

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**



**EPIDEMIOLOGÍA, IMPACTO ECONÓMICO Y CONTROL  
DE LA TRICOMONOSIS BOVINA EN LOS SISTEMAS  
EXTENSIVOS DE MONTAÑA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Jesús Alberto Mendoza Ibarra

Bajo la dirección de los doctores

Esther Collantes Fernández

Susana Pedraza Díaz

Luis Miguel Ortega Mora

**MADRID, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**EPIDEMIOLOGÍA, IMPACTO ECONÓMICO Y CONTROL DE LA  
TRICOMONOSIS BOVINA EN LOS SISTEMAS EXTENSIVOS DE  
MONTAÑA**

Tesis Doctoral

D. Jesús Alberto Mendoza Ibarra

Madrid, 2013

Bajo la dirección de:

Dra. Esther Collantes Fernández

Dra. Susana Pedraza Díaz

Dr. Luis Miguel Ortega Mora



Memoria presentada por D. Jesús Alberto Mendoza Ibarra para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 16 de abril de 2013





Dña. **Esther Collantes Fernández**, Doctora en Veterinaria y Profesora Ayudante Doctor, D. **Luis Miguel Ortega Mora**, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Universidad adscritos al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y Dña. **Susana Pedraza Díaz**, Doctora en Biología e investigadora contratada en la Universidad Politécnica de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada “**EPIDEMIOLOGÍA, IMPACTO ECONÓMICO Y CONTROL DE LA TRICOMONOSIS BOVINA EN LOS SISTEMAS EXTENSIVOS DE MONTAÑA**” que presenta el licenciado en Veterinaria D. **Jesús Alberto Mendoza Ibarra**, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para su presentación y defensa.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado como directores de la mencionada tesis doctoral, autorizando su presentación.

En Madrid, a 16 de Marzo de 2013,

Fdo. Dra. Esther Collantes Fernández

Fdo. Dra Susana Pedraza Díaz

Fdo. Dr. Luis Miguel Ortega Mora



Esta tesis doctoral ha sido lograda gracias a la financiación de diversas entidades que aportaron los recursos económicos y logísticos para la obtención del objetivo final. Entre estas se incluyen el INIA mediante el proyecto (RTA2009-00136-C02-02), el programa ALBAN mediante el programa de becas de alto nivel para America Latina (No. E07D400491CO), la Universidad de Pamplona mediante una comisión de estudios, el programa COLFUTURO, el Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología COLCIENCIAS y la Agencia Nacional de Hidrocarburos ECOPETROL.



A Solita y Salvador quienes creyeron en mi y fueron motor y guía.



A Melissa, tu constante presencia y amor han sido mi apoyo y siempre me has dado alientos y fuerza para continuar adelante cuando el camino se ha hecho difícil.

A Jesús David y Arantxa, dos ángeles que me han sido enviados para alegrar mi corazón y darme una razón adicional para este constante batallar.

A mis gorditas, Susana y Consuelo, seres maravillosos cuyo corazón lleno de amor y bondad siempre han estado pendientes de mi, brindándome su ternura y apoyo.

A todos los miembros de mi familia, que siempre me brindaron su apoyo y estuvieron pendientes del desarrollo de este trabajo.



## **AGRADECIMIENTOS.**

Un día partí de mi amada Colombia y atravesé el océano para cumplir con un objetivo que me había impuesto, conmigo llevé mi mujer y un bebe y así comencé esta aventura que culmina con este trabajo de tesis, fue mucha la gente que conocí y muchas las personas que me colaboraron para haber logrado el objetivo final. Luis cuyo espíritu y carisma lo hace una de las mejores personas que he conocido en mi vida y al cual tengo un profundo aprecio y admiración, su ayuda fue fundamental en todo momento, Susana guió mis pasos y me acompañó en los inicios realizando una maravillosa labor hasta la obtención del título de Máster, para Esther solo tengo palabras de agradecimiento, su paciencia fue probada al máximo y sin duda ha sido la gran arquitecta de esta tesis, en la que aportó todo su compromiso, experiencia, trabajo y sobre todo una muy buena voluntad.

A todos los compañeros del grupo Saluvet, quienes aportaron su trabajo para la elaboración de esta tesis en especial a Silvia, Vanesa y Carmen, cuyos aportes fueron significativos para obtener los resultados finales, igualmente a todas aquellas personas que sacrificaron parte de su tiempo para transitar por las hermosas montañas y valles de Asturias, colaborando con los muestreos de este maravilloso trabajo, al viejo David el incondicional, a Javier Moreno, Virginia, Claudia, Adriana, Paula, Alba, Laura, Javier Regidor, a Santa por sus aportes en la estadística y como persona, a todos los colaboradores del Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, pero en especial a Flan una de las personas en las que he visto el mayor equilibrio entre la locura y la cordura, a las personas de ASEAMO-ASEAVA y de manera muy especial a Paco y Juanín quienes no solo fueron unos colaboradores sin cuya disposición y trabajo no hubiera sido posible la culminación de este trabajo, sino que además son seres humanos maravillosos, a todos las personas del SERIDA que me acompañaron y fueron fundamentales en el desarrollo de esta investigación en especial a Koldo y a sus colaboradores, a José, Arsenio, Luis y Ramonín. Igualmente deseo dar un agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma me acompañaron y cuya presencia fue especial brindando siempre una actitud de apoyo cuando los requerí, Gema, Ignacio, Lydia, Chema, Mercedes, Javier, Francisco, Belén y finalmente a mis compatriotas que me acompañaron en esa aventura por el viejo mundo y fueron apoyo y enganche con la vida, Darío, Carlos, Kelly y Erika y a todos los ganaderos y veterinarios que colaboraron desinteresadamente y finalmente a todos aquellos que por tiempo o por espacio se hayan escapado de esta lista.



## Lista de Publicaciones

El desarrollo de esta tesis, ha dado lugar a los siguientes artículos científicos:

1. Mendoza-Ibarra, J.A., Pedraza-Díaz, S., García-Pena, F.J., Rojo-Montejo, S., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., San Miguel-Ibanez, E., Navarro-Lozano, V., Ortega-Mora, L.M., Osoro, K., Collantes-Fernandez, E., 2012. High prevalence of *Trichostrongylus axei* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. The Veterinary Journal 193, 146-151.
2. Mendoza-Ibarra, J.A., Ortega-Mora, L.M., Pedraza-Díaz, S., Rojo-Montejo, S., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García-Peña, F.J., Navarro-Lozano, V., Cuevas-Martín, M.D., Osoro, K., Collantes-Fernández, E. 2012. Differences in the prevalence of *Trichostrongylus axei* infection in beef cattle farmed under extensive conditions in northern Spain. The Veterinary Journal, doi:10.1016/j.tvjl.2012.10.026.
3. Collantes-Fernández, E., Mendoza-Ibarra, J.A., Pedraza-Díaz, S., Rojo-Montejo, S., Navarro-Lozano, V., Ortega-Mora, L.M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Osoro, K. 2013. Efficacy of a control program against bovine trichostrongylosis based on testing and culling infected bulls in beef cattle managed under mountain pastoral systems of Northern Spain. The Veterinary Journal. Artículo en revisión.



# **ÍNDICE GENERAL**



<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>	
<b>1. TRICOMONOSIS BOVINA .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Etiología.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Clasificación taxonómica.....	3
1.1.2. Morfología .....	4
1.1.3. Nutrición, metabolismo y reproducción.....	6
1.1.4. Estructura antigénica.....	7
1.1.5. Variabilidad intra- e inter-específica.....	8
1.1.6. Localización y ciclo biológico .....	9
<b>1.2. Epidemiología .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Prevalencia.....	11
1.2.2. Transmisión .....	13
1.2.3. Factores de riesgo .....	14
Edad.....	14
Raza .....	14
Estado de portador.....	15
Prácticas ganaderas.....	16
<b>1.3. Importancia económica.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. Patogenia y lesiones .....</b>	<b>17</b>
1.4.1. En el macho .....	17
1.4.2. En la hembra y el concepto.....	18
1.4.3. Mecanismos de acción patógena.....	19
1.4.4. Inmunidad .....	21
1.4.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria .....	23
<b>1.5. Cuadro clínico y lesional .....</b>	<b>24</b>
1.5.1. Individual .....	24
1.5.2. De rebaño.....	26
<b>1.6. Diagnóstico .....</b>	<b>27</b>
1.6.1. Diagnóstico clínico, epidemiológico y diferencial .....	27
1.6.2. Diagnóstico de laboratorio.....	28
1.6.2.1. Recogida y envío de muestras .....	28
1.6.2.1.1. En el toro.....	28
Método del lavado prepucial.....	29
Método de la pipeta.....	30
Método del raspador .....	30
1.6.2.1.2. En vaca y novilla.....	31
1.6.2.1.3. En el feto .....	32
1.6.2.2. Transporte de la muestra.....	32

1.6.2.3. Detección de <i>T. foetus</i> por observación directa y cultivo .....	33
Medios de transporte y cultivo .....	34
1.6.2.4. Detección de <i>T. foetus</i> por PCR.....	37
1.6.2.5. Otros métodos diagnósticos.....	38
Muco aglutinación .....	38
Test intradérmico.....	39
Serología.....	39
Inmunohistoquímica en tejidos.....	39
<b>1.7.Prevenición y control.....</b>	<b>40</b>
1.7.1. Medidas de manejo .....	40
1.7.2. Vacunación .....	43
1.7.3. Tratamiento.....	46
<b>2. EXTENSIFICACIÓN DEL GANADO BOVINO EN LA UE</b>	
<b>2.1. Política Agraria común y cría de bovino de carne .....</b>	<b>47</b>
<b>2.2. Razas Asturianas .....</b>	<b>49</b>
2.2.1. Asturiana de la Montaña .....	49
2.2.2. Asturiana de los Valles .....	51
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO II. HIGH PREVALENCE OF TRITRICHOMONAS FOETUSINFECTION IN ASTURIANA DE LA MONTAÑA BEEF CATTLE KEPT IN EXTENSIVE CONDITIONS IN NORTHERN SPAIN</b>	
<b>Abstract .....</b>	<b>61</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>63</b>
<b>2. Materials and methods.....</b>	<b>64</b>
2.1. Sampling design .....	64
2.2. Sampling technique.....	64
2.3. Culture methods .....	65
2.4. DNA extraction for <i>T. foetus</i> detection.....	65
2.5. DNA extraction for <i>C. fetus venerealis</i> detection .....	66
2.6. PCR .....	66
2.7. Herd and bull data collection .....	66
2.8. Statistical Analyses .....	66
<b>3. Results.....</b>	<b>67</b>
3.1. Prevalence and risk factor analysis .....	67
3.2. Diagnostic methodology .....	67
<b>4. Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>72</b>
<b>6. Acknowledgements .....</b>	<b>73</b>

**CAPÍTULO III. MANAGEMENT PRACTICES IN BEEF CATTLE INFLUENCE  
*Tritrichomonas foetus* PREVALENCE IN EXTENSIVE MOUNTAIN SYSTEMS IN  
SPAIN**

**Abstract ..... 77**

**Acknowledgements ..... 83**

**CAPÍTULO IV. EFFICACY OF A CONTROL PROGRAM AGAINST BOVINE  
TRICHOMONOSIS BASED ON TESTING AND CULLING INFECTED BULLS  
IN BEEF CATTLE MANAGED UNDER MOUNTAIN PASTORAL SYSTEMS OF  
NORTHERN SPAIN**

**Abstract ..... 87**

**1. Introduction ..... 89**

**2. Materials and methods ..... 90**

2.1. Mountain pastoral system in AM herds ..... 90

2.2. Study design ..... 91

2.3. Sample collection ..... 92

2.4. Culture method ..... 92

2.5. DNA extraction and PCR ..... 92

2.6. Data Collection ..... 93

2.7. Economic analysis ..... 93

2.8. Statistical analysis ..... 94

**3. Results ..... 94**

3.1 *T. foetus* infection caused a deleterious effect on reproductive efficiency and economic losses in AM herds ..... 94

3.2. Efficacy of the control plan ..... 96

**4. Discussion ..... 100**

**5. Conclusions ..... 103**

**6. Acknowledgements ..... 103**

**CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL ..... 105**

**CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS ..... 123**

**RESUMEN/SUMMARY ..... 129**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 135**



## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico

AM: Asturiana de la Montaña

ARN/RNA: ácido ribonucleico

ASEAMO: Asociación española de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de la Raza Asturiana de la Montaña

ASEAVA: Asociación española de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de la Raza Asturiana de los Valles

AV: Asturiana de los Valles

BT: Tricomonosis bovina (del inglés: Bovine Trichomonosis)

BGC: Campilobacteriosis genital bovina (del inglés: Bovine Genital Campylobacteriosis)

°C: grados centígrados

cm: centímetro

PAC/CAP: Política Agraria Común (del inglés: Common Agricultural Policy)

CPA: Centro de Parasitología Animal

DMD: medio Diamond (del inglés: Diamond medium)

EE.UU: Estados Unidos de Norte América

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático (del inglés: Enzyme Linked Immunossorbent Assay)

gr: gramo

IA: inseminación artificial

i.v.: vía intravenosa

IgG1, IgG2: inmunoglobulinas del isotipo 1, 2

IgM: inmunoglobulina M

Igs: inmunoglobulinas

IHQ: inmunohistoquímica

ITS1: espacio de transcripción interna-1 (del inglés: internal transcribed spacer I)

kDa: kilodaltons

Kg: kilogramo

LPG: lipofosfoglicano

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

MDM: medio Diamond modificado (del Inglés: modified Diamond medium)

ME: microscopía electrónica

mg: miligramo

## Abreviaturas

---

ml: mililitro

mm: milímetro

MT: microscopía de transmisión

ng: nanogramo

nm: nanómetro

No.: número

OR: odds ratio

PBS: tampón fosfato salino (del inglés: phosphate-buffered saline)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: polymerase chain reaction)

PI: post-infección

rRNA/ARNr: ARN ribosómico (del inglés: ribosomic RNA)

SGA: antígeno soluble y glicosilado (del inglés: soluble and glycosylated antigen)

STD: enfermedad de transmisión sexual (del inglés: sexually transmitted diseases)

TFTM: medio de transporte para *T. foetus* (del inglés: *T. foetus* transport medium)

UE: Unión Europea

µm: micrómetro

µL: microlitro

**ÍNDICE DE TABLAS:**

**Capítulo I. Antecedentes y objetivos**

Tabla 1. Prevalencia de la tricomonosis bovina en diversos países. .... 13

**Capítulo II. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain.**

Table 1. Association of *T. foetus* status with epidemiological data and putative herd risk in 62 beef herds in Northern Spain..... 62

Table 2. Effect of diagnostic methodology on isolation rate of *T. foetus*. .... 69

**Capítulo III. Management practices in beef cattle influence *Tritrichomonas foetus* prevalence in extensive mountain systems in Spain.**

Table 1. Distribution of the *Tritrichomonas foetus* infection status according to epidemiological and risk analysis in Asturiana de los Valles (AV) beef herds in northern Spain. .... 81

Table 2. Details of differences in the management of the Asturiana de los Valles (AV) and Asturiana de la Montaña (AM) cattle breeds in northern Spain..... 83

**Capítulo IV. Efficacy of a control program against bovine trichomonosis based on testing and culling infected bulls in beef cattle managed under mountain pastoral systems of Northern Spain.**

Table 1. Summary of statistical analysis of reproductive parameters in Asturiana de la Montaña herds before the implementation of the bovine trichomonosis control program..... 94

Table 2. Summary of economic losses caused by bovine trichomonosis calculated for a characteristic herd of Asturiana de la Montaña breed (n=20 cows and one bull) and considering reproductive data of Table 1, productive records of the breed (<http://www.aseamo.com/raza.aspx>) and local sales yard prices (<http://www.sadei.es>)..... 96

Table 3. Bull and herd *T. foetus* prevalence before and after of the implementation of the control program. .... 98

Table 4. Association of *T. foetus* status with epidemiological data and putative risk factors in Asturiana de la Montaña beef herds in the first and second years of the control program ..... 99



**ÍNDICE DE FIGURAS:**

**Capítulo I. Antecedentes y objetivos**

Figura 1. Esquema de un trofozoíto de <i>T. foetus</i> .....	5
Figura 2. <i>T. foetus</i> se localiza sobre la superficie del epitelio escamoso estratificado del pene y el prepucio proximal, en las criptas prepuciales. En la hembra, el parásito se concentra preferentemente en los pliegues del cérvix. La transmisión del parásito se produce de animal infectado a animal sano, casi exclusivamente mediante la cópula.....	10
Figura 3. Signos clínicos individuales observados en hembras infectadas por <i>T. foetus</i> . ....	26
Figura 4. Protocolo de recogida de muestra de esmegma prepucial para el diagnóstico de la tricomonosis bovina. ....	29
Figura 5. Recogida de muestra de esmegma prepucial mediante pipeta de IA. ....	30
Figura 6. Recogida de muestra de esmegma prepucial mediante raspador plástico.....	31
Figura 7. Diferentes protozoos encontrados durante el examen de material enviado para diagnóstico de la tricomonosis bovina.....	36
Figura 8. Medidas utilizadas para la prevención y control de la tricomonosis bovina.....	42
Figura 9. Evolución del censo de vacuno en España (1986-2008). Descenso del vacuno lechero e incremento del número de vacas nodrizas.....	49
Figura 10. Semental de Asturiana de la Montaña. ....	50
Figura 11. Semental de Asturiana de los Valles.....	51

**Capítulo IV. Efficacy of a control program against bovine trichomonosis based on testing and culling infected bulls in beef cattle managed under mountain pastoral systems of Northern Spain.**

Figure 1. Distribution of the calving rate by month in <i>T. foetus</i> infected and non-infected herds of Asturiana de la Montaña beef breed.....	95
Figure 2. Comparison of reproductive data before and after implementation of the control measures in <i>T. foetus</i> infected and non-infected herds.....	97



# **CAPÍTULO I**

---

## **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**



### 1. TRICOMONOSIS BOVINA

La tricomonosis bovina es una enfermedad de transmisión sexual del ganado bovino que cursa con fallo reproductivo temprano y es frecuente en los sistemas de explotación extensivos donde se utiliza la monta natural (Clark et al., 1971; BonDurant, 2005; Rae and Crews, 2006). Antiguamente esta enfermedad se conocía con el nombre de “aborto bovino por *Trichomonas*”, “peste de la cubrición” o “catarro vaginal contagioso” en referencia a su principal manifestación clínica. Esta enfermedad fue descrita por primera vez hace más de 100 años por Kunstler en Francia en 1888, sin embargo, su descubrimiento es atribuido al científico italiano Mazzanti en 1900, quien describió el agente en dos vacas y una novilla sacrificadas por su bajo nivel de fertilidad (Revisado en Skirrow and BonDurant, 1988). En 1928, en un estudio de 105 fetos abortados se detectó la presencia del parásito en 9 casos (Riedmuller et al., 1928). En este momento se propuso el nombre de *Tritrichomonas foetus*. En 1932, la enfermedad se describió por primera vez en ganaderías de leche en EE.UU. A partir de 1933, los casos se describieron en todo el mundo (Rae and Crews, 2006).

Actualmente, la tricomonosis bovina está incluida en la Lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Asimismo, se recoge en la Directiva Europea que regula el comercio de semen bovino (European Union 1998, 2004) y la OIE establece una serie de recomendaciones en relación a esta enfermedad para la importación de animales de cría, sementales y semen de origen bovino (<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/>). En Europa, la introducción de la inseminación artificial (IA) y el establecimiento de ciertas medidas preventivas contribuyeron a que esta enfermedad se erradicara en muchas zonas (Yule et al., 1989; Foote, 1996; van Bergen et al., 2005).

#### 1.1 ETIOLOGÍA

##### 1.1.1 Clasificación taxonómica

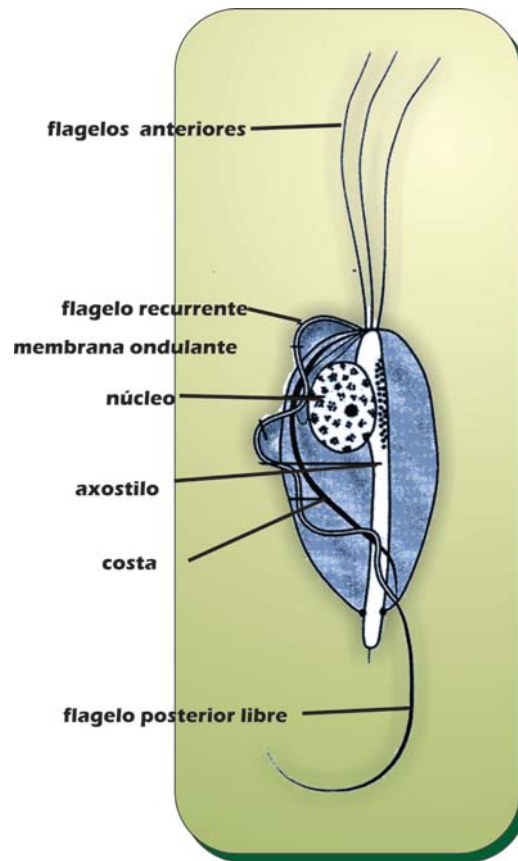
El agente etiológico de la tricomonosis bovina es *Tritrichomonas foetus*, un protozoo parásito, piriforme, encuadrado taxonómicamente en el Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora (trofozoítos flagelados), Clase Zoomastigophorea (sin

cloroplastos), Superorden Parabasalidea (con uno o más aparatos parabasales), Orden Trichomonadida, Familia Trichomonadidae, Subfamilia Tritrichomonadinae y género *Tritrichomonas*. A esta familia también pertenecen otros tricomonádidos que afectan al hombre (*T. vaginalis*), aves domésticas (*T. gallinae*) y cerdo (*T. suis*) (Taylor et al., 1994; Ortega-Mora et al., 1998a).

### 1.1.2 Morfología

*T. foetus* poseen estadio de trofozoíto, con aspecto piriforme u ovoide, y cuyo tamaño oscila entre 8-18  $\mu\text{m}$  de longitud y 4-9  $\mu\text{m}$  de ancho (Kreier and Baker, 1987). Los trofozoítos poseen varias estructuras con función locomotora como los flagelos y la membrana ondulante (Figura 1). *T. foetus* posee 4 flagelos, originados a partir de unas formaciones denominadas cuerpos basales o cinetosomas, situados en el polo apical de la célula. Tres de los flagelos son de longitud similar entre sí y se dirigen hacia delante, son los flagelos libres, cuyo número caracteriza a cada género de la familia Trichomonadidae. De esta forma, el género *Tritrichomonas* se caracteriza por tener 3 flagelos libres, mientras que los géneros *Tetratrichomonas* y *Pentatrichomonas* poseen 4 y 5 flagelos, respectivamente. En *T. foetus*, el cuarto flagelo, denominado flagelo recurrente, se dirige hacia la parte posterior del cuerpo, asociado al mismo por una membrana ondulante, y se continúa como flagelo libre más allá del extremo posterior de la membrana ondulante (Taylor et al., 1994; Ortega-Mora et al., 1998a; Benchimol, 2004) (Figura 1).

Las organelas internas de *T. foetus* son similares a las de otros tricomonádidos, el citoplasma contiene una serie de elementos de soporte, entre los que destacan el complejo pelta-axostilar y la costa que bordea el flagelo recurrente, el axostilo y dos filamentos parabasales que soportan un complejo de Golgi simple, estos elementos junto con los flagelos componen el citoesqueleto (Benchimol, 2005). El axostilo se origina en la misma zona del nacimiento de los flagelos, rodeado en este punto de un anillo de cromatina, y se dirige hacia la parte posterior del parásito, haciendo prominencia en el extremo posterior. La pelta es una estructura semilunar muy poco desarrollada, situada en la parte anterior del axostilo. Ambas estructuras forman el complejo pelta-axostilar, compuesto de grupos de microtúbulos conectados, formando una especie de hendidura que aloja el núcleo y los cuerpos parabasales (Benchimol, 2004; Benchimol, 2005).



**Figura 1.** Esquema de un trofozoíto de *T. foetus*.

En *Trichomonas*, el axostilo tiene dos funciones, sirve como una organela de soporte (mientras la pelta refuerza la pared del canal flagelar) y además participa en los procesos de división celular, permitiendo la constricción de los núcleos durante la cariocinesis (Ribeiro et al., 2002). La costa es una estructura rígida que se sitúa en el margen interno de la membrana ondulante y le sirve de soporte. Los filamentos parabasales por su parte, son también elementos filamentosos rayados perpendicularmente y su misión parece ser la de servir de apoyo al cuerpo parabasal (aparato de Golgi). Los filamentos parabasales y el cuerpo parabasal constituyen el aparato parabasal, situado en la parte anterior de la célula (Benchimol, 2004; 2005).

*T. foetus* tiene un núcleo simple anterior y los hidrogenosomas, los cuales aparecen como corpúsculos electro-densos que actúan como sustitutos funcionales de las mitocondrias. Otros componentes celulares que pueden observarse en el citoplasma son los ribosomas libres, polisomas, gránulos de glucógeno, vesículas y vacuolas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte (Benchimol, 2004; 2005).

Bajo condiciones desfavorables, tales como una baja concentración de nutrientes, la presencia de ciertos fármacos como la griseofulvina, o cambios abruptos en la temperatura, los trofozoítos internalizan el flagelo y adquieren una forma de pseudoquiste, el cual no está rodeado de una pared celular manifiesta (Pereira-Neves and Benchimol, 2009).

### 1.1.3 Nutrición, metabolismo y reproducción

Con respecto a la nutrición, los tricomonádidos carecen de citostoma, por lo que están capacitados para captar los alimentos a través de la superficie celular mediante pinocitosis y fagocitosis, con la formación resultante de vacuolas alimenticias de tamaño diverso. Como otros tricomonádidos, *T. foetus* se alimenta principalmente de bacterias, cuya proliferación depende de las condiciones del medio donde el parásito se asienta, concretamente del tracto genital (Petrin et al., 1998).

Desde el punto de vista metabólico, *T. foetus* es incapaz de sintetizar *de novo* nucleótidos púricos o pirimidínicos, así como fosfoglicéridos complejos o colesterol. El parásito obtiene su energía mediante el catabolismo anaeróbico de los carbohidratos; aunque son aerotolerantes, los hidrogenosomas son los encargados de producir el hidrógeno molecular en condiciones de anaerobiosis reduciendo la tensión de oxígeno. De esta forma el parásito consigue mantener el pH de su entorno próximo a la neutralidad, favoreciendo su desarrollo (Kleydman et al., 2004).

La reproducción de *T. foetus*, al igual que la de todos los tricomonádidos, es de tipo asexual. El parásito se divide mediante fisión binaria longitudinal según un tipo de mitosis (criptopleuromitosis) en la que persiste la membrana nuclear. No se ha observado ningún tipo de reproducción sexual (Petrin et al., 1998). Adicionalmente, cuando se compara con la forma de trofozoíto, los pseudoquistes presentan un modelo de mitosis diferente, ya que dividen primero los núcleos sin dividir sus citoplasmas, lo que lleva a la formación de polimastigontes multinucleados que persisten si las células se mantienen bajo condiciones de estrés. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, los flagelos se externalizan y emergen los nuevos trofozoítos flagelados a partir de las células multinucleadas (Pereira-Neves and Benchimol, 2009).

### 1.1.4 Estructura antigénica

De acuerdo con la reacción de aglutinación, tradicionalmente se consideran tres serotipos de *T. foetus*: Belfast, Manley y Brisbane, poseedores de determinantes antigénicos específicos, además de otros compartidos. Aunque los estudios no son recientes, se ha descrito que dichos serotipos son morfológicamente indiferenciables y manifiestan una patogenicidad similar en los bovinos, si bien muestran diferente comportamiento en animales de laboratorio y en cultivos celulares. Se ha podido demostrar que los animales inmunizados frente a un serotipo desarrollan anticuerpos frente al serotipo homólogo, así como frente a los serotipos heterólogos. En general, se suele encontrar un único serotipo en infecciones naturales individuales, aunque puede existir una mezcla de serotipos en un rebaño (Dennett et al., 1974).

En cuanto a la composición antigénica de *T. foetus*, Hall et al. (1986), describieron una serie de 55 a 60 proteínas con pesos moleculares que variaban entre 25 kDa y 210-220 kDa. Se ha señalado que el suero de vacas inmunizadas con el parásito reconoce aproximadamente 38 antígenos distintos, entre los que destaca un antígeno de superficie de 150 kDa que está ampliamente distribuido en diversas poblaciones del parásito (Hall et al., 1986). En general, existe una fuerte reacción cruzada entre diferentes aislados de *T. foetus*, mostrando una gran similitud tanto en el perfil de proteínas totales como en el perfil antigénico que muestran al enfrentarse a diferentes sueros (Huang et al., 1989). Asimismo, se ha descrito la presencia de diversos polisacáridos de superficie y antígenos de naturaleza proteica, que muestran una gran estabilidad incluso después de varios pases por cultivo *in vitro* (Dennett et al., 1974). Existen también antígenos que se comportan como adhesinas con potencial inmunogénico, entre los que se encuentran los lipofosfoglicanos (LPG), presentes en la superficie de *T. foetus* unidos a la membrana parasitaria por una molécula de inositol-fosfoceramida (Shaia et al., 1998). Los LPG son glicoconjugados ricos en fructosa y en menor cuantía manosa, galactosa, glucosamina, glucosa y galactosamina (Singh et al., 2001). Su composición lipídica incluye principalmente ácido palmítico y esteárico. Otra adhesina superficial es la Tf 190 denominada así por su peso molecular, la cual contiene 2 subunidades inmunogénicas de 140 kDa y 60 kDa, más ciertos componentes polipeptídicos. El antígeno Tf 190 tiene la propiedad de inducir una respuesta inmunitaria caracterizada por una respuesta de linfocitos T que pueden desarrollar memoria (Shaia et al., 1998).

La adhesina superficial Tf 1.17 es otra glicoproteína altamente glicosilada (50-70kDa) que posee un péptido extra unido covalentemente con el resto de la molécula de lipofosfoglicano. Este péptido exclusivo le otorgaría un gran poder inmunogénico comparado con el LPG (Singh et al., 2001). Se ha descrito que la proteína Tf 1.17 estimula la síntesis de anticuerpos que inhiben la adhesión parasitaria al epitelio vaginal y favorecen la aglutinación y destrucción de *T. foetus* mediante el complemento (Hodgson et al., 1990).

Otra adhesina de *T. foetuses* el antígeno soluble y glicosilado (SGA), el cual se libera continuamente desde la superficie del protozoo y está relacionado químicamente con LPG y Tf 1.17. Se han descrito otras adhesinas, de aproximadamente 100kDa de peso molecular, en la superficie del protozoo y en las vesículas citoplasmáticas aunque normalmente estarían enmascaradas por carbohidratos específicos que se expondrían sólo ante determinadas condiciones (da Silva et al., 1999). Finalmente, la similitud química y fisiológica de varias de las adhesinas descritas para *T. foetus* sugieren que, en ciertos casos, podría tratarse de una misma molécula o grupo de ellas.

Otros antígenos de superficie son glicoproteínas de membrana con un peso molecular entre 45 y 70 kDa que estimulan el desarrollo de una respuesta protectora en el ganado bovino y se han asociado con la inmunidad mediada por el complemento y la prevención de la adherencia del parásito (BonDurant et al., 1993).

### **1.1.5 Variabilidad intra e inter-específica**

En la actualidad, se han planteado nuevos interrogantes sobre la taxonomía y espectro de hospedadores de *T. foetus*. Se conoce que *T. foetus* tiene una morfología idéntica y una secuencia de ARNr homóloga a la descrita para *T. suis*, habitante apatógeno de la cavidad nasal y tracto digestivo del cerdo. La extrema similitud entre *T. foetus* y *T. suis* sugiere que se tratarían de una misma especie adaptada a diferentes hospedadores (Felleisen, 1998; Tachezy et al., 2002; Lun et al., 2005). Pese a ello, en un trabajo reciente se ha observado que *T. suis* no es capaz de colonizar el tracto genital de novillas infectadas experimentalmente (Cobo et al., 2001).

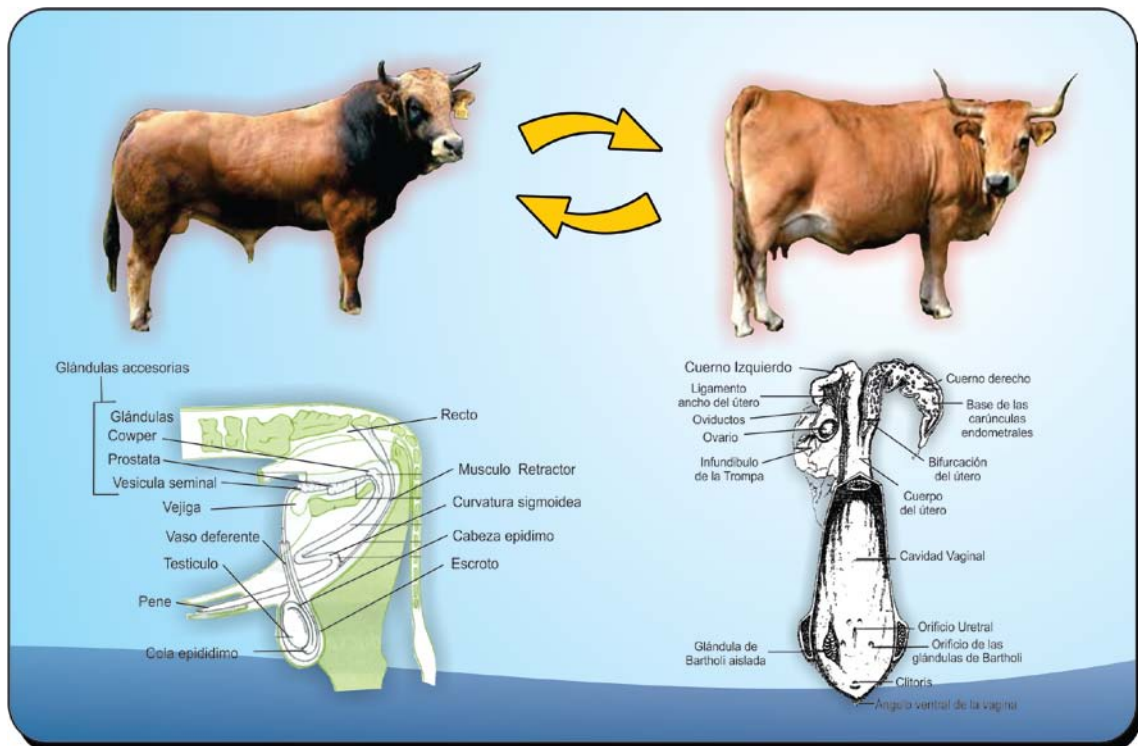
Por otra parte, se considera que *T. foetus* es también el agente causal de la tricomonosis felina, enfermedad cuyo principal signo clínico es una diarrea del intestino grueso en el gato (Gookin et al., 2001). Sin embargo, existen diferencias significativas biológicas y moleculares entre ambas que plantean la posibilidad de una variabilidad dentro de la especie de *T. foetus*. En cuanto al hábitat y localización en el hospedador, mientras que en el ganado bovino el parásito se localiza en el aparato genital (BonDurant, 1997), en el gato la localización es intestinal, principalmente en el colon (Gookin et al., 2001; Yaeger et al., 2005). Por otra parte, se han realizado infecciones experimentales en vacas con aislados obtenidos de gatos (Stockdale et al., 2007) y en gatos con aislados obtenidos del ganado bovino (Stockdale et al., 2008). Las consecuencias de la infección en el ganado bovino producidas por el aislado felino AUTf-1 fueron más leves que las causadas por el aislado bovino D-1 (Stockdale et al., 2007).

Estudios recientes sugieren que también existen diferencias a nivel genético (Slapeta et al., 2010; Frey and Muller, 2012). Algunos autores han concluido que quizás las diferencias entre especies o genotipos de *Tritrichomonas* no se reflejen en el ARNr, puesto que especies como *T. foetus*, *T. suis* o *T. mobilensis*, consideradas hasta ahora como especies distintas dentro de este género, presentan diferencias genéticas muy pequeñas (Felleisen et al., 1997). En un estudio reciente, Slapeta et al. (2010), han demostrado una mayor variabilidad genética entre aislados de *T. foetus* de origen felino y bovino utilizando tanto la región ITS como una región polimórfica que presenta secuencias de ADN repetitivas de longitud variable. Con base en estos resultados han propuesto el reconocimiento de un genotipo felino y un genotipo bovino dentro de *T. foetus* (Frey and Muller, 2012).

