: the abundance of each representative phylum was homogeneous (Fig. 1), and when the 10 most abundant bacterial families were analysed with R, a similar distribution and median was also observed, with only slight differences (Fig. 2). The alpha diversity (Fig. 3) and beta diversity (Fig. 4) were also evaluated in both case and control groups. While the alpha diversity values (Shannon and Simpson indices) were similar in both groups where no significant differences in means were noted according a t -test performed for Shannon (p -value = 0.745) and Simpson (p -value = 0.403) indices (Fig. 3), our data suggest a high diversity of the samples regardless of the group (Shannon value was between 3 and 4, and Simpson value was close to 1). Similarly, the results of the beta diversity using Bray-Curtis dissimilarity index did not show substantial differences in the bacterial species composition as the samples were not grouped into specific groups according to the type of herds (infertility-related or healthy) (Fig. 4). The Principal Coordinates Analysis (PCoA) explained only the 23.4% total variance of the dissimilarities between samples and the function “Adonis” indicated that only the 0.8% ($R^2 = 0.00829$) of the variation in distances was explained by the grouping tested (p -value = 0.001). Similar results were observed in a recent study where no significant differences in the composition of the bacterial populations of preputial bull samples were observed according to e.g. the type of breed and feeding, the use of antibiotics or the breeding history (Wickware et al., 2020).

3.2. Infertility-associated bacteria present in preputial samples

When a deeper analysis of the OTUs obtained was performed, we observed the presence of specific bacterial genera and species associated

with infertility within cattle herds, among which we found both primary and opportunistic pathogens. The results from the chi-square tests showed the presence of one genera significantly associated with bull infertility (p-value <0.001): *Mycoplasma* spp. (720 bulls were positive within the case group and 37 bulls were positive within the control group). Species from *Mycoplasma* spp. have been already reported in cattle reproductive pathologies, such as *M. bovis* or *M. bovis genitalium* (Reichel et al., 2018; Kirkbride, 1987). Interestingly, the remaining bacterial species previously associated with bovine infertility did not show a statistically significant correlation with fertility problems. However, *C. fetus* species, whose correlation with fertility problems showed a p-value of 1, was only found in the case group samples (26 bull samples – 2.75%). The species *C. fetus* is a primary pathogen associated to cattle infertility and is particularly troublesome in countries where natural breeding and extensive production is practised (Mshelia et al., 2010). On the other hand, *U. diversum*, detected in a high percentage in both groups, was present in bulls from case group (798 positives) in a higher percentage than bulls from the control group (66 positives). Even though there is not a significant association with bull infertility. However, it is interesting to taking into account that *U. diversum* is an opportunistic pathogen previously associated with bovine infertility (Díaz et al., 2019; Hobson et al., 2013), that is able to colonize the foreskin and urethra in bulls, and can be transmitted to females even through artificial insemination (Buziniani et al., 2011). Thus, it would be interesting to develop more studies about the true role of *U. diversum* in cattle infertility.

4. Conclusions

In conclusion, we performed the first report on the type and distribution of the bacterial populations in extensive bovine herds with records on low fertility in Spain. While the abundance and diversity of the bacterial population was similar in both infertility-related and healthy herds, we observed a relevant association of one bacterial taxa with the infertility-related herds: *Mycoplasma* spp., while the remaining bacterial species previously associated with bovine infertility did not show a statistically significant correlation with fertility problems, e.g. *C. fetus* or *Ureaplasma diversum*.

Our study highlights the promising potential that the application of sequencing techniques (e.g. 16S rRNA-based metagenomics) possesses in examining bovine infertility, as they are able to reveal different pathogens that could go unnoticed using diagnostic approaches for only the main known pathogens. Likewise, our research opens a new path in which new and previously neglected bacterial genera and species, that may play a relevant role in bovine infertility associated with bulls, are revealed.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

This work was funded by the Region of Madrid (Spain) (IND2018/BIO-9246), and an R&D agreement between the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, VISAVET-Universidad Complutense de Madrid and the Universidad de Burgos for research activities on infectious infertility in extensively reared cattle.

References

- Alves, L.D.F., Westmann, C.A., Lovate, G.L., De Siqueira, G.M.V., Borelli, T.C., Guazzaroni, M.E., 2018. Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. *Int. J. Genomics*. <https://doi.org/10.1155/2018/2312987>.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecol.* 26, 1442–1448. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.

- Bharti, R., Grimm, D.G., 2021. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief. Bioinform.* 22, 178–193. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz155>.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwards, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gantner, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolek, T., Kreps, J., Langille, M.G. L., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Maroz, C., Martin, B.D., McDonald, D., Mciver, L.J., Mednik, A.V., Metcalfe, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimy, A.T., Havas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Prieuse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., U-Hassan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Buziniani, M., Yamaguti, M., Oliveira, R.C., Cortez, B.A., Marques, L., Machado-Santelli, G.M., Assumpção, M.E., Timenetsky, J., 2011. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozooids. *BMC Res. Notes* 4, 0–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-455>.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Callhane, A.C., Thionouze, J., Petriere, G., Higgins, D.G., 2005. MAD4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 21 (11), 2789–2790. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti394>.
- Díaz, J.M., Prieto, A., López, G., Díaz, P., López, C., Quintela, L., Morrondo, P., Fernández, G., 2019. Association of *Ureaplasma diversum* with reproductive disease in cattle. *H. Z. Vet. J.* 67, 249–256. <https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1623733>.
- Dziewiecka, D., 2016. Significance and roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb. Ecol.* 72, 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>.
- Givens, M.D., 2018. Review: risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* 12, s165–s171. <https://doi.org/10.1017/S175173118000708>.
- Hobson, N., Chousalkar, K.K., Chenoweth, P.J., 2013. *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: its detection and potential effects. *Aust. Vet. J.* 91, 469–473. <https://doi.org/10.1111/avj.12113>.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6 (2), 65–70.
- Kirkbride, C.A., 1987. Mycoplasma, ureaplasma, and achleoplasma infections of bovine genitalia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 3, 575–591. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31131-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31131-2).
- Kindworth, A., Prieuse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- Ling, Z., Kong, J., Liu, F., Zhu, H., Chen, X., Wang, Y., Li, L., Nelson, K.E., Xia, Y., Xiang, C., 2010. Ling-BMGGen-2010.
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>.
- Mshelia, G.D., Amin, J.D., Woldehiwet, Z., Murray, R.D., Egbu, G.O., 2010. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod. Domest. Anim.* 45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01546.x>.
- Quast, C., Prieuse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. URL: <https://www.R-project.org/> (accessed 3.14.22).
- Reichel, M.P., Wahl, L.C., Hill, F.I., 2018. Review of diagnostic procedures and approaches to infectious causes of reproductive failures of cattle in Australia and New Zealand. *Front. Vet. Sci.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00222>.
- Rzewuska, M., Kwiecień, E., Chrobak-Chmiel, D., Kizerwetter-Świdła, M., Stefańska, I., Gierczyńska, M., 2019. Pathogenicity and virulence of *Truoperella pyogenes*: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112737>.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00662-07>.
- Wickham, H., 2007. Reshaping data with the reshape package. *J. Stat. Softw.* 21 (12), 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12>.
- Wickham, H. (Ed.), 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.

Resultados

C. Páó et al.

Research in Veterinary Science 150 (2022) 52–57

Wickham, H., François, R., Henry, L., Miller, K., 2021. Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.

Wickware, C.L., Johnson, T.A., Koziol, J.H., 2020. Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls. *Theriogenology* 145, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.002>.

Yoo, H.S., 2010. Infectious causes of reproductive disorders in cattle. *J. Reprod. Dev.* 56 <https://doi.org/10.1262/jrd.1056S53>.

Capítulo II

4.3. Estudio para la evaluación y mejora, en su caso, de la técnica PCR para la detección de *C. fetus* y *T. foetus* en muestras prepuciales de toros en régimen extensivo.

A pesar de la limitada información disponible respecto a los agentes infecciosos que pueden causar problemas de fertilidad en el toro, existen una serie de patógenos primarios de importancia reconocida cuya detección temprana en los toros es un elemento clave para la prevención y control de estos. Uno de ellos es *C. fetus*, cuya subespecie Cfv es el agente causal de CGB, enfermedad de declaración obligatoria en España de acuerdo al Real Decreto 526/2014. Este patógeno supone una preocupación en producción animal al ser una causa de pérdidas económicas en el sector bovino por su efecto sobre los índices de fertilidad. Además, la subespecie Cfv ha sido detectada en casos de infección en humanos (Wagenaar et al. 2014). Por su parte, la subespecie Cff causa infecciones esporádicas en el tracto reproductivo en ganado bovino, donde se la ha relacionado con problemas reproductivos, además supone una potencial preocupación en salud pública al tratarse de un patógeno zoonótico capaz de transmitirse al ser humano a través de diferentes vías (p.ej. mediante el consumo de alimentos contaminados) (Wagenaar et al. 2014).

Otro patógeno primario asociado a problemas de fertilidad en machos es *T. foetus*, agente etiológico de la tricomoniasis bovina, también considerada una enfermedad de declaración obligatoria en España (Real Decreto 526/2014). La tricomonosis bovina en España es una causa relevante de infertilidad en los rebaños que genera pérdidas económicas principalmente en explotaciones extensivas dedicadas a la producción de carne (Collantes-Fernández et al. 2019).

Como ya se ha mencionado previamente, los toros infectados por *C. fetus* y *T. foetus* resultan ser, por lo general, asintomáticos (Michi et al. 2016). Debido a la falta de síntomas en machos, las infecciones por estos patógenos en toros reproductores pueden pasar desapercibidas si no se realizan controles previos a la monta o IA, pudiendo ser transmitidos a las hembras. Hasta el

momento, no existe un tratamiento eficaz en toros infectados por *C. fetus* y *T. foetus* ni existen programas de profilaxis específica, por lo que la detección temprana y eficaz de toros infectados resulta ser una medida preventiva adecuada para minimizar el impacto negativo que tienen estos patógenos en la fertilidad de los rebaños.

Debido a las limitaciones del cultivo respecto a la PCR, esta última técnica diagnóstica es la más comúnmente empleada para la detección de *C. fetus* y *T. foetus* en muestras prepuciales de toros. No obstante, la PCR también presenta algunas limitaciones para la detección de ambos patógenos en muestras clínicas, siendo una técnica susceptible de mejora. Los estudios del presente capítulo dan respuesta al OBJETIVO ESPECÍFICO 3 (*Evaluar diferentes protocolos de PCR publicados en la literatura científica para la detección de C. fetus y la diferenciación de las subespecies Cfv y Cff en lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo con el fin de desarrollar y establecer un protocolo de detección mediante PCR que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica, y en consecuencia, permita la identificación de toros portadores para llevar a cabo la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino*), y OBJETIVO ESPECÍFICO 4 (*Evaluar diferentes protocolos de PCR publicados en la literatura científica para la detección de T. foetus en lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo, así como diseñar un nuevo protocolo de PCR basado en nuevas dianas genéticas alternativas a ARNr-ITS, diana utilizada por excelencia para este objetivo, con el fin de desarrollar y establecer el protocolo de detección que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica y para la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino*) de la presente memoria de tesis doctoral.

Este capítulo comprende dos estudios que han sido materializados en dos publicaciones correspondientes:

- i) Artículo 3, en el que se realiza la adaptación y comparación de diferentes técnicas de PCR para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de Cfv y Cff que ha sido publicado por

la revista *Theriogenology* [factor de impacto JCR: 2.923 - 2021(cuartil Q1), factor de impacto SJR: 0,69 – 2021 (cuartil Q1)] con la referencia <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.020>

- ii) Artículo 4, en el que se realiza la adaptación y comparación de diferentes protocolos de PCR para la detección de *T. foetus* en lavados preputiales de toros reproductores criados en régimen extensivo, y que ha sido publicado por la revista *Parasitology Research* [factor de impacto JCR: 2.383 – 2021 (cuartil Q3), factor de impacto SJR: 0.562 - 2021 (cuartil Q1)] con la referencia <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07487-72.740>.

4.3.1. Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples.

Autores: **Polo, C.**, García-Seco, T., Hernández, M., Fernández, V., Rodríguez-Lázaro, D., Goyache, J., Domínguez, L., & Pérez-Sancho, M. 2021.

Título: *Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples.*

Revista: *Theriogenology*

Año: 2021

Volumen: 172

Páginas: 300–306

DOI: doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.020

El hospedador primario de *C. fetus* es el ganado bovino y ovino. Es una de las principales causas de infertilidad infecciosa que afecta de forma directa al rendimiento productivo de las explotaciones extensivas bovinas (además de una potencial preocupación en sanidad pública al tratarse de un patógeno zoonótico). Hasta la fecha, se han identificado tres subespecies de *C.*

Resultados

fetus: i) Cfv (*C. fetus* subsp. *venerealis*), ii) Cff (*C. fetus* subesp. *fetus*), y iii) Cft (*C. fetus* subesp. *testudinum*).

En ganado bovino, Cfv es el agente etiológico de la CGB, enfermedad que se caracteriza por ser una causa de muerte embrionaria temprana y abortos en las hembras, estando incluida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la OMSA. En España, se trata de una enfermedad de declaración obligatoria de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 526/2014. Por otra parte, Cff se localiza de forma natural en el tracto gastrointestinal, siendo capaz de generar infecciones en el tracto reproductivo de forma esporádica, lo que se traduce en problemas de fertilidad. Hasta la fecha, la subespecie Cff carece de un papel de importancia en la infertilidad en bovino, no obstante, algunos estudios recientes han mostrado como Cff resulta ser un microorganismo potencialmente presente en el espermatozoides de los toros que podría alterar de forma negativa la calidad espermática así como ser transmitido de forma venérea a las hembras donde podría ser la causa de problemas reproductivos (Cagnoli et al. 2020).

En machos, las infecciones por *C. fetus* suelen ser asintomáticas por lo que pueden pasar fácilmente desapercibidas durante largos periodos de tiempo, lo que parece dificultar su control dentro de los rebaños, ya que los machos podrían actuar como portadores silentes, transmitiendo *C. fetus* de forma venérea.

En este escenario, la disponibilidad de técnicas diagnósticas fiables, rápidas y económicas (que permitan la detección de *C. fetus* y la identificación de la subespecie de los aislados) es una estrategia clave para el control de este patógeno, permitiendo evaluar el estado sanitario reproductivo de los toros de una explotación. Si bien el cultivo a partir de muestras clínicas se considera la técnica de referencia para el diagnóstico de CGB (WOAH 2021) en la actualidad, la mayoría de los laboratorios diagnósticos utilizan la técnica PCR como una herramienta rápida y fiable para la detección e identificación de *C. fetus* y la diferenciación de sus subespecies en muestras prepucciales. A pesar de ello, no existe ningún ensayo de PCR normalizado y estandarizado para la detección y la diferenciación de subespecies de *C. fetus* en muestras de lavados prepucciales de toros, si bien existen diferentes protocolos de PCR publicados que se

dirigen sobre distintas dianas genéticas. Además, la cantidad de estudios comparativos (en términos de sensibilidad, especificidad y rendimiento diagnóstico) de las diferentes técnicas de PCR disponibles para la detección de *C. fetus* en muestras clínicas es muy limitada, no existiendo ninguno que abarque todas las dianas genéticas disponibles para la identificación de la especie y diferenciación de subespecies de *C. fetus*. Por último, algunas de las dianas descritas para estos fines no están exentas de inconvenientes y particularidades que se traducen en distintos rendimientos diagnósticos. Todo ello dificulta el disponer de un sistema de vigilancia para la recogida de información armonizada sobre la presencia, circulación, incidencia, etc. de este patógeno en la cabaña ganadera. En definitiva, todo ello limita el conocimiento holístico que tenemos en la actualidad acerca del verdadero papel de las subespecies Cfv y Cff en la infertilidad infecciosa en ganado bovino.

En el Artículo 3 (“*Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples*”) del presente capítulo, se realizó un estudio comparativo de diferentes protocolos de PCR dirigidos sobre distintas dianas genéticas con la finalidad de adaptar y determinar el protocolo más adecuado para la detección de *C. fetus* en lavados prepuciales de toros criados en extensivo, así como para la diferenciación de las subespecies Cfv y Cff y el papel que la subespecie Cff podría estar jugando en la infertilidad bovina.

Para ello, se evaluaron seis ensayos de PCR dirigidos sobre los genes *16S* del ARNr, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* y *nahE* para la identificación de la especie *C. fetus*. De igual modo se evaluaron cuatro ensayos de PCR dirigidos sobre los genes *ISCfe1*, *sapB2*, *parA* y *virB11* para la diferenciación de las subespecies Cfv y Cff. De todos los protocolos de PCR incluidos en el presente estudio, destaca la adaptación de una técnica PCR basada en el protocolo de pirosecuenciación del trabajo de Persson y colaboradores (2012). Para dicha adaptación, se tomaron los cebadores específicos de *C. fetus* gyrB-F3 y gyrB-R2 junto con la sonda gyrB-P1, cuya combinación, de acuerdo con el análisis *in silico* realizado con BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permitía la

Resultados

detección específica de *C. fetus* frente a otros microorganismos potencialmente presentes en muestras prepuciales.

Para el estudio comparativo se evaluaron, en primer lugar, la sensibilidad y especificidad analíticas de cada protocolo. A continuación, se analizó el rendimiento diagnóstico de cada técnica sobre 289 muestras prepuciales (una muestra por toro) de toros criados en régimen extensivo que previamente habían sido analizadas mediante el estudio metagenómico basado en la secuenciación de la región hipervariable V3-V4 del gen del *16S* del ARNr para la clasificación de la población bacteriana (Artículo 2). De este modo, se incluyeron 41 muestras positivas a *C. fetus* y 248 muestras negativas, de acuerdo a los resultados del análisis metagenómico. El protocolo de PCR llamado en el presente trabajo “P12” (Persson et al. 2012), dirigido sobre el gen *gyrB*, obtuvo los mejores resultados en comparación al resto de protocolos de PCR empleados, detectando *C. fetus* en el 95,1% de las muestras positivas (39/41) por metagenómica y un 2% de las muestras (5/248) cuya identificación como positivas a *C. fetus* fue dudosa.

Un 85,4% de las muestras positivas a *C. fetus* fueron identificadas como Cf_v (35/41) con, al menos, una técnica PCR específica de subespecie, pero no se detectó Cf_f en ninguna de las muestras. En consecuencia, en un 14,6% de los casos (6/41) no fue posible la identificación de la subespecie. Cabe destacar que el único protocolo de PCR incluido en el estudio para la identificación de Cf_f (Wang et al. 2002), presentó una sensibilidad analítica baja (50.000 copias de genoma por reacción de PCR), por lo que se debe considerar que la presencia de Cf_f en las muestras analizadas podría estar pasando desapercibida debido a la limitada sensibilidad analítica de la única técnica disponible, pudiendo estar siendo infravalorado el papel de Cf_f con relación a infertilidad en bovino. Por otra parte, en el 33,1% de las muestras negativas a *C. fetus* (82/248) se observaron amplificaciones inespecíficas con alguna de las técnicas PCR con dianas genéticas empleadas para la detección de la subespecie Cf_v (*ISCfe1* y *virB11*). Todos estos resultados pusieron de manifiesto las claras limitaciones de los protocolos de PCR para la diferenciación de subespecies de *C. fetus* disponibles hasta la fecha.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se confirmó la HIPÓTESIS 5 en lo referente a *C. fetus* (*Las herramientas moleculares actualmente implementadas en la detección de C. fetus y T. foetus presentan un margen de mejora que repercutirá en las medidas de control y manejo de estas patologías infecciosas en el toro*) y refuerza la idea planteada en la HIPÓTESIS 6 (*La detección de C. fetus y la diferenciación de las subespecies Cfv y Cff en muestras prepuciales de toros mediante el empleo de protocolos de PCR presenta limitaciones en cuanto a sensibilidad y/o especificidad que impactan en las ratios de detección de C. fetus en lavados prepuciales, disminuyendo el rendimiento diagnóstico para detección y diferenciación de subespecies de C. fetus en muestras clínicas*).

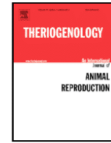
Así mismo se da respuesta al OBJETIVO ESPECÍFICO 3 de la presente tesis: *Evaluar diferentes protocolos de PCR publicados en la literatura científica para la detección de C. fetus y la diferenciación de las subespecies Cfv y Cff en lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo con el fin de desarrollar y establecer un protocolo de detección mediante PCR que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica, y en consecuencia, permita la identificación de toros portadores para llevar a cabo la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino*.

El presente estudio propuso un nuevo protocolo de PCR (P12) que parece mejorar lo obtenido por otros protocolos usados previamente para la detección de *C. fetus* en muestras prepuciales de acuerdo con lo publicado en la literatura científica y los informes de la OMSA. Del mismo modo, el estudio puso de manifiesto la necesidad de establecer criterios rigurosos para discriminar entre subespecies de *C. fetus* empleando técnicas de PCR y permitir mejorar la comprensión del papel de las subespecies Cfv y Cff en la epidemiología y patogenia de la infertilidad infecciosa bovina.



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/theriogenology

Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples

Coral Polo ^{a,b}, Teresa García-Seco ^a, Marta Hernández ^c, Víctor Fernández ^d, David Rodríguez-Lázaro ^e, Joaquín Goyache ^{a,f}, Lucas Domínguez ^{a,f}, Marta Pérez-Sancho ^{a,f,*}

^a VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

^b MAEVA SERVET S.L., Calle de la Pragua 3, 28749, Madrid, Spain

^c Molecular Biology and Microbiology Laboratory, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Av. Burgos, 47071, Valladolid, Spain

^d Zootecnia Análisis Clínicos Veterinarios S.L.P., Calle Tierra de Campos 24-26, 37008 Salamanca, Spain

^e Microbiology Area, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, Calle Don Juan de Austria s/n, 09001, Burgos, Spain

^f Department of Animal Health, Faculty of Veterinary, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2020

Received in revised form 14 May 2021

Accepted 17 June 2021

Keywords:

Cattle infertility

Campylobacter fetus

Subspecies

Bull preputial samples

PCR

Molecular diagnosis

ABSTRACT

Campylobacter fetus is a zoonotic pathogen found in cattle, in which it is one of the main causes of infectious infertility. Most diagnostic laboratories use PCR as quick easy tool for *C. fetus* identification. However, there is no standardized PCR assay for *C. fetus* detection and subspecies differentiation, hindering the comparison of results. In this study, we evaluated selected PCR assays targeting the 16S rRNA, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* and *nahE* genes for *C. fetus* identification and *ISCfe1*, *sapB2*, *parA* and *virB11* for subspecies differentiation. Analytical sensitivity and specificity were assessed for each PCR assay, and the assays were then tested on 289 bull preputial samples that had also been analysed by 16S rRNA barcode metagenomics. In total, 41 *C. fetus*-positive samples were included. The P12 PCR assay targeting the *gyrB* gene performed best, detecting the pathogen in 95.1% of positive samples. For the discrimination of *C. fetus* subspecies, we were able to identify a proportion (85.4%) of the *C. fetus*-positive samples correctly as *C. fetus venerealis* with at least one subspecies-specific PCR, but *C. fetus fetus* was not detected in any of the samples tested. Remarkably, *C. fetus* subspecies amplification was observed following PCR on some samples (33.1%) considered *C. fetus*-negative, highlighting the need for rigorous criteria for discriminating between *C. fetus* subspecies, to improve understanding of the role of the two *C. fetus* subspecies in the epidemiology and pathogenesis of bovine infectious infertility.

© 2021

1. Introduction

The fertility and conception rates of nursing cows in Spain are an estimated 17.1% lower than the mean rates for the European Union [1]. Infectious diseases are among the most important potential causes of bovine infertility [2]. *Campylobacter fetus* infection is frequently linked to cattle infertility, particularly in countries in which extensive production practices and natural breeding are common [3].

Three subspecies of *C. fetus* have been identified: *C. fetus* subspecies *venerealis*, *C. fetus* subspecies *fetus* and *C. fetus* subspecies *testudinum*. *C. fetus venerealis* is the etiological agent of bovine genital campylobacteriosis (BGC), which is characterized by infertility, early embryo death

and abortions [3,4], and is listed as a notifiable disease by the World Organization for Animal Health [5]. Both *C. fetus* subspecies *venerealis* and *fetus* have been associated with low fertility rates in cattle [6]. The infection is frequently asymptomatic in males and is silently transmitted for long periods, allowing the pathogen to circulate in cattle herds [3,4]. In addition, the pathogen is transmitted not only through natural breeding techniques, but also through artificial insemination, as it is able to survive in frozen sperm samples [7]. The clinical signs of *C. fetus venerealis* and *C. fetus fetus* infections in cattle are similar, but *C. fetus fetus* can also be isolated from the intestinal tract of healthy animals [3,4]. *C. fetus* subspecies *fetus* can also infect humans, causing clinical signs ranging from an acute diarrheal illness to systemic disease, with the description of a number of clinical cases over time [8].

According to OIE guidelines [4] the recommended method for *C. fetus* identification is microbiological culture and phenotypic characterization. However, the OIE also recognizes polymerase chain reaction

* Corresponding author. VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.
E-mail address: maperezs@ucm.es (M. Pérez-Sancho).

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.020>

0093-6911/© 2021

(PCR), with the *nahE* gene as the molecular target, as a valid test for *C. fetus* identification [4]. Microbiological culture is a laborious, tedious, and resource-demanding process for fastidious microorganisms such as *C. fetus*, and its analytical sensitivity is often limited, as *C. fetus* is easily overgrown by commensal bacteria [9]. Likewise, *C. fetus* has low levels of biochemical activity, and differentiation between its subspecies on the basis of biochemical features is, therefore, difficult [4]. Molecular assays can overcome these drawbacks. A comparison of available PCR assays by van der Graaf-van Bloois et al. [10] demonstrated the usefulness of molecular diagnosis for *C. fetus* subspecies identification. However, some gene targets for *C. fetus* identification at species and subspecies level were not included in this comparative study, and field samples were not included in the evaluation of the assays.

The primary aim of this study was, therefore, to perform a systematic comparative search for the genetic targets currently used for *C. fetus* detection and for distinguishing between the two principal subspecies (*C. fetus venerealis* and *C. fetus fetus*) in cattle, and to assess the analytical sensitivity and specificity of the PCR assays. We then evaluated the diagnostic performance of selected PCR assays on preputial smegma samples, with a view to proposing a robust PCR assay for *C. fetus* detection in field samples.

2. Materials and methods

2.1. Systematic review and selection of PCR protocols

A systematic bibliographic search was conducted with the following search strings in (i) PubMed: (“Campylobacter fetus”[Mesh]) AND “PCR”[Mesh], (ii) Web of Science: TS=(“Campylobacter fetus” AND “PCR”) and (iii) Scopus databases: TITLE-ABS-KEY (“Campylobacter fetus” AND “PCR”). Repetitions were removed with EndNote version X9.3.1 build 13758, and, following a review of the abstracts, only those containing information about PCR for *C. fetus* identification were retained. The inclusion criteria (studies assessed further) were: i) inclusion of the primer sequences in the publication ii) indication of the probe sequence, if appropriate, iii) confirmation of the specificity of primers by *in silico* BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysis, considering as valid all forward and reverse primer sequences displaying 100% identity to the *C. fetus* reference sequence from the GenBank database and not matching sequences from other cattle pathogens associated with infertility or other microorganisms potentially present in preputial samples, iv) 100% identity of the probe sequence with *Campylobacter* spp. reference sequences from the GenBank database, and v) description of the thermal cycler conditions provided in the publication. The systematic review identified 34 publications meeting the inclusion criteria and published since 1996, based on 10 different gene targets for *C. fetus* identification (*16S* rRNA, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* and *nahE*) and subspecies discrimination (*ISCfe1*, *parA*, *sapB2* and *virB11*). All publications meeting the inclusion criteria were reviewed individually and, for each genetic target described for *C. fetus*, a single PCR protocol was chosen. Priority was accorded to protocols meeting the following selection criteria: i) protocol subjected to a validation process, ii) protocol tested on clinical samples with satisfactory results in terms of analytical sensitivity, specificity and/or detection rates, iii) real-time protocols, particularly those using specific probes. Table 1 shows the selection of PCR assays and adaptation to Qiagen PCR kits (QuantiFast Pathogen PCR, QuantiFast SYBR Green PCR and QIAGEN Multiplex PCR kits).

The final reaction volume, concentrations of primers and probes and thermocycler conditions are shown in Table 1. For all PCR assays, we used 2 μ L of DNA elute per reaction. For conventional PCR assays, electrophoresis was performed in a 2% agarose gel (Biotools MB agarose) at 70 mV and 400 mA for 55 min.

The PCR assay based on the work of Hum et al. [11] had a limited performance on field samples in our study, as did the PCR protocol

based on the work of Iraola et al. [12] (high proportion of non-specific results). Both these protocols involved the use of a multiplex PCR with the MG3F and MG4R primers [11,12] for *C. fetus* identification. The thermocycler conditions described by Schulze et al. (2006) [13] were applied to both these protocols, as an improvement strategy.

2.2. Analytical sensitivity (LOD) and specificity tests

Real-time PCR was performed in a Bio-Rad CFX96 thermocycler (Bio-Rad), and conventional PCR tests were performed in Bio-Rad C1000 and T100 thermocyclers (Bio-Rad), in specific PCR conditions (Table 1). For specificity tests, a comprehensive set of species closely phylogenetically and ecologically related (potentially present in preputial samples; one strain/species) to *C. fetus* was used (Table 2). We also included the three subspecies of *C. fetus* (Table 2).

For analytical sensitivity tests, *C. fetus* (ICM18/00015 from the VISAVET-UCM collection), *C. fetus venerealis* (ICM18/00036 from the VISAVET-UCM collection) and *C. fetus fetus* (ATCC-27374) isolates were used according to OIE recommendations for correct determination of the limit of detection (LOD) and the confidence interval (CI) [14]. The concentration of genomic DNA was adjusted to a final concentration of 1 ng of DNA per reaction (approximately 500,000 *C. fetus* genome copies) with the High Sensitivity DNA Quantitation Kit (Invitrogen) and a Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen), and serial ten-fold dilutions were then prepared, down to 0.1 fg DNA per reaction. The limit of detection (LOD) was calculated according to OIE recommendations, as follows: 20 replicates of each DNA dilution were prepared, for determination of the CI, with the 100% CI implying that all 20 replicates yield a positive result and the 95% CI corresponding to a positive result for 19 of the 20 replicates.

For each real-time PCR, the cutoff was established by determining the arithmetic mean value of the C_T of the 20 replicates of the dilution of the LOD with a CI \geq 95%. For conventional PCR, visual detection of the band in the agarose gel was considered to indicate a positive result. In cases of doubt concerning the PCR result, NIH ImageJ software [15] was used, in accordance with the manufacturer's instructions (<https://imagej.nih.gov/ij/>) to determine whether the result should be considered positive.

2.3. Recovery of preputial wash samples from bulls

The diagnostic performance of selected PCR assays was assessed on a selection of preputial wash samples from 289 bulls from Spanish extensive livestock farms. Samples were selected from our collection on the basis of metagenomic results (see below). All samples were subjected to the same processing protocol (see below). Briefly, 15 mL of preputial wash sample was centrifuged at $1512 \times g$ for 10 min, and the pellets were stored at -80°C until analysis. DNA was extracted with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to a slightly modified version of the manufacturer's protocol: the pellet was first suspended in a cell lysis buffer [20 mM Tris-Cl (pH 8), 2 mM sodium EDTA, 1.2% Triton X-100 and 20 mg/mL lysozyme in a final volume of 360 μ L] and incubated for 1 h at 37°C . DNA was then extracted according to the kit manufacturer's instructions.

2.4. Metagenomic analysis of the clinical samples

Microbial diversity was assessed by analyzing the sequence of the V3–V4 region of the *16S* rRNA gene. The primers and PCR conditions used for this analysis were as previously reported [16]. Sample multiplexing, library purification and sequencing were performed as described in the Illumina (San Diego, CA) “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” guide. Libraries were sequenced on an Illumina MiSeq platform providing 300-bp paired-end reads.

Resultados

Table 1
PCR assays for *C. fetus* detection and subspecies differentiation studied here.

