

Detección de *Tritrichomonas foetus* por PCR en esmegma prepucial de toros en Uruguay

Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR in preputial smegma of bulls in Uruguay

Caroline da Silva Silveira^{1*} 0000-0003-0957-7773
Martín Fraga¹ 0000-0003-3390-9723
Cecilia Monesiglio¹ 0000-0003-0047-8736
Rafael Delpiazzi² 0000-0003-3461-0395

Melissa Macías-Rioseco¹ 0000-0001-7139-8384
Federico Giannitti¹ 0000-0001-8799-6848
Franklin Riet-Correa¹ 0000-0001-5738-7785

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay. *E-mail: carolsilveira7@hotmail.com, frcorrea@inia.org.uy

² Departamento de Salud de los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, EEMAC, Paysandú, Uruguay.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 56
Nº 213 (2020 Ene - Jun) e20205621307

DOI: 10.29155/VET.56.213.7

Recibido: 06/05/2019
Aceptado: 18/03/2019

Resumen

La tricomoniasis bovina es una enfermedad venérea causada por *Tritrichomonas foetus*, responsable de pérdidas económicas principalmente por infertilidad y aborto en vacas y vaquillonas. El diagnóstico se basa en el cultivo del protozoo y/o su detección por técnicas moleculares. En Uruguay el reporte más reciente del parásito data de 2005 en un feto bovino abortado. El objetivo de este trabajo es comunicar la detección de *T. foetus* en esmegma prepucial de toros de Uruguay. Se evaluaron 310 muestras de esmegma prepucial de 121 toros de tambos y 189 toros de sistemas productivos de carne, mediante PCR y cultivo para *T. foetus*. Los animales provenían de 56 establecimientos (32 lecheros, 29 carniceros y 5 mixtos) distribuidos en 12 departamentos. En 2,25% (7/310) de las muestras se identificó *T. foetus* por PCR seguida de secuenciación genómica de los amplicones para la confirmación, mientras que ninguna muestra fue positiva por cultivo. Se observó un 5% (6/121) de positivos en los animales destinados a la producción lechera, todos ellos provenían del mismo establecimiento. El ADN del parásito se detectó en 1 (0,5%) de los 189 toros de carne que se analizaron. El 3,4% (1/29) y 3,1% (1/32) de los establecimientos evaluados que tenían toros de carne y leche, respectivamente, fueron positivos a *T. foetus*. La PCR permite la detección de ADN de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros negativas por cultivo. La infección por *T. foetus* podría estar subestimada debido al uso del cultivo como único método de diagnóstico.

Palabras clave: Enfermedad venérea, PCR, Tricomoniasis bovina, *Tritrichomonas foetus*, Uruguay.

Abstract

Bovine trichomoniasis is a venereal disease caused by *Tritrichomonas foetus*. It is responsible for economic losses worldwide, causing mainly infertility and abortion in cows and heifers. The diagnosis of this disease is mainly based on microbiological culture and on molecular testing. In Uruguay the parasite has not been reported since 2005. The aim of this study is to report the detection of *T. foetus* by PCR in preputial smegma from bulls from dairy and beef Uruguayan farms. A total of 310 smegma samples, 121 from dairy-production-bulls and 189 from meat-production-bulls, were sampled. Animals came from 56 farms distributed within 12 different departments of Uruguay. While, the PCR analysis of preputial smegma identified 2.25% (7/310) positive for *T. foetus*, no culture-positive samples were detected. The parasite was detected in 5% (6/121) of the sampled bulls for dairy production, these six animals were from the same dairy farm. *Tritrichomonas foetus* was only detected in one out of 189 animals from beef production. This study showed that 3.4% (1/29) and 3.1% (1/32) of beef and dairy farms respectively, were positive for *T. foetus* infection. PCR is advantageous over culture; therefore, it is an efficient and quick method for the detection of *T. foetus* in preputial samples. The results of this work suggest that the parasite detection may be underestimated due to the use of only culture-based diagnostics.

Keywords: Venereal disease, PCR, Bovine trichomoniasis, *Tritrichomonas foetus*, Uruguay.

Introducción

La tricomoniasis bovina es una enfermedad venérea causada por el protozoo extracelular flagelado *Tritrichomonas foetus* (Rae y Crews, 2006). La enfermedad está mundialmente distribuida (Yao, 2013), principalmente en regiones que utilizan la monta natural como manejo reproductivo (Rae y Crews, 2006).