### 1.1.6 Localización y ciclo biológico

En los bovinos, *T. foetus* se localiza en el aparato genital (Skirrow, 1987; BonDurant, 1997) (Figura 2). La localización preferente del parásito en el toro es la cavidad prepucial, concentrándose mayoritariamente en la mucosa peneana y zonas adyacentes de la mucosa prepucial posterior (Clark et al., 1974a; Parsonson et al., 1974; Parker et al., 1999). El parásito se ubica específicamente sobre la superficie del epitelio escamoso estratificado del pene y el prepucio proximal en el área del fórnix. Con la edad, este epitelio llega a sufrir numerosos plegamientos, produciéndose un mayor desarrollo de las criptas, donde

*T. foetus* puede desarrollarse apropiadamente al darse un microambiente adecuado para microorganismos anaerobios facultativos o microaerofílicos (Rhyan et al., 1999).



**Figura 2.** *T. foetus* se ubica sobre la superficie del epitelio escamoso estratificado del pene y el prepucio proximal, en las criptas prepuciales. En la hembra, el parásito se concentra preferentemente en los pliegues del cérvix. La transmisión del parásito se produce de animal infectado a animal sano, casi exclusivamente mediante la cópula.

En la hembra, el parásito se concentra preferentemente en los pliegues del cérvix (BonDurant, 1997). La infección es autolimitante, desapareciendo simultáneamente el parásito de todas las áreas del tracto genital al cabo de un periodo mínimo de 90-95 días (Parsonson et al., 1976; Rae et al., 2004; BonDurant, 2007).

Al igual que otros tricomonádidos, *T. foetus* tiene un ciclo biológico directo exhibiendo la forma de trofozoíto, que no presenta formas de vida libre, ni hospedadores intermediarios y tiene como hospedador definitivo a los bovinos tanto de las razas *Bos taurus* (*Bos primigenius taurus*) como *Bos indicus* (*Bos primigenius indicus*) (Felleisen, 1999; BonDurant, 2005).

En condiciones naturales, *T. foetus* se transmite directamente de animal infectado a animal sano, casi exclusivamente mediante la cópula (Figura 2). Los toros se infectan durante la cubrición de vacas infectadas, quedando como portadores asintomáticos.

### 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

#### 1.2.1 Prevalencia

La tricomonosis genital bovina es una enfermedad cosmopolita, habiéndose denunciado su presencia en países de los cinco continentes. La mayoría de los estudios de esta enfermedad coinciden en señalarla como endémica en aquellas zonas donde el ganado bovino se explota en régimen extensivo y la monta natural se utiliza de forma habitual. Sin embargo, la introducción hace algunas décadas de la IA en el ganado bovino lechero y en pequeños rebaños de carne y el establecimiento de ciertas medidas de manejo y diagnóstico han contribuido a que se haya erradicado en muchas zonas donde con anterioridad constituía la causa más importante de fallo reproductivo en los rebaños bovinos.

En la Tabla 1 se recogen algunos datos sobre la prevalencia de la infección por *T. foetus*. La mayoría de los datos disponibles no son recientes, sin embargo, demuestran la importancia de la enfermedad. En Australia a principios de la década de los 70, la prevalencia de rebaños infectados era estimada en un 40% (Clark et al., 1974b). Otro estudio más reciente realizado en toros demuestra que el 65,6% de los rebaños están infectados. Las estimaciones de la prevalencia individual varían entre el 24,7% y el 30,2% en los toros y entre el 4,6% y el 6,4% en las vacas (McCool et al., 1988).

En los EE.UU, se ha descrito una prevalencia del 16% en rebaños de carne en California (BonDurant et al., 1990) y un 30,4% en Florida (Rae et al., 2004), con una prevalencia individual en los toros que oscila entre el 0–7,8%. Recientemente, se realizó un estudio epidemiológico retrospectivo en Alabama encontrándose una prevalencia individual de un 0,27% mientras que el mismo estudio realizado de manera prospectiva describió un 1,25% (Rodning et al., 2008). Szonyi et al. (2011) en un estudio

epidemiológico realizado en Texas encontraron una prevalencia individual del 3,6% en toros. En Canadá, se ha encontrado una prevalencia individual del 6% (Riley et al., 1995).

En países como Costa Rica y Argentina, se han obtenido prevalencias de rebaño del 18,4% y del 28%, respectivamente (Pérez et al., 1992; 2006). En Brasil, aunque apenas existen estudios, se ha descrito que la infección podría afectar al 13% de las explotaciones y al 29% de los toros (datos no publicados). En Sudáfrica, Erasmus et al. (1989) señalaron una prevalencia del 7%.

En Europa esta enfermedad ocasionó graves problemas durante la década de los cincuenta, siendo considerada como la enfermedad reproductiva más importante en el ganado bovino en el sur de Alemania. Actualmente, en algunos países como Gran Bretaña, debido a la práctica de la IA y a la realización de muestreos periódicos, la infección se considera prácticamente erradicada.

En España, pese haber sido señalada su presencia en varias provincias, los datos de prevalencia disponibles son escasos y, entre los que existen, muchos están ya obsoletos y la metodología diagnóstica empleada fuera de uso. Aunque la mayoría de los trabajos se realizaron en la década de los cincuenta, la primera descripción en nuestro país la realizó Escartín Barles en 1946. Luna Infante en 1956 señala, sobre 1804 abortos estudiados en la provincia de La Coruña, una prevalencia del 46% para el aborto tricomonósico, del 27% para el brucelar y del 27% para los abortos de etiología inespecífica. Al igual que en otros países la instauración de la IA y otras medidas de control, lograron disminuir considerablemente la prevalencia de esta infección, aunque esporádicamente se han denunciado brotes de tricomonosis en diferentes áreas de España, como en la Cornisa Cantábrica y en la zona de Zamora. Asimismo, los diagnósticos de esta enfermedad son habituales en el área de explotación de la raza Avileña. En el norte de la provincia de León, donde la monta natural y el uso de pastos comunales son prácticas de manejo habituales, se llevó a cabo un estudio con objeto de determinar la prevalencia individual en los toros. Para ello, se muestrearon 70 sementales mayores de un año, que servían a un total de 4136 vacas procedentes de 184 rebaños, resultando positivos dos de ellos (2,9%) (Martin-Gomez et al., 1998).

**Tabla 1.** Prevalencia de la tricomonosis bovina en diversos países.

País	Prevalencia rebaño (%)	Prevalencia individual en toros (%)	Referencia
Australia	65,6	ND	McCool et al., 1988
Argentina	28	ND	Perez et al., 2006
Brasil	13	29	Sin publicar
Canadá	ND	6	Riley et al., 1995
Costa Rica	6,7-18,4	3,9-6,2	Perez et al., 1992
EE.UU. (California)	ND	6-7,8	Skirrow and BonDurant., 1988
EE.UU. (Nevada)	26,7-44,1	4,7	Kvasnicka et al., 1989
EE.UU. (California)	15,8	4,1	BonDurant et al., 1990
EE.UU. (Florida)	30,4	6	Rae et al., 2004
EE.UU. (Alabama)	ND	0,27-1,25	Rodning et al., 2008
EE.UU. (Texas)	ND	3,6	Szonyi et al., 2011
España	ND	2,9	Martin-Gomez et al., 1998
Sudáfrica	ND	7	Erasmus et al., 1989

ND: No Determinado

### 1.2.2 Transmisión

Como se ha mencionado anteriormente, *T. foetus* se transmite directamente de animal infectado a animal sano mediante la cópula. Los promedios de transmisión a las hembras oscilan entre el 30 y el 70% (Clark and Dufty, 1978; Christensen and Clark, 1979; Rhyan et al., 1999). La transmisión está en relación directa con el número de organismos sobre la superficie del pene y el prepucio, la libido y el nivel de dominancia del macho en el rebaño (BonDurant, 2005).

Ocasionalmente, la transmisión puede darse por otros mecanismos; por ejemplo, de forma mecánica durante la práctica de la IA o de la exploración vaginal, si se utiliza material contaminado o bien, a través de un toro sano, desde una vaca infectada a otra receptiva, si entre las dos montas no transcurre demasiado tiempo. Adicionalmente, aunque este patógeno no está presente en el semen, puede contaminarlo a partir del líquido preucial durante la recolección manual. Dada la resistencia de *T. foetus* en el semen fresco, puro o diluido, refrigerado e incluso, crío-conservado, existe la posibilidad de transmisión mediante IA con semen contaminado (Clark, 1971; Eaglesome and Garcia, 1997; BonDurant, 2005).

### 1.2.3 Factores de riesgo

Existen diversos factores que contribuyen a la presentación de la tricomonosis, los cuales se comentan a continuación.

#### Edad

Diversos estudios han mostrado una asociación directa de la edad del toro con la presentación de la tricomonosis bovina, debido al mayor número de contactos sexuales y por tanto una mayor exposición al agente etiológico. Asimismo en los toros mayores, las criptas glandulares son más profundas en la mucosa prepucial, hecho que favorece la implantación y desarrollo del patógeno (Dufty et al., 1975; Christensen et al., 1977; Clark and Dufty, 1978). Algunos estudios indican que la eliminación del protozoo en un toro joven es posible dentro de los primeros 20 minutos posteriores a la monta de una vaca infectada, sin embargo algunos toros expuestos a *T. foetus* en situaciones naturales de monta, son capaces de llegar a ser animales crónicamente infectados a pesar de la edad (Clark et al., 1977).

En diversos estudios se han encontrado diferencias significativas en la frecuencia de la infección en relación con la edad de los toros. En toros menores de 3 años se observó una prevalencia del 2% frente a un 6,7% en toros mayores de 4 años (BonDurant et al., 1990). Igualmente Rae et al. (1999), describieron que la edad media de los toros infectados fue de 5,5 años y la de los no infectados 3,9 ( $P < 0.001$ ). Recientemente, se ha observado que los toros mayores de 5 años de edad tenían 2,2 (OR=2,2; 95% CI, 1,1-4.3;  $P = 0,022$ ) veces más probabilidades de infectarse con *T. foetus* comparados con los toros menores de 5 años (Rae et al., 2004).

#### Raza

A pesar de que varios estudios han examinado la susceptibilidad a la infección en diversas razas, no se ha podido establecer una clara asociación. Aunque en los primeros estudios realizados no se encontraron diferencias en la predisposición a la infección por *T. foetus* entre las razas derivadas del *Bos taurus* (*Bos primigenieus taurus*) y las del *Bos indicus* (*Bos primigenieus indicus*), estudios posteriores han demostrado un mayor riesgo

de infección para el *B. taurus*. Estas diferencias se han justificado por el mayor número de montas realizadas por *B. taurus* comparado con las efectuadas por *B. indicus* en el mismo periodo de tiempo, incrementándose de esta manera la posibilidad de exposición a vacas infectadas (BonDurant et al., 1990; Ortega-Mora et al., 1998b). Posteriormente, en un estudio realizado por Rae et al. (2004) se describió que las razas de origen *B. taurus* tuvieron seis veces más probabilidad de estar infectadas que las razas derivadas del *B. indicus*.

Algunos estudios también han sugerido que ciertas razas, como la Hereford pueden ser más resistentes a la infección (Ball, 1987). Asimismo, la prevalencia en las razas Simmental, Charolesa y Angus ha sido comparativamente mayor en relación con otras razas puras y sus cruces (Rae et al., 1999; Villarroel et al., 2004; Rae and Crews, 2006). Rae (1989), evaluó la susceptibilidad en una granja con diversas razas describiendo una mayor prevalencia de *T. foetus* en la raza Brangus (17,9%) frente a la raza Bradford (2,5%). En este mismo estudio, los toros Angus (la única raza *Bos taurus* representada en el estudio) presentaron una prevalencia del 12%.

### **Estado de portador**

La existencia de portadores asintomáticos, principalmente los machos, aunque también un pequeño porcentaje de hembras, permiten el mantenimiento de la infección en los rebaños afectados (Skirrow, 1987; Mancebo et al., 1995). En los machos, la infección persiste durante largos periodos de tiempo, lo que está relacionado con la baja capacidad de desarrollar una respuesta inmunitaria (Perez et al., 1992). Adicionalmente, como se ha mencionado anteriormente, la presencia de criptas más profundas en el epitelio prepucial de toros mayores, proporciona un ambiente microaerofílico, adecuado para el desarrollo de *T. foetus*.

En el caso de las hembras en infecciones experimentales, la infección se elimina del útero y la vagina entre las semanas 6 y 12 post-infección (Anderson et al., 1996; BonDurant et al., 1996). Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de que algunos animales puedan actuar como portadores asintomáticos, manteniendo la infección durante toda la gestación e incluso más allá del parto. Así, *T. foetus* fue detectado en novillas infectadas naturalmente en el día 300 post cubrición (Mancebo et al., 1995).

### Prácticas ganaderas

Determinados hábitos relacionados con el manejo de los animales facilitan la transmisión de la infección y dificultan su control, como la utilización de sementales compartidos, el uso de pastos comunales y la ausencia de pruebas diagnósticas en los animales de nueva adquisición (Goodger and Skirrow, 1986; Gay et al., 1996; Ortega-Mora et al., 1998b; Mardones et al., 2008). También se ha descrito que un aumento en el número de rebaños que comparten un pasto, conlleva un aumento en el riesgo de infección al incrementarse los contactos sexuales con animales de estado sanitario desconocido (Gay et al., 1996).

Por su parte, el tamaño de la explotación también parece ser un factor de riesgo. Se ha descrito que aquellas explotaciones de gran tamaño (500 animales) tenían un riesgo significativamente más alto de estar infectadas cuando se comparaban con explotaciones más pequeñas. Esto es debido a que los propietarios dividen las explotaciones en unidades de producción, las cuales tienen un mayor número de toros (>10) por unidad, en comparación con las explotaciones pequeñas que tienen menos toros por unidad de producción (Rae et al., 2004). Por tanto, aquellas prácticas que conlleven un incremento en la relación toro:vaca (menor número de vacas por toro), parecen aumentar el riesgo de infección. Esta práctica es usada por los productores para incrementar las tasas de concepción en granjas donde la densidad es relativamente baja y la extensión de las explotaciones es grande. Se asume que cada una de estas prácticas incrementa el número de contactos sexuales aumentando el riesgo de la enfermedad (Rae et al., 2004).

### 1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las mayores pérdidas económicas ocasionadas por este patógeno, se asocian con problemas de fallo reproductivo temprano, lo que supone una disminución del número de terneros a destetar y un incremento en el intervalo entre partos. La reducción en el número de terneros que se obtienen en el mismo período de tiempo y en su peso final se traduciría en una disminución de los ingresos por terneros que oscilaría entre el 4,4% y el 10,2%. En estas circunstancias, se produce la imposibilidad de tener la paridera concentrada para vender los terneros al destete o cebados en los meses de mayor demanda. También es

importante la repercusión en los costes de alimentación cuando los partos se producen en épocas desfavorables. A estas pérdidas habría que añadirle las ocasionadas por las vacas que abortan o desarrollan piómetras y las derivadas de dos situaciones epidemiológicas que agravan el proceso: la existencia potencial de vacas portadoras para la siguiente estación reproductora y el posible incremento en la prevalencia de la infección al ser adquirida por los toros no infectados. A estas pérdidas, habría que añadirle los gastos derivados del sacrificio y reposición de los animales infectados así como el coste de la atención veterinaria (Rae, 1989; BonDurant et al., 1990; Speer and White, 1991; Rae et al., 2004).

Los costes causados por la tricomonosis bovina en EE.UU. hace 15 años ya suponían unas pérdidas de 600 millones de dólares (Speer and White, 1991). En un estudio de simulación, se estimó que en una explotación con una prevalencia de *T. foetus* en el 20-40% de los sementales supondría una incidencia en las hembras entre el 17% y el 72%. Como consecuencia se daría una reducción del 14-50% en el número de terneros nacidos al año. Además, al prolongarse el periodo de partos y disminuir el de engorde de los terneros se reduciría el peso final de estos. El balance final supondría una disminución de los ingresos por ternero que oscilaría entre el 4,4% y el 10,2% (Rae, 1989; Ortega-Mora et al., 1998b).

### 1.4 PATOGENIA Y LESIONES

#### 1.4.1 En el macho

*T. foetus* se localiza en las criptas peneanas, el fómix y la parte distal de la uretra (Parsonson et al., 1974). El microorganismo no invade el epitelio, por lo que la infección no cursa con lesiones en el pene ni prepucio y no afecta a la calidad del semen o la libido del toro (Parsonson et al., 1974; Anderson et al., 1994). El macho una vez infectado actúa como portador asintomático durante toda su vida. En este sentido, se han estudiado toros infectados con *T. foetus* durante periodos prolongados de tiempo, comprobándose semanalmente la presencia del parásito en el esmegma prepucial sin que se observe ningún signo clínico, ni lesión macroscópica en dichos animales (BonDurant, 1997; Rhyan et al., 1999).

Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos han permitido evidenciar la presencia de infiltrados de células mononucleares y plasmáticas en la lámina propia de pene y prepucio junto a estructuras linfoides (Rhyan et al., 1999). Dichas estructuras fueron previamente descritas por Parsonson et al. (1974). Posteriormente, se determinó que eran sitios de procesamiento antigénico y síntesis de inmunoglobulinas (Rhyan et al., 1999). El prepucio y el pene de los toros infectados con *T. foetus* presenta una infiltración intra y subepitelial por células plasmáticas y linfoides. Los infiltrados linfoplasmáticos subepiteliales están uniformemente distribuidos bajo el epitelio, pero ocasionalmente forman agregados similares a folículos linfáticos en los cuales se distinguen incluso centros germinales. Sin embargo esta infiltración inflamatoria no difiere de la encontrada en ocasiones en toros normales (Cobo et al., 2011).

### **1.4.2 En la hembra y en el concepto**

La infección en la hembra ocurre después del coito con un toro infectado. El parásito atraviesa el cérvix durante el estro y progresa rápidamente, pudiéndose detectar en el mucus cérvico-vaginal una semana después de producida la infección. A las dos semanas, *T. foetus* puede haber colonizado las diferentes partes del aparato genital. La localización preferente es en la base del cuello uterino y el mucus cérvico-vaginal, pero el número de parásitos presente en éste suele variar a lo largo del ciclo estral, siendo mayor en los días anteriores al celo (BonDurant, 2005). Después del día 49, *T. foetus* ocasiona endometritis, cervicitis, salpingitis y placentitis (Parsonson et al., 1976; Rhyan et al., 1988; Anderson et al., 1996) con infiltrado linfocitario en la lámina propia, presencia de macrófagos y células plasmáticas (Anderson et al., 1996). La infección por *T. foetus* produce la pérdida de la gestación en los periodos embrionario y fetal antes del día 120 de gestación. La infección en la hembra suele ser autolimitante, desapareciendo transcurridos entre 90-95 días post-infección (Parsonson et al., 1976). Las vacas que se recuperan poseen una inmunidad parcial frente a la reinfección. La inmunidad que se desarrolla dura aproximadamente unos 6 meses y después va disminuyendo con el tiempo, desapareciendo completamente a los 3-4 años tras la primo-infección en ausencia de vacunaciones o reinfecciones (Clark et al., 1983b).

El establecimiento de la infección en el tracto genital de la hembra no parece interferir con la fertilización ni con el desarrollo temprano del embrión, siendo la endometritis la

responsable de la pérdida de gestación. El embrión bovino migra normalmente hacia el útero, se desarrolla como blastocisto (día 6-7) y comienza el proceso de implantación incluyendo la elongación (día 13), aposición (día 19-20) y adhesión (días 21-22) (Guillomot, 1995). No existen estudios que demuestren que *T. foetus* provoque alguna alteración en las mencionadas etapas, a pesar de que *T. foetus* se adhiere a la zona pelúcida y células trofoblásticas en las primeras 72 horas del desarrollo embrionario (Bielanski et al., 2004). Estudios *in vitro* utilizando óvulos, cigotos y embriones bovinos en presencia de *T. foetus* no mostraron efectos sobre la movilidad o la función de los espermatozoides, la fertilización o el desarrollo embrionario (Bielanski et al., 2004). Sin embargo, otros estudios recientes *in vitro* han podido demostrar que *T. foetus* daña la zona pelúcida alcanzando el oocito e induciendo apoptosis (Benchimol et al., 2007).

Las lesiones placentarias y fetales antes del día 60 de gestación son mínimas, permitiendo el mantenimiento de la gestación normalmente. Sin embargo, después de dicho período, la presencia de *T. foetus* genera una reacción inflamatoria en los placentomas (cotiledones y carúnculas) con presencia de macrófagos y neutrófilos (Rhyan et al., 1988; Rhyan et al., 1995). Dicha placentitis se correlaciona con la pérdida fetal y ocurre usualmente antes del séptimo mes de preñez. En los dos primeros meses de gestación, *T. foetus* es capaz de penetrar en el corion placentario y el epitelio de las mucosas fetales invadiendo los tejidos conectivos y linfáticos adyacentes. Se cree que el parásito es aspirado por el feto a partir del líquido amniótico, produciéndose la colonización del estómago, el intestino y los pulmones fetales (BonDurant, 1997). Los hallazgos histopatológicos fetales más frecuentes son bronconeumonía piogranulomatosa y enteritis necrotizante (Rhyan et al., 1988; Rhyan et al., 1995), encontrándose una gran cantidad de parásitos en el estroma del corion de la placenta de fetos abortados, así como en los alveolos y bronquiolos (Rhyan et al., 1988).

### **1.4.3 Mecanismos de acción patógena**

Pese a lo expuesto, los mecanismos por los cuales se produce la mortalidad embrionaria tardía y fetal temprana son desconocidos. Entre ellos cabría incluir: la acción mecánica directa de *T. foetus* agravada por la presencia de una gran cantidad de parásitos en el útero materno; la citotoxicidad producida por las enzimas secretadas por el parásito;

la alteración del medio ambiente intrauterino por la reacción inflamatoria y la respuesta inmunitaria que desarrolla el hospedador.

*T. foetus* reside en la mucosa superficial del tracto reproductor del hospedador y su habilidad para adherirse al epitelio vaginal es fundamental en el establecimiento de la infección (Burgess and McDonald, 1992). La adhesión de *T. foetus* a la célula epitelial del tracto genital de la hembra bovina se inicia mediante el flagelo posterior y luego continúa por su soma, favorecido por el pH vaginal, siendo capaz de producir daños citotóxicos por contacto (Corbeil et al., 1989). En el proceso de adhesión de *T. foetus* intervendrían moléculas específicas, como la fibronectina (Alderete et al., 2002) y la ecto-ATPasa  $Mg_{2+}$  dependiente, que desdoblaría la D-galactosa ubicada en la superficie mucosa del hospedador (Jesus et al., 2002). A su vez, el proceso de adhesión se ve facilitado por lectinas superficiales de *T. foetus* que se unen específicamente al ácido siálico de la superficie mucosa (Babal and Russell, 1999) y otras moléculas superficiales del parásito reconocidas genéricamente como adhesinas (Felleisen, 1999). Entre ellas destacan los lipofosfoglicanos (LPG), Tf 190, la adhesina superficial Tf 1.17 y el antígeno soluble y glicosilado (SGA), el cual es continuamente liberado desde la superficie del protozoo y relacionado químicamente con LPG y Tf 1.17 (Singh et al., 2001). Todas estas moléculas se han descrito en el apartado de composición antigénica. Dichas adhesinas tendrían también la capacidad de adherirse y destruir los glóbulos rojos por hemoaglutinación (Felleisen, 1999).

Por otra parte, *T. foetus* secreta una serie de enzimas con actividad citotóxica muy activas a pH fisiológico frente a una gran variedad de moléculas del hospedador incluyendo proteínas con función defensiva inespecífica y específica como la lactoferrina, fibronectina e inmunoglobulinas. Estas enzimas podrían actuar en lugares físicos críticos como la unión materno-fetal en un momento en que esta superficie se encuentra en expansión (días 28-45 de gestación). Entre estas enzimas cabe destacar endo y exoenzimas que incluyen beta-galactosidasas, glicosidasas relacionadas con la ruptura de la capa de mucina genital, y neuraminidasas localizadas en la periferia del protozoo. Sin embargo, la cisteín-proteasa es la enzima de mayor importancia en la patogénesis de *T. foetus* (Mallinson et al., 1995; Thomford et al., 1996).

La cisteín-proteasa ayuda a la escisión de la fibronectina y desintegración de la matriz extracelular epitelial, degradando diferentes proteínas del hospedador, (fibrinógeno, albúmina y lactoferrina) y colaborando con el proceso de adherencia debido a su capacidad para desintegrar epitelios (Yule et al., 1989). A su vez, favorece la evasión de la respuesta inmunitaria humoral, degradando isotipos de IgG, especialmente IgG2, encargados de opsonizar y facilitar la fagocitosis mediada por neutrófilos (Bastida-Corcuera et al., 2000). Asimismo, también degrada la fracción C3 e inhibe la formación de C3b y la cascada mediada por el complemento (Talbot et al., 1991; Kania et al., 2001). La acción de la cisteín-proteasa definiría por tanto, una eficiente evasión de la inmunidad humoral mucosal del tracto genital y la consecuente persistencia parasitaria.

Por otra parte, también se ha indicado que la propia endometritis que se produce aproximadamente a las 6-8 semanas post-infección altera el medio intrauterino causando la muerte del feto. Uno de los mecanismos sugeridos sería la excreción por parte del parásito de antígenos de membrana que se unirían a la célula hospedadora (corion embrionario o endometrio materno) y actuarían de nexo de unión para los anticuerpos anti-*T. foetus*, desencadenando diversos mecanismos de destrucción celular como la fagocitosis, opsonización, etc.

### 1.4.4 Inmunidad

La respuesta inmunitaria en la infección por *T. foetus* ha sido estudiada tanto en infecciones experimentales como naturales y muchos de los datos se han complementado con estudios vacunales.

En un toro sano, la mucosa del prepucio y pene está cubierta por un epitelio escamoso plano queratinizado formando criptas que se extienden dentro del tejido conectivo subepitelial. Este epitelio presenta gran cantidad de neutrófilos y linfocitos incluyendo linfocitos T CD3+ y CD8+ distribuidos de manera difusa cerca de la membrana basal (Cobo et al., 2010). El subepitelio del prepucio está poblado por células linfoides incluyendo células plasmáticas productoras de IgG y en menor cantidad de IgA e IgM (Flower et al., 1983). El subepitelio prepucial de los toros está igualmente infiltrado por linfocitos, los cuales forman agregados similares a folículos linfoides así como células MHC II+ y CD 205+, estas últimas son las encargadas de iniciar la respuesta innata frente

a antígenos del parásito observándose un aumento en su número, tanto en infecciones experimentales como naturales (Cobo et al., 2010). El epitelio genital puede funcionar como células presentadoras de antígeno ya que se han detectado antígenos de *T. foetus* en el interior del citoplasma de dichas células así como en el interior de células mononucleares subepiteliales (Rhyan et al., 1999). A pesar de que las células epiteliales pueden presentar antígenos a las células T en la mucosa prepucial en concierto con MHC II y células expresando CD205+, la activación/diferenciación de células T efectoras, su regulación y la inmunidad innata no han sido estudiadas (Cobo et al., 2011).

La infección por *T. foetus* en toros, induce la producción local de IgG1, IgM e IgA frente el antígeno Tf1.17, aunque esta respuesta no es suficiente para resolver la infección (Rhyan et al., 1999). Sin embargo, a diferencia de las infecciones naturales, en las experimentales no se inducen cantidades considerables de anticuerpos hasta seis semanas post infección, no detectándose en ninguno de los casos anticuerpos séricos.

A diferencia del toro, las vacas son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva frente a *T. foetus* (Skirrow and BonDurant, 1990a). Las infecciones pueden ser eliminadas del tracto reproductivo en las hembras en un periodo aproximado de 95 días (Parsonson et al., 1976) o pueden incluso prolongarse hasta los 22 meses. Existe una respuesta de memoria ya que hay resistencia frente a las reinfecciones que acontecen en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, la inmunidad no persiste y esta respuesta sólo es efectiva si la re-infección ocurre dentro de los 15 meses siguientes a una primoinfección (Parsonson et al., 1974; Clark et al., 1983a).

La infección natural no induce la síntesis de anticuerpos sistémicos ni durante ni después de la infección (Cobo et al., 2010). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en el toro, la infección en la hembra induce una respuesta local de anticuerpos en vagina y útero. En los primeros estudios realizados se demostró que el mucus vaginal de vacas infectadas era capaz de inmovilizar y aglutinar al parásito. Además, la relación directa entre la desaparición del parásito y la aparición de aglutininas locales ha sido sugerida por diversos autores. Hasta el momento se sabe que las IgA e IgG1 aumentan en la vagina y en el cérvix a las 8 semanas post-infección mientras que en el útero, el incremento sucede a las 11 semanas post-infección. La IgM se detecta en cantidades ínfimas y la IgG2 aparece sólo de manera transitoria incrementándose en la 11 semana p.i en el cérvix y en

la 14 semana p.i. en la vagina. Tanto la IgA como la IgG1 anti-*T. foetus* producidas localmente reconocen un amplio número de antígenos parasitarios de entre 20 y 200 kDa. La eliminación del parásito se ha relacionado con el reconocimiento por parte del hospedador de proteínas de alto peso molecular (Skirrow and BonDurant, 1990a; Corbeil and BonDurant, 2001; Corbeil et al., 2005).

Es conocido que las IgG1 anti-*T. foetus* son capaces de prevenir la adhesión del parásito a las células epiteliales vaginales, mientras que las IgG2 pueden estar más relacionadas con la opsonización. Dado que la fagocitosis es una de las formas de eliminación de este parásito, la opsonización puede ser un importante mecanismo de eliminación de éste. Se conoce poco acerca del papel de la IgA, aunque se piensa que la inmunidad asociada a mucosas juega un papel importante en este proceso. Los conocimientos sobre los mecanismos de respuesta celular en el hospedador frente a la infección son escasos. Las primeras evidencias corresponden a la observación de fagocitosis del parásito por parte de neutrófilos y macrófagos. La fagocitosis también se ha observado *in vitro* por parte de linfocitos y neutrófilos en ratones inmunizados con el parásito vivo, lo que sugiere que la fagocitosis era mediada por la opsonización del parásito. Estudios recientes sugieren que, para que la destrucción del parásito por parte de linfocitos polimorfonucleares fuera significativa, se requeriría la opsonización conjunta por parte de los anticuerpos anti-*T. foetus* y del complemento (Gault et al., 1995; Corbeil and BonDurant, 2001; Corbeil et al., 2005).

### **1.4.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria**

La persistencia y resistencia de la infección por *T. foetus* parece estar relacionada con la capacidad del patógeno de evadir la respuesta inmunitaria, utilizando para ello varios mecanismos (Cobo et al., 2011; Corbeil and BonDurant, 2001; Bastida-Corcuera et al., 2000; Kania et al., 2001):

- La variación de los epítomos antigénicos de superficie en las sucesivas generaciones: el parásito modifica la composición química de los azúcares de las glicoproteínas de superficie, por lo tanto modifica su identidad antigénica, por consiguiente la especificidad de los anticuerpos producidos por el hospedador resulta insuficiente (Corbeil and BonDurant, 2001). Así, la expresión del epítomo

Tf 1.17 varía entre diferentes poblaciones de *T. foetus* (Ikeda et al., 1993; Ikeda et al., 1995).

- El enmascaramiento antigénico: el parásito cubre sus epítomos con proteínas propias del hospedador por la presencia de receptores de fibronectina, fibrinógeno y laminina, impidiendo que el parásito sea reconocido como un agente extraño.
- La degradación de las Igs (principalmente las IgA, IgG) por proteasas extracelulares del parásito, alterando los mecanismos específicos de las defensas del hospedador.
- La internalización de inmunoglobulinas específicas adheridas a la membrana citoplasmática mediante un fenómeno similar a la endocitosis.
- Excreción de cisteín-proteasas, con todos los efectos previamente descritos sobre diversas proteínas del hospedador incluyendo, albúmina, lactoferrina, complemento C3, IgG1 e IgG2 (Bastida-Corcuera et al., 2000; Kania et al., 2001). Asimismo, se ha determinado que la lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpos es poco efectiva, ya que los niveles de complemento son bajos en el nicho en el que se desarrolla el parásito (Felleisen, 1999).

### 1.5. CUADRO CLINICO Y LESIONAL

#### 1.5.1 Individual

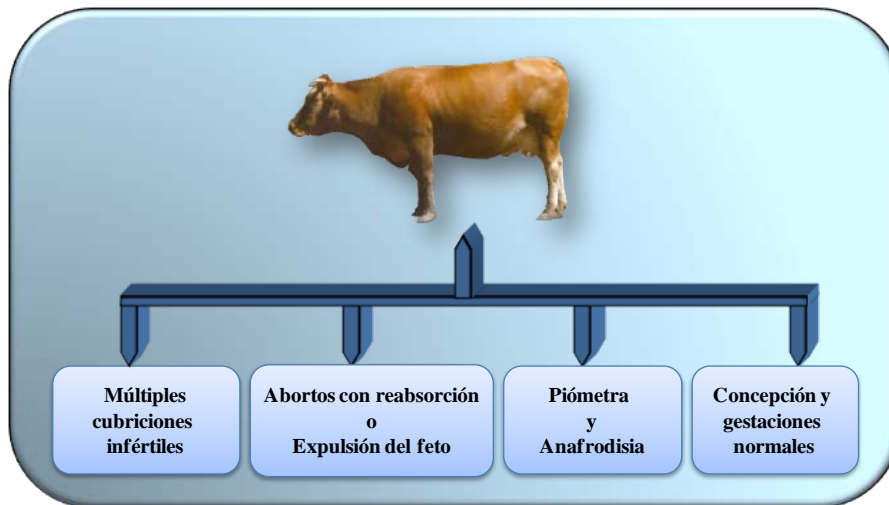
En el macho, la infección cursa de forma asintomática (Cobo et al., 2011). En la hembra, la manifestación más significativa es el fracaso reproductor transitorio acompañado de escasos signos clínicos consistentes en vaginitis, cervicitis y/o endometritis moderada, unidos, en ocasiones, a una descarga vulvo-vaginal mucosa o mucopurulenta aunque lo normal es que no existan signos manifiestos de la infección (Anderson et al., 1996). El embrión o el feto se pierden casi siempre en el primer tercio de la gestación, pasando el aborto desapercibido y calificándose el animal como repetidor, infértil o no preñado.

Después de la pérdida del feto se establece un proceso gradual de reparación del útero que se completa entre 2-6 meses después del aborto. En algunos casos (entre un 5-10% de

las hembras) existe mantenimiento del cuerpo lúteo y maceración fetal lo que ocasiona la presencia de una piómetra, que, en algunos casos, desencadena la esterilidad del animal (Rhyan et al., 1988; Rhyan et al., 1995).

En consonancia con todo lo expuesto anteriormente, los cuadros clínicos que pueden desarrollar las vacas y novillas que han sido infectadas por *T. foetus* pueden observarse en la Figura 3 y se resumen a continuación (revisado en Ortega-Mora et al., 1998; Rae and Crews, 2006):

- Concepción y gestación normales, sin signos de enfermedad.
- Múltiples cubriciones infértiles, pero sin mostrar signos obvios de infección. Los ciclos estrales pueden ser regulares cada 21 días si la muerte embrionaria se produce antes del reconocimiento maternal de la gestación o, con mayor frecuencia, irregulares si la muerte embrionaria es posterior a ese reconocimiento.
- Aborto con reabsorción o expulsión del feto, seguido de un periodo de infertilidad debido a la inflamación y destrucción de la mucosa uterina, que será reparada gradualmente hasta la reinstauración del útero fértil. Durante este periodo son normales las descargas vaginales mucopurulentas asociadas a una endometritis crónica.
- Piómetra y anafrodisia. En algunos casos, el cuerpo lúteo ovárico de gestación se mantiene y provoca una continua secreción de flujos dentro del lumen uterino que junto con la muerte y maceración del feto, hacen que se desarrolle una piómetra y se instaure una infección crónica que, de no repararse, produce esterilidad. Este hecho acontece en menos del 10% de los animales.



**Figura 3.** Signos clínicos individuales observados en hembras infectadas con *T. foetus*.

### 1.5.2 De rebaño

Los efectos de la enfermedad en el rebaño son la sumatoria de los signos clínicos individuales, unidos al impacto de la presencia del parásito sobre la eficiencia reproductiva de las hembras. El primer indicio de la presencia de tricomonosis en un rebaño es un brusco descenso de la fertilidad, observándose una disminución de la tasa de concepción, un aumento de vacas repetidoras, un alargamiento del intervalo entre partos y, como consecuencia la disminución del número de terneros/año (Clark et al., 1983a; McCool et al., 1988; BonDurant, 2005; Rae and Crews, 2006).