Species or subspecies	Target	PCR type	Reference	Code ^a	Primers and probes	PCR conditions ^b											
						vol (μL)	vol Mix (μL)	Fw (μM)	Rv (μM)	Pr (μM)	ID. (C°/min)	D. (C°/s)	A. (C°/s)	E. (C°/s)	N ^c	FE. (C°/min)	AS. (bp)
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>J6Sr RNA</i>	Real-time (probe)	[33]	I16	16SPw 5'-GCACCTGCTCAACTTTC-3' 16SRv 5'-CCTTACCTGGGCTTGAT-3' 16SPb 5'-VIC-ATCTCTAAGAGATTAGTTG-MGB-NFQ-3'	25	5	0.9	0.9	0.2	95/5	95/15	60/60	-	35	70/5	42
	<i>cdtB</i>	Conventional	[34]	K16	Cf-spBU6 5'-GGCTTTGCAAAACCAGAAG-3' Cf-spBR3 5'-CAAGAGTTCCTTAAACTC-3'	50	12.5	0.2	0.2	-	95/5	94/20	56/90	72/90	30	72/10	553
	<i>nahE</i>	Real-time (probe)	[10] ^c	G13	nahE-F 5'-TGTTATGGTGATCAAAATAGCTGTG-3' nahE-R 5'-GAGCTGTTTTATGGCTACTCTTTTTTA-3'	20	5	0.6	0.6	0.2	95/15	60/45	-	-	40	-	27
	<i>gyrB</i>	Real-time (probe)	[32]	P12	nahE-P 5'-6-FAM-TGTATATGCACITTTAGCAACIT-NFQ-3' gyrB-F3 5'-CTGTAAGAAAAGTCCAGGAATGT-3' gyrB-R2 5'-CCATGATTGCTCTATAGAGTTATCA-3' gyrB-P1 5'-6-FAM-CWACTTCATAAATCATATGATGAAG-MGB-NFQ-3' JH0087 5'-TGAGGCTGTACAAGGAGTTA-3'	25	5	0.4	0.4	0.2	95/5	95/15	60/60	-	50	-	52
	<i>crp60</i>	Real-time (SYBR)	[35]	CD9	JH0088 5'-TGAGCTATGGCTATTTCGTGAA-3' MG3F 5'-GGTAGCCGACGCTGTAAGAT-3' MG4R 5'-TAGCTACATAAGCAACT-3' JH0087 5'-TGAGGCTGTACAAGGAGTTA-3'	25	12.5	0.2	0.2	-	95/5	95/15	62.5/15	72/15	40	95/1	100
	<i>czxA</i>	Conventional	[11] ^d	H97	JH0088 5'-TGAGCTATGGCTATTTCGTGAA-3' MG3F 5'-GGTAGCCGACGCTGTAAGAT-3' MG4R 5'-TAGCTACATAAGCAACT-3'	25	12.5	0.5	0.5	-	95/15	96/15	60/60	72/90	35	72/10	764
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	<i>ISCf-I</i>	Real-time (probe)	[10] ^c	G13 (ISC1)	ISC1-F 5'-AGGGGAAGAGAATGTTAAATTTGAA-3' ISC1-R 5'-CCATAAAGCTAGCTGAAAACCTG-3' ISC1-P 5'-VIC-CCAAAGATGCTTGAATA-NFQ-MGB-3'	20	5	0.6	0.6	0.2	95/5	95/15	60/45	-	40	-	34
				G13 (ISC2)	ISC2-F 5'-TTCAAAGCTCTTGGGGTTAC-3' ISC2-R 5'-AAAGCCTGTTTAGAACAATAAFACTC-3' ISC2-P 5'-VIC-ACTGGTGGGAGGCTAG-NFQ-MGB-3'	20	5	0.6	0.6	0.2	95/5	95/15	60/45	-	40	-	208
	<i>vb11</i>	Conventional	[12] ^d	I12	nC1165g4f 5'-AGGACACAATGCTAACTGG-3' nC1165g4R 5'-GATTGTATAGGGACTTTGG-3'	20	10	0.38	0.38	-	95/15	96/15	60/60	72/90	35	72/10	233
	<i>parA</i>	Conventional	[11] ^d	H97 (VenS)	VenSF 5'-CTTAGCAGTTTGGGATATTGGCATT-3' VenSR 5'-GCTTTTGAGATAACAATAAGACTT-3'	25	12.5	0.5	0.5	-	95/15	96/15	60/60	72/90	35	72/10	142
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>sapB2</i>	Conventional	[28] ^c	W02	CFF 5'-GCAAATATAAATGTAAGCGGAGAG-3' CFR 5'-TGCAGGGGCCACCTAT-3'	25	12.5	0.5	0.5	-	95/15	95/30	59/90	72/30	30	72/10	435

^a The code refers to the name of PCR assay.

^b PCR conditions: vol(μL), final reaction volume; vol.Mix (μL), volume of 5 × QuantiFast Pathogen Master Mix for real-time (probe) PCR, 2 × QuantiFast SYBR Green PCR Master mix for real-time (SYBR) PCR and 2 × QIAGEN Multiplex PCR Master Mix for conventional PCR; Fw(μM), final concentration of forward primer; Rv(μM), final concentration of reverse primer; Pr(μM) final concentration of probe; ID.(C°/min), initial denaturation; D.(C°/s) denaturation step per cycle; A.(C°/s), annealing step per cycle; E.(C°/s) elongation step per cycle; N^c, number of cycles; FE.(C°/min), final elongation step; AS.(bp), amplicon size. The default MgCl₂ concentration was used for each Qiagen PCR kit.

^c van der Graaf-van Blois et al. [10] analysed the sensitivity and specificity of 155 *C. fetus* isolates: 100% sensitivity and specificity were reported for *nahE*; 97% sensitivity and 100% specificity for *ISCf-I-ISC1* primers and 100% sensitivity and 98% specificity for *ISCf-I-ISC2* primers; 100% sensitivity and specificity for *czxA*; 58% sensitivity and 83% specificity for *parA*; 76% sensitivity and 72% specificity for *sapB2*.

^d The multiplex PCR assay described by Hum et al. [11] gave a large number of non-specific results with our field samples, as did the PCR assay described by Iraola et al. (2012) [12], based on multiplex PCR with the same pair of primers as used by Hum et al. [11] for *C. fetus* detection. We therefore used the thermocycling conditions described by Schulze et al. (2006) [13], which resolved this problem.

Table 2
Specificity of PCR assays for *C. fetus* detection and subspecies identification. We included one strain per species.

Species	C. fetus					C. fetus venerealis				C. fetus fetus	
	I16 ^c	G13	C09	P12	K16	H97	G13-ISC1	G13-ISC2	I12	H97-VenS	W02
<i>Arcobacter butzleri</i>	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella abortus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Toxoplasma gondii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coxiella burnetii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter lanienae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter sputorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. fetus</i> ICM18/00015	20.86 ^b	22.06	21.08	21.66	+ ^a	+	-	-	-	-	-
<i>C. fetus</i> DICM11/00145-2-C	18.6	18.88	17.75	19.19	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. fetus</i> sub. <i>venerealis</i> ICM18/00036	21.27	22.17	21.5	22.78	+	+	21.03	22.02	+	+	-
<i>C. fetus</i> sub. <i>venerealis</i> ICM172263	18.58	19.39	17.84	19.31	+	+	16.9	17.05	+	+	-
<i>C. fetus</i> sub. <i>fetus</i> ATCC-27374	21.18	21.82	20.47	21.58	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. fetus</i> sub. <i>testudinum</i> ATCC-BAA-2539	22.08	25.15	-	24.06	+	-	-	-	-	-	-

^a +: positive amplification in conventional PCR assays; -: absence of amplification.

^b mean C_T value for real-time PCR assays.

^c The P12 PCR assay targets the *gyrB* gene and was described by Pearson et al. (2012) [32]; the G13 PCR assay targets the *nahE* gene and was described by van der Graaf-van Bloois et al. [10]; the I16 PCR assay targets the 16S rRNA gene and was described by Iraola et al. [33], the C09 PCR assay targets the *cpn60* gene and was described by Chaban et al. [35], the H97 PCR assay targets the *cstA* gene and was described by Hum et al. [11], the K16 PCR assay targets the *cdtB* gene and was described by Kamet et al. [34], the G13-ISC1 and G13-ISC2 PCR assays target the ISCF1 and were described by Graaf-van Bloois et al. [10], the I12 PCR assay targets the *virB11* gene and was described by Iraola et al. [12], the H97-VenS PCR assay targets the *parA* gene and was described by Hum et al. [11], and the W02 PCR assay targets the *sapB2* gene and was described by Wang et al. (2002) [28].

Raw demultiplexed sequence data were processed with the QiimeReporter pipeline (<https://github.com/dabadgarcia/qiimereporter>). This straightforward pipeline for the analysis of amplicon sequences integrates basic Qiime2 commands [17] and the R programming language. The DADA2 package [18] was used to filter reads, merge paired ends, remove chimeras and assign amplicon sequence variants (ASVs). A pre-trained naïve Bayes classifier [19] was used to obtain the taxonomic assignment of the ASVs, using the SILVA database version 132 [20] as a reference. This generated a table detailing the microbial composition of each sample.

2.5. Diagnostic performance of selected PCR methods

The same DNA extracts used for metagenomic analysis were also processed with the selected PCR assays (Table 1). PCR inhibition was assessed by including an internal control in the P12 PCR assay. This internal control was provided by the QuantiFast Pathogen PCR + IC kit (Qiagen). Samples were classified into three categories based on the results of metagenomics and PCR assays, considered independently. A sample was considered positive if 16S rRNA sequencing identified *C. fetus* and/or two or more species-specific genetic targets (16S rRNA, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* and *nahE*) were amplified by PCR protocols. Samples were considered negative if neither 16S rRNA sequencing or the use of species-specific gene targets resulted in positive results for *C. fetus*. Finally, results for a particular sample were considered dubious if only one single species-specific PCR protocol yielded positive results. As a positive control for PCR assays, were used ICM18/00015 (*C. fetus*), ICM18/00036 (*C. fetus* subsp. *venerealis*) and ATCC-27374 (*C. fetus* subsp. *fetus*). Sterile water was used as a negative control.

3. Results

3.1. Analytical sensitivity and specificity

The analytical specificity results are shown in Table 2. The internal control included in the P12 protocol made it possible to check that there was no PCR inhibition. No non-specific amplification was observed in the sensitivity and specificity tests. The species-specific C09 and H97 PCR assays did not detect the *C. fetus testudinum* control strain ATCC-BAA-2539.

Analytical sensitivity depended on the PCR assay used. For *C. fetus* detection, the I16 PCR assay performed best, with a LOD as low as 10 fg for *C. fetus* DNA (equivalent to five copies of the genome). The G13, P12 and C09 PCR assays each detected *C. fetus* DNA down to levels as low as 100 fg, (equivalent to 50 genome copies), and the conventional K16 and H97 PCR assays had a LOD of 10 pg *C. fetus* DNA (equivalent to 5000 genome copies). For *C. fetus venerealis*, the G13-ISC1 PCR assay had a LOD of 10 fg DNA (equivalent to 5 genome copies), whereas the ISC2 PCR assay detected *C. fetus venerealis* at levels down to 1 pg of DNA (equivalent to 500 genome copies). Finally, the LOD for the H97 and I12 PCR assays was 10 pg of *C. fetus venerealis* DNA (equivalent to 5000 genome copies), whereas the W02 PCR assay detected *C. fetus* sub-species *fetus* at levels down to 100 pg (equivalent to 50,000 genome copies). For real-time PCR assays, mean C_T ranged from 33 (G13-ISC2 PCR assay) to 38 (I16 PCR assay).

3.2. Diagnostic performance of the selected PCR protocols with field samples

A summary of the samples included in this study and their classification is provided in Table 3. This classification was used to evaluate the diagnostic performance of the selected PCR assays. The selection of preputial wash samples included 31 *C. fetus*-positive samples and 248 negative samples, according to 16S rRNA sequencing results. Following

Table 3A
PCR results for field bovine preputial samples, for the identification of (A) *C. fetus* and (B) *C. fetus venerealis*.

PCR assay ^a	P12	G13	I16	C09	H97	K16
Positive samples^b	39/41 (95.1%)	34/41 (82.9%)	35/41 (85.4%)	33/41 (80.5%)	31/41 (75.6%)	27/41 (65.8%)
Identification of <i>C. fetus</i> dubious^c	5/248 (2%)	0/248 (0%)	1/248 (0.4%)	0/248 (0%)	0/248 (0%)	0/248 (0%)
Negative samples^d	243/248 (98%)	247/248 (99.6%)	247/248 (99.6%)	248/248 (100%)	248/248 (100%)	248/248 (100%)

^a The P12 PCR assay targets the *gyrB* gene and was described by Pearson et al. [32], the G13 PCR assay targets the *nahE* gene and was described by van der Graaf-van Bloois et al. [10], the I16 PCR assay targets the 16S rRNA gene and was described by Iraola et al. (2016) [33], the C09 PCR assay targets the *cpn60* gene and was described by Chaban et al. [35], the H97 PCR assay targets the *cstA* gene and was described by Hum et al. [11], the K16 PCR assay targets the *cdtB* gene and was described by Kamei et al. [34].

^b *C. fetus*-positive samples were identified on the basis of massive 16S rRNA sequencing and/or two or more species-specific PCR assays.

^c The identification of *C. fetus* was considered dubious for samples testing negative by 16S rRNA, but positive in a single *C. fetus*-specific PCR assay.

^d *C. fetus*-negative samples were those in which the pathogen was not detected by massive 16S rRNA sequencing or *C. fetus*-specific PCR assays.

Table 3B
PCR results for field bovine preputial samples, for the identification of (A) *C. fetus* and (B) *C. fetus venerealis*.

PCR assay ^a	G13-ISC1	G13-ISC2	I12	H97-VenS
Identification of <i>C. fetus venerealis</i> in <i>C. fetus</i>-positive samples	33/41 (80.50%)	32/41 (78.05%)	17/41 (41.50%)	6/41 (14.63%)
Non-specific results for <i>C. fetus</i>-negative samples^b	10/248 (4%)	6/248 (2.40%)	73/248 (29.40%)	0/248 (0%)

^a The results were considered non-specific if the sample tested negative for *C. fetus* by massive 16S rRNA sequencing and in *C. fetus*-specific PCR assays, but positive in one or two *C. fetus* subspecies *venerealis*-specific PCR assays.

^b The G13-ISC1 and G13-ISC2 PCR assays target the *ISCfe1* and were described by Graaf-van Bloois et al. [10], the I12 PCR assay targets the *virB11* gene and was described by Iraola et al. [12], and the H97-VenS PCR assay targets the *parA* gene and was described by Hum et al. [11].

PCR analysis, another 10 samples were considered to be *C. fetus*-positive due to the amplification of two or more species-specific targets by PCR. Some minor discrepancies between metagenomics and PCR results were observed. In 10 of the 41 samples considered positive for *C. fetus*, two or more *C. fetus*-specific targets (16S rRNA, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* and *nahE*) yielded positive results, whereas the metagenomics analysis was negative. Likewise, it was possible to identify *C. fetus* solely through 16S rRNA sequencing in two of the 41 *C. fetus* samples considered positive.

The P12 PCR assay gave the best performance with field samples, identifying 95.1% of the *C. fetus*-positive samples, whereas the I16 and G13 PCR assays detected 85.4% and 82.9% of the positive samples, respectively (Table 3). Interestingly, the detection results were not improved by combining the P12 PCR assay with any other PCR assay. The P12 PCR assay also gave positive amplification results for 2% of the *C. fetus*-negative samples, whereas the I16 PCR assay gave positive amplification results for only 0.4% of negative samples (Table 3). These samples were considered “dubious” in our results (Table 3).

We defined a criterion for considering *C. fetus* subspecies identification to be correct: identification of the species *C. fetus* in a preputial sample by at least two different species-specific PCR assays based on two different genetic targets, and positive amplification in at least one subspecies-specific PCR assay. In total, 35 of the 41 (85.4%) *C. fetus*-positive samples were identified as *C. fetus venerealis* by PCR for at least one subspecies-specific target: *ISCfe1*, *virB11* and/or *parA*. Identifica-

tion to subspecies level was not possible with any of the subspecies-specific PCR assays for the other six samples. The G13-ISC1 and ISC2 PCR assays targeting *ISCfe1* identified 80.5% and 78.1% of the *C. fetus*-positive samples, respectively, as *C. fetus venerealis* (Table 3). The PCR assays targeting other genomic regions had a poorer performance: 41.5% and 14.6% for the I12 PCR assay targeting the *virB11* gene and for the H97-VenS PCR assay targeting the *parA* gene, respectively. The W02 PCR assay did not identify *C. fetus fetus* in any of the samples studied.

Finally, 82 of the 248 *C. fetus*-negative samples (33.1%) tested positive in one or more PCR protocols for subspecies *venerealis* despite testing negative in all assays for the species *C. fetus* (P12, I16, G13, C09, H97 and K16). These cases were classified as non-specific amplification, and were considered to be negative: 73 samples for the I12 PCR assay targeting the *virB11* gene, 10 samples for the G13-ISC1 assay and six samples for the G13-ISC2 PCR assay, both targeting the *ISCfe1* gene.

4. Discussion

C. fetus venerealis, the causal agent of BGC, is one of the most relevant infectious causes of infertility in cattle reared in countries in which extensive production and natural breeding methods are practiced. However, *C. fetus* subspecies *fetus* has also been associated with infertility in cattle [3,6]. *C. fetus* can also be considered to be of public health concern, as it is a zoonotic pathogen [8].

Bacteriological culture followed by biochemical identification is the recommended method for identifying *C. fetus* according to OIE guidelines [4]. However, this approach is less sensitive than molecular techniques [21], due to the highly demanding nutritional and atmospheric requirements of this species and the ease with which it is overgrown by commensal bacteria [9]. The biochemical identification of this species and its subspecies is also potentially problematic, due to for example, the low levels of biochemical activity in *C. fetus* [4].

In this study, we assessed the diagnostic performance of PCR assays for all the genetic targets described to date for *C. fetus* detection, using bovine preputial wash samples, one of the reference sample for BGC diagnosis [4]. Our systematic literature review revealed 34 publications since 1996 relating to 10 different gene targets for *C. fetus* identification (16S rRNA, *gyrB*, *cpn60*, *cstA*, *cdtB* and *nahE*) and subspecies discrimination (*ISCfe1*, *parA*, *sapB2* and *virB11*). We selected eight publications from this list, covering all the targets described in previous studies, based on preference criteria. Another two publications were discarded: i) the assay described by van Bergen et al. [22] was rejected due to its low specificity (45%), as previously reported by van der Graaf-van Bloois et al. [10]; ii) the PCR assay described by Chaban et al. [23] was discarded due to random amplifications observed during specificity and analytical sensitivity tests. The PCR assays were adapted in our laboratory, but the oligonucleotides used were those indicated in the original publications (Table 1).

We assessed the robustness of the PCR assays on a selection of 289 field preputial wash samples previously analysed by metagenomics methods. Metagenomics analyses based on 16S rRNA gene sequencing are a powerful tool for investigating microbial populations, but this technique may present limitations for identification to the genus and species levels, because some phylogenetically close microorganisms have almost identical 16S rRNA targets, decreasing the potential of this approach as a diagnostic tool [24,25]. For these reasons, we considered samples to be positive if the ASVs for *Campylobacter* species level identification were 100% identical to the reference sequences from the SILVA database, and/or if two or more *C. fetus*-specific PCR assays yielded positive results.

We found that the P12 PCR assay targeting the *gyrB* gene was the most suitable PCR assay for *C. fetus* identification. Despite its conservation and similar sequences in many bacterial species, *gyrB* has been shown to be a good target for bacterial species differentiation [25]. It

gave positive results for 95.1% of the *C. fetus*-positive samples, with a LOD of 100 fg (the equivalent of about 50 *C. fetus* genomes). Its combination with other protocols did not improve the results for *C. fetus* identification on the total collection of bull preputial wash samples tested. These results contrast with the indications of the OIE terrestrial manual for the diagnosis of BGC [4], which recommends the use of PCR assays targeting the *nahE* gene. Our results indicate that the G13 PCR assay targeting the *nahE* gene is significantly less efficient, identifying 82.9% of the total *C. fetus*-positive samples. Nevertheless, with the P12 assay, we found that 2% of samples tested positive only with this protocol (these results were thus considered dubious) corresponding to five of 248 samples (Table 3).

For the epidemiology and ecology of bovine infectious infertility, and BGC in particular, it is important to be able to identify the causal agent to a finer taxonomic level than the species —i.e. determine whether *C. fetus* subspecies *veneralis* or *C. fetus* subspecies *fetus* is involved. As there is currently no gold standard for *C. fetus* subspecies discrimination, we considered subspecies identification to be correct if at least two different species-specific PCRs (targeting two different genomic regions) identified *C. fetus* in a preputial sample, and at least one subspecies-specific PCR identified *C. fetus veneralis* or *fetus*. The use of molecular techniques to distinguish between *C. fetus* subspecies may be hampered by the very minor differences in genomic sequence between *C. fetus fetus* and *C. fetus veneralis* [26]. Interestingly, we obtained different results for each *C. fetus* subspecies. We were able to identify a relevant percentage of the *C. fetus*-positive samples correctly as *C. fetus veneralis* (85.4%) with at least one subspecies-specific PCR (this predominance of subspecies *C. fetus veneralis* has been reported before [27]), we were unable to identify any sample as *C. fetus fetus*, probably due to the low sensitivity of the W02 protocol (LOD = 100 pg of DNA). We cannot rule out the presence of *C. fetus fetus*, particularly in the samples for which identification to subspecies level was not possible. This lack of identification may be due to the poor LOD of the *C. fetus fetus*-specific PCR assay used (W02) [28]: 100 pg of *C. fetus fetus* DNA (approximately 50,000 genome copies), much poorer than for the *C. fetus veneralis*-specific PCR assay tested. The G13-ISC1 and G13-ISC2 PCR assays targeting *ISCfe1*, identified 80.50% and 78.05%, respectively, of the *C. fetus*-positive samples as *C. fetus veneralis*.

Interestingly, a large percentage of the samples considered negative (33.1%) tested positive in subspecies-specific PCRs targeting the *virB11* and/or *ISCfe1* genomic regions of *C. fetus veneralis*, despite giving no amplification in any of the six *C. fetus* species-specific PCRs. According to the criteria defined in this study, we considered these results to correspond to non-specific PCR amplifications. Sequences homologous to *ISCfe1* appear to be present in other species, and this may lead to false positives [29]. Most of these non-specific amplifications (89%) were associated with the *virB11*-specific I12 PCR assay. The *virB11* gene is not necessarily present in all *C. fetus veneralis* strains and may also be absent from *C. fetus fetus* strains [30]. Consequently, *virB11* is of limited value as a target for subspecies differentiation, in terms of both specificity and sensitivity. By contrast, no non-specific amplification was observed in the PCR assay targeting *parA*, but the sensitivity of the conventional PCR assay used was poor (LOD of 10 pg, approximately 5000 *C. fetus veneralis* genome copies). Despite the limited number of PCR protocols evaluated here (one protocol per molecular target for *C. fetus* detection and subspecies differentiation), our results indicate that further studies are required to define solid and rigorous criteria for distinguishing between *C. fetus* subspecies, potentially based on more than just positive amplification in a single subspecies-specific PCR assay. Further studies are also required, for the definition and evaluation of reliable genetic targets for the unequivocal differentiation of subspecies, to facilitate determinations of the real prevalence of the *C. fetus* subspecies in herds and their impact on fertility [31]. One promising option would be the use of whole-genome sequencing for *C. fetus* subspecies differentiation. However, this technique is laborious, time-

consuming and expensive, and is not currently widely used in diagnostic laboratories [4].

In summary, we describe here an evaluation of the performance of current molecular targets for PCR assays for *C. fetus* detection and subspecies discrimination (one molecular target/PCR). Our findings suggest that the P12 PCR assay [32] is the most robust PCR assay for *C. fetus* detection, with excellent specificity and LOD values; it also provided the best results for field samples (detection of the pathogen in 95.1% of the samples considered positive). Furthermore, an internal control can be included in this PCR assay, which is highly recommended for routine practice in diagnostic laboratories. The PCR assays had different performances for discriminating *C. fetus* subspecies. We were able to identify a large proportion (85.4%) of the *C. fetus*-positive samples correctly as *C. fetus veneralis* with at least one subspecies-specific PCR assay, but *C. fetus fetus* was not detected in any of the samples tested with the specific W02 PCR assay [28]. Remarkably, we observed amplification in *C. fetus* subspecies-specific PCR assays for some samples (33.1%) considered *C. fetus*-negative. Differences in diagnostic performance between different PCR protocols with the same molecular target are not unexpected, but our results highlight the need for solid criteria for the identification of different *C. fetus* subspecies in discrimination assays, as previously reported [4,10,31]. Further studies of the existing genetic targets and improvements of current PCR protocols, together with the design and evaluation of new protocols could help improve our understanding of the role of the two principal *C. fetus* subspecies in the epidemiology and pathogenesis of bovine infectious infertility.

CRedit authorship contribution statement

Coral Polo: Conceptualization, Data curation, Software, Methodology, Writing – original draft. **Teresa García-Seco:** Data curation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **Marta Hernández:** Data curation, Methodology, Funding acquisition, Software, Resources, Writing – original draft. **Victor Fernández:** Data curation, Methodology, Investigation, Resources, Methodology. **David Rodríguez-Lázaro:** Data curation, Software, Funding acquisition, Methodology, Writing – review & editing. **Joaquín Goyache:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing. **Lucas Domínguez:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Marta Pérez-Sancho:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Supervision, Writing – review & editing.

Declarations of competing interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This work was partly funded by Community of Madrid (Spain) (IN-D2018/BIO-9246), and an R&D agreement between the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Visavet-Universidad Complutense de Madrid and the University of Burgos for research activities on infectious infertility in extensively reared cattle.

References

- [1] Sanz A, Revilla R, Álvarez-Rodríguez J, Rodríguez-Sánchez J, Casasús I. La fertilidad de la cabaña nacional de vacas nodrizas de nuevo a examen. *Mundo ganadero* 2013; 251:38–44 [Spanish].
- [2] Yoo HS. Infectious causes of reproductive disorders in cattle. *J Reprod Dev* 2010;56: S53–60. <https://doi.org/10.1262/jrd.1056s53>.
- [3] Balzan C, Ziech RE, Gressler LT, Vargas APC. Bovine genital campylobacteriosis: main features and perspectives for diagnosis and control. *Ciência Rural* 2020;50(3): e20190272. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190272>.
- [4] World Organisation for Animal Health (OIE). Chapter 3.4.4. Bovine genital campylobacteriosis. 2018. <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health>.

- standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf. [Accessed 16 April 2021].
- [5] World Organisation for Animal Health (OIE) <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/old-classification-of-diseases-notifiable-to-the-oie-list-b/> s16 April 2021
- [6] Mshelia GD, Amin JD, Woldehiwet Z, Murray RD, Egwu GO. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim* 2010;45(5):e221–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01546.x>.
- [7] Givens MD. Review: risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* 2018;12(s1):s165–71. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>.
- [8] Holst E, Wathe B, Hovelius B, Mårdh PA. Bacterial vaginosis: microbiological and clinical findings. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6(5):536–41. <https://doi.org/10.1007/BF02014242>.
- [9] Chaban B, Garcia Guerra A, Hendrick SH, Waldner CL, Hill JE. Isolation rates of *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* from bovine preputial samples via passive filtration on nonselective medium versus selective medium, with and without transport medium. *Am J Vet Res* 2013;74(8):1066–9. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.8.1066>.
- [10] van der Graaf-van Bloois L, van Bergen MA, van der Wal FJ, de Boer AG, Duim B, Schmidt T, et al. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus*-specific real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 2013;95(1):93–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.005>.
- [11] Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J* 1997;75(11):827–31. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb15665.x>.
- [12] Iraola G, Hernández M, Calleros L, Paolicchi F, Silveira S, Velilla A, et al. Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *J Vet Sci* 2012;13(4):371–6. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.4.371>.
- [13] Schulze F, Bagon A, Müller W, Hotzel H. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44(6):2019–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.02566-05>.
- [14] World Organisation for Animal Health (OIE). Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. 2019. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/ahnm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf. [Accessed 16 April 2021].
- [15] W.S. Rasband ImageJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 1997–2018 <https://imagej.nih.gov/ij/> s16 April 2021 [
- [16] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013;41(1):e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- [17] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Author Correction: reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019;37(9):1091. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0252-6>.
- [18] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016;13(7):581–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- [19] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, James R, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(16):5261–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- [20] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D590–6 Database issue <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- [21] Castro-Escarpullí G, Aguilera G, Alonso-Aguilar N, Rivera G, Bocanegra-García V, Guo X, et al. Identification and typing methods for the study of bacterial infections: a brief review and mycobacterial as case of study. *Arch Clin Microbiol* 2015;7:1–3.
- [22] van Bergen MA, Simons G, van der Graaf-van Bloois L, van Putten JP, Rombout J, Wesley I, et al. Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J Med Microbiol* 2005;54(Pt 12):1217–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46186-0>.
- [23] Chaban B, Chu S, Hendrick S, Waldner C, Hill JE. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Can J Vet Res* 2012;76(3):166–73.
- [24] Simner PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2017;66(5):778–88. <https://doi.org/10.1093/cid/cix881>.
- [25] Poirier S, Rué O, Peguilhan R, Coeuret G, Zagorec M, Champomier-Vergès MC, et al. Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using *gyrB* amplicon sequencing: a comparative analysis with 16S rDNA V3–V4 amplicon sequencing. *PLoS One* 2018;13(9):e0204629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204629>.
- [26] Calleros L, Betancor L, Iraola G, Méndez A, Morsella C, Paolicchi F, et al. Assessing the intra-species genetic variability in the clonal pathogen *Campylobacter fetus*: CRISPRs are highly polymorphic DNA markers. *J Microbiol Methods* 2017;132:86–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.012>.
- [27] Delpiazzo R, Barcellos M, Barros S, Betancor L, Fraga M, Gil J, et al. Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence. *Vet Anim Sci* 2020;11:100163. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100163>.
- [28] Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4744–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.12.4744-4747.2002>.
- [29] Silva MF, Duarte A, Pereira G, Mateus L, Lopes-da-Costa L, Silva E. Assessment of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* molecular diagnosis using clinical samples of bulls. *BMC Vet Res* 2020;16(1):410. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02634-7>.
- [30] Silva MF, Pereira AL, Fraqueza MJ, Pereira G, Mateus L, Lopes-da-Costa L, et al. Genomic and phenotypic characterization of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* strains. *Microorganisms* 2021;9(2):340. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020340>.
- [31] van der Graaf-van Bloois L, Miller WG, Yee E, Rijnsburger M, Wagenaar JA, Duim B. Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. *J Clin Microbiol* 2014;52(12):4183–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01837-14>.
- [32] Persson S, Petersen HM, Jespersgaard C, Olsen KE. Real-time TaqMan polymerase chain reaction-based genus-identification and pyrosequencing-based species identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* directly on stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74(1):6–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.029>.
- [33] Iraola G, Pérez R, Betancor L, Marandino A, Morsella C, Méndez A, et al. A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Vet Res* 2016;12(1):286. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0913-3>.
- [34] Kamei K, Asakura M, Somroop S, Hatanaka N, Hinenoya A, Nagita A, et al. A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *J Med Microbiol* 2016; 63(Pt 5):659–66. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.071498-0>.
- [35] Chaban B, Musil KM, Himsforth CG, Hill JE. Development of cpn60-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(10):3055–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.00101-09>.

4.3.2 *Molecular detection of Tritrichomonas foetus in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting EF1-alpha-Tf1 and a comparative study of published PCR techniques.*

Autores: **Polo, C.**, García-Seco, T., Fernández, V., Hernández, M., Briones, V., Díez-Guerrier, A., Domínguez, L., & Pérez-Sancho, M.

Título: *Molecular detection of Tritrichomonas foetus in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting EF1-alpha-Tf1 and a comparative study of published PCR techniques.*

Revista: *Parasitology Research.*

Año: 2022

Volumen: 121(6)

Páginas: 1725–1733

DOI: doi.org/10.1007/s00436-022-07487-7

El parásito *T. foetus* es el agente etiológico de la tricomonosis bovina, si bien también se ha detectado en gatos y cerdos. La tricomonosis bovina es una enfermedad incluida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la OMSA y declaración obligatoria en España de acuerdo al Real Decreto 526/2014, que afecta negativamente a la fertilidad de los rebaños generando pérdidas económicas en las explotaciones afectadas. En los toros, la tricomonosis generalmente es una enfermedad venérea asintomática y persistente capaz de ser transmitida a las hembras a través de la monta natural y la inseminación artificial. Por su carácter asintomático en los machos, las infecciones por *T. foetus* fácilmente pasan desapercibidas. Debido a la controversia acerca de los tratamientos de las infecciones por este parásito, la detección de *T. foetus* para el control de toros infectados es un punto clave para su control dentro de los rebaños bovinos y la prevención de su transmisión a las hembras.

La detección de *T. foetus* en muestras clínicas se realiza generalmente por microscopía, cultivo o PCR. Sin embargo, las condiciones de muestreo y transporte pueden afectar a los porcentajes de detección de *T. foetus*, especialmente cuando se emplean las técnicas diagnósticas de microscopía

directa o cultivo. Así, la PCR es la técnica más comúnmente empleada por los laboratorios diagnósticos. La mayoría de los protocolos de PCR publicados se dirigen sobre la región genómica ARNr-ITS, la cual parece presentar una alta homología con la secuencia de otros microorganismos filogenéticamente próximos (como *Simplicimonas* spp. o *Tritrichomonas mobilensis*) pudiendo dar lugar a amplificaciones inespecíficas. De hecho, en el presente trabajo fueron observadas reacciones cruzadas con *Simplicimonas* spp. por parte de los cebadores TFIT-F/TFITS-R (Gookin et al. 2002), lo que unido a lo publicado por otros trabajos (en los que se emplean otros cebadores) (Frey et al. 2017; Dąbrowska et al. 2019a), refuerza la idea acerca de la potencial inespecificidad de los protocolos de PCR basados sobre la región genómica ARNr-ITS en algunos escenarios. En la práctica, este hecho se traduce en la aparición de posibles resultados falsos positivos, por lo que resulta interesante disponer de dianas genéticas alternativas para el desarrollo de técnicas PCR que puedan ser empleadas en casos de sospecha de falsos positivos en las técnicas habitualmente empleadas basadas en la región genómica ARNr-ITS.

