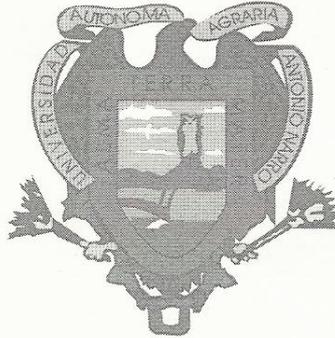


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO  
PARA TRITRICHOMONIASIS FOETUS EN  
GANADO BOVINO**

**POR**

**JUAN JERONIMO GONZALEZ**

**MONOGRAFÍA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

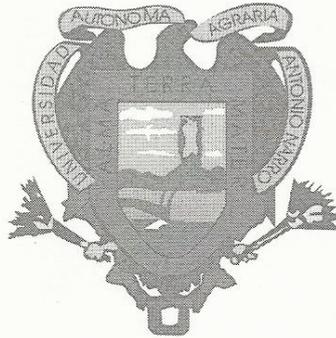
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**MARZO 2011.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO  
PARA TRITRICHOMONIASIS FOETUS EN  
GANADO BOVINO**

**POR**

**JUAN JERONIMO GONZALEZ**

**MONOGRAFÍA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ASESOR:**

**MVZ. MC. Francisco J Carrillo Morales**

**CO ASESOR**

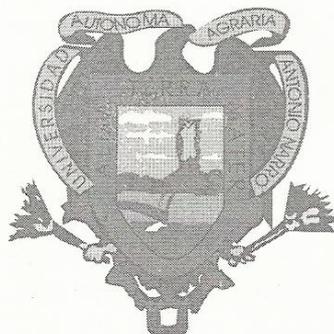
**MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO**

**TORREÓN, COAHUILA**

**MARZO 2011.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

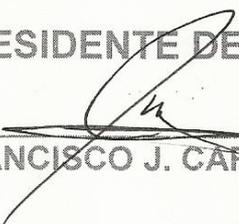


**DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO  
PARA TRITRICHOMONIASIS FOETUS EN  
GANADO BOVINO**

**MONOGRAFÍA**

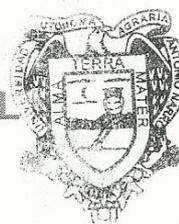
Aprobada por el

**PRESIDENTE DEL JURADO**

  
MVZ. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL**

  
MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO



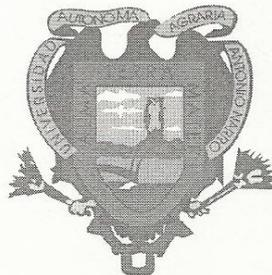
Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

**TORREÓN, COAHUILA**

**MARZO 2011.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

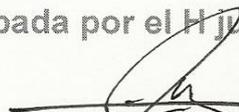
**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

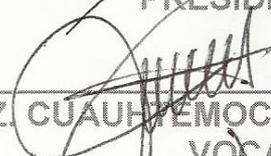


**DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO  
PARA TRITRICHOMONIASIS FOETUS EN  
GANADO BOVINO**

**MONOGRAFÍA**

Aprobada por el H. Jurado examinador

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. MC. FRANCISCO J CARRILLO MORALES  
PRESIDENTE

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. CUAUHTEMOC FÉLIX ZORRILLA  
VOCAL

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. GILBERTO JIMÉNEZ FRÍAS  
VOCAL

  
\_\_\_\_\_  
MVZ MC JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS  
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA

MARZO 2011.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro U-L, por haberme abierto sus puertas en estos 5 años para poder lograr unas de mis más grandes metas como ser humano.

Agradezco a todos los Profesores de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro U-L, por compartir sus conocimientos.

Agradezco al MVZ. MC. Francisco J. Carrillo Morales, por su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo.

Agradezco a toda la gente de la Comarca Lagunera, por su generosidad y amistad que me brindaron durante el tiempo que permanecí en este lugar.

Agradezco a todos mis amigos (Jorge, Gerardo, Calixto, Carlos, Herminio, Enrique Misael.) por sus consejos y apoyo en aquellos momentos difíciles que pase a lo largo de mi estancia.

Agradezco a la familia Jerónimo, (Tíos, Abuelos, Primos), por su apoyo moral,  
GRACIAS.

## **DEDICATORIAS.**

A mi padre Sr. Juan Jerónimo González (†), que con su ejemplo de luchar y conseguir lo que se proponía, pude terminar mi carrera a pesar del fuerte dolor que me causara su pérdida, pude concluir lo que él un día me motivara a empezar.

A mi madre Sra. Celia González Hernández, por haberme dado la vida, y por todo su apoyo, consejos, y por la confianza depositada en mi a pesar de los fuerte tropiezos que pasamos, y a pesar de todo, nunca se dio por vencida.

A toda la Familia González Hernández (Abuelos, Tíos, Primos.) por todo su apoyo incondicional, pude finalizar mi carrera y que sin su ayuda no hubiera podido y por estar siempre motivándome con sus consejos.

A todas las personas que en mi creyeron y apoyaron en todo momento,  
**GRACIAS.**

## RESUMEN.

En el presente trabajo se hace una revisión de los aspectos vinculados con los principales medios de cultivo de la trichomonosis poniendo énfasis no sólo en las características morfológicas y ultraestructurales, sino también en la patogenicidad de *Tritrichomonas foetus*. Se describen además aspectos recientes del diagnóstico y la presencia de otros protozoos aislados del contenido prepucial de toros, como también se destaca la necesidad de utilizar otras técnicas como PCR, inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

La tritricomonosis bovina es causada por *Tritrichomonas foetus*, un protozoo flagelado, Presenta una distribución mundial y en cierta ocasión mostró una enorme importancia económica como causa de aborto e infertilidad, especialmente en vacas lecheras. En las áreas del mundo donde está ampliamente distribuido el uso de la inseminación artificial, la prevalencia se encuentra muy reducida, aunque todavía presenta importancia en rebaños de vacas para carne o en otras circunstancias donde no se utiliza la inseminación artificial.

La transmisión de la enfermedad tiene lugar primariamente mediante el coito, aunque también puede tener lugar la transmisión mecánica mediante instrumentos de inseminación o el examen del aparato genital. El microorganismo puede sobrevivir a 5 °C en semen completo o diluido. Los toros constituyen el reservorio principal de la enfermedad ya que tienden a ser portadores a largo plazo, mientras que la mayoría de las vacas eliminan la infección espontáneamente. Por estas razones, normalmente se prefieren las muestras procedentes de toros para llevar a cabo el diagnóstico y control de la enfermedad.

*Trichomonas foetus* es un protozoo piriforme eucarióta, flagelado, de aproximadamente 8-18 µm de largo y 4-9 µm de ancho, con tres flagelos anteriores y un oposterior, y una membrana ondulante. Los microorganismos se desplazan con un movimiento rotatorio entrecortado y se observan en pruebas de cultivo de muestras prepuciales de toros infectados y lavados

vaginales o mucus cérvico vaginal de las vacas infectadas, o, a veces, en los fetos abortados. Los microorganismos pueden cultivarse in-vitro, y pueden observarse en un portaobjetos húmedo o teñido.

El método de diagnóstico estándar para los toros implica la recogida, examen y cultivo del prepucio y el pene. se puede recoger de diferentes maneras, incluyendo el lavado prepucial o el rascado de la cavidad prepucial y el glande del pene a nivel del fórnix con una pipeta de inseminación seca. Existen una variedad de medios de cultivo in-vitro, aunque, más recientemente, se ha introducido una prueba de cultivo campo disponible comercialmente que permite el crecimiento de los tricomonas y el examen microscópico directo.

La infección también puede detectarse mediante la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). En el pasado se ha utilizado como prueba para rebaños una reacción de aglutinación empleando mucus recogido a partir del cervix y un antígeno preparado a partir de microorganismos cultivados. De manera similar se ha utilizado una prueba intradérmica empleando un precipitado del organismo con ácido tricloroacético.

**Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico:** Se encuentra disponible comercialmente una vacuna de células enteras muertas parcialmente eficaces bien como vacuna monovalente, o como parte de una vacuna polivalente que contiene *Campylobacter* y *Leptospira*3.

Palabras claves: *Tritrichomonas foetus*, Medios de diagnóstico, Cultivos, PCR, Histoquímica.

