

TRICOMONOSIS

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La tricomonosis es una enfermedad venérea del ganado bovino causada por *Tritrichomonas foetus*, un parásito protozoario flagelado.

La tricomonosis es asintomática en los toros, sin embargo, en las vacas se caracteriza por infertilidad, aborto, muerte fetal embrionaria y temprana, maceración fetal, piometra y secreción vaginal. La enfermedad tiene una distribución mundial, y en algún momento fue de gran importancia económica como causa de aborto e infertilidad, especialmente en el ganado lechero. El uso generalizado de la inseminación artificial en muchos lugares del mundo ha contribuido a la reducción de la prevalencia. Sin embargo, la tricomonosis sigue siendo importante en países con prácticas agrícolas extensivas, en las que no se utiliza la inseminación artificial.

La transmisión de la enfermedad se produce principalmente por el coito, pero puede producirse transmisión mecánica por los instrumentos de inseminación o por el examen del aparato reproductor de la hembra. El microorganismo puede sobrevivir en semen, completo o diluido, a 5°C. Los toros de más de 3–4 años son el principal reservorio del parásito, ya que tienden a ser portadores a largo plazo, mientras que la mayoría de las vacas y toros jóvenes (de menos de 3 años) pueden eliminar la infección espontáneamente. Por estas razones, para diagnosticar y controlar la enfermedad en los rebaños generalmente se prefieren las muestras de toros.

Identificación del agente mediante cultivo in-vitro y microscopía: *Tritrichomonas foetus* es un parásito protozoario piriforme flagelado, de aproximadamente 8–18 µm de largo y 4–9 µm de ancho, con tres flagelos anteriores y uno posterior y una membrana ondulante. Estos microorganismos se desplazan con movimientos bruscos y se ven en pruebas de cultivos de muestras prepuciales de toros infectados y de lavados vaginales o moco cervicovaginal de vacas infectadas, y algunas veces en fetos abortados. *Tritrichomonas foetus* se puede cultivar in vitro, y se puede ver en preparaciones húmedas o portaobjetos teñido. El método de diagnóstico estándar para los toros implica la obtención, el examen y el cultivo apropiados de esmegma del prepucio y del pene, mientras que en las vacas, la muestra preferida es el moco vaginal. Se puede obtener esmegma por varios medios, como el lavado prepucial, o el raspado de la cavidad prepucial y del glande del pene al nivel del fórnix con una pipeta de inseminación seca. Existen varios medios de cultivo in vitro, como un kit comercial de análisis para usar en condiciones de campo, que favorece el crecimiento de tricomonas y permite el examen al microscopio óptico.

Identificación del agente por métodos moleculares: La tricomonosis bovina también se puede detectar por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tanto la PCR convencional como la cuantitativa en tiempo real se han utilizado con éxito en la identificación de *T. foetus* y en el diagnóstico de la tricomonosis. Ambos métodos se han usado en combinación con cultivo o sin ningún otro método. La PCR convencional tiene mayor sensibilidad cuando se combina con el cultivo, mientras que la PCR cuantitativa se ha utilizado con éxito en muestras clínicas. La PCR cuantitativa en tiempo real ha sido validada tanto en EE.UU. como en Canadá y ahora está disponible en forma de kit comercial. Esta prueba también se usa de forma habitual en Australia.

Pruebas serológicas: Se ha intentado desarrollar pruebas inmunológicas, como una prueba de aglutinación que usa moco recogido del cuello uterino y un antígeno fabricado a partir de microorganismos cultivados, y se han utilizado como pruebas de diagnóstico a nivel de rebaño. Sin embargo, carecen de sensibilidad y no se utilizan para el diagnóstico de la tricomonosis a nivel individual.

Requisitos para las vacunas: Existe una vacuna comercial de células completas muertas, en forma de vacuna monovalente o parte de una vacuna polivalente, que contiene *Campylobacter* y *Leptospira* y que se ha observado que es parcialmente eficaz.

A. INTRODUCCIÓN

Descripción e importancia de la enfermedad: La tricomonosis es una enfermedad bovina venérea causada por el parásito protozoario flagelado *Tritrichomonas foetus*.

Agente patógeno causal: *Tritrichomonas foetus* pertenece al género *Tritrichomonas*, de la familia *Trichomonadidae*. *Tritrichomonas foetus* es piriforme, mide 8–18 µm de largo y 4–9 µm de ancho, y tiene tres flagelos anteriores y uno posterior, y una membrana ondulante. Los microorganismos vivos se desplazan con movimientos espasmódicos y giratorios, y pueden detectarse mediante microscopía óptica. Se debe usar microscopía de campo oscuro con contraste de fase u otros métodos para observar los detalles necesarios para la identificación. Se han publicado descripciones morfológicas detalladas, que incluyen estudios de microscopía electrónica (Warton y Honigberg, 1979). *Tritrichomonas foetus* solo tiene el estadio de trofozoíto y se multiplica por fisión binaria longitudinal; la reproducción sexual no se sabe que ocurra. Se reconocen tres serotipos según la prueba de la aglutinación (Skirrow & BonDurrant, 1988): la cepa “Belfast”, descrita predominantemente en Europa, África y EE. UU. (Gregory *et al.*, 1990); la cepa ‘brisbane’, descrita en Australia (Elder, 1964) y la cepa ‘manley’, que ha sido descrita en solo unos pocos brotes (Skirrow & BonDurrant, 1988).

Los hospedadores habituales de *T. foetus* son bovinos (*Bos taurus*, *B. indicus*). El tracto gastrointestinal bovino alberga otros varios tricomonas comensales, como *Pentatrichomonas hominis*, *Tetratrichomonas buttrei*, *Tetratrichomonas pavlova*, *Tritrichomonas enteris* y *Pseudotrichomonas*, que a menudo contaminan muestras prepuciales (Taylor *et al.*, 1994). El número de flagelos, observados bajo luz de contraste de fases o después de la tinción, es una característica morfológica importante que puede ayudar a diferenciar *T. foetus* de otros parásitos flagelados bovinos. Sin embargo, los tricomonas distintos de *T. foetus* a menudo son difíciles de distinguir de *T. foetus* en función del cultivo y la morfología (Taylor *et al.*, 1994).