La información publicada relativa a dianas alternativas de PCR para la detección de *T. foetus* es muy escasa. De acuerdo con el estudio presentado en el presente capítulo, solo se han descrito dos dianas genéticas alternativas: i) el microsatélite *TfRE*, para el que existe publicada una PCR convencional (Ho et al. 1994), y ii) el gen que codifica la beta-tubulina 1, sobre el que se ha diseñado un kit comercial (WOAH 2018) del que se carece de información publicada acerca del protocolo de PCR y secuencias de cebadores y sonda empleados.

En el presente trabajo (Artículo 4) se realizó un estudio comparativo de distintas parejas de cebadores dirigidos sobre la diana ARNr-ITS con el fin de determinar el protocolo de PCR más adecuado para la detección de *T. foetus* sobre lavados prepuciales, así como su comparación con protocolos de PCR dirigidos sobre dianas alternativas donde, como se ha comentado anteriormente, solo se pudo incluir una técnica PCR dirigida sobre el microsatélite *TfRE*. Todo esto da respuesta al OBJETIVO ESPECÍFICO 4 de la presente Tesis: *Evaluar diferentes protocolos de PCR publicados en la literatura científica para la detección de T. foetus en lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo así como diseñar un nuevo*

protocolo de PCR basado en nuevas dianas genéticas alternativas a ARNr-ITS, diana utilizada por excelencia para este objetivo, con el fin de desarrollar y establecer el protocolo de detección que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica y para la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino.

Debido a la escasez de dianas de PCR alternativas a ARNr-ITS, en el presente estudio también se diseñó una nueva PCR en tiempo real dirigida al gen *EF1-alfa-Tf1* (que codifica para el factor de elongación 1 alfa 1, implicado en el proceso de traducción por parte de los ribosomas). Esta diana ha sido previamente empleada para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros mediante la técnica LAMP obteniendo buenos resultados en referencia a su sensibilidad (0,5 trofozoitos/mL) y especificidad (al no obtenerse amplificaciones con muestras que contienen *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp., protozoos comúnmente confundidos con *T. foetus*) (Oyhenart 2018).

En total, el estudio comparativo comprendió cinco protocolos con diferentes parejas de cebadores dirigidos sobre la región ARNr-ITS (Gookin et al. 2002, 2005; McMillen y Lew 2006b; Mueller et al. 2015; Nickel et al. 2002), un protocolo dirigido sobre el microsatélite *TfRE* (Ho et al. 1994) y la PCR diseñada en el presente trabajo dirigida sobre el gen *EF1-alfa-Tf1* (Polo et al. 2022). Como técnica de referencia en el estudio se empleó una de las técnicas de PCR en tiempo real dirigida sobre la región ARNr-ITS incluida en el presente trabajo. Esta es la técnica denominada M06 (McMillen y Lew 2006), indicada como protocolo de PCR adecuado para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales por la OMSA (WOAH 2018) y empleada como técnica de referencia previamente (Meggiolaro et al. 2019). En primer lugar, se analizaron la especificidad y sensibilidad analítica de cada protocolo de PCR incluido en el estudio. Posteriormente, se determinó el rendimiento diagnóstico de cada protocolo sobre 466 muestras prepuciales de toros reproductores criados en régimen extensivo, donde un total de 168 muestras se correspondían con casos positivos a *T. foetus* y 298 a casos negativos. Se calculó la concordancia mediante el cálculo del Coeficiente kappa de Cohen (*software* SPSS, IBM SPSS Statistics 22.0) donde los valores 0,0

Resultados

- 0,2 indicaron una concordancia insignificante, 0,2 – 0,4 baja, 0,4 – 0,6 una concordancia moderada, 0,6 – 0,8 buena concordancia y 0,8 – 1 muy buena concordancia. Así mismo fueron calculados los valores predictivo positivo (VPP) y predictivo negativo (VPN).

En cuanto a los protocolos dirigidos a la región genómica ARNr-ITS, los resultados del presente estudio mostraron una muy buena concordancia para el protocolo M15 (Mueller et al. 2015) (Coeficiente kappa de Cohen = 0,958), y el protocolo G05 (Gookin et al. 2005) (Coeficiente kappa de Cohen = 0,948). Por el contrario, la concordancia con la técnica de referencia fue muy inferior para el protocolo G02 (Gookin et al. 2002) (Coeficiente kappa de Cohen = 0,587) con el que se observaron un 18,6% de amplificaciones inespecíficas y que presentó un VPP de 0,6, lo que sugiere la presencia de falsos positivos presumiblemente debido a reacciones cruzadas con *Simplicimonas* spp. Por otra parte, el protocolo N02 (Nickel et al. 2002) también presentó una concordancia limitada con el protocolo de referencia (Coeficiente kappa de Cohen = 0,700) mostrando un VPN de 0,87 (lo que sugiere la presencia de falsos negativos). La ausencia de estudios diagnósticos que utilicen los sets de cebadores de los protocolos G02 y N02 dificultó una adecuada discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se sugiere que G02 y N02 no son protocolos adecuados para la detección de *T. foetus* en muestras prepucciales de toros.

Por último, la técnica PCR diseñada sobre el gen *EF1-alfa-Tf1* fue capaz de detectar 5,75 copias del genoma de *T. foetus* sin mostrar amplificaciones inespecíficas, donde su rendimiento diagnóstico mostró un alto grado de concordancia con el ensayo de referencia (Coeficiente kappa de Cohen = 0,967) al igual que la PCR previamente publicada sobre el microsatélite *TfRE* (Coeficiente kappa de Cohen = 0,986). Esta última técnica fue capaz de detectar 0,575 copias del genoma de *T. foetus* y no presentó reacciones inespecíficas en el presente trabajo, si bien este último punto resulta ser controvertido al haberse identificado amplificaciones inespecíficas previamente (Felleisen et al. 1998). Una ventaja del protocolo de PCR en tiempo real diseñado en el presente trabajo con respecto a la técnica PCR convencional dirigida sobre el microsatélite *TfRE*, es el uso de un control interno de PCR para la detección de posibles inhibiciones de la

propia técnica PCR, así como la rapidez en la obtención de resultados al tratarse de un protocolo que hace uso de una sonda específica que da los resultados de la PCR en tiempo real. Estos dos factores son de gran relevancia a la hora de aplicar esta tecnología en la detección de *C. fetus* en muestras clínicas como parte del proceso diagnóstico de enfermedades reproductivas en ganado bovino.

Los resultados de este trabajo confirman la HIPÓTESIS 5 en lo referente a *T. foetus* (*Las herramientas moleculares actualmente implementadas en la detección de C. fetus y T. foetus presentan un margen de mejora que repercutirá en las medidas de control y manejo de estas patologías infecciosas en el toro*) y la HIPÓTESIS 7 [*El empleo de protocolos de PCR para la detección de T. foetus en muestras prepuciales de toros reproductores (técnica comunmente empleada por laboratorios diagnósticos), presenta limitaciones en cuanto a su especificidad debido a que se basa sobre una región homóloga (ARNr-ITS) en otras especies de Trichomonas potencialmente presentes en muestras clínicas, lo que se podría traducir en la potencial aparición de falsos positivos. Por ello, el diseño de protocolos de PCR sobre dianas genéticas alternativas como herramienta de confirmación de infecciones por T. foetus en lavados prepuciales de toro, supondría una mejora del rendimiento diagnóstico mediante PCR*] de la presente memoria de tesis doctoral.



Molecular detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting *EF1-alpha-Tf1* and a comparative study of published PCR techniques

Coral Polo^{1,2} · Teresa García-Seco¹ · Víctor Fernández³ · Marta Hernández⁴ · Víctor Briones^{1,5} · Alberto Díez-Guerrier^{2,5} · Lucas Domínguez^{1,5} · Marta Pérez-Sancho^{1,5}

Received: 11 October 2021 / Accepted: 9 March 2022 / Published online: 29 March 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

The parasite *T. foetus* causes trichomonosis in cattle but is generally asymptomatic in males. Thus, many bulls carrying the disease go unnoticed, making the detection of *T. foetus* in bulls an important aspect for its control. Due to drawbacks posed by its cultivation, PCR is a preferred option for diagnostic laboratories. Most published PCR protocols target the genomic region comprising the *18S*, *5.8S*, and *28S* rRNA genes and internal transcribed spacers 1 and 2 (rRNA-ITS region), homologous to that of other *Tritrichomonas* species. There is minimal information on alternative genetic targets and no comparative studies have been published. We compared a protocol based on the microsatellite *TfRE* (called H94) and five protocols based on the rRNA-ITS region (called M06, M15, G02, G05, and N02). We also designed and evaluated a novel PCR-based assay on the *EF1-alpha-Tf1* gene (called V21). The analytical sensitivity and specificity assays for the PCR protocols were performed according to the World Organisation for Animal Health (OIE) directives and the comparative study was performed with a widely used PCR (M06) on clinical samples from 466 breeding bulls. V21 showed a high degree of agreement with our reference M06 (kappa=0.967), as well as M15 (kappa=0.958), G05 (kappa=0.948), and H94 (kappa=0.986). Protocols H94 and V21 appear to be good approaches for confirming clinical cases in preputial bull samples when genomic regions alternative to rRNA-ITS are required. By contrast, N02 gave false negatives and G02 false positives.

Keywords *Tritrichomonas foetus* · Real-time PCR · *EF1-alpha-Tf1* · Bull

Section Editor: Yaoyu Feng

✉ Marta Pérez-Sancho
maperezs@visavet.ucm.es

¹ VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

² MAEVA SERVET S.L., Calle de la Fragua 3, 28749 Madrid, Spain

³ Zootecnia Análisis Clínicos Veterinarios S.L.P., Calle Tierra de Campos 24-26, 37008 Salamanca, Spain

⁴ Molecular Biology and Microbiology Laboratory, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla Y León, Av. Burgos, 47071 Valladolid, Spain

⁵ Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Introduction

The protozoan *Tritrichomonas foetus* is a flagellated pathogen that causes trichomonosis in cattle, cats, and pigs (Dąbrowska et al. 2019b). In bulls, trichomonosis is an asymptomatic and persistent venereal disease, whereas in cows, it causes cervicitis, endometritis, foetal death during the first trimester of gestation, a delayed return to estrus, and infertility (Michi et al. 2016). In addition, *T. foetus* is transmitted through both natural breeding and artificial insemination (Givens 2018). In this scenario, the control of *T. foetus* in males is crucial for its control within cattle herds. Due to its relevance in production, bovine trichomonosis is a notifiable disease in certain countries.

The detection of *T. foetus* is generally carried out by microscopy, culture, and molecular techniques, such as PCR (OIE 2018). However, sampling and transport conditions can affect the detection rate of *T. foetus*, primarily via direct microscopy and culture (Yao 2013). In recent years,

molecular detection has become one of the most widely used options in diagnostic laboratories (OIE 2018). The OIE cited real-time PCR, mentioning the work of McMillen and Lew (McMillen and Lew 2006) (here called the M06 protocol) as a suitable method for the detection of *T. foetus* in clinical samples (OIE 2018). This widely used PCR assay (Effinger et al. 2014; Dąbrowska et al. 2019a; Meggiolaro et al. 2019) is based on the genomic region comprising the 18S, 5.8S, and 28S rRNA genes and internal transcribed spacers 1 and 2 (rRNA-ITS region), a multicopy target (Chakrabarti et al. 1992) used for the design of various published PCR assays (Felleisen et al. 1998; Gookin et al. 2002, 2005; Nickel et al. 2002; McMillen and Lew 2006; Mueller et al. 2015; Ginter Summarell et al. 2018; Dąbrowska et al. 2019a), most of them used for the diagnosis of clinical samples (Köster et al. 2015; Casteriano et al. 2016; Li et al. 2016; Dąbrowska et al. 2020). Despite the value of this diagnostic approach, to our knowledge, no systematic comparative study of all the PCR assays for the detection of *T. foetus* has been published. In addition, similarities with rRNA-ITS sequences present in other *Trichostrongylus* species, such as *Trichostrongylus mobilensis*, have been described, resulting in potential cross-reactions (Dąbrowska et al. 2019a). Alternative genetic regions have been studied (Reinmann et al. 2012; Ślipeta et al. 2012; Sun et al. 2012) for different purposes. Nevertheless, two alternative PCR targets for the diagnosis of *T. foetus* directly in clinical samples, which may overcome these potential drawbacks, have been described: (i) *TjRE* microsatellite-PCR (Ho et al. 1994), with minimal information (only one reference sequence in GenBank (AY435432.1) that comes from an unpublished study), and (ii) a commercial kit that targets the *beta-tubulin 1* gene that lacks published data (OIE 2018). In this context, it would be useful to explore new molecular targets for the detection of *T. foetus* as a confirmatory test, for example, in the event of doubtful results. Oyhenart et al. recently published a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the *EF1-alpha-Tf1* gene for the detection of *T. foetus* on bull preputial wash samples (Oyhenart 2018). This LAMP assay showed high analytical sensitivity (0.5 trophozoites/mL) and specificity, making this genetic target a valuable alternative for the confirmation of *T. foetus* in clinical samples (Oyhenart 2018). However, no PCR assay for *T. foetus* detection directly in clinical samples based on this target has yet been published.

Here, we aimed to perform a comparative study of all molecular target-PCR techniques currently published for the detection of *T. foetus* to assess their diagnostic performance on a cohort of breeding bulls raised in an extensive regimen. In addition, we propose a new real-time PCR assay targeting the *EF1-alpha-Tf1* gene, developed as an

alternative method for the detection of *T. foetus* in bull preputial wash samples.

Materials and methods

Systematic review and selection of PCR protocols

We conducted a systematic bibliographic search in PubMed, search string: (Trichostrongylus foetus) AND (PCR); Web of Science, search string: TS = (Trichostrongylus AND foetus AND PCR); and Scopus, search string: TITLE-ABS-KEY (“Trichostrongylus foetus”) AND (“PCR”). Among the papers found ($n = 614$), duplicates were removed using EndNote X8 software and the abstracts were manually screened. All publications that mentioned the use of a PCR technique for *T. foetus* detection (41 publications) were further evaluated according to the following inclusion criteria: (i) abstracts must contain information about the *T. foetus* genetic target, (ii) primers and probe sequences must be published, (iii) PCR and thermal cycler conditions must be provided, and (iv) due to the technological limitations of many diagnostic laboratories, the PCR design should be based on DNA detection (not RNA due its fragility in field samples) and, just in case of real-time PCR protocols, use the most common fluorescent systems (SYBRgreen or Taqman probes) for *T. foetus* identification. When the same primer set was used in more than one study, only one was included in the present study based on the following prioritization criteria: (i) those that were assessed on clinical samples and/or (ii) those adapted to real-time protocols, in particular, those using specific probes. Finally, six published protocols (five targeting the rRNA-ITS genomic region and one *TjRE*) were included in the study (Table 1). The locations of the selected primers within the rRNA-ITS region are shown in Fig. 1.

All PCR protocols were carried out under the conditions of the original paper with minor changes for their adaptation to our laboratory (optimal conditions of the Qiagen PCR kits used: QuantiFast Pathogen PCR, QuantiFast SYBR Green PCR, and Qiagen Multiplex PCR kits). For real-time PCR, a probe specific for an internal PCR control was used (provided by the QuantiFast Pathogen PCR kit).

Design and optimization of a novel real-time PCR based on the EF1-alpha-Tf1 gene

The design of an in-house PCR based on the *EF1-alpha-Tf1* gene (called V21, Table 1) was carried out using Oligo (Oligo 7 Primer Analysis Software) and HM217356.1 from the GeneBank database as the reference sequence. The specificity of the primers and probe were verified in silico by blastn using BLAST online software from the NCBI website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The primers were

Table 1 PCR assays for *T. foetus* detection included in the present study

Target ^a	PCR type	Real time (probe)	Reference (code ^b)	Primers and probes (5' to 3')	PCR conditions ^c								
					Fw (μM)	Rv (μM)	Pr (μM)	ID. (C°/min)	D. (C°/s)	A. (C°/s)	E. (C°/s)	N°	FE. (C°/min)
ITS	Real time (probe)		McMillen and Lewis 2006 (M06)	TFP2: CGCGCTGGA	0.90	0.90	0.08	95/5 ^d	95/20	60/45	40	40	57
				TTAGCTTCTTT TFR2: GGCGCGCAA TGTGCAT									
ITS	Real time (SYBR)		Mueller et al. 2015 (M15)	TRICH2: 6-FAM- ACAAAG TTGGAT CTTTG-MGB-BHQ	0.20	0.20		95/5	95/30	63/20	40	40	348
				TFR3: CGGGTCTTC CTAAT GAGACA GAAAC									
EF	Real time (probe)		Current study (V21)	TF4: CCTGCCGTT GGATCAGTTTCG TTAA	0.50	0.50	0.40	95/5	95/20	61/35	45	45	76
				TFE1A1: AGTCCG CCGC AATCAA RfE1A1: CTCCTC AACTTCGGCTGT GA									
ITS	Conventional (nested)*		Gookin et al. 2002 (G02)	PhE1A1: 6-FAM- ATCATCAAGTAC GGCTCAGT-MGB- NFQ	1.25	1.25		95/15	95/30	57/30	50	72/10	347
				TFR3: CGGGTCTTC CTAATGAGACA GAAAC									
ITS	Conventional		Gookin et al. 2005 (G05)	TFR4: CCTGCCGTT GGATCAGTTTCG TTAA	2.50	2.50							208
				TFITS-F: CTGCCG TTGGATCAGTTT CG									
ITS	Conventional		Gookin et al. 2005 (G05)	TFITS-R: GCAAATG TGCATTCAAAGA TCG	0.30	0.30		95/15	95/60	60.1/60	35	72/10	642
				499F: GCTCGTAGT CAGAACTGC 1140R: CCCAATTAG AACTCT AICTC									

Table 1 (continued)

Target ^a	PCR type	Reference (code ^b)	Primers and probes (5' to 3')	PCR conditions ^c									
				Fw (μ M)	Rv (μ M)	Pr (μ M)	ID. (C°/min)	D. (C°/s)	A. (C°/s)	E. (C°/s)	N°	FE. (C°/min)	AS. (bp)
ITS	Conventional	Nickel et al. 2002 (N02)	TF211A: CCTGCC GTGGATCAGTT TCGTTA	0.20	0.20	0.20	95/15	94/60	60/60	72/60	35	72/10	211
TRE	Conventional	Ho et al. 1994 (H94)	TF211B: GCGCAA TGIGCAITCAAA GATTCG TF1: CATTATCCC AAAATGGTATAAC TF2: GTCAATTAAG TACATAAATTC	0.38	0.365	0.38	95/15	94/60	45/60	72/120	41	72/10	162

^aGenomic region that comprises the 18S, 5.8S, and 28S rRNA genes and the internal transcribed spacer 1 and 2 of *T. foetus* (ITS), *EF1-alpha-Tf1* gene (EF), and microsatellite *TRE* sequence (TRE)

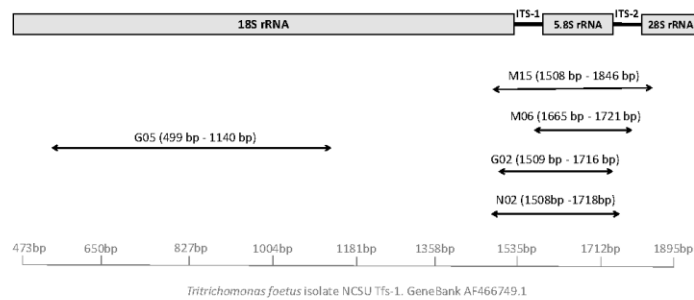
^bInternal code that references the protocols used in the current study

^cPCR were performed in a 25 μ L of final reaction volume for M06, V21, G02, G05, N02, and H94 protocols and 20 μ L for M15 protocol: Fw (μ M), final concentration of forward primer; Rv (μ M), final concentration of reverse primer; Pr (μ M), final concentration of probe; ID. (C°/min), initial denaturation; D. (C°/s), denaturation step per cycle; A. (C°/s), annealing step per cycle; E. (C°/s), elongation step per cycle; N°, number of cycles; FE. (C°/min), final elongation step; AS. (bp), amplicon size

^dA previous step at 50 °C during 2 min was added

^eIt is a one-step nested PCR

Fig. 1 Primer position of the PCR protocols used that target the 18S/TTS-1/5.8S/TTS-2 genomic region of *T. foetus*. The reference and amplicon sequence length is indicated in base pair (bp). This figure is based on Fig. 1 from Felleisen et al. (1998) publication



synthesized by Eurofins Genomics (Eurofins Genomics, GmbH) and the probe by ThermoFisher (Applied Biosystems, UK). The primer/probe sequences and PCR conditions are shown in Table 1. The QuantiFast Pathogen PCR kit (Qiagen, Germany) and an internal PCR control provided in the kit were used to verify the lack of PCR inhibition.

Analytical sensitivity and specificity tests

Conventional PCR protocols were performed using C1000 and T100 thermocyclers (Bio-Rad, USA) and the PCR product detected following gel electrophoresis. For all conventional PCR assays, electrophoresis was performed in 2% agarose gels (Biotools MB agarose) at 70 mV and 400 mA for 55 min. Real-time PCR assays were performed in a CFX96 thermocycler (Bio-Rad, USA) using specific conditions (Table 1).

The validation data from the original studies (and subsequent studies), which assessed the specificity of each PCR assay, were taken into account for the analytical specificity test (Gookin et al. 2002, 2005; Nickel et al. 2002; McMullen and Lew 2006; Effinger et al. 2014; Mueller et al. 2015; Ginter Summarell et al. 2018; Dąbrowska et al. 2019a; Meggiolaro et al. 2019). In addition, information about the specificity of the genetic target on which the novel PCR protocol was based was considered (Oyhenart 2018). A panel of pathogens (field or reference strains) associated with bovine infertility or potentially present in preputial samples was also included (one strain/species). The field isolates were part of the VISAVET-UCM collection (Universidad Complutense de Madrid, Spain) and type strains came from the ATCC collection: *Aeromonas butzleri*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Trichomonas foetus* (ATCC-30232 TM reference) *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lariena*, *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *fetus*

(ATCC-27374 TM reference), and *C. fetus* subsp. *testudinum* (ATCC-BAA-2539 TM reference).

The ATCC-30232 strain was used as a control for the analytical sensitivity test of each evaluated PCR. The analysis was performed according to the OIE instructions (OIE 2019). The limit of detection (LOD) and corresponding confidence interval (CI) was calculated for each selected protocol using a battery of serial tenfold dilutions (triplicate test for real-time PCR and duplicate test for conventional PCR) starting from 1 ng of DNA/reaction (corresponding to approximately 5750 copies of the *T. foetus* genome (Benchimol et al. 2017)). The DNA concentration was adjusted using a High Sensitivity DNA Quantitation Kit (Invitrogen, USA) and a Qubit 4 Fluorometer device (Invitrogen, USA). For real-time protocols, the cut-off was established based on the arithmetic mean value of the C_T of the 20 replicates from the LOD test in which the highest dilution of the LOD had a $CI \geq 95\%$ (OIE 2019). For conventional protocols, the LOD and CI were established according to the visual detection of bands in the agarose gel.

Preputial washes and DNA extraction

A selection of 466 samples recovered for routine diagnosis from breeding bulls raised in extensive regimens was included. Samples were selected based on previous molecular results using an in-house PCR designed by Genetics PCR Solutions (GPS, Spain). The samples consisted of 15 mL of preputial washes in PBS, which were centrifuged at $1512 \times g$ for 10 min and stored at -80°C until analysis. Nucleic-acid extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), with slight modifications: a cellular lysis buffer (20 mM Tris-Cl (pH 8), 2 mM sodium EDTA, 1.2% Triton X-100, and 20 mg/mL lysozyme in a 360 μL final volume) was first added to the sample pellets and the mixture incubated at 37°C for 1 h. The DNA extraction was subsequently performed according to the manufacturer's instructions.

Clinical diagnosis classification of the results

In the current study, we used the M06 PCR protocol (McMillen and Lew 2006) as the reference assay, as previously reported (Meggiolaro et al. 2019). We considered non-specific results to be those for which *T. foetus*-positive results were obtained with only one PCR protocol (and negative with M06). The internal PCR control included in this protocol allowed us to verify the lack of inhibition.

The concordance between the results of each protocol and those of the M06 protocol was estimated with Cohen's kappa coefficient using SPSS software (IBM SPSS Statistics 22.0) according to the following interpretation: 0.0–0.2: insignificant, 0.2–0.4: low, 0.4–0.6: moderate, 0.6–0.8: good, and 0.8–1.0: very good. The percentage of agreement of positive and negative samples of each protocol with the reference was calculated, along with the positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV).

Results

In vitro analysis: analytical sensitivity and specificity tests

The analytical specificity test revealed no amplification with any control isolated strain for any PCR protocol (including the in-house V21 protocol), being only positive for the *T. foetus* isolate (ATCC-30232). The LOD ($CI \geq 95\%$) of the M06, M15, G02, G05, and H94 PCR protocols was 1.10^{-4} ng of DNA/reaction (approximately 0.575 *T. foetus*

genome copies), whereas the N02 protocol had a LOD ($CI \geq 95\%$) of 1.10^{-3} ng of DNA/reaction (approximately 5.75 *T. foetus* genome copies). Further results related to the LOD of each PCR protocol are included in Table 2. After the analytical sensitivity assay, we established a cut-off for real-time protocols. The cut-off for the M06 protocol (here the reference assay) was a $C_T \leq 34$ and that for the M15 protocol a $C_T \leq 32$.

Comparative study on field samples

A summary of the results on the field samples is shown in Table 2. The panel of included field samples was composed of 168 positive samples and 298 negative samples. The percentage of agreement among the PCR protocols targeting the rRNA-ITS region was variable. The results of M15 and G05 showed high agreement with those of M06 (95.8% and 94.6%, respectively, for positive samples and 99.3% for negative samples). The concordance of the results obtained with M15 with those of M06 was very good according to Cohen's kappa value (0.958), and the PPV and NPV were 0.98 (Table 2). Similarly, Cohen's kappa value for G05 was 0.948, with a PPV of 1 and a NPV of 0.97 (Table 2). Protocols G02 and N02 showed poorer results. The Cohen's kappa value for the G02 protocol was 0.587 (moderate concordance), with 70.1% agreement for negative samples and a PPV of 0.64, whereas Cohen's kappa value for the N02 protocol was 0.700 (good concordance), with 74.4% agreement for positive samples and a NPV of 0.87 (Table 2). The percentage of non-specific results for the rRNA-ITS—PCR protocols also varied; for the M15 protocol, only 2 of 466 total

Table 2 Agreement results of the selected PCR protocols with respect to the M06 protocol results and percentage of non-specificities

PCR	Concordance of positives	Concordance of negatives	PPV	NPV	Non-specific results	LOD (ng/ μ L)	Cohen's kappa	Genetic target	Reference
M06	Ref.*	Ref.*	Ref.*	Ref.*	0/466 (0%)	4.10^{-6}	Ref.*	rRNA-ITS	McMillen and Lew 2006
M15	161/168 (95.8%)	296/298 (99.3%)	0.98	0.98	2/466 (0.4%)	5.10^{-6}	0.958	rRNA-ITS	Mueller et al. 2015
G02	160/168 (95.2%)	209/298 (70.1%)	0.64	0.96	87/466 (18.6%)	4.10^{-6}	0.587	rRNA-ITS	Gookin et al. 2002
G05	159/168 (94.6%)	296/298 (99.3%)	1	0.97	0/466 (0%)	4.10^{-6}	0.948	rRNA-ITS	Gookin et al. 2005
N02	125/168 (74.4%)	295/298 (98.9%)	0.99	0.87	1/466 (0.2%)	4.10^{-5}	0.700	rRNA-ITS	Nickel et al. 2002
H94	166/168 (98.8%)	296/298 (99.3%)	1	0.99	0/466 (0%)	4.10^{-6}	0.986	TjRE	Ho et al. 1994
V21	161/168 (95.8%)	298/298 (100%)	1	0.98	0/466 (0%)	4.10^{-5}	0.967	<i>EF1-alpha-Tj1</i>	Current study

See Table 1 to know all PCR references. From left to right in the header row is indicated: The PCR protocol (PCR); the agreement of positives samples with M06 (Concordance of positives) and the concordance of negatives where 168 are positive samples and 298 negative samples for M06 protocol; the positive predictive value (PPV) and the negative predictive value (NPV); the non-specific results (are those samples negative to the reference protocol and positive only by one of the others) where 466 are the total samples; the limit of detection (LOD) with a confidence interval $\geq 95\%$; the Cohen's kappa value; the genetic target where it is indicate the genomic region that comprises the 18S, 5.8S, and 28S rRNA genes and the internal transcribed spacer 1 and 2 (rRNA-ITS), TjRE microsatellite, and *EF1-alpha-Tj1* gene; and the reference of the original work

*The method used as reference (Ref.) was the M06 protocol

samples (0.4%) were falsely positive, 87 of 466 (18.6%) for the G02 protocol, and 1 of 466 (0.2%) for the N02 protocol.

The H94 protocol based on the microsatellite *TjRE* of *T. foetus* showed a Cohen's kappa coefficient of 0.986 (very good concordance), with high agreement with the M06 protocol for positive and negative samples: PPV = 1 and NPV = 0.99 (Table 2).

In-house PCR protocol based on the EF1- α -Tf1 gene

The analytical sensitivity test showed a LOD (CI \geq 95%) of 1.10^{-3} ng of DNA/reaction (approximately 5.75 *T. foetus* genome copies) and the cut-off was established at a $C_T \leq 40$. In terms of the performance of V21 on field samples, this PCR assay showed a Cohen's kappa value of 0.967 (very good concordance), with 95.8% concordance for positive samples and 100% for negative samples with our reference PCR (M06 protocol) and a PPV of 1 and NPV of 0.98 (Table 2). These results are in accordance with the analytical specificity results of the V21 protocol, which showed no amplification with the isolates included in the specificity test (except *T. foetus* isolates, Table 2).

Discussion

T. foetus is the etiological agent of trichomonosis, which is generally an asymptomatic and persistent venereal disease in bulls, whereas it can cause a number of reproductive disorders in cows (Michi et al. 2016). In addition, this parasite can be transmitted through natural breeding and artificial insemination (Givens 2018). In this scenario, the detection of *T. foetus* in males is an essential step for the control of trichomonosis. The OIE thus established real-time PCR as a recommended technique for the detection of *T. foetus* in clinical samples (OIE 2018). The OIE guidelines of trichomonosis diagnosis include the PCR protocol of McMillen and Lew (McMillen and Lew 2006) as a suitable assay for *T. foetus* identification in clinical samples. Here, we used this protocol (called M06) as the reference method (as previously considered by Meggiolaro et al. 2019) to compare five different PCR protocols currently available for *T. foetus* detection (Table 1). This is the first report of a systematic comparison of PCR techniques available for *T. foetus* detection directly on bull preputial samples. Five protocols based on rRNA-ITS were selected (Table 1): (1) M06 (McMillen and Lew 2006) (the reference assay in our study), (2) M15 (Mueller et al. 2015), (3) G02 (Gookin et al. 2002), (4) G05 (Gookin et al. 2005), and (5) N02 (Nickel et al. 2002). This genomic region is a multicopy target (Chakrabarti et al. 1992) that appears to be highly similar in other *Tritrichomonas* species, such as *Tritrichomonas mobilensis*, resulting in potential

cross-reactions, as previously reported for primers TFR3/TFR4 (M15 protocol) (Dąbrowska et al. 2019a).

Although *T. mobilensis* has only been described in the intestine of *Saimiri sciureus* and *Saimiri boliviensis* squirrel monkeys (Scimeca et al. 1989) to date, potential target homology suggests a potential cross-reaction with other *Tritrichomonas* spp., which could pose a problem in the analysis of field samples. According to our results, G02 (TFIT-F/TFIT-R set primers) showed cross-reactions with *Simplicimonas* spp. by in silico analysis of sequences from PCR amplicons sequencing (data not shown). In a previous work by Frey et al. (2017), similar cross-reactions were noted in vaginal swabs of cows and heifers with other set of primers and probes. This data reinforces the idea that PCR protocols based on rRNA-ITS region may provide false positives (Frey et al. 2017; Dąbrowska et al. 2019a). Thus, PCR techniques based on alternative targets could become a useful approach to detect *T. foetus* as a confirmatory test.