## ÍNDICE.

Agradecimientos	i
Dedicatorias	ii
Resumen	iii
Índice	iv
INTRODUCCIÓN	1
Características morfológicas de <i>Tritrichomonas foetus</i>	2
Patogenicidad	4
Nuevos hallazgos histopatológicos	5
Antecedentes	6
Estado actual de la enfermedad	7
Técnicas de diagnóstico	9
Examen directo del cultivo	9
Recogida de muestras	10
Materiales y método para la obtención de muestras prepuciales	11
Raspador	11
Aspirador	11
Empuñadura	12
Técnica de trabajo	13
Ventajas respecto a	14
El raspador metálico	14
La pipeta lisa	14
El raspador blando	14
Inconvenientes	15
Cultivo	15
Procedimientos de cultivo	16

Medio de Diamond modificado	16
Ensayo de cultivo de campo (InPouch™ TF)	17
Sensibilidad y especificidad globales del ensayo de cultivo e identificación	17
Reacción en cadena de la polimerasa	18
Ensayos alternativo	20
Prueba de aglutinación de mucus	20
Ensayo intradérmico “Tricin”	21
Inmunohistoquímica en tejidos	21
Vacunas	22
Bibliografía	23

## INTRODUCCIÓN.

En México al igual que el resto del mundo se hace necesario aumentar la producción de carne y leche, para alimentar a una población humana en constante crecimiento, en tal sentido plantea como meta mejorar la eficiencia reproductiva y el rendimiento del ganado, para poder hacer frente a la demanda de proteína de origen animal. Mejorar la eficiencia reproductiva, constituye un reto para el éxito económico de nuestra ganadería, Aún cuando la mayor parte de la ganadería en México puede parcialmente obtener 70 a 80% de partos anuales, la cifra real promedio se encuentra alrededor de un 50%. Esta diferencia entre el potencial y la realidad tiene su fundamento en la baja productividad de la ganadería Mexicana e igualmente de la América Latina tropical. Alteraciones de orden fisiológico, endocrino y nutricional afectan la capacidad reproductiva del ganado, ocasionando problemas tales como: anestro, aborto, piómetras, repetición de celos, muertes embrionarias y retenciones placentarias entre otras. Estos síntomas se encuentran ligados a una serie de enfermedades del tracto reproductivo que constituyen una causa predisponente de infertilidad y esterilidad del rebaño. (13, 29, 31).

Al mencionar enfermedades del tracto reproductivo como la Brucelosis, Leptopirosis, Campilobacteriosis, Vibriosis y Trichomoniasis, IBR, DVB, se destaca la importancia de desarrollar programas para controlar y erradicar dichas enfermedades, que por su naturaleza y características inciden negativamente en la producción.

La trichomonosis bovina o tricomoniasis (130) es una enfermedad de transmisión sexual ocasionada por el protozoo flagelado *Tritrichomonas foetus* (12, 56, 97). La infección afecta el área genital de los bovinos produciendo en la hembra vaginitis, endometritis, mortalidad embrionaria y abortos con ocasionales piómetras (4, 50, 52, 53, 142). En el macho la infección usualmente es asintomática y crónica sin afectar la libido ni su fertilidad (51, 141, 154) siendo más frecuente en machos adultos y viejos (27, 29). Los toros permanecen infectados para toda su vida. Los signos de la enfermedad en el rodeo se basan en baja tasa de preñez, repetición de servicios con celos irregulares, preñez des uniforme y abundantes preñeces tardías (29, 52, 53). La pérdida del embrión o expulsión del feto en estadios tempranos de la gestación (2-4 meses) motiva la repetición del celo al finalizar el servicio. Debido al escaso desarrollo del feto, el aborto pasa desapercibido en condiciones de ganadería extensiva (48).

## Características morfológicas de *Tritrichomonas foetus*.

*Tritrichomonas foetus*. Es un protozoo del género *Tritrichomonas*, familia *Trichomonadidae*, clase *Phytomastigophorea* y del *phylum* *Sarcomastigophora*. compartiendo similar género con *Tritrichomonas mobilensis* y *Tritrichomonas suis*. Por su parte, el agente de la tricomoniasis humana, *Trichomonas vaginalis* pertenece al género *Tricomonas*.

*T. foetus* es piriforme y mide de 9 a 18  $\mu\text{m}$  x 4 a 8  $\mu\text{m}$ , aunque debido a la plasticidad de su protoplasma adopta diversas formas según requerimientos fisiológicos. Como característica del subreino eucariota,

*Trichomonas foetus* es un protozoo piriforme eucarióta, flagelado, de aproximadamente 8-18  $\mu\text{m}$  de largo y 4-9  $\mu\text{m}$  de ancho, con tres flagelos anteriores y un oposterior, y una membrana ondulante. *T. foetus* posee un núcleo usualmente esférico u ovoide (98). Se identificaron dos formas de *T. foetus*: una en estado de *trofozoito* caracterizado por una forma elongada que constituye la mayor parte de la población normal, y otra forma *seudoquística*, oval e inmóvil, que aparece en condiciones de medio ambiente desfavorable como temperatura hostil o deficiencias nutricionales. *T. foetus* posee tres flagelos anteriores de 11 a 17  $\mu\text{m}$  de largo y un flagelo posterior de 16  $\mu\text{m}$  que conforma una membrana ondulante que recorre todo el cuerpo formando 2 a 5 ondas.(Figura 1).

Las trichomonas presentan unas organelas únicas, los hidrogenosomas, que tienen doble membrana, se dividen por fisión e importan proteínas en post translación. Los hidrogenosomas realizan la glicólisis y producción de ATP anaeróbica del piruvato y malato ya que este protozoo carece de mitocondrias y peroxisomas . Si bien los hidrogenosomas tienen una función similar a las mitocondrias, los primeros carecen de genoma propio, cadena respiratoria y citocromos. El complejo blefaroplasto es otra organela característica de *T.foetus*, formado por los gránulos basales denominados kinetosomas que se conectan con los flagelos. Desde el blefaroplasto surge el axostilo, estructura tubular prominente, delgada e hialina que se curva alrededor del núcleo y pasa longitudinalmente a través del protozoo emergiendo en una corta proyección a

caudal, y la costa que es un cuerpo basal débilmente cromático que corre por debajo de la membrana ondulante.

*T. foetus* no tiene vida libre ni formas quísticas de sobrevivencia ya que la formación de pseudoquistes es solo un fenómeno de adaptación al huésped en condiciones desfavorables. No posee huéspedes intermediarios y debe siempre habitar un huésped que será definitivo en el desarrollo parasitario. El huésped de *T. foetus* es el bovino, ya sea *Bos taurus* como *Bos indicus*, aunque puede ocasional y probablemente en forma temporaria colonizar otras especies incluyendo búfalo, equino, cerdo, roedores e inclusive humanos, donde se lo menciona en un caso incidental asociado a un trasplante de médula ósea.

*T. foetus* se transmite, bajo condiciones naturales, exclusivamente por vía sexual la transmisión mecánica o por vía pasiva, por la cual un toro libre de la infección sirve en un corto tiempo a una hembra infectada en primera instancia y luego a una segunda hembra, infectándolo pasivamente a ésta última, es poco probable en condiciones naturales, trabajos realizados al evaluar toros sanos mediante la prueba de capacidad de servicio efectuada sobre hembras bovinas conocidas de estar infectadas con *T. foetus*, se pudo comprobar con que facilidad algunos toros lograban infectarse al estar en contacto con la hembra durante no más de 20 min. de servicio. En condiciones artificiales, *T. foetus* puede difundirse por inseminación artificial ya que el protozoo permanece viable en el semen congelado infectado.

En la actualidad, y mediante técnicas de biología molecular que permiten conocer el genoma de organismos, nuevos interrogantes se han planteado sobre la taxonomía y huéspedes de *T. foetus*. Así, *T. foetus* presenta una morfología idéntica y una secuencia genética de ARNr homóloga con *Tritrichomonas 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 huéspedes. Pese a ello, un reciente trabajo efectuado con una cepa de *T. suis*, la misma no logró establecerse y colonizar el tracto genital de vaquillonas. Por otra parte, *T. foetus* fue identificada como agente causal de diarrea crónica en gatos donde colonizó el epitelio del íleo, ciego y colon. Estos hallazgos sugieren reconsiderar el ciclo de vida de *T. foetus* y eventuales fuentes

de diseminación de la enfermedad hasta hoy no contempladas incluyendo la coexistencia de bovinos con cerdos y gatos debiéndose mejorar el conocimiento sobre la posibilidad de la transmisión entre estas especies.

### **Patogenicidad.**

*T. foetus* reside normalmente 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 y 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 continua por su soma (Corbeil y col. 1989). El complejo molecular, adhesina Tf 190, ubicado en la superficie de *T. foetus* también favorecería la adhesión y citotoxicidad hacia la célula hospedador (Shaia y col. 1998). El poder invasivo y la selectividad de *T. foetus* hacia las células huésped estaría determinado por el reconocimiento de receptores glicoproteicos en la matriz extracelular del hospedador a partir de lectinas del protozoo (Costa e Silva Filho y col. 1989; Babal y col. 1994).