Los toros son portadores asintomáticos y diseminadores del protozoo. La transmisión ocurre principalmente en el momento del coito, aunque también puede ocurrir por inseminación artificial (IA) ya que *T. foetus* puede permanecer viable en semen criopreservado (Egleasome y García, 1992). El parásito se aloja en las criptas prepuciales y en la mucosa peneana de los toros sin afectar la libido (BonDurant, 2005). En condiciones *in vitro* el parásito altera la motilidad progresiva de los espermatozoides, lo que sugiere una posible influencia negativa en la calidad seminal (Ribeiro et al., 2010).

La enfermedad afecta directamente el desempeño reproductivo de las hembras, pudiendo obtenerse entre 45,3% y 57% de vacas no preñadas al final del servicio y, consecuentemente, una reducción del 14% al 50% de la cantidad de terneros al pie de las madres (Ondrak, 2016). Esto se debe a que la infección en vacas y vaquillonas suele resultar en infertilidad, muerte embrionaria, piometra poscoital, aborto o maceración fetal (BonDurant, 2005; Ondrak, 2016; Rae y Crews, 2006). Se ha estimado que las pérdidas por vaca infectada con *T. foetus* en lecherías de California, EEUU, han alcanzado los US\$665 (Goodger y Skirrow, 1986). No se reportan en países de Sudamérica estimaciones del impacto económico de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta el hábitat de *T. foetus*, el diagnóstico de tricomoniasis bovina se ha basado en el cultivo y la examinación microscópica de muestras clínicas de esmegma prepucial de toros (Clark y Diamond, 2002; Schonmann et al., 1994). Cuando se producen pérdidas gestacionales, el mucus cervicovaginal de vacas/vaquillonas afectadas, y los órganos y fluidos de los fetos abortados representan muestras adecuadas para el diagnóstico (Bondurant, 2005).

Tritrichomonas foetus también puede ser detectada mediante amplificación de secuencias de ADN ribosomal por PCR convencional con cebadores específicos que permiten la amplificación del gen 5.8S y secuencias ITS1 e ITS2 del parásito (Felleisen et al., 1998). También se han desarrollado protocolos de PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) que proporcionan además de alta especificidad, una alta sensibilidad (McMillen y Lew, 2006), aunque este último abordaje es más costoso que la PCR convencional (Oyhenart, 2018).

La tricomoniasis bovina está reportada en Argentina como una enfermedad persistente en los establecimientos, con una prevalencia predial que varía del 3% al 19,4% en diferentes regiones del país (Molina et al., 2018a; Rojas et al., 2011; Suárez et al.,

2008). En la provincia de La Pampa se implementó, primero en forma voluntaria y actualmente de forma obligatoria, el Programa Provincial de Control y Erradicación de enfermedades venéreas bovinas (tricomoniasis bovina y campilobacteriosis genital bovina). Este programa demostró ser eficaz, reduciendo la prevalencia predial de estas enfermedades de aproximadamente 10% a 3% en un período de 7 años (2007-2014), utilizando como diagnóstico únicamente el cultivo (Molina et al., 2018b). En Brasil, considerando distintos estudios regionales, la prevalencia a nivel de rodeos de tricomoniasis bovina es de 1,88% a 66,7% (Alves et al., 2011; Filho et al., 2018; Oliveira et al., 2015), con regiones donde no se reporta la enfermedad (Rocha et al., 2009).

En Uruguay la enfermedad se diagnosticó por primera vez en la década de 1940 en tambos, tanto en vacas como en fetos abortados (Cassamagnaghi y Cassamagnaghi, 1943). Varias décadas después se observó una frecuencia de 6,5% (50/768) de establecimientos positivos al parásito en la cuenca lechera del país (Errico et al., 1978; Herrera et al., 1986). La última referencia del parásito data del año 2005, cuando se reportó su observación por campo oscuro en el líquido abomasal de un feto bovino abortado, en coinfección con *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* (Easton, 2006), otro agente abortivo de transmisión venérea. En un estudio a nivel nacional en ganado de carne, se evaluaron por cultivo 1754 muestras de esmegma prepucial de toros, sin detección de animales positivos para *T. foetus* (Repiso et al., 2005).