Tritrichomonas suis, un microorganismo comensal de los cerdos, y *T. foetus*, que afecta a los bovinos, son indistinguibles morfológicamente, serológicamente y antigénicamente. El uso de técnicas moleculares modernas, como el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), el análisis del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), el análisis de las repeticiones de longitud variable (VLR) y los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basados en espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 y 2) respaldan la opinión de que estas dos especies son idénticas (Tachezy *et al.*, 2002). Más recientemente, se descubrió que *T. foetus* y *T. suis* son idénticos en 9/10 loci, y el uso del sinónimo senior de *T. suis* ha sido suprimido a favor de *T. foetus* (Šlapeta *et al.*, 2012).

Tritrichomonas foetus ha sido descrito en gatos domésticos, caballos y corzos. Otras especies, como cabras, cerdos, perros, conejos y cobayas, han sido infectadas experimentalmente (Levine, 1973). *Tritrichomonas foetus* también se ha aislado de gatos con diarrea y ahora se conoce comúnmente como el *T. foetus* “genotipo gato” (Šlapeta *et al.*, 2012). También se ha descrito que *Tritrichomonas foetus* causa infecciones en humanos, como meningoencefalitis y peritonitis en individuos inmunodeprimidos e inmunodeprimidos (Yao, 2012).

La transmisión de la infección tiene lugar a través del coito, o por examen del tracto reproductor de las vacas con instrumentos contaminados. También puede ocurrir por inseminación artificial (IA), ya que el semen de toros infectados puede resultar contaminado pasivamente por *T. foetus* presente en la cavidad prepucial. Por lo tanto, todos los toros deben analizarse periódicamente para comprobar si están infectados por *T. foetus*. En los lugares en los que se usa la IA junto con una monitorización diagnóstica y el sacrificio de toros infectados, la tricomonosis se controla; sin embargo, todavía prevalece en las Américas, Australia, Sudáfrica y los países de Europa del Este donde aún se practica la ganadería extensiva y se permite el apareamiento natural.

En los toros, el sitio de infección es principalmente la cavidad prepucial (BonDurant, 1997), en cuyo caso la enfermedad cursa con poca o ninguna manifestación clínica. En el caso de los toros mayores de 3–4 años, la recuperación espontánea rara vez ocurre, lo cual da lugar a una fuente permanente de infección en los rebaños. En toros menores de 3-4 años, la infección puede ser transitoria. Una de las medidas propuestas para controlar la infección por *T. foetus* en un rebaño es el uso de toros menores de 3-4 años en lugar de toros mayores de 3–4 años (Yao, 2013).

Tritrichomonas foetus está presente en pequeñas cantidades en la cavidad prepucial de los toros infectados, con cierta concentración en el fórnix y alrededor del glande (BonDurant, 1997). Los toros infectados crónicamente no presentan lesiones macroscópicas. En la vaca infectada, la lesión inicial es una vaginitis que, en animales gestantes, ocasiona la invasión del cuello uterino y el útero. Se pueden producir varias secuelas, como una

placentitis que conducirá a un aborto temprano (1-16 semanas), secreción uterina y piometra. En algunos casos, a pesar de la infección, la gestación no termina con el aborto y nace un ternero normal y a término. A nivel de rebaño, las vacas pueden, después de la infección, presentar ciclos estrales irregulares, secreción uterina, piometra o aborto temprano (BonDurant, 1997; Skirrow & BonDurrant, 1988). Las vacas generalmente eliminan la infección en 90 días y adquieren una protección inmunitaria de corta duración contra *T. foetus* durante un período de al menos un año, y, en algunos casos, de hasta tres años (BonDurant, 1997).

Diagnóstico diferencial: se deben descartar enfermedades como la campilobacteriosis, la leptospirosis, la brucelosis, la neosporosis, la clamidiosis, la diarrea vírica bovina, la rinotraqueítis infecciosa bovina y la anaplasmosis, que pueden causar signos clínicos como infertilidad, vaginitis, piometra, abortos y secreción vaginal.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la tricomonosis y su propósito

Método	Propósito					
	Determinar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones post-vacunación
Identificación del agente¹						
Microscopía para identificación morfológica	+++	++	+++	+++	++	n/a
PCR convencional en muestras clínicas	+	++	–	++	–	n/a
PCR convencional en combinación con cultivo	++	+++	–	+++	+	n/a
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	++	n/a

Clave: +++ = método recomendado, validado para el fin indicado; ++ = método adecuado, pero puede precisar una validación posterior; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad; n/a = no aplicable.
PCR = reacción en cadena de la polimerasa

1. Identificación del agente

Un diagnóstico provisional de tricomonosis como causa de fracaso reproductivo en un rebaño se basa en la historia clínica, los signos de aborto temprano, repetidos intentos de inseminación o ciclos estrales anormales. La confirmación de la infección se basa la demostración de *T. foetus* en el líquido de la placenta, el contenido gástrico del feto abortado, los lavados uterinos, la secreción debida a la piometra, el moco vaginal o el esmegma prepucial. En rebaños infectados, el material más fiable para el diagnóstico es el lavado o raspado prepucial o vaginal (Buller & Corney, 2013; Yao, 2013).

La cantidad de microorganismos varía según las situaciones. Son numerosos en el feto abortado, en el útero varios días después del aborto y, en las vacas recién infectadas, en el moco vaginal 12-20 días después de la infección. En el toro infectado, *T. foetus* está presente en la mucosa del prepucio y del pene, aparentemente sin invadir los tejidos de la submucosa. Antes de tomar una muestra

1 Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

prepucial, en general se recomienda esperar al menos 1 semana después de la última monta o inseminación.