Por otra parte, diversas endo y exoenzimas de *T. foetus* influyen en los mecanismos de patogenicidad. La cisteína proteinasa extracelular del protozoo favorece la invasión hacia la célula huésped debido a su capacidad para desintegrar epitelios, enzimas celulares y fibronectinas (Talbot y col. 1991). A su vez, dicha enzima degrada isotipos de IgG, especialmente IgG2 y un componente del complemento (c3), ambos presente en secreciones genitales de la hembra bovina (Bastida-Corcuera y col. 2000; Kania y col. 2001). La IgG2 y el complemento son importantes dentro de los mecanismos de defensa del bovino hacia organismos patógenos extracelulares (Aydintug y col. 1993). Sin embargo, la acción lítica de la cisteína proteinasa extracelular de *T. foetus* sobre la IgG2 y fracciones del complemento representaría un importante mecanismo de evasión del sistema inmune por parte del protozoo (Bastida-Corcuera y col. 2000; Kania y col. 2001). Por otra parte, la resistencia de IgG2 a ser degradada por dicha enzima es regulada genéticamente (Bastida-Corcuera y col. 2000). Por lo tanto, la presencia de animales con mayor capacidad para liberarse antes de la infección genital sería genéticamente determinada por la presencia de IgG2 resistente a la degradación enzimática (Bastida-Corcuera y col. 2000).

## **Nuevos hallazgos histopatológicos.**

En los toros, *T. foetus* se localiza comúnmente en la cavidad prepucial, especialmente en las criptas peneanas, fornix y parte distal de la uretra, sin producir lesiones patológicas (BonDurant 1997; Rhyan y col. 1999). Recientes estudios morfológicos e inmunohistoquímicos permitieron evidenciar la presencia de infiltrados de células mononucleares y plasmáticas en la lámina propia de pene y prepucio junto a estructuras linfoideas (Rhyan y col. 1999). Dichas estructuras fueron previamente descritas por 5 Parsonson y col. 1974 y actualmente se determinó que eran sitios de procesamiento antigénico y síntesis de inmunoglobulinas (Rhyan y col. 1999). En la hembra bovina, a partir del coito, *T. foetus* invade el epitelio vaginal causando vaginitis moderada con infiltrado linfocitario en la lámina propia y presencia de macrófagos y células plasmáticas (Campero y col. 1993; Anderson y col. 1996). También se observan en el cérvix, útero y oviducto inflamaciones intersticiales de un grado moderado a severo (Campero y col. 1993; Anderson y col. 1996). Posteriormente, una vez que la preñez se ha establecido, *T. foetus* difunde hacia la placenta y el feto (Rhyan y col. 1995 (b)). El cambio inflamatorio en la hembra más significativo, que determina la pérdida reproductiva, es la endometritis de grado moderado a severa con presencia de agregados linfoideos y células inflamatorias en el estrato compacto (Campero y col. 1993; Anderson y col. 1996).

Las lesiones placentarias y fetales antes del día 60 de gestación son mínimas, permitiendo mantener la gestación normalmente (Campero, datos sin publicar). Sin embargo, luego 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 y col. 1988 y 1995 (a)). Dicha placentitis se correlaciona con el aborto y ocurre usualmente antes del 7° mes de preñez (Rhyan y col. 1988 y 1995 (a)). Además, luego de los dos primeros meses de gestación *T. foetus* es capaz de penetrar en el corión placentario y el epitelio de las mucosas fetales invadiendo los tejidos conectivos y linfáticos adyacentes (Rhyan y col. 1988; 1995 (a) y 1995 (b)). Los hallazgos histopatológicos fetales más frecuentes son bronconeumonía piogranulomatosa y enteritis necrotizante (Rhyan y col. 1988 y 1995 (b)). A su

vez, granulomas inflamatorios en el pulmón junto a meconio, macrófagos y células gigantes indicarían que el aborto suele ser precedido por la expulsión de meconio e ingestión e inhalación del mismo por el feto (Rhyan y col. 1995 (b)). La presencia de dichas células gigantes y la respuesta inflamatoria pulmonar fetal fueron recientemente evidenciadas por inmunohistoquímica (Campero).

### **Antecedentes.**

La Tricomoniasis bovina es una enfermedad de transmisión sexual ocasionada por el protozoo *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) (Honigberg 1978). El huésped definitivo es el bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), pero ha sido ocasionalmente aislado del búfalo, equino, cerdo y roedores (Honigberg 1978; McCool y col. 1987). *T. foetus* es un protozoo flagelado de 9 a 18 x 4 a 8 µm de tamaño, piriforme, que posee una membrana ondulante la cual recorre todo el cuerpo formando de 2 a 5 ondulaciones y presenta tres flagelos anteriores y un flagelo posterior (Honigberg 1978; Mattos y col. 1997; Lun y Gajadhar 1999). Los mecanismos metabólicos de glicólisis son realizados mediante una organela de doble membrana denominada hidrogenosoma, la cual le permite al protozoo adaptarse a vivir en condiciones de anaerobiosis o microaerofilia (Honigberg 1978).

La enfermedad se transmite por vía sexual, resultando suficiente 200 a 80000 flagelados para establecer la infección en el prepucio de un toro (Clark 1971). Sin embargo, puede difundirse por inseminación artificial, ya que el parásito puede permanecer viable en el semen congelado infectado (BonDurant 1997).

La enfermedad en el macho cursa generalmente en forma asintomática sin afectar la calidad seminal ni la libido (BonDurant 1997). En toros mayores de 4 a 5 años, la recuperación espontánea raramente ocurre (menos del 10% de los toros afectados) y el toro se convierte en una fuente permanente de infección para el rodeo, comportándose el mismo como 'carrier' o transmisor (BonDurant 1997). Estudios realizados en EE.UU han mencionado que toros menores de 3 a 4 años suelen presentar una infección transitoria o bien son resistentes a *T. foetus* (BonDurant 1997). A diferencia de ello, el hallazgo de toros infectados de dicha edad o menor es un hallazgo común en Argentina (Campero Palladito 1983; Campero y col. 1987(b)).

En la hembra bovina, *T. foetus* persiste en las secreciones genitales por 90 a 190 días (Skirrow y BonDurant 1990 (a); Campero y col. 1993) pudiendo persistir hasta

300 días post servicio (Mancebo y col. 1995). *T. foetus* ocasiona en las hembras bovinas muerte embrionaria, infertilidad transitoria, descargas uterinas, piómetra y ocasionalmente aborto (Rhyan y col. 1988; Campero y col. 1993). Sin embargo, es factible que *T. foetus* infecte el útero preñado durante toda la gestación, pudiendo la vaca parir un ternero a término normal y persistiendo la infección en vagina por 6 a 9 semanas post-parto (Skirrow 1987). Por otra parte, ensayos realizados en INTA Balcarce Argentina permitieron aislar *T. foetus* de vagina de vacas con 6 meses de gestación, desapareciendo posteriormente el protozoo y pariendo las hembras un ternero viable (Campero,).

Dentro de los signos clínicos de un rodeo infectado con *T. foetus* se menciona la repetición de celos, preñeces tardías en un servicio de 3-4 meses, baja tasa de preñez, prolongados intervalos entre partos y una marcada cola de parición (Clark y col. 1983 (b)).

### **Estado actual de la enfermedad.**

La Trichomoniasis bovina ha sido controlada en la mayoría de los países avanzados mediante el empleo de medidas reproductivas tales como la inseminación artificial, control sanitario del semen y el descarte de los animales infectados. Así, en Inglaterra solo se reportaron dos casos en el período 1974-1994 (Taylor y col. 1994) y en Suiza no se registraron casos en igual período (Felleisen y col. 1998). Sin embargo, en países con ganadería extensiva y con la utilización de servicio natural, la enfermedad continúa siendo un problema.

En el noroeste de España se estimó una prevalencia de 2.9% toros infectados con *T. foetus* (Martín-Gómez y col. 1997). La prevalencia de la enfermedad en rodeos cárnicos de EE.UU se estimó en 15.8% en rodeos de California (BonDurant y col. 1990) y entre 26.7% a 44.1 % en rodeos de Nevada (Kvasnicka y col. 1989). En Saskatchewan, Canadá, el 6% de los toros analizados estaban infectados con *T. foetus* (Ryley y col. 1995) y también se reportó la enfermedad en establos de México, Costa Rica y Australia (Perez y col. 1992; BonDurant 1997).

*En Argentina, T. foetus* se evidenció como responsable de pérdidas reproductivas en hatos para cría en 1966 a partir de un feto abortado de la localidad bonaerense de Bordenave gracias al aporte del Dr RM Roberts (29). Desde esa instancia comenzó a difundirse el conocimiento del diagnóstico y manejo de la

enfermedad, (29). en la Pampa húmeda, Su esfuerzo y dedicación permitieron apoyar las acciones iniciales para mejorar el control de la enfermedad (29, 34).

La tricomonosis bovina es causada por el protozoo flagelado *Tritrichomona foetus*. Los hospedadores naturales de *T. foetus* son el ganado vacuno (*Bos taurus*, *B. Indicus*). En el intestino del ganado bovino se encuentran especies no patógenas de tricomonas; *T. suis* de los cerdos es indistinguible morfológicamente, serológicamente y genéticamente de *T. foetus*.