Algunos trabajos han corroborado los efectos de la presencia de *T. foetus* sobre el rebaño. Alsted et al. (1984) y Barling et al. (2005), determinaron que la proporción de vacas no preñadas fue del 57% y 45,3% en rebaños infectados. Rae et al. (1989), establecieron que la disminución del número de terneros por año se encuentra en relación con el número de vacas infectadas. Clark (1983), encontró una diferencia del 17% en el número de terneros por año, comparando rebaños con presencia de toros positivos frente a rebaños libres de la infección. Este mismo estudio determinó que el intervalo entre partos fue de 96,5 a 98,9 días mayor en los rebaños infectados.

### 1.6 DIAGNÓSTICO

#### 1.6.1 Diagnóstico clínico, epidemiológico y diferencial

El diagnóstico clínico individual es de muy poca utilidad, ya que generalmente no se observa ningún signo clínico (independiente del fallo reproductivo) como consecuencia de la infección. Las hembras pueden tener descarga vaginal mucopurulenta poco abundante, endometritis, cervicitis leve, salpingitis y enrojecimiento del cuello uterino. Las infecciones en el toro pasan desapercibidas, la calidad del semen no está alterada y su comportamiento reproductivo es normal aunque puede sufrir adelgazamiento y pérdida de la libido como consecuencia de un exceso de montas por la repetición de celo en las hembras (BonDurant, 2005).

Se puede sospechar de la presencia de la enfermedad al estudiar el historial del rebaño. También es importante considerar el historial de los sementales y las prácticas ganaderas para orientar el diagnóstico (Dekeyser, 1986; BonDurant, 2005; Rae and Crews, 2006). En concreto, los lugares de pastoreo, pastos comunales, vallado en mal estado, el uso de toros comunales o la incorporación de sementales nuevos a la explotación pueden ser datos orientativos en el diagnóstico epidemiológico. En rebaños sospechosos donde habitualmente se lleva a cabo el diagnóstico de gestación a los 35 días es aconsejable repetirlo a los 90 días ya que es en este momento, en caso de que exista tricomonosis, cuando se pierden la mayor parte de las gestaciones (Hurtado Pizarro, 2005; Mardones et al., 2008).

Después de conocido el historial y realizado el diagnóstico de gestación en el rebaño sospechoso, es necesario llevar a cabo el diagnóstico diferencial con otras enfermedades que cursan con manifestaciones similares a la tricomonosis. Entre ellas, hay que incluir la campylobacteriosis genital bovina, enfermedad de transmisión sexual causada por *Campylobacter fetus veneralis*, que presenta una epidemiología muy similar a la tricomonosis aunque, en este caso, no son típicas las piómetras postcoito. Otros agentes infecciosos de transmisión venérea son *Haemophilus somnus*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis genitalium* y el herpesvirus bovino I (biotipo 2), aunque su presencia es esporádica (Ortega-Mora et al., 1998a). En los casos raros en que la tricomonosis cursa con aborto en la fase media o tardía de la gestación es necesario realizar el diagnóstico

diferencial con otras causas de aborto. Entre ellas se encuentran, la brucelosis, la leptospirosis, la listeriosis, la clamidiosis, las infecciones por ureaplasmas y salmonelas (*Salmonella dublin* es la más frecuente), por micoplasmas y algunas especies de hongos que pueden producir aborto en el ganado bovino (*Aspergillus*, *Candida*, etc). Entre los agentes víricos que pueden causar problemas reproductivos están el herpesvirus bovino tipo 1 y el agente etiológico de la diarrea vírica bovina/enfermedad de las mucosas. En caso de aborto, también es necesaria la diferenciación entre la tricomonosis y la neosporosis (Ortega-Mora et al., 1998a). También deben descartarse otras causas no transmisibles de fallo reproductivo, como la nutrición inadecuada y/o insuficiente tanto de las hembras como de los machos.

### **1.6.2 Diagnóstico de laboratorio**

El diagnóstico definitivo de la tricomonosis debe basarse en la identificación del parásito en las secreciones prepuciales o en el mucus cérvico-vaginal de los animales infectados. Para el diagnóstico de la infección en un rebaño, lo más recomendable es muestrear a los sementales en vez de a las hembras, debido a la persistencia de la infección en el toro durante periodos de tiempo prolongados. La muestra de elección en el toro es el esmegma prepucial. La toma de muestras y el transporte son puntos clave que deben llevarse a cabo siguiendo procedimientos normalizados y validados. Actualmente, la técnica de referencia para el diagnóstico de rutina y control de la enfermedad es la identificación morfológica del parásito en cultivo y confirmación por PCR (Figura 4) (metodología diagnóstica revisada en: Campero et al., 2003; Sager et al., 2007; (BonDurant, 2005; Rae and Crews, 2006; Sager et al., 2007).

#### **1.6.2.1 Recogida y envío de muestras**

##### **1.6.2.1.1 En el toro**

El diagnóstico de laboratorio en el toro, se realiza mediante el cultivo del agente a partir del esmegma prepucial. Antes de muestrear al animal es conveniente mantener al toro en reposo sexual durante una o dos semanas para maximizar el número de organismos presentes en la cavidad prepucial. Asimismo, es aconsejable recortar el pelo del saco prepucial y limpiar la zona para evitar la contaminación fecal. Hay que evitar el uso

de jabón u otros desinfectantes ya que pueden afectar a la viabilidad del agente. Posteriormente, se realiza un masaje vigoroso de la zona caudal de la cavidad del prepucio, con objeto de que los parásitos presentes en las criptas se desprendan de la mucosa. Es importante también evitar la contaminación de la muestra con orina, ya que diluye la muestra. Las muestras de esmegma prepucial pueden obtenerse por raspado, succión o lavado, usando un raspador o una pipeta de IA (Parker et al., 2003a; Sager et al., 2007).



**Figura 4.** Protocolo de recogida de muestras de esmegma prepucial para el diagnóstico de la tricomonosis bovina.

### Método del lavado prepucial

Este método está basado en la introducción de PBS o solución salina saturada dentro del prepucio (Fitzgerald et al., 1952), para ello se utiliza una pipeta de IA, a la que se le conecta un tubo de látex de aproximadamente 60 cm. Este tubo de látex está adosado por su otro extremo a una jeringa que contiene PBS. Una vez introducida la solución, se cierra con una mano el orificio prepucial para evitar su salida y se efectúan vigorosos masajes en sentido cráneo-caudal durante aproximadamente 1 minuto y posteriormente se recoge el líquido, dejándolo caer por gravedad a través de la goma (Schonmann et al., 1994).

Actualmente, este método se ha dejado de utilizar ya que los lavados ocasionan la dilución del contenido celular de la muestra, además de resultar tedioso, aumentar el número de muestras contaminadas y, en algunos toros, la introducción de líquido estimula la micción.

### Método de la pipeta

Originalmente se utilizó la pipeta de Bartlett (1949), que consistía en un tubo de vidrio de 54 cm de largo y con uno de sus extremos acodado, el cual se introducía en la cavidad prepucial mientras que en el extremo opuesto se colocaba un tubo de látex por donde se aspiraba el material. Este método fue modificado posteriormente utilizando otras variables como las pipetas de IA, a las que se conecta para aspirar una jeringa con un tubo de goma entre ésta y la pipeta (Figura 5). Este sistema permite extraer una adecuada cantidad de esmegma. Las desventajas citadas por algunos autores, como pequeños traumatismos en la mucosa y resistencia por parte del toro, pueden evitarse si la introducción de la pipeta en la cavidad prepucial se efectúa cuidadosamente (Parker et al., 1999).



**Figura 5.** Recogida de muestra de esmegma prepucial mediante pipeta de IA.

### Método del raspador

Los raspadores son instrumentos metálicos o plásticos de 70 cm de largo que tienen un extremo anterior ranurado de aproximadamente 10 cm de largo y 8 mm de diámetro, por medio del cual se facilita la acción del raspado de los pliegues prepuciales. El raspador se introduce en la cavidad prepucial, efectuando 20 a 30 movimientos en sentido antero-posterior. Posteriormente, el material recogido es inoculado en los correspondientes medios de transporte o PBS, efectuando movimientos rotatorios para desprender el esmegma de las ranuras del cabezal (Figura 6). El raspador siempre debe

esterilizarse antes de muestrear cada animal. Muchos autores han avalado su empleo por la rapidez con la que se opera y por la sencillez del método, además disminuye la contaminación por orina y no se necesita de un asistente para la toma de la muestra (Parsonson et al., 1974). El pequeño volumen obtenido tras el raspado prepucial facilita el transporte y el procesamiento en el laboratorio. Por otra parte, al obtener la muestra de la región caudal del saco prepucial, hay menos probabilidades de contaminaciones medioambientales, especialmente en los toros que presentan una fuerte contaminación de la porción anterior de la cavidad prepucial causada por la eversión de la lámina interna. Estos hallazgos han sido también observados por otros investigadores que han realizado muestreos para *C. fetus venerealis* (Tedesco et al., 1977).



**Figura 6.** Recogida de muestra de esmegma prepucial mediante raspador plástico.

Se ha demostrado que la recogida de la muestra con pipeta de IA o raspador tiene una sensibilidad similar (Schonmann et al., 1994). Parker et al. (1999), no encontraron diferencias cuando compararon la toma de muestras con pipetas de IA y la utilización de un raspador metálico. Además se observó un incremento en la sensibilidad cuando las muestras fueron tomadas en el lado derecho del animal, independientemente de la técnica de muestreo utilizada, observándose cuatro veces más probabilidad de que fuera positiva que aquellas que se tomaron en el lado izquierdo (Parker et al., 2003b).

### 1.6.2.1.2 En la vaca o novilla

Debido al carácter autolimitante de la infección en la hembra, es muy importante tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la exposición y la toma de muestras ya que puede

tener un impacto significativo en los resultados del diagnóstico, por lo que el aislamiento del parásito puede ser menos exitoso que en el macho (Monke et al., 2002; Parker et al., 2003b).

La muestra en las hembras se realiza por medio de una pipeta de IA, obteniendo un aspirado del moco cérvico-vaginal a partir del cérvix. Alternativamente, en el caso de una piómetra se puede aspirar parte de su contenido. La muestra puede ser examinada directamente o tras inocularla en medios de cultivo apropiados (Gregory et al., 1990; Schonmann et al., 1994).

### **1.6.2.1.3 En el feto**

Los fetos abortados no son muestras frecuentes para el diagnóstico, pero en el caso de que se recoja un feto abortado, se examinará el contenido del abomaso.

### **1.6.2.2 Transporte de las muestras**

Del mismo modo, se debe evitar la conservación a bajas temperaturas e intentar el envío al laboratorio lo antes posible si se realiza el aislamiento del agente. En ninguno de los casos deben pasar más de 2 días desde la recogida de la muestra hasta su análisis, observándose una reducción superior al 14% en la sensibilidad de la técnica utilizada cuando las muestras se refrigeran durante 24 horas o más (Mukhufhi et al., 2003). Bryan et al., (1999), estudiaron la influencia del tiempo y la temperatura sobre el aislamiento de *T. foetus*, determinándose una disminución en la sensibilidad del diagnóstico cuando las muestras fueron mantenidas a bajas temperaturas durante más de 12 horas. Por otra parte, si la muestra se va analizar por PCR, sería recomendable su conservación a 4°C. En este sentido, Mukhufhi et al., (2003), analizaron muestras de lavado prepuccial transportadas en PBS y mantenidas durante 6 horas, 30 horas y 5 días a 4°C, observándose una disminución de la sensibilidad al aumentar el tiempo de conservación de la muestra. En otro estudio 5 muestras positivas fueron mantenidas a temperatura ambiente y otras tantas fueron almacenadas a 4-8°C, procesándose cada 24 h, 250 µL de cada muestra por PCR. Las muestras mantenidas a temperatura ambiente fueron positivas hasta las 72 horas, mientras que las muestras mantenidas a 4-8°C fueron positivas hasta una semana después (Mutto et al., 2006).

### 1.6.2.3 Detección de *T. foetus* por observación directa y cultivo

La muestra de esmegma prepucial puede resuspenderse en solución salina fisiológica y examinarse microscópicamente realizando una identificación del parásito en fresco. Sin embargo, el número de formas parasitarias en el esmegma prepucial o en el mucus cérvico-vaginal es relativamente bajo y el parásito debe ser cultivado en un medio apropiado para incrementar su número y que sea fácilmente detectable. Tanto en fresco como en cultivo, el parásito se reconoce a 200-400 aumentos por su tamaño y morfología (cuerpo piriforme, membrana ondulante, tres flagelos libres en la parte anterior), así como por su movimiento rotacional característico (Campero et al., 2003; Parker et al., 2003, Sager, 2007). Es necesario diferenciar a *T. foetus* de otros protozoos no patógenos con morfología similar aunque, en muchos casos, estos últimos no crecen en los medios de cultivo (Rae and Crews, 2006; Sager et al., 2007).

En el toro, el número de trofozoítos obtenidos mediante lavados prepuciales es muy variable (200-80.000/ml) y, por tanto, el examen directo es aproximadamente un 25% menos sensible que el cultivo. Mediante la observación directa, la probabilidad de detectar el parásito en el mucus cérvico-vaginal es menor que en las secreciones prepuciales debido, probablemente, a la fluctuación en su número a lo largo del ciclo estral, siendo mayor en los días inmediatamente anteriores al estro, y a la naturaleza viscosa del mismo, que afecta tanto a la recolección de la muestra como al movimiento y localización del parásito dentro de ella. En hembras infectadas experimentalmente, también se ha observado un menor porcentaje de positividad mediante la observación directa del mucus (30%) que tras el cultivo de las muestras (78%) (BonDurant, 2005).

### Medios de transporte y cultivo

Como se ha mencionado anteriormente, normalmente es necesario el cultivo del parásito porque, en la mayoría de los casos, el número de microorganismos es insuficiente para hacer un diagnóstico positivo mediante un examen directo. Asimismo, en la mayoría de los casos la recogida se realiza lejos del laboratorio, por lo que es muy importante resuspender la muestra en un medio de transporte/cultivo. Se han utilizado diversos medios con el objeto de conservar adecuadamente la muestra hasta su inoculación en los medios de cultivo apropiados. Así, el Centro para la Parasitología Animal (CPA), de Canadá, utiliza un medio Tioglicolato modificado denominado TFTM (*Tritrichomonas foetus* Transport Medium), para preservar la morfología y viabilidad de *T. foetus* hasta su llegada al laboratorio, donde es inoculado en el medio Diamond (DM) (Parker and McIntosh, 2000). Otras soluciones entre las que se incluyen: Agua peptonada (Tedesco et al., 1979), varias formulaciones de leche de vaca (Reece et al., 1983), solución salina (Kimsey et al., 1980), solución lactato de Ringer (Skirrow et al., 1985) y el medio Kupferberg (Kimsey et al., 1980), así como variantes del medio Diamond (Kimsey et al., 1980), son ejemplos de medios que han sido usados como medios de transporte.

Los medios de cultivo que pueden utilizarse pueden ser el medio CPLM (cisteína/peptona/infusión de hígado y maltosa), el medio BGPS (extracto de carne/glucosa/peptona y suero), el medio de Clausen (neopeptona-lemco-extracto de hígado y glucosa), el medio Oxoid, el medio Diamond y el medio comercial InPouch™ TF, siendo estos dos últimos los más utilizados (Todorovic et al., 1967; Sager et al., 2007; Rodning, 2007).

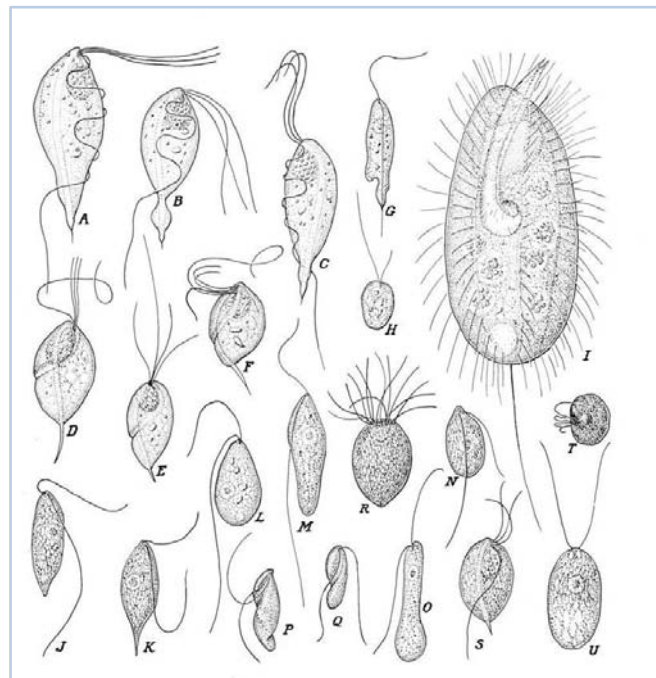
En los EE.UU. desde mediados de los años 40 y hasta finales de los 80 el raspado prepuccial y el cultivo en el medio Diamond fue el método de diagnóstico más utilizado (Schonman et al., 1994). Posteriormente, a principios de los 90, se introdujo un medio de transporte y cultivo comercializado en formato individual en un sobre plástico que es conocido como InPouch™ TF (Biomed Diagnostics, Inc., San Jose, CA) (Kimsey et al., 1980). Para ambos medios, las muestras que llegan al laboratorio deben ser incubadas a 37°C. Las muestras cultivadas se examinarán como mínimo cada 48 horas y por un periodo no inferior a los 7 días (Borchardt et al., 1992; Rae, 2006, Sager et al., 2007).

El cultivo *in vitro* del material prepucial utilizando los medios Diamond o InPouch™ TF ha sido considerado el método de referencia o “gold standard”, sin embargo la estimación de la sensibilidad diagnóstica depende de la eficacia en la recogida de la muestra, el manejo y el procesamiento, la composición y calidad del medio de cultivo y del número de muestreos que se realizan. En las mejores condiciones de muestreo, transporte y cultivo, no se garantiza que todas las muestras tomadas de un toro infectado den un resultado positivo. La probabilidad de detectar un animal positivo es del 85% si sólo analizamos una muestra y del 99% si se analizan tres (Parker et al., 1999). Por su parte, se ha estimado que la sensibilidad del sistema InPouch TF en los toros es de un 92% siempre y cuando las condiciones de manejo y transporte de la muestra sean óptimas (Kimsey et al., 1980; Thomas et al., 1990; Schönmann et al., 1994; Parker et al., 1999). Sin embargo, sensibilidades entre 70-90% son más representativas de muestras tomadas o procesadas bajo condiciones subóptimas como ocurre en condiciones de campo (Skirrow et al., 1985; Schönmann et al., 1994; Peter et al., 1995; Gay et al., 1996; Rae et al., 1999; Parker et al., 1999). La sensibilidad del medio InPouch™ TF en el diagnóstico de *T. foetus* es similar a la descrita para el medio Diamond (Diamond, 1957; Skirrow et al., 1985; Schönmann et al., 1994). Sin embargo, Parker et al., (2003) determinaron que el medio InPouch tenía 6,95 veces más probabilidades de detectar una muestra positiva, comparado con el medio Diamond.

La infección en las hembras se elimina normalmente tras 90-95 días, de manera que puede ser difícil aislar el parásito a partir de animales en fases tardías de la infección. En vacas jóvenes infectadas experimentalmente, se consiguió una sensibilidad del 88% a lo largo de un periodo de 10 semanas después de la infección utilizando el método de cultivo InPouch™ TF (Kittel et al., 1998). Esto es debido, probablemente, a las fluctuaciones en el número de parásitos durante el ciclo estral (Barlett and Hammond, 1945; Hammond and Barlett, 1954) y la naturaleza viscosa del moco cérvico-vaginal que puede afectar tanto la recolección de la muestra como al movimiento del parásito.

La especificidad del diagnóstico, cuando se utilizan medios de cultivo, puede igualmente ser un problema, debido a que otros protozoos presentes en muestras prepuciales pueden sobrevivir en los mismos. En algunos casos, otros tricomonádidos (por ejemplo, especies de *Pentatrichomonas*, *Tetratrichomonas* y *Pseudotrichomonas*), presumiblemente de origen intestinal han sido aislados del tracto reproductivo e intestinal

del ganado bovino (Campero et al., 2003; Cobo et al., 2007; Agnew et al., 2008). La fuente más probable de estos protozoos es la contaminación fecal de la muestra durante su obtención o bien por la conducta homosexual del toro. La similitud morfológica de los distintos géneros de protozoos flagelados que pueden crecer en los medios de cultivo, puede contribuir a falsos diagnósticos positivos (Figura7). Este hecho, representa un problema potencial para los laboratorios de diagnóstico. Por tanto, es de suma importancia la confirmación del resultado mediante una técnica de PCR específica para *T. foetus*, que permita diferenciar a esta especie del resto de posibles especies de tricomonádidos contaminantes (Ribeiro, 1990; Taylor et al., 1994; Felleisen et al., 1997; BonDurant et al., 1999).



**Figura 7.** Diferentes protozoos encontrados durante la examinación de material enviado para diagnóstico de tricomonosis A-C *Tritrichomonas foetus*; D-F *Monocercomonas sp*; G *Cercomona crassicauda*; H *Monas obliqua*; I *Lembus pusillus*; J-O *Bodo caudatus*; P-Q *Spiromonas angusta*; R *Callimastix frontalis*; S-T *Monocercomonas ruminantium*; U *Polytoma uvella* (Parker and McIntosh, 2000).

### 1.6.2.4 Detección de *T. foetus* por PCR

La técnica de PCR es actualmente utilizada por la mayoría de los laboratorios de diagnóstico para la identificación de *T. foetus* mostrando una buena sensibilidad y especificidad (Ho et al., 1994; Felleisen et al., 1998). Se han diseñado varias pruebas de PCR basadas mayoritariamente en la amplificación de una secuencia del ARNr 5.8 S o de la región ITS1 o ITS2 (Felleisen et al., 1997; 1998; Nickel et al., 2002) así como una PCR cuantitativa en tiempo real (Huby-Chilton et al. 2009). Las diferentes técnicas de PCR descritas muestran una sensibilidad suficiente para la detección de ADN a partir de un solo organismo en medio de cultivo (Ho et al., 1994; Felleisen et al., 1998; Nickel et al., 2002; Mukhufhi et al., 2003) estimándose que la sensibilidad diagnóstica de los ensayos de PCR es similar a la del sistema de cultivo InPouch™ TF. Por esta razón, Campero et al., (2003), sugieren una estrategia de diagnóstico en dos etapas. La primera se basaría en el cultivo de los raspados prepuciales, en el que se ha demostrado una sensibilidad aproximada del 90% (Skirrow et al., 1985; Borchardt et al., 1992). El segundo paso sería la confirmación por PCR de las muestras con cultivo positivo.

Sin embargo, en las muestras prepuciales la sensibilidad de la PCR parece ser menor debido probablemente a la inhibición por componentes del esmegma prepucial. Los lavados prepuciales frecuentemente contienen cantidades importantes de orina que puede tener un efecto inhibitorio (Mukhufhi et al., 2003). El raspado prepucial es más traumático, por lo que puede contener productos procedentes del daño del epitelio superficial, hemoglobina procedente de los glóbulos rojos, compuestos orgánicos, etc. Asimismo, las muestras pueden ser de consistencia mucoide lo que reduce la sensibilidad de la PCR (Ho et al., 1994). Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del ensayo se han probado varios protocolos de extracción de ADN. En este sentido, se ha utilizado la resina comercial Chelex 100 (BioRad) la cual ha demostrado tener la capacidad de eliminar potenciales inhibidores de la PCR (Walsh et al., 1991). Estudios previos han utilizado con éxito esta resina con una solución de agar de 0,05% para extraer el ADN a partir de esmegma previamente inoculado con trofozoítos de *T. foetus* (Chen and Li, 2001; Parker et al., 2001).

Por otra parte, el tiempo que transcurre en el procesamiento de la muestra puede llevar a una disminución en la sensibilidad de la PCR debido a una degradación progresiva de los ácidos nucleicos. *T. foetus* secreta un amplio espectro de enzimas hidrolíticas (Thomford et al., 1996). Estas enzimas causan la lisis celular y del ADN (Turner and Muller, 1983; Wang and Wang, 1985). Otros componentes, procedentes del propio parásito o de otros microorganismos presentes en la cavidad prepucial, pueden igualmente afectar la integridad de los ácidos nucleicos. Recientemente, Mukhufhi et al., (2003) investigaron la sensibilidad de un ensayo de PCR para el diagnóstico de *T. foetus* y los efectos del método de muestreo, el almacenamiento y la utilización de un medio de transporte sobre la prueba. Su ensayo mostró un límite de detección de dos organismos por ml, observando una disminución de la sensibilidad al aumentar el tiempo de almacenamiento de las muestras (de 90% a 6 horas a 31% en 5 días). Sin embargo, el método de muestreo (lavado, pipeta o raspador) y el uso del agente conservante tiocianato de guanidinio para el ADN no mostraron ninguna ventaja adicional.

### 1.6.2.5 Otros métodos diagnósticos

Otras pruebas utilizadas en vacas son la aglutinación en moco cérvico-vaginal y las pruebas intradérmicas. Además, se han descrito algunos métodos para detectar anticuerpos específicos en el suero.

#### **Muco-aglutinación**

En los años 40 se desarrolló una prueba de aglutinación del mucus que detecta aproximadamente un 60% de las vacas infectadas de forma natural, con niveles de anticuerpos que varían de acuerdo con la fase del estro. Las muestras se recogen con una pipeta de IA de la región cervical de la vagina, preferentemente pocos días después del estro. Cualquier muestra de sangre en el moco cérvico-vaginal invalida la prueba debido a que el suero contiene anticuerpos no específicos que harán que la aglutinación ocurra. Los anticuerpos aparecen en el moco cérvico-vaginal unas 6 semanas después de la infección y persisten durante varios meses. La prueba de muco-aglutinación permite determinar infecciones latentes o recientes, es específica y no presenta reacciones

cruzadas con *C. fetus* o *Brucella*. Sin embargo, la mayor limitante es su baja sensibilidad (Sager et al., 2007).

### **Test intradérmico**

Kerr (1944) desarrolló una prueba intradérmica utilizando un precipitado de *T. fetus* en ácido tricloroacético (Tricin). El sitio de inyección es la piel del cuello, de forma similar a la utilizada para la prueba de la tuberculina. La reacción consiste en una placa superficial acompañada de un aumento de grosor de la piel de más de 2 mm. La prueba fue valiosa en el diagnóstico del rebaño, pero los animales permanecían positivos después de la recuperación de la enfermedad.

### **Serología**

Los niveles de anticuerpos sistémicos frente a *T. fetus* en suero bovino han sido cuantificados por la técnica de ELISA (Skirrow and BonDurant, 1990), siendo ésta utilizada para detectar anticuerpos en suero, lavados prepuciales y plasma seminal, usando tanto antígenos del parásito entero como antígenos de proteínas de membrana (Campero et al., 1990). De acuerdo a la OIE, el uso de estas pruebas es limitado y no se recomienda para el diagnóstico de animales individuales.

### **Inmunohistoquímica en tejidos**

En el feto abortado no existen lesiones específicas macroscópicas o microscópicas y para realizar el diagnóstico es necesaria la identificación del agente. Se ha descrito una técnica inmunohistoquímica para detectar *T. fetus* en la placenta y pulmones fetales de abortos bovinos fijados con formaldehído e incluidos en parafina empleando un anticuerpo monoclonal (Rhyan et al., 1995). La tinción inmunohistoquímica se realiza utilizando un sistema de marcado con estreptavidina/biotina disponible comercialmente y un anticuerpo monoclonal frente a *T. fetus*. Este método se ha utilizado para diagnosticar abortos causados por *T. fetus*.

### 1.7 PREVENCIÓN Y CONTROL

#### 1.7.1 Medidas de manejo

Las medidas pueden variar si lo que se pretende es prevenir, controlar o erradicar la enfermedad. En los rebaños lecheros y en algunos de carne de pequeño tamaño, la práctica de la IA es una medida muy útil para reducir y eliminar la infección. Para aquellos toros destinados a IA se exige la realización de diagnósticos periódicos y cuarentena para los animales nuevos. Asimismo, en la importación de semen es de gran valor conocer el país de origen, el historial reproductivo del toro (usar semen de toros que no se hayan utilizado para monta natural o que sólo hayan montado novillas vírgenes), y las pruebas realizadas por el centro de IA (Eaglesome and García, 1997; [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_sommaire.htm)). La OIE también recomienda usar semen de sementales que hayan permanecido en un establecimiento o centro de IA donde no se haya registrado ningún caso.

En rebaños donde no es posible la introducción de la IA, como en muchos de los sistemas extensivos de ganado de carne, se recomiendan las siguientes medidas (revisado en Ball et al., 1987; McCool et al., 1998; BonDurant, 2005; RaeandCrews, 2006; Campero and Gottstein, 2007):

- Control del movimiento de los animales, tanto machos como hembras. Este control incluye mantener las cercas en buen estado.
- Evitar pastos comunales. Esta práctica es uno de los factores de riesgo más importantes para la transmisión de esta enfermedad. En estos casos, se recomienda realizar un diagnóstico periódico de los sementales y evitar el uso de toros comunales, a menos que se conozca su procedencia.
- Usar sólo toros o novillas vírgenes como reposición. El uso de toros jóvenes de menos de 3 años de edad, también podría disminuir la incidencia de la infección, aunque se recomienda comprobar la procedencia del toro y su estado sanitario.
- Mantener la edad media de los toros del rebaño tan joven como sea posible. Toros viejos pueden ser portadores permanentes de la enfermedad.

- Diagnóstico de los toros adquiridos. Se recomienda el análisis de dos muestras de esmegma prepucial con dos semanas de intervalo si el toro procede de una explotación negativa y de tres si procede de un rebaño con antecedentes.
- No mezclar las vacas o novillas de estado sanitario desconocido durante la temporada de cría.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la tricomonosis es una enfermedad de importancia para el comercio internacional. En los casos de importación de ganado para cría y según la OIE ([http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_sommaire.htm)), se recomienda que las autoridades veterinarias de los países importadores exijan un certificado veterinario internacional que acredite que:

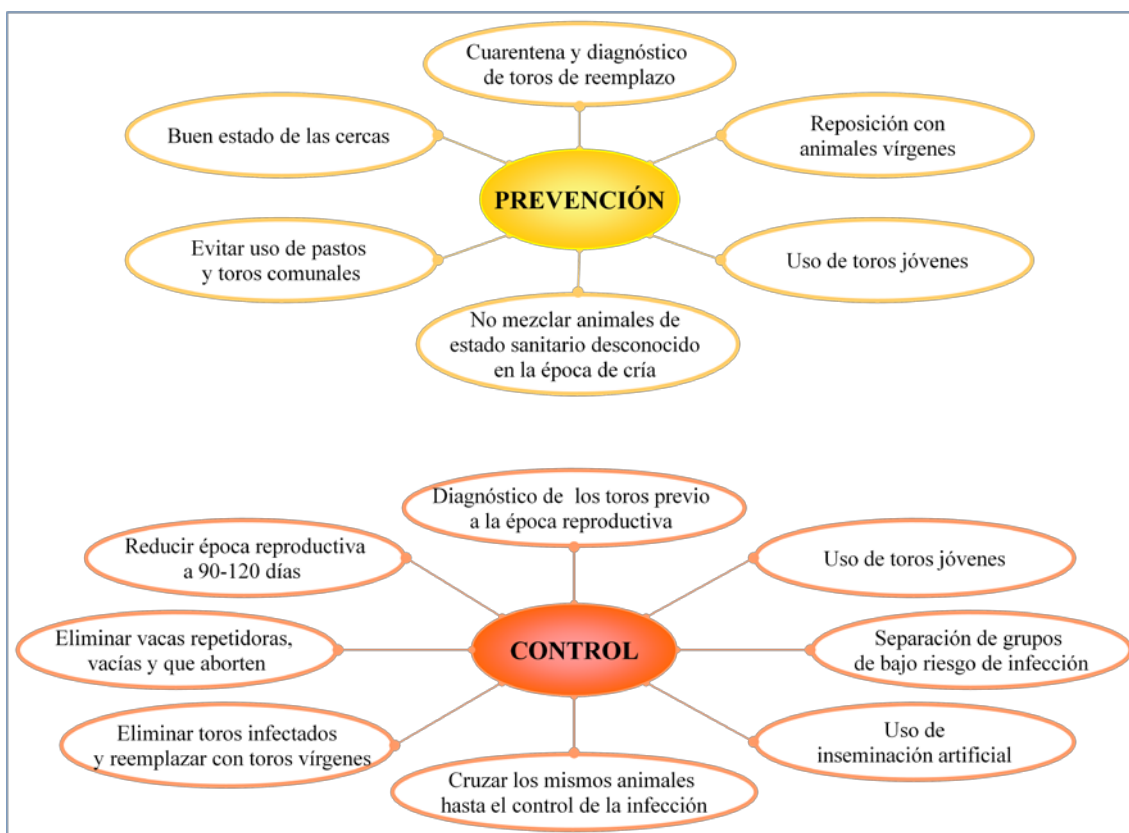
- Los animales pertenecen a un rebaño en el que no se haya registrado ningún caso.
- Las hembras y/o machos sean vírgenes, o sólo hayan sido montados o hayan cubierto animales vírgenes.
- Diagnóstico negativo a partir de esmegma prepucial en el toro, o moco cérvico-vaginal en la hembra, en los animales que hayan montado o ya hayan sido cubiertos.

Cuando esta infección ha sido diagnosticada en un rebaño, además de las herramientas preventivas expuestas anteriormente, se deben adoptar medidas de control para reducir el impacto y eliminar la enfermedad, algunas de las cuales se listan a continuación (Figura8):

- Análisis de los toros antes de la temporada de cría y sacrificio de los infectados. Se recomienda muestrear dos o tres veces al animal en un intervalo de 15 días. Una vez no se detecten nuevos casos, se recomienda realizar análisis anuales para verificar el estado del rebaño.
- Cuando se compren toros, se deben adquirir de rebaños negativos y con certificado diagnóstico.
- Reducir la edad promedio de los toros, ya que disminuye la probabilidad de la presencia de portadores.
- Se recomienda la separación del rebaño de un grupo de bajo riesgo formado por las hembras vírgenes. Éstas deben de ser cubiertas por toros vírgenes o por machos

jóvenes que tampoco estén infectados. El resto de reproductoras pueden pasar al grupo de animales de bajo riesgo, una vez hayan eliminado la infección, considerándose una buena medida el dejar transcurrir 90-100 días después de un parto normal. Además, se deben eliminar aquellas vacas que no quedan preñadas durante mucho tiempo y las que abortan de manera repetida, ya que podrían ser portadoras de la enfermedad.

- Cruzar el mismo grupo de hembras con el mismo macho hasta que la enfermedad esté controlada.
- Reducir la duración de la temporada de cría a no más de 90 a 120 días. Una larga temporada de cría puede enmascarar la pérdida de productividad atribuible estas infecciones.
- Realizar un diagnóstico de gestación a los 45 o 60 días. Eliminar vacas vacías o colocarlas en el grupo de alto riesgo. Cualquier vaca que aborte o con descarga uterina debe ser aislada y se recomienda realizar el diagnóstico de laboratorio. Si no se sacrifica, debe ser también clasificada en el rebaño de alto riesgo.



**Figura 8.** Medidas utilizadas para la prevención y control de la tricomonosis bovina.

Independientemente del tipo de manejo siempre que se practique la monta natural, es aconsejable la realización de análisis periódicos en los machos. Algunos estudios han demostrado la importancia de mantener subunidades de producción dentro de las explotaciones de gran tamaño, donde un toro permanece con un número de vacas determinado, lo que ayudaría a disminuir considerablemente el riesgo de propagación de la infección a la explotación completa si el toro estuviese infectado. En un estudio realizado por Rae et al., (1999), se analizaron diferentes explotaciones entre 1000 y 4000 vacas, las cuales fueron divididas en unidades de producción de acuerdo al número de toros, pero siempre manteniendo una relación de toro/vaca de 1:25, lo que permitió mantener unidades libres de la infección, así como un mejor control cuando se detectaron animales positivos.