1.1. Técnicas de obtención y condiciones de transporte de las muestras

Se han descrito varias técnicas para recoger muestras prepuciales de toros o muestras vaginales de vacas. Es importante evitar la contaminación fecal, ya que puede introducir protozoos intestinales que pueden confundirse con *T. foetus* (Taylor *et al.*, 1994). La contaminación de las muestras debe minimizarse mediante la eliminación de material extraño y de pelo sucio alrededor del orificio prepucial o de la vulva; sin embargo, se debe evitar la limpieza de esta zona, particularmente con desinfectantes, ya que ello puede reducir la sensibilidad del diagnóstico.

Las muestras recogidas de toros, vacas y fetos abortados se analizan por métodos convencionales (examen directo y cultivo) o por métodos moleculares. Las técnicas de muestreo son las mismas en ambos casos; sin embargo, las muestras para cultivo se inoculan en medio de transporte o medio de cultivo, mientras que las de biología molecular se pueden recoger en medio o en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en solución salina normal.

1.1.1. Obtención de muestras: toros

Las muestras de toro se pueden obtener por tres métodos: raspado, cepillado o lavado (Buller y Corney, 2013; Yao, 2013):

- i) El raspado de la mucosa prepucial y peneana con una pipeta de inseminación artificial (conectada a una jeringa o una perilla a través de un tubo de goma de silicona) es una técnica común.
- ii) Se pueden usar cepillos especiales de metal o plástico para recolectar esmegma del pene y el prepucio (Yao, 2013). Para este fin, se comercializan cepillos desechables de plástico con un orificio en la punta ('cepillo' hueco o raspador). Son fáciles de usar y rápidos. La herramienta se frota suavemente sobre la superficie del pene y el prepucio interno cerca del fórnix. El esmegma recolectado se enjuaga en ~5 ml de PBS o solución salina normal, o medio.
- iii) El lavado prepucial sigue siendo una técnica común. Se inserta un tubo de plástico fuerte conectado a una perilla de goma en toda la longitud de la cavidad prepucial y esta se lava con 20-30 ml de PBS a pH 7.2 o solución salina normal.

No se recomienda recoger lavados de la vagina artificial después de la recolección del semen debido a la baja sensibilidad diagnóstica (Gregory *et al.*, 1990).

Las técnicas de muestreo para toros han sido comparadas por varios laboratorios (revisado en Yao, 2013). Los resultados indican que los tres métodos, es decir, cepillado, raspado y lavado, proporcionan una sensibilidad analítica similar, independientemente del método de diagnóstico implementado posteriormente, es decir, cultivo o PCR. Por lo tanto, las técnicas de muestreo deben elegirse en función del contexto y de las condiciones locales.

Varios laboratorios han examinado el efecto de un muestreo repetido sobre la sensibilidad diagnóstica (revisado en Yao, 2013). Para una sensibilidad óptima (95% o más), la primera toma de muestras debe realizarse después de un descanso sexual de 1 semana y deben tomarse muestras de los toros y analizarse tres veces a intervalos semanales.

1.1.2. Obtención de muestras: vacas

Las muestras de las vacas se recogen lavando la vagina o raspando el cuello uterino con una pipeta de inseminación artificial o un cepillo. El moco recogido se enjuaga en ~5 ml de PBS o solución salina normal (si se desea PCR), o en medio.

1.1.3. Muestras de fetos abortados

Los abortos debidos a *T. foetus* pueden ocurrir en cualquier momento de la gestación, a partir de los 2 meses en adelante, pero se producen con mayor frecuencia a los 3-5 meses (Buller y Corney, 2013). Cuando se producen abortos en este período y se sospecha la infección por *T. foetus*, se deben tomar muestras de la placenta y de los líquidos fetales, así como de los pulmones del feto abortado (Buller y Corney, 2013). También se ha descrito que el contenido abomasal contiene un alto número de *T. foetus* (Rhyan *et al.*, 1988).

Cuando las muestras deben enviarse a un laboratorio y no pueden entregarse dentro de las siguientes 24 horas, se debe usar un medio de transporte que contenga antibióticos (p. ej., un caldo de tioglicolato con antibióticos [Bryan *et al.*, 1999] o una bolsa de plástico comercial). El PBS no es un buen medio de transporte si las muestras van a ser cultivadas (Bryan *et al.*, 1999).

Durante el transporte, los microorganismos deben estar protegidos de temperaturas extremas, especialmente si los cultivos deben realizarse en el laboratorio. La temperatura debe mantenerse por encima de los 5°C y por debajo de los 37°C durante todo el transporte (Bryan *et al.*, 1999). El transporte a 25°C seguido de cultivo a 37°C se considera óptimo para la supervivencia y el crecimiento de *T. foetus* (Buller y Corney, 2013).

En conclusión, para elegir las técnicas de obtención de las muestras y de diagnóstico deben tenerse en cuenta varios factores, como las condiciones y posibilidades de transporte, y la duración prevista del transporte.

1.2. Identificación de *T. foetus* mediante examen directo o en cultivo

1.2.1. Detección directa de los parásitos

Se puede intentar la detección directa de los parásitos por microscopía inmediatamente después de la obtención de la muestra o al recibir la muestra en el medio de transporte (ver a continuación los criterios de examen e identificación). Sin embargo, los microorganismos son a menudo demasiado escasos como para que se pueda llevar a cabo una detección directa de las muestras originales. Por lo tanto, deben prepararse cultivos para permitir la multiplicación de los parásitos por encima del límite de detección (alrededor de 10⁴/ml, Bryan *et al.*, 1999).

1.2.2. Cultivo

Las muestras deben inocularse en medios de cultivo tan pronto como sea posible después de su obtención y luego incubarse a 30°C–37°C, durante 48–72 horas o más, dependiendo del medio de cultivo utilizado, antes de ser examinadas (véase la Sección B.1.2.2.1). Los medios inoculados no deben enfriarse ni refrigerarse, ya que ello afectaría la supervivencia de *T. foetus*.