*Trichomonas foetus* es piriforme, con 8-18  $\mu\text{m}$  de largo y 4-9  $\mu\text{m}$  de ancho, con tres flagelos anteriores y uno posterior y una membrana ondulante. Los microorganismos vivos se desplazan con un movimiento rotatorio entrecortado y pueden detectarse mediante microscopía visible. Pueden utilizarse la microscopía de contraste de fases o campo oscuro u otros métodos para observar los detalles necesarios para la identificación. Las descripciones morfológicas detalladas, incluidos los estudios de microscopía electrónica, han sido publicados por Warton & Honigberg (47). Es importante diferenciar *T. foetus* de otros protozoos flagelados contaminantes que pueden encontrarse presentes en el tracto reproductor bovino (3, 6, 33, 45). Una característica importante es el número de flagelos observados bajo iluminación de contraste de fases, ya que puede ayudar a diferenciar *T. foetus* de algunos flagelados bovinos que parecen similares. Se ha descrito una técnica de tinción que puede utilizarse para observar más claramente la morfología (25).

El microorganismo se multiplica mediante fisión binaria longitudinal; no existe reproducción sexual y no se han observado estadios del parásito resistentes al medio ambiente.

En unos primeros estudios se reconocieron tres serotipos basados en la aglutinación (42): la cepa “*belfast*”, descrita como predominante en Europa, África y EEUU (23); la cepa “*brisbane*” en Australia (12); y la cepa “*manley*”, que ha sido descrita solamente en algunos brotes (42). Poco trabajo más se ha realizado en este campo. Necesita realizarse más trabajo en el área de comparar las características de crecimiento, la variación genética y antigénica y la patogénesis de los aislados de *T. foetus* de diferentes zonas antes de que pueda realizarse la designación de “cepa” y “serotipo” con garantías.

Los microorganismos pueden cultivarse *in vitro*, preferiblemente en medio de Diamond (10), medio de Clausen (28) o medio de *Trichomonas*, el cual se encuentra disponible comercialmente (40). En EEUU se ha desarrollado una prueba de cultivo de campo que permite el crecimiento de los tricomonas y el examen microscópico directo sin aspiración del inóculo (41, 46) (InPouch™ TF, ver nota al pie 2).

La transmisión de la infección en condiciones naturales tiene lugar a través del coito, mediante inseminación artificial o mediante el examen del aparato genital de las vacas. El lugar de la infección en los toros es principalmente la cavidad prepucial (1, 35), y se observan pocas o ninguna manifestaciones clínicas. En los toros mayores de 3-4 años raramente tiene lugar la recuperación espontánea y el toro se convierte en una fuente permanente de infección. En los toros menores de 3-4 años la infección puede ser transitoria. Los microorganismos están presentes en número pequeño en la cavidad prepucial de los toros, con alguna concentración en el fórmix y alrededor del glande del pene (20). El toro infectado crónicamente no muestra lesiones patentes. En la vaca, la lesión inicial es una vaginitis, que puede continuar en los animales gestantes con la invasión del cervix y el útero. Pueden aparecer varias secuelas, incluyendo una placentitis que lleva a un aborto prematuro (1-16 semanas), flujo uterino y piometra. En algunos casos, la gestación no finaliza con el aborto a pesar de la infección y nace un ternero normal a término. En cuanto al rebaño, las vacas presentan estros irregulares, flujo uterino, piometra y aborto prematuro (1, 15, 42). Generalmente, la vaca se recupera y después de la infección o el aborto se hace inmune, al menos durante esa temporada de cría (1, 15, 44).

## **TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.**

### **Examen directo del cultivo.**

El diagnóstico provisional de la tricomonosis se basa en la historia clínica, síntomas de aborto prematuro, revisiones repetidas, o ciclos de celo irregulares. La confirmación depende de la demostración de los microorganismos en el líquido placentario, el contenido estomacal de los fetos abortados, los lavados uterinos, el flujo piometral o el mucus vaginal.

En los rebaños contaminados, el material más fiable para el diagnóstico son los lavados prepuciales o vaginales, o los raspados (24, 29, 31, 41). En Europa Occidental, las Directivas de la Unión Europea (UE) requieren la recogida de lavados prepuciales, o, en el caso de los animales hembra, una prueba de aglutinación de mucus vaginal (13).

El número de microorganismos varía en dependencia con diferentes situaciones. Son numerosos en los fetos abortados, en el útero se mantienen varios días después del aborto y en las vacas infectadas recientemente, son muy abundantes en el mucus vaginal 12-20 días después de la infección. A partir de entonces el número de microorganismos varía de acuerdo con la fase del ciclo del celo, siendo el más elevado 3-7 días después de la ovulación. Los microorganismos de *T. foetus* están presentes en el toro infectado en un número muy alto en la mucosa del prepucio del pene, aparentemente sin invadir los tejidos submucosos. Generalmente, se recomienda dejar pasar 1 semana después de la última revisión antes de tomar una muestra prepucial.

## **Recogida de muestras**

Se han descrito varias técnicas para recoger muestras prepuciales de los toros o muestras vaginales de las vacas. Es importante evitar la contaminación fecal, ya que se pueden introducir protozoos intestinales que pueden confundirse con *T. foetus* (45). La contaminación de las muestras debería minimizarse eliminando el material externo y los pelos sucios de alrededor del orificio prepucial o de la vulva; sin embargo, debe evitarse la limpieza del área, concretamente con desinfectantes, ya que puede disminuir la sensibilidad del diagnóstico. En los toros pueden recogerse las muestras raspando la mucosa prepucial y del pene con una pipeta de inseminación artificial (31, 41) o una escobilla metálica (30, 31), mediante lavado prepucial (41), o lavando la vagina artificial después de la recogida del semen (19). Esta última técnica no es recomendable ya que su sensibilidad puede ser menor (19). Las muestras de vacas se recogen mediante lavado de la vagina o raspando el cérvix con una pipeta de inseminación artificial o una escobilla metálica (24, 27).

Cuando las muestras deben enviarse a un laboratorio y no pueden recogerse en 24 horas, debería emplearse un medio de transporte (por ejemplo medio de Winters, solución tamponada salina con suero bovino fetal al 5%, o leche desnatada, con o sin antibióticos [37] o en tioglicolato [5]), o la bolsa plástica de cultivo de campo (5, 46). Los microorganismos deben protegerse durante el transporte de la exposición a la luz y de las temperaturas extremas, las cuales deberían permanecer por encima de los 5°C y por debajo de los 38°C (5).

#### **MATERIALES Y MÉTODO PARA LA OBTENCION DE MUESTRAS PREPUCIALES.**

**Raspador:** Está construido con un tubo plástico semiflexible de 6 mm de diámetro exterior, 4 mm de luz y 60 cm de largo que posee la rigidez suficiente para ser empujado hasta el fondo de saco prepucial sin inconveniente. En el extremo que se introduce dentro del prepucio presenta un sector de 2 cm de longitud con ranuras anulares para remover el esmegma y tres orificios de 2 mm de diámetro, que sumados al del extremo de la pipeta conforman cuatro puntos de aspiración.

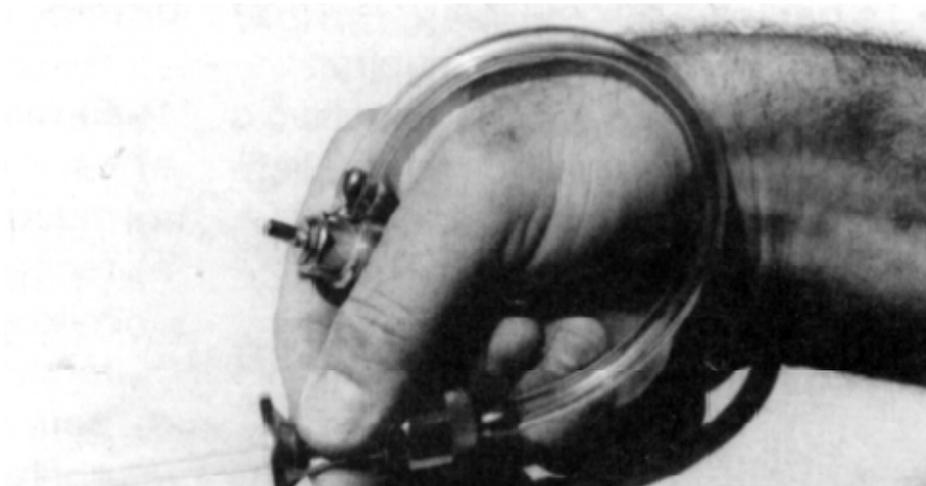


(Figura I)

**Aspirador:** La succión del material removido se realiza mediante un frasco de poliestireno flexible de 60 ml de capacidad que se cambia con facilidad cuando se ensucia.