### 1.7.2 Vacunación

El principal objetivo de las vacunas frente a *T. foetus* en hembras bovinas es evitar la cervicitis, la endometritis y la placentitis, las cuales ocasionan infertilidad y pérdida de la preñez (BonDurant et al., 1993; BonDurant, 1997). Las vacunas frente a la tricomonosis bovina deben ser capaces de generar una respuesta inmunitaria capaz de eliminar a *T. foetus* del tracto reproductivo antes de que tenga lugar el daño fetal (aproximadamente día 60-70 post infección), sin necesariamente evitar la colonización del epitelio vaginal por parte del protozoo (BonDurant et al., 1993; BonDurant, 1997). En los últimos años se han efectuado importantes avances en el conocimiento de la patogenia del protozoo y en el desarrollo de diferentes tipos de vacunas frente a *T. foetus* (Corbeil et al., 2001). La respuesta generada para eliminar la infección genital por *T. foetus* en las hembras bovinas es sólida en los primeros 6 meses p.i., pero después desaparece. Estos hallazgos han motivado numerosas investigaciones para el desarrollo de vacunas encaminadas a disminuir las pérdidas económicas que produce la enfermedad. La respuesta inmunitaria mucosal en el área genital parece ser el principal mecanismo protector (BonDurant, 1997). En vacas infectadas se desarrolla una respuesta genital caracterizada por la presencia de IgA e IgG1 y una leve respuesta sistémica caracterizada por la presencia de IgG2 e IgG1, (Skirrow and BonDurant 1990; Anderson et al., 1996; Corbeil et al., 1998). Por regla general, las vacas inmunizadas con *T. foetus* han tenido un patrón de respuesta humoral similar al descrito para las infecciones naturales (Herr et al., 1991; BonDurant et al., 1993). Sin embargo, los niveles de IgA genitales parecen depender del tipo de

antígeno vacunal, del adyuvante y de la vía de administración de las formulaciones vacunales.

Se ha descrito el desarrollo de vacunas con células enteras de *T. foetus* inactivadas. Estas vacunas utilizan todas las estructuras del parásito sin distinción de componentes antigénicos específicos. La única vacuna comercial frente a la tricomonosis bovina disponible en los EE.UU. y no en Europa, es una vacuna muerta frente a *T. foetus* preparada a partir de organismos enteros. Esta vacuna puede obtenerse en presentación monovalente (Trich Guard) pero también polivalente unida a *C. fetus* subespecie *venerealis* y *Leptospira* (Trich Guard V5-L). En Argentina se comercializa también una vacuna oleosa inactivada Tricovac (Laboratorio Biológico de Tandil) que contiene un adyuvante oleoso al 50% con una concentración de  $5 \times 10^7$  trofozoítos de *T. foetus* cuya aplicación es subcutánea. En los estudios realizados en novillas aplicando vacunas basadas en el parásito entero administradas por vía subcutánea (Kvasnicka et al., 1989; 1992; Herr et al., 1991; Gault et al., 1995; Cobo et al., 2002; 2004) se ha observado una reducción en el número de hembras infectadas y un menor tiempo de infección genital, además de un mayor porcentaje de hembras preñadas en comparación con los animales testigo. La infección genital por *T. foetus* fue más corta en hembras vacunadas donde la infección persistió entre 3 y 5 semanas (Kvasnicka et al., 1992; Gault et al., 1995; Anderson et al., 1996). En cambio en hembras no vacunadas la infección se prolongó desde 5 a 14 semanas (Herr et al., 1991; Kvasnicka et al., 1992; BonDurant et al., 1993; Hudson et al., 1993; Gault et al., 1995). Este efecto se traduce en un menor número de servicios (1,44 vs 1,73 en no vacunados;  $P < 0,16$ ), mayor porcentaje de animales gestantes al primer servicio (66,7 vs 33,3%;  $P < 0,05$ ) (Hudson et al., 1993) y de vacas paridas (62,5% vs el 31,5%;  $P < 0,001$ ), representando una reducción de pérdidas embrionarias/fetales del 56,4% (Kvaniska et al., 1992).

También se han desarrollado vacunas con subunidades de *T. foetus* (Clark et al., 1983b; BonDurant et al., 1993; Corbeil et al., 1998). A partir de la identificación de antígenos en la superficie celular de *T. foetus*, algunos investigadores australianos utilizaron fracciones de membrana glicoproteicas de *T. foetus* como inmunógeno en toros con aceptables resultados (Clark et al., 1984). Campero et al. (1999), realizaron un ensayo con una vacuna experimental formulada con antígenos de membrana de *T. foetus*. Las vacas fueron inmunizadas con esta vacuna y posteriormente desafiadas por vía vaginal.

La vacuna utilizada logró generar inmunidad y acortar el periodo de infección en los animales vacunados comparados con los testigos. Recientemente, Cobo et al. (2002), utilizaron una vacuna experimental con célula entera y otra a base de membranas de *T. foetus* en vacas desafiadas con un toro naturalmente infectado. Los autores observaron una mayor eficacia de la vacuna de membrana de *T. foetus* en comparación con la vacuna de célula entera, ya que los animales presentaron una menor duración de la infección, mayor tasa de preñez y menor tasa de mortalidad fetal.

En los últimos años, gracias a la identificación y purificación de un antígeno superficial de *T. foetus* denominado Tf 1.17 (Hodgson et al., 1990) se ha desarrollado una vacuna recombinante experimental (BonDurant et al., 1993; Anderson et al., 1996; Corbeil et al., 1998). Tf 1.17 es un antígeno glicoproteico presente en cepas de *T. foetus* de diferentes regiones geográficas del mundo (Hodgson et al., 1990; Ikeda et al., 1993). Además, estudios *in vitro* demuestran que anticuerpos monoclonales frente a Tf 1.17 fueron capaces de inmovilizar, aglutinar, evitar la adhesión celular y destruir por la vía del complemento a *T. foetus* (Hodgson et al., 1990). Se desconoce la eficacia en condiciones naturales de esta vacuna basada en Tf 1.17, pero su aplicación en novillas desafiadas experimentalmente con *T. foetus* evidenció un rápido acortamiento de la infección, y una producción de IgA específicas en las secreciones genitales (Anderson et al., 1996; Corbeil et al., 1998). Otra vacuna fue elaborada con el antígeno superficial Tf 190 (Voyich et al., 2001a) y al emplearla por vía subcutánea en novillas, incrementó los niveles séricos de IgG1 e IgG2. Al ser aplicada por vía nasal produjo un aumento de la IgA en los fluidos genitales a los 30 días post-desafío. Estas hembras inmunizadas en la mucosa nasal se infectaron en menor porcentaje que las hembras no vacunadas. Otro punto importante en la inmunoprolifaxis frente a *T. foetus* es la respuesta inmunitaria celular incluyendo linfocitos T CD4+ y CD8+. La inmunización con antígeno Tf 190 indujo una proliferación específica de linfocitos T CD4+ y un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  (Voyich et al., 2001). El papel de la respuesta Th1 en la tricomonosis bovina es incierto, pudiendo ser beneficiosa para el hospedador en la eliminación del patógeno o ser perjudicial al inducir infiltrados mononucleares e incremento de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que interrumpen la gestación (Voyich et al., 2001).

La inmunidad inducida por vacunas frente a *T. foetus* no ha sido estudiada en profundidad en toros y sólo se menciona en algunos trabajos (Clark et al., 1983, 1984;

Soto and Parma, 1989; Campero et al., 1990; Herr et al., 1991). En toros mayores de 5 años, la vacuna con célula entera careció de efecto preventivo o curativo (Clark et al., 1983b). Vacunas realizadas con membrana glicoprotéica de *T. foetus* demostraron inducir cierto grado de inmunidad con una mejora en la eficacia frente a la infección (Clark et al., 1983b; Clark et al., 1984). Hasta la fecha esta vacuna no ha mostrado eficacia en los toros, a pesar de que no se conoce el motivo de esta falta de protección, lo que podría estar relacionado con una falta de reconocimiento específico del antígeno en la superficie del epitelio escamoso del pene y del prepucio (Clark et al., 1983b; Clark et al., 1984).

### 1.7.3 Tratamiento

Los primeros tratamientos que se utilizaron frente a *T. foetus* consistían en la aplicación local de diversas soluciones antisépticas, entre las que cabe citar los lavados uterinos y vaginales y el rociado del pene y los pliegues prepuciales con soluciones de lugol al 1:3000, cloramina al 0,3%, tripaflavina y acriflavina al 0,3-0,5% y agua oxigenada al 0,5%. Posteriormente, se emplearon diversos fármacos como el metronidazol en ungüento al 5% más ducha uretral con 30 ml de una solución al 1% y las diamidinas aromáticas como el Berenil en lavados prepuciales durante cinco días sucesivos (Campero et al., 1987).

La mayoría de los diferentes tratamientos locales y/o sistémicos que se han propuesto para los toros infectados son engorrosos, difíciles de aplicar y las cepas desarrollan resistencia muy rápidamente (Campero and Palladino, 1983; Campero et al., 1987a, b). Por otro lado, el tratamiento sistémico con fármacos como metronidazol o dimetridazol, produce efectos secundarios adversos y poblaciones resistentes (Campero et al., 1987a,b). El Ipronidazol ha demostrado ser eficaz en toros y vacas (Skirrow et al., 1985), pero el uso de este fármaco, no ha sido aprobado debido a sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas. El uso de estos agentes quimioterápicos es ilegal en muchos países debido a los residuos tóxicos en la carne (BonDurant, 1997). Hasta el momento no se han desarrollado tratamientos alternativos, como consecuencia, los toros infectados deben ser sacrificados.

La falta de un tratamiento efectivo frente a la tricomonosis resalta la necesidad de realizar un control apropiado basado en el manejo y en la información suministrada a los veterinarios como a los productores acerca de la importancia de la enfermedad.

## **2. EXTENSIFICACION DEL GANADO BOVINO EN LA UNIÓN EUROPEA**

### **2.1. Política Agraria Común y cría de bovino de carne**

La Política Agraria Común (PAC) es una de las políticas más importantes y uno de los elementos esenciales del sistema institucional de la Unión Europea (UE). Está basada en un sistema de subvenciones y asignaciones al sector agropecuario de acuerdo al cumplimiento de ciertas normas y requerimientos que han ido cambiando con el paso de los años. La PAC, durante sus más de 50 años de existencia ha tenido como objetivos primordiales el principio de seguridad y soberanía alimentaria de la Unión Europea, el mantenimiento de la capacidad y actividad productiva del medio rural y la conservación del medio ambiente. La inclusión de estos requisitos en las políticas sectoriales agrarias ha supuesto una importante contribución a las políticas en materia de conservación del medio ambiente en la UE y al mantenimiento y uso/explotación sostenible del entorno. En el ámbito del ganado bovino, la PAC ha intentado evitar los excedentes alimentarios, frenando la tendencia a la producción intensiva mediante la introducción de la prima a la vaca nodriza y a la extensificación. Ello ha supuesto una mayor atención a los sistemas ganaderos extensivos, especialmente en zonas de montaña, como sistemas contribuyentes a la conservación de la naturaleza y basados en el empleo de razas autóctonas adaptadas al medio, potenciando de esta manera, la conservación de la naturaleza, el bienestar animal y los valores sociales asociados a estos sistemas (<http://www.magrama.gob.es/es>).

Como consecuencia de esta política, a principios de la década de los noventa se inició un cambio significativo en el sector vacuno en España, con una reducción importante y progresiva en el censo del vacuno de leche y un aumento de las vacas de carne (Figura 9). Esto ha supuesto que, aunque el censo comparativo de vacuno adulto entre 1985 y 2010 haya sufrido pocos cambios, en términos prácticos cuantitativos (2,68 y 2,9 millones de reproductoras, respectivamente), en términos cualitativos la proporción entre animales de aptitud láctea-mixta y cárnica prácticamente se haya invertido (1,89 millones de vacas de

ordeño y 0,79 de carne en 1985 frente a 0,87 millones de vacas de leche y 2,09 de carne en la actualidad). En el sector vacuno de carne español se incluyen explotaciones que presentan diferente orientación productiva, de forma que se puede hablar del subsector de cría y del subsector de cebo. Dentro del sector del vacuno de cría, su censo e importancia ha ido aumentando, favorecido por las primas de la PAC a la vaca nodriza y a los sistemas extensivos ligados al uso del territorio. A diferencia del ganado vacuno de leche, este sector mantiene hoy en día un patrimonio genético autóctono muy importante en España, ya que más del 70% del censo actual, se encuentra compuesto por razas autóctonas en mayor o menor grado de pureza (Ortuño Perez and Fernandez-Cavada Labat, 1995). Según los datos publicados por el MAGRAMA a Julio de 2011 la cabaña española de vacas nodrizas alcanzó 1.870.373 cabezas.

La distribución geográfica del vacuno de cría se encuentra localizada en torno a dos grandes áreas claramente definidas: las dehesas del suroeste y las zonas de montaña de la mitad norte de España (Ortuño-Perez and Fernandez-Cavada Labat, 1995). La dehesa como sistema de producción se caracteriza por el aprovechamiento de grandes extensiones de superficie, en las que al menos el 50% de la superficie está ocupada por pastizal con arbolado. La ganadería de la dehesa se encuentra integrada por un conjunto de razas autóctonas muy rústicas y adaptadas al entorno en el que fueron seleccionadas y por otras razas foráneas introducidas en épocas relativamente recientes, la mayoría de las cuales se encuentran cruzadas y perfectamente aclimatadas.

Los sistemas de cría de vacuno en las zonas de montaña son sistemas extensivos basados también en la explotación de razas autóctonas y con periodos fijos de manejo, marcados por las fechas de inicio y final del pastoreo estival. Las explotaciones suelen ser pequeñas de tipo familiar, con amplia base territorial, pero con grandes disponibilidades pastorales de uso comunal y la práctica de la transtermitancia entre la montaña, en verano, y el valle, en invierno (Manrique et al., 1992). En ambos sistemas (dehesa y montaña), prima el uso de la monta natural y ha supuesto la vuelta al uso de métodos tradicionales de explotación de los recursos como los pastos comunales.



**Figura 9.** Evolución del censo de vacuno en España (1986-2008). Descenso del vacuno lechero e incremento del número de vacas nodrizas (Fuente: Magrama 2008).

## 2.2 Razas Asturianas

Las razas Asturiana de los Valles (AV) y de la Montaña (AM) son dos razas autóctonas adaptadas al medio y representativas del vacuno de cría en nuestro país en sistemas de montaña para zonas más favorecidas (AV) y situaciones más extremas y menos propicias (AM). Ambas razas se manejan en sistemas extensivos basados en el aprovechamiento de recursos pastables, entre ellos pastos comunales, utilizando la monta natural como sistema de cubrición.

### 2.2.1 Asturiana de la Montaña

La raza Asturiana de la Montaña o Casina, es una raza bovina con asentamiento en la zona de montaña del oriente de Asturias, presentando características de rusticidad y adaptación con el consiguiente aprovechamiento de pastos en áreas orográficamente accidentadas de difícil utilización. La raza Asturiana de la Montaña, está integrada desde hace tiempo en el paisaje y ecosistema, cumpliendo una importante función de conservación del medio natural y, por lo tanto, de fijación de la población en zonas de montaña. En el Catálogo Oficial de Razas del Ministerio de Agricultura (R.D. 1682/97) está considerada como raza de protección oficial (<http://www.viaganadera.com/aseamo/>) (Figura 10).



**Figura 10.** Semental de Asturiana de la Montaña.

La raza AM es fiel representante del Tronco Cantábrico, castaño y cóncavo de los bovinos españoles, tiene larga historia como raza de triple aptitud carne-leche-trabajo de equilibrada proporcionalidad, productiva y de modestos rendimientos. La introducción de ganado lechero en el Principado ocasionó un proceso de consecuencias negativas sobre la raza, lo que se tradujo en pérdidas censales, retirada y acantonamiento ocupacional impulsando la orientación hacia la producción de carne (Sánchez, 2002).

En la actualidad, esta raza se explota en régimen extensivo fundamentalmente en las zonas montañosas del oriente asturiano y su censo asciende a 8.344 hembras reproductoras, de las cuales 4.600 son en pureza, estando inscritas en el libro genealógico, y 616 machos. El sistema tradicional de manejo que utilizan los ganaderos es el *sistema valle-puerto* y consiste en el aprovechamiento de los pastos comunales de los puertos o montañas desde finales de primavera hasta el otoño, para a continuación realizar una trashumancia a las zonas de valle o costa en invierno. Las explotaciones ganaderas son pequeñas y, en la mayoría de los casos, están dedicadas a una producción conjunta de carne y queso. Las cubriciones son de primavera a verano, casi todas en monta natural durante la estancia en los puertos. Sólo esporádicamente se utiliza la IA. Los partos se acumulan entre finales del invierno y comienzo de la primavera (<http://www.viaganadera.com/aseamo/>).

### 2.2.2. Asturiana de los Valles

La Asturiana de los Valles es una raza bovina autóctona que se cría fundamentalmente en las estribaciones de la Cordillera Cantábrica y se encuentra perfectamente integrada cumpliendo la importante misión de conservar el medio natural y el paisaje, a la par que constituye una fuente de ingresos indispensables para los habitantes de las zonas de montaña. En la actualidad está acreditada como la mejor raza española de vacuno para la producción de carne y una de las mejores de Europa. Se pueden distinguir variables internas dentro de los ejemplares de la raza, referidas a subtipos constitucionales y geográficos, siendo la variedad musculosa conocida también como culona, la más importante (Figura 11).



**Figura 11.** Semental de Asturiana de los Valles mostrando el subtipo constitucional culón.

La Asturiana de los Valles se explota en régimen extensivo en los territorios de la Cornisa Cantábrica con un censo de 88.413 vacas, de las cuales 39.687 están inscritas en el libro genealógico y 2672 machos. En la reproducción de las vacas se practica la monta natural en el 71% de las explotaciones, aunque en un 44% de las mismas también se realiza IA en un porcentaje de sus vacas y en el 29% de las explotaciones se realiza IA en la totalidad del rebaño. Existen tres modalidades productivas diferentes: el sistema tradicional valle/puerto, el sistema de semiestabulación regular y el sistema de estabulación mínima.

**Sistema tradicional valle/puerto:** Se trata por lo general de pequeñas explotaciones, con instalaciones de tipo tradicional y se basa en el pastoreo estival de los puertos de montaña acompañado de un breve pastoreo primaveral y otoñal de los prados del valle, con prolongadas estabulaciones invernales donde los animales son alimentados exclusivamente a base de heno de hierba. Las cubriciones son casi todas en monta natural. Los partos tienen lugar básicamente a la salida del invierno y principios de primavera.

**Sistema de semiestabulación regular:** se trata de un sistema asentado en zonas de media montaña con alimentación basada exclusivamente en el aprovechamiento de los prados de la explotación y del monte del lugar. Una vez concluida la estabulación invernal, a mediados de marzo comienza el pastoreo de primavera, el cual se acompaña de estabulación nocturna de las vacas para amamantar los terneros y poder recibir una suplementación en pesebre a base de forraje y/o concentrados. En el verano las vacas paridas suelen estabularse por el día para evitar problemas de insectos y salir al pasto al oscurecer, mientras que las vacas secas y novillas permanecen todo el día fuera. En el otoño pastan en los prados de la explotación de igual manera que en primavera, procediendo en el invierno a la estabulación permanente del rebaño. En este sistema está muy extendido el uso de la IA, motivo por el cual los partos tienen una distribución más uniforme a lo largo del año.

**Sistema permanente o de estabulación mínima:** se basa en el pastoreo permanente a lo largo del año de praderas naturales o mejoradas, sin apenas estabulación de los animales. Durante el invierno los animales se suplementan con ensilado de hierba fundamentalmente. Es un sistema asentado en zonas de climatología y orografía benignas. La mejor disponibilidad de pastos de estas zonas permite la existencia de rebaños relativamente grandes, explotados en condiciones extensivas bajo pastoreo rotacional. Aunque los partos siguen siendo mayoritariamente en primavera, en estas zonas existe una tendencia creciente a los partos de otoño. Las cubriciones son casi todas en monta natural.

Ambas razas se encuentran sometidas a un plan de Conservación y Mejora, gestionado por las Asociaciones españolas de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de la Raza Asturiana de la Montaña (ASEAMO) y Asturiana de los Valles (ASEAVA). El objetivo de este plan es promover el aumento del número de vacas y toros de la raza para conservar

## Capítulo I

---

el máximo de variabilidad genética y procurar un mayor nivel de productividad y rentabilidad de las explotaciones. La selección de machos constituye un capítulo importantísimo en los actuales esquemas de selección de estas razas. Los mejores machos se seleccionan según los criterios que resulten de interés para la raza, y se destinarán a ser reproductores como sementales de inseminación artificial o para ser utilizados como toros de monta natural (<http://www.aseava.com/>).



### OBJETIVOS

Como se ha mencionado anteriormente, la tricomonosis bovina es una causa importante de fallo reproductivo temprano en el ganado bovino en régimen extensivo. Su transmisión se produce por vía venérea: los toros se infectan durante la cubrición de vacas infectadas quedando como portadores asintomáticos y constituyendo la principal fuente de infección en los rebaños (BonDurant, 2005; Rae and Crews 2006; Givens, 2006). La transmisión de esta enfermedad se ve influenciada por determinadas prácticas de manejo en los rebaños, como la utilización de la monta natural como sistema de cubrición, el uso de sementales compartidos, los pastos comunales y la ausencia de pruebas diagnósticas en los sementales de nueva adquisición (Rae and Crews, 2006).

En Europa, la tricomonosis ocasionó graves problemas durante la década de los cincuenta del siglo XX pero gracias al uso de la IA, al control sanitario del semen y al sacrificio de los sementales infectados, actualmente, la infección se considera prácticamente erradicada en el ganado bovino de leche. Sin embargo, en los últimos tiempos la Política Agraria Común ha promovido la extensificación de la producción bovina en Europa, con una reducción importante y progresiva en el censo del vacuno de leche y un aumento del número de vacas nodriza. El aumento en su censo se ha visto favorecido por las primas de la Unión Europea a la vaca nodriza y a los sistemas extensivos ligados al uso del territorio. En estos sistemas se ha vuelto al uso de métodos tradicionales de explotación. Todo ello, unido a la libre circulación de animales de estado sanitario incierto, podría estar favoreciendo la re-emergencia de la tricomonosis bovina, ya que se dan todos los factores de riesgo para su mantenimiento.

En relación al diagnóstico, es importante mencionar de nuevo que en zonas de ganadería extensiva y donde se use la monta natural, el diagnóstico de la tricomonosis y campilobacteriosis genital debe hacerse de forma conjunta. Los programas de prevención y control están basados en la capacidad de identificar con precisión a los sementales infectados y su eliminación, por lo que es fundamental que la toma de muestras y la detección del agente en el laboratorio se realicen siguiendo procedimientos normalizados y validados. La toma de muestras puede realizarse mediante las técnicas del lavado prepuccial o raspado, siendo esta última la más recomendable, utilizando bien una pipeta de IA o un raspador (Tedesco et al., 1977; Schonmann et al., 1994; Irons et al., 2002).

Existe una gran variedad de medios de cultivo específicos para *T. foetus* y la elección de uno u otro puede condicionar la sensibilidad del método de cultivo (Parker et al., 2003a; Sager et al., 2007). Por otra parte, la utilización de la técnica de PCR es fundamental, no sólo porque permite la detección de parásitos no viables o que estén en muy pequeñas cantidades, sino que permite diferenciar a *T. foetus* del resto de tricomonádidos (Felleisen et al., 1997; Hum et al., 1997, Campero et al., 2003, Schulze et al., 2006). Aunque estas técnicas (cultivo y PCR) presentan en general una adecuada sensibilidad, en condiciones de campo el diagnóstico se dificulta debido a la temperatura de conservación y la duración del transporte de la muestra (Bryan et al., 1999; Mukhufhi et al., 2003; Parker et al., 2003a,b; Cobo et al., 2007). Además, es frecuente que las muestras de esmegma prepucial estén contaminadas con heces, sangre, orina o semen, que pueden dificultar el diagnóstico.

Desde el punto de vista económico, las repercusiones de la tricomonosis bovina en las explotaciones infectadas son importantes, ocasionando una reducción en el número de terneros nacidos por vaca y año, junto al sacrificio y reposición de los animales infectados (BonDurant et al., 1990; Rae et al., 1989). En este sentido, la tricomonosis podría tener una importante repercusión sobre la productividad de los sistemas de vacuno de cría en nuestro país, siendo necesaria la puesta en marcha de medidas para el control de este patógeno.

En función de lo anteriormente expuesto, en el presente estudio de tesis doctoral se han planteado, por una parte, la validación de los métodos de diagnóstico de la tricomonosis bovina en muestras de campo y, por otra, el estudio de la epidemiología e impacto sobre la productividad de la tricomonosis bovina en dos razas representativas de vacuno de carne criadas en sistemas extensivos de montaña en España: las razas Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña.

Para ello se plantearon tres objetivos específicos:

- 1. Validación de los métodos de diagnóstico de la tricomonosis bovina en muestras de campo.** Con el objetivo de optimizar la metodología diagnóstica para la detección de *T. foetus* en muestras de campo, se usaron diferentes métodos de muestreo (raspado con pipeta de IA y raspador) y medios de transporte-cultivo

específicos para el crecimiento de *T. foetus* (TFTM-Diamond e In Pouch TF test), comparándose a su vez con la técnica de PCR. También se probaron dos métodos de extracción de ADN. El primero consistió en una prueba comercial, indicado para células de origen animal y el segundo es una técnica recomendada para muestras con potenciales inhibidores de la PCR y consistió en la aplicación de la resina Chelex-100. Asimismo, se estudió la forma de conservar la integridad del ADN de la muestra recién recogida hasta su llegada al laboratorio. Para ello, se resuspendió parte del esmegma prepucial en un tampón de lisis para extracción de ADN, con el fin de inhibir la acción de las enzimas proteolíticas y endonucleasas.

**2. Estudio de la prevalencia y factores de riesgo de la infección por *T. foetus* en explotaciones de vacuno de carne en sistemas extensivos de montaña en España de las razas Asturiana de la Montaña y Asturiana de los Valles.** En la raza Asturiana de la Montaña, el estudio se realizó en sementales procedentes de explotaciones seleccionadas al azar con un sistema de transtermitancia valle-puerto que utilizan pastos comunales. En el caso de la raza Asturiana de los Valles, el muestreo se realizó en sementales pertenecientes a explotaciones permanentes en zonas de valle, que no comparten pastos (sistema estante) y explotaciones que comparten pastos con sistema de transtermitancia valle-puerto. De esta forma se comparó la infección por *T. foetus* en las dos razas: Asturiana de los Valles (explotada en condiciones más favorables) y Asturiana de la Montaña (explotada en condiciones desfavorables), y en dos sistemas de manejo: sistema transtermitante (comparten pastos comunales) y sistema estante (no comparten pastos).

**3. Estudio del impacto de la tricomonosis sobre la eficacia reproductiva y eficacia de las medidas de control en los sistemas de vacuno de cría de la raza Asturiana de la Montaña.** Se analizó el impacto de esta enfermedad sobre los índices reproductivos del rebaño, analizando el intervalo entre partos, el número de vacas paridas, comparando explotaciones infectadas con aquellas libres de la infección. La eficacia de las medidas de control se evaluó comparando la prevalencia y los índices obtenidos antes y después del sacrificio de los sementales infectados. Asimismo se realizó una estimación de las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad.



# CAPÍTULO II

---

## **High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain**

Jesús A. Mendoza-Ibarra<sup>a</sup>, Susana Pedraza-Díaz<sup>a</sup>, Francisco J. García-Peña<sup>b</sup>, Silvia Rojo-Montejo<sup>a</sup>, Jose A. Ruiz-Santa-Quiteria<sup>c</sup>, Elena San Miguel-Ibáñez<sup>b</sup>, Vanesa Navarro-Lozano<sup>a</sup>, Luis M. Ortega-Mora<sup>a</sup>, Koldo Osoro<sup>d</sup>, Esther Collantes-Fernandez<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>SALUVET, Animal Health Department,  
Faculty of Veterinary Sciences,  
Complutense University of Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.*

*<sup>b</sup>Laboratorio Central de Veterinaria de Algete,  
Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino,  
Ctra Madrid-Algete km 8, 28110, Algete, Spain.*

*<sup>c</sup>Animal Health Department,  
Faculty of Veterinary Sciences,  
Complutense University of Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.*

*<sup>d</sup>Área de Sistemas de Producción Animal,  
Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Consejería  
del Medio Rural y Pesca, Asturias, 33300 Villaviciosa, Spain.*

Vet J. 2012;193(1):146-151.

doi: 10.1016/j.tvjl.2011.09.02



### Abstract

Bovine trichomonosis (BT) and bovine genital campylobacteriosis (BGC) are sexually transmitted diseases that can be important infectious causes of reproductive failure in extensively managed beef cattle where natural mating is a common practice. However, their prevalence in Europe was thought to be insignificant or very low. The purpose of this study was to investigate the prevalence and risk factors associated with BT and BGC in a representative beef cattle breed, Asturiana de la Montaña (AM), which is usually managed extensively in the mountain areas of Northern Spain and putative risk factors associated with the two diseases are present on most farms holding AM cattle.

Preputial smegma samples were collected from 103 bulls belonging to 65 herds. Pathogen detection was undertaken using culture and PCR. Two scraping methods for sample collection (AI pipette and plastic scraper), as well as different culture media and DNA extraction methods were evaluated on field samples. *Campylobacter fetus veneralis* infection was not detected in any animal in any herd. However, *Tritrichomonas foetus* infection was demonstrated in 32% (33/103) and 41.5% (27/65) of bulls and herds tested, respectively. AM bulls older than 3 years (39.7%) were more likely to be infected than young bulls (16%) (OR = 3.45, CI = 1.07–11.19). An increase in repeat breeder cows was reported in herds from which *T. foetus* was detected (OR = 5.2, CI = 1.5–17.18). These findings highlight the re emergence of this disease in extensively managed beef cattle in Spain. For routine diagnosis, the use of a culture technique and PCR in combination is advisable for testing smegma samples under field conditions.

**Keywords:** Bovine trichomonosis, Genital campylobacteriosis, Prevalence, Risk factors, Diagnosis



### 1. Introducción

Bovine trichomonosis (BT) and bovine genital campylobacteriosis (BGC) are two sexually transmitted diseases that are considered to be important causes of early reproductive failure in beef cattle kept under extensive management conditions (BonDurant, 2005; Rae and Crews, 2006; Mshelia et al., 2009). BT is caused by the flagellated protozoan parasite *Tritrichomonas foetus* (Skirrow and BonDurant, 1988) and BGC by the Gram-negative motile bacterium *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* (Eaglesome and Garcia, 1992). Both agents are localized in the preputial cavity of bulls and in the genital tract of cows and are transmitted mechanically during coitus. In both cases infection is asymptomatic in bulls which act as carriers, whereas in cows infection can cause early embryonic death or abortion (BonDurant, 2005; Rae and Crews, 2006).

BT and BGC are still common in some areas where natural breeding of beef cattle is widely practised, such as in Southern Africa, America, Australia and Asia (BonDurant, 2005; Mshelia et al., 2009). In Europe, the advent of artificial insemination (AI) and effective control programmes have greatly reduced the incidence of the two diseases. However, reform of the Common Agricultural Policy and increased emphasis on environmentally friendly land management

has encouraged the expansion of extensively managed beef herds in areas with grasslands, Mediterranean or mountainous areas (such as in Spain). These systems usually use natural breeding and commonly have cattle grazing communal pastures, which are significant risk factors for both BT and BGC. Thus these changes in farming practice could lead to the re-emergence of these two diseases.

Testing of bulls for BGC and BT is recommended since infection is asymptomatic. Combining culture and PCR techniques is recommended in order to improve the sensitivity and specificity of diagnostic testing (Felleisen et al., 1997; Hum et al., 1997; Campero et al., 2003; Schulze et al., 2006). However, diagnosis is difficult for many reasons related to sample collection, culture media, holding temperatures and time delay until processing (Bryan et al., 1999; Mukhufhi et al., 2003; Parker et al., 2003a,b; Cobo et al., 2007). Moreover, preputial smegma samples are often contaminated with faeces, blood, urine or semen, which could limit the effectiveness of culture or PCR. Nevertheless, optimization and validation of protocols have been mainly carried out using samples spiked with the pathogen or from experimentally infected animals and studies under field conditions are limited.

The purpose of this study was to investigate the prevalence of BT and BGC and the risk

factors in bulls of the Asturiana de la Montaña (AM) breed in Spain. The AM breed is a representative traditional beef cattle breed usually managed extensively in mountain pastoral systems with grazing in communal pastures of medium– high altitude during the spring–summer–autumn period and wintering in lowlands. In such systems <2% of the matings are undertaken using AI (Cañon et al., 1994). Pathogen detection was undertaken using culture and PCR. Two scraping methods for sample collection (AI pipette and plastic scraper), as well as different culture media were evaluated on field conditions. Additionally, we examined the effects of a solution to prevent DNA degradation caused by time delay until processing and different DNA extraction protocols on the accuracy of *T. foetus* PCR.

## 2. Material and methods

### 2.1 Sampling design

The study area was located in Principado de Asturias (North-western Spain) and the targets of this survey were AM bulls of breeding age ( $\geq 18$  months) which had at least 2 weeks sexual rest. Smegma samples were taken in winter before the mating season. The number of bulls and herds to be sampled was based on the AM bull population (616 bulls distributed in 505 herds), an estimated prevalence of 10% and a 5% accuracy with 95% confidence. The

sample size required was 114 bulls (Win-episcopo version 2.0; CLIVE).

Animals were randomly selected from farms registered in the database under the custody of the Asturiana de la Montaña breeder organization (ASEAMO), which contacted the farms to ask for their participation in this survey. All animal handling and sample collection procedures were performed in accordance with the guidelines established by the European Union.

### 2.2 Sampling technique

Smegma samples were collected by two scraping methods. The first method used a plastic AI pipette connected to a sterile disposable 20 mL syringe that was inserted into the prepuce and scraped back and forth 15 times while applying suction. The second method of sample collection was a plastic cylinder brush scraper (Laboratorio Azul Diagnostico) which was inserted into the prepuce and scraped in a similar manner. The method used first on each bull was randomly selected.

With both methods, the collected material was then transferred to a tube containing 5 mL phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0). The PBS suspension was thoroughly mixed to create a homogenous mixture from which aliquots were taken and used as inoculum for

culture media or DNA extraction methods, as described below.

### 2.3 Culture methods

For detection of *T. foetus*, two culture media were evaluated, namely, the commercially available InPouch TF test (Biomed Diagnostics) and thyoglicollate transport medium (TFTM) with modified Diamond medium (MDM). Immediately after sample collection, 500 µL from the suspension of the PBS mixture were inoculated into the upper chamber of the InPouch TF medium or into 10 mL of the TFTM medium. The samples were transported at room temperature and arrived at the laboratory within 6 h of collection. Samples were maintained for 24 h at 37 °C and then processed as described previously (Parker et al., 2003a; Sager et al., 2007). All samples were incubated at 37 °C for 7 days in dark conditions and microscopically examined (200 x screening; 400 x confirmation) on days 2, 4, 6 and 7 after sample collection. Parasites were identified by their characteristic morphological features and motility.

Diagnosis of *C. fetus venerealis* was carried out at the Spanish reference laboratory for campylobacteriosis in animals (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, Madrid). Two culture protocols were tested. Briefly, 1 mL from the suspension of the PBS mixture

was inoculated into Lander's transport medium (Lander, 1990a,b) and 500 µL into double strength FBP medium (Gorman and Adley, 2004) with 0.5% active charcoal (Sigma). At the laboratory, samples were processed according to OIE and Cape Town protocols (Le Roux and Lastovica, 1998; Wagenaar and Van Bergen, 2004).

### 2.4 DNA extraction for *T. foetus* detection

A comparative evaluation of DNA extraction protocols for the diagnosis of *T. foetus* was carried out on field samples. In the first experiment, immediately after sample collection by IA pipette or plastic brush, 500 µL from the suspension of the PBS mixture were inoculated into 600 µL of the lysis buffer included in the Real Pure DNA extraction kit (Durviz) to prevent DNA degradation. In order to investigate the effect caused by time delay until processing, PBS was stored at 4 °C and after 48 h, a further aliquot of 500 µL from the suspension of the PBS was inoculated into lysis buffer and both samples were processed by the Realpure Kit, following manufacturer's instructions.

In the second experiment, samples collected by AI pipette or plastic brush were subjected to DNA extraction using the Chelex 100 chelating resin (Bio-Rad), which is reported to remove potential inhibitory compounds (Walsh et al., 1991). Here, after 48 h of storage

at 4 °C, another aliquot of 500 µL of the suspension from PBS mixture was added to a solution containing 5% Chelex 100 (w/v) in ultrapure sterile water, 2 µL of 20 mg/mL proteinase K (Sigma) and 12 µL of 1 M DTT (Sigma), and mixed gently. The mixture was incubated at 56 °C for 45 min, boiled for 8 min, vigorously vortexed for 10 s and subsequently centrifuged for 5 min at 12,000 g (Walsh et al., 1991).