1.2.2.1. Medios de cultivo

Se pueden usar varios medios de cultivo. El medio de tricomonas de Diamond se ha usado mucho durante décadas con algunas modificaciones a lo largo del tiempo (Bryan *et al.*, 1999). Sin embargo, se pueden utilizar otros, como el caldo de infusión de hígado (Lun *et al.*, 2000), también denominado medio TFM, y los medios de Clausen y de Oxoid. También se comercializan kits de cultivo.

a) Composición de tres medios de cultivo de uso frecuente

i) Medio de Diamond modificado (Bryan *et al.*, 1999; Lun *et al.*, 2000)

El medio de Diamond modificado consiste en: 2 g de tripticasa peptona, 1 g de extracto de levadura, 0,5 g de maltosa, 0,1 g de L-hidrocloruro de cisteína, y 0,02 g de L-ácido ascórbico, y se prepara con 90 ml de agua destilada que contenga 0,08 g de K₂HPO₄ y 0,08 g de KH₂PO₄; se ajusta a un pH de 7,2–7,4 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Tras haber añadido 0,05 g de agar, el medio se autoclava durante 10 minutos a 121°C y después se deja enfriar a 49°C, y a continuación se añaden, de forma aséptica, 10 ml de suero bovino inactivado (inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos), 100.000 unidades de penicilina C cristalina y 0,1 g de sulfato de estreptomina. El medio se distribuye de forma aséptica en alícuotas de 10 ml en viales de tapón de rosca de 16 × 125 mm y se conserva a 4°C hasta su uso.

La incorporación de agar en el medio confina a los microorganismos contaminantes en gran parte a la parte superior del medio de cultivo, mientras que ayuda a mantener las condiciones microaerófilas en la parte inferior, donde hay mayor número de tricomonas.

ii) Medio para *Tritrichomonas foetus* (TFM) (basado en medio de Plastridge modificado)

El medio TFM consiste en: 12,5 g de digesto de hígado neutralizado y 5 g de triptosa disueltos en 500 ml de agua destilada. El pH se ajusta a 7,4 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Tras agregar 1,5 g de agar Bacto, el medio se autoclava durante 15 minutos a 121°C. Se prepara una solución de antibióticos que contenga 0,75 g de penicilina y 0,082 g de estreptomina en 100 ml de agua destilada. Para preparar 1 litro del medio TFM, se combinan 500 ml del medio basal con 500 ml de suero bovino inactivado estéril y 10 ml de la solución de antibióticos. Este medio se puede conservar a -20°C.

Cuando se requiere una combinación de comodidad y sensibilidad, se puede usar un kit combinado de cultivo y transporte de muestras (BonDurant, 1997; Borchardt *et al.*, 1992). Este kit consiste en una bolsa de plástico flexible transparente 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 en la bolsa de cultivo normalmente se recogerían mediante la técnica de raspado prepucial (BonDurant, 1997). Las muestras recogidas por lavado prepucial requieren una centrifugación antes de la introducción del sedimento en la cámara superior. Después de la mezcla, el medio se introduce en la cámara inferior, y la bolsa se sella y se incuba a 37°C. El examen microscópico para tricomonas se puede hacer directamente a través de la bolsa de plástico (Borchardt *et al.*, 1992).

La calidad del agua utilizada es importante, y se puede agregar un antifúngico a los medios para controlar el crecimiento de levaduras.

Se deben realizar verificaciones de control de calidad que incluyan controles de esterilidad en todos los lotes de medios.

Es importante asegurarse de que los medios de cultivo se utilicen antes de la fecha de caducidad establecida, ya que muchos medios no son estables. Los medios de fabricación propia normalmente deberían conservarse durante un período de tiempo no superior a 1 mes a 5°C ± 3°C.

b) Características de crecimiento en cada medio

Lun *et al.* (2000) probaron los tres medios descritos anteriormente, es decir, el medio líquido de infusión de hígado de Diamond y un kit de cultivo comercial. Descubrieron que los tres medios permitían el crecimiento de *T. foetus* a 37°C. Se probaron dieciséis cepas de diversos orígenes geográficos. Las características de crecimiento de estas cepas fueron diferentes en función del medio. En el caso de las cepas cultivadas en Diamond, la cinética de crecimiento pareció menos variable entre cepas, y la concentración máxima tendió a alcanzarse antes (entre los días 2 y 4 post-inoculación) y fue generalmente más alta (más de 107 microorganismos por ml) que con los otros dos medios. Sin embargo, en el medio de Diamond, los parásitos murieron más rápido después de alcanzar la concentración máxima. Esto tiene implicaciones para el seguimiento de los cultivos (véase la Sección B.1.2.3).

1.2.2.2. Inoculación en los cultivos

Es deseable procesar mediante centrifugación las muestras recogidas por lavado prepucial o lavado vaginal. Si las condiciones de muestreo en el campo no permiten el uso de una centrífuga, las muestras deben decantarse durante 15–20 minutos sobre una mesa. Luego se inocula un volumen de aproximadamente 1 ml o menos del sedimento o el precipitado de la etapa de centrifugación en los medios de cultivo.

Cuando se utilizan dispositivos comerciales para la toma de muestras que van equipados con un cepillo desechable, después de haber obtenido la muestra, este último se corta asépticamente de tal forma que caiga directamente en el medio de cultivo.

1.2.2.3. Condiciones de los cultivos

Los cultivos deben mantenerse a una temperatura de entre 30°C y 37°C. En ningún caso, la temperatura de incubación debe superar los 37°C.

Se debe cultivar una cepa de *T. foetus* en paralelo con las muestras problema, a modo de control.

Es aconsejable comenzar a examinar los medios de cultivo microscópicamente los días 2–4 después de la inoculación, lo cual, en la mayoría de los medios corresponderá a la concentración máxima. Si se utiliza el medio de Diamond, se puede realizar un único examen el día 2–4, ya que los parásitos empezarán a desaparecer rápidamente de este medio desde el día 5 en adelante (Lun *et al.*, 2000). Con otros medios que permiten un crecimiento más lento, como la infusión de caldo de hígado y, aún más, los medios comerciales, se recomienda examinar los cultivos periódicamente después del examen inicial hasta el día 7 después de la inoculación (Bryan *et al.*, 1999; Lun *et al.*, 2000). Un único examen en el día 7 es una opción alternativa con los medios que permiten un crecimiento más lento de *T. foetus* que Diamond (Sección B.1.2.3).