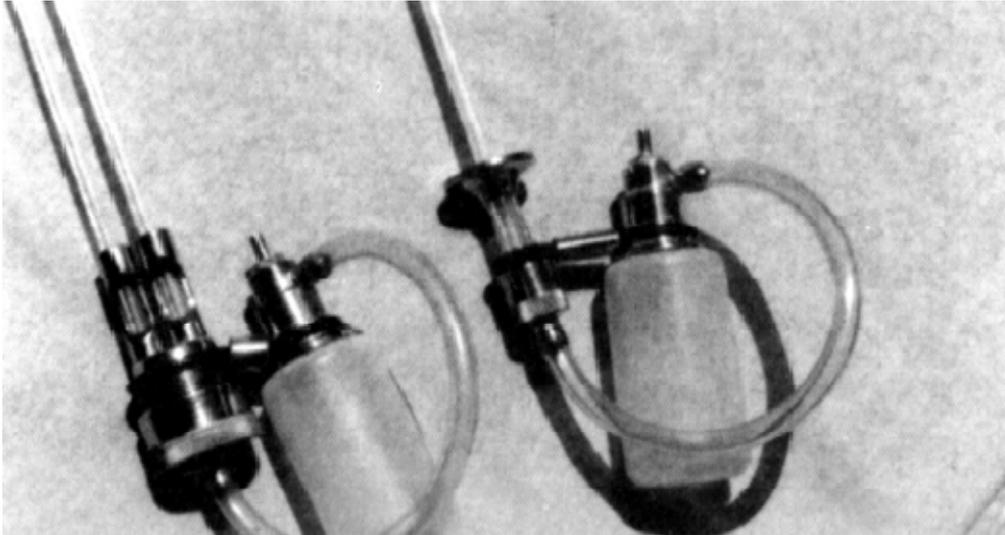
**Empuñadura:** Se diseñó un pequeño intermediario para conectar el frasco plástico con el raspador. Es un conjunto de cuatro elementos que cumplen otras tantas funciones y que se desarma con facilidad para permitir su limpieza. a) buje de goma donde se inserta el raspador, b) apoyo para el pulgar e índice que permite sujetar el catéter y facilita los movimientos de vaivén durante el raspado, mientras el frasco se toma con los tres dedos restantes, e) válvula para eliminar el vacío y d) tapón de bronce donde se inserta el frasco.

La movilidad se logró mediante una vinculación flexible entre el frasco y la empuñadura lo que permite no sólo adaptarlo a cualquier posición de trabajo que convenga al operador sino también manejarlo con la mano izquierda o derecha.



(Figura 2)

Dos modelos de empuñadura según se quiera utilizar uno o dos aspiroraspadores al mismo tiempo para sembrar en forma independiente un medio de cultivo para *Trichomonas* y otro para *Campylobacter*.



### **TÉCNICA DE TRABAJO.**

1.-Introducir el aspiro-raspador hasta el fondo del saco prepucial. Si el avance se dificulta por que la mucosa está muy seca, se lubrica la cavidad colocando con la pipeta un pequeño volumen de la misma solución, medio de cultivo o transporte, que se esté utilizando.

2.- Meter aire dentro de la cavidad prepucial comprimiendo el frasco plástico.

3.- Realizar veinte raspados en sentido antero posterior en la zona del fornix y glande del pene.

6.- partir del décimo movimiento de raspado comenzar a aspirar.

5- Enjuagar en el medio de cultivo o transporte aspirando y expeliendo con el frasco flexible.

Si bien la aspiración se puede realizar con una jeringa, el uso del intermediario aquí descrito es más práctico porque permite trabajar con una sola mano. El conjunto es totalmente desarmable lo que facilita su limpieza.

Utilizar un frasco plástico resultó más conveniente que la pera de goma. No se deteriora por el calor ni se reseca con el uso; se ve cuando pasa líquido a su interior, es lavable y muy económico.

La válvula permite que entre aire al sistema anulando el vacío e interrumpiendo la aspiración. De esa forma se evita diluir la muestra o mojar el frasco en caso que el toro orine durante el raspado. El catéter se sujeta entre los dedos pulgar e índice para no disminuir la sensibilidad del operador durante el raspado. Con esto se evita ejercer una presión excesiva que podría lesionar

la mucosa prepucial o peneana. Comparado con otros métodos en uso, el aspiroraspador presenta varias ventajas y algunos inconvenientes.

### **Ventajas respecto de:**

#### **1) El raspador metálico:**

- a) es menos agresivo para la mucosa prepucial.
- b) recoge más material porque permite aspirar el esmegma que se remueve.
- c) permite obtener muestras menos contaminadas. Si la pipeta está muy embarrada, se puede limpiar el exterior y sólo se utiliza para sembrar, el material aspirado contenido en su interior.
- d) no se necesita calentar agua para esterilizar los raspadores. Esto no es una ventaja menor. A menudo conseguir los elementos para encender fuego y hervir agua es una molestia.

#### **2) La pipeta lisa:**

- a) recoge más cantidad de material porque remueve las células superficiales que luego son aspiradas.
- b) tiene mejor capacidad de aspiración porque es de mayor diámetro y posee cinco orificios en lugar de uno sólo.
- c) se trabaja con una sola mano porque no se aspira con jeringa. Esto permite tomar el prepucio con la mano libre para guiar la pipeta o sujetarlo, si es muy péndulo, como es caso de los toros cebú.
- d) la longitud del instrumento permite llegar hasta el fondo del saco prepucial aun en toros de razas cebuínas o en aquellas mangas donde el animal queda lejos del operador.

#### **3) El raspador blando:**

- a) no hay que esterilizar los cabezales.
- b) evita armar los raspadores uno a uno.
- c) es más barato.

Valen las mismas consideraciones de los puntos b) y c) enunciadas arriba

## **Inconvenientes:**

En relación con el raspador blando de caucho siliconado puede ser más traumático si se emplea una presión exagerada y cotejado con el raspador de bronce los muestreos se encarecen porque el catéter se descarta.

El instrumento descrito si bien puede aumentar ligeramente los costos del diagnóstico, simplifica y agiliza la técnica de muestreo, recoge una considerable cantidad de material y elimina toda posibilidad de transmisión de enfermedades. Técnica de acuerdo a: *Aspiro raspador para la obtención de muestras prepuciales. Jornadas de C.A.D.I.A, (Mural)*. Baigun, R , y Garat M...1987.

## **Cultivo.**

Deberían prepararse cultivos cuando los microorganismos son demasiado escasos para una detección directa y una identificación precisa. Normalmente es necesario el cultivo de los microorganismos porque, en la mayoría de los casos, el número de microorganismos no es suficientemente grande para hacer un diagnóstico positivo mediante un examen directo. Pueden utilizarse varios medios. Los medios elegidos son el medio CPLM (cisteína/peptona/infusión de hígado y maltosa), el medio BGPS (extracto de carne/glucosa/peptona y suero), el medio de Clausen (Neopeptna-Lemco-extracto de hígado y glucosa), medio Diamond para tricomonas, medio Oxoid para *Trichomonas* y los sistemas de cultivo comerciales (11, 28, 32, 40). La inoculación de las muestras en los medios de cultivos debería realizarse lo antes posible después de la recogida. Es necesario procesar la muestra mediante centrifugación en las muestras recogidas mediante lavado prepucial. Entonces se examina el sedimento y se inocular en medios de cultivo.

También es importante asegurarse de que los medios de cultivo se utilicen antes de la fecha establecida de caducidad, ya que muchos medios no son estables. La calidad del agua empleada es importante, y puede añadirse a los medios un antifúngico para controlar el crecimiento de los hongos.

La detección inicial de los microorganismos puede realizarse mediante microscopía de campo claro, en un portaobjetos húmedo preparado directamente a partir de la muestra o el cultivo, o a través de la pared plástica del InPouch™ (sistema InPouch™ TF), utilizando el alfiler de plástico proporcionado especialmente, o los microorganismos pueden verse en un microscopio de campo claro estándar utilizando un aumento de 100 o superior. Puede ser útil un microscopio invertido para examinar los tubos que contienen medio de cultivo (de Diamond). Los medios de cultivo deberían examinarse microscópicamente después de la inoculación en intervalos desde el día 1 al día 7 (26). Los microorganismos pueden identificarse en base a los rasgos morfológicos característicos. Los microorganismos con forma de pera tienen tres flagelos anteriores y uno posterior, y una membrana ondulante que se extiende cerca del extremo posterior de la célula. También tienen un axostilo que normalmente se extiende más allá del extremo posterior de la célula. La microscopía de contraste de fases es muy valiosa para revelar estos rasgos, o también puede emplearse un procedimiento de tinción desarrollado recientemente (25). Ambas técnicas funcionan bien cuando se encuentran presentes un número relativamente alto de microorganismos, especialmente la técnica de tinción.