In the third experiment, correlation between culture and PCR methods was determined. In this case, 500 µL of each culture medium (InPouch TF or TFTM– MDM) were taken on day 2 after sample collection. Samples were centrifuged at 850 g for 10 min, supernatant removed and DNA extracted from the sediments using the Realpure kit as described above.

### 2.5 DNA extraction for *C. fetus venerealis* detection

Nucleic acid extraction from the suspension of the PBS mixture and Lander's medium was carried out at the reference laboratory. The BioSprint 96 robotic system (Qiagen) with the BioSprint DNA Blood kit (Qiagen) were used according to the manufacturer's instructions.

### 2.6 PCR

For *T. foetus* amplification, PCR was undertaken as described by Felleisen et al.

(1998). Amplified products were sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analysed using the BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (Ibis Therapeutics). Amplification of *C. fetus venerealis* DNA was carried out by a conventional multiplex PCR (Hum et al., 1997) and a real-time PCR (McMillen et al., 2006) at the reference laboratory.

### 2.7 Herd and bull data collection

A questionnaire was filled out by breeders. Parameters evaluated included: farm location, type of management, herd size, number of bulls per herd, bull-to cow ratio, bull age, the use of AI, natural mating, purchase of sexually active animals (bulls or cows), quality of the fences, rotation of bulls between herds, sharing livestock, sharing pastures, increase of repeat breeder cows, presence and increase of abortion cases, performing reproductive controls, nutritional management during mating season and vaccination against reproductive diseases.

### 2.8 Statistical analyses

Data were analysed using the Chi-square or Fisher's exact test. Risk factors were analysed by estimating the odds ratio (OR). Cohen's kappa ( $\kappa$ ) index was calculated to determine the agreement between the different diagnostic

methods. Statistical analysis was undertaken using SPSS version 14.0.

### 3. Results

#### 3.1 Prevalence and risk factor analysis

A total of 103 bulls and 65 herds from AM breed were sampled, corresponding to 16.7% (103/616) and 12.8% (65/505) of the bull and herd population, respectively. *T. foetus* infection was detected in 29 bulls by both culture and PCR, and in four bulls by PCR only. *T. foetus* identity was confirmed by sequencing of all amplified products. Individual bull prevalence of trichomonosis was 32% (33/103, 95% CI: 23.8–42.6%) and the herd prevalence 41.5% (27/65, 95% CI: 30.3–53.7%). *C. fetus venerealis* was not detected by either culture or PCR.

A total of 62/65 questionnaires were returned and analysed. No risk factors were associated with *T. foetus* infection with the exception of bull age (Table 1). AM bulls older than 3 years were more likely to be infected than young bulls (OR = 3.45, 95% CI = 1.068–11.19). Repeat breeder cows were more commonly reported in *T. foetus* infected herds (OR = 5.2, 95% CI = 1.5–17.18).

#### 3.2 Diagnostic methodology

Results from the different sampling methods, culture media and DNA extraction methods are summarized in Table 2. Samples collected by plastic brush or AI pipette were not available in one and two bulls, respectively, because the animals got loose during sampling.

A total of 203 preputial smegma specimens were collected. Analysis of the culture results obtained from samples collected by pipette or by scraper revealed no differences ( $P > 0.05$ ), showing a very good agreement ( $\kappa \geq 0.88$ ). A higher percentage of bulls yielded protozoa suggestive of *T. foetus* using the InPouch TF test (28.2%) than MDM medium (25.2%) but the agreement between the TFM–MDM and the InPouch TF test was very good ( $\kappa \geq 0.89$ ). Most positive cultures were detected on day 2 post sample collection in both media (InPouch 78.5% and MDM 73%). Bacterial and fungal contamination was more often observed in samples incubated in the MDM medium (57.4%) than in the In- Pouch TF test (12.7%) ( $P < 0.05$ ). From day 4 after sample collection, these MDM medium samples showed excessive bacterial or fungal growth contaminations.

**Table 1.** Association of *T. foetus* status with epidemiological data and putative herd risk in 62 beef herds in Northern Spain. Risk factors associated with *T. foetus* infection are in bold.

Variable	Category	<i>T. foetus</i> status			<i>P</i> -value	OR 95% CI		
		N	Infected(%)	Non-infected (%)		OR	Lower	Upper
Type of management	Extensive	10	7 (70)	3 (30)	0.150	0.35	0.082	1.51
	Semiextensive	51	23 (45)	28 (55)				
Rotation of bulls between herds	Yes	57	29 (51)	28 (49)	0.31	3.1	0.305	31.680
	No	4	1 (25)	3 (75)				
Purchase of sexually active bulls	Yes	34	16 (47)	18 (53)	0.818	0.89	0.327	2.419
	No	28	14 (50)	14 (50)				
Purchase of sexually active cows	Yes	5	3 (60)	2 (40)	0.588	1.67	0.259	10.741
	No	57	27 (47)	30 (53)				
Shared livestock	Yes	60	29 (47)	31 (53)	0.738	0.93	0.56	15.658
	No	2	1 (50)	1 (50)				
Use of AI	Yes	10	5 (50)	5 (50)	0.91	1.08	0.279	4.18
	No	52	25 (48)	27 (52)				
Presence of abortion cases	Yes	6	4 (66)	2 (34)	0.346	2.30	0.390	13.64
	No	56	26 (46)	30 (54)				
Increase of abortion	Yes	1	1 (100)	0 (0)	0.305	0.48	0.372	0.628
	No	60	29 (48)	31 (52)				
<b>Increase of repeat breeder cows</b>	<b>Yes</b>	<b>20</b>	<b>15 (75)</b>	<b>5 (25)</b>	<b>0.007</b>	<b>5.20</b>	<b>1.5</b>	<b>17.18</b>
	<b>No</b>	<b>41</b>	<b>15 (36)</b>	<b>26 (64)</b>				
Vaccines against reproductive disease	Yes	19	12 (63)	7 (27)	0.170	2.38	0.783	7.237
	No	43	18 (42)	25 (58)				
Perform reproductive controls	Yes	1	0 (0)	1 (100)	0.298	0.47	0.365	0.619
	No	61	29 (48)	32 (52)				
Nutritional supplements	Yes	31	14 (45)	17 (55)	0.705	0.82	0.301	2.253
	No	30	15 (50)	15 (50)				
Quality of the fences	Good	23	11 (48)	12 (52)	1.0	0.96	0.344	2.707
	Regular/bad	39	19 (49)	20 (51)				
<b>Bull age</b>	<b>&lt; 3 years</b>	<b>25</b>	<b>4 (16)</b>	<b>21 (84)</b>	<b>0.04</b>	<b>3.45</b>	<b>1.068</b>	<b>11.19</b>
	<b>&gt; 3 years</b>	<b>68</b>	<b>27 (40)</b>	<b>41 (60)</b>				

**Table 2.** Effect of diagnostic methodology on isolation rate of *T. foetus*

Method	Sampling technique <sup>a</sup>		Total bulls <sup>b</sup> (%)
	AI pipete <sup>b</sup> (%)	Plastic brush <sup>b</sup> (%)	
<i>In vitro culture</i>			
In Pouch TF	26/101 (25.7)	28/102 (27.4)	29/103 (28.2)
TFM/DMD	22/101 (21.8)	24/102 (23.5)	26/103 (25.2)
<i>PCR</i>			
Smegma samples/lysis buffer <sup>c</sup>	28/101 (27.7)	28/102 (27.4)	32/103 (31.1)
Smegma samples /48 h <sup>d</sup>	27/101 (26.7)	27/102 (26.5)	30/103 (29.1)
Smegma samples /Chelex 100 <sup>e</sup>	13/97 (13.4)	11/100 (11.0)	16/101 (15.8)
In Pouch TF <sup>f</sup>	28/100 (28.0)	27/101 (26.7)	30/102 (29.4)
DMD <sup>f</sup>	23/101 (22.8)	22/101 (21.8)	26/103 (26.2)

<sup>a</sup> Samples collected by AI pipette or plastic brush were not available in two and one bull, respectively, because the animals got loose during sampling.

<sup>b</sup> No. of positive bulls /no. of bulls.

<sup>c</sup> After sample collection, smegma samples diluted in PBS were inoculated into the lysis buffer and DNA was extracted by the commercial Real Pure DNA extraction kit.

<sup>d</sup> Smegma samples diluted in PBS were stored at 4 °C and after 48 h DNA was extracted by Chelex 100.

<sup>f</sup> DNA was extracted from InPouch TF or DMD medium samples on day 2 post sample collection by the commercial Real Pure DNA extraction kit.

Analysis of the PCR results obtained from samples collected by pipette or by scraper using the different DNA extraction protocols showed very good agreement ( $\kappa \geq 0.87$ ). The highest percentage of positive bulls (31.1%) was detected by PCR on smegma samples diluted in the lysis buffer. No significant effect of adding a preservative solution to prevent DNA degradation was observed ( $P > 0.05$ ). However, significantly less *T. foetus* was detected from DNA samples extracted with the Chelex 100 ( $P < 0.01$ ) and only a moderate degree of agreement was obtained ( $\kappa \geq 0.48$ ).

Analysis of the results obtained by testing an aliquot of each culture medium by PCR, revealed no differences from results observed by microscopic examination on day 2 after sample collection ( $P > 0.05$ ), and these results showed very good agreement ( $\kappa \geq 0.8$ ). All culture positive samples identified using the InPouch TF test were confirmed by PCR. However, three culture negative samples using the InPouch TF test were found to be positive by PCR. In contrast, when the TFM–MDM method was used seven culture positive samples were negative by PCR, and seven culture negative samples were positive by PCR.

### 4. Discussion

The results obtained in this study showed a high prevalence of *T. foetus* infection in the sampled population. Comparable prevalence rates have been recorded in areas with extensive cattle management and natural breeding, such as 30.4% in Florida (USA), 18.4% in Costa Rica and 28% in Argentina (Perez et al., 1992, 2006; Rae et al., 2004). Effective control of BT has been achieved in many areas of Europe but the disease is reported sporadically. The World Organisation for Animal Health reports the presence of BT in France, Germany, Italy and Spain from 2005 to 2010.

In Spain in 1998, the percentage of *T. foetus* infected bulls living in similar conditions, both by geographical location (the mountainous region of Leon province, North-western Spain) and by management (beef cattle managed extensively in mountain communal pastures), was 2.9% (2/70) (Martin-Gomez et al., 1998), which is much lower than the results reported here. Our findings could indicate a re-emergence of BT in extensive beef production systems in the mountain areas of Southern Europe and, in view of the results, more studies should be

undertaken to investigate the incidence of *T. foetus* in other areas where natural breeding of beef cattle is common.

Our data suggest that *T. foetus* infection could be an important factor limiting animal productivity. Rae (1989) estimated that herds with 20–40% of *T. foetus* infected bulls may experience a reduction of 14–40% in annual calf crop. Our survey identified a higher percentage of repeat cow breeders in infected herds, consistent with the findings of Stewart et al. (1998). More studies are required to better estimate the current impact of BT in affected AM herds.

Bull age was the only risk factor associated with *T. foetus* infection. The effect of age was also observed in previous studies (BonDurant et al., 1990; Rae et al., 2004). No other risk factors were identified in our work, perhaps because our study population was too homogeneous. Villarroel et al. (2004) reported that in the USA, shared grazing was the most significant risk factor for a decrease in calving incidence attributable to *T. foetus*, followed in importance by lack of bull testing before breeding and a higher proportion of older bulls. These factors are commonly found in traditionally management in

AM herds. Development and implementation of appropriate measures to control BT need to be put in place on such herds.

To control BT effectively, highly sensitive and specific tests are required. Schonmann et al. (1994) and Irons et al. (2002) reported that collection of preputial smegma with a specialized scraping tool reduced contaminant levels and improved isolation rates compared to samples collected by just aspiration and washing. In the present study collecting by scraping with a plastic brush or scraping- aspiration with an AI pipette connected to a syringe had no impact on results as previously reported (Parker et al., 1999). However, collection by AI pipette resulted in some samples containing blood or inadequate mucoid material, which meant that further samples needed to be collected.

Although agreement between the TFM-MDM and the InPouch TF test was very good, the use of the InPouch TF test resulted in increased isolation of *T. foetus* and reduced bacterial or fungal contamination, consistent with previous reports (Felleisen et al., 1997; Parker et al., 2003a) and confirming the usefulness of the test for BT under field conditions.

In order to improve diagnosis of BT by PCR, different protocols for DNA extraction were tested on field samples. We tested a commercial lysis buffer for sample collection which, according to the manufacturer, preserves DNA successfully for several months at room temperature. The time point chosen for examining the effect of the solution was 48 h, but no significant advantageous effect was found. A decrease over time in sensitivity of PCR testing has been described for stored samples (from 90% at 6 h to 31% at 5 days) (Mukhufhi et al., 2003). Possibly, analysis of longer storage time points would have been useful. Nevertheless, the highest percentage of positive samples was detected in smegma samples diluted in the lysis buffer, showing the advantage of this buffer.

Preputial scrapings could contain inhibitory compounds which can reduce PCR sensitivity (Ho et al., 1994). The Chelex 100 chelating resin is reported to remove potential inhibitory compounds from blood, urine or semen samples (Walsh et al., 1991), so is a good candidate to use in preputial smegma samples. Chen and Li (2001) successfully extracted DNA from a smegma sample put into the resin with 0.05% agar and spiked with *T. foetus* in a

previous study. However, in our investigation chelated samples had significantly lower isolation rates than unchelated ones. The high temperatures and alkaline environment of the Chelex 100 extraction procedure could have degraded the DNA (Hoff-Olsen et al., 1999). Our results show that the Chelex 100 was not appropriate for *T. foetus* DNA extraction from field samples.

PCR could detect low numbers of dead parasites when direct microscopy fails. Here, four infected animals were detected when PCR was applied directly on smegma samples diluted in the lysis buffer or PBS. Discrepancies between culture and PCR could be due to poor growth of *T. foetus* in the culture media, probably due to low parasite viability or the presence of contaminants. In addition, it is likely that *T. foetus* will not always be pipetted into each reaction tube, thus yielding a negative result. Our results show that PCR applied directly to smegma samples diluted in PBS or a lysis buffer would increase the probability of detecting the parasite. However, in order to avoid false positives or false negatives, the use of both techniques (culture and PCR) in combination is recommended for routine diagnosis.

In the present survey, *C. fetus venerealis* infection was not detected. The isolation of *Campylobacter* species is difficult because of their limited viability outside the host, due to the temperature, nutritional and atmospheric requirements of the organisms (Smibert, 1978). Our results are considered reliable, since recommended diagnostic methodology and molecular diagnostic techniques were used, and we have detected *C. fetus venerealis* in herds with reproductive problems from other Spanish areas, using the same methodology described here (Ortega-Mora and García-Peña, 2008). *C. fetus venerealis* is commonly found in geographical areas with relatively high ambient temperatures (Harwood et al., 2009), in contrast to the conditions of our sample area here in the mountainous regions of Northern Spain.

### 5. Conclusions

In view of the expansion of extensive beef husbandry in Europe and the concomitant increase in the use of natural mating and shared grazing, the results reported here could indicate a re-emergence of BT and highlight the importance of implementing testing programmes to evaluate the real

importance of this disease in European countries.

### **6. Acknowledgements**

This work was funded by INIA (RTA2009-00136-C02-02 project). J.A. Mendoza-Ibarra from Universidad de Pamplona (Colombia) was supported by the Programme Alban, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship No. E07D400491CO. We

also express our gratitude to ASEAMO-ASEAVA (Luis Echevarria, Angel Rodriguez, Gerardo Noval, Paco Cueto, Juanín Martínez and Carlos Martínez), SERIDA (Jose M. Mendez, Luis Antón, Ramonín Piquero and Arsenio Alvarez), clinical veterinarians and farmers for the invaluable contribution to this study. We would like to thank Tania Serrano-García and Sonia García-Baz (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete) for their excellent technical assistance.



# CAPÍTULO III

---

## **Differences in the prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef cattle farmed under extensive conditions in northern Spain.**

Jesús Alberto Mendoza-Ibarra<sup>a</sup>, Luis Miguel Ortega-Mora<sup>a</sup>, Susana Pedraza-Díaz<sup>a</sup>,  
Silvia-Rojo Montejo<sup>a</sup>, Jose Antonio Ruiz-Santa-Quiteria<sup>b</sup>, Francisco Javier García-Peña<sup>c</sup>,  
Vanesa Navarro<sup>a</sup>, Carmen Cuevas<sup>a</sup>, Koldo Osoro<sup>d</sup>, Esther Collantes-Fernández<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*SALUVET, Animal Health Department,  
Faculty of Veterinary Sciences,  
Complutense University of Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.*

<sup>b</sup>*Laboratorio Central de Veterinaria de Algete,  
Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino,  
Ctra Madrid-Algete km 8, 28110, Algete, Spain.*

<sup>c</sup>*Animal Health Department,  
Faculty of Veterinary Sciences,  
Complutense University of Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.*

<sup>d</sup>*Área de Sistemas de Producción Animal,  
Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Consejería  
del Medio Rural y Pesca, Asturias, 33300 Villaviciosa, Spain.*



#### Abstract

Bovine trichomonosis (BT) is a sexually transmitted disease of cattle caused by infection with *Tritrichomonas foetus*. In a recent study, *T. foetus* infection was detected in 41.5% of herds of an endangered beef breed, the Asturiana de la Montaña (AM), which is farmed under extensive, mountain pastoral systems in northern Spain. The objective of this study was to determine the prevalence of this pathogen in the more production-centred Asturiana de los Valles (AV) beef breed farmed in the same region, and to identify potential associated management risk factors. Infection was detected in a significantly smaller number (5.2%) of AV herds, despite the fact that both populations share the same ecological niche. Communal grazing was not identified as significant risk factor and study results suggest the prevalence of BT is likely to vary considerably depending on how the cattle are managed.

*Keywords:* Bovine, *Tritrichomonas foetus*, Extensive farming systems, Spain, Prevalence



Bovine trichomonosis (BT) is a sexually transmitted disease of cattle caused by infection with *Tritrichomonas foetus*, and resulting in reproductive failure and economic loss (Rae et al., 2004; BonDurant, 2005). The disease commonly occurs where beef cattle are managed under extensive conditions and where natural, rather than artificial, insemination is practiced (BonDurant, 2005). In Spain, the population of beef cattle managed in extensive outdoor grazing systems has increased significantly in the last number of years in response to the reform of the Common Agricultural Policy (CAP). In such systems, more ‘traditional’ farming methods such as natural breeding, the sharing of bulls, and communal grazing are commonly practiced, all recognised risk factors for BT. Furthermore, there is free movement of animals of unknown health, particularly venereal health, status. Taken together, there is concern that BT could re-emerge as a significant threat to animal health and welfare.

In a recent study, *T. foetus* infection was detected in 41.5% of herds of an endangered beef breed, the Asturiana de la Montaña (AM), which is farmed under extensive, traditional mountain pastoral systems in northern Spain

(Mendoza-Ibarra et al., 2012). Greater numbers of the more production-centred Asturiana de los Valles (AV) beef breed (Sierra et al., 2010), is also farmed in northern Spain in systems similar to that of the AM breed, as well as in lower-lying coastal pastures, where communal grazing is not practiced. The objective of this study was to estimate the prevalence of BT in the AV breed, and to determine the management risk factors for the disease.

The study area was in Principado de Asturias in North-western Spain, and the subjects were AV bulls of breeding age ( $\geq 18$  months) which had had at least 2 weeks of sexual rest. The number of bulls/herds to be sampled was based on the AV bull population (8504 bulls distributed in 3232 herds), an estimated prevalence of 30% with 5% accuracy and 95% confidence, as determined by Win-episcopo (version 2.0).

Bulls were randomly selected from farms registered with the AV breed association (ASEAVA). A total of 327 bulls and 229 herds of the AV breed were sampled. Smegma samples were taken before the mating season by scraping the preputial cavity with a plastic brush and were examined for *T.*

*foetus* as previously described (Mendoza-Ibarra et al., 2012), including culture using ‘In Pouch TF’ media (Sager et al., 2007), and by PCR (Felleisen et al., 1998).

All animal handling and sample collection procedures were approved by the Animal Research Committee of the Complutense University, Madrid (Spain) following the regulations of the Animal Research Committee and EU legislation (Council Directive 86/609/EEC).

A bull was considered infected when both test results were positive. A culture-positive, PCR-negative result was considered to be due to non-*T. foetus* trichomonads. If *T. foetus* organisms were detected only by PCR, the animal was re-tested. A standardised questionnaire (Mendoza-Ibarra et al., 2012), was completed by herd owners in an attempt to identify risk factors related to BT. The data were analysed using the Chi-square or Fisher exact tests, and risk factors were determined by estimating the odds-ratio (OR). A multivariate regression analysis was only applied if  $\geq 2$  factors had a *P*-value  $< 0.1$  in the bivariate analysis. Analyses were performed using the statistics package SPSS version 15.0.

Infection was detected in 4.0% (13/327, 2.3–6.7%, 95% CI) of bulls and in 5.2% (12/229, 2.9–9.0%, 95% CI) of herds using both culture and PCR. A total of 207 questionnaires were returned providing data for 247 of the bulls. Although no risk factors were identified (Table 1), bulls  $> 3$  years old were more likely to be infected than younger animals ( $P < 0.001$ ; OR, 27.29; CI, 1.58–471.4), a finding similar to that previously reported (Rae et al., 2004; BonDurant, 2005; Mendoza-Ibarra et al., 2012). Epidemiological investigation of potential risk factors found that the prevalence of infection in AV herds on shared grazing was 6.8% (9/132; 3.4–12.6%; 95% CI), and was 4.2% in bulls (9/213; 2.1–8.0%; 95% CI). This contrasted with herd and animal (bull) prevalences of 4.1% (3/73; 0.9–11.9%; 95% CI) and 3.5% (4/115; 1.1–8.9%; 95% CI), respectively, where herds were pastured separately. Although communal grazing has been identified as significant risk factor for BT (Gay et al., 1996), this factor was not identified as significant in the current study. Furthermore, when the questionnaire data were stratified by management type, no other risk factors were identified (data not shown).

### Capítulo III

**Table 1.** Distribution of the *Tritrichomonas foetus* infection status according to epidemiological and risk analysis in Asturiana de los Valles (AV) beef herds in northern Spain.

Variable	Category	<i>T. foetus</i> status			<i>P</i> value	OR (95% CI)		
		N <sup>a</sup>	Infected (%)	Non-infected (%)		OR	Lower	Upper
Communal pastures	Yes	132	9 (6.8)	123 (93.2)	0.54	1.70	0.44	6.51
	No	73	3 (4.1)	70 (95.9)				
Rotation of bulls between herds	Yes	133	8 (6.0)	125(94.0)	0.75	1.45	0.37	5.65
	No	71	3 (4.2)	68 (95.8)				
Purchase of sexually active bulls	Yes	105	6 (5.7)	100 (95.3)	1	1.11	0.33	3.75
	No	101	5 (5.0)	96 (95)				
Purchase of sexually active cows	Yes	52	5 (9.6)	47 (90.4)	0.15	2.61	0.74	8.71
	No	153	6 (3.9)	147 (96.1)				
Shared livestock	Yes	118	8 (6.8)	110 (93.2)	0.36	1.98	0.51	7.72
	No	85	3 (3.5)	82 (96.5)				
Use of AI	Yes	91	4 (4.4)	87 (95.6)	0.76	0.70	0.20	2.48
	No	114	7 (6.1)	107 (93.9)				
Presence of abortion cases	Yes	36	3 (8.3)	33 (91.7)	0.41	1.83	0.46	7.26
	No	169	8 (4.7)	161 (95.3)				
Increase of abortion <sup>b</sup>	Yes	9	2 (22.2)	7 (77.8)	0.07	5.91	1.07	32.59
	No	195	9 (4.6)	186 (95.4)				
Increase of 'repeat breeder' cows	Yes	26	3(11.5)	23 (88.5)	0.15	2.73	0.67	11.07
	No	176	8 (4.5)	168 (95.5)				
Vaccines against reproductive disease practice	Yes	96	8 (8.3)	88 (91.7)	0.12	3.09	0.79	12.01
	No	105	3 (2.9)	102 (97.1)				
Reproductive health programme in operation in herd	Yes	75	4 (5.3)	71 (94.7)	1	0.97	0.27	3.44
	No	128	7 (5.5)	121 (94.5)				
Nutritional supplements given to cattle	Yes	137	6 (4.4)	131 (95.6)	0.50	0.64	0.17	2.36
	No	60	4 (6.7)	56 (93.3)				
Quality of fencing between neighbouring herds	Good	73	3 (4.1)	70 (95.9)	0.75	0.66	0.17	2.59
	Regular/bad	132	8 (6.1)	124 (93.9)				

<sup>a</sup> A total of 207 questionnaires were returned providing data for 247 of the bulls.

<sup>b</sup> Multivariate analysis was not performed as only one variable (increased numbers of abortions) with  $P < 0.1$ .

The prevalence of BT identified in the present study is similar to that reported previously: 6% in Florida (Rae et al., 2004) and 3.7% in Texas (Szonyi et al., 2012), respectively. Nevertheless, the prevalence of infection in the AV breed was significantly lower ( $P < 0.0001$ ) than that found in AM cattle (32% and 41.5% in bulls and herds, respectively) (Mendoza-Ibarra et al., 2012). While it has been suggested that some breeds of *Bos taurus* may be more resistant to BT than others (Rae et al., 2004), no substantive evidence to support this has been reported (BonDurant et al., 1990). Inherited differences in susceptibility to infection between the AM and AV breeds are unlikely given the common genetic origin of these breeds. The AM breed is typically farmed in traditional mountain pastoral systems whereas AV cattle are used more in specialised, commercial beef production (Sierra et al., 2010). The lower prevalence of BT found in the AV breed could be associated with these differences in farming management (Table 2).

Over the last three decades, selection programs and AI have been used in the AV breed to increase the number of animals with muscular hypertrophy (Gutierrez et al., 1997). Although AI is

recognised method of controlling BT (BonDurant, 2005), significant differences in the prevalence of infection were not identified in the current study between herds using AI and not using AI, probably due to the fact that the disease prevalence was very low in the AV cattle we surveyed. However, we found that AI was used more commonly in AV compared to AM herds ( $P < 0.0001$ ) (Table 2). Furthermore, a previous study indicates that a reduction in the incidence of *T. foetus* infection can also be achieved by exclusively using young bulls for mating (Christensen et al., 1977). In the present study, the percentage of bulls <3 years old was higher in AV than in AM herds ( $P < 0.0001$ ) (Table 2). Consequently, the use of AI and the greater proportion of young bulls could have contributed to the lower infection prevalence in the AV compared to the AM cattle. Other differences in management may have had an impact on infection prevalence. The requirement for breeders of AM cattle to use AM sires in order to maintain the breed's phenotypic characteristics has promoted the use of communal, potentially infected bulls, a practice not as widespread in AV herds ( $P < 0.0001$ ) (Table 2). Typically, AV herds are larger than AM herds ( $P < 0.05$

[Student's t test], data not shown) and AV cattle on public grazing share pasture with a smaller number of herds than AM cattle (K. Osoro, personal communication). Gay et al. (1996) reported that the risk that a herd being infected with *T. foetus* increased as the inter-mixing of herds increased. The

method of data collection in our study did not allow us to carry out similar analysis. A further potentially significant factor is that bulls of the AV breed are usually restricted to individual farms during the grazing period in contrast to AM bulls which have a wider range of movement between herds.

**Table 2.** Details of differences in the management of the Asturiana de los Valles (AV) and Asturiana de la Montaña (AM) cattle breeds in northern Spain.

Management practice	AV breed	AM breed	P value	OR (95% CI)		
				OR	Lower	Upper
Use of AI	44.4% (91/114)	16.1% (10/62)	P<0.0001	4.1	1.99	8.62
Use of bulls < 3 years old	54.2%(134/247)	26.9% (25/93)	P<0.0001	3.14	1.86	5.29
Use of communal bulls	51% (121/237)	78.3% (76/97)	P<0.0001	3.4	2.01	5.99

The findings of this study indicate that the prevalence of BT in AV cattle in northern Spain is significantly lower than that previously reported for the AM breed, despite the fact that both breeds essentially share the same ecological niche. The results confirm the presence of BT in extensively farmed beef cattle in this region but suggest the prevalence is likely to vary considerably depending on how the animals are managed.

### Acknowledgements

This work was funded by the INIA (RTA2009-00136-C02-02) project. J.A.

Mendoza-Ibarra from Pamplona University (Colombia) was supported by the Programme Alban, the European Union Programme of Higher Level Scholarships for Latin America (Scholarship No. E07D400491CO). We also express our gratitude to the ASEAMO-ASEAVA (L. Echevarria, A. Rodriguez, G. Noval, P. Cueto, J. Martinez and C. Martínez), and SERIDA (J.M. Mendez, L. Antón, R. Piquero and A. Álvarez) organisations, as well as to all of the veterinarians and farmers who contributed to this study.



# CAPÍTULO IV

---

## **Efficacy of a control program against bovine trichomonosis based on testing and culling infected bulls in beef cattle managed under mountain pastoral systems of Northern Spain.**

Esther Collantes-Fernández<sup>a</sup>, Jesús Alberto Mendoza-Ibarra<sup>a</sup>, Susana Pedraza-Díaz<sup>a</sup>,  
Silvia Rojo-Montejo<sup>a</sup>, Vanesa Navarro-Lozano<sup>a</sup>, Luis Miguel Ortega-Mora<sup>a</sup>, Jose  
Antonio Ruiz-Santa-Quiteria<sup>b</sup>, Koldo Osoro<sup>c</sup>.

*<sup>a</sup>SALUVET, Departamento de Sanidad Animal,  
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.*

*<sup>b</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,  
Universidad Complutense de Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.*

*<sup>c</sup>Área de Sistemas de Producción Animal,  
Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA),  
Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Rural,  
Asturias, E-33300 Villaviciosa.*

The Veterinary Journal, en revisión



### Abstract

Bovine Trichomonosis (BT) is a sexually transmitted disease considered an important cause of early reproductive failure in cattle under extensive management conditions. In Spain, there are evidences of a re-emergence of BT in extensive husbandry. Recently, *Tritrichomonas foetus* was detected in 41.5% of herds from one representative beef cattle breed (Asturiana de la Montaña, AM), reared in traditional mountain systems in Spain (Mendoza-Ibarra et al., 2012). The objective of the present study was to evaluate the effect of BT on the reproductive performance and the economic consequences in AM herds. The benefits of a control program based on testing and culling of infected bulls were also studied comparing *T. foetus* prevalence and reproductive data before and after implementation of the control measures. In infected herds, *T. foetus* infection caused prolonged calving intervals (79 days longer;  $P < 0.0001$ ) and a higher percentage of cows-not-in calf than in non-infected herds (36% vs 19%;  $P < 0.001$ ). Data for economic analysis showed that BT could reduce income by 68.8% in AM herds. After implementing the control program, cows had shorter calving intervals and an increase in pregnancy percentage of 17.67% was recorded, being similar to the records observed for non infected herds ( $P > 0.05$ ). Nevertheless, following the control program, the *T. foetus* infection rate showed a significant decline ( $P < 0.05$ ) but no significant differences were observed between the first and second year post-culling and the herd incidence was 22.72% (10/44). The testing and culling policy was an effective measure to improve reproductive efficiency and to reduce economical losses, but it will not be effective enough to control this endemic disease in extensively managed beef when common pastures are used.

**Keywords:** Bovine trichomonosis, Control, Reproductive performance, Economic losses, Prevalence.



### 1. Introduction

Bovine Trichomonosis (BT) is a sexually transmitted disease (STD) caused by the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*, considered an important cause of early reproductive failure in cattle. BT is widespread around the world, especially in Asia, Australia, America and South Africa, where natural service by bulls is used as a major means of breeding (Yao, 2013). The parasite is found in the superficial layers of the preputial mucosa in bulls, and colonizes the vagina, cervix, uterus and oviducts of cows. Bulls will remain persistently infected and spread infection from cow to cow during natural service. In cows, *T. foetus* persists in the genital secretions from 13 to 28 weeks and causes the loss of the conceptus at some time early in gestation (Clark et al., 1971; 1974; Parsonson et al., 1974; BonDurant, 1997; Skirrow and BonDurant, 1990). BT is a well-documented cause of early reproductive failure in cattle, increasing calving intervals, resulting in reduced fertility rates, higher culling rates and consequent economic losses (Clark et al., 1983; Rae, 1989; BonDurant, 2007). Management procedures for BT control are not easy to implement under the

extensive management systems (Ball et al., 1987; BonDurant, 2005). The practiced systematic approach of BT control relies upon identification of infected bulls followed by removal of them from the herd (Rae and Crews, 2006). In this context, combined culture and PCR techniques is advised in order to improve the sensitivity and specificity of diagnostic testing (Felleisen et al., 1997; Campero et al., 2003, Sager et al., 2007).

In Spain, there are evidences of a re-emergence of BT in extensive husbandry as a consequence to the expansion of beef cattle based outdoor grazing on systems, promoted by the Common Agricultural Policy (CAP) reform. In a recent study, *T. foetus* infection was detected in 32% bulls and 41.5% of herds from Asturiana de la Montaña (AM), a traditional beef cattle breed reared under traditional mountain pastoral systems (Mendoza-Ibarra et al., 2012). Hardy local breeds are often used in mountain systems because they are able to withstand the sometimes inhospitable conditions. However, the profitability of the traditional and local breeds is lower due to less intensive system. Consequently, in light of the high BT prevalence found and

considering the absence of effective control, *T. foetus* infection could constitute an important limiting factor to improve animal productivity and sustainability in the AM breed. In Spain, the current strategy for the control of BT is voluntary, and relies on individual producers to decide if BT is a significant problem in their own herds and if control measures are needed. If producers are to make sound decisions regarding BT management and control programs, real information on the impact of infection and the benefits of the control are necessary.

Field investigations to evaluate the current impact of BT are logistically difficult to conduct and most published information derives from studies under controlled conditions (Clark et al., 1983), computer simulation studies (Rae, 1989), or studies based on data production from large-scale cow-calf enterprises (Christensen et al., 1977), where management procedures could differ from local breeds managed using traditional systems. Our objective was to evaluate the effect of BT on reproductive performance and the economic consequences in AM infected herds, and to determine the benefits of a control program based on testing and culling infected bulls.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Mountain pastoral system in AM herds

Mountain pastoral systems are characterized by the management of cattle in fixed periods, marked by the start and end of summer, grazing in communal mountain pastures. The present study was carried out on the native AM breed, managed under sustainable mountain pastoral conditions and adapted to less favored mountain areas around Picos de Europa National Park, in the eastern part of “Principado de Asturias” (Northern Spain). Nutrition is primarily dependent on natural pastures, either consumed by grazing during the spring, summer and autumn, or in the form of hay and silage in the winter months. The system relies on the complementarity of forage production from grassland located in the valley bottoms (private property) and communal mountain grazing lands (slopes and highlands). The harvest cycle begins in May when cattle move to the highlands, where they remain until October. Then, cattle start to descend to winter slopes and meadows on the valley. Throughout the autumn, cattle remain all day on slopes and meadows and, as winter progresses they go down

to the valley meadows. In February the animals are in the meadows (mostly) or housed (some farms). In late March, cattle start to use the slopes and in May the cycle restarts when they move again to the mountain lands. The mating, mainly through natural mating, occurs in spring-summer (maximum period of sexual activity), in the meadows close to the holding or in communal pastures in the mountains. Births accumulate between late winter and early spring (February-May). No calving difficulties exist because of the size of the AM calf and the good maternity of dams. Calves come with mothers to mountain pastures and are weaned in the fall at around 5-7 months-old to be sold in the numerous fairs held at that time (<http://www.aseamo.com/raza.aspx>).

### 2.2 Study design

In a first study, the reproductive impact and economic consequences of BT were evaluated in AM herds. According to a previous study (Mendoza-Ibarra et al., 2012). AM herds were divided into *T. foetus* infected and non-infected herds and reproductive data (calving intervals and number of cows in calf) were collected. Herds belonging to both groups were selected on the basis of existing records in the database under

the custody of the Spanish official “Asturiana de la Montaña” breeder organization (ASEAMO), providing reliable data for 32 infected and 32 non-infected herds. Economic losses associated with the presence of the disease were calculated using reproductive data from these herds, as described below.