En conclusión, debe destacarse que los diferentes medios de cultivo descritos anteriormente son igualmente válidos siempre que los procedimientos de cultivo sigan los requisitos generales y estén adaptados al tipo de medio. Los laboratorios deben evaluar qué es lo más adecuado para ellos en su propio contexto, dadas sus instalaciones y experiencia, y teniendo en cuenta las consideraciones climáticas, logísticas y económicas.

1.2.3. Resumen de los tiempos óptimos de crecimiento y supervivencia para cada medio

El crecimiento óptimo en el caso del medio de Plastringe modificado, el medio de *Trichomonas* y el medio de kit comercial es de 2–7 días, y el tiempo de supervivencia en cultivo es de 1–7 días; en el caso del medio modificado de Diamond, es de 2–4 días y el tiempo de supervivencia en cultivo es 1–4 / 5 días (Buller & Corney, 2013).

1.2.4. Detección de *Tritrichomonas foetus* e identificación mediante examen microscópico

La detección inicial de microorganismos se puede llevar a cabo mediante microscopía óptica en un portaobjetos de preparación húmeda directamente a partir de una gota de la muestra o cultivo, o a través de la pared de una bolsa de plástico. Cuando se examina una gota de medio de cultivo, debe tomarse cuidadosamente del fondo del tubo, donde es probable que las tricomonas se concentren debido a las condiciones microaerofílicas.

Los microorganismos se pueden ver bajo un microscopio compuesto estándar usando $\times 40$ o $\times 80$ aumentos inicialmente, y luego $\times 100$ o $\times 400$. *Tritrichomonas foetus* es móvil y normalmente presenta movimientos bruscos en preparaciones húmedas. Para lograr la detección de parásitos en cantidades reducidas y la observación de las características morfológicas, se debe dedicar suficiente tiempo, es decir, 2–5 minutos, al examen de cada portaobjetos.

Los microorganismos piriformes tienen tres flagelos anteriores y uno posterior y una membrana ondulada que se extiende casi hasta el extremo posterior de la célula. También tienen un axostilo que generalmente se extiende más allá del extremo posterior de la célula (Tabla 2).

La microscopía de contraste de fases es muy valiosa para revelar estas características. También se puede utilizar un procedimiento de tinción rápido basado en Giemsa (Buller y Corney 2013; Lun y Gajadhar, 1999). Ambas técnicas funcionan mejor cuando hay un número relativamente alto de microorganismos, especialmente la técnica de tinción.

La tinción de las tricomonas se realiza mejor con yodo de Lugol, que mejora las características morfológicas de los flagelos y la membrana (Lun y Gajadhar, 1999). En resumen, se concentra a alta velocidad, p. ej., 16.000 μg por 10 segundos, 1 ml del cultivo que supuestamente contiene los parásitos. El sobrenadante se elimina y el sedimento se resuspende homogéneamente en medio de cultivo con un 10% de suero bovino. Se prepara un frotis fino en un portaobjetos de microscopio usando 10 μl de la suspensión. El portaobjetos se seca al aire y se fija durante 1 minuto en alcohol metílico y luego se tiñe en yodo de Lugol durante 1 minuto. El portaobjetos se tiñe posteriormente con el método rápido de Giemsa siguiendo las instrucciones del fabricante. El portaobjetos se lava a fondo para eliminar posibles restos de tinción y se seca al aire antes de examinarse a $\times 100$ en inmersión en aceite (Buller y Corney, 2013). La tinción permite la diferenciación de *T. foetus* de otras tricomonas, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Características morfológicas de los tricomonas (Buller & Corney, 2013).

Microorganismo	Flagelos anteriores	Flagelos posteriores	Membrana ondulante	Hospedador
Tritrichomonas				
<i>T. foetus</i>	3	1	2–5	Ganado bovino
<i>T. enteris</i>	3	1	3	Ganado bovino
<i>T. vaginalis</i>	4	0	4	Humanos
Tetratrichomonas				
<i>T. buttreysi</i>	3 o 4 de longitud variable	3–5	1	Cerdos, ganado bovino
<i>T. pavlovi</i>	4	1	2–4	Terneros
Pentatrichomonas				
<i>P. hominis</i>	4	1	3 ondulaciones	Humanos, primates, gatos, perros, ganado bovino

1.2.5. Sensibilidad y especificidad generales del cultivo y de la identificación

Toda estimación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba de cultivo e identificación dependerá de la eficacia de la obtención, manipulación y procesamiento de la muestra, así como de la composición y calidad del medio de cultivo.

En los toros, un kit comercial de bolsa tiene una sensibilidad del 92% (intervalo de confianza del 95%, 84–96%), mientras que el mismo dispositivo utilizado en vacas jóvenes infectadas experimentalmente tuvo una sensibilidad aparente del 88% durante un período de 10 semanas después de la infección (Kittel *et al.*, 1998).

Las estimaciones para los medios de Diamond y relacionados han sido variables, posiblemente debido a la variación en la composición y la preparación, pero varían del 78% al 99% (Skirrow y BonDurrant, 1988). Hasta hace poco, se suponía que la especificidad de la prueba de cultivo era del 100%, pero es probable que sea una sobreestimación.

Los resultados de diagnóstico con muestras de toros utilizando medio de Diamond o un kit de campo han demostrado que los dos métodos dan resultados comparables (Borchardt *et al.*, 1992; Bryan *et al.*, 1999; Kittel *et al.*, 1998). Se debe destacar que no todas las muestras tomadas de un toro en particular que se sabe que está infectado necesariamente darán un resultado de cultivo positivo. Incluso cuando las condiciones de obtención, transporte, cultivo e identificación de la muestra son óptimas, se debe obtener más de una muestra negativa para que exista una seguridad razonable de que el animal no está infectado. Esta es la base para que la mayor parte de la normativa relativa a la cría especifique que los toros mayores de 6 meses de edad deben ser evaluados tres veces a intervalos semanales antes de concluir que no hay infección por *T. foetus*. En el caso de los toros de menos de 6 meses, o que se hayan criado solamente con toros, una prueba negativa se considera suficiente.