## **Procedimientos de cultivo.**

### **Medio de Diamond modificado.**

El material de vidrio utilizado para el cultivo debería lavarse en agua destilada (evitando el empleo de detergentes). El medio de Diamond modificado consiste en: 2 g de tripticasa de peptona, 1 g de extracto de levadura, 0,5 g de maltosa, 0,1 g de clorhidrato de L-cisteína, y 0,02 g de ácido L-ascórbico; y se lleva hasta 90 ml con agua destilada que contiene, de cada uno, 0,08 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y se ajusta hasta pH 7,2 -7,4 con hidróxido sódico o ácido clorhídrico. Después de la adición de 0,05 g de agar, el medio se autoclave durante 10 minutos a 121 °C, se deja enfriar hasta los 49°C, y entonces se añaden asépticamente 10 ml de suero bovino inactivado (inactivado mediante calentamiento hasta 56°C durante 30 minutos), 100.000

unidades de penicilina G cristalizada y 0,1g de sulfato de estreptomicina. El medio se reparte asépticamente en alícuotas de 10 ml en viales estériles de 16 x 125 mm con tapón de rosca, y se refrigeran a 4°C hasta su uso. Los medios deberían cultivarse hasta 7 días y las muestras examinarse en intervalos diarios (1, 26). La incorporación de agar en el medio limita a los microorganismos contaminantes en su mayoría a la porción superior del tubo del ensayo, mientras que ayuda a mantener las condiciones microaerófilas en el fondo del tubo, donde los tricomonas se encuentran en grandes cantidades.

### **Ensayo de cultivo de campo (InPouch™ TF).**

Cuando se requiere una combinación de comodidad y sensibilidad puede utilizarse una prueba de cultivo de campo (sistema InPouch™ TF) (1, 4, 32, 41, 46). Consiste en una bolsa de plástico transparente y flexible con dos cámaras. La cámara superior contiene un medio especial en el que se introduce la muestra. Las muestras de campo para la inoculación directa se recogerían normalmente mediante la técnica de raspado prepuccial (1, 41). Las muestras recogidas mediante lavado prepuccial requieren centrifugación antes de introducir el sedimento en la cámara superior. Después de mezclar, el medio se introduce en la cámara inferior, y entonces la bolsa se sella y se incuba a 37°C. El examen microscópico de los tricomonas puede realizarse directamente a través de la bolsa plástica (4). Los resultados del diagnóstico con muestras de toros utilizando bien el medio de Diamond o el sistema InPouch™ TF han mostrado que los dos métodos ofrecen resultados comparables o que hay algunas ventajas (en comodidad y resultados en el ensayo) con el sistema InPouch™ TF (4, 5, 24, 32, 41).

### **Sensibilidad y especificidad globales del ensayo de cultivo e identificación.**

Cualquier estimación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo de cultivo e identificación dependerá de la eficacia en la recogida de la muestra, el manejo y el procesamiento, así como la composición y calidad del medio de cultivo. Se ha estimado que la sensibilidad del sistema InPouch™ TF en los toros es de un 92% (95% de intervalo de confianza, 84-96%) (31),

para el Diamond y otros medios relacionados las estimaciones han sido variables, debido posiblemente a la variación en la composición y la preparación, aunque oscilan entre el 78% y el 99%. Hasta hace poco se ha asumido que la especificidad del ensayo de cultivo era del 100%, pero se trata probablemente de una sobreestimación.

Cada muestra tomada a partir de un toro en concreto que se sabe que está infectado no dará necesariamente un resultado de cultivo positivo. Incluso con las condiciones óptimas de muestreo, transporte, cultivo e identificación, debería obtenerse más de una muestra negativa antes de que exista una certeza razonable de que el animal no está infectado. Deberían calcularse valores de predicción negativos utilizando una estimación de la sensibilidad del ensayo de diagnóstico, y la probabilidad de infección preensayo del animal (31), para estimar la probabilidad de que un animal no se encuentre infectado. Existen pocas estimaciones de la sensibilidad de diagnóstico de la muestra estándar y el método de cultivo con las muestras de las hembras.

La infección en las hembras se elimina normalmente entre 90-95 días, de manera que puede ser difícil aislar microorganismos a partir de animales en fases tardías de su infección. En vacas jóvenes infectadas experimentalmente, se consiguió una sensibilidad aparente del 88% a lo largo de un periodo de 10 semanas después de la infección utilizando el método de cultivo InPouch™ TF (24).

El diagnóstico de un aborto inducido por *T. foetus* puede ser relativamente fácil cuando se recupera un feto abortado, debido al gran número de microorganismos demostrable en el contenido abomasal del feto o en los líquidos de la placenta. Además, pueden utilizarse técnicas inmunohistoquímicas en los fetos abortados para demostrar microorganismos de *T. foetus* invasores de tejidos.

### **Reacción en cadena de la polimerasa.**

Las técnicas moleculares que utilizan la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido aprovechadas para la identificación de

*T. foetus* (14, 21). El desarrollo de un ensayo diagnóstico de PCR ofrece varias ventajas potenciales, incluyendo una sensibilidad analítica aumentada, un tiempo de diagnóstico más rápido, y el hecho de que los microorganismos de la muestra recogida no necesitan ser viables. Investigaciones iniciales (14, 21) demostraron que los cebadores de ADN son capaces de detectar un número muy bajo de parásitos a partir de cultivos de laboratorio del organismo, sin la presencia de material prepucial. Sin embargo, en las muestras prepuciales se requiere un número más elevado de parásitos para proporcionar un resultado positivo del PCR; ello es debido probablemente a la inhibición por del esmegma prepucial. Se han descrito varias técnicas de extracción del ADN (14, 21, 34), y es probable que la sensibilidad del ensayo diagnóstico se encontrará influida por la eficiencia del método de extracción, y los procedimientos para superar a los inhibidores contaminantes. Se ha estimado que la sensibilidad diagnóstica de los ensayos de PCR es similar a la del sistema de cultivo InPouch™ TF (14, 21).

Sin embargo, se han analizado demasiado pocas muestras a partir de una población pequeña de toros infectados como para establecer un cálculo firme de la sensibilidad.

La especificidad de diagnóstico del ensayo de PCR depende de la especificidad de los cebadores. Un grupo de cebadores (21) originó productos no específicos de tamaño similar en aproximadamente un tercio de las muestras control negativo. Una pareja de cebadores basados en la secuencia 5.8s del rRNA han demostrado una buena especificidad de diagnóstico en muestras de animales negativos (14), aunque se necesita más trabajo con estos cebadores empleando diferentes poblaciones de animales. Estos cebadores rinden productos de amplificación a partir de algunos flagelados cercanos y relacionados (*Trichomonas suis*, *T. monilensis*, y un tricomonas de los gatos) que son indistinguibles de los de *T. foetus* (14, 18). Es posible que algunas de estas especies sean sinónimos de *T. foetus*. Un trabajo reciente ha demostrado que estos cebadores pueden utilizarse para distinguir entre *T. foetus* y tricomonas que no son *T. foetus*, y que a veces se encuentran en muestras prepuciales (3, 6, 33). Las técnicas basadas en el ADN tienen potencial como un ensayo primario o auxiliar (3, 6, 14, 29, 34). Aunque esta

tecnología representa una esperanza en la investigación, es necesario realizar más trabajos para evaluar y validar su aplicación en el diagnóstico clínico de las infecciones por *T. foetus*, antes de sustituir al método de cultivo como el ensayo diagnóstico rutinario.

### **Ensayos alternativos.**

En los años 40 se desarrollaron pruebas de aglutinación de mucus e intradérmicos, y todavía encuentran un uso limitado, aunque restringen su utilidad problemas de sensibilidad y especificidad. Se están desarrollando actualmente otros ensayos inmunológicos basados en el enzimoimmunoensayo (ELISA) (1, 17). Las técnicas inmunohistoquímicas que utilizan anticuerpos monoclonales han puesto de manifiesto microorganismos de *T. foetus* en tejidos fijados con formaldehído (38).