In terms of alternative genetic targets for the detection of *T. foetus* directly on clinical samples, one PCR protocol based on the microsatellite *TjRE* is available: H94 (Ho et al. 1994). This protocol was designed based on a barely studied repetitive region of the *T. foetus* genome, with a single available reference sequence in GenBank (AY435432.1). Finally, according to the OIE (2018), a commercial PCR kit targeting the *beta-tubulin 1* gene is also available. However, the information to perform the assay is not published, which is why it was not included in our comparative study. As a consequence, the number of alternatives to rRNA-ITS-based PCR protocols is very limited. Recently, a LAMP technique targeting the *EF1- α -Tf1* gene showed very good results for *T. foetus* identification in bull preputial samples, being able to detect 0.5 trophozoites/mL (Oyhenart 2018). However, no PCR protocol based on this target has been published. We therefore propose a novel real-time PCR assay (here called the V21 protocol) targeting the *EF1- α -Tf1* gene as an alternative target for the confirmation of the presence of *T. foetus* in preputial samples (Table 1).

In terms of the protocols targeting the rRNA-ITS genomic region, our results from the comparative study showed very good concordance for the M15 protocol, for which Cohen's kappa value was 0.958, and the G05 protocol, for which Cohen's kappa value was 0.948 (Table 2). The M15 protocol is a real-time adaptation (Mueller et al. 2015) of the conventional PCR protocol from the study of Felleisen et al. (Felleisen et al. 1998). Thus, their primers TFR3/TFR4 (Table 1) have been evaluated and used by several studies for *T. foetus* identification (Casteriano et al. 2016; Dąbrowska et al. 2019a), with satisfactory results. On the contrary, it is difficult to find publications that have used the primer pair 499F/1140R (protocol G05, Table 1) (Tolbert et al. 2012). However, we found the diagnostic performance of the G05 protocol to be very similar to that of the M15 and M06 protocols. Thus, the G05 protocol

appears to be relatively good for the detection of *T. foetus* in bull preputial wash samples.

On the other hand, Cohen's kappa value for the G02 protocol was 0.587 (PPV = 0.6), with 18.6% non-specific results. These results suggest the presence of a high number of false positives, whereas for the N02 protocol, Cohen's kappa value was 0.700, with a NPV of 0.87, suggesting the presence of false negatives (Table 2). Our results differ from those of the original publications of both protocols (Gookin et al. 2002; Nickel et al. 2002). The absence of additional diagnostic studies using these protocols hampers a proper discussion of this point. Nevertheless, according our results, G02 PCR is a limited technique for the identification of *T. foetus* directly on clinical samples (PPV = 0.64, Table 2). Further studies will be needed to confirm the diagnostic performance of the G02 and N02 protocols.

The H94 protocol, based on the microsatellite *TyRE*, showed a Cohen's kappa coefficient of 0.986, with no observed non-specific amplification (Table 2), contradicting the results cited in the study of Felleisen et al. (Felleisen et al. 1998). Nevertheless, our results are similar to those of the study of Ho et al. (Ho et al. 1994) and Riley et al. (Riley et al. 1995), in which the use of the primer pair TF1/TF2 appeared to provide high performance for the detection of *T. foetus*. Our study shows that the diagnostic performance of the H94 protocol on field samples appears to be good, with a PPV of 1 and NPV of 0.99.

Finally, Cohen's kappa coefficient for the in-house V21 protocol (based on the *EF1-alpha-Tf1* gene) was 0.967 (with a PPV of 1 and NPV of 0.98), and there was no non-specific amplification, as for the H94 protocol (Table 2). Thus, V21 protocol seems to be highly specific compared with other PCR designs based on rRNA-ITS genomic region (Table 2) (Frey et al. 2017; Dąbrowska et al. 2019a). Nevertheless, the LOD of the V21 protocol should be considered, as it was an order of magnitude lower than that of M06 (the reference protocol), detecting approximately 5.75 *T. foetus* genome copies per reaction. Based on our results, the use of the H94 and V21 protocols appears to be a good approach for the confirmation of clinical cases when alternative genomic regions to rRNA-ITS are required. An important aspect of the V21 protocol relative to the H94 protocol, for *T. foetus* detection on clinical samples, is the use of an internal PCR control to detect inhibition, the absence of non-specificities, and the rapid obtention of results, as it is a real-time PCR assay with a specific probe.

Conclusions

Published PCR protocols based on the rRNA-ITS region showed a high degree of agreement (M15 and G05) with the reference protocol (M06) to identify *T. foetus* in preputial

bull samples. However, the rRNA-ITS genomic region appears to be highly similar in phylogenetically close species, which may translate into potential cross-reactions. Thus, protocols based on alternative molecular targets may be useful. The H94 protocol based on the microsatellite *TyRE* (AY435432.1 GeneBank) showed excellent concordance with the reference protocol (Cohen's kappa coefficient of 0.986), with no non-specific amplification detected. Our study shows the diagnostic performance of H94 in preputial bull samples to be good, capable of detecting approximately 0.575 copies of *T. foetus* genome per PCR reaction.

Our in-house V21 protocol based on the *EF1-alpha-Tf1* gene also showed very high concordance with the reference protocol (Cohen's kappa coefficient of 0.967), with no non-specific amplification, to detect 5.75 copies of *T. foetus* genome per PCR reaction. Both the H94 and V21 protocols show promise for confirming clinical cases of *T. foetus* when another molecular target is required. An advantage of the V21 over the H94 protocol, for *T. foetus* detection on clinical samples, is the use of an internal PCR control to detect inhibition and the speed to obtain results as it is a specific probe real-time PCR.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was co-financed by the Community of Madrid (Spain) (IND2018/BIO-9246). In addition, this work was co-funded by a R&D Agreement between the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, VISAVET-Universidad Complutense de Madrid, and Universidad de Burgos to carry out research activities on infectious infertility in intensively raised cattle.

Declarations

Ethics approval The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. No ethical approval was required due to sample collection from animals has been gathered.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Benchimol M, de Almeida LGP, Vasconcelos AT et al (2017) Draft genome sequence of *Trichostrongylus axei* strain K. *Genome Announc* 5:16–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00195-17>
- Casteriano A, Molini U, Kandjumbwa K et al (2016) Novel genotype of *Trichostrongylus axei* from cattle in Southern Africa. *Parasitology* 143:1954–1959. <https://doi.org/10.1017/S003118201600158X>
- Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR, Yowell CA (1992) Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Trichostrongylus axei*. *Mol Biochem Parasitol* 52:75–83. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90037-K](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90037-K)
- Dąbrowska J, Karamon J, Kochanowski M et al (2019a) Development and comparative evaluation of different LAMP and PCR assays for coprological diagnosis of feline trichostrongylosis. *Vet Parasitol* 273:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.07.014>
- Dąbrowska J, Karamon J, Kochanowski M et al (2019b) *Trichostrongylus axei* as a causative agent of trichostrongylosis in different animal hosts. *J Vet Res* 63:533–541. <https://doi.org/10.2478/jvvetres-2019-0072>
- Dąbrowska J, Karamon J, Kochanowski M et al (2020) *Trichostrongylus axei*: a study of prevalence in animal hosts in Poland. *Pathogens* 9:1–10. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030203>
- Effinger L, Peddireddi L, Simunich M et al (2014) Pooling of cultured samples and comparison of multistate laboratory workflows with the MagMAX sample preparation system and VetMAX quantitative polymerase chain reaction reagents for detection of *Trichostrongylus axei*-colonized bulls. *J Vet Diagnostic Investig* 26:72–87. <https://doi.org/10.1177/1040638713510003>
- Felleisen RSJ, Lambelet N, Bachmann P et al (1998) Detection of *Trichostrongylus axei* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Clin Microbiol* 36:513–519. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.513-519.1998>
- Frey CF, Müller N, Stüber N et al (2017) Simplicimonas-like DNA in vaginal swabs of cows and heifers cross-reacting in the real-time PCR for *T. foetus*. *Vet Parasitol* 237:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.024>
- Ginter Summrell CC, Hairgrove TB, Schroeder ME et al (2018) Improvements in *Trichostrongylus axei* molecular testing. *J Vet Diagnostic Investig* 30:603–608. <https://doi.org/10.1177/1040638718767943>
- Givens MD (2018) Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* 12:s165–s171. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>
- Gookin JL, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB, Levy MG (2002) Single-tube nested PCR for detection of *Trichostrongylus axei* in feline feces. *J Clin Microbiol* 40:4126–4130. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4126-4130.2002>
- Gookin JL, Birkenheuer AJ, St. John V et al (2005) Molecular characterization of trichostrongylids from feces of dogs with diarrhea. *J Parasitol* 91:939–943. <https://doi.org/10.1645/GE-474R.1>
- Ho MSY, Conrad PA, Conrad PJ et al (1994) Detection of bovine trichostrongylosis with a specific dna-probe and pcr amplification system. *J Clin Microbiol* 32:98–104. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.1.98-104.1994>
- Köster LS, Chow C, Yao C (2015) Trichostrongylosis in cats with diarrhoea in Hong Kong, China, between 2009 and 2014. *JFMS* 424 Open Rep 1(2):2055116915623561. <https://doi.org/10.1177/2055116915623561>
- Li W-C, Wang K, Zhang W et al (2016) Prevalence and molecular characterization of intestinal trichostrongylids in pet dogs in East China. *Korean J Parasitol* 54:703–710. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.6.703>
- McMillen L, Lew AE (2006) Improved detection of *Trichostrongylus axei* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet Parasitol* 141:204–215. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.012>
- Meggiolaro MN, Roeber F, Kobylski V et al (2019) Comparison of multiplexed-tandem real-time PCR panel with reference real-time PCR molecular diagnostic assays for detection of *Giardia intestinalis* and *Trichostrongylus axei* in cats. *Vet Parasitol* 266:12–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.009>
- Michi AN, Favetto PH, Kastelic J, Cobo ER (2016) A review of sexually transmitted bovine trichostrongylosis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* 85:781–791. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.037>
- Mueller K, Morin-Adeline V, Gilchrist K et al (2015) High prevalence of *Trichostrongylus axei* “bovine genotype” in faecal samples from domestic pigs at a farm where bovine trichostrongylosis has not been reported for over 30 years. *Vet Parasitol* 212:105–110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.010>
- Nickel DD, Olson ME, Schultz GA (2002) An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Trichostrongylus axei* in cattle. *Can Vet J* 43:213–216
- OIE (2018) Trichostrongylosis. *Terrestrial Manual*. Chapter 3.4.15.: 1210–1221. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.15_TRICHOSTRONGYLOSIS.pdf. Accessed 11 January 2022.
- OIE (2019) Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf. Accessed 11 January 2022.
- Oyhenart J (2018) Direct detection of *Trichostrongylus axei* in cattle genital fluid through loop mediated isothermal amplification of elongation factor 1 alpha 1. *Vet Parasitol* 261:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.08.011>
- Reinmann K, Müller N, Kuhnert P et al (2012) *Trichostrongylus axei* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1 α . *Vet Parasitol* 185:138–144. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.032>
- Riley DE, Wagner B, Polley L, Krieger JN (1995) PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Trichostrongylus axei* isolates from Saskatchewan, Canada. *J Clin Microbiol* 33:1308–1313. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1308-1313.1995>
- Scimeca JM, Culbertson DE, Abree CR, Gardner WA (1989) Intestinal trichostrongylids (*Trichostrongylus mobilensis*) in the natural host *Saimiri sciureus* and *Saimiri boliviensis*. *Vet Pathol* 26:144–147. <https://doi.org/10.1177/030098588902600207>
- Šlapeta J, Müller N, Stack CM et al (2012) Comparative analysis of *Trichostrongylus axei* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Trichostrongylus suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int J Parasitol* 42:1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.004>
- Sun Z, Stack C, Šlapeta J (2012) Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Trichostrongylus axei* parasites of cats and cattle. *Vet Parasitol* 186:445–449. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.001>
- Tolbert MK, Leutenegger CM, Lobetti R et al (2012) Species identification of trichostrongylids and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichostrongylosis. *Vet Parasitol* 187:319–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.031>
- Yao C (2013) Diagnosis of *trichostrongylus axei*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichostrongylosis in US cattle? *J Med Microbiol* 62:1–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.047365-0>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo III

4.4 Time, temperature, and media: the three keys to improve the recovery of Campylobacter fetus subsp. venerealis from preputial bull samples.

Autores: **Polo, C.**, García-Seco, T., Fernández, V., Briones, V., Díez-Guerrier, A., Domínguez, L., Pérez-Sancho, M.

Título: *Time, temperature, and media: the three keys to improve the recovery of Campylobacter fetus subsp. venerealis from preputial bull samples.*

Revista: en proceso de revisión.

Como se ha mencionado a lo largo de la presente memoria de tesis doctoral, uno de los microorganismos más destacados por su importancia en infertilidad bovina es *C. fetus*. La subespecie CfV (para la cual se han descrito algunos casos de infección en humanos) es la causa etiológica de la CGB. Como se ha indicado con anterioridad, los toros infectados por *C. fetus* resultan ser asintomáticos, lo que facilita que las infecciones por CfV pasen desapercibidas. Por ello, la detección de toros infectados resulta ser una medida preventiva fundamental para minimizar el impacto negativo de la CGB en los rebaños.

La técnica de referencia para el diagnóstico de CGB en toros sigue siendo actualmente el cultivo (WOAH 2021), que permite el aislamiento de CfV (y en general, de *C. fetus*) a partir de muestras clínicas, lo que la convierte en una técnica esencial para el desarrollo de autovacunas como herramienta de emergencia en el control de *C. fetus*, la caracterización de cepas para llevar a cabo estudios epidemiológicos, determinación del perfil de resistencia a antibióticos, de factores de virulencia, etc.

Debido al bajo rendimiento diagnóstico que tiene a menudo el cultivo de *C. fetus*, asociado a factores como la susceptibilidad de *C. fetus* a las fluctuaciones de las condiciones atmosféricas y la temperatura durante el transporte y conservación de las muestras (Lander 1990a; Koya 2016),

su susceptibilidad a sufrir la rotura de su pared debido al empleo de asas de Digralsky durante su siembra en placa (Hedderich et al. 2011), y a que es fácilmente superada en su crecimiento durante el cultivo por bacterias comensales presentes naturalmente en la muestra (Chaban et al. 2013), es una técnica diagnóstica cuya implementación puede ser complicada en la mayoría de los laboratorios diagnósticos. Es por ello, que este capítulo comprende un estudio en el que se realiza la adaptación y comparación de diferentes protocolos de cultivo con objeto de maximizar la recuperación y aislamiento de Cfv a partir de muestras prepuciales de toros reproductores criados en régimen extensivo. Así, este estudio da respuesta al OBJETIVO ESPECÍFICO 5 propuesto en la presente memoria de tesis doctoral: *Evaluar diferentes protocolos de cultivo publicados en la literatura científica para el aislamiento de Cfv a partir de lavados prepuciales de machos reproductores criados en régimen extensivo con el fin de desarrollar y establecer el protocolo de aislamiento que mejore el rendimiento diagnóstico de esta técnica, y en consecuencia, permita la implementación de pautas de actuación y prevención más rápidas y eficaces en los programas de reproducción de explotaciones extensivas en bovino así como el estudio de Cfv en toros reproductores (estudios de resistencias antibióticas, epidemiología molecular, etc.).*

El estudio presentado en este capítulo, correspondiente al Artículo 5, que actualmente se encuentra en proceso de revisión.

Como se ha mencionado previamente, el objetivo del presente trabajo fue diseñar un protocolo de cultivo comprendiendo desde desde la toma de la muestra hasta el aislamiento de *C. fetus* subsp. *venerealis* que mejore la sensibilidad diagnóstica del cultivo. Se evaluaron diferentes combinaciones de TEM (Lander, Weibridge, Thomann, Stuart y PBS), medios de enriquecimiento (Preston, Bolton y Brucella) y medios de cultivo [Agar sangre (SBA), Preston y Skirrow], llevando a cabo la contaminación artificial de los distintos medios (así como de las muestras clínicas) mediante un aislado de *C. fetus* subsp. *venerealis* (cepa ICM18/00036), procedente de una muestra prepucial de un toro criado en régimen extensivo.

4.4.1. Evaluación de la capacidad de recuperación de *Cfv* dependiendo de los medios de transporte, enriquecimiento y cultivo empleados

Los medios de transporte fueron inoculados con *C. fetus* subsp. *Venerealis* para conseguir una concentración final aproximada de 3×10^4 UFC/mL y se almacenaron a temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y refrigeración (4°C), durante 24h y 48h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. La viabilidad de *Cfv* en la incubación de 48h fue prácticamente nula con todos los medios evaluados, por lo que los resultados no fueron incluidos en el estudio, asumiéndose que en ningún caso puede conservarse una muestra de lavado prepucial más de 24h para el aislamiento de *C. fetus*.

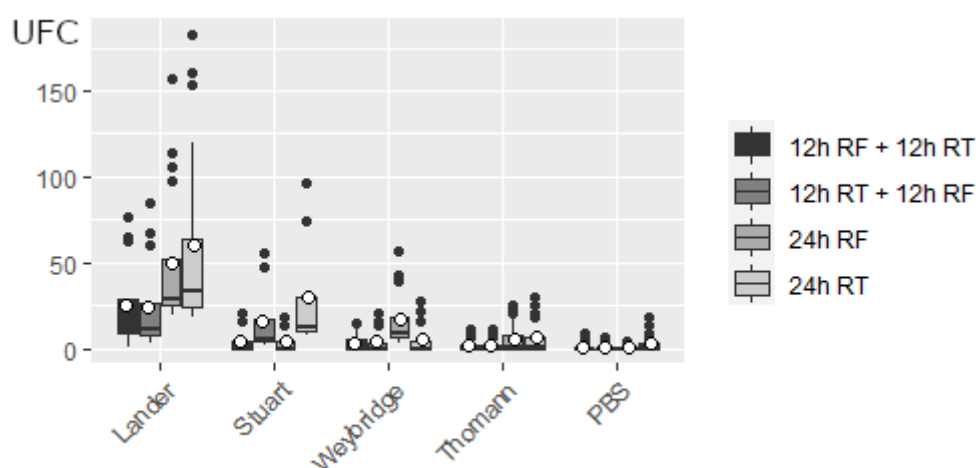


Figura 6. Estudio comparativo de medios de transporte. El número de UFC tras el almacenamiento de los medios de transporte durante 24h (y posteriormente cultivado en medio Skirrow) se muestra en el eje “Y”. Las cajas indican el 50% de la parte central de la distribución por cuartiles, las líneas verticales indican el 1,5 superior del rango intercuartílico, y los puntos negros indican medidas fuera de rango. Las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana y los puntos blancos la media. Las condiciones de tiempo y temperatura evaluadas se indican en la leyenda: refrigeración (RF, 4°C) durante 12h seguido de 12h a temperatura ambiente (RT, $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) (12h RF + 12h RT), 12h a temperatura ambiente seguido de 12h en refrigeración (12h RT + 12h RF), refrigeración durante 24h (24h RF), y 24h a temperatura ambiente (24h RT).

Los resultados obtenidos indicaron que el medio Lander fue el que mejor preservó la viabilidad de Cfv a lo largo de 24h a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ [media de UFC = 333, rango intercuartílico (RIQ = 24,4-63,75)], seguido del medio Lander almacenado también 24h a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ (mediana UFC = 29, RIQ = 24,75-51,5). Los recuentos de UFC más altos con el medio Stuart (mediana UFC = 12, RIQ = 9,75-29,75) también se obtuvieron en esas mismas condiciones, si bien para el medio Weybridge los mayores recuentos (mediana UFC = 9, RIQ = 6,75-18,75) se observaron tras 24 h a 4°C . Cabe citar que todas las placas sembradas a partir de medio Lander mostraron crecimiento del al menos una colonia de Cfv, independientemente de las condiciones de tiempo y temperatura en las que se hubiera conservado el medio experimentalmente contaminado. Esto mismo se observó también en el medio Stuart, pero únicamente a partir de las condiciones de conservación de 24h a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y de 12h a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ + 12h a 4°C . Los recuentos de UFCs a partir del medio Thomann estuvieron por debajo de 30 en todas las combinaciones de tiempo y temperatura evaluados. Actualmente en la práctica, muchos de los lavados prepucciales que son enviados a laboratorios diagnósticos, lo hacen en PBS. No obstante, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el medio PBS rara vez permitió la recuperación de colonias, siendo un medio inadecuado para el transporte de las muestras desde su toma hasta su procesamiento en el laboratorio, afectando de forma negativa la sensibilidad del cultivo.

Todas estas observaciones fueron respaldadas por los resultados del modelo de Poisson, que puso de manifiesto que tanto el medio de transporte como las condiciones de tiempo y temperatura de conservación estaban significativamente asociadas con el recuento de UFC, siendo la conservación a temperatura ambiente durante 24h la opción que ofrecía el mayor número de UFC previsto (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes y OR (Odd ratio) del modelo de Poisson usado para establecer la relación entre UFC observadas en el medio Skirrow dependiendo del medio de transporte y combinación de tiempo y temperatura [12RF12RT: refrigeración durante 12h (4°C) seguido de 12h a temperatura ambiente

($21^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), 12RT12RF: 12h a temperatura ambiente seguido de 12h en refrigeración, 24RF: refrigeración durante 24h y 24h a temperatura ambiente]. La referencia empleada en el modelo fue: PBS y 24RT.

Medio de transporte	Tiempo y temperatura	Valor estimado	Error estandar	OR	95% CI (intervalo de confianza)
		1.159	0.140		
Lander	12RF12RT	2.050	0.149	7.76	5.86-10.51
Lander	12RT12RF	2.027	0.149	7.59	5.73-10.28
Lander	24RF	2.745	0.144	15.57	11.86-20.92
Lander	24RT	2.940	0.144	18.92	14.44-25.39
Stuart	12RF12RT	0.345	0.218	1.41	0.92-2.16
Stuart	12RT12RF	1.629	0.165	5.10	3.71-7.11
Stuart	24RF	0.258	0.223	1.29	0.83-1.99
Stuart	24RT	2.225	0.154	9.25	6.9-12.66
Weybridge	12RF12RT	0.000	0.198	1.00	0.68-1.48
Weybridge	12RT12RF	0.331	0.184	1.39	0.97-2
Weybridge	24RF	1.674	0.153	5.33	3.99-7.27
Weybridge	24RT	0.546	0.176	1.73	1.23-2.45
Thomann	12RF12RT	-0.376	0.219	0.69	0.44-1.05
Thomann	12RT12RF	-0.321	0.216	0.73	0.47-1.1
Thomann	24RF	0.601	0.174	1.82	1.3-2.58
Thomann	24RT	0.653	0.173	1.92	1.38-2.71
PBS	12RF12RT	-1.099	0.280	0.33	0.19-0.56
PBS	12RT12RF	-1.224	0.294	0.29	0.16-0.51
PBS	24RF	-1.986	0.403	0.14	0.06-0.28

Los resultados obtenidos con el experimento 2, dirigido a la evaluación de los medios y condiciones de enriquecimiento y cultivo, se muestran en la Figura 7. Tras el cultivo de los medios de enriquecimiento a 37°C durante 48h, la recuperación de colonias de Cfv fue posible en el 100% de las repeticiones del experimento con el medio Preston, observándose un número incontable de colonias (>300 UFC) en los tres medios de cultivo en placa: SBA, Preston y Skirrow. Con respecto al medio de enriquecimiento Brucella, se observó un recuento de UFC significativamente superior cuando el cultivo se realizó en medio SBA (mediana UFC = 220; RIQ = 203,25-236,75) comparado con el medio de cultivo Skirrow [mediana UFC = 86,5; RIQ = 75,25-118, Odds ratio (OR) del modelo de Poisson = 0,46; intervalo de confianza del 95% (IC 95%) = 0,42-,51) y con el medio de cultivo Preston (mediana UFC = 84,5; RIQ = 83-90,5; OR = 0,39, IC 95% = 0,35-

0,43). El medio Bolton (y el PBS), por su parte, no permitió la recuperación de colonias en ninguno de los medios de cultivo empelados.

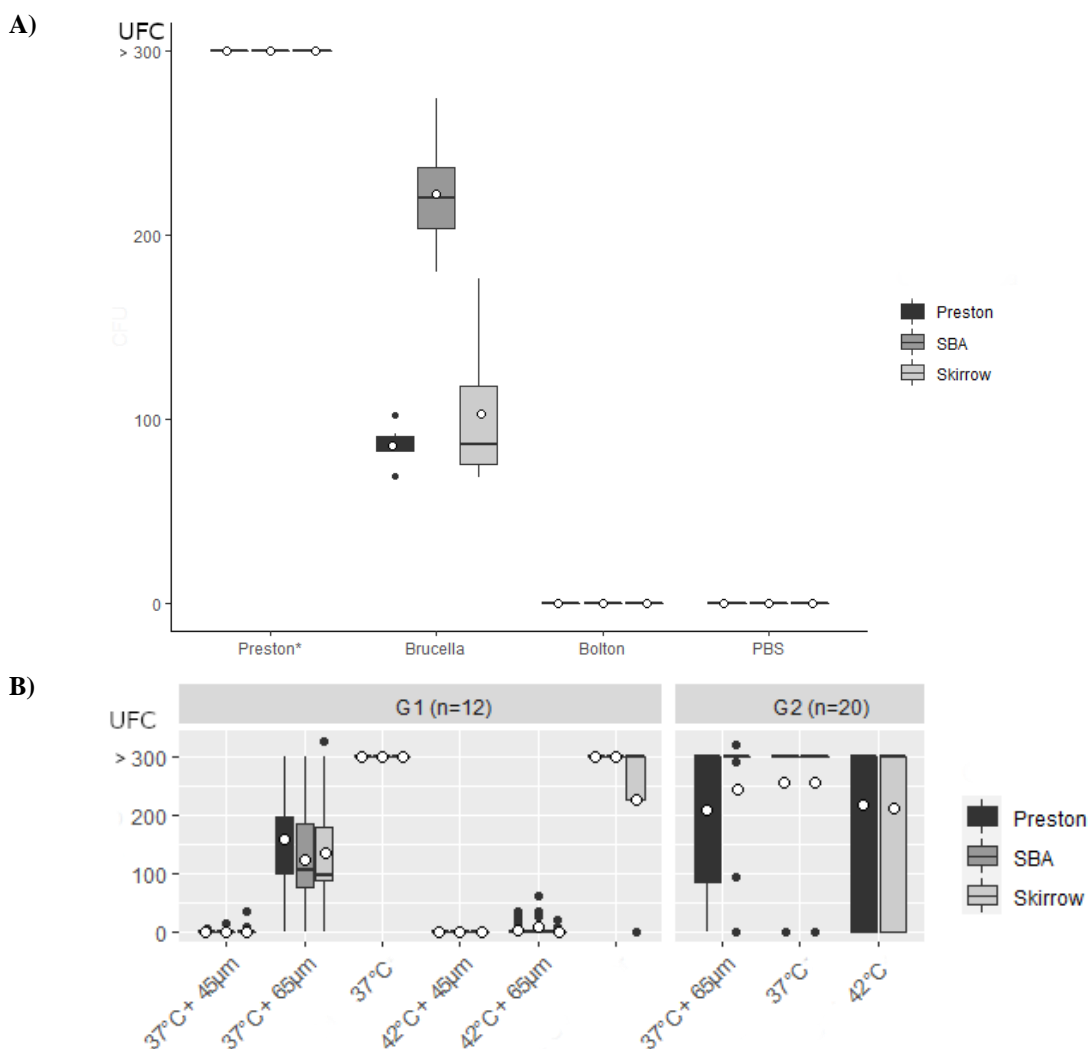


Figura 7. El número de UFC se muestra en el eje “Y”. Las cajas indican el 50% de la parte central de la distribución por cuartiles, las líneas verticales indican el 1,5 superior del rango intercuartílico, y los puntos negros indican medidas fuera de rango. Las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana y los puntos blancos la media. En la leyenda se indican los medios de cultivo (Preston, agar sangre como SBA, y Skirrow) donde se realizó el recuento de UFC. A) Resultados del recuento en placa de los medios de enriquecimiento previamente inoculados con Cfv (experimento 2). En el eje “X” se indica en medio de enriquecimiento (Bolton, Brucella and Preston. PBS as negative control). B) Resultados del recuento en placa del ensayo diagnóstico llevado a cabo con muestras prepuciales inoculadas con Cfv usando Lander

como medio de transporte y Preston como medio de enriquecimiento (experimento 3). Las condiciones de cultivo indicadas en el eje "X" son: 37°C o 42°C sin filtración de la muestra previo al cultivo en placa, o con el uso de filtros de 0.65µm o 0.45µm de diámetro de poro.

Con base en los resultados obtenidos, el protocolo que maximizaría la recuperación de Cfv implicaría el uso del medio Lander como medio de transporte, manteniendo las muestras a una temperatura constante de 21 ± 2 °C durante no más de 24h hasta su procesamiento en el laboratorio, empleando el medio de enriquecimiento Preston cultivado a 37°C durante 48h.

4.4.2. Evaluación del rendimiento diagnóstico del medio de transporte y enriquecimiento seleccionados con muestras de lavados prepuciales de toros

El rendimiento diagnóstico fue evaluado mediante el uso de muestras de lavados prepuciales procedentes de toros negativos a *C. fetus*, experimentalmente contaminadas con Cfv. De acuerdo a los resultados obtenidos en la anterior sección (experimentos 1 y 2), el medio de transporte seleccionado para este ensayo fue el Lander, y el medio de enriquecimiento, el Preston. Dado que los resultados obtenidos en el experimento 2 basados en el uso del Preston como medio de enriquecimiento no permitieron determinar el mejor medio de cultivo sólido a emplear (SBA, Preston y Skirrow) dado el elevado crecimiento de Cfv en todos ellos, los tres medios sólidos fueron empleados en el primer grupo de muestras de lavados prepuciales analizadas (grupo 1). Adicionalmente al empleo de medios de cultivo selectivos (Preston y Skirrow), y con el fin de minimizar la cantidad de microorganismos contaminantes potencialmente presentes en las muestras prepuciales (p.ej. *Proteus* spp. and *Pseudomonas* spp.), las muestras fueron: i) sembradas en paralelo con y sin filtración pasiva previa (usando filtros de 0,65 µm y 0,45 µm de tamaño de poro) y ii) incubadas no solo a 37°C sino también a 42°C, con el fin de disminuir la cantidad de contaminantes incapaces de crecer adecuadamente a temperaturas elevadas filtradas.

Resultados

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 6 y 7 y la Tabla 7. Los mejores resultados en términos de recuperación de Cfv se obtuvieron cuando no se realizaba filtración de la muestra previa a la siembra y las placas se incubaban a 37°C. Asimismo, la odds de recuperar Cfv fue significativamente inferior ($p < 0,001$) cuando las placas se incubaban a 42°C y se empleaban filtros [aunque cabe citar que se observaron resultados de recuperación de Cfv significativamente mejores ($p < 0,001$) usando filtros de 0,65 μm de tamaño de poro en comparación con el empleo de filtros de 0,45 μm]. Sin embargo, no se observó asociación entre el medio de cultivo y el resultado cuando el efecto del uso de los filtros y la temperatura de incubación fueron tenidos en cuenta en el modelo de regresión logística. En lo que respecta al crecimiento de microorganismos distintos a Cfv (contaminantes), el uso del medio no selectivo SBA sin empleo de filtros previos al cultivo fue la combinación que dió lugar a la aparición de un mayor porcentaje de placas contaminadas en comparación con los medios Skirrow y Preston y con el empleo de filtros, tanto de 0,65 μm como, especialmente, de 0,45 μm , mientras que el efecto de la temperatura (37°C vs. 42°C) presentó un impacto más limitado en los resultados (Tabla 6).

Tabla 7. Resultados del ensayo diagnóstico llevado a cabo con muestras prepuciales de toros enriquecidas con Cfv usando como medio de transporte Lander y preston como medio de enriquecimiento. Se muestra el porcentaje de *C. fetus* subsp. *venerealis* recuperado (% de UFC recuperado) y el porcentaje de platos contaminados (% de contaminantes) del grupo 1 de muestras (n=12) y grupo 2 (n=20) en Preston, agar sangre (SBA) y Skirrow bajo diferentes condiciones de cultivo: a 37°C o 42°C sin el empleo de filtros (Sin filtro) o con el uso de filtros de 0.65 μm o 0.45 μm . NA: condiciones no analizadas. Cada cultivo fue realizado por duplicado (cada muestra fue cultivada dos veces en paralelo).