In a second study, a control program based on detection and culling of infected bulls was conducted on AM herds, during two consecutive mating seasons. The effect of the program was determined by comparing *T. foetus* prevalence and reproductive data before and after implementation of the control measures. *T. foetus* prevalence before culling was based on published data (Mendoza-Ibarra et al., 2012). In order to study the prevalence of *T. foetus* after the control program, the number of herds to be sampled was based on the AM herd population (505 herds) and an estimated herd prevalence of 40% (Mendoza-Ibarra et al., 2012) with 10% accuracy and 95% confidence. The sample size required was 79 herds as determined by Win-episcopo (version 2.0). We attempted to collect a sample from every bull on the premises. The study area was located in Principado de Asturias (Northwestern Spain) and the

targets were AM bulls of breeding age ( $\geq 18$  months) with at least two weeks of sexual rest. Smegma samples were taken in winter before the mating season during two consecutive years. Herds were randomly selected from farms registered in the database under the custody of ASEAMO, who contacted with the farms, asking for their participation in this survey. All animal handling and sample collection procedures were performed in accordance with the guidelines established by the European Union. Furthermore, the incidence of *T. foetus* infection was determined and non-infected AM farms were monitored prospectively, being re-sampled at least twice during the study. In addition to determine the benefits of the control program, reproductive data (calving intervals and number of cows in calf) from a group of 14 infected herds and 11 non-infected herds were collected before and after the start of the control program.

### 2.3 Sample collection

Smegma samples were collected by a plastic cylinder brush scraper (Laboratorio Azul Diagnóstico, S.A.) which was inserted into the prepuce and scraped back and forth 15 times. The material was then transferred to a tube

containing Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.0) and 500  $\mu$ L from the suspension of the PBS mixture were inoculated into the upper chamber of the In Pouch TF medium (Biomed Diagnostics) (Mendoza-Ibarra, et al., 2012). The PBS mixture and In Pouch samples were transported at 4 °C and 37 °C in a portable incubator, respectively, and arrived at the laboratory within 6 h post-collection.

### 2.4 Culture method

In Pouch samples were maintained for 48 h at 37 °C and then processed as described previously (Parker et al., 2003; Sager et al., 2007). All samples were incubated at 37 °C for 7 days in dark conditions and microscopically examined (200  $\times$  screening; 400  $\times$  confirmation) on days 2, 4, 6 and 7 after sample collection. Parasites were identified by their characteristic morphologic features and motility.

### 2.5 DNA extraction and PCR

The PBS and 500  $\mu$ L of the InPouch TF samples taken on day 2 after sample collection were centrifuged for 10 min at 850  $\times$  g for 10 min (Mendoza-Ibarra et al., 2012). Supernatants were removed and DNA was extracted from the sediments using the Realpure kit

(Durviz) following manufacturer's instructions. For *T. foetus* amplification, PCR was performed as described (Felleisen et al., 1998). To identify false-positive results, negative control samples (without template) were added to each set of DNA extractions. To avoid false positive reactions, DNA extraction, PCR sample preparation and electrophoresis were performed in separate rooms using different sets of instruments and aerosol barrier tips, and disposable gloves.

### 2.6 Data Collection

All breeders were requested to fill out a standardized questionnaire (Mendoza-Ibarra et al., 2012) in order to investigate risk factors related to BT. Reproductive records were collected from the ASEAMO database, including calving dates and cows-in-calf percentages. Calving intervals were computed as the number of days between two consecutive calving dates. Cows-in-calf percentages were calculated as number of cows-in-calf divided by number of cows present in the herd from January until the end December. The incidence was calculated as new cases in the study period divided by herds at risk.

### 2.7 Economic analysis

Data for economic analysis were taken from ASEMO (<http://www.aseamo.com/raza.aspx>) and local sales yard records (<http://www.sadei.es>). Four types of economic losses were evaluated:

1. Calf losses, which was calculated based on number of calves born per year  $\times$  market value of the calves (mean of <sup>1</sup>€25 per calf). In addition, CAP price subsidies per AM registered calf born (€190 /female and €120/male) were considered, assuming an equal distribution of male and female calves born.
2. Elongation of the calving intervals. The cost of maintaining non-pregnant cows in the herd was determined using the data calculated in other beef breeds managed under traditional mountain system (€1.6/day/cow) (Garcia-Martinez, 2008).
3. Trichomonad testing: €100/bull, including personnel costs.
4. The cost of culling infected bulls, which was determined considered a mean bull carcass weight of 300 kg, cull price data from the local sales yard (€2.7/kg), transport cost to slaughterhouse (€50) and bull replacement costs (€1500 /bull).

---

<sup>1</sup> €1 = approximately £0.86 or \$1.34 as at February 2013

2.8 Statistical analysis

Information from questionnaires was arranged in categorized tables. Data analysis was assessed by the Chi-square test or the Fisher exact test. Risk factors were determined estimating the odds-ratio (OR). A multivariate regression analysis was only applied if factors had a *P*-value <0.1 in the bivariate analysis. Analyses were performed using the statistics package SPSS for Windows (version 15.0, SPSS). Differences between group means were tested using the Student's *t* test or one-way ANOVA test, following by Bonferroni post-test to examine all possible pairwise comparisons using GraphPad Prism 5 software.

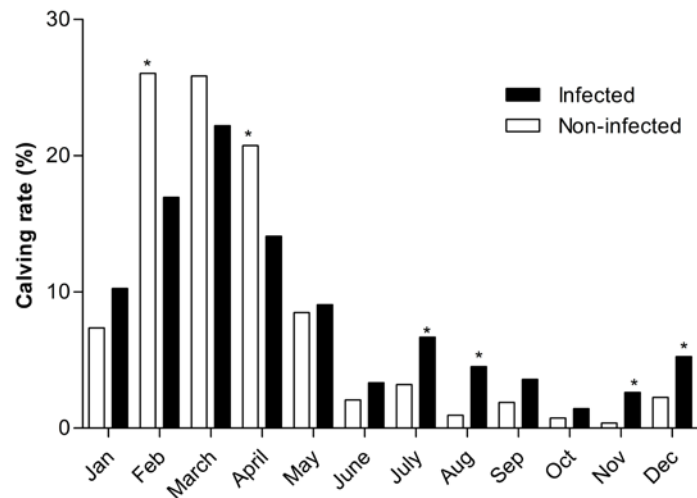
3. Results

3.1 *T. foetus* infection caused a deleterious effect on reproductive efficiency and economic losses in AM herds

To evaluate the effect of BT, reproductive performance and economic consequences were determined. A significant deleterious effect on reproductive efficiency was found as a consequence of *T. foetus* infection in the 32 herds studied (Table 1). In infected herds, calving intervals were significantly prolonged (79 days longer; *P*<0.0001) and the percentages of cows-not-in calf was higher than in non-infected herds (36% vs 19.04%; *P*<0.001). When temporal calving distribution was analyzed, 88.5% (469/530) and 72.55% (304/419) of the births occurred in January-May in non-infected and infected herds, respectively (*P*<0.0001). Comparing both groups by month, birth rates were higher in February and April in non-infected herds (*P*<0.001-*P*<0.01) and in July, August, November and December in infected herds (*P*<0.05-0.001) (Figure 1).

**Table 1.** Summary of statistical analysis of reproductive parameters in Asturiana de la Montaña herds before the implementation of the bovine tricomonosis control program.

Parameter	<i>T. foetus</i> status				Difference (infected vs non-infected)
	Infected herds		Non-infected herds		
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Calving date	4 May	95.5 days	30 March	62.48 days	+35 days
Calving interval (days)	500	8.9	421	5.2	+79.5
Cows-in-calf (%)	63.8	3.16	80.9	2.85	-17.1



**Figure 1.** Distribution of the calving rate by month in *T. foetus* infected and non-infected herds of Asturiana de la Montaña beef breed. Bars represent means of compiled data corresponding to calving dates from 419 cows of 32 infected herds (in black) and 530 cows of 32 non-infected herds (in white). Asterisks indicate for each month, statistically significant differences of the calving frequencies between infected- and non-infected herds ( $P < 0.05$ ).

Consequently, calving date mean was 35 days later in infected herds (Table 1). Data from the economic analysis showed that BT could reduce income by 68.8% in AM herds. On an average AM breed herd (n=20 cows and one bull), the total economic losses associated to *T. foetus* infection were estimated to be about €5.283 per year, being a reducing calf crop and an excess of days open the main causes of economic losses (Table 2).

Additionally due to late breeding, calves would be born 35 days later (Table 1). If an AM calf gains about 0.7-0.8 kg/day (Osoro et al., 1999), calves from infected cows would be nearly 25-28 kg lighter at weaning (5-7 month of age). At market price, AM producer could be losing nearly 53 € (about 16.3%) for every late calf born in a single season.

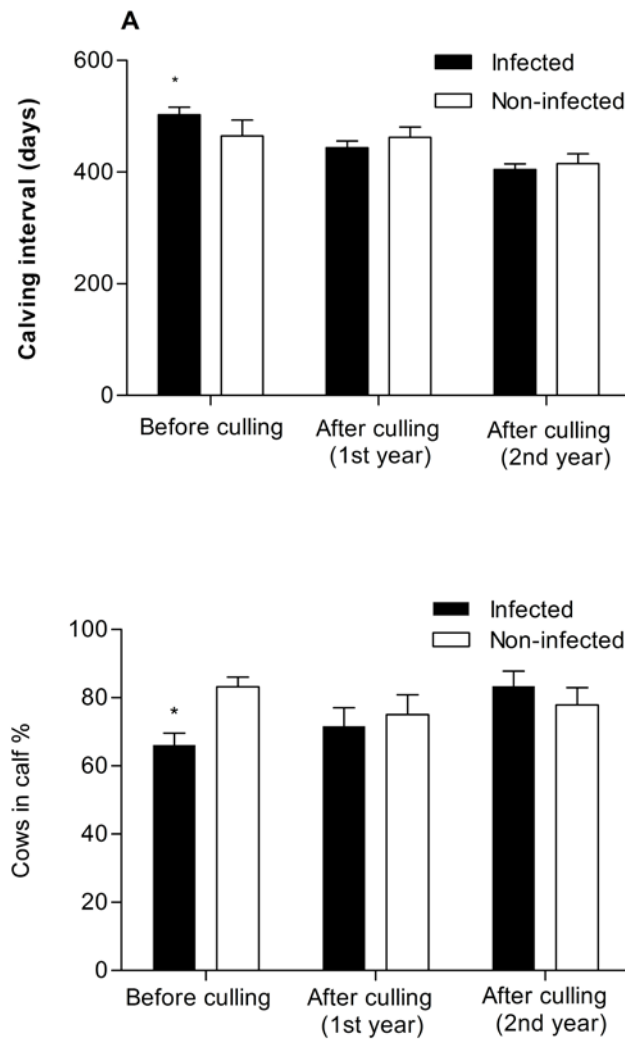
**Table 2.** Summary of economic losses caused by bovine trichomonosis calculated for a characteristic herd of Asturiana de la Montaña breed (n=20 cows and one bull) and considering reproductive data of Table 1, productive records of the breed (<http://www.aseamo.com/raza.aspx>) and local sales yard prices (<http://www.sadei.es>).

Cost category	<i>T. foetus</i> status		Difference (infected vs non-infected)	Percentage of losses
	Infected herds	Non-infected herds		
Calf crop	€5760	€7680 €	€-1920	25%
CAP price subsidies (€190 ♀/€120 ♂)	€1860	€2480 €	€-620	8%
Calf market price (€325)	€3900	€5200 €	€-1300	16.9%
Losses from excess days open (€1.6/cow/day)	€-2528	€0	€-2528	32.9%
Trichomonad testing (€100 /bull)	€-100	€0	€-100	1.3%
Culling/replacement bull	€-735	€0	€-735	9.6%
<b>TOTAL</b>	<b>€2397</b>	<b>€7680</b>	<b>€-5283</b>	<b>68.78%</b>

### 3.2 Efficacy of the control plan

In light of the consequences of the infection, a control program based on detection and culling of infected bulls was conducted on AM herds. In the first and second years, 78.8% (26/33) and 71.4% (10/14) infected bulls were culled, respectively. The effect of the program was determined by comparing the reproductive data before and after the BT control in 14 herds. We observed that cows calving had shorter calving intervals following elimination of the infected bulls

(Figure 2A). Specifically, calving interval decreased about 59 and 98 days after the first and second year post-culling, respectively ( $P < 0.0001$ ), and no statistically significant differences were observed when compared to those in uninfected herds ( $P > 0.05$ ). Moreover after the control program, a 17.67% increase in pregnancy was recorded ( $P < 0.05$ ) and cows became pregnant in a similar proportion than in non-infected herds ( $P > 0.05$ ).



**Figure 2.** Comparison of reproductive data before and after implementation of the control measures in *T. foetus* infected and non-infected herds, respectively. **(A)**. Calving intervals. Bars indicate means ( $\pm$ SEM) of the number of days between two consecutive calving dates. **(B)**. Percentage of cows in calf. Bars indicate means ( $\pm$ SEM) of the number of cows in calf. Asterisks indicate statistically significant differences between infected herds before control program vs infected herds after first or second year after culling and vs non- infected herds.

In the first year after the implementation of control measures, a total of 110 bulls from 75 herds were sampled and 110 bulls from 71 herds in the second year. *T. foetus* infection rate showed a significant decline compared with the prevalence before the implementing control program (Table 3) ( $P<0.05$ ). However, no significant differences were observed between the first and second year post-culling ( $P>0.05$ ). In order to determine the incidence of *T. foetus* infection, a total of 44 non-infected AM farms were followed prospectively during the study period, being the herd incidence 22.72% (10/44). The epidemiological

investigation of potential risk factors performed (Table 4) showed that bulls >3 years old were more likely to be infected than younger animals in the second year post-culling ( $P<0.05$ ). However, the percentage of AM bulls older than 3 years decreased after the implementation of control measures, from 73.1% (68/93) (Mendoza-Ibarra et al., 2012) to 58.9% (58/102) in the first year and 57.1% (60/105) in the second year ( $P<0.05$ ). No other risk factors were identified (Table 4). Repeat-breeder cows were not reported in the first year post-culling but in the second year an increased was observed in *T. foetus* infected herds ( $P<0.01$ ) (Table 4).

**Table 3.** Bull and herd *T. foetus* prevalence before and after the implementation of the control program.

	<sup>a</sup> Bull prevalence	95% CI		<sup>b</sup> Herd prevalence	95% CI	
		Lower %	Upper %		Lower %	Upper %
Before culling (Mendoza-Ibarra et al., 2012)	32% (33/103)	23.8	41.6	41.5% (27/65)	30.3	53.7
1 <sup>st</sup> year post-culling	12.7% (14/110)	7.6	20.4	18.7% (14/75)	11.3	29.1
2 <sup>nd</sup> year post-culling	13.6% (15/110)	8.3	21.4	19.7% (14/71)	12.0	30.5

<sup>a</sup> No. of *T. foetus* infected bulls/No. of bulls tested (percentage).

<sup>b</sup> No. of *T. foetus* infected herds/No. of herds tested (percentage).

**Table 4.** Association of *T. foetus* status with epidemiological data and putative risk factors in Asturiana de la Montaña beef herds in the first and second years of the control program.

Variable	Category	<i>T. foetus</i> status						<i>P-value</i>		OR 95%CI	
		N		Infected (%)		Non-infected (%)		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>
		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>				
Communal pastures	Yes	66	65	13(19.77)	14 (21.5)	53(80.3)	51 (78.5)	1.00	0.62	1.22	2.74
	No	6	5	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)	5 (100)				
Purchase of sexually active bulls	Yes	58	47	10 (17.2)	8 (17)	48 (82.8)	39 (83)	0.45	0.53	0.63	0.61
	No	16	24	4 (25)	6 (25)	12 (75)	18 (75)				
Purchase of sexually active cows	Yes	9	3	2 (22.2)	1 (33.3)	7 (77.8)	2 (66.7)	1.00	0.5	1.21	2.03
	No	63	66	12 (19.7)	13 (19.4)	51 (80.3)	53 (80.6)				
Shared livestock	Yes	65	58	12 (18.5)	13 (22.4)	53 (81.5)	45 (77.6)	0.68	0.44	0.79	3.46
	No	9	13	2 (22.2)	1 (7.6)	7 (77.8)	12 (92.4)				
Rotation of bulls between herds	Yes	18	10	3 (16.7)	2 (20)	15 (83.3)	8 (80)	1.00	1.00	0.92	0.96
	No	56	58	10 (17.9)	12 (20.7)	46 (82.1)	46 (79.3)				
Use of AI	Yes	10	14	1 (10)	6 (42.8)	9 (90)	8 (57.2)	0.68	0.025	0.43	4.59
	No	64	57	13 (20.3)	8 (14)	51 (79.7)	49 (86)				
Presence of abortion	Yes	4	10	0 (0)	4 (40)	4 (100)	6 (60)	1.00	1.00	0.00	3.4
	No	70	61	14 (20)	10 (16.4)	56 (80)	51 (83.6)				
Presence of repeat-breeder cows	Yes	23	31	6 (26.1)	11 (35.5)	17 (73.9)	20 (64.5)	0.34	0.005	1.85	6.78
	No	50	40	8 (16)	3 (7.5)	42 (84)	37 (92.5)				
Vaccination against reproductive disease practiced	Yes	28	32	6 (21.4)	5 (15.6)	22 (79.6)	27 (84.4)	0.76	0.55	1.26	0.62
	No	45	39	8 (17.8)	9 (23)	37 (82.2)	30 (77)				
Reproductive health programme in operation in herd	Yes	6	10	2 (33.3)	2 (20)	4 (66.7)	8 (80)	0.32	1.00	2.33	1.02
	No	68	61	12 (17.6)	12 (19.7)	56 (82.4)	49 (80.3)				
Nutritional supplements	Yes	59	55	11 (18.6)	12 (21.8)	48 (81.4)	43 (78.2)	1.00	0.72	0.99	1.81
	No	15	15	3 (20.0)	2 (13.3)	12 (80)	13(86.7)				
Quality of the fences	Good	14	9	5 (35.7)	2 (22.2)	9 (64.3)	7 (77.8)	0.12	1.00	3.09	1.22
	Regular/Bad	59	58	9 (15.3)	11(19)	50 (84.7)	47 (81)				
Bull age	< 3 years	44	45	4 (9.1)	2 (4.4)	40 (90.9)	43 (95.4)	0.26	0.022	0.43	0.17
	> 3 years	58	60	11 (19)	13 (21.7)	47 (81)	47 (78.3)				

1<sup>st</sup>: First year post-culling infected bulls. A total of 74 questionnaires were returned.

2<sup>nd</sup>: Second year post-culling infected bulls. A total of 71 questionnaires were returned

### 4. Discussion

Improving reproduction in beef cattle should be a major objective to increase production, profitability and sustainability, because the number of calves born per year is one of the most important variables affecting both biological and economic efficiency in beef cow herds. Consequently, decreased reproductive efficiency of a herd could decrease profitability and may ultimately cause failure of the production unit. BT is primarily a problem of extensively-managed herds using uncontrolled mating and can persist in endemic herds without detection for a long time. The magnitude of the economic losses incurred due to *T. foetus* infection has been mainly estimated using simulation models, describing a reduction of 14–50% in annual calf crop if prevalence of *T. foetus* in the bull population was 20–40%; net return per cow exposed to an infected bull was reduced to 5–35% (Rae, 1989). Losses associated with *T. foetus* may be difficult to recognize and the evaluation of herd production data is limited by the accuracy of information supplied by the producer. In our field study, calving dates and number of cows-in-calf data were used as a

measure of reproductive efficiency in cows. *T. foetus* infection reduced income by 68.8% in AM herds, being the primary impact the prolonged calving interval and calf crop reduction. On average, the infected herds required 79 days longer to engender a live calf. Elongation of the calving interval is translated into an excess of days open, which causes losses by the cost of maintaining open cows. In other beef breeds managed under similar mountain pastoral systems, a daily feed cost per cow of €1.6 was estimated (Garcia-Martinez, 2008). Therefore, the cost of a delay of 79 days could cause losses about €126 per cow. Overall, calf production was reduced by 17.7% by failure or delay in conception. These findings support previous results which showed that *T. foetus* infection is negatively associated with the performance of the animals, reducing herd profitability. Our results are in agreement with data reported by Clark et al. (1983), who reported a reduction of the calf production of 18% and prolonged calving intervals that were significantly different from those of non-infected heifers.

On the other hand, the weight of calves at weaning is very important to

the productivity of the herd. In AM, farms are predominantly spring-calving herds. The breeding season occurs during late winter-early spring, resulting in a concentration of births coinciding with the more abundant grass periods to ensure the development of the calf and a good body condition of the dam without additional costs of concentrate and forage. Calves accompany the dams to the natural hay meadows and/or mountain pastures, being weaned gradually when they start to consume grass (from 4 months-old). In the infected herds, the calving season was spanned over the time, so batches of calves were of different ages, making the management more complex. Moreover, the suckling/growing period will be shortened for those calves born at the end of the season. Additionally, if births occur later calves will start to consume grass in summer when the quality and availability of the pastures is lower. Unfortunately, weaning percentages and weaning weights for participating herds were not available. However, it is predicted that this calving delay forces calves to be marketed at lighter weight or increases feeding cost to reach a desired market weight. The impact of fewer and younger or lighter calves on revenue may mean financial disaster for a producer. Moreover, producer

encounters other costs, such as veterinary services, higher replacement rate and loss of the herd genetic improvement (BonDurant, 1997). This scenario represents substantial losses for AM producers already operating on marginal profit levels.

In light of the consequences of the infection, a control program based on detection and culling of infected bulls was conducted. Control of BT requires a plan to identify and eliminate infected bulls. In addition, different options are available depending on the prevalence found and the existence of risk factors. They range from minimal monitoring (e.g. in countries free of infection) over reproductive management to vaccination approaches (Corbeil, 1994; BonDurant, 1997). This study aimed to investigate the effect of a “test and cull” control plan in AM breed in which, a high *T. foetus* herd prevalence (41.5%) was detected and risk factors, such as natural breeding, grazing in communal pastures, communal bulls and high proportion of old bulls, are present in the traditional management of this breed (Mendoza-Ibarra et al., 2012). Often, it is difficult to demonstrate effects of management on fertility in any one herd in one year and it is necessary to have large numbers of observations to

demonstrate significant differences. In BT, the largest losses occur in the first (reduction of 17.6% in calf production) and second (28.6%) years when cows experience primary infection (Clark et al., 1983). Therefore, in the present study, reproductive data were collected during two years after implementation of the control measures to enable the analysis of the effects of the program control on reproductive performance. Following elimination of the infected bulls, an improvement of the reproductive performance was observed and reproductive data were equivalent of those recorded in the non-infected herds. An increase in pregnancy percentage of 17.67% following elimination of the infected bulls was observed. In previous studies following resolution of infection in a herd, an increase on calving rates to 90% (Ball et al., 1987) or pregnancy percentage from 74 to 85% (Skirrow et al., 1985) were described.

Additionally, a comparison of the prevalence of *T. foetus* infection before and after implementation of the control program showed a sustainable reduction of *T. foetus* prevalence. However, after two years, the *T. foetus* prevalence did not decrease and the incidence was 22.72%, which could be attributed mainly to the presence of putative risk

factors associated to BT in the management of this breed. Clinical consequences were also present in *T. foetus* infected herds in the second year and a significant higher percentage of repeat-breeder cows were reported. Complete elimination of *T. foetus* from AM herds using the “test and cull” approach and without substantial changes in management seems unlikely. In AM herds, the existence of a high proportion of old bulls of the sampled population (more than 50%) and other putative risk factors present in the traditional management of this breed (natural mating, communal grazing on public lands or sharing livestock of unknown status), in combination with the lack of regular monitoring programs of the bulls concerning venereal diseases, represent a complex situation for BT control. In the USA there are rules/regulations to reduce spread of the disease (Szonyi et al., 2012; Yao, 2013). The core of these regulations is testing bulls. In Spain, the current strategy for the control of BT is voluntary. BT can be devastating when several owners use common pastures. In this situation, all owners should cooperate and establish rules regarding the access of animals to common pastures and their management prior to entry. All bulls from herds using commingled grazing should be tested

every year (preferably two or three tests). If BT is identified, infected bulls should be culled and only young bulls should be allowed in the common grazing areas. These measures will require interdisciplinary partnership and stronger collaboration of farmers, veterinary and local administration to build an appropriated infrastructure to detect and respond to the effect of the disease. However, for extensively managed beef herds, when risk factors and outside source of infection cannot be avoided or prevented such as common pastures, or when producers are reluctant to cull certain infected bulls, vaccination could be a feasible control measure to implement to reduce the economic losses due to BT (Villarroel et al., 2004).

### 5. Conclusions

BT had a significant impact on the reproductive performance of beef cattle managed under mountain pastoral systems in northern Spain. Implementation of the CAP reform has promoted the beef outdoor grazing systems and pastoral systems are used in many mountainous areas of Europe. The results reported here highlight the impact that STD could have on beef cattle managed extensively, since risk factors for STD diseases are present in these

systems (natural-breeding and grazing of cattle in communal pastures). Our results provide also valuable data for planning control strategies and for making recommendations to farmers. Testing and culling infected bulls was an effective measure to improve reproductive efficiency and to reduce economical losses. Knowing the status of the bulls pre- and post-breeding is the first step for developing a sound *T. foetus* control plan and the best form of herd surveillance. However, the testing and culling policy will not be effective enough to control this endemic disease in extensively managed beef when common pastures are used.

### 6. Acknowledgements

This work was funded by INIA (RTA2009-00136-C02) project. J.A. Mendoza-Ibarra from Universidad de Pamplona (Colombia) was supported by the Programme Alban, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship No. E07D400491CO. We also express our gratitude to ASEAMO, SERIDA, clinical veterinarians and farmers for the invaluable contribution to this study.



# **CAPÍTULO V**

---

## **DISCUSIÓN GENERAL**



La tricomonosis bovina es una de las enfermedades venéreas de mayor impacto en la reproducción en los sistemas extensivos (BonDurant, 2005). En nuestro país, pese a haber sido señalada su presencia en el pasado en diversas provincias, los datos de prevalencia disponibles son escasos y, entre los que existen, muchos están ya obsoletos y la metodología diagnóstica empleada fuera de uso. En España, el censo de explotaciones de bovino de cría ha aumentado significativamente en los últimos años en respuesta a la reforma de la PAC, y ha supuesto, una mayor atención a los sistemas ganaderos extensivos basados principalmente en el empleo de razas autóctonas adaptadas al medio, especialmente en zonas de montaña, y la vuelta al uso de métodos tradicionales de explotación como los pastos comunales y el uso de la monta natural. Todo ello ha supuesto el incremento de posibles factores de riesgo para algunas parasitosis bovinas que se creían desaparecidas o, en todo caso, poco importantes económicamente como es el caso de la tricomonosis bovina, pudiendo constituir una amenaza significativa para la sanidad y producción animal. Este trabajo de tesis doctoral constituye el primer estudio epidemiológico de la tricomonosis bovina realizado en razas autóctonas representativas del sistema de vacuno de cría español en zonas de montaña, las razas Asturiana de la Montaña y Asturiana de Los Valles.

Para llevar a cabo este estudio, en el primer objetivo se abordó una validación de la metodología para la detección de *T. fetus* en muestras de esmegma prepucial, empleándose para ello diferentes métodos de muestreo, técnicas y protocolos diagnósticos. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección (cultivo y PCR) presentan en general una adecuada sensibilidad, pero en condiciones de campo el diagnóstico se dificulta. La mayoría de los estudios existentes hasta el momento, han realizado una optimización y validación de la metodología diagnóstica bajo condiciones controladas de laboratorio, bien utilizando muestras contaminadas con el parásito o de animales infectados experimentalmente. La importancia de nuestro trabajo radica en el empleo de muestras de animales recogidas en condiciones de campo. Como requisito indispensable para el muestreo, los toros mantuvieron un reposo sexual de al menos dos semanas, con el objetivo de evitar una reducción del número de parásitos en la cavidad prepucial como consecuencia de la monta, lo que podría dar lugar a una disminución de la sensibilidad de las técnicas y la aparición de falsos negativos (Rodning et al., 2008).

Para la recogida de esmegma prepucial, se evaluaron dos métodos de muestreo: mediante una vaina de IA y utilizando un raspador plástico. Ninguna de las técnicas causó un marcado estrés o daño al animal y la sensibilidad observada fue muy similar con ambos métodos. Sin embargo, algunas muestras recogidas con la vaina de IA contenían trazas de sangre o se obtuvo una cantidad inadecuada de esmegma prepucial, siendo necesario ocasionalmente repetir la toma de muestras. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por otros autores, los cuales determinaron que la sensibilidad fue la misma cuando se realizó el muestreo con pipeta de IA o con raspador (Tedesco et al., 1979; Parker et al., 1999). Otro estudio en el cual se compararon los mismos sistemas de muestreo, determinaron que el raspado era una técnica más rápida, segura y ofrecía algunas ventajas tales como la obtención de muestras más concentradas, una reducida contaminación, la posibilidad de recoger la muestra sin necesidad de un asistente, y se evitaba la contaminación de la muestra por orina (Irons et al., 2002). Estas ventajas también pudieron ser observadas en nuestro estudio por lo que se recomienda el uso del raspador para la recogida de esmegma prepucial.

El aislamiento del parásito en cultivo *in vitro* ha sido considerado el método de referencia para el diagnóstico de la infección por *T. foetus* (BonDurant et al., 2003; Parker et al., 2003a), existiendo una gran variedad de medios para el crecimiento del parásito. A principios de los años 60 los medios más usados eran los medios Plastringe y Diamond (Todorovic and McNutt, 1967). Actualmente, el medio InPouch TF y el medio Diamond modificado son los métodos más usados para el cultivo *in vitro* de *T. foetus* (Rodning, 2007). Por su parte, el uso de medios de transporte para mantener la viabilidad del parásito en la muestra es un factor importante en el diagnóstico de *T. foetus*. En el presente trabajo se realizó una comparación entre el sistema canadiense que utiliza como medio de transporte el TFTM y posterior cultivo en medio de Diamond, con el medio comercial InPouch TF. En ambos casos las muestras se transportaron a temperatura ambiente y llegaron al laboratorio a las 6 horas, incubándose a 37 °C y observándose al microscopio los días 2, 4, 6 y 7 post-recogida. En nuestro estudio, la concordancia entre ambos medios fue muy buena, sin embargo observamos un mayor número de muestras positivas cuando se utilizó el medio In Pouch TF. Parker et al. (2003a) también compararon el sistema TFTM/Diamond y el In Pouch TF, observándose una sensibilidad del 76,8% con el medio Diamond y del 95% con el medio InPouch TF, con 6,95 veces más de probabilidades de detectar un animal infectado cuando se usó este último. Thomas

et al. (1990), no encontraron diferencias significativas entre los dos medios, aunque observaron un mayor número de resultados positivos en las primeras 48 horas con el medio InPouch TF, al igual que lo observado en nuestro estudio. También se ha señalado que el medio InPouch TF necesita un menor número de trofozoítos para su detección en los tiempos iniciales de incubación (Borchardt et al., 1992). La ventaja del uso del medio InPouch TF puede ser debida a una mejor optimización de los componentes del medio y unas mejores condiciones anaeróbicas facilitadas por el sistema de dos cámaras, lo que favorecería el crecimiento del parásito. Por otro lado, la presencia de contaminaciones por bacterias u hongos también es menos frecuente en el medio InPouch TF (Felleisen et al., 1997), al igual que lo observado en nuestro estudio. Este resultado puede ser debido a la existencia de pasos adicionales en el sistema canadiense, como la centrifugación del medio TFT y la inoculación del sedimento en Diamond. Nuestros resultados confirman la utilidad del medio comercial InPouch para el diagnóstico de la tricomonosis en condiciones de campo.

Como se ha mencionado en el capítulo de introducción, la PCR es una técnica altamente sensible y específica para el diagnóstico de la tricomonosis. Sin embargo se ha descrito que un retraso en el procesamiento de la muestra puede conducir a una disminución en la sensibilidad debido a una degradación de los ácidos nucleicos. Además *T. foetus* secreta una variedad de enzimas hidrolíticas (Thomford et al., 1996), que junto a otros compuestos podrían causar la degradación del ADN (Turner and Muller, 1983; Wang and Wang, 1985). En este sentido, se ha observado una sensibilidad en la PCR del 90% en muestras procesadas a las 6 horas y del 31% a los 5 días (Mukhufhi et al., 2003). En otro estudio en el cual las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente comparándolas con la refrigeración durante una semana, no se observó ningún resultado positivo a las 72 horas en aquellas muestras mantenidas a temperatura ambiente (Mutto et al., 2006). En el presente trabajo y con el objetivo de mejorar el diagnóstico por PCR, se probaron diferentes protocolos para la extracción de ADN en muestras de esmegma prepucial obtenidas en condiciones de campo. Para ello, se utilizó un tampón de lisis comercial para la recogida de la muestra, que de acuerdo con el fabricante, conserva el ADN durante varios meses a temperatura ambiente y permite su uso en la mayoría de las aplicaciones en biología molecular. El periodo de tiempo elegido para examinar el efecto de la solución fue de 48 horas, de acuerdo con las condiciones de rutina recomendadas para el diagnóstico de la enfermedad (BonDurant, 2005). Sin embargo, no se observó una

ventaja significativa en su uso como agente conservante del ADN. Posiblemente, un aumento en el tiempo de almacenamiento de la muestra podría haber sido útil para evaluar sus efectos. Anteriormente, el uso del isocianato de guanidina como agente conservante del ADN tampoco resultó ventajoso (Mukhufhi et al., 2003). Sin embargo en nuestro estudio, el mayor porcentaje de muestras positivas se detectó en aquellas muestras de esmegma prepuccial diluidas en el tampón de lisis, mostrando los beneficios del mismo en el diagnóstico de la infección.

Por otra parte, es frecuente que las muestras de esmegma prepuccial estén contaminadas con heces, sangre, orina o semen, que junto con la consistencia mucosa del esmegma, pueden reducir la sensibilidad de la PCR (Ho et al., 1994). En este sentido, el uso de la resina Chelex 100 como método de extracción del ADN en muestras de esmegma podría ser beneficioso, por su capacidad para eliminar estos inhibidores (Walsh et al., 1991). En un estudio anterior, esta resina con una solución de agar al 0,05% fue utilizada con éxito para extraer ADN de *T. foetus* en muestras de esmegma contaminadas con el parásito (Chen and Li, 2001). Cuando aplicamos este sistema a muestras de animales con infección natural, el número de positivos fue significativamente menor que el obtenido con la prueba comercial. Se ha descrito que las altas temperaturas y las condiciones alcalinas requeridas en el proceso de extracción con el Chelex podrían degradar el ADN (Hoff-Olsen et al., 1999). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que este sistema no es apropiado para la extracción de ADN de *T. foetus* en este tipo de muestras.

El diagnóstico de *T. foetus* por cultivo y observación microscópica implica la identificación del parásito por su morfología, número de flagelos y motilidad, pero estas diferencias no son siempre fácilmente observables (Walker et al., 2003). Se han identificado otras especies de tricomonádidos de origen intestinal en la cavidad prepuccial de los toros y que son transferidas mediante la monta entre machos, como parte del comportamiento etológico. Estas especies son apatógenas pero poseen características morfológicas y de motilidad similares a *T. foetus* (BonDurant et al., 1999; Campero et al., 2003; Cobo et al., 2003). Este hecho es de gran importancia en el diagnóstico ya que los animales declarados positivos deben ser sacrificados. En este sentido, la técnica de PCR ha sido considerada como un método muy valioso (por su especificidad) para la detección e identificación de *T. foetus*. Además y a diferencia de lo que ocurre con la microscopía,

la PCR puede detectar al parásito en muestras con un número bajo o con parásitos muertos, así como en muestras con contaminación bacteriana elevada. Por tanto, se ha recomendado por diversos autores su combinación con el cultivo con el objeto de aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (Felleisen et al., 1998; Campero et al., 2003; Cobo et al., 2004; Schulze et al., 2006; Cobo et al., 2007). En estudios anteriores se ha determinado una sensibilidad del 67,8% para el cultivo, 65,9% de la técnica de PCR y 78,3% para ambas técnicas en combinación (Cobo et al., 2007). En nuestro estudio se determinó la concordancia entre el cultivo y la PCR realizada a partir de una alícuota del medio de cultivo en el día 2 post-recogida. Los valores de concordancia entre ambas técnicas fueron buenos, todos los resultados positivos por cultivo se confirmaron por PCR y sólo 4 animales infectados fueron detectados por PCR cuando se aisló el ADN directamente de las muestras de esmegma prepucial, pero no se pudieron determinar sobre los medios de cultivo. Estas discrepancias pueden deberse a un deficiente crecimiento de *T. foetus* en los medios de cultivo probablemente debido a una baja viabilidad del parásito, a un número bajo, así como a la presencia de contaminaciones bacterianas. Otro factor a considerar es la dilución de la muestra en el medio de cultivo lo que puede disminuir la sensibilidad de las técnicas si el número de parásitos presentes es bajo, siendo probable que el parásito no siempre se pipetee al recoger la alícuota, dando lugar a un resultado negativo. Por tanto, debido a que el método de cultivo *in vitro* depende de la viabilidad del parásito, la PCR aplicada directamente a las muestras de esmegma prepucial aumentaría la probabilidad de detectar el parásito. Sin embargo, para el diagnóstico de rutina y con el fin de evitar falsos positivos o falsos negativos, se recomienda el uso de ambas técnicas (cultivo y PCR) en combinación.