### **Prueba de aglutinación de mucus.**

En los años 40 se desarrolló una prueba de aglutinación de mucus (23, 26) 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 del mucus se recogen a partir de la región cervical de la vagina, preferiblemente unos pocos días después del estro. Los anticuerpos aparecen en el mucus cervical aproximadamente 6 semanas después de la infección, y persisten durante varios meses. Los anticuerpos también se pueden encontrar en las secreciones prepuciales (39, 43). El ensayo de aglutinación del mucus es más útil como un ensayo de rebaño, siendo capaz de detectar infecciones latentes o eliminadas recientemente. Es específico y no da reacción cruzada con *Campylobacter foetus* o *Brucella abortus*, aunque carece de sensibilidad. Para tomar la muestra cervical debería utilizarse un tubo de cristal de 30 cm de longitud, 9 mm de diámetro, y doblado en un ángulo de 150°C a aproximadamente 9 cm de un extremo, o una pipeta de inseminación artificial. No debería utilizarse aquel mucus que contenga sangre, y el animal debería muestrearse de nuevo. El suero contiene anticuerpos no específicos y hará que tenga lugar la aglutinación. El mucus se diluye 1/5 con suero fisiológico salino y se emulsiona en un tubo de Griffith. Se preparan muestras por duplicado

diluidas 1/10 y 1/20, pipeteando 2 ml de mucus y 2 ml de agar fundido (56°C en un baño con agua) en los tubos para la dilución 1/10, y 1 ml de mucus, 1 ml de tampón salino y 2 ml de agar fundido para la dilución 1/20. También se preparan controles por duplicado que contienen 2 ml de tampón salino y 2 ml de agar fundido. Todos los tubos se mantienen durante la mezcla en un baño con agua a 56°C y entonces se vierten individualmente en placas de Petri de 5 cm y se dejan enfriar. El antígeno para el ensayo se prepara añadiendo lentamente un cultivo de tricomonas a una mezcla 2/1 de tampón salino y glucosa al 1% para alcanzar una concentración de aproximadamente 100.000 microorganismos/ml (aproximadamente seis tricomonas/campo del microscopio a x400). A continuación, se añaden 1,5 ml de antígeno a cada placa de petri, y las placas se incuban durante 1,5 horas a 37°C, y se dejan a temperatura ambiente durante 1,5 horas más. Se considera positiva la aglutinación a una dilución de 1/10.

### **Ensayo intradérmico “Tricin”**

Se ha descrito un ensayo intradérmico para el diagnóstico de trichomonosis bovina (22). El lugar de inyección es en la piel del cuello, parecido al lugar que se utiliza en la prueba de la tuberculina. Se inyecta i/d una dosis de 0,1 ml del antígeno “Tricin” y la reacción se mide 30-60 minutos más tarde. La reacción consiste en un halo superficial que se observa visualmente y muestra un incremento >2 mm en el grosor de la piel.

### **Inmunohistoquímica en tejidos.**

En el feto abortado no existen lesiones específicas macroscópicas o microscópicas, y para realizar el diagnóstico es necesaria la identificación de los microorganismos. Se ha descrito una técnica Inmunohistoquímica para detectar *T. foetus* en la placenta y pulmones fetales de abortos bovinos fijados con formaldehído e incluidos en parafina empleando un anticuerpo monoclonal (Mab) (38). La tinción Inmunohistoquímica se realiza utilizando un sistema de marcaje con estreptavidina/biotina disponible comercialmente y un Mab (34.7C4.4) frente a *T. foetus*. En el protocolo, secciones de 4 µm

desparafinadas se incuban con el anticuerpo después de bloquear con un suero de cabra no inmune. Después de tres lavados en tampón las secciones se incuban durante 30 minutos a 37°C con inmunoglobulina biotinilada de cabra anti-ratón y anti-conejo. Después de tres lavados adicionales en tampón, la estreptavidina marcada con peroxidasa se aplica durante 30 minutos a 37°C, y la actividad enzimática se diluye con AEC (3-amino-9-etilcarbazol) al 3% en N, N dimetilformamida. Las secciones se tiñen por contraste con hematoxilina Gill II durante 3 minutos, se lavan y se aclaran en tampón durante 1 minuto. Este método se ha utilizado para diagnosticar abortos causados por *T. foetus*.

### **LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO.**

Las vacunas de células completas para vacas han mostrado ofrecer protección, y se encuentran disponibles comercialmente (9) bien como una “bacterina” monovalente, o como parte de una vacuna polivalente que también contiene *Campylobacter* y *Leptospira* spp. (vacuna CL) (1) (ver nota al pie 3).

Estos productos muestran eficacia en la hembra pero no en el toro (2). Este resultado contrasta con los primeros estudios en Australia en los cuales se consiguió la protección o incluso la eliminación en toros que recibieron fracciones de membrana o glicoproteína de *T. foetus* (7, 8). Se han puesto de manifiesto anticuerpos específicos en el suero y el mucus vaginal de vacas jóvenes inoculadas con una vacuna que contiene *T. foetus* (17). En este estudio, una vacuna de células muertas parcialmente efectiva no previno la infección, pero pareció permitir la desaparición de la infección en hembras vacunadas antes del momento de la gestación en que el feto se encuentra generalmente en un mayor riesgo de aborto. Se están buscando más vacunas efectivas que hagan uso de antígenos superficiales de membrana de *T. foetus*, y presentan el potencial de una vacuna recombinante (9, 16).

La vacuna de células enteras se produce cultivando *T. foetus* (cultivo VMC-84) en medio modificado de Diamond (9), y congelando el cultivo a -20°C durante 60 minutos. Después de descongelar se añade una suspensión de 5 x 10<sup>7</sup> microorganismos/ml en tampón salino fosfato a la vacuna CL.

## Bibliografía.

1. Bondurant R.H. (1997). pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. *vet. clin. north am. food anim. pract.*, **13**, 345–361.
2. Bondurant R.H., corbeil r.r. & corbeil l.b. (1993). immunisation of virgin cows with surface antigen tf1.17 of *tritrichomonas foetus*. *infect. immun.*, **61**, 1385–1394.
3. Bondurant R.H., gajadhar a., campero c.m., et al. (1999). preliminary characterization of a *tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial smegma of virgin bulls. *bov. pract.*, **33**, 124– 127.
4. Borchardt K.A., norman b.b., thomas m.w. & harmon w.m. (1992). evaluation of a new culture method for diagnosing *tritrichomonas foetus*. *vet. med.*, **87**, 104–112.
5. Bryan l.a., Cambell J.R. (1999). effects of temperature on the survival of *tritrichomonas foetus* in transport, diamond's and inpouch™ tf media. *vet. rec.*, **144**, 227–232.
6. Campero C.M., Rodriguez Dubra c., Bolondi a., Cacciato c., Cobo e., Perez s., Odeon a., Cipolla a. (2003). Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T.foetus* trichomonads from genitalia of virgin bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.*, **112**, 167–175. 26. Campero, C.M., 1985, Medios de Transporte para *Tritrichomonas foetus*. *Rev Med Vet* 66, 200-209.
27. Campero, C.M., 1988, Inflammation of the accessory sex glands and immunopathological studies of the genitalia of the bull. PhD Thesis. Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.
28. Campero, C.M., 1992, Medios de cultivo para *Tritrichomonas foetus*: consideraciones generales. *Vet Arg* 9, 318-323.
29. Campero, C.M., 2000a, Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Anales* 53, 88-112.
30. Campero, C.M., 2000b, Inmunidad local e inmunopatología de las enfermedades venéreas en el tracto genital bovino. Libro de la Segunda Reunión Argentina de Patología Veterinaria, 27 -
- 29 de septiembre del 2000, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.
31. Campero, C.M., 2002, Eficiencia productiva del rodeo de cría. *Rev. Idia XXI* 2, 127-131.
32. Campero, C.M.; Palladino, M.R., 1983, Presencia de cepas de *Tritrichomonas foetus* quimioresistentes en Argentina. *Gaceta Vet* 45, 899-909.

33. Campero, C.M., Ladds, P.W., 1991, Cuantificación de inmunoglobulinas en fluidos genitales y células contenedoras de inmunoglobulinas en el tracto genital de toros vacunados y desafiados con *Trichomonas foetus*. Rev Med Vet 72, 36-39.
34. Campero, C.M., Palladino, M.R., Villar, J.A, 1983, Actualización sobre Trichomoniasis Bovina. Rev Arg Prod Anim 3, 387-432.
35. Campero, C.M.; Palladino, M.R.; Spina, M.E., 1984, Empleo de dos métodos de cultivo para *Trichomonas foetus*. Therios 4, 268-279.
36. Campero, C.M., Catena, M.C., Medina, D., 1986, Caldo infusión hígado para el cultivo de *Trichomonas foetus*. Vet Arg 3, 80-81. Sitio Argentino de Producción Animal
37. Campero, C.M., Ballabene, N., Cipolla, A., Zamora, A., 1987a, Dual infection of bulls with campylobacteriosis and trichomoniasis: treatment with dimetridazole chlorhydrate. Aust Vet J 64, 320-321.
38. Campero, C.M., Catena, M., Demayo, M., 1987b, Tratamiento de toros infectados con *Trichomonas foetus* resistentes en rodeos de cría de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Vet Arg 4, 234-240.
39. Campero, C.M., Ladds, P.W., Hirst, R.G., Vaughan, D.E., Emery, J.A., 1989, Detection of *Trichomonas foetus* antigens in formalin-fixed, paraffin embedded sections by the peroxidase antiperoxidase technique. Aust Vet J 66, 264-266.
40. 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 bull by ELISA after vaccination and challenge with *Trichomonas foetus*. Aust Vet J 67, 175-178.
41. Campero, C.M., Conosciuto, G., Odriozola, E., Moreira, A.R., Lodeiro, R., García Boissou, R., Hernaiz, R., 1992, Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos en vacas lecheras asociados con problemas reproductivos. Rev Med Vet 73, 264-272.
42. Campero, C.M., Cano, D., Pinilla, G., García, J.P., 1993a, Infección a *Trichomonas foetus* en toros como secuela de la prueba de capacidad de servicio sobre vaca infectada. Vet Arg 10, 164-168.
43. Campero, C.M., Patitucci, A., Medina, D., 1993b, Tricomoniasis bovina: infección experimental y natural en hembras. Vet Arg 10, 662-670.
44. Campero, C.M., Medina, D., Rossetti, O., Marcovecchio, F., Cosentino, B., Marcone, J., Carracino, M., 1998, Vacunación subcutánea e intravaginal contra tricomoniasis en vaquillonas. Rev Med Vet 79, 347-353.
45. Campero, C., Rossetti, O., Medina, D., Bretschneider, G., Roppel, M., 1999, Inmunización en vaquillonas mediante vacuna de membrana de *Trichomonas foetus*. Vet Arg 154, 250-262.
46. Campero, C.M., Anderson, M.L., Bondurant, R.H., Cobo, E.R., 2000, Evidencia de *Trichomonas foetus* mediante inmunohistoquímica en tejidos bovinos infectados. XXI Congr. Mundial Buiatría A: 10903, abs: 096.