Sin embargo, debido que no se han implementado masivamente programas de control y erradicación de tricomoniasis bovina en Uruguay, es esperable que la enfermedad continúe presente en los rodeos bovinos. El objetivo de este trabajo es mostrar el potencial del uso de PCR para la detección de *T. foetus* en muestras de esmegma prepucial de toros negativas por cultivo.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Entre julio de 2016 y febrero de 2019, se obtuvieron 310 muestras de esmegma prepucial de toros de 56 establecimientos distintos, localizados en 12 departamentos de Uruguay (Tabla 1).

Se muestrearon 121 toros en 32 establecimientos de sistemas productivos lecheros y 189 toros de 29 predios de producción de carne, 5 establecimientos tenían toros de leche y carne (explotaciones mixtas). Los muestreos se realizaron de dos formas distintas: 1) directamente en establecimientos con problemas de abortos ocasionados por diferentes y/o indeterminadas etiologías (146 toros de 15 establecimientos) y 2) en dos plantas de faena, de toros sin conocimiento de los datos reproductivos de los establecimientos. Se visitaron 15 establecimientos de los cuales 13 eran tambos y 2 predios dedicados a la ganadería de carne, tomándose muestras de 98 y 48 respectivamente (Tabla 2).

Tabla 1: Cantidad de toros de lechería y para carne muestreados según el departamento de origen.

Departamento	Total de toros muestreados	
	Lechería	Ganadería de carne
Artigas	-	37
Canelones	3	38
Cerro Largo	2	18
Colonia	70	-
Flores	-	7
Florida	7	-
Paysandú	1	53
Salto	-	20
San José	20	5
Treinta y tres	-	11
Lavalleja	3	-
Soriano	15	-

Tabla 2: Identificación, departamento, tipo de explotación y cantidad de toros muestreados en los establecimientos visitados

Id. Establecimiento	Departamento	Explotación	Cantidad de toros muestreados
1	Colonia	Lechería	4
2	San José	Lechería	2
3	Florida	Lechería	1
4	Canelones	Lechería	1
5	Florida	Lechería	1
6	San José	Lechería	7
7	Colonia	Lechería	14
8	Colonia	Lechería	1
9*	Colonia	Lechería	48
10	Colonia	Lechería	1
11	Lavalleja	Lechería	1
12	Lavalleja	Lechería	2
13	Soriano	Lechería	15
14	Paysandú	Ganadería	15
15	Paysandú	Ganadería	33

*Establecimiento con 6 toros positivos a *T. foetus* por PCR.

Los toros aptos para el estudio habían estado en descanso reproductivo por al menos 7 días previo al muestreo. En los tambos, los muestreos se realizaron de forma seriada con intervalos de aproximadamente 7-10 días entre muestreos, hasta completar un total de 3, antes de ser considerados negativos. En los dos predios dedicados a la producción de carne sólo se realizó un muestreo por motivos ajenos a este trabajo, debido a dificultades de logística. El esmegma en estos toros se obtuvo por el método de raspaje prepucial (Tedesco et al., 1977) utilizando raspadores estériles descartables. El raspador se introdujo en el orificio prepucial, se alcanzó la mayor profundidad posible en la cavidad prepucial y se realizaron entre 20 y 30 movimientos en sentido anteroposterior. Inmediatamente el raspador se introdujo en tubos de 15 mL de capacidad que contenían 8 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sumergiendo toda la punta del raspador y transfiriendo la mayor cantidad posible del esmegma obtenido. Una vez obtenida la suspensión se tomó 1 mL y se inoculó inmediatamente a un medio de cultivo comercial para tricomonas (CM0161, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). (CM0161, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). Las muestras se enviaron a temperatura ambiente al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) para su procesamiento.

En los frigoríficos, se obtuvieron muestras de 23 toros originarios de 19 tambos y de 141 toros de carne provenientes de 27 predios distintos. Para obtener las muestras de esmegma prepucial, la parte externa del pene y el prepucio fueron recuperados postmortem y se raspó la mucosa prepucial con una espátula descartable (Terzolo et al., 1992). Las muestras se transfirieron a tubos con PBS estéril. La suspensión así obtenida se inoculó para cultivo como se describió arriba.