En las hembras, dado que la infección generalmente se elimina en 90–95 días, puede ser difícil aislar microorganismos en las últimas etapas de la infección.

El diagnóstico de aborto inducido por *T. foetus* puede ser relativamente fácil cuando se recupera de un feto abortado, debido a la gran cantidad de microorganismos demostrables en el contenido del abomaso o fluidos placentarios del feto (Rhyan *et al.*, 1988). Además, se pueden utilizar técnicas inmunohistoquímicas y métodos moleculares para demostrar *Tritrichomonas foetus* en tejidos de fetos abortados.

1.2.6. Inmunohistoquímica

Se han descrito técnicas inmunohistoquímicas que utilizan anticuerpos monoclonales para revelar *T. foetus* en tejidos fijados con formalina (Rhyan *et al.*, 1995). Estas técnicas se pueden utilizar para identificar *T. foetus* en tejidos de fetos abortados (como placenta y pulmones).

1.3. Métodos moleculares – detección de ácidos nucleicos

Se han descrito varios métodos moleculares para la detección de ADN de *T. foetus* preparado a partir de cultivos o directamente a partir de muestras clínicas. Estos incluyen métodos de PCR convencionales y en tiempo real que se dirigen a las regiones conservadas del gen de ARN ribosómico 5.8S y las regiones de espaciadores transcritos internos (ITS) adyacentes. Una PCR ofrece varias posibles ventajas, como una mayor sensibilidad analítica, un tiempo de respuesta de más rápido y el hecho de que no se requiere que los microorganismos e la muestra obtenida estén intactos y sean viables.

1.3.1. Extracción de ADN

Las muestras de elección para la extracción de ADN son esmegma y moco vaginal en PBS o solución salina normal, medio de transporte y cultivos.

1.3.1.1. Termólisis

Un ml de muestra (moco vaginal o esmegma) se centrifuga durante 5 minutos a 12.000 *g*. El sobrenadante se elimina y el sedimento se resuspende en 500 µl de RNAsa/agua libre de DNAsa. La suspensión se calienta a 95°C durante 10 minutos. El lisado se centrifuga a 2000 *g* durante 3 minutos y se analizan 5 µl del sobrenadante.

1.3.1.2. Extracción con perlas magnéticas

Existen varios kits de perlas magnéticas a la venta. Esta metodología usa un sistema robótico; es sensible y adecuada para la configuración de alto rendimiento cuando el diagnóstico de *T. foetus* debe analizarse en numerosas muestras.

1.3.1.3. Método de la columna de centrifugación

Este método utiliza columnas de centrifugación y es más adecuado cuando se trata de la extracción manual de un pequeño número de muestras. Hay una serie de kits de columna de centrifugación a la venta y todos funcionan de manera similar.

La sensibilidad de las PCR convencionales mejora cuando se usan extractos de ADN purificados obtenidos mediante el uso de kits comerciales, como los de perlas magnéticas o columna de centrifugación. La PCR en tiempo real se puede usar para los tres métodos de extracción. McMillen y Lew (2006) observaron una mayor sensibilidad al utilizar el método de termólisis, que no era adecuado para la PCR convencional

1.3.2. PCR convencional

Felleisen *et al.* (1998) describieron una PCR convencional que usa cebadores TFR3 y TFR4 para diferenciar *T. foetus* de otras tricomonas comensales, que son contaminantes fecales de muestras clínicas enviadas para el diagnóstico de la tricomonosis bovina.

Los cebadores utilizados son TFR3 y TFR4, que se dirigen a una región de 347 pb y tienen las siguientes secuencias:

TFR3 5'-CGG-GTC-TTC-CTA-TAT-GAG-ACA-GAA-CC-3'

TFR4 5'-CCT-GCC-GTT-GGA-TCA-GTT-TCG-TTA-A-3'

La PCR generalmente se realiza durante 40 ciclos con una desnaturalización de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de hibridación a 67°C y 90 segundos de extensión a 72°C durante 90 segundos. La extensión final se realiza a 72 °C durante 15 minutos (Felleisen *et al.*, 1998).

El uso de dos conjuntos de cebadores a la vez, que amplifican el ADN del grupo de tricomonas (TFR1 y TFR2) y el conjunto de cebadores específicos de *T. foetus* TFR3 y TFR4 (Felleisen *et al.*, 1998) permitió la diferenciación de *T. foetus* de otras tricomonas comensales del tracto gastrointestinal que a menudo son contaminantes fecales del sistema reproductivo bovino (Campero *et al.*, 2003). El ADN de *Trichomonas foetus* se amplifica por ambos grupos de cebadores, mientras que el ADN de las tricomonas comensales solo se amplifica por TFR1 y TFR2.

Las secuencias de los cebadores genéricos TFR1 y TFR2, que amplifican una región de 372 pb de la región ITS1 e ITS2 del grupo tricomonas, son las siguientes:

TFR1 5'-GTA-GGT-GAA-CCT-GCC-GTT-G-3'

TFR2 5'-ATG-CAA-CGT-TCT-TCA-TCG-TG-3'

La PCR se realiza durante 30 ciclos con una desnaturalización de 30 segundos a 94°C, seguida de 20 segundos de hibridación a 58°C y una extensión de 30 segundos a 72°C. La extensión final se realiza a 72°C durante 20 minutos.

Los cebadores TFR3 y TFR4 también se han usado junto con tinciones fluorescentes quelantes de ADN en condiciones de PCR en tiempo real para fines de investigación en lugar de cribado diagnóstico de la tricomonosis (Casteriano *et al.*, 2016).

Grahn *et al.* (2005) también han utilizado los cebadores TFR1 y TFR2 en combinación con un fluoróforo, mientras que el cebador directo (TFR1) está marcado con un fluoróforo 6FAM, lo que da como resultado una mayor sensibilidad de la PCR convencional.

Hayes *et al.* (2003) también utilizaron RFLP del amplicón generado por los cebadores TFR1 y TFR2 para diferenciar varias tricomonas, incluida *T. foetus*.