47. Campero, C.M., Rodriguez Dubra, C., Bolondi, A., Cacciato, C., Cobo, E., Perez, S., Odeon, A., Cipolla, A., BonDurant, R.H., 2003a, Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. *Vet Parasitol* 112, 167-175.
48. Campero, C.M., Moore, D.P., Odeón, A.C., Cipolla, A.L., Odriozola, E., 2003b, Etiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Comm* 27, 359-369.
7. Clark B.L., Dufty J.H. & Parsonson I.M. (1983). Immunisation of bulls against trichomoniasis. *Aust. Vet. J.*, **60**, 178–179.
8. Clark B.L., Emery D.L. & Dufty J.H. (1983). Therapeutic immunisation of bulls with the membranes and glycoproteins of *Tritrichomonas foetus* var *brisbane*. *Aust. Vet. J.*, **61**, 65–66.
9. Corbeil I.b. (1994). Vaccination strategies against *trichomonas foetus*. *parasitol. today*, **10**, 103–106.
10. Hiamond I.s. (1983). Lumen dwelling protozoa: entamoeba, trichomonads and giardia. *en: in vitro* cultivation of protozoan parasites, jensen j.b., ed. crc press, boca raton, florida, usa, 65–109.
11. eaglesome M.D. Garcia M.M. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. part 1. *brucella*, *leptospira*, *campylobacter fetus* and *trichomonas foetus*. *vet. bull*, **62**, 743–775.
12. Elder J.K. (1964). Examination of twelve strains of *trichomonas foetus* (reidmuller) isolated in queensland and the description of a new serotype, *t. foetus* var. *brisbane*. *queensl. j. agric. sci.*, **21**, 193–203.
13. European union (1988). Council directive eec 88/407 of 14th june 1988 laying down the animal health requirements applicable to intra-community trade in and imports of deep-frozen semen of domestic animals of the bovine species. *off. j. european communities council*, **194**, 10–23.
14. Felleisen R.S.J., 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. *j. clin. microbiol.*, **36**, 513–519.
15. Fitzgerald p.r. (1986). Bovine trichomoniasis in parasites: epidemiology and control. *vet. clin. n. am. food anim. pract.*, **2**, 277–282.
16. Gault R.A., Hall M.R., kvasnicka w.g. Hanks D.R. (1999). Characterisation of antigenic proteins from *trichomonas foetus* recognised by antibodies in rabbit, serum, bovine serum and bovine cervicovaginal mucus. *j. parasitol.*, **85**, 244–251.

17. 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 *trichomonas foetus*. *am. j. vet. res.*, **56**, 454–459.
18. Gookin j.l., Birkenheuer a.j., Breitschwerdt e.b. & levy m.g. (2002). Single-tube nested pcr for detection of *trichomonas foetus* in feline feces. *j. clin. microbiol.*, **40**, 4126–4130.
19. Gregory M.W., Ellis b Redwood d.w. (1990). Comparison of sampling methods for the detection of *trichomonas foetus*. *vet. rec.*, **127**, 16.
20. Hammond d.m. Bartlett d.e. (1943). the distribution of trichomonas foetus in the preputial cavity of infected bulls. *am. j. vet. res.* **4**,143–149.
21. Ho m.s.y., Conrad p.a., Conrad p.j., Lefebvre r.b., Perez b. Bondurant r.h. (1994). the detection of bovine trichomoniasis with a specific dna probe and pcr amplification system. *j. clin. microbiol.*, **32**, 98– 104.
22. Kerr w.r. (1944). the intradermal test in bovine trichomoniasis. *vet. rec.*, **56**, 303–305.
23. Kerr w.r. Robertson m. (1941). An investigation into the infection of cows with *trichomonas foetus* by means of the agglutination reaction. *vet. j.*, **97**, 351–363.
24. 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 *trichomonas foetus* in beef heifers. *j. am. vet. med. assoc.*, **213**, 519–522.
25. Lun z.-r. Gajadhar a.a. (1999). A simple and rapid method for staining *trichomonas foetus* and *trichomonas vaginalis*. *j. vet. diagn. invest.*, **11**, 471–474.
26. Lun z.-r., Parker s. Gajadhar a.a. (2000). Comparison of growth rates in *trichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *vet. parasitol.*, **89**, 199–208.
27. Mancebo o.a., Russo s.m., Carabajal I.I. & monzon c.m. (1995). Persistence of *trichomonas foetus* in Naturally infected cows and heifers in argentina. *vet. parasitol.*, **59**, 7–11.
28. Ministry OF Agriculture, Fisheries AND Food (MAFF) (1986). Manual of Veterinary Parasitological Techniques, Reference Book 418. HMSO, London, UK.
29. 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 médium on the test. *Theriogen.*, **60**, 1269–1278.

30. Ostrowski j.e.b., Baigun r., Frene a.j., Rodriguez Dubrac c. Rutter r. (1974). Obtencion de muestras prepuciales para el diagnostico de *Trichomonas foetus* por raspado de mucosa. *Rev Med. Vet.*, **55**, 525–528.
31. Parker s., Campbell j.r., Ribble c. Gajadhar a.a. (1999). Comparison of two sampling tools for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls and clinical interpretation of culture results. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **215**, 231–235.
32. Parker s., Campbell j. Gajadhar a. (2003). 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. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 460–465.
33. Parker s., Campbell j., Mcintosh k., Gajadhar a. (2003). Diagnosis of trichomoniasis in 'virgin' bulls by culture and polymerase chain reaction. *Can. Vet. J.*, **44**, 732–734.
34. 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. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 508–513.
35. Parsonson I.M., Clark B.L. & Dufty J.H. (1974). The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection of the bull. *Aust. Vet. J.*, **50**, 421–423.
36. Pierce A.C. (1949). The mucus agglutination test for the diagnosis of bovine trichomoniasis. *Vet. Rec.*, **61**, 347–349.
37. Reece R.L., Dennett D.P. & Johnson R.H. (1983). Some observations on cultural and transport conditions for *Trichomonas foetus* var brisbane. *Aust. Vet. J.*, **60**, 62–63.
38. Rhyan J.C., Wilson K.L., Bengess D.E., Staokhouse L.L. & Quinn W.J. (1995). The immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 98–101.
39. 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. *Vet. Pathol.*, **36**, 406–411.
40. Ribeiro L.M.M. (1990). An efficient medium for the isolation of *Tritrichomonas foetus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **57**, 209–210.
41. Schonmann M.J., Bondurant R.H., Gardner L.A., Van Hoosear K., Baltzer W. & Kachulis C. (1994). Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *Vet. Rec.*, **134**, 620–622.
42. Skirrow S.Z. & Bondurant R.H. (1988). Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, **58**, 591–603.

43. Soto P., Parma A.E. (1989). The immune response in cattle infected with *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, **33**, 343–348.
44. Soulsby E.J.L. (1982). Helminths. Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Seventh Edition. Balliere Tindall, London, UK, 556–561.
45. Taylor M.A., Marshall R.N. & Stack M. (1994). Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br. Vet. J.*, **150**, 73–80.
46. Thomas M.W., Marmon W.M. White c. (1990). An improved method for the detection of *Tritrichomonas foetus* infection by culture in bulls. *Agri-Practice*, **11**, 13–17.
47. Warton A. & Honigberg B.M (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *J. Protozoot.*, **26**, 56–62.
- Estado actual de la enfermedad.