Cultivo de *T. foetus*

Para cultivo de *T. foetus* se utilizó el medio de cultivo Trichomonas (CM0161, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) adicionado con cloranfenicol 1% (100 µg/L; ION S.A., Montevideo, Uruguay) y suero bovino inactivado por calor en baño maría (8%; 56°C por 30min), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras se incubaron a 37°C y alícuotas del cultivo se examinaron en microscopio óptico cada 24 horas durante 7 días (BonDurant, 2005). Para verificar cada lote de medio de cultivo se inocularon al menos 5 tubos con una cepa viable de *T. foetus* mantenida en el laboratorio, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

PCR para la detección de *T. foetus*

Para la extracción de ADN, 2 mL de la suspensión del esmegma en PBS se centrifugaron a 9500 g por 1 minuto. Luego, el sobrenadante se descartó y la extracción se realizó sobre el sedimento utilizando el kit comercial “Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit” (Zymo Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección de *T. foetus* se amplificó el gen que codifica para el ARNr 5.8S y las regiones ITS1 e ITS2 utilizando los cebadores TRF-3 (5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGACC-3') y TRF-4 (5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGT-TAA-3' (Felleisen et al., 1998). Para cada reacción se utilizaron 2,5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,2 µl de dNTPs (10µM), 2,5 µl de albumina sérica bovina (BSA, 1%), 2,5 µl buffer (10x), 0,5 µl de cada cebador, 0,1 µl de ADN polimerasa Taq (5U; Invitrogen), 3 µl de ADN de la muestra y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en un termociclador “Applied Biosystems ProFlex PCR System” (Thermo

Fisher Scientific) utilizando un protocolo que incluyó una desnaturalización inicial (94°C, 3 min); 30 ciclos de: desnaturalización (94°C, 30 s), hibridación (65°C, 30 s) y extensión (72°C, 60 s); y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con Good View™ y se visualizaron en un fotodocumentador “Gel Doc™ EZ Imager” (Bio-Rad). El tamaño del fragmento esperado (347 pb), se determinó comparando con HyperLadder 100 pb (Bioline, UK).

Secuenciación de los amplicones

Para confirmar que los fragmentos amplificados correspondían a *T. foetus* se realizó la purificación y secuenciación en el servicio de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se ensamblaron y editaron utilizando el programa BioEdit (Versión 7.2.5; Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) y se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997).

Resultados

Ninguna de las 310 muestras fue positiva por cultivo para *T. foetus*. La PCR reveló que el 2,25% (7/310) de los toros analizados fueron positivos para este agente. De los toros destinados a producción de leche, 5% (6/121) fueron positivos, todos ellos pertenecientes al mismo establecimiento de origen (establecimiento 9; Tabla 2). En los toros de carne, se detectó un animal positivo de 189 (0,5%).

El establecimiento lechero positivo está localizado en el departamento de Colonia, los 6 toros positivos eran de la raza Normando y tenían entre 1,5 y 3,5 años, los animales habían sido muestreados por visitas al predio. El toro de carne positivo, un Hereford de 6 años, era originario de un establecimiento del departamento de Treinta y Tres, y había sido muestreado en un frigorífico.

Del total de rodeos evaluados, 3,5% (2/56) tenían animales positivos para *T. foetus*, siendo un rodeo lechero y uno de ganado de carne. La frecuencia predial fue de 3,4% (1/29) en rodeos de carne y de 3,1% (1/32) en rodeos lecheros. Ninguno de los 5 establecimientos con explotación mixta fue positivo. Las secuencias obtenidas a partir de las muestras positivas tuvieron 100% de similitud con secuencias publicadas de *T. foetus* (MK770858.1; MK770848.1; MK770847.1 entre otras).

Discusión

En este trabajo se detectó por PCR la presencia de ADN de *T. foetus* en toros de leche y de carne, aunque no se logró cultivar el agente. En Uruguay hacía más de una década que no se reportaba la circulación de *T. foetus* en bovinos.

Herrera et al., (1986) en la cuenca lechera del país, evaluaron

muestras de esmegma prepucial, mucus vaginal y fetos y placentas de ganado abortado y determinaron una frecuencia de *T. foetus* a nivel predial de 6,5% (50/768). Sumando curiosamente, que entre los años 1973 y 1985, solamente dos toros de carne evaluados fueron positivos a la infección por este parásito. Similar a lo reportado en dicho trabajo, aproximadamente 30 años después nuestros resultados sugieren que *T. foetus* está presente con mayor frecuencia en ganado lechero que de carne, aunque la proporción de predios con toros positivos fue similar en ambos sistemas productivos.