En el segundo objetivo de esta tesis doctoral, se estudió la prevalencia y factores de riesgo de la infección por *T. foetus* en rebaños seleccionados al azar de las razas AM y AV. En ambas razas, al ser zonas de ganadería extensiva y donde se usa la monta natural, se realizó el diagnóstico de la tricomonosis y campilobacteriosis genital bovina de forma conjunta, utilizando los métodos ya validados para la toma de muestras y la detección del agente en el laboratorio. En el caso de la campilobacteriosis genital el diagnóstico se realizó en el Laboratorio español de referencia para campilobacteriosis en animales (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, Madrid). A diferencia de los datos de prevalencia encontrados para la tricomonosis y que se detallarán a continuación, no se detectó la presencia de *C. fetus venerealis*. El aislamiento de las especies *Campylobacter*

es difícil por su limitada viabilidad fuera del hospedador, debido a la temperatura y a los requerimientos nutricionales y atmosféricos de estos microorganismos (Smibert, 1978). También se ha descrito que *C. fetus venerealis* se aísla más comúnmente en zonas geográficas con una temperatura ambiente relativamente alta (Harwood et al., 2009), en contraste con las condiciones de nuestro área de muestreo (regiones de montaña del norte de España). En España, no hay estudios sobre la prevalencia de la campilobacteriosis genital, sin embargo, se ha detectado *C. fetus venerealis* en explotaciones con problemas reproductivos, principalmente en zonas de dehesa utilizando la misma metodología (8,2%; Ortega-Mora & García-Peña, 2008, Rojo-Montejo et al., 2010). Por lo tanto, son necesarios más estudios para investigar la prevalencia de esta enfermedad en otras zonas geográficas del país.

En lo que se refiere a la tricomonosis bovina, los resultados obtenidos en la raza AM en este estudio muestran una alta prevalencia de infección por *T. foetus* en la población muestreada (prevalencia individual 32% y prevalencia de rebaño 41,5%). Es importante resaltar que la prevalencia podría ser ligeramente superior a la obtenida, ya que incluso en las mejores condiciones de muestreo, transporte y cultivo, no se garantiza que todas las muestras tomadas de un toro infectado sean positivas. En nuestro estudio, sólo se tomó una muestra por toro, y en estos casos se ha descrito que la probabilidad de detectar un animal positivo es del 85% mientras que es del 99% si se analizan tres muestras (Sager et al., 2007). En comparación con otros estudios, las tasas de prevalencia son similares a las observadas en zonas con manejo extensivo del ganado de carne donde se usa la monta natural, como un 30,4% en Florida (Rae et al., 2004), y 18,4% y 28%, en Costa Rica y Argentina, respectivamente (Pérez et al., 1992; 2006). En España, el último estudio publicado data de 1998 y el porcentaje de toros infectados fue mucho menor que el encontrado en el presente estudio (prevalencia individual 2,9%; Martín-Gómez et al., 1998). Diferentes factores pueden haber contribuido a la mayor prevalencia encontrada en el presente estudio, como el uso de una metodología más sensible o diferencias geográficas o de manejo. Sin embargo, ambos estudios se realizaron en regiones montañosas del norte de España y el manejo de los rebaños se realizaba en sistemas extensivos con sistema de transtermitancia valle-puerto. Actualmente, también se dispone de datos de la presencia de la infección en explotaciones con antecedentes de fallo reproductivo temprano situadas fundamentalmente en el oeste peninsular (Cáceres, Badajoz, Salamanca y Ávila), donde una parte importante del ganado es mantenido en

extensivo en sistema de dehesa. Los resultados obtenidos en AM son muy similares a los obtenidos en estas explotaciones (tasa de infección individual 18,8% y de rebaño del 34,8%; Ortega-Mora & García-Peña, 2008; Rojo-Montejo et al., 2010). Estos resultados podrían indicar una re-emergencia de la tricomonosis en los sistemas extensivos de ganado de carne en nuestro país.

En relación a los factores de riesgo asociados a la enfermedad, la edad del toro fue el único factor de riesgo identificado en nuestro estudio, siendo la infección más frecuente en toros mayores de 3 años de edad. Datos similares se han reportado con anterioridad por BonDurant et al. (1990). Estos autores encontraron que el 2% de los toros infectados eran menores de 3 años frente al 6,7% que fueron mayores de 4 años. En otros estudios epidemiológicos, la edad media de los toros infectados fue 5,5 años y la de los no infectados 3,9 (Rae et al., 1999), teniendo los toros mayores de 5 años de edad, 2,2 veces más riesgo de estar infectados (Rae et al., 2004). Este resultado indicaría que la presencia de toros mayores de 3 años, aumentaría el riesgo de infección en un rebaño, debido a que estos animales actuarían como portadores asintomáticos. Este hecho, es debido al aumento de la posibilidad de exposición al parásito y al desarrollo en los toros de más edad de criptas glandulares más profundas en la mucosa prepucial, favoreciendo la implantación y desarrollo del parásito (Clark et al., 1974; Parsonson et al., 1974; BonDurant, 1997). En nuestro estudio, no se pudieron determinar otros factores de riesgo asociados a la enfermedad, debido a la homogeneidad de la población analizada y de las condiciones de manejo en los rebaños muestreados, ya que todos se explotan en un sistema de transtermitancia valle-puerto con uso de pastos comunales en la época estival. En un estudio previo en EE.UU., el uso de pastos comunales resultó ser el factor de riesgo más importante, seguido de la falta de pruebas diagnósticas antes de la temporada de reproducción y una mayor proporción de machos de más edad (Villarroel et al., 2004). La alta prevalencia de la infección encontrada en este estudio podría deberse a la existencia de toros viejos y factores de riesgo adicionales en los rebaños de AM, como el uso de pastos comunales con animales de estado sanitario desconocido.

En lo que se refiere a AV, es una raza explotada principalmente en el Principado de Asturias y con mayor importancia que la raza AM, tanto en censo como en producción cárnica (Sierra et al., 2010). En este caso, el muestreo se realizó en dos tipos de sistemas: toros de explotaciones permanentes en zonas de valle o sistema estante y toros de

explotaciones con sistema de transtermitancia valle-puerto, que al igual que en la raza AM usan pastos comunales. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de la tricomonosis en AV y determinar los factores de riesgo de la enfermedad según el tipo de manejo de la raza (sistema estante *vs* sistema transtermitante) así como las posibles diferencias entre AV y AM.

La prevalencia en los toros de AV fue del 4% y la de rebaño el 5,2%. Al igual que lo observado en la raza AM, cuando se comparó la edad de los toros infectados, el mayor porcentaje se encontró en aquellos toros mayores de 3 años, indicando de nuevo que la edad es un factor de riesgo. No se identificaron otros factores de riesgo asociados a la enfermedad, y tampoco se encontraron diferencias entre el sistema estante y el transtermitante, a pesar de que el uso de pastos comunales se ha identificado como un factor de riesgo importante asociado a la enfermedad (Gay et al., 1996). Este resultado puede ser debido a la baja prevalencia encontrada y a la falta de pruebas diagnósticas y control frente a las enfermedades venéreas en ambos sistemas. La prevalencia en la raza AV es similar al 6% encontrado en Florida (Rae et al., 2004) y 3,7% en Texas (Szonyi et al., 2012). Sin embargo, la prevalencia de la infección en la raza AV fue significativamente menor que la encontrada en AM, a pesar del hecho de que ambas razas comparten básicamente el mismo nicho ecológico. Aunque se ha sugerido que algunas razas de *Bos taurus* pueden ser más resistentes a la tricomonosis que otras (Rae et al., 2004), las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre las razas AM y AV son poco probables, dado a que su origen genético es común (ambas derivan de Tronco Cantábrico). Por su parte, la menor prevalencia de *T. foetus* observada en AV puede ser debida a diferencias en el manejo entre AM y AV. AM es una raza rústica que utiliza sistemas de montaña tradicionales (pastos comunales) mientras que AV es una raza más comercial, especializada en la producción de carne, siendo el manejo técnico del rebaño más avanzado (Sierra et al., 2010). En este sentido, durante las últimas tres décadas, en la raza AV se han aplicado programas de selección mediante el uso de IA con el objetivo de incrementar el número de animales con el gen de la hipertrofia muscular. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de la infección entre los rebaños de AV que utilizaban o no IA, probablemente debido al hecho de que la prevalencia de la enfermedad fue muy baja. Sin embargo, se observó que el uso de la IA era más frecuente en las explotaciones de AV (44,4%) en comparación con los rebaños AM (16,1%). La práctica de la IA podría haber ayudado a la reducción en la presencia de la tricomonosis

bovina, ya que es una medida de control muy efectiva (Ball et al., 1987; BonDurant, 2005). Otro factor a tener en cuenta es la edad de los toros. Cuando se comparó la edad de la población muestreada entre AM y AV, el número de toros mayores de 3 años fue superior en la raza AM (73,1% versus 46,4%). La existencia de una mayor proporción de toros menores de 3 años de edad en AV podría haber contribuido a la menor prevalencia encontrada, ya que es otra de las medidas usadas para el control de la tricomonosis bovina. Se ha descrito que los toros entre 1 y 2 años de edad son más resistentes y pueden llegar a eliminar la infección (Rae and Crews, 2004). Por otra parte, también existen otras diferencias de manejo entre las explotaciones de AM y AV que pueden explicar las diferencias encontradas. En AV, las explotaciones son de mayor tamaño que en AM y los pastos se comparten con un menor número de rebaños que en AM. Se ha descrito que el riesgo de infección por *T. foetus* es mayor al aumentar el número de rebaños que comparten pastos (Gay et al., 1996). Por otra parte, AM es una raza actualmente bajo un programa de conservación, en la cual el uso de toros comunales es más frecuente que en AV. Esta práctica podría favorecer la diseminación de la enfermedad en el caso de usar toros infectados. Otra diferencia a resaltar es que los toros de la raza AV normalmente permanecen en las granjas durante el período de pastoreo a diferencia de los toros de AM, que suelen subir a los pastos comunales. En resumen, los resultados de este estudio indican que la tricomonosis bovina está presente en el ganado vacuno de cría en sistemas de montaña, sin embargo la prevalencia puede variar considerablemente dependiendo de las prácticas ganaderas utilizadas en los rebaños.

Como ya se ha indicado en numerosas ocasiones a lo largo de esta tesis, la aplicación de la reforma de la PAC ha favorecido el uso de sistemas extensivos, y en particular los localizados en zonas de montaña. De esta forma, la conservación de la biodiversidad de estos hábitats, depende exclusivamente del pastoreo y del uso de razas autóctonas, que por su fácil adaptación al medio y la capacidad para aprovechar los recursos disponibles mediante el pastoreo, son capaces de resistir a condiciones muchas veces inhóspitas. En este sentido, la eficiencia reproductiva es el factor de mayor impacto económico en los sistemas de vacuno de cría, ya que condiciona el número de terneros destetados y vendidos por vaca y año, y por tanto la rentabilidad y sostenibilidad de la explotación. La tricomonosis bovina, es un problema en las explotaciones que usan la monta natural y pueden persistir en rebaños de forma endémica sin ser detectada durante periodos largos de tiempo, dando lugar principalmente a un aumento en el intervalo entre partos y una

disminución del número de terneros. Teniendo en cuenta los resultados de prevalencia obtenidos en la raza de AM, la tricomonosis bovina podría constituir, un importante factor limitante en la productividad de estas explotaciones. En el tercer objetivo de esta tesis se analizó el impacto de la tricomonosis sobre la eficiencia reproductiva y la eficacia de las medidas de control en los rebaños de la raza AM.

Las pérdidas económicas debidas a la infección por *T. foetus* han sido principalmente estimadas utilizando modelos de simulación, describiendo una reducción del 14-50% en el número de terneros nacidos/año (Rae, 1989). Las pérdidas asociadas a la infección pueden ser difíciles de reconocer y la evaluación de los datos productivos del rebaño está limitada por la exactitud de la información suministrada por el ganadero. En nuestro estudio, se han recogido la fecha de parto y el porcentaje de vacas paridas o terneros/año para evaluar la eficiencia reproductiva del rebaño. Los rebaños infectados presentaron un alargamiento del intervalo entre partos y disminución del número de terneros/año, suponiendo un 68,8% menos de ingresos anuales. El alargamiento del intervalo entre partos se traduce en un exceso de días abiertos, ocasionando pérdidas por el coste de mantener las vacas abiertas. En otras razas de carne manejadas en sistemas de pastoreo de montaña similares, como explotaciones de las razas Pardo suiza o Pirenaica, se estimó un coste diario por vaca de 1,6€(García-Martínez, 2008). Por lo tanto, el coste del retraso de 79 días podría causar pérdidas de aproximadamente 126€por vaca. Por otra parte, cabe destacar las consecuencias indeseables que se producen en el manejo de las explotaciones cuando los intervalos entre partos se prolongan. En los rebaños infectados, la producción de terneros también se redujo en un 17,7% por fallos o retrasos en la concepción. Estos hallazgos apoyan resultados anteriores, que describen una reducción de la producción de terneros de 18% y un aumento en el intervalo entre partos (Clark et al., 1983).

Por su parte, el peso de los terneros al destete es otro factor de gran importancia que condiciona la productividad del rebaño. El manejo reproductivo en los sistemas de vacuno en zonas de montaña gira alrededor de la planificación de la época de partos (García-Dory, 1980; Serrano et al., 2002). En las explotaciones de AM, el periodo de cubrición ocurre a finales de invierno y principios de primavera en los prados cercanos a la explotación o en los pastos comunales en las montañas, produciéndose por tanto la concentración de la paridera en los meses de primavera, coincidiendo con una mayor abundancia de pastos para asegurar una buena condición corporal de la madre y el

ternero, suprimiéndose de esta manera los costes de suplementación con forraje o concentrados. Los terneros acompañan a las madres, siendo destetados gradualmente cuando empiezan a consumir pasto (a partir de los 4 meses). En nuestro estudio, las explotaciones infectadas presentaron un retraso y dispersión en la paridera, dando lugar a lotes de terneros con diferente edad lo que además dificulta su manejo. En estas circunstancias, se produce también la imposibilidad de vender los terneros al destete o cebados en los meses de mayor demanda. Adicionalmente, aquellos terneros que nacen tarde durante la época de cría, iniciarán el consumo de pastos en el verano, cuando la calidad y cantidad es peor. Por tanto, es importante la repercusión en los costes de alimentación cuando los partos se producen en épocas desfavorables, disminuyendo la época de amamantamiento y engorde del ternero y reduciéndose, por tanto, su peso final. Aunque no se pudieron obtener los pesos de los terneros al destete, es de suponer que estos animales tendrían pesos inferiores en el momento de su venta. Considerando que un ternero de AM gana aproximadamente 0,7-0,8 kg/día (Osoro et al., 1999), aquellos terneros procedentes de explotaciones infectadas podrían llegar a tener 25-28 kg menos en el momento del destete (5-7 meses de edad), traduciéndose en una pérdida de casi 53€ por cada ternero nacido en una estación reproductiva (aproximadamente 16,3%), lo que al final se traducirá en importantes pérdidas económicas para el productor. A todas estas pérdidas económicas, habría que sumar otras más difíciles de cuantificar como las derivadas de los servicios veterinarios, pérdidas en la mejora genética del rebaño debido al sacrificio de animales infectados y un aumento en la tasa de reposición (BonDurant, 1997). Este escenario representa unas importantes pérdidas económicas para los productores de AM, que suelen operar en niveles marginales de beneficios.

Como consecuencia de las pérdidas económicas observadas, se puso en marcha un plan de control de la enfermedad. Las medidas de control varían en función de si lo que se pretende es prevenir, controlar o erradicar la enfermedad abarcando desde acciones mínimas (por ejemplo, la monitorización en los países libres de la infección), cambios en el manejo reproductivo y de rebaño (IA, separación del rebaño en grupos de alto y bajo riesgo, sacrificio de toros positivos, etc.) y programas de vacunación (revisado en Rae and Crews, 2006; Campero and Gottstein, 2007). La eficacia de estas medidas puede variar considerablemente según la prevalencia de la infección y la exposición a determinados factores de riesgo. En esta tesis se determinó la eficacia de un plan de control basado en el diagnóstico y sacrificio de los toros infectados antes de la época

reproductiva en explotaciones donde se había observado una alta prevalencia (41,5%) y donde están presentes factores de riesgo como son pastos comunales, alta proporción de toros mayores de 3 años y el uso de toros compartidos. A menudo, es difícil observar cambios en la eficiencia reproductiva del rebaño analizando los índices reproductivos de una única época reproductiva. En la tricomonosis bovina cuando las vacas experimentan una primoinfección, las mayores pérdidas ocurren en el primer y segundo año, observándose una reducción en el número de terneros del 17,6% y 28,6%, respectivamente (Clark et al., 1983). Por esta razón, se recogieron datos reproductivos durante los dos primeros años después de la puesta en marcha del plan de control. Como consecuencia de la adopción de las medidas de control en las explotaciones infectadas de AM, se observó una mejora en los índices reproductivos durante los dos años posteriores a la eliminación de los toros infectados. Concretamente, se observó un acortamiento medio del intervalo entre partos de 59 días después del primer año post-sacrificio y de 98 días en el segundo año, obteniéndose valores similares a los observados en los rebaños no infectados (media de 450 días de intervalo entre partos). Asimismo, el porcentaje de terneros nacidos por año se incrementó un 17,7% siendo similar al observado en los rebaños del grupo no infectado. El diagnóstico anual y sacrificio de los toros infectados es una medida eficaz, que mejoró significativamente los índices reproductivos, reduciendo por tanto, las pérdidas económicas. En estudios previos se ha descrito un aumento de la tasa de partos en rebaños que han resuelto la infección (Ball et al., 1987) y porcentajes de gestación entre 74-85% (Skirrow et al., 1985).

La eficacia de las medidas de control se evaluó también comparando la prevalencia antes y después del sacrificio de los sementales infectados, observándose una reducción de la prevalencia de *T. foetus* a nivel individual y de rebaño. Sin embargo, en el segundo año la prevalencia no disminuyó y la incidencia fue del 22,72%, lo que podría atribuirse principalmente a la presencia de factores de riesgo asociados a la enfermedad. La eliminación de la enfermedad en los rebaños de AM utilizando el diagnóstico y sacrificio de toros infectados sin la realización de cambios sustanciales en el manejo de los animales, parece poco probable. En los rebaños de AM, la existencia de una alta proporción de toros mayores de 3 años (más del 50%) y otros factores de riesgo presentes en el manejo tradicional de la raza (monta natural, pastos comunales y toros compartidos), en combinación con la falta de pruebas diagnósticas anuales para la

detección de enfermedades venéreas, representan una situación compleja para el control de la tricomonosis bovina.

En los Estados Unidos, el diagnóstico de la tricomonosis bovina en sementales o animales de cría es obligatorio en muchos estados (Szonyi et al., 2012; Yao, 2013), mientras que en España es de carácter voluntario. Para que un plan de control basado en el diagnóstico y sacrificio de los toros infectados sea eficaz, es necesario controlar las fuentes externas de infección o transmisión. El aprovechamiento de los pastos comunales, supone un beneficio evidente, no sólo en el aspecto económico, para las explotaciones que hacen uso de él, sino también en el paisajístico y medioambiental. Sin embargo el uso de estos pastos, supone un riesgo sanitario al existir contacto entre animales de diferente origen y estado sanitario. Para que los rebaños continúen con el sistema de aprovechamiento de pastos, tan beneficioso en todos los ámbitos, minimizando los factores negativos, es necesario buscar medidas de control mediante la implicación de normas de uso comunes de estos sistemas comunales. En aquellos rebaños en los que se utilizan pastos comunales, es recomendable la colaboración de todos los usuarios para analizar todos los toros de las explotaciones que comparten los pastos de forma anual (preferiblemente dos o tres diagnósticos). Los toros infectados deben ser sacrificados y sólo los toros negativos o jóvenes deben ser permitidos en las áreas de pastoreo. Estas medidas requerirán la colaboración interdisciplinaria de ganaderos, veterinarios y la administración local para construir una infraestructura apropiada para detectar y responder a los efectos de la enfermedad. Los resultados obtenidos en este estudio son por tanto de gran valor para la planificación de estrategias de control frente a esta enfermedad.

Sin embargo, en zonas donde no se puedan llevar a cabo estas medidas y existan los factores de riesgo antes descritos, además del diagnóstico anual de los toros, la vacunación podría ser otra medida de control beneficiosa en rebaños. En estas situaciones, estudios matemáticos de simulación (Villarroel et al., 2004) en los que se analizó el beneficio potencial de la vacunación tomando en consideración diferentes factores de riesgo, los costes de la vacuna, servicios veterinarios y el valor de los terneros destetados, demostraron que la vacunación fue la medida de control más beneficiosa, principalmente en aquellas explotaciones donde se usaban pastos comunales, no realizaban pruebas diagnósticas en los toros y al menos dos tercios de los toros utilizados eran mayores de 3

años. La vacunación disminuiría significativamente las pérdidas económicas ocasionadas por la infección al aumentar el número de terneros nacidos. Sin embargo, es importante señalar que estos estudios de simulación están realizados tomando como referencia granjas de Estados Unidos (tamaño >100 animales; ratio vaca-toro de 25:1), por lo que los resultados pueden variar en función de las características de las explotaciones. Aunque la eficacia de la vacunación no es del 100%, su empleo permitiría generar una respuesta inmunitaria que redujera el tiempo de infección en las hembras vacunadas antes de que sea un riesgo para el embrión/feto, disminuyendo las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad (BonDurant et al., 2005; Cobo et al., 2002). Este efecto se traduce en un menor número de servicios (1,44 vs 1,73 en no vacunados;  $P < 0,16$ ), mayor porcentaje de animales gestantes al primer servicio (66,7% vs 33,3%;  $P < 0,05$ ) (Hudson et al., 1993) y de vacas paridas (62,5% vs el 31,5%;  $P < 0,001$ ), representando una reducción de pérdidas embrionarias/fetales del 56,4% (Kvaniska et al., 1992). En Norteamérica, la mayor parte de los países sudamericanos, Australia y Nueva Zelanda se comercializan productos vacunales. En Europa, no existe ninguna vacuna disponible para el control de la tricomonosis bovina, por lo que la elaboración de autovacunas con cepas de campo es una opción a tener en cuenta. Sin embargo, la eficacia de estas vacunas se desconoce. La inducción de una respuesta inmunitaria a nivel de mucosas en el tracto genital es de gran importancia para la protección frente a enfermedades de transmisión sexual. En este sentido, la utilización de nuevos adyuvantes y la vía de inoculación, podrían mejorar la eficacia de las vacunas frente a la tricomonosis.

Esta tesis doctoral supone en su conjunto un avance significativo en el conocimiento de la epidemiología, impacto económico y control de la tricomonosis bovina en nuestro país. Los resultados obtenidos señalan que la enfermedad está presente en los sistemas de cría de bovino de montaña, causando importantes pérdidas económicas y con una importante repercusión en la eficiencia reproductiva en las explotaciones afectadas. De esta forma, se ha detectado un problema grave y desatendido hasta el momento, poniéndose de manifiesto la necesidad de incluir esta enfermedad en el diagnóstico rutinario en explotaciones con monta natural y establecer planes para su control. Asimismo los resultados obtenidos podrían sugerir una re-emergencia de la tricomonosis bovina, no solo en España, si no en otras zonas de Europa donde el ganado bovino de carne se maneja en condiciones extensivas y están presentes factores de riesgo.

# **CAPÍTULO VI**

---

## **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



**OBJETIVO 1. Validación de los métodos de diagnóstico de la tricomonosis bovina en muestras de campo.**

**Primera.** Para el diagnóstico de la tricomonosis bovina en toros, se recomienda realizar la recogida de esmegma prepucial en el toro mediante un raspado de la mucosa prepucial del toro, utilizando preferentemente un raspador. Este presenta ciertas ventajas frente a la recogida de la muestra utilizando una pipeta de inseminación artificial: mayor rapidez y facilidad en la toma de muestras, obtención de una muestra más concentrada y con menor contaminación.

**Segunda.** Se ha demostrado la utilidad del medio comercial InPouch y la técnica de PCR para la detección de *T. foetus* en muestras de esmegma prepucial, especialmente cuando esta última se aplica directamente sobre la muestra de esmegma prepucial. Sin embargo, para el diagnóstico de rutina y con el fin de evitar falsos positivos o negativos, se recomienda la combinación del cultivo del parásito junto con la técnica de PCR.

**OBJETIVO 2. Estudio de la prevalencia y factores de riesgo de la infección por *T. foetus* en explotaciones de vacuno de carne en sistemas extensivos de montaña de las razas Asturiana de la Montaña y Asturiana de los Valles.**

**Primera.** Se ha observado que la tricomonosis bovina está presente en las explotaciones bovinas de las razas Asturiana de la Montaña y Asturiana de los Valles. La edad del toro fue el único factor de riesgo identificado en nuestro estudio, siendo la infección más frecuente en toros mayores de 3 años de edad.

**Segunda.** Los resultados obtenidos en la raza Asturiana de la Montaña muestran una alta prevalencia de infección por *T. foetus* en la población muestreada, siendo superior que la encontrada en Asturiana de los Valles. Estas diferencias podrían ser debidas a variaciones en las prácticas ganaderas utilizadas en los rebaños como el uso de inseminación artificial, edad de los toros, uso de pastos compartidos y toros compartidos.

**OBJETIVO 3. Estudio del impacto de la tricomonosis bovina sobre la eficacia reproductiva y eficacia de las medidas de control en los sistemas de vacuno de cría de la raza Asturiana de la Montaña.**

**Primera.** La tricomonosis bovina tuvo importantes repercusiones en la eficiencia reproductiva en las explotaciones de Asturiana de la Montaña. Los rebaños infectados presentaron un alargamiento del intervalo entre partos y disminución del número de terneros/año, traducándose en una reducción importante de los ingresos económicos.

**Segunda.** En relación con las medidas de control, el diagnóstico anual y sacrificio de los toros infectados mejora significativamente los índices reproductivos de las explotaciones de Asturiana de la Montaña, reduciendo por tanto, las pérdidas económicas causadas por la enfermedad. Sin embargo, esta medida no fue totalmente eficaz en el control de la infección al existir una prevalencia elevada y mantenerse los factores de riesgo de la enfermedad, como una alta proporción de toros mayores de 3 años, uso de pastos comunales y ausencia de pruebas diagnósticas obligatorias para esta enfermedad.

**OBJECTIVE 1. Validation of diagnostic methods for bovine trichomonosis in field samples.**

**First.** For bovine trichomonosis diagnosis, it is recommended to collect preputial smegma samples from the bull by scraping, preferably using a plastic brush. This scraper shows advantages over the use of an artificial insemination pipette being the procedure faster and easier and obtaining a more concentrated and less contaminated sample.

**Second.** The InPouch™ TF test and the PCR have proven very useful for detection of *T. foetus* in preputial smegma samples, particularly when PCR is performed directly on the smegma sample. However, for routine diagnosis, in order to avoid false positives or false negatives, the combination of parasite culture and PCR is recommended.

**OBJECTIVE 2. Prevalence and risk factors associated to infection with *T. foetus* in the Asturiana de la Montaña and Asturiana de los Valles beef cattle breeds managed under extensive mountain pastoral systems.**

**First.** Bovine trichomonosis is present in Asturiana de la Montaña and Asturiana de los Valles herds. Bull age was the only risk factor identified in the present study, being infection more frequent in bulls older than three years of age.

**Second.** The results obtained in the Asturiana de la Montaña breed show a high prevalence of infection with *T. foetus* in the sampled population, being higher than that found in the Asturiana de los Valles breed. These differences could be due to variations in the management practices such as the use of artificial insemination, the age of the bulls, the use of communal pastures and sharing bulls.

**OBJECTIVE 3. Impact of trichomonosis on the reproductive performance and efficacy of control measures on the Asturiana de la Montaña beef cattle breed.**

**First.** Bovine trichomonosis had a significant impact on the reproductive performance in Asturiana de la Montaña herds. Infected herds showed prolonged calving intervals and a calf crop decrease, leading to an important income reduction.

**Second.** In relation to the control measures, annual testing and culling of infected bulls improves significantly reproductive parameters in Asturiana de la Montaña herds, reducing thereby the economical losses caused by the disease. However this measure was not totally effective to control the disease due to the high prevalence and the maintenance of risk factors for the disease: high percentage of bulls over three years of age, use of communal pastures and lack of compulsory testing for this disease.

# **RESUMEN / SUMMARY**

---



La tricomonosis bovina es una enfermedad de transmisión sexual del ganado bovino que cursa con fallo reproductivo temprano y es frecuente en los sistemas de explotación extensivos donde se utiliza la monta natural. El agente etiológico es *Tritrichomonas foetus*, protozoo perteneciente a la familia Trichomonadidae. Su transmisión se produce principalmente por vía venérea, los toros se infectan durante la cubrición de vacas infectadas quedando como portadores asintomáticos y constituyendo la principal fuente de infección en los rebaños.

En Europa, gracias al uso de la inseminación artificial (IA), actualmente, la infección se considera prácticamente erradicada. Sin embargo, en los últimos años la Política Agraria Común (PAC) ha promovido la extensificación de la producción bovina en Europa. En España, se ha traducido en un cambio significativo en el sector vacuno, con una reducción importante y progresiva en el censo del vacuno de leche y un aumento de las vacas de carne. Dentro de dicho sector debemos destacar el vacuno de cría, cuyo censo e importancia ha ido aumentando, favorecido por las primas de la Unión Europea a las vacas nodrizas y a los sistemas extensivos ligados al uso del territorio. En estos sistemas se ha vuelto al uso de métodos tradicionales, como los pastos comunales y el uso de la monta natural. Todo ello, unido a la libre circulación de animales de estado sanitario incierto, podría favorecer la re-emergencia de la tricomonosis bovina. El objetivo general de esta tesis doctoral fue el estudio de la epidemiología, impacto económico y control de la tricomonosis bovina en dos razas representativas del sistema de vacuno cría en España en las zonas de montaña: las razas Asturiana de los Valles (AV) y Asturiana de la Montaña (AM).

Para llevar a cabo este estudio, se abordó en primer lugar una validación de la metodología para la detección de *T. foetus*. Es fundamental que la toma de muestras y la detección del agente en el laboratorio se realicen siguiendo procedimientos normalizados y validados. Las técnicas del cultivo del parásito y PCR presentan en general una adecuada sensibilidad pero en condiciones de campo el diagnóstico se dificulta. Por estos motivos, en el primer objetivo de esta tesis doctoral, se compararon diferentes métodos de recogida del esmegma prepucial (pipeta de IA y raspador), dos medios de cultivo para *T. foetus* (InPouch y TFTM-Diamond), comparándose a su vez con la técnica de PCR.

También se probaron dos métodos de extracción del ADN y la forma de conservar la integridad del ADN de la muestra recién recogida hasta su llegada al laboratorio.

Según los resultados obtenidos, se recomienda realizar un raspado de la mucosa prepucial del toro, utilizando preferentemente un raspador ya que presenta ciertas ventajas frente a la pipeta de IA, como una mayor rapidez, obtención de una muestra más concentrada y con menor contaminación. Asimismo, se ha demostrado la utilidad del medio comercial InPouch y la técnica de PCR, especialmente cuando esta última se aplica directamente sobre la muestra de esmegma prepucial. Sin embargo, para el diagnóstico de rutina y con el fin de evitar falsos positivos o negativos, se recomienda la combinación del cultivo del parásito junto con la técnica de PCR.

En el segundo objetivo se estudió la prevalencia y factores de riesgo de la infección por *T. foetus* en rebaños seleccionados al azar de las razas AM y AV. Los resultados obtenidos en la raza AM mostraron una alta prevalencia de la infección en la población muestreada, observándose una prevalencia individual del 32% y una prevalencia de rebaño del 41,5%. En relación a los factores de riesgo asociados a la enfermedad, la edad del toro fue el único factor de riesgo identificado en nuestro estudio, siendo la infección más frecuente en toros mayores de 3 años de edad. En lo que se refiere a la raza AV, el muestreo se realizó en dos tipos de sistemas: toros de explotaciones permanentes en zonas de valle o sistema estante y toros de explotaciones con sistema de transtermitancia valle-puerto, que al igual que en la raza AM usan pastos comunales. La prevalencia de la infección en la raza AV (prevalencia individual 4% y prevalencia de rebaño 5,2%) fue significativamente menor que la observada en AM, a pesar del hecho de que ambas razas comparten el mismo nicho ecológico. Estas diferencias pudieron ser debidas a variaciones en las prácticas ganaderas utilizadas en los rebaños de AV, como el uso de IA, toros más jóvenes y uso de pastos compartidos con menor número de rebaños. Por otra parte, AM es una raza actualmente bajo un programa de conservación, en la cual el uso de toros comunales es más frecuente que en AV. Esta práctica podría favorecer la diseminación de la enfermedad en el caso de usar toros infectados.

En el tercer objetivo de esta tesis se analizó el impacto de la tricomonosis sobre la eficiencia reproductiva y la eficacia de las medidas de control en los rebaños de la raza AM. Los rebaños infectados presentaron un alargamiento del intervalo entre partos (79

días), y una disminución del número de terneros/año (17%), que supondrían un 68,8% menos de ingresos anuales. Como consecuencia de las pérdidas económicas estimadas, se puso en marcha un plan de control de la enfermedad basado en el diagnóstico y sacrificio de los toros infectados. Como resultado, se observó un acortamiento medio del intervalo entre partos de 59 días después del primer año post-sacrificio y de 98 días en el segundo año, obteniéndose valores similares a los observados en los rebaños no infectados (media de 450 días de intervalo entre partos). Asimismo, el porcentaje de terneros nacidos por año se incrementó un 17,7% siendo similar al observado en los rebaños del grupo no infectado. Por tanto, el diagnóstico anual y sacrificio de los toros infectados fue una medida eficaz, que mejoró significativamente los índices reproductivos, reduciendo por tanto las pérdidas económicas. La eficacia de las medidas de control se evaluó también comparando la prevalencia antes y después del sacrificio de los sementales infectados, observándose una disminución significativa de la prevalencia de rebaño del 41,5% al 17%-19%. Sin embargo, en el segundo año la prevalencia no disminuyó y la incidencia fue del 22,72%. Este hecho podría atribuirse principalmente a la presencia y persistencia de factores de riesgo asociados a la enfermedad, como la existencia de una alta proporción de toros mayores de 3 años (más del 50%) y otros factores de riesgo presentes en el manejo tradicional de la raza (monta natural, pastos comunales y toros compartidos), en combinación con la falta de pruebas diagnósticas periódicas obligatorias para la tricomonosis. En este sentido, la vacunación podría ser una medida de control beneficiosa en rebaños expuestos a factores de riesgo.

Esta tesis doctoral supone en su conjunto un avance significativo en el conocimiento de la epidemiología, impacto económico y control de la tricomonosis bovina en España. Los resultados obtenidos señalan que la enfermedad está presente en los sistemas extensivos de montaña, causando importantes pérdidas económicas, y teniendo una importante repercusión en la eficiencia reproductiva en las explotaciones afectadas. Se pone en evidencia, por tanto, un problema grave y desatendido hasta el momento y se sugiere la necesidad de incluir esta enfermedad en el diagnóstico rutinario en explotaciones con monta natural y establecer planes para su control. Asimismo los resultados obtenidos alertan sobre la re-emergencia de la tricomonosis bovina, en España y sugieren la posibilidad de que este hecho este aconteciendo en otras zonas de Europa donde el ganado bovino de carne se maneja en condiciones extensivas y están presentes factores de riesgo.