Se ha descrito una amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) dirigida al ADNr 5.8S de *T. foetus* con una sensibilidad ligeramente más alta que la PCR en la que se utiliza TFR3/TFR4, y una mayor especificidad (Oyhenart *et al.*, 2013). Debido a la simplicidad de esta prueba respecto a la PCR o PCR en tiempo real, la LAMP puede ser una alternativa más barata para técnicos con poca experiencia, aunque no se ha probado en condiciones de campo en esta etapa.

1.3.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

Un método de PCR en tiempo real con sonda Minor Groove Binder (MGB) descrito por McMillen y Lew (2006), basado en la región ITS-1, situado dentro de las mismas regiones de ADNr que los cebadores de PCR TFR3-TFR4, demostró ser altamente específico y sensible en comparación con el cultivo/microscopía y los métodos de PCR descritos anteriormente (McMillen y Lew, 2006). La sensibilidad de este ensayo se evaluó con diluciones decimales de números conocidos de células de *T. foetus*, y se comparó con la de la observación al microscopio tras al cultivo y la PCR TFR3-TFR4. La PCR en tiempo real con sondas detectó una sola célula por ejecución directamente de esmegma o moco vaginal no cultivado y fue 2500 veces y 250 veces más sensible que la microscopía tras el cultivo selectivo, respectivamente (para cada tipo de muestra), y 500 veces más sensible que el cultivo seguido de PCR con TFR3-TFR4. Cuando se comparó con la amplificación del ADN de *T. foetus* de los cultivos con TFR3-TFR4, la PCR en tiempo real fue en todos los casos 10 veces más sensible al utilizar las muestras de esmegma los 0, 2 y 5 días después del cultivo. Al utilizar el moco vaginal, ambas PCR demostraron sensibilidades equivalentes en los días 0 y 2 con un aumento de 10 veces en la sensibilidad en el caso de la PCR en tiempo real realizada el día 5 después del cultivo. La sensibilidad de la PCR con TFR3-TFR4 fue 10 veces menor que la PCR en tiempo real con ADN purificado extraído de muestras clínicas. Además, la sensibilidad de la PCR en tiempo real mejoró 500 veces cuando se usaron lisados de células en crudo, que no eran adecuados como molde para la PCR convencional (McMillen y Lew, 2006). Las evaluaciones iniciales de esta PCR en tiempo real mostraron que de 159 muestras de Australia destinadas a pruebas de diagnóstico, 14 indicaron toros positivos mediante PCR en tiempo real (habiéndose analizado muestras clínicas: esmegma y moco vaginal) y solo tres se confirmaron por cultivo selectivo/microscopía (test exacto de Fisher, $p < 0,001$) (McMillen y Lew 2006). La PCR en tiempo real se diseñó con una sonda MGB. La sustitución de la sonda MGB por otras sondas, como los inhibidores de agujero negro o TAMRA dan falsos positivos. La PCR en tiempo real utiliza los siguientes cebadores y sonda:

TFF2 (20µM) 5'-GCG-GCT-GGA-TTA-GCT-TTC-TTT-3'

TFR2 (20µM) 5'-GGC-GCG-CAA-TGT-GCA-T-3'

TrichP2 (5µM) 5'-6FAM-ACA-AGT-TCG-ATC-TTT-G-MGB-3'

La PCR en tiempo real se realiza usando una reacción de 25 µl que contiene mezcla primaria comercial, cebadores TFF2 y TFR2 cada cual a una concentración de 900 nM y sonda TichP2 80 nM. Cuando se utiliza una uracilo-AND-glucosilasa (UDG) que contiene la mezcla primaria, la PCR en tiempo real se realiza a 50°C durante 2 minutos para activar la UDG y prevenir contaminación por arrastre, seguida de una incubación a 95°C durante 2 minutos y luego 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 45 segundos. La fluorescencia se adquiere en el canal verde al final de cada paso de hibridación/extensión.

Se ha llevado a cabo una evaluación sólida de la versión comercial de este ensayo de PCR en tiempo real como se describe por Effinger *et al.* (2014) usando post-cultivo de PCR en tiempo

real. Esta evaluación usó 833 muestras de esmegma cultivadas, que fueron analizadas por cinco laboratorios en los EE. UU. Usando el kit comercial de PCR en tiempo real, diferentes métodos de procesamiento de ADN, equipo de PCR y condiciones de ciclo de PCR. También se procesaron grupos compuestos por una muestra de *T. foetus* positivo y cuatro muestras de esmegma negativo y se detectó el 96% de las muestras positivas en estas agrupaciones. Para las pruebas de muestras individuales, se alcanzó un acuerdo global del 95.89% entre los cinco laboratorios participantes. Un estudio reciente realizado en Canadá mostró que la detección en tiempo real de la PCR de *T. foetus* en muestras prepucciales agrupadas en PBS era más sensible que los métodos de cultivo. El estudio también demostró que no había diferencia en la detección de *T. foetus* de toros infectados conocidos entre PCR directa en tiempo real (de PBS), cultivo / microscopía o PCR de cultivo / en tiempo real.

Se ha desarrollado otro método de PCR en tiempo real, que se dirige al gen que codifica la beta-tubulina 1 de *T. foetus*. Está disponible en el mercado en forma de kits comerciales. A pesar del alto grado de conservación de los genes de beta tubulina en tricomonas, se afirma que la prueba es específica y tiene una amplia gama de detección de cepas de *T. foetus*. Sin embargo, hay pocos datos e inéditos sobre la evaluación de estos kits.

Los marcos de diagnóstico por PCR se determinan mejor para una región y un país en particular teniendo en cuenta el tiempo de transporte al laboratorio de diagnóstico, la temperatura de la muestra, el grado de optimización de la extracción del ADN y los métodos de PCR utilizados en el laboratorio de diagnóstico. Actualmente, la mejor opción es utilizar protocolos publicados (adaptados al laboratorio particular) o kits comerciales de PCR en tiempo real para *T. foetus* aplicados al medio de transporte o PBS, lo que garantiza resultados preliminares rápidos, especialmente cuando se utilizan lisados hervidos.