		Filtros				
		Sin filtro	0.65 μm	0.45 μm		
Grupo 1 (n=12)	Preston	% de UFC recuperado	37°C	100	100	20.8
			42°C	100	29.2	0
		% de contaminantes	37°C	12.5	12.5	4.2
			42°C	4.2	0	0
	SBA	% de UFC recuperado	37°C	100	87.5	16.6
			42°C	100	45.8	8.3

			37°C			42°C				
			% de UFC recuperado	% de contaminantes	0	% de UFC recuperado	% de contaminantes	0		
Grupo 2 (n=20)	Skirrow	% de contaminantes	37°C	58.3	37.5	0	37°C	54.2	25	0
			42°C	100	95.8	16.6	42°C	75	25	0
		% de UFC recuperado	37°C	100	95.8	16.6	42°C	75	25	0
			42°C	75	25	0	37°C	16.6	8.3	0
		% de contaminantes	37°C	16.6	8.3	0	42°C	8.3	8.3	0
			42°C	8.3	8.3	0				
	Preston	% de UFC recuperado	37°C	Sin filtro	85	90	42°C	72.5	NA	
			42°C	72.5	NA					
		% de contaminantes	37°C	35	12.5	42°C	30	NA		
			42°C	30	NA					
		% de UFC recuperado	37°C	85	82.5	42°C	70	NA		
			42°C	70	NA					
Skirrow	% de contaminantes	37°C	42.5	17.5	42°C	30	NA			
		42°C	30	NA						

Los resultados de los análisis de las muestras del Grupo 2 del experimento 3, procesadas a 37 °C o 42 °C con o sin filtración pasiva previa empleando filtros de 0,65 µm de diámetro de poro usando únicamente medios de cultivo selectivos (Skirrow y Preston), se resumen en la Figura 7B y Tabla 7. Teniendo en cuenta los resultados del grupo 1 de muestras, no se incluyó en el análisis el uso de filtros de 0,45 µm debido a su impacto negativo en la capacidad de recuperación de Cfv. Lo resultados pusieron de manifiesto que existía una probabilidad de recuperación de Cfv significativamente más alta ($p < 0,001$) cuando las placas se incubaban a 37°C (OR = 2; IC 95% 1,06-5,14), mientras que el uso o no de filtros de diámetro de poro de 0,65 µm junto con el uso de medios de cultivo selectivos no presentó un impacto estadísticamente significativo ($p > 0,05$) en el resultado de recuperación de Cfv. Sin embargo, el uso de filtros de 0,65 µm demostró dar lugar a una menor proporción de placas contaminadas, mientras que el tipo de medio selectivo y

Resultados

la temperatura de incubación mostraron un impacto menor en la aparición de microorganismos contaminantes en los cultivos.

5. DISCUSIÓN

El sector bovino extensivo en España está caracterizado por su orientación prioritaria a la producción de carne donde es común el empleo, dentro de la especie *Bos taurus*, de variedades autóctonas (como Avileña-Negra Ibérica) y sus cruces con otras variedades importadas (como Holstein, Charolais o Limousin). El objetivo principal de estas granjas es maximizar la producción de terneros por vaca y año (Gonzalez-Rodriguez 2016; MAPA 2016; Endres y Schwartzkopf-Genswein 2017; MAPA 2020). Actualmente, debido a la situación geográfica de España y su dinámica productiva en lo que respecta al sector agrario, la ganadería bovina extensiva en nuestro país es vulnerable a los efectos del cambio climático debido a su dependencia de la disponibilidad de pastos y enclaves de agua potable (Rubio y Roig 2017).

Pese a los potenciales efectos negativos de la producción animal sobre el medio ambiente, la ganadería bovina en régimen extensivo puede minimizar dichos efectos a través de la explotación eficiente de recursos naturales contribuyendo al mantenimiento de ecosistemas diversos y resilientes (Rubio y Roig 2017). Es importante destacar que España fue el tercer país en importancia para el sector de vacuno de carne dentro de la UE en 2020, habiendo producido 677 mil toneladas de carne que suponen aproximadamente el 10% de la carne de vacuno producida (MAPA 2021). Pese a ello, el margen de ganancias para los ganaderos de vacuno ha experimentado una tendencia a la baja desde 2017, debido principalmente al encarecimiento de las materias primas. A ello han de sumarse las pérdidas económicas debidas a diversas causas como la infertilidad, que en España presenta índices bajos (69,5% en 2020) en comparación con la media europea (>80% en 2020) (MAPA 2021).

Es por ello por lo que la mejora de la fertilidad de estos rebaños se postularía como una estrategia adecuada para aumentar la eficiencia de los sistemas de producción bovina en régimen extensivo, reduciendo las pérdidas económicas para los ganaderos y contribuyendo al establecimiento de sistemas productivos que minimicen su huella ecológica. A su vez, contribuirían al mantenimiento de ecosistemas resilientes capaces de soportar, por ejemplo, los cada vez más recurrentes periodos de calor intenso (AEMET 2022), así como a corto, medio y largo plazo, ser el sistema productivo de carne de alta calidad proteica más adecuado desde un punto de vista de sostenibilidad ecológica (Peyraud y Macleod 2020; Greenwood 2021).

Una de las causas más destacables de infertilidad en rebaños bovinos en régimen extensivo en España parecen ser las infecciones del sistema reproductivo que afectan a la capacidad reproductiva de toros y/o vacas (Gonzalez-Rodriguez 2016). De forma generalizada, la mayoría de los estudios sobre microorganismos causantes de infertilidad en bovino se centran en las hembras, probablemente debido a que son las que soportan el grueso de la producción al ser en ellas en las que se basa la producción de carne (a través de rebaños de vacas nodrizas para la obtención de terneros destinados al engorde) en el caso de la producción en régimen extensivo. Sin embargo, el macho también desempeña un papel de importancia desde el punto de vista reproductivo ya que la existencia de bajos niveles de fertilidad en un único macho puede impactar en el éxito reproductivo de todo un rebaño debido a que un mismo toro es a menudo empleado para: i) la cubrición de la totalidad de las vacas de una explotación cuando dicho rebaño es pequeño, o; ii) la generación de multitud de dosis seminales empleadas en IA. De este modo, la presencia tanto de patógenos causantes de infertilidad en machos [p.ej. *Brucella abortus* (Joya et al. 2011)] como de patógenos de transmisión venérea asociados a infertilidad en hembras

(que en algunos casos causan una infección asintomática en toros) (Givens 2018), es un aspecto clave que se ha de considerar para mejorar la fertilidad de los rebaños.

Cuando se profundiza en el estudio de las causas de infertilidad infecciosa de acuerdo a lo publicado en bases de datos científicas, se aprecia la escasez de datos acerca del papel del toro en relación con la infertilidad de carácter infeccioso en el rebaño a pesar de que diferentes autores han señalado que un porcentaje elevado de fallos reproductivos es atribuible al macho (Butler et al. 2020; Montoya-Monsalve et al. 2021). Por ello, las infecciones que comprometen la fertilidad de un macho empleado para la cría, o de un conjunto pequeño de machos reproductores, es un punto crucial en la fertilidad del rebaño (Hopper 2015).

Esta limitada disponibilidad de datos actualizados y completos sobre los machos bovinos resulta llamativa debido a que han sido descritos multitud de patógenos como potenciales causantes de infertilidad en toros, y/o capaces de transmitirse a las hembras donde causan problemas reproductivos p.e. BVDV, BoHV-1, *B. abortus*, *C. fetus*, *T. foetus*, *Ureaplasma diversum*, *Leptospira* spp., *Histophilus somnus* o *Chlamydia* spp. (Givens y Marley 2008; Yoo 2010; Givens 2018). De este modo, los estudios dirigidos a la mejora en el conocimiento sobre el papel del toro en referencia a los problemas de infertilidad infecciosa en rebaños bovinos, así como el control de patógenos en toros reproductores, resultan ser aspectos de importancia para la mejora de la eficiencia productiva de los sistemas de producción extensiva de ganado bovino.

En este escenario, una revisión sistemática de la literatura científica sobre las causas de infertilidad infecciosa en ganado bovino se postula como una herramienta útil para la elaboración de un listado de todos aquellos microorganismos potencialmente presentes en toros que pudieran ser la causa de problemas reproductivos en los rebaños, y poner de manifiesto las necesidades más prioritarias sobre estudios que permitan esclarecer el

verdadero papel del toro como actor principal en los problemas de infertilidad de origen infeccioso en el rebaño. La mejora e implementación de nuevos abordajes para la detección de microorganismos, como la secuenciación masiva (Goodman y Lahmers 2021), incidiendo en patógenos de conocida relevancia en producción extensiva en nuestro país, como *C. fetus* y *T. foetus* (cuyas infecciones fácilmente pueden pasar desapercibidas en machos debido a la ausencia de síntomas en estos) (Michi et al. 2016), podría ser una medida relevante que permita mejorar el conocimiento acerca del verdadero papel del macho en referencia a la infertilidad infecciosa en rebaños bovinos en extensivo. Así mismo existen ciertas limitaciones de las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas (técnica de PCR y cultivo) para la detección de *C. fetus* y *T. foetus* (Yao 2013; Frey et al. 2017; Dąbrowska et al. 2019a; WOAHA 2021) que comprometen su rendimiento diagnóstico en ciertos escenarios, por lo que la mejora y el desarrollo de protocolos optimizados para su detección en muestras procedentes de toros reproductores resultaría ser de gran utilidad para la mejora en el diagnóstico, y control de estos microorganismos en los rebaños bovinos.

Por todo ello, el **principal objetivo** de la presente memoria de tesis doctoral es la mejora del conocimiento sobre el papel del toro como elemento clave en los problemas de infertilidad de origen infeccioso en rebaños bovinos criados en régimen extensivo mediante la revisión sistemática de los patógenos asociados a infertilidad en el toro, así como la evaluación y desarrollo de herramientas diagnósticas de última generación y tradicionales para la detección de patógenos de relevancia en este campo. Por ello, se ha puesto especial atención a las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas para la detección de dos patógenos de importancia en explotaciones extensivas en España: *C. fetus* y *T. foetus*.

La consecución de este objetivo ha planteado tres objetivos específicos que tratan de dar respuesta a importantes vacíos en el conocimiento y las herramientas para el estudio del papel de los toros en los problemas de infertilidad de origen infeccioso. El bajo número de estudios dirigidos en toros podría estar limitando el conocimiento que tenemos acerca del impacto real de multitud de patógenos (conocidos y desconocidos) que afecten a su capacidad reproductiva, así como limitar el conocimiento acerca del papel de los machos en relación con la transmisión de patógenos a las hembras.

El **primer objetivo específico** de la presente tesis consistió en llevar a cabo una evaluación sistemática de las principales causas de infertilidad en ganado bovino criado en régimen extensivo debido a causas infecciosas y la potencial presencia de agentes predisponentes asociados a infertilidad en bovino. En consecuencia, se realizó un primer abordaje teórico (Artículo 1. “*What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds*”) mediante una revisión sistemática de la literatura científica sobre trabajos realizados en explotaciones bovinas seleccionando aquellos que relacionaron la presencia de uno o varios microorganismos con problemas de fertilidad, centrando el foco de atención en el papel del macho.

De acuerdo con los resultados expuestos en el Artículo 1 de la presente memoria de tesis doctoral, se aprecia una tendencia ascendente en el número de publicaciones científicas que relacionan la presencia de microorganismos con bajos índices de fertilidad en rebaños bovinos compuestos exclusivamente por machos y rebaños mixtos pudiéndose deber a un mayor interés en las causas de infertilidad bovina de origen infeccioso y el papel del macho. Se seleccionaron y analizaron un total de 38 publicaciones científicas desde 1966 hasta 2022 donde se recogía información procedente de más de 3.000 toros. El total de publicaciones describieron seis géneros de bacterias distintas que comprenden 18 especies (47,4% del total de publicaciones), cinco especies de virus (39,5% del total de

publicaciones) y cuatro especies de parásitos (29% del total de publicaciones). El microorganismo más comúnmente identificado en rebaños con bajos ratios de fertilidad fue BoHV (descrito por el 26,3% del total de publicaciones) seguido por *C. fetus* (23,7%), *Trichostrongylus axei* (18,4%) y BVDV, *Ureaplasma* spp., y *Mycoplasma* spp. (10,5% cada uno). En el caso de los virus BoHV y BVDV, ambos afectan a la calidad espermática en toros (El-Mohamady et al. 2020) y generan abortos en las hembras (Grooms 2004; Newcomer y Givens 2016) pudiendo ser transmitidos de forma venérea a través de la monta natural y la IA (Givens 2018). Por otra parte, los machos infectados con la bacteria *C. fetus* y el parásito *T. foetus*, como ya se ha mencionado previamente, suelen ser asintomáticos pudiendo transmitir estos patógenos de forma venérea a través de la monta natural y la IA a las hembras donde causan infertilidad (Givens y Marley 2008).

Uno de los aspectos más llamativos del estudio realizado es que no se identificaron hongos pese a que se conocen casos por los cuales este tipo de microorganismos son capaces de afectar de forma negativa la calidad espermática en toros (Joya et al. 2011). La ausencia de hongos en la revisión realizada en el presente estudio puede ser debida a que las infecciones por hongos son eventos poco comunes que se producen frecuentemente debido a deficiencias inmunitarias del animal o a la alteración de las barreras mucosas (Dixon et al. 1996; Seyedmousavi et al., 2018), siendo microorganismos para los que no se realizan controles rutinarios en los laboratorios diagnósticos a no ser que exista una sospecha previa.

En un menor porcentaje se describen otros microorganismos como *Mycoplasma* spp. (identificado por el 10,5% del total de publicaciones), en el que la especie *M. bovis*, *M. mycoides*, *M. wenyonii* y *M. bovis* parece que están asociados con problemas reproductivos en toros (Parker et al., 2018), mientras que *M. bovis* y *M. mycoides* parecen ser transmitidos a las hembras por toros reproductores (Carli et al., 2022; Dudek et al., 2020). En las hembras,

infecciones por *Mycoplasma* spp. se traduce en trastornos reproductivos, como vulvovaginitis, endometritis, distocia (Parker et al., 2018) y abortos esporádicos (Carli et al., 2022), mientras que la patogenia en toros ha sido menos estudiada (Carli et al., 2022) y la ausencia de síntomas podría ser un fenómeno común (Parker et al., 2018). En base a esta información, parece pertinente reflexionar sobre la necesidad de realizar estudios que permitan eliminar las lagunas existentes en el conocimiento acerca del verdadero papel de estos microorganismos en la infertilidad del ganado bovino. En un bajo porcentaje de artículos, también se situaron microorganismos como *U. diversum*, o *Staphylococcus* spp., que resultan ser microorganismos poco estudiados con relación a la infertilidad (Kirkbride 1987; Wentink et al. 2000; Reichel et al. 2018; Ahuja y Cheema 2018; Díaz et al. 2019; Cojkic et al. 2021). *U. diversum* se ha descrito como potencial causa de infertilidad bovina, no obstante, el conocimiento acerca de la patogenicidad de este microorganismo es incierto (Buzinhani et al. 2011) en la actualidad. Se podría asumir que estas limitaciones en el conocimiento acerca de la patogenicidad de estos microorganismos son producto del limitado número de estudios dirigidos a los mismos en relación con la infertilidad bovina, en especial en lo referente al toro pese a haberse sugerido que, p.ej. en el caso de *U. diversum*, dicho microorganismo es capaz de colonizar los espermatozoides, si bien algunos trabajos no observan que afecte de una forma evidente a la calidad espermática (Buzinhani et al. 2011). A pesar de ello, *U. diversum* parece estar asociado a infertilidad en ganado bovino a través, principalmente, de bajos ratios de concepción (Santos Junior et al. 2021), lo que sugiere un posible papel del toro como portador de *U. diversum* transmitiéndolo a las hembras donde se traduciría en bajos ratios de concepción.

Por último, llama la atención la ausencia de patógenos asociados a infertilidad en hembras que podrían ser transmitidos de forma venérea por parte del toro y, en consecuencia, se esperaría su presencia en toros sometidos a estudios sobre causas infecciosas de

infertilidad en rebaños bovinos. Algunos ejemplos son *H. somni*, *Pasteurella* spp., *Enterococcus* spp., *Aspergillus* spp. o *Candida* spp. (Yoo 2010; Givens 2018). En algunos casos, esta ausencia es especialmente llamativa como ocurre en el caso de *Enterococcus faecium*. Existen estudios experimentales en toros donde se demostró la capacidad de *E. faecium* para disminuir la calidad espermática debido a una reducción de la movilidad espermática y un decrecimiento significativo ($p < 0,01$) en el potencial de la membrana mitocondrial de los espermatozoides, lo que disminuiría su capacidad de fecundación (Ďuračka et al. 2021).

Por otra parte, los principales microorganismos asociados a infertilidad en toros descritos en esta revisión presentan una distribución a nivel mundial, así como se observó una tendencia al alza en el número de publicaciones. Un aspecto que podría estar relacionado con las restricciones en el conocimiento acerca del verdadero papel del macho en relación a infertilidad bovina son las limitaciones de las técnicas empleadas para la detección de los mismos a partir de muestras clínicas (Petit et al. 2009). De acuerdo con los resultados del Artículo 1, las técnicas empleadas por los diferentes trabajos seleccionados, en los que se relacionaban los bajos ratios de fertilidad a la presencia de uno o varios microorganismos, son el cultivo y la detección directa por microscopía (19 del total de las 38 publicaciones seleccionadas), los inmunoensayos (22/38) y la técnica PCR (13/38).

No obstante, todas estas técnicas están dirigidas a la detección de uno o pocos microorganismos concretos. Además, cada técnica presenta limitaciones propias de su fundamento, p. ej. la detección mediante microscopía requiere, *a priori*, una alta densidad de la presencia del microorganismo en cuestión y el cultivo presenta serias carencias en términos de sensibilidad debido al hecho de la existencia de microorganismos no cultivables que no son pueden ser detectados mediante esta aproximación. De acuerdo al trabajo de Petit *et al.* realizado sobre muestras cervicales de vacas con problemas

reproductivos en menos del 30% de los casos pudo identificarse, mediante el cultivo, el microorganismo responsable con el uso de esta técnica (Petit et al. 2009).

No se debe olvidar en este punto, la naturaleza multifactorial de infertilidad en bovino, ni tampoco el elevado número de microorganismos asociados a infertilidad bovina de carácter infeccioso, es por ello por lo que no podemos sacar conclusiones sobre el verdadero alcance del diagnóstico de los problemas de infertilidad asociados a causas infecciosas cuando se emplean técnicas como el cultivo, inmunoensayos o PCR de manera exclusiva y dirigida a determinados microorganismos. Existen trabajos más recientes en los que se han empleado técnicas como la secuenciación masiva, donde se han puesto de manifiesto la presencia de microorganismos que, por lo general, no son detectados mediante cultivo, inmunoensayos o PCR en controles rutinarios llevados a cabo por laboratorios diagnósticos, asociando la presencia de potenciales patógenos a problemas reproductivos en bovino (Cojkic et al. 2021). La ventaja de las técnicas de detección basadas en la secuenciación masiva comparadas con el resto de las técnicas anteriormente citadas, es la capacidad de detectar (teóricamente) de forma simultánea la presencia de diferentes microorganismos presentes en una muestra clínica detectando así microorganismos no cultivables o para los que no se encuentran dirigidos los inmunoensayo y PCR (Van Borm et al. 2015), y que, por lo tanto, podrían estar pasando desapercibidos.

En base al conjunto de datos obtenidos a través de la revisión sistemática, el bajo número de publicaciones existentes, y las aparentes limitaciones de las técnicas más comúnmente empleadas en diagnóstico (microscopía, cultivo, inmunoensayos y PCR) se puede asumir que existe una comprensión limitada acerca del verdadero papel del macho en referencia a los problemas de fertilidad de carácter infeccioso en los rebaños bovinos debido: i) a la aparente limitación en el conocimiento publicado sobre el efecto real que algunos

microorganismos tienen sobre la fertilidad del macho, como *Mycoplasma* spp o *U. diversum*; ii) debido a la aparente limitación en el conocimiento acerca de la capacidad de transmisión de patógenos causantes de problemas reproductivos en hembras como por ejemplo *Candida* spp., y iii) debido a la potencial falta de estudios en rebaños bovinos puesta de manifiesto con la ausencia de trabajos que identifiquen en machos algunos patógenos asociados a infertilidad en hembras como por ejemplo *H. somni*.

Estas limitaciones en el conocimiento podrían ser superadas con la implementación de nuevas técnicas de análisis para la detección y estudio de microorganismos presentes en rebaños con bajos índices de fertilidad como, por ejemplo, mediante el empleo de secuenciación masiva para disponer de información actualizada y completa sobre las poblaciones microbianas presentes en el prepucio de los toros (el lavado prepucial es una de las muestras indicadas para el diagnóstico de patógenos reproductivos como *C. fetus* y *T. foetus* (WOAH 2018, 2021)) y posibles diferencias en las mismas asociadas a su estado reproductivo (machos con problemas de fertilidad versus machos sanos desde un punto de vista reproductivo). Esto permitiría determinar i) la relevancia real que los patógenos identificados en la revisión bibliográfica del Artículo 1 podrían estar teniendo en los toros criados en España en régimen extensivo, ii) la presencia de microorganismos asociados a problemas de fertilidad no descritos hasta la fecha o que pasaran desapercibidos en los controles rutinarios a este nivel (que suelen ser análisis dirigidos a la detección e indentificación de la especie, poniendo especial énfasis en microorganismos oportunistas que puedan adoptar un papel patógeno en determinados escenarios, y iii) la existencia de diferencias en las poblaciones microbianas en el prepucio de toros que pudieran estar asociados a problemas de fertilidad.

Por todo ello, el **segundo objetivo específico** de la presente tesis plantea el análisis diferencial de poblaciones bacterianas (que representa el grupo de patógenos más diverso

de acuerdo con los resultados del Artículo 1) presentes en lavados prepuciales de toros empleados para la cría con bajas tasas de fertilidad, así como machos sanos desde un punto de vista reproductivo. Para ello se realizó un estudio metagenómico (cuyos principales resultados se presentan en el Artículo 2 “*Exploiting 16S rRNA-based metagenomics to reveal neglected microorganisms associated with infertility in breeding bulls in Spanish extensive herds*”) de 1029 muestras prepuciales de toros criados en régimen extensivo en España (una muestra por toro). El estudio metagenómico basado en el análisis de la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosómico bacteriano mostró una abundancia de los principales taxones bacterianos muy similar en el grupo de toros procedentes de rebaños diagnosticados con baja fertilidad (grupo problema) y toros procedentes de rebaños considerados sanos (grupo control) desde un punto de vista reproductivo. Esto se tradujo en la ausencia de diferencias notables con respecto a los taxones bacterianos más abundantes entre el grupo problema y el grupo control. La comparación mediante ‘t-test’ de las medias de los diferentes índices de diversidad alfa empleados entre ambos grupos muestrales reveló la ausencia de diferencias significativas a diferentes niveles: i) el índice Shannon (p-valor = 0,745) presentó valores en torno a 3-4 lo que indicaba que ambos grupos muestrales tenían un alto grado de diversidad de especies, y ii) el índice Simpson (p-valor = 0,403) con valores próximos a 1 indicaba que ambos grupos muestrales tenían, de igual modo, una elevada diversidad de especies bacterianas. Así mismo, el análisis de la diversidad beta usando el índice de Bray-Curtis no mostró segregación del grupo problema y control en la representación gráfica, explicándose solo el 23,4% de la varianza total de las diferencias entre las muestras mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). La función ‘Adonis’ indicó que solo el 0,8% ($R^2 = 0,00829$; p-valor = 0,001) de la variación entre las muestras se debía al agrupamiento muestral indicado. Todos estos

resultados se tradujeron en que las diferencias de las poblaciones bacterianas observadas no se relacionaron con las diferencias en la fertilidad de los rebaños extensivos en los que fueron empleados dichos toros para la cría mediante monta natural, principalmente. Las limitaciones en la información disponible actualmente sobre las poblaciones bacterianas presentes en el prepucio de toros reproductores criados en extensivo, influyen en la dificultad de discusión de los resultados obtenidos. No obstante, el único estudio publicado hasta la fecha que aborda el estudio de la composición de las poblaciones bacterianas en muestras prepuciales de toros es el de Wickware et al. (2020), quienes tampoco encontraron diferencias significativas a este nivel en función de la raza, el tipo de alimentación, el uso de antibióticos y el historial reproductivo de los animales analizados, reforzando de este modo la idea de que no parecen existir diferencias marcadas y constantes en las poblaciones bacterianas presentes en el prepucio de toros que puedan asociarse de forma clara a la infertilidad. Por el contrario, sí se han publicado trabajos que sugieren diferencias de la microbiota seminal asociadas a infertilidad en toros reproductores (Cojkic et al. 2021). Las diferencias en las conclusiones de los diferentes trabajos en función de si el estudio es realizado sobre muestras prepuciales o seminales son de origen desconocido y han de ser evaluadas en futuros trabajos.

Con base en estos resultados, se planteó la idea de que, si bien no parece haber poblaciones bacterianas asociadas a infertilidad en el prepucio del toro, dicha infertilidad podría deberse a la presencia de determinados microorganismos, para lo que sería necesario otro tipo de análisis de los datos obtenidos mediante el estudio metagenómico. Cuando se realizó un análisis individual de la clasificación bacteriana obtenida a nivel de género y especie (OTU) de las muestras incluidas en el presente trabajo, se observaron bacterias previamente asociadas a infertilidad en ganado bovino que se detectaron únicamente en el grupo problema, por ejemplo, *C. fetus* (presente en el 2,75% del total de

muestras). No obstante, este patógeno no pudo ser asociado significativamente a infertilidad (p -valor = 1) mediante análisis estadístico con la prueba chi-cuadrado y la corrección de los p -valores mediante el método Holm-Bonferroni (Holm 1979). Esta especie bacteriana presenta dos subespecies, Cfv, causante de la CGB (enfermedad de declaración obligatoria en España de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 526/2014), y Cff (causante de infecciones esporádicas en el tracto reproductivo en bovino y también asociada a problemas reproductivos) (Mshelia et al. 2010; Cagnoli et al. 2020). Sin embargo, a través de la aproximación metodológica aplicada en este estudio (metagenómica) no se pudo determinar la subespecie en las muestras positivas a *C. fetus*. Esto pone de manifiesto que, a pesar de las grandes ventajas de esta tecnología, puede existir un bajo rendimiento en el diagnóstico de enfermedades de importancia cuando se pretende detectar un microorganismo a nivel de subespecie cuando dicha tecnología se aplica siguiendo la metodología aquí planteada. A la hora de solventar este inconveniente en la rutina laboratorial, se podría plantear como alternativa diagnóstica, p. ej. en el caso de *C. fetus* y sus subespecies, el empleo en serie de dos técnicas diagnósticas: i) metagenómica en todas las muestras (para determinar todas las poblaciones bacterianas presentes en una muestra de lavado prepuccial en cuanto a identificación de género-especie) y ii) la técnica PCR de aquellas muestras positivas a *C. fetus* (para la determinación de subespecie). Esta alternativa tampoco está exenta de inconvenientes. La identificación de subespecie de *C. fetus* mediante PCR presenta limitaciones principalmente debidas a la inespecificidad de multitud de dianas genéticas empleadas para la detección de Cfv publicadas hasta la fecha como son *ISCfe1* (Silva et al., 2020), *virB11* (Silva et al., 2021) o *parA* (Silva et al., 2020). Las limitaciones que presenta la técnica PCR para la diferenciación de Cfv y Cff en muestras prepucciales de toros se abordan más adelante en el Artículo 3 (“*Evaluation of PCR assays for Campylobacter*

fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples”).

También se observó la presencia de otros patógenos oportunistas (aunque no asociados de forma significativa a infertilidad), como es el caso de *U. diversum* [presente en 798 muestras procedentes del grupo problema (n=944) y 66 muestras del grupo control (n=85)], que previamente ha sido asociado a infertilidad bovina (Díaz et al. 2019). Esta bacteria es capaz de colonizar el prepucio y la uretra de los toros transmitiéndose a las hembras incluso mediante inseminación artificial (Buzinhani et al. 2011). En contraposición, respecto al género *Mycoplasma* spp., sí se observó una asociación estadísticamente significativa entre la detección de este género y los bajos índices de fertilidad (p-valor <0,001) [720 toros fueron positivos dentro del grupo problema (n=944) y 37 toros fueron positivos dentro del grupo control (n=85)]. Algunas especies como *M. bovis* y *M. bovis genitalium* han sido previamente asociadas a infertilidad en rebaños bovinos (Kirkbride 1987; Reichel et al. 2018). Como ya se ha mencionado, estas especies de *Mycoplasma* parecen carecer de un papel concreto en referencia a la infertilidad del toro o su potencial de transmisión a las hembras de acuerdo a lo encontrado en la literatura científica pese a que se ha sugerido que pueden tener un papel en la aparición de problemas reproductivos en bovino (Hathaway 2019). De hecho, Dudek y colaboradores sugirieron una posible relación directa entre toros portadores de *M. bovis* (presencia de la bacteria en muestras seminales empleadas en IA) y el desarrollo de problemas reproductivos y bajos ratios de concepción en hembras (Dudek et al. 2020). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente análisis metagenómico podrían estar indicando la presencia de bacterias causantes de infertilidad que están pasando desapercibidas en los análisis bacteriológicos rutinarios practicados en toros en régimen extensivo y que tendrían que ser considerados en el diagnóstico de patologías reproductivas de manera

dirigida, sobre todo cuando requieren el empleo de abordajes específicos como es el caso del cultivo de *Mycoplasma*.

En definitiva, la implementación de nuevas tecnologías en diagnóstico, como la secuenciación masiva, brindan la posibilidad de superar las limitaciones de las técnicas diagnósticas dirigidas así como de estudiar las poblaciones microbianas totales presentes en una muestra clínica permitiendo tener una visión integradora sobre qué microorganismos potencialmente causantes de infertilidad en las poblaciones de toros reproductores pueden estar pasando desapercibidos (o patógenos emergentes) con el uso de técnicas convencionales (que suelen estar dirigidas a la detección de patógenos específicos). Asimismo, también ofrecen la posibilidad de estudiar potenciales microorganismos aún desconocidos en referencia a infertilidad bovina o relaciones sinérgicas entre las poblaciones microbianas presentes o dinámicas de infección. Si bien, por el momento, los análisis mediante secuenciación masiva resultan costosos y es necesario disponer de personal cualificado para su correcta interpretación, este tipo de análisis moleculares abren una nueva vía de obtención de información de interés en el diagnóstico veterinario de enfermedades infecciosas en el ámbito de los problemas reproductivos (Van Borm et al. 2015; Kumar, 2019). El éxito de la implementación de esta tecnología en el ámbito veterinario se ha demostrado previamente (Anis et al. 2021; Van Borm et al. 2015) p.ej. trabajos que caracterizan la composición bacteriana del fluido cerebroespinal en ganado bovino y su relación con enfermedades neurológicas (Ferrini et al. 2022), o trabajos que llevan a cabo la caracterización de la población microbiana del rumen y su relación con la producción de gases de efecto invernadero como el metano (Wallace et al. 2015).

Centrando el foco de atención en patógenos primarios como *C. fetus* (presente en el 2,75% de los toros incluidos en el estudio metagenómico, Artículo 2) y *T. foetus*, es importante

destacar que son patógenos reconocidos causantes de infertilidad en rebaños de ganado bovino en extensivo para los cuales no existe un tratamiento eficaz en toros reproductores (Vasquez et al. 1983; Fóscolo et al. 2005; Michi et al. 2016; Erickson et al. 2017; MAPA 2019, 2022; Balzan et al. 2020). Ambos son capaces de transmitirse de forma venérea a través de la monta y la IA (Givens 2018), donde además los machos infectados suelen ser asintomáticos, por lo que *C. fetus* y *T. foetus* podrían pasar fácilmente desapercibidos (Michi et al. 2016) si no se realizan análisis rutinarios. En este contexto, la detección temprana, fiable y específica de machos infectados se convierte en una medida esencial para el control de estas patologías en rebaños bovinos criados en extensivo.

No obstante, las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas en la actualidad, que son la técnica de PCR y/o cultivo, para la detección de estos microorganismos en lavados prepuciales [muestra de elección (WOAH 2018, 2021)] presentan ciertas limitaciones de sensibilidad y especificidad en algunos escenarios, lo que coarta el rendimiento diagnóstico y el correcto control de estos patógenos en los rebaños (Lander 1990a; Monke et al. 2002; Midlej et al. 2011; Chaban et al. 2013; Yao 2013; Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014; Frey et al. 2017; WOAH 2018, 2021). Todo lo anteriormente expuesto lleva al **tercer, cuarto y quinto objetivo específico** de la presente memoria de tesis, en los que se plantea la puesta a punto y evaluación (y en algunos casos, desarrollo) de las técnicas diagnósticas más comúnmente empleadas, PCR y/o cultivo, para la detección de *C. fetus* y/o *T. foetus* en muestras prepuciales procedentes de machos reproductores criados en régimen extensivo, con el fin de desarrollar protocolos para optimizar el rendimiento diagnóstico para su detección en muestras de lavados prepuciales. Para ello, se realizaron dos estudios comparativos de técnicas de PCR [para la detección de *C. fetus* (Artículo 3 “*Evaluation of PCR assays for Campylobacter fetus detection and discrimination between C. fetus subspecies in bovine preputial wash samples*”) y *T. foetus* (Artículo 4

“*Molecular detection of Trichostrongylus axei in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting EF1-alpha-Tf1 and a comparative study of published PCR techniques*”] y de cultivo (Artículo 5 “*Time, temperature and media: the three keys to improve the recovery of Campylobacter fetus subsp. venerealis from preputial bull samples*”).