Bovine trichomonosis is a sexually transmitted disease in cattle causing early reproductive failure. The disease is common in areas where beef cattle are managed under extensive conditions and natural breeding is used. *Tritrichomonas foetus* is the aetiologic agent, belonging to the family Trichomonadidae. BT is a venereal disease and bulls become infected when natural mating is used remaining as asymptomatic carriers, and being the main source of infection in herds.

In Europe, the use of Artificial Insemination (AI) has greatly reduced the occurrence of the disease. However, in the last few years the Common Agricultural Policy (CAP) has encouraged the extensification of bovine production in Europe. In Spain, this has led to significant changes in cattle production systems with a significant and progressive reduction in dairy cattle census and increased beef cows. Within this sector, we must emphasize rearing calves, its census has increased due to the direct payments and subsidies of the European Union to suckler cattle and the systems linked to land use. In these systems they have returned to the use of traditional methods such as grazing on public land, use of communal bulls and natural breeding. Additionally, there is free movement of animals of unknown health status. These practices could lead to the re-emergence of BT. The general objective of this doctoral thesis was the study of epidemiology, economic impact and control of BT in two representative beef breeds in extensive mountain system in Spain: Asturiana de los Valles (AV) and Asturiana de la Montaña (AM).

For this purpose, a validation of the methodology for the detection of *T. foetus* was performed in the first place. It is paramount that sample collection and detection of the agent in the laboratory follow normalized and validated procedures. Culture and PCR techniques present an overall adequate sensitivity and specificity but under field conditions, diagnosis is difficult. Therefore in the first objective of this doctoral thesis, different methods of collecting preputial smegma (AI pipette vs plastic scraper), two *T. foetus* culture media (In Pouch vs TFTM-Diamond) and PCR were compared. For the latter, two DNA extraction protocols and how to preserve the integrity of DNA in the freshly collected sample until arrival at the laboratory were tested.

According to the results obtained, scraping the preputial mucosa with a plastic scraper is recommended since it shows certain advantages over the AI pipette being the procedure

faster and easier and obtaining a more concentrated and less contaminated sample: it is faster, obtaining a more concentrated and less contaminated sample. In addition, the InPouch™ TF test and the PCR have proven very useful for detection of *T. foetus* in preputial smegma samples, particularly when PCR is performed directly on the smegma sample. However, for routine diagnosis, in order to avoid false positives or false negatives, the combination of parasite culture and PCR is recommended.

In the second objective the prevalence and risk factor associated with BT in bulls from randomly selected herds of AM and AV breeds was investigated. The results obtained in the AM breed showed a high prevalence of *T. foetus* infection in the sampled population, having found an individual bull prevalence of 32 % and a herd prevalence of 41.5 %. In relation to the risk factors associated with the disease, bull age was the only risk factor identified in the present study, being infection more frequent in bulls older than three years of age. Regarding the AV breed, sampling was performed on two different types of systems: AV herds grazing in pastures of lowlands throughout the whole year and herds using the traditional mountain system, grazing in communal pastures like the AM breed. *T. foetus* prevalence in AV breed (individual prevalence 4% and herd prevalence 5.2%) was significantly lower than that found in the AM breed, in spite of sharing ecological niches. These differences could be due to variations on the management practices of the cattle in the AV herds, such as: the practice of AI, younger bulls, and use of shared pastures with fewer herds. Furthermore, AM is a breed currently under a conservation program. This fact has promoted the use of communal bulls. Therefore, infected bulls could increase the risk of disease spread.

In the third objective the effect of BT on reproductive performance and the effectiveness of control measures in AM herds was evaluated. In infected herds, calving intervals were significantly prolonged (79 days) and a reduction in the number of calves/year (17%) was observed which would mean a 68.8% decrease in annual revenue. In light of the economic consequences of the infection, a control program based on detection and culling of the infected bulls was conducted. As a result, the calving interval decreased by about 59 and 98 days after the first and second year post-culling respectively, and no statistically significant differences were observed when compared to those in uninfected herds (average 450 days of calving intervals). Moreover, after the implementation of a control program, a 17.7% increase in calves born per year was

recorded and cows became pregnant in a similar proportion to non-infected herds. Therefore, testing and culling infected bulls was an effective measure to improve reproductive efficiency and to reduce economical losses. Additionally, control measures were evaluated by comparing the prevalence of *T. foetus* infection before and after culling infected bulls, showing a significant reduction of herd prevalence from 41.5% to 17%-19%. However, in the second year the prevalence did not decrease and the incidence was 22.72%, which could be attributed mainly to the presence and persistence of putative risk factors associated to BT such as the existence of a high proportion of bulls older than 3 years old (over 50%) and other potential risk factors present in the traditional management of this breed (natural mating, communal grazing on public lands and shared bulls) combined with the lack of regular monitoring programs mandatory for trichomonosis. Therefore, vaccination could be a feasible control measure in herds exposed to risk factors.

This doctoral thesis is a significant advance in the understanding of the epidemiology, economic impact and control of BT in Spain. The results reported here indicate that BT is present in extensive mountain systems, causing significant economic losses, and having a major impact on reproductive efficiency in affected herds. It demonstrates therefore a serious and neglected problem and suggests the need to include this disease in routine diagnosis in natural breeding farms and to establish plans for its control. Furthermore, the results obtained confirm the re-emergence of bovine trichomonosis in Spain and suggest the possibility that this could also take place in other parts of Europe where beef cattle are managed in extensive conditions and risk factors are present.

# BIBLIOGRAFÍA

---



Agnew, D.W., Munson, L., Cobo, E.R., Olesen, D., Corbeil, L.B., BonDurant, R.H., 2008. Comparative histopathology and antibody responses of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad and *Tritrichomonas foetus* genital infections in virgin heifers. *Veterinary parasitology* 151, 170-180.

Alderete, J.F., Benchimol, M., Lehker, M.W., Crouch, M.L., 2002. The complex fibronectin-*Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis. *Parasitology international* 51, 285-292.

Alstad, A. D., Krogh, D., Fischer, K., Gustason, S., & Cassel, G., 1984. Trichomoniasis in a beef herd [*Trichomonas foetus*, cattle]. VM SAC. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, 79.

Anderson, M.L., Barr, B.C., Conrad, P.A., 1994. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 10, 439-461.

Anderson, M.L., BonDurant, R.H., Corbeil, R.R., Corbeil, L.B., 1996. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. *The Journal of parasitology* 82, 594-600.

Babal, P., Russell, L.C., 1999. Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. *The Journal of parasitology* 85, 33-40.

Ball, L., Dargatz, D.A., Cheney, J.M., Mortimer, R.G., 1987. Control of venereal disease in infected herds. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 3, 561-574.

Bastida-Corcuera, F., Butler, J.E., Heyermann, H., Thomford, J.W., Corbeil, L.B., 2000. *Tritrichomonas foetus* extracellular cysteine proteinase cleavage of bovine IgG2 allotypes. *The Journal of parasitology* 86, 328-332.

Benchimol, M., 2005. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology research* 97, 408-416.

Benchimol, M., 2004. Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 10, 528-550.

Benchimol, M., da Silva Fontes, R., Burla Dias, A.J., 2007. *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Veterinary research* 38, 399-408.

Bielanski, A., Ghazi, D.F., Phipps-Toodd, B., 2004. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos in vitro in the presence of *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology* 61, 821-829.

BonDurant, R.H., 1997. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 13, 345-362.

BonDurant, R.H., 2007. Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology* 68, 461-473.

BonDurant, R.H., 2005. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 21, 383-408.

BonDurant, R.H., Anderson, M.L., Blanchard, P., Hird, D., Danaye-Elmi, C., Palmer, C., Sischo, W.M., Suther, D., Utterback, W., Weigler, B.J., 1990. Prevalence of trichomoniasis among California beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 196, 1590-1593.

BonDurant, R.H., Campero, C.M., Anderson, M.L., Van Hoosear, K.A., 2003. Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in cultured isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 15, 579-584.

BonDurant, R.H., Corbeil, R.R., Corbeil, L.B., 1993. Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infection and Immunity* 61, 1385-1394.

BonDurant, R.H., van Hoosear, K.A., Corbeil, L.B., Bernoco, D., 1996. Serological response to in vitro-shed antigen(s) of *Tritrichomonas foetus* in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 3, 432-437.

Borchardt, K.A., Norman, B.B., Thomas, M.W., Harmon, W.M., 1992. Evaluation of a new culture method for diagnosing *Tritrichomonas foetus* infection. *Veterinary Medicine* 87, 104-112.

Bryan, L.A., Campbell, J.R., Gajadhar, A.A., 1999. Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch TF media. The Veterinary record 144, 227-232.

Burgess, D.E., McDonald, C.M., 1992. Analysis of adhesion and cytotoxicity of *Tritrichomonas foetus* to mammalian cells by use of monoclonal antibodies. Infection and immunity 60, 4253-4259.

Campero, C.M., Ballabene, N.C., Cipolla, A.C., Zamora, A.S., 1987. Dual infection of bulls with campylobacteriosis and trichomoniasis: treatment with dimetridazole chlorhydrate. Australian Veterinary Journal 64, 320-321.

Campero, C.M., Hirst, R.G., Ladds, P.W., Vaughan, J.A., Emery, D.L., Watson, D.L., 1990. Measurement of antibody in serum and genital fluids of bulls by ELISA after vaccination and challenge with *Tritrichomonas foetus*. Australian Veterinary Journal 67, 175-178.

Campero, C.M., Palladino, M.R., 1983. Presencia de cepas de *Tritrichomonas foetus* quimioresistentes en Argentina. 45, 899-909.

Campero, C.M., Rodriguez Dubra, C., Bolondi, A., Cacciato, C., Cobo, E., Perez, S., Odeon, A., Cipolla, A., BonDurant, R.H., 2003. Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. Veterinary parasitology 112, 167-175.

Campero, C. M., & Gottstein, B., 2007. Trichomonosis. Protozoal abortion in farm ruminants. guidelines for diagnosis and control. edited by, L.M.; Ortega-Mora, Bruno; Gottstein, F.; Conraths, D.; Buxton, CABI Publishing. UK. part 5, p. 290-301

Chen, X.G., Li, J., 2001. Increasing the sensitivity of PCR detection in bovine preputial smegma spiked with *Tritrichomonas foetus* by the addition of agar and resin. Parasitology research 87, 556-558.

Christensen, H.R., Clark, B.L., Parsonson, I.M., 1977. Incidence of *Tritrichomonas foetus* in young replacement bulls following introduction into an infected herd. Australian Veterinary Journal 53, 132-134.

Christensen, H.R., Clark, B.L., 1979. Spread of *Tritrichomonas foetus* in beef bulls in an infected herd. Australian Veterinary Journal 55, 205

Clark, B.L., Dufty, J.H., 1978. Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. Australian Veterinary Journal 54, 262-263.

Clark, B.L., Dufty, J.H., Parsonson, I.M., 1983a. The effect of *Tritrichomonas foetus* infection on calving rates in beef cattle. Australian Veterinary Journal 60, 71-74.

Clark, B.L., Dufty, J.H., Parsonson, I.M., 1983b. Immunisation of bulls against trichomoniasis. Australian Veterinary Journal 60, 178-179.

Clark, B.L., Emery, D.L., Dufty, J.H., 1984. Therapeutic immunisation of bulls with the membranes and glycoproteins of *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. Australian Veterinary Journal 61, 65-66.

Clark, B.L., Parsonson, I.M., Dufty, J.H., 1974a. Experimental infection of bulls with *Tritrichomonas foetus*. Australian Veterinary Journal 50, 189-191.

Clark, B.L., Parsonson, I.M., White, M.B., Banfield, J.C., Young, J.S., 1974b. Control of trichomoniasis in a large herd of beef cattle. Australian Veterinary Journal 50, 424-426.

Clark, B.L., White, M.B., Banfield, J.C., 1971. Diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls. Australian Veterinary Journal 47, 181-183.

Cobo, E.R., Campero, C.M., Gimeno, E.J., Barbeito, C.G., 2004. Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in the genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. Journal of comparative pathology 131, 127-134.

Cobo, E.R., Campero, C.M., Mariante, R.M., Benchimol, M., 2003. Ultrastructural study of a tetratrachomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. Veterinary parasitology 117, 195-211.

Cobo, E.R., Cano, D., Campero, C.M., 2001. Experimental infection with *Tritrichomonas suis* in heifers. Veterinary parasitology 99, 73-78.

Cobo, E.R., Cano, D., Rossetti, O., Campero, C.M., 2002. Heifers immunized with whole-cell and membrane vaccines against *Tritrichomonas foetus* and naturally challenged with an infected bull. Veterinary parasitology 109, 169-184.

Cobo, E.R., Canton, G., Morrell, E., Cano, D., Campero, C.M., 2004. Failure to establish infection with *Tetratrichomonas sp.* in the reproductive tracts of heifers and bulls. *Veterinary parasitology* 120, 145-150.

Cobo, E.R., Cipolla, A., Morsella, C., Cano, D., Campero, C., 2003. Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 50, 75-80.

Cobo, E.R., Corbeil, L.B., Agnew, D.W., VanHoosear, K., Friend, A., Olesen, D.R., BonDurant, R.H., 2007. *Tetratrichomonas spp.* and *Pentatrichomonas hominis* are not persistently detectable after intravaginal inoculation of estrous heifers. *Veterinary parasitology* 150, 18-26.

Cobo, E.R., Corbeil, L.B., BonDurant, R.H., 2011. Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of reproductive immunology* 89, 55-61.

Cobo, E.R., Corbeil, L.B., Gershwin, L.J., BonDurant, R.H., 2010. Preputial cellular and antibody responses of bulls vaccinated and/or challenged with *Tritrichomonas foetus*. *Vaccine* 28, 361-370.

Cobo, E.R., Favetto, P.H., Lane, V.M., Friend, A., VanHooser, K., Mitchell, J., BonDurant, R.H., 2007. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology* 68, 853-860.

Cobo, E.R., Morsella, C., Cano, D., Cipolla, A., Campero, C.M., 2004. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology* 62, 1367-1382.

Corbeil, L.B., Hodgson, J.L., Jones, D.W., Corbeil, R.R., Widders, P.R., Stephens, L.R., 1989. Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infection and immunity* 57, 2158-2165.

Corbeil, L.B., BonDurant, R.H., 2001. Immunity to bovine reproductive infections. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 17, 567-583.

Corbeil, L.B., Campero, C.M., Rhyan, J.C., Anderson, M.L., Gershwin, L.J., Agnew, D.W., Munson, L., BonDurant, R.H., 2005. Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary pathology* 42, 282-290.

da Silva, N.S., Dias Filho, B.P., de Souza, W., 1999. Identification and localization of an adhesin on the surface of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology research* 85, 984-992.

Dekeyser, P.J., 1986. Bovine genital campylobacteriosis. In: Murrow, D.A. (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia ; London : Saunders, 1980, pp. 263-266.

Dennett, D.P., Reece, R.L., Barasa, J.O., Johnson, R.H., 1974. Observations on the incidence and distribution of serotypes of *Tritrichomonas foetus* in beef cattle in north-eastern Australia. *Australian Veterinary Journal* 50, 427-431.

Dufty, J.H., Clark, B.L., Monsborough, M.J., 1975. The influence of age on the susceptibility of bulls to *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*. *Australian Veterinary Journal* 51, 294-297.

Eaglesome, M.D., Garcia, M.M., 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 16, 215-225.

Eaglesome, M.D., Garcia, M.M., 1992. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Bulletin* 62, 743-775.

Erasmus, J.A., De Wet, J.A., Van der Merwe, H.E., Pienaar, G.C., 1989. Bovine trichomoniasis in the north western Cape Province, western Transvaal and the Orange Free State. *Journal of the South African Veterinary Association* 60, 51-52.

Felleisen, R.S., Schmid-Lambelet, N., Walubengo, J., 1997. Comparative evaluation of methods for the diagnosis of bovine *Tritrichomonas foetus* infection. 7, 90-101.

Felleisen, R.S., 1999. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1, 807-816.

Felleisen, R.S., 1998. Comparative genetic analysis of tritrichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique. *Parasitology research* 84, 153-156.

Felleisen, R.S., 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* 115 ( Pt 2), 111-119.

Felleisen, R.S., Lambelet, N., Bachmann, P., Nicolet, J., Muller, N., Gottstein, B., 1998. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *Journal of clinical microbiology* 36, 513-519.

Flower, P.J., Ladds, P.W., Thomas, A.D., Watson, D.L., 1983. An immunopathologic study of the bovine prepuce. *Veterinary pathology* 20, 189-202.

Foote, R.H., 1996. Review: dairy cattle reproductive physiology research and management--past progress and future prospects. *Journal of dairy science* 79, 980-990.

Frey, C.F., Muller, N., 2012. *Tritrichomonas*--systematics of an enigmatic genus. *Molecular and cellular probes* 26, 132-136.

Garcia-Dory, M.A., 1980. La utilización de las razas autóctonas en los ecosistemas regionales como factor de ahorro energético en la ganadería española. *Agricultura y Sociedad* 15, 115-161.

Gault, R.A., Kvasnicka, W.G., Hanks, D., Hanks, M., Hall, M.R., 1995. Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research* 56, 454-459.

Gault, R.A., Kvasnicka, W.G., Hanks, D., Hanks, M., Hall, M.R., 1995. Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research* 56, 454-459.

Gault, R.A., Hall, M.R., Kvasnicka, W.G., Hanks, D.R., 1999. Characterization of antigenic proteins from *Tritrichomonas foetus* recognized by

antibodies in rabbit serum, bovine serum and bovine cervicovaginal mucus. *The Journal of parasitology* 85, 244-251.

Gay, J.M., Ebel, E.D., Kearley, W.P., 1996. Commingled grazing as a risk factor for trichomonosis in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209, 643-646.

Givens, M.D., 2006. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology* 66, 648-654.

Goodger, W.J., Skirrow, S.Z., 1986. Epidemiologic and economic analyses of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189, 772-776.

Gookin, J.L., Levy, M.G., Law, J.M., Papich, M.G., Poore, M.F., Breitschwerdt, E.B., 2001. Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research* 62, 1690-1697.

Gregory, M.W., Ellis, B., Redwood, D.W., 1990. Comparison of sampling methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *The Veterinary record* 127, 16.

Guillomot, M., 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 49, 39.

Hall, M.R., Huang, J.C., Ota, R., Redelman, D., Hanks, D., Taylor, R.E., 1986. Characterization of *Tritrichomonas foetus* antigens, using bovine antiserum. *American Journal of Veterinary Research* 47, 2549-2553.

Harwood, L.J., Thomann, A., Brodard, I., Makaya, P.V., Perreten, V., 2009. *Campylobacter fetus* subspecies venerealis transport medium for enrichment and PCR. *The Veterinary record* 165, 507-508.

Herr, S., Ribeiro, L.M., Claassen, E., Myburgh, J.G., 1991. A reduction in the duration of infection with *Tritrichomonas foetus* following vaccination in heifers and the failure to demonstrate a curative effect in infected bulls. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 58, 41-45

Ho, M.S., Conrad, P.A., Conrad, P.J., LeFebvre, R.B., Perez, E., BonDurant, R.H., 1994. Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *Journal of clinical microbiology* 32, 98-104.

- Hodgson, J.L., Jones, D.W., Widders, P.R., Corbeil, L.B., 1990. Characterization of *Tritrichomonas foetus* antigens by use of monoclonal antibodies. *Infection and immunity* 58, 3078-3083.
- Hoff-Olsen, P., Mevag, B., Staalstrom, E., Hovde, B., Egeland, T., Olaisen, B., 1999. Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic science international* 105, 171-183.
- Huang, J.C., Hanks, D., Kvasnicka, W., Hanks, M., Hall, M.R., 1989. Antigenic relationship among field isolates of *Tritrichomonas foetus* from cattle. *American Journal of Veterinary Research* 50, 1064-1068.
- Huby-Chilton, F., Scandrett, B.W., Chilton, N.B., Gajadhar, A.A., 2009. Detection and identification of *Tetratrichomonas* in a preputial wash from a bull by PCR and SSCP. *Veterinary parasitology* 166, 199-204.
- Hudson, D.B., Ball, L., Cheney, J.M., Mortimer, R.G., Bowen, R.A., Marsh, D.J., Peetz, R.H., 1993. Development and testing of a bovine trichomoniasis vaccine. *Theriogenology* 39, 929-935.
- Hurtado Pizarro, M., 2005. Diagnóstico de la campilobacteriosis genital bovina. *Bovis* , 37-51.
- Ikeda, J.S., BonDurant, R.H., Campero, C.M., Corbeil, L.B., 1993. Conservation of a protective surface antigen of *Tritrichomonas foetus*. *Journal of clinical microbiology* 31, 3289-3295.
- Ikeda, J.S., BonDurant, R.H., Corbeil, L.B., 1995. Bovine vaginal antibody responses to immunoaffinity-purified surface antigen of *Tritrichomonas foetus*. *Journal of clinical microbiology* 33, 1158-1163.
- Irons, P.C., Henton, M.M., Bertschinger, H.J., 2002. Collection of preputial material by scraping and aspiration for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls. *Journal of the South African Veterinary Association* 73, 66-69.
- Jesus, J.B., Lopes, A.H., Meyer-Fernandes, J.R., 2002. Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary parasitology* 103, 29-42.
- Kania, S.A., Reed, S.L., Thomford, J.W., BonDurant, R.H., Hirata, K., Corbeil, R.R., North, M.J., Corbeil, L.B., 2001. Degradation of bovine complement

C3 by trichomonad extracellular proteinase. *Veterinary immunology and immunopathology* 78, 83-96.

Kimsey, P.B., Darien, B.J., Kendrick, J.W., Franti, C.E., 1980. Bovine trichomoniasis: diagnosis and treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 177, 616-619.

Kittel, D.R., Campero, C., Van Hoosear, K.A., Rhyan, J.C., BonDurant, R.H., 1998. Comparison of diagnostic methods for detection of active infection with *Tritrichomonas foetus* in beef heifers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213, 519-522.

Kleydman, Y., Yarlett, N., Gorrell, T.E., 2004. Production of ammonia by *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology (Reading, England)* 150, 1139-1145.

Kvasnicka, W.G., Hanks, D., Huang, J.C., Hall, M.R., Sandblom, D., Chu, H.J., Chavez, L., Acree, W.M., 1992. Clinical evaluation of the efficacy of inoculating cattle with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research* 53, 2023-2027.

Kreier, J. P., & Baker, J. R. 1987. *Parasitic Protozoa* Allen & Unwin. *Boston, MA*.

Lun, Z., Parker, S., Gajadhar, A.A., 2000. Comparison of growth rates of *Tritrichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *Veterinary parasitology* 89, 199-208.

Lun, Z.R., Chen, X.G., Zhu, X.Q., Li, X.R., Xie, M.Q., 2005. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends in parasitology* 21, 122-125.

Mallinson, D.J., Livingstone, J., Appleton, K.M., Lees, S.J., Coombs, G.H., North, M.J., 1995. Multiple cysteine proteinases of the pathogenic protozoon *Tritrichomonas foetus*: identification of seven diverse and differentially expressed genes. *Microbiology (Reading, England)* 141 ( Pt 12), 3077-3085.

Mancebo, O.A., Russo, A.M., Carabajal, L.L., Monzon, C.M., 1995. Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. *Veterinary parasitology* 59, 7-11.

Manrique, E., Revilla, A., Olaizola, A., 1992. Los sistemas de producción de vacuno en montaña y su dependencia del entorno. *Bovis* 46, 9-42.

Mardones, F.O., Perez, A.M., Martinez, A., Carpenter, T.E., 2008. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary parasitology* 153, 231-237.

Martin-Gomez, S., Gonzalez-Paniello, R., Pereira-Bueno, J., Ortega-Mora, L.M., 1998. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef bulls in northwestern Spain. *Veterinary parasitology* 75, 265-268.

McCool, C.J., Townsend, M.P., Wolfe, S.G., Simpson, M.A., Olm, T.C., Jayawardhana, G.A., Carney, J.V., 1988. Prevalence of bovine venereal disease in the Victoria River District of the Northern Territory: likely economic effects and practicable control measures. 65, 153.

Monke, H.J., Love, B.C., Wittum, T.E., Monke, D.R., Byrum, B.A., 2002. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 14, 35-39.

Mukhufhi, N., Irons, P.C., Michel, A., Peta, F., 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogenology* 60, 1269-1278.

Mutto, A.A., Giambiaggi, S., Angel, S.O., 2006. PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. *Veterinary parasitology* 136, 357-361.

Nickel, D.D., Olson, M.E., Schultz, G.A., 2002. An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 43, 213-216.

Ortega-Mora, L.M., Matín-Gomez, S., Pereira-Bueno, J., 1998a. Diagnóstico de la tricomonosis bovina. *Bovis* , 41-49.

Ortega-Mora, L.M., Matín-González, S., Pereira-Bueno, J., 1998b. Epidemiología de la tricomonosis bovina. *Bovis* , 21-27.

Ortega-Mora, L.M., Gottstein, B., Conraths, F., & Buxton, D. (Eds.). 2007. Protozoal Abortifacients in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. CABI.

Ortega Mora, L.M., García Peña, F.J., 2008. Fallo reproductivo temprano por tricomonosis y campylobacteriosis en vacuno extensivo. In: Congreso Anembe, 2008, Salamanca.

Ortuño Perez, S.F., Fernandez-Cabada labat, J.L., 1995. Perspectivas economicas de las producciones ganaderas extensivas en las areas desfavorecidas ante la liberalizacion de los mercados. Oct-Dic, 165-191.

Osoro, K., Fernandez-Prieto, E., Celaya, R., Noval, G., Alonso, L., Castro, P. 1999. Respuesta productiva de dos razas de ganado vacuno manejadas en dos cubiertas vegetales de montaña. ITEA. 95, 188-203.

Parker, S., McIntosh, K., 2000. *Tritrichomonas foetus*: Diagnosis by microscopic examination and culture. , 1-14.

Parker, S., Campbell, J., Gajadhar, A., 2003a. Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Tritrichomonas foetus* in bulls. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 15, 460-465.

Parker, S., Campbell, J., Ribble, C., Gajadhar, A., 2003b. Sample collection factors affect the sensitivity of the diagnostic test for *Tritrichomonas foetus* in bulls. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 67, 138-141.

Parker, S., Campbell, J., Ribble, C., Gajadhar, A., 1999. Comparison of two sampling tools for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls and clinical interpretation of culture results. Journal of the American Veterinary Medical Association 215, 231-235.

Parker, S., Lun, Z.R., Gajadhar, A., 2001. Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Tritrichomonas foetus* in cultured preputial samples. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication

of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 13, 508-513.

Parsonson, I.M., Clark, B.L., Dufty, J., 1974. The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection in the bull. Australian Veterinary Journal 50, 421-423.

Parsonson, I.M., Clark, B.L., Dufty, J.H., 1976. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. Journal of comparative pathology 86, 59-66.

Pereira-Neves, A., Benchimol, M., 2009. *Tritrichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. Protist 160, 536-551.

Perez, E., Cobo, E., Martinez, A., Campero, C.M., 1992. Prevalence and risk factors for *Trichomonas foetus* infection in cattle in northeastern Costa Rica. 14, 155-155-165.

Perez, A., Cobo, E., Martinez, A., Campero, C., Spath, E., 2006. Bayesian estimation of *Tritrichomonas foetus* diagnostic test sensitivity and specificity in range beef bulls. Veterinary parasitology 142, 159-162.

Peter, D.A., Fales, W.H., Miller, R.B., Youngquist, R.S., Randle, R.F., Ganjam, I.K., Lybyer, J.L., 1995. *Tritrichomonas foetus* infection in a herd of Missouri cattle. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 7, 278-280.

Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G., 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clinical microbiology reviews 11, 300-317.

Rae, D.O., 1989. Impact of trichomoniasis on the cow-calf producer's profitability. Journal of the American Veterinary Medical Association 194, 771-775.

Rae, D.O., Chenoweth, P.J., Genho, P.C., McIntosh, A.D., Crosby, C.E., Moore, S.A., 1999. Prevalence of *Tritrichomonas fetus* in a bull population and effect on production in a large cow-calf enterprise. Journal of the American Veterinary Medical Association 214, 1051-1055.

Rae, D.O., Crews, J.E., 2006. *Tritrichomonas foetus*. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 22, 595-611.

Rae, D.O., Crews, J.E., Greiner, E.C., Donovan, G.A., 2004. Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology* 61, 605-618.

Reece, R.L., Dennett, D.P., Johnson, R.H., 1983. Some observations on cultural and transport conditions for *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. *Australian Veterinary Journal* 60, 62-63.

Rhyan, J.C., Blanchard, P.C., Kvasnicka, W.G., Hall, M.R., Hanks, D., 1995. Tissue-invasive *Tritrichomonas foetus* in four aborted bovine fetuses. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 7, 409-412.

Rhyan, J.C., Stackhouse, L.L., Quinn, W.J., 1988. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary pathology* 25, 350-355.

Rhyan, J.C., Wilson, K.L., Wagner, B., Anderson, M.L., BonDurant, R.H., Burgess, D.E., Mutwiri, G.K., Corbeil, L.B., 1999. Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Veterinary pathology* 36, 406-411.

Ribeiro, C.M., Falleiros, M.B., Bicudo, S.D., Junior, J.P., Golim, M.A., Filho, F.C., Padovani, C.R., Modolo, J.R., 2010. *Tritrichomonas fetus* extracellular products decrease progressive motility of bull sperm. *Theriogenology* 73, 64-70.

Ribeiro, K.C., Mariante, R.M., Coutinho, L.L., Benchimol, M., 2002. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 94, 289-301.

Ribeiro, L.M., 1990. An efficient medium for the isolation of *Trichomonas foetus*. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 57, 209-210.

Riley, D.E., Wagner, B., Polley, L., Krieger, J.N., 1995. PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. *Journal of clinical microbiology* 33, 1308-1313.

Rodning, S.P., Wolfe, D.F., Carson, R.L., Wright, J.C., Stockdale, H.D., Pacoli, M.E., Busby, H.C., Rowe, S.E., 2008. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. *Theriogenology* 69, 212-217.

Sager, H., Ferre, I., Henning, K., Ortega-Mora, L.M. (Eds.), 2007. Tritrichomonosis in: Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. CAB International, Oxfordshire, UK.

Sanchez, A., 2002. Razas Ganaderas Españolas I. Bovinas. FEAGAS, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación., Madrid.

Schonmann, M.J., BonDurant, R.H., Gardner, I.A., Van Hoosear, K., Baltzer, W., Kachulis, C., 1994. Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. The Veterinary record 134, 620-622.

Schulze, F., Bagon, A., Muller, W., Hotzel, H., 2006. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. Journal of clinical microbiology 44, 2019-2024.

Serrano, E., Lavín, P., Mantecón, A.R., 2002. Caracterización De Los Sistemas De Producción De Ganado Vacuno De Carne De La Montaña De León. S. A. Valles del Esla.

Shaia, C.I., Voyich, J., Gillis, S.J., Singh, B.N., Burgess, D.E., 1998. Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. Infection and immunity 66, 1100-1105.

Sierra, V., Guerrero, L., Fernandez-Suarez, V., Martinez, A., Castro, P., Osoro, K., Rodriguez-Colunga, M.J., Coto-Montes, A., Oliván, M., 2010. Eating quality of beef from biotypes included in the PGI "Ternera Asturiana" showing distinct physicochemical characteristics and tenderization pattern. Meat Science 86, 343-351.

Singh, B.N., BonDurant, R.H., Campero, C.M., Corbeil, L.B., 2001. Immunological and biochemical analysis of glycosylated surface antigens and lipophosphoglycan of *Tritrichomonas foetus*. The Journal of parasitology 87, 770-777.

Skirrow, S., BonDurant, R., Farley, J., Correa, J., 1985. Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls. Journal of the American Veterinary Medical Association 187, 405-407.

Skirrow, S., 1987. Identification of trichomonad-carrier cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191, 553-554.

Skirrow, S.Z., BonDurant, R.H., 1990a. Immunoglobulin isotype of specific antibodies in reproductive tract secretions and sera in *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. *American Journal of Veterinary Research* 51, 645-653.

Skirrow, S.Z., BonDurant, R.H., 1990b. Induced *Tritrichomonas foetus* infection in beef heifers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 196, 885-889.

Slapeta, J., Craig, S., McDonell, D., Emery, D., 2010. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. *Experimental parasitology* .

Smibert, R.M., 1978. The genus *Campylobacter*. *Annual Review of Microbiology* 32, 673-709.

Soto, P., Parma, A.E., 1989. The immune response in cattle infected with *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary parasitology* 33, 343-348.

Speer, C.A., White, M.W., 1991. Better diagnostics and control could save been industry \$650 million annually. 46, 18.

Stockdale, H., Rodning, S., Givens, M., Carpenter, D., Lenz, S., Spencer, J., Dykstra, C., Lindsay, D., Blagburn, B., 2007. Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of parasitology* 93, 1429-1434.

Stockdale, H.D., Dillon, A.R., Newton, J.C., Bird, R.C., BonDurant, R.H., Deinnocentes, P., Barney, S., Bulter, J., Land, T., Spencer, J.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., 2008. Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. *Veterinary parasitology* 154, 156-161.

Stockdale, H.D., Givens, M.D., Dykstra, C.C., Blagburn, B.L., 2009. *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Veterinary parasitology* 160, 13-17.

Szonyi, B., Srinath, I., Schwartz, A., Clavijo, A., Ivanek, R., 2011. Spatio-temporal epidemiology of *Tritrichomonas foetus* infection in Texas bulls based on state-wide diagnostic laboratory data. *Veterinary parasitology*

Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Sedinova, M., Vanacova, S., Vrlik, M., Van Ranst, M., Flegr, J., Kuldaa, J., 2002. Cattle pathogen *Tritrichomonas*

*foetus* (Riedmuller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. The Journal of eukaryotic microbiology 49, 154-163.

Talbot, J.A., Nielsen, K., Corbeil, L.B., 1991. Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. Canadian journal of microbiology 37, 384-390.

Taylor, M.A., Marshall, R.N., Stack, M., 1994. Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. The British veterinary journal 150, 73-80.

Tedesco, L.F., Errico, F., Del Baglivi, L.P., 1979. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls using two sampling methods and a transport medium. Australian Veterinary Journal 55, 322-324.

Tedesco, L.F., Errico, F., Del Baglivi, L.P., 1977. Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. Australian Veterinary Journal 53, 470-472.

Thomford, J.W., Talbot, J.A., Ikeda, J.S., Corbeil, L.B., 1996. Characterization of extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. The Journal of parasitology 82, 112-117.

Thomas, M. W., Harmon, W. M., & White, C., 1990. An improved method for the detection of *Tritrichomonas foetus* infection by culture in bulls. Agri-Practice, 11(1), 13-17.

Todorovic, R., McNutt, S.H., 1967. Diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls. American Journal of Veterinary Research 28, 1581-1590.

Turner, G., Muller, M., 1983. Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. The Journal of parasitology 69, 234-236.

Van Bergen, M.A., Linnane, S., van Putten, J.P., Wagenaar, J.A., 2005. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 24, 1017-1026.

Villarroel, A., Carpenter, T.E., BonDurant, R.H., 2004. Development of a simulation model to evaluate the effect of vaccination against *Tritrichomonas*

*foetus* on reproductive efficiency in beef herds. American Journal of Veterinary Research 65, 770-775.

Voyich, J.M., Ansotegui, R., Swenson, C., Bailey, J., Burgess, D.E., 2001a. Antibody responses of cattle immunized with the Tf190 adhesin of *Tritrichomonas foetus*. Clinical and diagnostic laboratory immunology 8, 1120-1125.

Voyich, J.M., Palecanda, A., Burgess, D.E., 2001b. Antigen-specific T-cell responses in cattle immunized with antigens of *Tritrichomonas foetus*. The Journal of parasitology 87, 1040-1048.

Walker, R.L., Hayes, D.C., Sawyer, S.J., Nordhausen, R.W., Van Hoosear, K.A., BonDurant, R.H., 2003. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 15, 14-20.

Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10, 506-513.

Wang, A.L., Wang, C.C., 1985. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. Molecular and biochemical parasitology 14, 323-335.

Wang, C.C., Wang, A.L., Rice, A., 1984. *Tritrichomonas foetus*: partly defined cultivation medium for study of the purine and pyrimidine metabolism. Experimental parasitology 57, 68-75.

Yaeger, M.J., Gookin, J.L., 2005. Histologic features associated with *Tritrichomonas foetus*-induced colitis in domestic cats. Veterinary pathology 42, 797-804.

Yao, C. 2013. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle?. Journal of Medical Microbiology 62:1-9.

Yule, A., Skirrow, S.Z., Bonduran, R.H., 1989. Bovine trichomoniasis. Parasitology today (Personal ed.) 5, 373-377.