1.4. Combinación del cultivo y la PCR en cultivos de 5 días

Se ha descrito que la combinación de métodos de PCR y cultivo produce mayor sensibilidad o especificidad, y se ha sugerido como el sistema más rentable y práctico para evaluar los toros antes de la reproducción (Michi *et al.*, 2016). Sin embargo, también se ha observado que el análisis de muestras clínicas de toros directamente mediante PCR es más sensible que el cultivo seguido de PCR (McMillen y Lew, 2006), aunque la mayoría de los laboratorios consideran los cultivos el método prioritario.

La combinación de cultivo y PCR debe implementarse en algunas situaciones específicas en que la especificidad es un problema debido a la aparición de otras tricomonas que pueden dar lugar a falsos positivos en el cultivo. En vista de la dificultad de distinguir *T. foetus* de otras tricomonas en base a la morfología, se recomienda que, siempre que existan instalaciones para los métodos basados en el ADN, los cultivos con tricomonas se analicen sistemáticamente por PCR para confirmar la presencia de *T. foetus*.

2. Pruebas serológicas

Los toros no generan respuestas inmunitarias prominentes contra *T. foetus*. Se han desarrollado algunas pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la tricomonosis bovina, como la prueba de aglutinación de moco y la prueba intradérmica (Rhyan *et al.*, 1999), y más recientemente, un ensayo de inmunoenzimático de captura de antígeno (BonDurant, 1997). Sin embargo, estas pruebas parecen tener un uso muy limitado debido a su baja sensibilidad o especificidad y, por lo tanto, no se recomiendan para la detección de *T. foetus* en animales individuales.

Las vacas infectadas desarrollan anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos que están presentes en el moco vaginal y en el suero, pero estos no se explotan con fines de diagnóstico.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Las vacunas de células enteras para vacas han demostrado ofrecer protección y se comercializan (Corbeil, 1994) como vacuna monovalente o como parte de una vacuna polivalente que también contiene *Campylobacter* y *Leptospira* spp. (BonDurant, 1997). Estos productos han demostrado eficacia en la vaca pero no en el toro.

Un ejemplo de método de producción de vacunas de células completas es el cultivo de *T. foetus* (cultivo VMC-84) en medio de Diamond modificado (Corbeil, 1994) y la congelación del cultivo a -20°C durante 60 minutos. Después de la descongelación, se agrega a la vacuna CL una suspensión de 5×10^7 microorganismos/ml en PBS.

BIBLIOGRAFÍA

- BONDURANT R.H. (1997). Pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **13**, 345–361.
- 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.
- BRYAN L.A., CAMBELL J.R. & GAJADHAR A.A. (1999). Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch™ TF media. *Vet. Rec.*, **144**, 227–232.
- BULLER N. & CORNEY B. (2013). Bovine Trichomonosis. Australian New Zealand Standard Diagnostic Procedure. <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ah/ANZSDP-Bovine-trichomoniasis.pdf> (assessed 1 August 2017).
- CASTERIANO A., MOLINI U., KANDJUMBWA K., KHAISEB S., FREY C.F. & ŠLAPETA J. (2016). Novel genotype of *Tritrichomonas foetus* from cattle in Southern Africa. *Parasitology*, **143**, 1954–1959.
- 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 bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.* **112**, 167–175.
- CORBEIL L.B. (1994). Vaccination strategies against *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Today*, **10**, 103–106.
- EFFINGER L., PEDDIREDDI L., SIMUNICH M., OBERST R., O'CONNELL C. & LEYVA-BACA I. (2014). Pooling of cultured samples and comparison of multistate laboratory workflows with the MagMAX sample preparation system and VetMAX quantitative polymerase chain reaction reagents for detection of *Tritrichomonas foetus*-colonized bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **26**, 72–87.
- 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.
- 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.
- GRAHN R.A., BONDURANT R.H., HOOSEAR K.A., WALKER R.L. & LYON L.A. (2005). An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, **127**, 33–41.
- GREGORY M.W., ELLIS B. & REDWOOD D.W. (1990). Comparison of sampling methods for the detection of *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Rec.*, **127**, 16.
- HAYES D.C., ANDERSON R.R. & WALKER R.L. (2003). Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 390–394.
- 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. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 519–522.
- LEVINE N.D. (1973). The Trichomonads. In: Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man, Levine N.D., ed. Burgess Publishing Company, Minnesota, USA, 88–110.
- LUN Z.-R. & GAJADHAR A.A. (1999). A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 471–474.
- 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.
- McMILLEN L. & LEW A.E. (2006). Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet. Parasitol.*, **141**, 204–215.
- MICHI A.N., FAVETTO P.H., KASTELIC J. & COBO E.R. (2016). A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology*, **85**, 781–791.

- OYHENART J., MARTÍNEZ F., RAMÍREZ R., FORT M., & BRECCIA J.D. (2013). Loop mediated isothermal amplification of 5.8S rDNA for specific detection of *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, **193**, 59–65.
- RHYAN J.C., STACKHOUSE L.L. & QUINN W.J. (1988). Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Pathol.*, **25**, 350–355.
- 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.
- 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.
- SKIRROW S.Z. & BONDURANT R.H. (1988). Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, **58**, 591–603.
- ŠLAPETA J., MÜLLER N., STACK C.M., WALKER G., LEW-TABOR A. & TACHEZY J. (2012). Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int. J. Parasitol.*, **42**, 1143–1149.
- TACHEZY J., TACHEZY R., HAMPL V., SEDINOVA M., VANACOVA S., VRLIK M., VAN RANST M., FLEGR J. & KULDAJ J. (2002). Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **49**, 154–163.
- 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.
- WARTON A. & HONIGBERG B.M (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *J. Protozoot.*, **26**, 56–62.
- YAO C. (2012). Opportunistic human infections caused by *Tritrichomonas* species: a mini-review. *Clin. Microbiol. News*, **34**, 127–131
- YAO C. (2013). Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *J. Med. Microbiol.*, **62**, 1–9.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO TRICOMONOSIS; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.