Respecto al diagnóstico molecular, la técnica más extendida para la detección de *C. fetus* y *T. foetus* en muestras clínicas es la técnica PCR (Chaban et al. 2013; Michi et al. 2016; WOAAH 2018, 2021). No obstante, el cultivo sigue siendo la técnica estándar para el diagnóstico de la CGB, causada por *Cfv* (WOAH 2021), que al igual que la tricomonosis bovina, causada por *T. foetus*, son enfermedades de declaración obligatoria en varios países entre los que se incluye España (Real Decreto 526/2014 del Boletín Oficial del Estado).

Respecto a *C. fetus*, en el ganado bovino se pueden encontrar dos subespecies diferentes en el tracto reproductivo, *Cfv* y *Cff*, ambas causantes de problemas reproductivos, si bien algunos autores han apuntado que *Cff* carece de relevancia en relación a infertilidad bovina (Michi et al. 2016; Cagnoli et al. 2020). La correcta diferenciación de dichas subespecies es importante para el correcto diagnóstico de la CGB, la cual resulta ser una de las causas de infertilidad en bovino identificadas como más relevantes a nivel mundial (Michi et al. 2016; WOAAH 2021). La diferenciación de subespecies también es importante para el estudio de ambas subespecies en relación a infertilidad en toros (Cagnoli et al. 2020) y como potenciales patógenos zoonóticos, donde la mayor parte de casos de infecciones en humanos asociados a *C. fetus* son causados por *Cff*. Esta subespecie puede ser transmitida de animales al ser humano a través de diversas vías como p.ej. el consumo de alimentos y aguas contaminados. Por su parte, la relevancia de *Cfv* como patógeno en humanos parece ser muy limitada pese a que han sido descritos

casos clínicos (Holst et al. 1987). La determinación, por parte de los laboratorios diagnósticos, de la subespecie del agente etiológico involucrado en las infecciones por *C. fetus* no siempre es posible, por lo que el conocimiento acerca del verdadero papel de ambas subespecies como agente zoonótico es limitado (Wagenaar et al. 2014).

De manera tradicional, la diferenciación de las subespecies de *C. fetus* se ha realizado mediante pruebas bioquímicas a partir de aislados recuperados de muestras clínicas. No obstante, la diferenciación de Cfv y Cff a través de su caracterización bioquímica no parece ser una aproximación exenta de inconvenientes (Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014; Calleros et al. 2017; Delpiazzo et al. 2021), debido a que el mismo perfil bioquímico puede ser obtenido por ambas subespecies (Van Bergen et al. 2005; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013, 2014; Delpiazzo et al. 2021).

El aislamiento de *C. fetus* (y en consecuencia de Cfv para la confirmación de casos de CGB) también resulta ser de gran interés para diversas aplicaciones; por ejemplo, permitiría el desarrollo de autovacunas como medida de urgencia de control y manejo de esta patología, caracterización de cepas para llevar a cabo estudios epidemiológicos, de resistencia a antibióticos, factores de virulencia, etc. No obstante, como ya se ha mencionado, la viabilidad de Cfv fuera del hospedador es limitada (Monke et al. 2002; Chaban et al. 2013), lo que repercute directamente en la probabilidad de aislamiento en el laboratorio a partir de muestras clínicas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha establecido un protocolo estandarizado para maximizar la recuperación de Cfv a partir de lavados prepuciales de toros.

Todo ello contextualiza la realización del trabajo recogido en el Artículo 3 de la presente memoria de tesis doctoral, donde se abordó la evaluación de la técnica PCR para la detección de *C. fetus* en muestras de toros reproductores, así como en la diferenciación de las subespecies Cff y Cfv. Como se ha comentado previamente, pese a que la PCR es

la técnica empleada por la mayoría de los laboratorios diagnósticos para la detección de *C. fetus* y diferenciación de subespecies Cfv y Cff en muestras clínicas debido a las principales limitaciones del cultivo, la PCR no está exenta de limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad diagnósticas que pueden dificultar su implementación en el diagnóstico rutinario empleando muestras clínicas y, en consecuencia, el correcto estudio de la implicación de Cfv y Cff en relación a infertilidad bovina (Cagnoli et al. 2020; WOAH 2021).

En dicho trabajo recogido en el Artículo 3 se llevó a cabo un estudio comparativo actualizado de diferentes protocolos de PCR publicados para la detección de *C. fetus* en muestras clínicas y la diferenciación de Cfv y Cff con el fin de determinar el protocolo que mejor rendimiento diagnóstico presentara para el análisis de lavados prepuciales de toros criados en extensivo. De este modo, fueron evaluados diferentes protocolos de PCR dirigidos sobre un total de 10 dianas genéticas distintas. Para la detección de la especie *C. fetus* fueron comparados los protocolos G13 basado en la diana *nahE* (Abril et al. 2007; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013), I16 basado en la diana *16S* ARNr (Iraola et al. 2016), P12 basado en la diana *gyrB* (Persson et al. 2012), C09 basado en la diana *cpn60* (Chaban et al. 2009), H97 basado en la diana *cstA* (Hum et al. 1997) y K16 basado en la diana *cdtB* (Kamei et al. 2014). En el caso de la diferenciación de subespecies, para la identificación de la subespecie Cfv fueron evaluados los protocolos G13-ISC basado en la diana *ISCfe1* (Abril et al. 2007; Van der Graaf-van Bloois et al. 2013), H97-Ven basado en la diana *parA* (Hum et al. 1997) y I12 basado en la diana *virB11* (Iraola et al. 2012). Por último, para la detección de la subespecie Cff fue empleado el único protocolo de PCR publicado hasta la fecha, W02, basado en la diana *sapB2* (Wang et al. 2002).

Con respecto a las diferencias entre los protocolos de PCR sobre dianas genéticas dirigidas a la detección de la especie *C. fetus*, el protocolo que peores resultados presentó

fue el protocolo de PCR convencional K16, el cual fue capaz de detectar únicamente el 65.8% de las muestras clasificadas como positivas (de acuerdo a los criterios descritos en la sección 3.4.1. *Estudio comparativo para la detección de C. fetus mediante la técnica PCR en lavados prepuciales de toros reproductores*) y para cuyo protocolo de PCR no existen hasta nuestro conocimiento publicaciones científicas posteriores a la descripción del mismo que lo hubieran empleado para la detección de *C. fetus*, lo que dificultó la discusión de estos resultados en relación a su empleo en muestras clínicas en distintos contextos. En cualquier caso, estos bajos niveles de sensibilidad podrían estar influidos por el límite de detección de dicho protocolo, entre 10 y 100 veces más alto que el resto de protocolos de PCR en tiempo real para detección de *C. fetus* evaluados, y que, a su vez, estaba al mismo nivel que el protocolo H97, el otro protocolo de PCR convencional incluida en el estudio para detección de *C. fetus*. Sin embargo, este protocolo H97 fue capaz de detectar el 75.6% de los casos positivos (un 10% más que el K16), y a diferencia del K16, ha sido ampliamente empleado (Schulze et al. 2006; Schmidt et al. 2010; Yamazaki et al. 2010; Chaban et al. 2012; Iraola et al. 2012; Guerra et al. 2014; Liu et al. 2019).

El trabajo de Chaban y colaboradores de 2012 adapta los cebadores específicos de subespecie Cfv a un protocolo en tiempo real (lo que supone una mejora con respecto al protocolo de PCR original) para la detección de esta bacteria en lavados prepuciales de toro, siendo capaz de detectar 11 de los 13 toros positivos a Cfv (Chaban et al. 2012). Guerra y colaboradores (Guerra et al., 2014) también emplearon el protocolo (Hum et al. 1997) adaptado a tiempo real del trabajo de Chaban (Chaban et al. 2012) sobre muestras clínicas. No obstante, en base a los resultados del trabajo de Chaban y colaboradores (Chaban et al. 2012), la capacidad de la diana genética *parA* para la correcta detección de Cfv puede ponerse en duda, una observación que coincide con nuestros resultados, donde

el protocolo de PCR basado en esta diana fue incluido en nuestro estudio comparativo, y debido a alta cantidad de amplificaciones inespecíficas, fue descartado como un protocolo apto para la detección de *C. fetus* en muestras clínicas. Esta idea toma fuerza tras los resultados del trabajo de Silva y colaboradores en los que esta diana genética (*para*) no parece ser exclusiva de *Cfv* (Silva et al., 2020).

De acuerdo a nuestros resultados, entre los cuatro protocolos restantes en tiempo real (C09, I16, G13 y P12), el ensayo de PCR que mejores resultados obtuvo fue el protocolo en tiempo real sonda específico P12 (protocolo de PCR basado en un protocolo de pirosecuenciación publicado en el trabajo de Persson y colaboradores (Persson et al. (2012) y adaptado para su uso en formato PCR en tiempo real en el presente estudio). La adaptación del protocolo P12 incluyó un control interno de reacción, un elemento altamente recomendado en laboratorios de diagnóstico debido a que permite detectar rápidamente si una reacción de PCR ha sido inhibida y, por lo tanto, evitar potenciales resultados falsos negativos en el diagnóstico (Rosenstraus et al. 1998). El protocolo P12 fue el más robusto para la detección de *C. fetus* en muestras de lavados prepuciales (con excelentes valores de especificidad y sensibilidad analítica), siendo capaz de detectar el 95,1% de las muestras consideradas positivas a *C. fetus*, mejorando ligeramente los resultados obtenidos con el protocolo de PCR de Graaf y colaboradores (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013) basado en la diana *nahE* para la detección de *C. fetus* [indicado por la OMSA(WOAH 2021)]. Por su parte, el protocolo de PCR identificado como G13 (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013) fue capaz de detectar el 82.9% de las muestras positivas, obteniendo a su vez muy buenos resultados en referencia a la especificidad y sensibilidad analítica de acuerdo a lo publicado en el trabajo original de Graaf y colaboradores donde se observó un 100% de sensibilidad y especificidad en la detección de *C. fetus* (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013).

La diferenciación de subespecies resultó ser más complicada. Se pudo identificar un 85,4% de las muestras positivas a *C. fetus* como Cfv con al menos un ensayo de PCR específico de subespecie. El 14,6% de las muestras positivas a *C. fetus* no fueron identificadas como Cff ni Cfv. En este punto, cabe destacar que el único protocolo de PCR empleado para la identificación de Cff, el protocolo W02 (Wang et al. 2002), presentó una sensibilidad analítica claramente baja (50.000 copias de genoma por reacción de PCR), por lo que se podría hipotetizar que la presencia de Cff podría haber pasado desapercibida debido a la falta de un protocolo de PCR más sensible y fiable, pudiendo estar siendo infravalorado el papel de Cff con relación a infertilidad en bovino.

Por otra parte, se observaron amplificaciones inespecíficas en el 33,1% del total de muestras negativas a *C. fetus* mediante secuenciación masiva. La diana *ISCfeI* mostró inespecificidades en el 6,4% del total de muestras negativas. Estas inespecificidades presumiblemente podrían ser debidas a la presencia en otras especies bacterianas de la diana genética empleada (Silva et al. 2020), lo que la convertiría en una diana poco recomendable para la detección de Cfv en muestras clínicas, pese a lo expuesto en el trabajo de Graaf y colaboradores, donde se mostraron resultados de un 97% de sensibilidad y un 100% de especificidad para la detección de Cfv (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Por otra parte, el protocolo de PCR (I12) basado en la diana *virB11*, también mostró amplificaciones inespecíficas en el 29,4% de las muestras negativas por secuenciación masiva a *C. fetus*, de nuevo posiblemente debido a la presencia de esta diana genética en otras especies (Silva et al. 2020). Pese a que el protocolo de PCR H97, basado en la diana *parA* (Hum et al. 1997) potencialmente presente en otras especies microbianas presentes en lavados prepuciales (Silva et al. 2021;2020), no presentó amplificaciones inespecíficas, la sensibilidad de la PCR, como ya se ha citado, resultó ser reducida (donde el límite de detección fue de aproximadamente 5.000 copias del genoma

de Cfv por reacción). Este resultado es muy similar a los obtenidos con el protocolo W02 para Cff, que ha sido un protocolo empleado por trabajos posteriores para la detección de Cff en muestras procedentes de cabras (Elbrissi et al. 2017) y muestras fecales de vacas lecheras (Ramonaitė et al. 2013). Una baja sensibilidad de la técnica PCR se traduciría en un potencial número de falsos negativos (Pugh et al. 2022), es por ello que en la presente memoria de tesis doctoral se consideró que ambos protocolos de PCR, H97 y W02, no serían los más apropiados para la identificación de la subespecie de *C. fetus* en muestras prepuciales de toro.

Al igual que ocurre con *C. fetus*, la detección de *T. foetus* en toros reproductores resulta ser una medida clave para el control de la presencia de *T. foetus* en los rebaños extensivos en bovino. La OMSA sugiere el empleo de un protocolo de PCR en tiempo real (sonda específica) para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros (WOAH 2018). Dicho protocolo se basa en el trabajo de McMillen y Lew (M06) (McMillen y Lew 2006) y ha sido empleado como técnica de referencia para nuestro estudio (protocolo M06), como ya fue empleado previamente (Meggiolaro et al. 2019). El protocolo de PCR M06 fue comparado con otros cuatro protocolos de PCR publicados en bases científicas [cuya diana genética también es la región multicopia ARNr-ITS, (Chakrabarti et al. 1992)]: i) protocolo M15 (Mueller et al. 2015), ii) G02 (Gookin et al. 2002), iii) G05 (Gookin et al. 2005), y iv) N02 (Nickel et al. 2002). Así mismo se compararon los protocolos de PCR disponibles basados en dianas genéticas alternativas a la región ARNr-ITS. La información a este respecto es muy limitada, cabe destacar que hasta nuestro conocimiento tan solo está descrito un único protocolo (identificado en el presente trabajo como protocolo H94) basado en la región microsatélite *TfRE* (Ho et al. 1994), para el cual apenas existe información publicada encontrándose tan solo un registro disponible (AY435432.1) en la base de datos GenBank. También existe un protocolo de PCR

basado en el gen de la beta-tubulina 1 para la detección de *T. foetus* en muestras clínicas, no obstante, se trata de un protocolo comercial para el cual no han sido publicadas las secuencias de los cebadores y sonda empleados (WOAH 2018).

El empleo de dianas genéticas alternativas a ARNr-ITS resulta interesante en el diagnóstico de *T. foetus* debido a que esta región parece ser altamente similar a la presente en otras especies como *Tritrichomonas mobilensis* (Dąbrowska et al. 2019a). De hecho, los resultados de la presente memoria de tesis doctoral mostraron (mediante secuenciación Sanger del producto de PCR) cómo el uso del par de cebadores TFIT-F/TFITS-R del protocolo G02 (Gookin et al. 2002) podía presentar reacciones cruzadas con *Simplicimonas* spp. Anteriormente, Frey y colaboradores (Frey et al. 2017) habían mostrado unos resultados muy similares a los descritos en el presente trabajo observando reacciones cruzadas con *Simplicimonas* spp. en muestras vaginales de vacas (usando una técnica PCR basada en ARNr-ITS con el empleo de un par diferente de cebadores). Estos datos refuerzan la idea de que la región ARNr-ITS podría ofrecer amplificaciones inespecíficas que dieran lugar a falsos positivos, disminuyendo el rendimiento diagnóstico de estos protocolos de PCR basados en dicha región genómica y siendo interesante el empleo de regiones alternativas para la confirmación de casos positivos en casos de sospecha de falsos positivos.

Debido a la poca información encontrada en referencia al empleo de dianas alternativas de PCR, se añadió, como objetivo complementario, el diseño de una PCR en tiempo real con empleo de sonda específica (protocolo V21) basada en la diana genética *EF1-alpha-Tf1*. Esta diana molecular ha sido previamente empleada como diana de la técnica LAMP publicada en el trabajo de Oyhenart (Oyhenart 2018). Estos autores observaron que dicha técnica LAMP era capaz de detectar 0.5 trofozoitos/mL en lavados prepuciales de toros, no observando reacciones inespecíficas, lo que convertía a *EF1-alpha-Tf1* en una diana

aparentemente adecuada para la detección de *T. foetus* en muestras clínicas procedentes de toros. Esta es una diana genética para la que no hay apenas información publicada en bases de datos; el trabajo de Oyhenart basa el diseño de la técnica LAMP en la secuencia HM217356.1 de GeneBank, única secuencia disponible para esta región del genoma de *T. foetus* (Malik et al. 2011), y sobre la que se diseñó el protocolo de PCR V21, incluido en el estudio comparativo mostrado en el Artículo 4 de la presente memoria de tesis.

Los protocolos M15 y G05 mostraron un alto grado de concordancia con el protocolo de referencia M06 (Coeficiente kappa de Cohen = 0,958 y 0,948, respectivamente). A este respecto es interesante destacar que mientras que los cebadores empleados en el protocolo M15 (basado en el trabajo previo de Felleisen y colaboradores, 1998) han sido ampliamente empleados en otros trabajos para la identificación de *T. foetus* (Casteriano et al. 2016; Dąbrowska et al. 2019a), apenas se encontró información sobre los cebadores empleados en el protocolo G05, habiéndose identificado un único protocolo que los empleaba (Tolbert et al. 2012). Por otra parte, el protocolo G02 (Coeficiente kappa de Cohen = 0,587; PPV = 0,6) presentó un alto porcentaje de amplificaciones inespecíficas (18.6%) presumiblemente debido a reacciones cruzadas con *Simplicimonas* spp. Por el contrario, el protocolo N02 (Coeficiente kappa de Cohen = 0,700; NPV = 0,87) presentó presuntos falsos negativos debido a la elevada cantidad de muestras positivas a *T. foetus* con el protocolo de referencia (que, sin embargo, fueron negativas mediante este protocolo de PCR. No obstante, la falta de estudios diagnósticos que hagan uso de los protocolos G02 y N02 dificultó una discusión apropiada acerca de su utilidad para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros. En base a nuestros resultados, ambos protocolos serían herramientas poco adecuadas para la detección de *T. foetus* en lavados prepuciales procedentes de toros reproductores.

En referencia al uso de dianas alternativas a ARNr-ITS, el protocolo H94 mostró un elevado grado de concordancia con el protocolo de referencia (Coeficiente kappa de Cohen = 0,986; PPV = 1 y NPV = 0,99), para el que no se detectaron reacciones inespecíficas en contraste a lo indicado en el estudio previo de Felleisen et al. (Felleisen et al. 1998), pero muy similar a lo indicado por Riley et al. (Riley et al. 1995). De igual modo, el protocolo V21, diseñado en la presente tesis, mostró un elevado grado de concordancia con el protocolo de referencia M06 (Coeficiente kappa de Cohen = 0,967; PPV = 1 y NPV = 0,98), para el que tampoco fueron detectadas reacciones inespecíficas. Es por ello por lo que los protocolos H94 y V21 parecen ser la opción más adecuada para la confirmación de casos positivos a *T. foetus* en muestras prepuciales de toros. Pese a que la sensibilidad analítica de V21 resultó ser un orden de magnitud menor que H94 (V21 fue capaz de detectar 5,75 copias de genoma de *T. foetus* por reacción), V21 es una técnica PCR en tiempo real (sonda específica), lo que la convierte en un método de detección más rápido que el empleo del protocolo H94 (protocolo convencional de PCR), y que además permite el uso de un control interno de reacción, asegurando así una fiabilidad mayor en la implementación de la técnica en muestras clínicas, minimizando el riesgo de obtener falsos negativos que se interpreten como un resultado válido.

En definitiva, con el fin de poner de manifiesto las limitaciones detectadas en el marco del diagnóstico molecular de *C. fetus* y *T. foetus* y presentar alternativas para su solución, a continuación se exponen de manera concisa los hallazgos más relevantes del trabajo de investigación realizado en dicho ámbito en el contexto de la presente tesis doctoral:

- i) La propuesta de un nuevo protocolo de PCR en tiempo real que hace uso de una sonda específica para la detección de *C. fetus* (Artículo 3) basado en la adaptación de un protocolo de pirosecuenciación (sobre el gen *gyrB*) previamente publicado (Persson et al. 2012), podría mejorar el rendimiento diagnóstico en referencia a los protocolos

- de PCR más comúnmente empleados (WOAH 2021), siendo capaz de detectar el 95,1% de las muestras consideradas positivas a *C. fetus*, frente al 82,9% obtenido con el protocolo de PCR (G13) indicado por la OMSA, basado en la diana *nahE* (WOAH 2021).
- ii) La evaluación de la especificidad de las técnicas de PCR para *C. fetus* demostró la existencia de reacciones inespecíficas en los protocolos de PCR dirigidos sobre las dianas *ISCfe1* y *VirB11*, específicas de la subespecie Cfv pero presumiblemente presentes en otras especies (Silva et al. 2020, 2021), poniendo de manifiesto la necesidad de establecer protocolos fiables para la diferenciación de subespecies con el fin de poder esclarecer el verdadero papel de la subespecie Cff en la infertilidad en bovino (Cagnoli et al. 2020) [cuyo papel al respecto no está claro hasta la fecha (Mshelia et al. 2010; Van Der Graaf-Van Bloois et al. 2014; Cagnoli et al. 2020; WOAH 2021)], así como del verdadero potencial zoonótico de Cfv y Cff (Wagenaar et al. 2014).
- iii) La región genómica ARNr-ITS ha sido planteada como una diana con posibles limitaciones de especificidad para la detección mediante PCR de *T. foetus* en muestras prepuciales (WOAH 2018), pudiendo dar lugar a resultados falsos positivos (Frey et al. 2017; Dąbrowska et al. 2019a). Por ello, la existencia de dianas genéticas alternativas para la confirmación de casos positivos se postulaba como una necesidad que debía ser abordada en la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros. Debido a la escasez de dianas de PCR alternativas, en el trabajo expuesto en la presente memoria de tesis doctoral se diseñó una nueva PCR en tiempo real que incluía una sonda específica (V21) para la detección de *T. foetus* (Artículo 4) basada en el gen *EF1-alfa-Tf1*. Dicha diana genética ha sido previamente empleada para la detección de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros mediante la técnica LAMP y

con la que se obtuvieron buenos resultados en referencia a su sensibilidad (0,5 trofozoitos/mL) y especificidad (al no obtenerse amplificaciones con muestras que contenían *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp., protozoos comúnmente confundidos con *T. foetus*) (Oyhenart 2018). De acuerdo con los resultados obtenidos, el protocolo V21 mostró una concordancia muy elevada con la PCR de referencia (coeficiente kappa de Cohen= 0,967, VPP=1 y VPN=0,98), que, junto con el hecho de tratarse de una PCR en tiempo real con un control interno de reacción para detectar inhibiciones (y por tanto minimizar resultados falsos negativos), lo convierten en un protocolo de PCR muy prometedor para la confirmación de casos positivos a *T. foetus* en muestras de lavados prepuciales.

Volviendo al diagnóstico de la CGB, a pesar de la demostrada utilidad y ventajas de la detección de Cfv mediante técnicas de PCR, el cultivo sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de esta patología en ganado bovino (WOAH 2021), como ya se ha citado con anterioridad. Sin embargo, debido a que el cultivo de Cfv (agente etiológico de la CGB) presenta una limitada sensibilidad en muchos escenarios (Chaban et al. 2013; Monke et al. 2002; Koya 2016), existen muchos laboratorios de diagnóstico donde no se emplea el cultivo para la detección de Cfv en muestras prepuciales. Así, aunque se han descrito diferentes estrategias para maximizar el aislamiento de Cfv a partir de muestras prepuciales de toros (Lander 1990a, b; Hum et al. 1994; Monke et al. 2002; Chaban et al. 2013), no existe hasta la fecha un protocolo estandarizado, siendo esta falta de armonización el punto de partida para el Artículo 5. Cabe citar, además, que la mejora en el aislamiento de Cfv mediante cultivo no es relevante únicamente para el diagnóstico de CGB en toros sospechosos, sino que disponer de las cepas aisladas es fundamental para el desarrollo de autovacunas en caso necesario, la caracterización de dichos aislados

para llevar a cabo estudios epidemiológicos, de resistencia a antibióticos, factores de virulencia, etc. En este contexto, en el citado Artículo 5 (“*Time, temperature and media: the three keys to improve the recovery of Campylobacter fetus subsp. venerealis from preputial bull samples*”) se compararon distintas combinaciones de medios de transporte (evaluando también el impacto que el tiempo y la temperatura de conservación podían tener sobre la viabilidad de Cfv), medios de enriquecimiento y de aislamiento (bajo diferentes condiciones de temperatura y uso o no de filtros) con el fin de maximizar las posibilidades de aislamiento de Cfv a partir de muestras de lavado prepucial de toros.

El citado trabajo desveló varias cuestiones cruciales que se recomiendan implementar para maximizar la recuperación de Cfv a partir de este tipo de muestras ya que han demostrado mejorar significativamente la recuperación de Cfv:

- i) El empleo del medio de transporte Lander (Lander 1990b, a) modificado [el 5- fluoruracilo, debido a que en trabajos previos se ha sugerido que este compuesto puede limitar el crecimiento de *C. fetus* (Lander 1990b), se sustituyó por anfotericina B de acuerdo al protocolo empleado en publicaciones anteriores (Ballabene y Terzolo 1992; Martin et al. 2002; Murinda et al. 2006; Koya 2016)]. En esta línea, es importante destacar que el empleo de tampón PBS, a pesar de ser un medio comúnmente utilizado para el transporte de muestras, de acuerdo a nuestros resultados está totalmente desaconsejado para mantener la viabilidad de Cfv, debido al reducido número de colonias de Cfv que permite recuperar (Figura 6), de forma similar a a lo observado en trabajos previos en los que emplean otros medios salinos (Monke et al. 2002).

- ii) El mantenimiento constante de la temperatura desde la toma de muestras hasta su procesamiento en el laboratorio, ya que, de acuerdo a lo que se ha observado previamente (Koya 2016), los cambios en la temperatura de conservación limitan la supervivencia de *C. fetus* en la muestra. Asimismo, se recomienda mantener la muestra preferiblemente a temperatura ambiente ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) frente a refrigeración (4°C). Este es un punto importante a considerar por los veterinarios clínicos, así como por los laboratorios de diagnóstico, ya que la conservación de muestras de diversa naturaleza en refrigeración hasta su procesamiento para la detección de distintos patógenos para maximizar su viabilidad y evitar el sobrecrecimiento de microorganismos es un procedimiento comúnmente empleado.
- iii) El procesamiento de las muestras en el laboratorio lo antes posible tras su recogida (siempre en menos de 24h) para evitar obtener resultados falsos negativos. Así, los resultados obtenidos cuando los ensayos se llevaron a cabo en 48h en el experimento 1 revelaron la práctica ausencia de recuperación de Cfv, en consonancia con la previamente referida escasa capacidad de supervivencia de este microorganismo fuera del hospedador (Monke et al. 2002; Chaban et al. 2013).
- iv) El empleo del medio de enriquecimiento Preston (Bolton y Robertson 1982), que, de acuerdo a los resultados del experimento 2 del Artículo 5, permitió la recuperación de Cfv en el 100% de los casos, mostrando así mismo los recuentos más altos (siempre por encima de las 300 UFC), independientemente del medio de cultivo sólido empleado tras el enriquecimiento (Figura 7A).

En términos de enriquecimiento de la muestra, cabe citar que el medio Brucella también podría considerarse una alternativa válida, dado que el número de colonias de Cfv recuperadas que se observó en los ensayos fue elevado (Figura 7A), especialmente cuando se combinaba con la siembra en medio sólido de cultivo no selectivo SBA (mediana UFC = 222), siendo este recuento inferior cuando se empleaban medios de específicos (mediana UFC en medio Skirrow = 109, mediana UFC en medio Prestor agar = 86). Cabe citar que dicho medio Brucella empleado en este trabajo se modificó ligeramente en relación a la receta descrita por Marcelino y colaboradores en 2015 (Marcellino et al. 2015): la cicloheximida fue sustituida por anfotericina B dada su acción potencialmente tóxica sobre *C. fetus* (Martin et al. 2002; Murinda et al. 2006; Koya 2016) y la polimixina B fue eliminada dada su potencial capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas cepas de *C. fetus* (Ballabene y Terzolo 1992)]. Es pertinente señalar que, a pesar de las diferencias de recuperación de Cfv observadas en los tres medios sólidos de cultivo a partir del medio de enriquecimiento Brucella en el experimento 2, se decidió incluir los tres medios de cultivo en los ensayos del experimento 3 (realizado con clínicas muestras de lavados prepuciales experimentalmente contaminados con Cfv). Esto vino justificado porque, por un lado, con el medio Preston, el que mostró los mejores resultados y por tanto fue elegido como medio de transporte para el experimento 3, no se pudieron observar diferencias entre los tres medios de cultivo dado el elevado crecimiento detectado en todos ellos, y por otro lado, porque la recuperación de Cfv en el experimento 3, al realizarse en muestras clínicas, se esperaba que pudiera verse afectada por el crecimiento de microorganismos diferentes a Cfv

presentes naturalmente en los lavados prepuciales, y por ello, podrían esperarse resultados distintos dependiendo del medio sólido de cultivo empleado, como confirmaron los resultados obtenidos (discutidos más adelante).

Para cerrar las cuestiones relativas a los medios en enriquecimiento, es pertinente destacar que el medio Bolton, a pesar de que se emplea comúnmente para el enriquecimiento de muestras de agua y alimentos para recuperación de diferentes especies del género *Campylobacter* (Hunt et al. 2021), de acuerdo a nuestros resultados, ha demostrado no ser útil para el aislamiento de Cfv a partir de muestras de lavados prepuciales, dado que no se observó recuperación de colonias con el uso del mismo (Figura 7A).

- v) La incubación de las placas de medios sólidos de cultivo a 37°C. En el experimento 3 se evaluó la incubación tanto a 37°C como a 42°C, esta última opción como alternativa para incrementar la sensibilidad de recuperación de Cfv, dado que ciertas cepas de este patógeno (incluyendo la empleada en los tres experimentos del Artículo 5) son capaces de crecer a 42°C, mientras que muchos microorganismos que puedan estar presentes en las muestras de lavados prepuciales pueden ver reducida o incluso eliminada su capacidad de crecimiento a esa temperatura. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que incubación a 42°C no redujo de forma notable el crecimiento de microorganismos contaminantes, mientras que sí disminuyó significativamente la probabilidad de aislamiento de Cfv (Tabla 6 y Figura 7B), especialmente cuando se combinaba con el uso de filtración previa a la siembra de la muestra en el medio sólido de cultivo [otro de los abordajes dirigidos a limitar el crecimiento de contaminantes y que ya se había señalado

en trabajos previos que podía limitar la recuperación de *C. fetus* (Clark et al. 1974)]. Además, teniendo en cuenta que no todas las cepas de Cfv son capaces de crecer a 42°C, la incubación a esta temperatura podría contribuir a obtener resultados falsos negativos incluso con muestras clínicas con un bajo nivel de presencia de se desaconseja la incubación a 42°C.

- vi) El empleo de los medios de cultivo sólido selectivos Bolton o Skirrow preferiblemente sin filtración pasiva previa de la muestra o, en su caso, empleando filtros de 0,65 µm.

Respecto al empleo de filtración del medio de enriquecimiento previo a su cultivo en el medio sólido empleando filtros de 0,45 µm o 0,65 µm, cabe citar que es una estrategia que ha demostrado previamente su capacidad para reducir la presencia de microorganismos contaminante y protocolos de aislamiento de Cfv y otras especies del género *Campylobacter* (Chaban et al. 2013). En consonancia con ello, los resultados obtenidos con el grupo de grupo 1 de muestras del experimento 3 del Artículo 5 demostraron que el uso de filtros de 0,45 µm disminuía significativamente el crecimiento de contaminantes en las placas de medio de cultivo (Tabla 6), si bien también disminuía la probabilidad de recuperación de Cfv. Por ello, el uso de filtros de 0,45 µm estaría desaconsejado de acuerdo a los resultados obtenidos.

El uso de medio de cultivo sólido no selectivo SBA estaría desaconsejado, ya que, aunque los resultados obtenidos con el grupo 1 de muestras mostraron que la capacidad de recuperación de Cfv (100% sin el uso de filtros, 87,5% con filtros de 0,65 µm) fue similar a la obtenida con medios sólidos selectivos (100% tanto sin el uso de filtros como con el uso de filtros de 0,65 µm), se observó un alto porcentaje de contaminaciones (Tabla 6).

Por otro lado, en lo que respecta a los medios de cultivo sólido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de aislamiento de Cfv en los resultados obtenidos con ambos grupos de muestras del experimento 3 (grupo 1 y grupo 2) entre los dos medios selectivos evaluados (Tabla 6), teniendo en cuenta el efecto de la temperatura y el uso de los filtros. Por tanto, ambos medios, Preston y Skirrow, serían adecuados para el aislamiento de Cfv a partir de muestras de lavados prepucciales. Estos resultados no coinciden con lo descrito por Chaban y colaboradores (Chaban et al. (2013), donde la mejor opción para la recuperación de Cfv fue el empleo de filtros de 0,65 de poro empleando el medio de cultivo no selectivo SBA, en comparación con el uso de medio Skirrow sin filtración previa de la muestra. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el trabajo de Chaban y colaboradores se realizaba la siembra del lavado prepuccial directamente en el medio sólido de cultivo, sin pasar por un protocolo previo de transporte y enriquecimiento, por lo que los resultados no son plenamente comparables.

De forma resumida, de acuerdo a los resultados obtenidos en el Artículo 5 se recomienda que para el aislamiento de Cfv a partir de muestras de lavados prepucciales de toros la muestra se transporte en el medio Lander, conservándose a temperatura constante hasta su procesamiento en el laboratorio (preferiblemente a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) que en refrigeración (4°C), en un tiempo máximo de 24h tras la toma de muestra. El protocolo de cultivo en el laboratorio incluiría un paso previo en enriquecimiento en medio líquido Preston incubado a 37°C durante 48 h en microaerofilia, seguido del cultivo en los medios sólidos selectivos Preston o Skirrow, con una incubación de 4 días a 37°C en condiciones de microaerofilia. Si bien la filtración de la muestra enriquecida previa a

su cultivo en medio sólido empleando filtros de 0,65 μm de poro ha demostrado que puede reducir el crecimiento de microorganismos contaminantes en las placas de medio sólido, su posible efecto sobre la sensibilidad de aislamiento de Cfv en determinados escenarios ha de tenerse en cuenta a la hora de decidir o no incluir este paso en los protocolos de aislamiento.

6. CONCLUSIONES

1. La información publicada sobre el papel del toro en los problemas de infertilidad infecciosa bovina es muy limitada, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar más estudios en este ámbito que permitan esclarecer el papel de los agentes infecciosos implicados en los problemas reproductivos de origen infeccioso con el fin de establecer medidas de prevención y manejo así como herramientas de diagnóstico.
2. La metagenómica es un abordaje metodológico válido para revelar la presencia de géneros y especies bacterianas, previamente ignoradas o infravaloradas, que puedan jugar un papel relevante en la infertilidad bovina.
3. El protocolo desarrollado en la presente tesis doctoral a partir de un protocolo de pirosecuenciación publicado previamente basado en el gen *gyrB* (Persson et al., 2012) es la mejor alternativa técnica, en términos de rendimiento diagnóstico, para la detección molecular de *Campylobacter fetus* en muestras de lavados prepuciales de toros.
4. Hoy en día existen importantes limitaciones en las alternativas diagnósticas basadas en la técnica PCR publicadas para la diferenciación de subespecies *C. fetus*, lo que dificulta aclarar la relevancia que estas subespecies pueden tener en la infertilidad del toro.
5. Los protocolos de Nickel et al., 2002 y de Gooking et al., 2002 son inadecuados para la identificación molecular de *Trichichimonas foetus* a partir de muestras de lavados prepuciales de toros dados los problemas de sensibilidad y especificidad diagnósticas que, respectivamente, que presentan.

6. El protocolo de PCR en tiempo real basado en la diana genética *EFl-alpha-Tfl* desarrollado en la presente tesis para la identificación molecular de *Trichichimonas foetus*, así como el protocolo descrito por Ho y colaboradores (1994) basado en el microsatélite *TfRE*, han demostrado ser alternativas adecuadas para la confirmación de resultados dudosos obtenidos a partir de protocolos de PCR basados en la región genómica rRNA ITS.
7. El protocolo más adecuado para maximizar las probabilidades de aislamiento de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* a partir de muestras de lavados prepuciales de toros consiste en el empleo del medio de transporte Lander, conservando la muestra a temperatura constante hasta su procesamiento en el laboratorio [preferiblemente a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)], en un tiempo máximo de 24 horas, continuando con un paso de enriquecimiento en medio líquido Preston incubado a 37°C durante 48 h en microaerofilia, seguido de la siembra en los medios sólidos selectivos Preston o Skirrow, preferiblemente sin filtración previa, incubados durante 4 días a 37°C en microaerofilia.

7. CONCLUSIONS

1. The information published about the role of the bull in bovine infectious infertility is limited, which highlights the need for more studies in this area to clarify the role of infectious agents involved in reproductive problems due to infections in order to establish prevention and management measures, as well as diagnostic tools.
2. Metagenomics is a valid methodological approach to reveal the presence of bacterial genera and species, previously ignored or underestimated, that may play a relevant role in bovine infertility.
3. The protocol developed in this doctoral thesis from a previously published pyrosequencing protocol based on the *gyrB* gene (Persson et al., 2012) is the best alternative, in terms of diagnostic performance, for the molecular detection of *Campylobacter fetus* on preputial bull samples.
4. There are still important limitations in diagnostic alternatives based on PCR assay published for the differentiation of *C. fetus* subspecies, which makes it difficult to clarify the relevance that these subspecies may have in bull infertility.
5. The protocols of Nickel et al., 2002 and Gooking et al., 2002 are inadequate for the molecular identification of *Trichichimonas foetus* from preputial bull samples due to the limitations of diagnostic sensitivity and specificity that, respectively, they present.
6. The real-time PCR protocol based on the genetic target *EF1-alpha-Tf1* developed in this thesis for the molecular identification of *Trichichimonas foetus*, as well as the protocol described by Ho et al. (1994) based on the microsatellite *TfRE*, have proven to be adequate

Conclusions

alternatives for the confirmation of doubtful results obtained from PCR protocols based on the rRNA-ITS genomic region.

7. The most appropriate protocol to maximize the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from bull preputial samples consists of the use of Lander's transport medium, keeping the sample at constant temperature until its processing in the laboratory [preferably at room temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)], up to 24 hours, following with an enrichment step in Preston liquid medium incubated at 37°C for 48 h in microaerophilia, followed by culture in Preston or Skirrow selective agar media, preferably without prior filtration, incubated for 4 days at 37°C in microaerophilia.

8. REFERENCIAS

- Abdel-Glil MY, Hotzel H, Tomaso H, Linde J (2020) Phylogenomic analysis of *Campylobacter fetus* reveals a clonal structure of insertion element *ISCfe1* positive genomes. *Front Microbiol* 11:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585374>
- Abril C, Vilei EM, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R. (2007) Discovery of insertion element *ISCfe1*: A new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin Microbiol Infect* 13:993–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01787.x>
- Adnane M, Chapwanya A (2022) A Review of the Diversity of the Genital tract microbiome and implications for fertility of cattle. *Animals* 12:1–14. <https://doi.org/10.3390/ani12040460>
- AEMET (2022) Informe de la Agencia Estatal de Meteorología: Olas de calor cada vez más intensas y frecuentes. https://www.aemet.es/es/noticias/2019/07/Olas_de_calor_mas_intensas_y_frecuentes (acceso online 11/01/2023)
- Ahmad HI, Ahmad MJ, Jabbar F, Ahmar S, Ahmad N, Elokil AA and Chen J (2020) The Domestication makeup: Evolution, survival, and challenges. *Front Ecol Evol* 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00103>
- Ahuja AK, Cheema RS (2018) Homology between cattle bull sperm and bacterial antigenic proteins viz a viz possible role in immunological infertility. *Reprod Domest Anim* 53:1530–1538. <https://doi.org/10.1111/rda.13292>
- Alonso J, Bahamonde A, Villa A, Castañón ÁR (2007) Morphological assessment of beef cattle according to carcass value. *Livest Sci* 107:265–273. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.09.027>
- Alzuguren O, Baselga C, Chacón G (2020) Diagnóstico de problemas reproductivos en el ganado vacuno. *rumiNews Septiembre*:60–69. <https://rumiantes.com/diagnostico-de-problemas-reproductivos-en-el-ganado-vacuno/> (acceso online 11/01/2023)
- Aubry P, Warnick LD, DesCôteaux L, Bouchard É (2008) A study of 55 field cases of uterine torsion in dairy cattle. *Can Vet J* 49:366–372. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2275340/pdf/cvj49pg366.pdf>
- Ballabene NC, Terzolo HR (1992) [Evaluation of antimicrobial drugs and atmospheres for the isolation of *Campylobacter fetus* subspp. from the bovine genital tract]. *Rev Argent Microbiol* 24:113–125. https://www.researchgate.net/publication/21852570_Evaluation_of_antimicrobial_drugs_and_atmospheres_for_the_isolation_of_Campylobacter_fetus_subsp_from_the_bovine_genital_tract (acceso online 11/01/2023)
- Balzan C, Ziech RE, Gressler LT, de Vargas APC (2020) Bovine genital campylobacteriosis: Main features and perspectives for diagnosis and control. *Cienc Rural* 50:. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190272>
- Bastos BF, de Almeida FM, Brener B (2019) What is known about *Tritrichomonas foetus* infection in cats? *Rev Bras Parasitol Vet* 28:1–11. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019005>
- Bellenger CR (1971) A comparison of certain parameters of the penis and prepuce in various breeds of beef cattle. *Res Vet Sci* 12:299–304. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)34152-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34152-3)

- Bharti R, Grimm DG (2021) Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief Bioinform* 22:178–193. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz155>
- Biomérieux (2022) Columbia agar + 5% sheep blood. <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/30-columbia-agar+-5-percent-sheep-blood>
- Bolton FJ, Robertson L (1982) A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol* 35:462–467. <https://doi.org/10.1136/jcp.35.4.462>
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang K, Bin Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik A V, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brooks BW, Devenish J, Lutze-Wallace CL, Milnes D, Robertson RH, Berlie-Surujballi G. (2004) Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet Microbiol* 103:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.008>
- Budke CM (2002) WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern
- Butler ML, Bormann JM, Weaber RL, Grieger DM, Rolf MM (2020) Selection for bull fertility: A review. *Transl Anim Sci* 4:423–441. <https://doi.org/10.1093/TAS/TXZ174>
- Buzinhani M, Yamaguti M, Oliveira RC, Cortez BA, Marques L, MacHado-Santelli GM, Assumpção ME, Timenetsky J (2011) Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozooids. *BMC Res Notes* 4:0–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-455>
- Cagnoli CI, Chiapparrone ML, Cacciato CS, Rodríguez MG, Aller JF, Catena M del C (2020) Effects of *Campylobacter fetus* on bull sperm quality. *Microb Pathog* 149:. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104486>
- Calleros L, Betancor L, Iraola G, Méndez A, Morsella C, Paolicchi F, Silveyra S, Velilla A, Pérez R (2017) Assessing the intra-species genetic variability in the clonal pathogen *Campylobacter fetus*: CRISPRs are highly polymorphic DNA markers. *J Microbiol Methods* 132:86–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.012>
- Carli, SD, Dias ME, da Silva MERJ, Breyer GM and Siqueira FM (2022). Survey of beef bulls in Brazil to assess their role as source of infectious agents related to cow infertility. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(1), 54–60. <https://doi.org/10.1177/10406387211050636>
- Cesoniene L, Dapkiene M, Sileikiene D (2019) The impact of livestock farming activity on the quality of surface water. *Environ Sci Pollut Res* 26:32678–32686.

- <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3694-3>
- Chaban B, Chu S, Hendrick S, Waldner C, Hill JE (2012) Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Can J Vet Res* 76:166–173
- Chaban B, Garcia Guerra A, Hendrick SH, Waldner CL, Hill JE (2013) Isolation rates of *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* from bovine preputial samples via passive filtration on nonselective medium versus selective medium, with and without transport medium. *Am J Vet Res* 74:1066–1069. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.8.1066>
- Chaban B, Musil KM, Himsforth CG, Hill JE (2009) Development of *cpn60*-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 75:3055–3061. <https://doi.org/10.1128/AEM.00101-09>
- Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR, Yowell CA (1992) Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 52:75–83. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90037-K](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90037-K)
- Clark BL, Monsborough MJ, Dufty JH (1974) Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Campylobacter fetus* subsp. *intermedius* from the preputial secretions of bulls. *Australian Vet J* 50:324
- Cojkic A, Niazi A, Guo Y, Hallap T, Padrik P, Morrell JM (2021) Article identification of bull semen microbiome by 16S sequencing and possible relationships with fertility. *Microorganisms* 9:1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122431>
- Collantes-Fernández E, Moreno-Gonzalo J, Sánchez-Sánchez R, García-Bocanegra I, Horcajo P, Ortega-Mora LM (2019) Prevalence of bovine trichomonosis and associated risk factors in bulls from Spanish beef herds. *Theriogenology* 128:116–121. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.030>
- Cortinovis C, Caloni F (2015) Alkaloid-containing plants poisonous to cattle and horses in Europe. *Toxins (Basel)* 7:5301–5307. <https://doi.org/10.3390/toxins7124884>
- Cusack DF, Kazanski CE, Hedgpeth A, Chow K, Cordeiro AL, Karpman J, Ryals R (2021) Reducing climate impacts of beef production: A synthesis of life cycle assessments across management systems and global regions. *Glob Chang Biol* 27:1721–1736. <https://doi.org/10.1111/gcb.15509>
- Czerkawski JW, Dargie JD, Edqvist L-E, Jayasuriya MCN (2013) Animal production and health. *FAO* 2013:9–12. <https://www.iaea.org/sites/default/files/publications/magazines/bulletin/bull26-2/26205780912.pdf> (acceso online 11/01/2023)
- D’Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G (2019) Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology* 125:277–284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>
- Dąbrowska J, Karamon J, Kochanowski M, Gottstein B, Cencek T, Frey CF, Müller N (2019a) Development and comparative evaluation of different LAMP and PCR assays for coprological diagnosis of feline tritrichomonosis. *Vet Parasitol* 273:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.07.014>
- Dąbrowska J, Karamon J, Kochanowski M, Sroka J, Zdybel J, Cencek T (2019b) *Tritrichomonas foetus* as a causative agent of tritrichomonosis in different animal hosts. *J Vet Res* 63:533–541. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0072>
- Dąbrowska J, Keller I, Karamon J, Kochanowski M, Gottstein B, Cencek T, Frey CF, Müller N

- (2020) Whole genome sequencing of a feline strain of *Tritrichomonas foetus* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates. *Int J Parasitol* 50:227–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.12.007>
- de Andrade Rosa I, de Souza W, Benchimol M (2013) High-resolution scanning electron microscopy of the cytoskeleton of *Tritrichomonas foetus*. *J Struct Biol* 183:412–418. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.07.002>
- de Lisled GW, Stephens DJ, Bird MME (1982) Letters to the editor: transport media for *Campylobacter fetus venerealis*. *N Z Vet J* 30:31–32. <https://doi.org/10.1080/00480169.1982.34870>
- de Rensis F, Scaramuzzi RJ (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. *Theriogenology* 60:1139–1151. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00126-2)
- Delpiazzo R, Barcellos M, Barros S, Betancor L, Fraga M, Gil J, Iraola G, Morsella C, Paolicchi F, Pérez R, Riet-Correa F, Sanguinetti M, Silva A, da Silva Silveira C, Calleros L (2021) Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a *16SrRNA* gene sequence. *Vet Anim Sci* 11:. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100163>
- Devenish J, Brooks B, Perry K, Milnes D, Burke T, McCabe D, Duff S, Lutze-Wallace CL (2005) Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:1261–1268. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.11.1261-1268.2005>
- Díaz JM, Prieto A, López G, Díaz P, López C, Quintela L, Morrondo P, Fernández G (2019) Association of *Ureaplasma diversum* with reproductive disease in cattle. *N Z Vet J* 67:249–256. <https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1623733>
- Diskin MG, Lonergan P, Kenny DA, Fair S (2018) International Bull Fertility Conference - Theory to Practice, Westport, Ireland, 2018. *Animal* 12:s1–s3. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001155>
- Dixon DM, McNeil MM, Cohen ML, Gellin BG, La Montagne JR (1996) Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep* 111:226–235
- Dorsch MA, Casaux ML, Calleros L (2022) Placentitis and abortion caused by a multidrug resistant strain of *Campylobacter fetus* subspecies fetus in a sheep in Uruguay. *Rev Argent Microbiol* 54:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.005>
- Dudek K, Nicholas RAJ, Szacawa E, Bednarek D (2020) Mycoplasma bovis infections— Occurrence, diagnosis and control. *Pathogens* 9:1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080640>
- Ďuračka M, Galovičová L, Kačániová M, Lukáč N, Tvrdá E (2021) The effect of *Enterococcus faecium* -induced in vitro infection in bovine semen. *Anim Sci Biotechnol* 54:80–85
- El-Mohamady RS, Behour TS, Rawash ZM (2020) Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. *Int J Vet Sci Med* 8:106–114. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850197>
- Elbrissi A, Sabeil YA, Khalifa KA, Enan K, Khair OM, El Hussein AM (2017) Isolation, identification and differentiation of *Campylobacter* spp. using multiplex PCR assay from goats in Khartoum State, Sudan. *Trop Anim Health Prod* 49:575–581. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1231-x>
- ELSEVIER (2021) Release notes for Mendeley Desktop v1.19.8. https://www.mendeley.com/release-notes/v1_19_8

- Embley TM, Van Der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Foster P, Tielens AGM, Martin W, Tovar J, Douglas AE, Cavalier-Smith T, Barbrook A, Allen JF, Lane N (2003) Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 358:191–203. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1190>
- Endres MI, Schwartzkopf-Genswein K (2017) Overview of cattle production systems. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100938-3.00001-2>
- Erickson NEN, Lanigan E, Waugh T, Gesy K, Waldner C (2017) Evaluation of long-acting oxytetracycline and a commercial monovalent vaccine for the control of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* infection in beef bulls. *J Vet Med B Infect Dis Vet* 58:1051–1058
- Esslemont RJ, Kossaibati MA, Allcock J (2001) Economics of fertility in dairy cows. *BSAP Occas Publ* 26:19–29. <https://doi.org/10.1017/s0263967x00033565>
- Eurostat (2021) Agricultural production - livestock and meat. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat&oldid=549389#Meat_production. Accessed 21 Sep 2022
- Felleisen RSJ, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Muller N, Gottstein B, Müller N, Gottstein B (1998) Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Clin Microbiol* 36:513–519. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.513-519.1998>
- Felleisen RSJJ (1997) Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* 115:111–119. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001212>
- Ferone M, Gowen A, Fanning S, Scannell AGM (2020) Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19:3106–3129. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>
- Ferrini S, Grego E, Ala U, Cagnotti G, Valentini F, Di Muro G, Iulini B, Stella MC, Bellino C, D'Angelo A (2022) Feasibility of 16S rRNA sequencing for cerebrospinal fluid microbiome analysis in cattle with neurological disorders: a pilot study. *Vet Res Commun*. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09949-w>
- Foley GL, Schlafer DH (1987) Candida abortion in cattle. *Vet Pathol* 24:532–536. <https://doi.org/10.1177/030098588702400610>
- Fóscolo CB, Pellegrin AO, Leite RC, Stynen APR, Lage AP (2005) Vaccination of bulls against Bovine Genital Campylobacteriosis: a therapeutic approach. *Anim Reprod* 122–127
- Franzluebbbers AJ, Stuedemann JA, Franklin DH (2012) Water infiltration and surface-soil structural properties as influenced by animal traffic in the Southern Piedmont USA. *Renew Agric Food Syst* 27:256–265. <https://doi.org/10.1017/S1742170511000378>
- Frey CF, Müller N, Stäuber N, Marreros N, Hofmann L, Hentrich B, Hirsbrunner G (2017) Simplicimonas-like DNA in vaginal swabs of cows and heifers cross-reacting in the real-time PCR for *T. foetus*. *Vet Parasitol* 237:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.024>
- Gaitán E, Monjo R, Pórtoles J, Pino-Otín MR (2020) Impact of climate change on drought in Aragon (NE Spain). *Sci Total Environ* 740:140094. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140094>
- Garcia MM, Eaglesome MD, Rigby C (1983) Campylobacters important in veterinary medicine. *Vet Bull* 53:793–818

- Gerber PJ, Mottet A, Opio CI, Falcucci A, Teillard F (2015) Environmental impacts of beef production: Review of challenges and perspectives for durability. *Meat Sci* 109:2–12. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.013>
- Ginter Summarell CC, Hairgrove TB, Schroeder ME, Conley R, Bounpheng MA (2018) Improvements in *Tritrichomonas foetus* molecular testing. *J Vet Diagnostic Investig* 30:603–608. <https://doi.org/10.1177/1040638718767943>
- Givens MD (2018) Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* 12:s165–s171. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>
- Givens MD (2006) A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology* 66:648–654. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.021>
- Givens MD, Marley MSD (2008) Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology* 70:504–507. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.033>
- Gonzalez-Rodriguez F (2016) Informe el vacuno extensivo en españa. Situación, evolución y perspectivas. *Zoetis* 3–34 <https://www.ugavan.es/wp-content/uploads/2017/09/Estudio-El-vacuno-extensivo-en-Espa%C3%B1a.pdf>
- Goodman L, Lahmers K (2021) Special issue on applied next-generation sequencing in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagnostic Investig* 33:177–178. <https://doi.org/10.1177/1040638721995676>
- Gookin JL, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB, Levy MG (2002) Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J Clin Microbiol* 40:4126–4130. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4126-4130.2002>
- Gookin JL, Birkenheuer AJ, St. John V, Spector M, Levy MG (2005) Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *J Parasitol* 91:939–943. <https://doi.org/10.1645/GE-474R.1>
- Greenwood PL (2021) Review: An overview of beef production from pasture and feedlot globally, as demand for beef and the need for sustainable practices increase. *Animal* 15:100295. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100295>
- Griffith AP, Boyer CN, Jun M, Mar F, Apr M, Jan D (2017) Fall versus spring calving: Considerations and profitability comparison. *Utextension* 1–13
- Grooms DL (2004) Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20:5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
- Guerra AG, Chaban B, Hill JE, Waldner CL, Hendrick SH (2014) Clinical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay for *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* in preputial samples from bulls. *Am J Vet Res* 75:851–860. <https://doi.org/https://doi.org/10.2460/ajvr.75.9.851>
- Gwazdauskas FC (1985) Effects of climate on reproduction in cattle. *J Dairy Sci* 68:1568–1578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80995-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80995-4)
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem Biol* 5:. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Harwood LJ, Thomann A, Brodard I, Makaya P V., Perreten V (2009) *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* transport medium for enrichment and PCR. *Vet Rec* 2:507–508
- Hathaway S (2019) Rapid risk assessment *Mycoplasma bovis* in bovine semen. <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/34179-mycoplasma-bovis-in-bovine-semen-rapid-risk-assessment> (acceso online 11/01/2023)

- Hedderich R, Müller R, Greulich Y, Bannert N, Holland G, Kaiser P, Reissbrodt R (2011) Mechanical damage to Gram-negative bacteria by surface plating with the Drigalski-spatula technique. *Int J Food Microbiol* 146:105–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.005>
- Henker LC, Lorenzett MP, Lopes BC, Dos Santos IR, Bandinelli MB, Bassuino DM, Juffo GD, Antoniassi NAB, Pescador CA, Sonne L, Driemeier D, Pavarini SP (2022). Pathological and etiological characterization of cases of bovine abortion due to sporadic bacterial and mycotic infections. *Braz J Microbiol* 53(4):2251-2262. <https://doi: 10.1007/s42770-022-00853-8>.
- Herrera PM (2020) Extensive farming and climate change. An in-depth approach. 1–30. http://www.ganaderiaextensiva.org/wp-content/uploads/2020/04/Eng_CuadernoEntretantos6_GanaderiayCC.pdf
- Ho MSYY, Conrad PJA, Conrad PJA, LeFebvre RB, Perez E, BonDurant RH (1994) Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *J Clin Microbiol* 32:98–104. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.1.98-104.1994>
- Hobson N, Chousalkar KK, Chenoweth P (2013) *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: Its detection and potential effects. *Aust Vet J* 91:469–473. <https://doi.org/10.1111/avj.12113>
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Foundation of the Scandinavian Journal of Statistics Stable U. Scand J Stat* 6:65–70. <https://www.ime.usp.br/~abe/lista/pdf4R8xPVzCnX.pdf>
- Holst E, Wathne B, Hovelius B, Mårdh PA (1987) Bacterial vaginosis: Microbiological and clinical findings. *Eur J Clin Microbiol* 6:536–541. <https://doi.org/10.1007/BF02014242>
- Hopper RM (2015) *Bovine reproduction*, 2015th edn. John Wiley & Sons, Oxford, UK
- Hum S, Brunner J, McInnes A, Mendoza G, Stephens J (1994) Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* from cattle. *Aust Vet J* 71:184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb03385.x>
- Hum S, Quinn K, Brunner J, On S (1997) Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J* 75:827–831. <https://doi.org/https://doi: 10.1111/j.1751-0813.1997.tb15665.x>.
- Hunt JM, Abeyta C, Tran T (2021) *BAM Chapter 7: Campylobacter*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-7-campylobacter>
- Illumina (2013) 16S Metagenomic Sequencing Library preparation. *Illumina.com* 1–28. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Indjein L (2013) Molecular diagnostic protocols for Bovine Genital Campylobacteriosis using comparative genomics and virulence studies. 260. <https://doi.org/10.14264/uql.2016.847>
- Iraola G, Hernández M, Calleros L, Paolicchi F, Silveyra S, Velilla A, Carretto L, Rodríguez E, Pérez R (2012) Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *J Vet Sci* 13:371–376. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.4.371>
- Iraola G, Pérez R, Betancor L, Marandino A, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Piccirillo A, Tomás G, Velilla A, Calleros L (2016) A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Vet Res* 12:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0913-3>

- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36:5–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Joya MAP, Góngora A, Jiménez C (2011) Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Rev Colomb Ciencias Pecu* 24:634–646. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324723/20782099>
- Kamal R, Dutt T, Patel M, Dey A, Bharti PK, Chandran PC (2018) Heat stress and effect of shade materials on hormonal and behavior response of dairy cattle: a review. *Trop Anim Health Prod* 50:701–706. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1542-6>
- Kamei K, Asakura M, Somroop S, Hatanaka N, Hinenoya A, Nagita A, Misawa N, Matsuda M, Nakagawa S, Yamasaki S (2014) A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *J Med Microbiol* 63:659–666. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.071498-0>
- Kamei K, Kawabata H, Asakura M, Samosornsuk W, Hinenoya A, Nakagawa S, Yamasaki S (2016) A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for *Campylobacter jejuni*, *C. Fetus*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, and *C. lari*. *Jpn J Infect Dis* 69:256–258. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.182>
- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, McCann ML (2021) Difference in body weight at breeding affects reproductive performance in replacement beef heifers and carries consequences to next generation heifers. *Animals* 11:. <https://doi.org/10.3390/ani11102800>
- Kenny DA, Byrne CJ (2018) Review: The effect of nutrition on timing of pubertal onset and subsequent fertility in the bull. *Animal* 12:s36–s44. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000514>
- Kenny DA, Heslin J, Byrne CJ (2018) Early onset of puberty in cattle: Implications for gamete quality and embryo survival. *Reprod Fertil Dev* 30:101–117. <https://doi.org/10.1071/RD17376>
- Kirkbride CA (1987) Mycoplasma, ureaplasma, and acholeplasma infections of bovine genitalia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 3:575–591. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31131-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31131-2)
- Koya A (2016) Bovine Genital Campylobacteriosis: Isolation, identification and virulence profiling of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in a small animal model. School of Veterinary Science, The University of Queensland. <https://doi.org/10.14264/uql.2016.187>
- Kumar, D (2019) Next-Generation Sequencing as diagnostic tool in veterinary research. *J Anim Res* 9:797–806. <https://doi.org/10.30954/2277-940x.06.2019.1>
- LaFaunce NA, McEntee K (1982) Experimental *Mycoplasma bovis* seminal vesiculitis in the bull. *Cornell Vet* 72:150–167. <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.b4179408&view=1up&seq=161> (acceso 11/01/2023)
- Lamb HJ, Hayes BJ, Nguyen LT, Ross EM (2020) The future of livestock management: A review of real-time portable sequencing applied to livestock. *Genes (Basel)* 11:1–27. <https://doi.org/10.3390/genes11121478>
- Lander KP (1990a) The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br Vet J* 146:334–340. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(11\)80026-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(11)80026-6)

- Lander KP (1990b) The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Br Vet J* 146:327–333. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(11\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(11)80025-4)
- Laybourn-Langton L, Muhia J, El-Adawy M (2022) COP27 Climate Change Conference: urgent action needed for Africa and the world: Wealthy nations must step up support for Africa and vulnerable countries in addressing past, present and future impacts of climate change†. *Age Ageing* 51:afac235. <https://doi.org/10.1093/ageing/afac235>
- Le Mouël C, Forslund A (2017) How can we feed the world in 2050? A review of the responses from global scenario studies. *Eur Rev Agric Econ* 44:541–591. <https://doi.org/10.1093/erae/jbx006>
- Liu YH, Yamazaki W, Huang YT, Liao CH, Sheng WH, Hsueh PR (2019) Clinical and microbiological characteristics of patients with bacteremia caused by *Campylobacter* species with an emphasis on the subspecies of *C. fetus*. *J Microbiol Immunol Infect* 52:122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.009>
- Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawksworth DL, Hyde KD, Irinyi L, Jeewon R, Johnston PR, Kirk PM, Malosso E, May TW, Meyer W, Öpik M, Robert V, Stadler M, Thines M, Vu D, Yurkov AM, Zhang N, Schoch CL (2020) Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus* 11:. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Madruga ÁL, Vicente C, Vivares G (2019) Reproducción y fertilidad en vacuno de carne. *rumiNews* 55–69. <https://rumiantes.com/download/reproduccion-vacuno-carne.pdf>
- Malik SB, Brochu CD, Bilic I, Yuan J, Hess M, Logsdon JM, Carlton JM (2011) Phylogeny of parasitic parabasalia and free-living relatives inferred from conventional markers vs. *Rpb1*, a single-copy gene. *PLoS One* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020774>
- MAPA (2022) Tricomoniasis bovina. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/fichayprogramadevigilanciaycontroltricomoniasis_tcm30-561938.pdf (acceso online 11/01/2023)
- MAPA (2021) Caracterización del sector vacuno en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informecaracterizacionsectorvacunodecarne_datos2021_tcm30-553721.pdf (acceso online 11/01/2023)
- MAPA (2020) Bases zootécnicas para el cálculo del balance alimentario de nitrógeno y de fósforo. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. <https://cpage.mpr.gob.es/producto/bases-zootecnicas-para-el-calculo-del-balance-alimentario-de-nitrogeno-y-fosforo-2/> (acceso online 11/01/2023)
- MAPA (2019) Campilobacteriosis Genital Bovina. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/fichayprogramadevigilanciaycontrolcgb_tcm30-561928.pdf (acceso online 11/01/2023)
- MAPA (2018) Estudio del Sector Español de Vacas Nodrizas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. https://preservicio.mapama.gob.es/fr/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/estudionodrizas2018nipo_tcm36-109530.pdf (acceso online 11/01/2023)
- MAPA (2016) Definición y caracterización de la extensividad en las explotaciones ganaderas en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España.

- https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informesobreganaderiaextensivaenespanaoctubre2017nipo_tcm30-428264.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Marcellino RB, Morsella CG, Cano D, Paolicchi FA (2015) Eficiencia del cultivo bacteriológico y de la inmunofluorescencia en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos. *Rev Argent Microbiol* 47:183–189. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.008>
- Martin KW, Mattick KL, Harrison M, Humphrey TJ (2002) Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Lett Appl Microbiol* 34:124–129. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01058.x>
- McMillen L, Lew AE (2006a) Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet Parasitol* 141:204–215. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.012>
- Mearns R (1996) When Livestock are Good for the Environment: Benefit-Sharing of Environmental Goods and Services. <https://opendocs.ids.ac.uk/opendocs/bitstream/handle/20.500.12413/3347/Wp45.pdf?sequence=1> (acceso 11/01/2023)
- Meggiolaro MN, Roeber F, Kobylski V, Higgins DP, Šlapeta J (2019) Comparison of multiplexed-tandem real-time PCR panel with reference real-time PCR molecular diagnostic assays for detection of *Giardia intestinalis* and *Tritrichomonas foetus* in cats. *Vet Parasitol* 266:12–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.009>
- Meier S, McNaughton LR, Handcock R, Amer PR, Beatson PR, Bryant JR, Dodds KG, Spelman R, Roche JR, Burke CR (2021) Heifers with positive genetic merit for fertility traits reach puberty earlier and have a greater pregnancy rate than heifers with negative genetic merit for fertility traits. *J Dairy Sci* 104:3707–3721. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19155>
- Melletti M, Burton J (2010) Cambridge Books Online. *Choice Rev Online* 48:48-1788-48–1788. <https://doi.org/10.5860/choice.48-1788>
- Mendoza-Ibarra JA (2013) Epidemiología, impacto económico y control de la Tricomonosis Bovina en los sistemas extensivos de montaña. *Dep Sanid Anim Fac Vet Univ Complut Madrid* 154. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/23438/1/T34863.pdf> (acceso 11/01/2023)
- Michi AN, Favetto PH, Kastelic J, Cobo ER (2016a) A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* 85:781–791. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.037>
- Midlej V, Pereira-Neves A, Kist LW, Bogo MR, Benchimol M (2011) Ultrastructural features of *Tritrichomonas mobilensis* and comparison with *Tritrichomonas foetus*. *Vet Parasitol* 182:171–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.015>
- Monke HJ, Love BC, Wittum TE, Monke DR, Byrum BA (2002) Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Vet Diagnostic Investig* 14:35–39. <https://doi.org/10.1177/104063870201400107>
- Montoya-Monsalve G, Sánchez-Calabuig MJ, Blanco-Murcia J, Elvira L, Gutiérrez-Adán A, Ramos-Ibeas P (2021) Impact of overuse and sexually transmitted infections on seminal parameters of extensively managed bulls. *Animals* 11:1–13. <https://doi.org/10.3390/ani11030827>
- Moorey SE, Biase FH (2020) Beef heifer fertility: Importance of management practices and technological advancements. *J Anim Sci Biotechnol* 11:1–12.

- <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00503-9>
- Morand S (2020) Emerging diseases, livestock expansion and biodiversity loss are positively related at global scale. *Biological Conservation* 248. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108707>
- Morrell JM (2020) Heat stress and bull fertility. *Theriogenology* 153:62–67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.014>
- Mshelia GD, Amin JD, Woldehiwet Z, Murray RD, Egwu GO (2010) Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: Geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim* 45:. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01546.x>
- Mueller K, Morin-Adeline V, Gilchrist K, Brown G, Šlapeta J (2015) High prevalence of *Tritrichomonas foetus* “bovine genotype” in faecal samples from domestic pigs at a farm where bovine trichomonosis has not been reported for over 30 years. *Vet Parasitol* 212:105–110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.010>
- Murinda SE, Nguyen LT, Headrick SJ, Meleo P, Oliver SP (2006) Potential of antimicrobial agents to inhibit fungi to aid isolation of *Campylobacter*. *Foodborne Pathog Dis* 47:367–371. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(92\)90376-T](https://doi.org/10.1016/0379-6779(92)90376-T)
- NCBI (2022) Taxonomy Browser. *Campylobacter* spp. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=194&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (acceso online 11/01/2023)
- NCBI (2021) BLAST. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (acceso online 11/01/2023)
- Newcomer BW, Givens D (2016) Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. 32:425–441. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.011>
- Nickel DD, Olson ME, Schultz GA (2002) An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. *Can Vet J* 43:213–216. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339206/> (acceso online 11/01/2023)
- Noya A, Casasús I, Ferrer J, Sanz A (2019) Long-term effects of maternal subnutrition in early pregnancy on cow-calf performance, immunological and physiological profiles during the next lactation. *Animals* 9:936. <https://doi.org/doi:10.3390/ani9110936>
- WOAH (2021) Bovine genital campylobacteriosis. Chapter 3.4.4. Terrestrial manual. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf (acceso online 11/01/2023)
- WOAH (2018) Trichomonosis. Chapter 3.4.15. Terrestrial manual. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.15_TRICHOMONOSIS.pdf (acceso online 11/01/2023)
- WOAH (2019) Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Oyhenart J (2018) Direct detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle genital fluid trough loop mediated isothermal amplification of elongation factor 1 alpha 1. *Vet Parasitol* 261:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.08.011>
- Parker AM, House JK, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL (2018) Journal of veterinary internal medicine a review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med* 1241–

1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>
- Patrick ME, Gilbert MJ, Blaser MJ, Tauxe R V., Wagenaar JA, Fitzgerald C (2013) Human infections with new subspecies of *Campylobacter fetus*. *Emerg Infect Dis* 19:1678–1680. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130883>
- Pedraza-Díaz S, Arranz-Solís D, Gómez-Couso H, Fuschs L, Fort M, Rengifo-Herrera C, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM, Collantes-Fernández E (2019) Multilocus analysis reveals further genetic differences between *Tritrichomonas foetus* from cats and cattle. *Vet Parasitol* 276:108965. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108965>
- Pereira-Neves A, Benchimol M (2009) *Tritrichomonas foetus*: Budding from multinucleated pseudocysts. *Protist* 160:536–551. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.05.001>
- Persson S, Petersen HM, Jespersgaard C, Olsen KEP (2012) Real-time TaqMan polymerase chain reaction-based genus-identification and pyrosequencing-based species identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* directly on stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:6–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.029>
- Perumal P, Kumar TK, Srivastava SK, Vupru K, Srivastava SK (2013) Infectious causes of infertility in buffalo bull (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bull* 32:71. https://www.pphouse.org/upload_article/17_IJBSM_March_2013_Perumal_et_al.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Petit T, Spersger J, Rosengarten R, Aurich J (2009) Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 44:88–91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01002.x>
- Peyraud J, Macleod M (2020) Study on Future of EU livestock: how to contribute to a sustainable agricultural sector?. <https://doi.org/10.2762/3440>
- Poirier S, Rué O, Peguilhan R, Coeuret G, Zagorec M, Champomier-Vergès MC, Loux V, Chaillou S (2018) Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using gyrB amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. *PLoS One* 13:1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204629>
- Polo C, García-Seco T, Hernández M, Fernández V, Rodríguez-Lázaro D, Goyache J, Domínguez L, Pérez-Sancho M (2021) Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples. *Theriogenology* 172:300–306. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.020>
- Prevatt C, Lamb GC, Dahlen C, Mercadante VRG, Waters K (2018) What is the economic impact of infertility in beef cattle? *Edis* 2018:1–4. <https://doi.org/10.32473/edis-an208-2018>
- PRISMA (2022) PRISMA Flow Diagram. In: TRANSPARENT Report. Syst. Rev. META-ANALYSES. <https://www.prisma-statement.org//PRISMAStatement/FlowDiagram> (acceso online 11/01/2023)
- Public Health Laboratory Network (2000) *Campylobacter* infection case definition summary. *Phln* 14. https://www.health.gov.au/sites/default/files/documents/2022/06/campylobacteriosis-laboratory-case-definition_0.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Pugh J, Wilkinson D, Savulescu J (2022) Sense and sensitivity: can an inaccurate test be better than no test at all? *J Med Ethics* 48:329–333. <https://doi.org/10.1136/medethics-2021-107234>

- Putney DJ, Drost M, Thatcher WW (1988) Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30:195–209. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90169-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90169-0)
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. In: R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Ramonaite S, Rokaityte A, Tamulevičiene E, Malakauskas A, Alter T, Malakauskas M (2013) Prevalence, quantitative load and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in dairy cattle herds in Lithuania. *Acta Vet Scand* 55:87. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-87>
- Rappé MS, Giovannoni SJ (2003) The Uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57:369–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>
- Rasband W (2018) ImageJ. In: Natl. institutes Heal. Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Reichel MP, Wahl LC, Hill FI (2018) Review of diagnostic procedures and approaches to infectious causes of reproductive failures of cattle in Australia and New Zealand. *Front Vet Sci* 5:1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00222>
- Reinmann K, Müller N, Kuhnert P, Campero CM, Leitsch D, Hess M, Henning K, Fort M, Müller J, Gottstein B, Gottstein B, Frey CF (2012) *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1 alpha. *Vet Parasitol* 185:138–144. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.032>
- Rhyan JC, Wilson KL, Wagner B, Anderson ML, BonDurant RH, Burgess DE, Mutwiri GK, Corbeil LB (1999) Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Vet Pathol* 36:406–411. <https://doi.org/10.1354/vp.36-5-406>
- Riet-Correa F, Medeiros RMT, Schild AL (2012) A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. *J Appl Toxicol* 32:245–254. <https://doi.org/10.1002/jat.1754>
- Riley DE, Wagner B, Polley L, Krieger JN (1995) PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. *J Clin Microbiol* 33:1308–1313. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.5.1308-1313.1995>
- Rivera RM, Hansen PJ (2001) Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 121(1):107-15.
- Roche-Ramo JM (2021) Benefits of extensive livestock farming and organic fertilizers in the context of the European Green Deal (EGD) (IR) (information report with reference: NAT/825-EESC-2021)
- Rodríguez-Rojo PM, Roig S, López-Carrasco C, Redondo García MM, Sánchez-Mata D (2022) Which factors favour biodiversity in iberian dehesas? 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/su14042345>
- Rohr JR, Civitello DJ, Halliday FW, Hudson PJ, Lafferty KD, Wood CL, Mordecai EA (2020) Towards common ground in the biodiversity–disease debate. *Nat Ecol Evol* 4:24–33. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1060-6>
- Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, Debonville D, Spadoro JP (1998) An internal control for routine diagnostic PCR: Design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin*

- Microbiol 36:191–197. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.1.191-197.1998>
- Roux S, Matthijnsens J, Dutilh BE (2021) Metagenomics in virology. *Encycl Virol* 133–140. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20957-6>
- Rutledge J., Monson R., Northey D., Leibfried-Rutledge M. (1999) Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. *Theriogenology* 51:330. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)91889-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)91889-7)
- Rychlik W (2007) OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol* 402:35–60. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_2
- Saed OM, Al-Aubaidi JM (1983) Infertility in heifers caused by pathogenic strain of *Mycoplasma bovis*. *Cornell Vet* 73:125–130. PMID: 6839781
- San Miguel Ayanz A, Roig Gómez S, Perea R (2016) The pastures of Spain. *Pastos Rev la Soc Española para el Estud los Pastos* 46:6–39
- Rubio, A., Roig, S., 2017: Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático en los sistemas extensivos de producción ganadera en España. Oficina Española de Cambio Climático. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. https://www.miteco.gob.es/es/cambio-climatico/temas/impactos-vulnerabilidad-y-adaptacion/informe_ganaderia_extensiva_tcm30-435573.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Sanin LY, Cabrera AMZ, Morales AMT (2016) Adaptive responses to thermal stress in mammals. *Rev Med Vet (Bogota)* 121–135. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542016000100012 (acceso online 11/01/2023)
- Santos Junior MN, Macêdo Neres NS de, Campos GB, Bastos BL, Timenetsky J, Marques LM (2021) A Review of *Ureaplasma diversum*: A representative of the mollicute class associated with reproductive and respiratory disorders in cattle. *Front Vet Sci* 8:1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.572171>
- Sanz A, Revilla R, Álvarez-Rodríguez J, Rodríguez-Sánchez J., Casasús I (2013) La fertilidad de las vacas nodrizas de nuevo a examen. *Mundo Ganad* 38–44. <https://core.ac.uk/download/pdf/71401528.pdf> (acceso online 11/01/2023)
- Schmidt T, Venter EH, Picard JA (2010) Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. *J S Afr Vet Assoc* 81:87–92. <https://doi.org/10.4102/jsava.v81i2.111>
- Schulze F, Bagon A, Müller W, Hotzel H (2006) Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J Clin Microbiol* 44:2019–2024. <https://doi.org/10.1128/JCM.02566-05>
- Scimeca JM, Culbertson DE, Abee CR, Gardner WA (1989) Intestinal Trichomonads (*Tritrichomonas mobilensis*) in the natural host *Saimiri sciureus* and *Saimiri boliviensis*. *Vet Pathol* 26:144–147. <https://doi.org/10.1177/030098588902600207>
- Seyedmousavi, S., Bosco, S., De Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R., Jacobsen, I. D., Martel, A., Mignon, B., Pasmans, F., Pieckov a, E., Rodrigues, A. M., Singh, K., Vicente, V. A., Wibbelt, G., Wiederhold, N. P., & Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. *Medical Mycology*, 56, S165–S187. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>
- Shi Y, Jiang W, Ma Z, Qiu Y (2017) A case report of pulmonary tritrichomonosis in a pig. *BMC Vet Res* 13:. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1242-x>

- Silva MF, Duarte A, Pereira G, Mateus L, Lopes-da-Costa L, Silva E (2020) Assessment of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* molecular diagnosis using clinical samples of bulls. *BMC Vet Res* 16:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02634-7>
- Silva MF, Pereira AL, Fraqueza MJ, Pereira G, Mateus L, Lopes-Da-costa L, Silva E (2021) Genomic and phenotypic characterization of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* strains. *Microorganisms* 9:1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020340>
- Silveira C da S, Fraga M, Giannitti F, Macías-Rioseco M, Riet-Correa F (2018) Diagnosis of bovine genital campylobacteriosis in South America. *Front Vet Sci* 5:1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00321>
- SITRAN (2021) Estudio del sector vacuno de carne español, datos SITRAN. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/estudio_vacasnodrizas_datossitran2020_tcm30-109530.pdf (acceso online 11/01/2023)
- Skirrow M. B (1977) *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Br Med J* 9–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1631297/pdf/brmedj00470-0013.pdf> (acceso online 11/01/2023)
- Šlapeta J, Müller N, Stack CM, Walker G, Lew-Tabor A, Tachezy J, Frey CF (2012) Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int J Parasitol* 42:1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.004>
- Steffen D (1997) Genetic causes of bull infertility. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13:243–253. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30338-8](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30338-8)
- Steiner JL, Engle DM, Xiao X, Saleh A, Tomlinson P, Rice CW, Cole NA, Coleman SW, Osei E, Basara J, Middendorf G, Gowda P, Todd R, Moffet C, Anandhi A, Starks PJ, Ocshner T, Reuter R, Devlin D (2014) Knowledge and tools to enhance resilience of beef grazing systems for sustainable animal protein production. *Ann N Y Acad Sci* 1328:10–17. <https://doi.org/10.1111/nyas.12572>
- Szenci O, Sassi G, Fodor L, Molnár L, Szelényi Z, Tibold J, Mádl I, Egyed L (2016) Co-infection with Bovine Herpesvirus 4 and *Histophilus somni* significantly extends the service period in dairy cattle with purulent vaginal discharge. *Reprod Domest Anim* 51:143–149. <https://doi.org/10.1111/rda.12658>
- Taylor MA, Marshall RN, Stack M (1994) Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br Vet J* 150:73–80. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80098-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80098-3)
- Terry SA, Basarab JA, Guan LL, McAllister TA (2021) Strategies to improve the efficiency of beef cattle production. *Can J Anim Sci* 101:1–19. <https://doi.org/10.1139/cjas-2020-0022>
- Tkacz A, Hortala M, Poole PS (2018) Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples. *Microbiome* 6:1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0491-7>
- Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV (2002) Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon* 40:1635–1660. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00239-8)
- Tourtellotte ME, Lein DH (1976) Infertility of cattle caused by Mycoplasmas. *Health Lab Sci* 13:152–158
- Truysers I, Luke T, Wilson D, Sargison N (2014) Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. *BMC Vet Res* 10:1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0280-x>

- Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev V V., Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37–43. <https://doi.org/10.1038/nature02340>
- Van Bergen MAP, Dingle KE, Maiden MCJ, Newell DG, Van Der Graaf-Van Bloois L, Van Putten JPM, Wagenaar JA (2005) Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43:5888–5898. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5888-5898.2005>
- Van Borm S, Belák S, Freimanis G, Fusaro A, Granberg F, Höper D, King DP, Monne I, Orton R, Rosseel T (2015) Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? *Methods Mol Biol* 1247:415–436. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4_30
- Van Der Graaf-Van Bloois L, Miller WG, Yee E, Rijnsburger M, Wagenaar JA, Duim B (2014) Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. *J Clin Microbiol* 52:4183–4188. <https://doi.org/10.1128/JCM.01837-14>
- Van der Graaf-van Bloois L, van Bergen MAP, van der Wal FJ, de Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA (2013) Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 95:93–97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.005>
- Vasquez LA, Ball L, Bennett BW, Rupp GP, Ellis R, Olson JD, Huffman MH (1983) Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): vaccination of experimentally infected bulls. *Am J Vet Res* 44:1553–1557. PMID: 6194723
- Wagenaar JA, Van Bergen MAP, Blaser MJ, Tauxe R V., Newell DG, Van Putten JPM (2014) *Campylobacter fetus* infections in humans: Exposure and disease. *Clin Infect Dis* 58:1579–1586. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu085>
- Wallace RJ, Rooke JA, McKain N, Duthie CA, Hyslop JJ, Ross DW, Waterhouse A, Watson M, Roehe R (2015) The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics* 16:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2032-0>
- Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG (2002) Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Society* 40:4744–4747. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744>
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF (2021) Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* 39:1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
- Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JED, Van Den Berg T (2000) Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livest Prod Sci* 62:207–220. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00158-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00158-X)
- Wickware CL, Johnson TA, Koziol JH (2020) Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls. *Theriogenology* 145:231–237. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.002>
- Wolfe DF (2018) Review: Abnormalities of the bull - Occurrence, diagnosis and treatment of

- abnormalities of the bull, including structural soundness. *Animal* 12:s148–s157.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118000939>
- Yamazaki W, Taguchi M, Misawa N (2010) Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Microbiol Immunol* 54:398–404. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00233.x>
- Yao C (2013) Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *J Med Microbiol* 62:1–9.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.047365-0>
- Yoo HS (2010) Infectious causes of reproductive disorders in cattle. *J Reprod Dev* 56 Suppl:S53-60. <https://doi.org/10.1262/jrd.1056s53>
- Zago D, Canozzi MEA, Barcellos JOJ (2020) Pregnant beef cow's nutrition and its effects on postnatal weight and carcass quality of their progeny. *PLoS One* 15:1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237941>
- Zekarias T, Demissie E, Ahmed MW, Dema T, Amsalu A (2019) Non-infectious causes of infertility in dairy cows: A review. *J Reprod Infertil* 10:51–57.
<https://doi.org/10.5829/idosi.jri.2019.51.57>

9. ANEXOS

9.1. Lista de acrónimos y abreviaturas

AEMET	Agencia estatal de meteorología
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNr-ITS	Región genómica que comprende los genes que codifican para el 18S, 5.8S, y 28S ARNr y los “ <i>internal transcribed spacer</i> ” 1 y 2
CGB	Campilobacteriosis genital bovina
BOE	Boletín Oficial del Estado
BoHV	Herpesvirus bovino
BoHV-1	Herpesvirus bovino tipo 1
BoHV-4	Herpesvirus bovino tipo 4
BVDV	Virus de la diarrea bovina
Cff	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
Cft	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>testudinum</i>
Cfv	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HPG	Eje hipotalámico-pituitario-gonadal
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
IA	Inseminación artificial
IC	Intervalo de confianza
IFAT	Prueba de anticuerpos inmunofluorescentes
KCl	Cloruro de potasio
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
LH	Hormona luteinizante
LOD	Límite de detección
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España
Mab-ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas basado en anticuerpos monoclonales
NaCl	Cloruro sódico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
OR	Odds ratio
OTU	Unidad taxonómica operacional
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVA	Peso vivo adulto
sp.	Género
spp.	Especies dentro del género
subsp.	Subespecie
UE	Unión Europea
UFC	Unidad formadora de colonia

9.2. Lista de tablas

Tabla 1: Técnicas de laboratorio actualmente empleadas para la detección de *C. fetus* en muestras clínicas de toros reproductores. Esta tabla está basada en la información recogida en la OMSA (WOAH 2021) donde se indican las técnicas empleadas para este fin (Técnica): PCR, reacción en cadena de la polimerasa; IFAT, prueba de anticuerpos inmunofluorescentes; Mab-ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas basado en anticuerpos monoclonales.

Tabla 2: Pruebas bioquímicas empleadas para la diferenciación de *C. fetus* y sus subespecies de otras especies dentro del género *Campylobacter*. Tabla basada en la información recogida en el informe de la Organización de la Salud Mundial Animal (WOAH 2021), donde “+” y “-” indican la obtención de resultados positivos y negativos, respectivamente, para las pruebas: i) si presenta o no actividad oxidasa, ii) si presenta o no actividad catalasa, iii) si presenta o no crecimiento en cloruro de sodio al 3.5% (NaCl), iv) si presenta o no crecimiento en presencia de glicina al 1 % y v) si produce o no sulfuro de hidrógeno (H₂S) en un medio que contiene 0.02% de cisteína.

Tabla 3. Protocolos de PCR para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de subespecies Cfv y Cff incluidos en el estudio comparativo recogido en el Artículo 3 de la presente Tesis.

Tabla 4. Protocolos de PCR incluidos para la detección de *T. foetus* incluidos en el estudio comparativo recogido en el Artículo 4 de la presente Tesis.

Tabla 4. Composición de cada medio de transporte incluido en el estudio comparativo en un volumen final de 250 mL. Todos los compuestos fueron disueltos en agua destilada. Se indica de izquierda a derecha: Weybridge (We), Lander (La), Thomann (Th), Stuart (St) and PBS (P) con un pH final de 7.4.

Tabla 5. Composición de cada medio de enriquecimiento y de cultivo empleado en un volumen final de 250mL. Todos los compuestos fueron disueltos en agua destilada. Los medios de enriquecimiento fueron dispensados en tubos (12mL) mientras que los medios de cultivo fueron plaqueados. Se indica de izquierda a derecha: medio de enriquecimiento Preston (Pr), medio de

enriquecimiento Brucella (Br), medio de enriquecimiento Bolton (Bo), medio de cultivo Skirrow (Sk), medio de cultivo Preston (Pr-ag) y medio de sangre de oveja al 5% (SBA).

Tabla 6. Coeficientes y OR (Odd ratio) del modelo de Poisson usado para establecer la relación entre UFC observadas en el medio Skirrow dependiendo del medio de transporte y combinación de tiempo y temperatura [12RF12RT: refrigeración durante 12h (4°C) seguido de 12h a temperatura ambiente (21°C±2°C), 12RT12RF: 12h a temperatura ambiente seguido de 12h en refrigeración, 24RF: refrigeración durante 24h y 24h a temperatura ambiente]. La referencia empleada en el modelo fue: PBS y 24RT.

Tabla 7. Resultados del ensayo diagnóstico llevado a cabo con muestras prepuciales de toros enriquecidas con Cfv usando como medio de transporte Lander y preston como medio de enriquecimiento. Se muestra el porcentaje de *C. fetus* subsp. *venerealis* recuperado (% de UFC recuperado) y el porcentaje de platos contaminados (% de contaminantes) del grupo 1 de muestras (n=12) y grupo 2 (n=20) en Preston, agar sangre (SBA) y Skirrow bajo diferentes condiciones de cultivo: a 37°C o 42°C sin el empleo de filtros (Sin filtro) o con el uso de filtros de 0.65 µm o 0.45 µm. NA: condiciones no analizadas. Cada cultivo fue realizado por duplicado (cada muestra fue cultivada dos veces en paralelo).

9.3. Lista de figuras

Figura 1. Esquema morfológico de *T. foetus*. Dibujo basado en la imagen tomada por microscopía electrónica publicada en el trabajo (de Andrade Rosa et al. 2013). Se muestran los tres flagelos anteriores (FA), la membrana ondulante (MO), el axostilo (A) y el flagelo posterior (FP).

Figura 2. Cebador sentido (TFF2 5'-GCGGCTGGATTAGCTTTCTTT-3'), antisentido (TFR2 5'-GGCGCGCAATGTGCAT-3') y sonda (TRICHP2 5'-6-FAM-ACAAGTTCGATCTTTG-MGB-BHQ-3') empleadas por el trabajo de McMillen y Lew (2006) para la detección de *Trichomonas foetus* en muestras clínicas y su localización dentro de la diana ARNr-ITS (18S, 5.8S, y 28S ARNr y los 'internal transcribed spacer' 1 y 2).

Figura 3. Relación del objetivo general y las hipótesis y objetivos específicos de la presente tesis con los diferentes capítulos y artículos llevados a cabo para alcanzar dichos objetivos que den respuesta a las hipótesis planteadas. La HIPÓTESIS 1 plantea que existen microorganismos causantes de infertilidad en toros en extensivo que no se conocen o que no se consideran en los análisis diagnósticos rutinarios, a su vez la HIPÓTESIS 2 plantea el escaso número de trabajos dirigidos sobre el toro como causa de infertilidad infecciosa en rebaños, mientras que la HIPÓTESIS 3 plantea que la revisión sistemática de la literatura científica resultaría una herramienta útil para listar los patógenos descritos hasta la fecha asociados a infertilidad en toros e identificar las posibles limitaciones respecto al conocimiento sobre la importancia del toro en la fertilidad de los rebaños por causas infecciosas. Por ello se plantea el OBJETIVO ESPECÍFICO 1 para el cual se realizó el trabajo recogido en el ARTÍCULO 1 del CAPÍTULO I en el que se realiza una búsqueda sistemática de la literatura para elaborar un ranking de microorganismos asociados a infertilidad y establecer potenciales puntos clave en las lagunas sobre el conocimiento acerca del verdadero papel del macho en relación a infertilidad infecciosa. En el mismo capítulo de tesis (CAPÍTULO I), se muestra el ARTÍCULO 2 en que se realiza el estudio metagenómico (basado en el gen del *16S* del ARNr) de 1029 lavados prepuciales para la clasificación bacteriana de microorganismos potencialmente asociados a bajos índices de fertilidad en los rebaños, un trabajo enmarcado dentro del OBJETIVO ESPECÍFICO 2 orientado a dar respuesta a la HIPÓTESIS 1 y la HIPÓTESIS 4 que plantea que el empleo del análisis metagenómico sobre muestras clínicas de toros reproductores podría ser una herramienta adecuada para la identificación de patógenos asociados a problemas de fertilidad incluyendo aquellos que escapan a los controles rutinarios. La HIPÓTESIS 5 plantea que las herramientas moleculares actualmente implementadas en la detección de *C. fetus* y *T. foetus*, cultivos y PCR, presentan un margen de mejora, donde la HIPÓTESIS 6 plantea las limitaciones y susceptibilidad de mejora de la PCR para la detección de *C. fetus* y la diferenciación de Cfv y Cff en muestras prepuciales, mientras que la HIPÓTESIS 7 plantea las limitaciones para la detección de *T. foetus* mediante PCR. Por ello se establece el OBJETIVO ESPECÍFICO 3 y 4 para el cual se realizaron los trabajos recogidos en el ARTÍCULO 3 y 4 del CAPÍTULO II en el que se realizaron estudios comparativos

de protocolos modificados a partir de protocolos previamente publicados, así como de nuevos protocolos de PCR que mejoren el rendimiento diagnóstico de *C. fetus* (y diferenciación de Cfv y Cff) (ARTÍCULO 3) y *T. foetus* (ARTÍCULO 4) mediante PCR a partir de lavados prepuciales. Por último, la HIPÓTESIS 8 plantea las limitaciones del cultivo para la detección de Cfv y por tanto de la susceptibilidad de mejora en el diagnóstico de la CGB mediante esta técnica. Por ello, contemplado dentro del OBJETIVO ESPECÍFICO 5, se realizó el trabajo recogido en el ARTÍCULO 5 del CAPÍTULO III, en el que se realizó un estudio comparativo de diferentes medios y estrategias de cultivo para la recuperación de Cfv a partir de muestras prepuciales.

Figura 4. Flujo de trabajo PRISMA para la revisión sistemática de la literatura a partir de registros procedentes de bases de datos (PRISMA 2022) haciendo uso del gestor bibliográfico Mendeley Desktop 1.19.8 (ELSEVIER 2021).

Figura 5. A) Esquema del experimento realizado para la comparación de medios de transporte. (volumen final del medio de transporte de 12mL y con una concentración final de $\approx 10^4$ UFC/mL de Cfv). B) Medios de enriquecimiento y cultivo comparados, donde cada medio de enriquecimiento (con un volumen final de 12mL) se evalúa en paralelo con cada medio de cultivo y donde cada medio de enriquecimiento fue inoculado con 300 μ L del medio de transporte (con un volumen final de 12mL y con una concentración final de 10^4 UFC/mL de Cfv), incubado a 37°C durante 48h. Posteriormente 100 μ L del medio de enriquecimiento fueron sembrados en las diferentes placas de cultivo, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 4 días en microaerofilia. C) Grupo 1 de muestras de lavados prepuciales de toro (n=12) inoculadas experimentalmente (10^4 UFC/mL de Cfv) para evaluar la tasa de recuperación de Cfv bajo diferentes temperaturas de cultivo (42 y 37°C durante 4 días en microaerofilia) filtrando previamente las muestras con filtros de 0,65 μ m y 0,45 μ m de diámetro de poro así como sin el uso de filtros; D) Grupo 2 de muestras (n=20) contaminadas experimentalmente (10^4 UFC/mL de Cfv) para evaluar la tasa de recuperación de Cfv bajo diferentes temperaturas de cultivo (42 y 37°C durante 4 días en microaerofilia) filtrando previamente las muestras con filtros de 0,65 μ m y sin el uso de filtros en los medios de cultivo selectivos Preston y Skirrow.

Figura 6. Estudio comparativo de medios de transporte. El número de UFC tras el almacenamiento de los medios de transporte durante 24h (y posteriormente cultivado en medio Skirrow) se muestra en el eje “Y”. Las cajas indican el 50% de la parte central de la distribución por cuartiles, las líneas verticales indican el 1,5 superior del rango intercuartílico, y los puntos negros indican medidas fuera de rango. Las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana y los puntos blancos la media. Las condiciones de tiempo y temperature evaluadas se indicant en la leyenda: refrigeración (RF, 4°C) durante 12h seguido de 12h a temperature ambiente (RT, 21°C±2°C) (12h RF + 12h RT), 12h a temperature ambiente seguido de 12h en refrigeración (12h RT + 12h RF), refrigeración durante 24h (24h RF), y 24h a temperatura ambiente (24h RT).

Figura 7. El número de UFC se muestra en el eje “Y”. Las cajas indican el 50% de la parte central de la distribución por cuartiles, las líneas verticales indican el 1,5 superior del rango intercuartílico, y los puntos negros indican medidas fuera de rango. Las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana y los puntos blancos la media. En la leyenda se indican los medios de cultivo (Preston, agar sangre como SBA, y Skirrow) donde se realizó el recuento de UFC. A) Resultados del recuento en placa de los medios de enriquecimiento previamente inoculados con Cfv (experimento 2). En el eje “X” se indica en medio de enriquecimiento (Bolton, Brucella and Preston. PBS as negative control). B) Resultados del recuento en placa del ensayo diagnóstico llevado a cabo con muestras prepuciales inoculadas con Cfv usando Lander como medio de transporte y Preston como medio de enriquecimiento (experimento 3). Las condiciones de cultivo indicadas en el eje “X” son: 37°C o 42°C sin filtración de la muestra previo al cultivo en placa, o con el uso de filtros de 0.65µm o 0.45µm de diámetro de poro.

9.4. Estancias nacionales e internacionales

- Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología. Valladolid, España. Periodo: 1 de octubre de 2018 al 31 de enero de 2019. Tutor: Dra. Marta Hernández Pérez.
- Norwegian University of Life Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Department of Paraclinical Sciences. Bacteriology and Mycology Unit. Ås, Noruega. Periodo: 1 de agosto al 31 de octubre de 2022. Tutor: Dra. Sabrina Rodríguez Campos.

9.5. Comunicaciones orales en congresos

- *Estudio metagenómico basado en el análisis de la región V3-V4 del 16S ARNr en muestras de lavados prepuciales.* Coral Polo Vaquero, Teresa García Seco, Lucas Dominguez Rodríguez, Marta Hernandez, David Rodríguez Lázaro, Marta Pérez Sancho. PhDay-VETINDOC 2020. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- *Design of a real-time PCR targeting EF1-alpha-Tf1 gene (EF1a1) for Tritrichomonas foetus identification on preputial bull samples.* Coral Polo, Teresa García-Seco, Almudena Casamayor, Alberto Díez-Guerrier, Victor Fernández, Lucas Domínguez, Marta Pérez-Sancho. EAVLD 2021.

9.6. Comunicaciones mediante póster en congresos

- *Comparison of gene targets for Campylobacter fetus PCR-identification using high throughput sequencing as gold standard.* Polo C, García-Seco T, Hernández M, Fernández V, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez, L, Pérez-Sancho M. OHEJP ASM 2020.
- *A systematic review about infectious cattle infertility highlights a lack of pathogens detection related to breeding bulls.* Coral Polo, Teresa García-Seco, Almudena Nández, Carmen Herranz, Alberto DíezGuerrier, Lucas Domínguez, Marta Pérez-Sancho. ESDAR 2021.
- *Comparative study of adapted transport media to improve Campylobacter fetus subsp. venerealis culture.* Polo C, García-Seco T, Fernández V, Díez-Guerrier, Domínguez, L, Pérez-Sancho M. EAVLD 2022.

9.7. Premios

Tercer premio en la VI jornada VETINDOC PhDay Complutense 2020, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, patrocinado por el Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, con la comunicación oral “Estudio metagenómico basado en el análisis de la región V3-V4 del 16S ARNr en muestras de lavados prepuciales”. <https://veterinaria.ucm.es/vi-vetindoc-phday>

9.8. Colaboración en tareas docentes

Microbiología e Inmunología 2019-2020 (34 horas).

Microbiología e Inmunología 2020-2021 (34 horas).

Microbiología e Inmunología 2021-2022 (34 horas).

9.9. Organización de eventos científicos

- Comité organizador de las V Jornadas de Investigación en doctorado – PhDay 2020 Complutense. Facultad de Veterinaria.
- Comité organizador de las Jornadas de la Mujer y la Niña en la ciencia 2021 Complutense. Facultad de Veterinaria.
- Moderadora en la mesa redonda "Mujeres y ciencia, en mayúsculas". Jornadas de la Mujer y la Niña en la ciencia 2021 Complutense. Facultad de Veterinaria.
- Moderador de las VI Jornadas de Investigación en doctorado – PhDay 2021 Complutense. Facultad de Veterinaria.

9.10. Formación adicional

- Diploma en Análisis bioinformático por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla. Formato *online*. Curso 2019-2020.
- Cursando el Máster en Análisis avanzado bioinformático por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla. Formato *online*. Curso 2022-2023.