Los principales factores de riesgo para la tricomoniasis bovina son: la cantidad de toros en un mismo establecimiento, reproducción por servicio (monta) natural, y extenso periodo de servicio (servicio continuo) (Ondrak, 2016). En este trabajo todos los toros positivos destinados a lechería pertenecían al mismo establecimiento, donde había 48 toros en total, todos los cuales fueron incluidos en el muestreo. En este trabajo todos los toros positivos destinados a lechería pertenecían al mismo establecimiento, donde había 48 toros en total, todos los cuales fueron incluidos en el muestreo. Rae et al., (2004) indican que los predios que tienen más de 10 toros por grupo de reproducción tienen 3,9 veces más oportunidades de tener infección por *T. foetus*. En Argentina, este último también es un factor de riesgo para la infección por *T. foetus*, sumado el manejo reproductivo continuo (Odds Ratio=1,59) (Molina et al., 2018a).

En Uruguay, 41,3% de los tambos usan servicio continuo como manejo reproductivo (Schild, 2017). Se reporta que 50% de los predios lecheros en el país usa únicamente servicio con toros (monta natural), y un 29% adicional utiliza la combinación de monta natural con IA, es decir que en el 79% de los tambos uruguayos la monta natural es el manejo de elección (INALE, 2014). El uso de toros para repaso como manejo reproductivo en gran parte de los establecimientos lecheros del país minimiza el uso de grandes grupos de estos animales. Por otro lado, la monta natural es un factor de riesgo que puede perpetuar el parásito y consecuentemente la enfermedad en los rodeos.

La detección de *T. foetus* por PCR ha sido previamente reportada (Felleisen et al., 1998; Gookin et al., 2002; Riley et al., 1995). Esta es una herramienta diagnóstica rápida independiente del cultivo que permite obtener resultados en pocas horas (Cobo et al., 2007; Mutto et al., 2006), mientras que el cultivo requiere de una semana para la obtención de resultados negativos (Cobo et al., 2007). La PCR convencional tiene una sensibilidad y especificidad de 78-98,38% y 93,75-96,7% respectivamente, más altas que las pruebas de cultivo (Cobo et al., 2007; Ho et al., 1994; Mukhufhi et al., 2003; Mutto et al., 2006).

Si bien los cebadores utilizados en este trabajo se reportan como específicos para *T. foetus*, Felleisen et al., (1998) reportaron que con estos mismos cebadores también amplificaron el ADN de *Trichomonas mobilensis* y *Trichomonas suis*. *T. mobilensis* es un parásito intestinal que ha sido identificado en monos ardilla (*Saimiri* spp.) (Culberson et al., 1986) y *T. suis* se encuentra

en la cavidad nasal y el tracto digestivo de los cerdos (De Carli y Guerrero Ramírez, 1975). Sin embargo, más recientemente la similitud morfológica, genética y de patogenicidad entre las cepas de *T. foetus* y *T. suis* están siendo ampliamente discutidas. Los autores indican que estas dos especies de *Tritrichomonas* son idénticas, proponiendo cambio en la nomenclatura de *T. suis*, ya que es sinónimo de *T. foetus* (Tachezy et al., 2002; Lun et al., 2005; Slapeta et al., 2012). Los factores arriba mencionados sugieren que la posibilidad de observación de *T. mobilensis* en muestras de esmegma prepucial bovino es baja y que la reacción cruzada con *T. suis* no influye en el diagnóstico ya que es una cepa equivalente a *T. foetus* en todos los aspectos. La secuenciación realizada desde las muestras positivas por PCR en ese estudio demostró 100% de similitud con *T. foetus*, lo que refuerza la confiabilidad de los resultados positivos.

La sensibilidad de la PCR convencional puede ser mejorada utilizando la qPCR para la detección de *T. foetus* (Dufernez et al., 2007; McMillen y Lew 2006), sin embargo, esta técnica no está ampliamente distribuida en los laboratorios veterinarios en Uruguay, entre otros motivos porque requiere técnicos altamente calificados para su ejecución y la validación e interpretación de los resultados, así como equipos y reactivos específicos costosos (Oyhenart, 2018).

La sensibilidad de la técnica de cultivo de *T. foetus* es baja. Perez et al., (2006) reportaron una sensibilidad del 72% a partir un muestreo de 2838 toros usados para producción de carne. En nuestro trabajo no fue posible cultivar *T. foetus*. Este resultado puede deberse a diferentes factores que afectan negativamente a la sensibilidad. Una vez obtenidas las muestras la viabilidad del parásito se ve afectada por el medio de cultivo o transporte empleados, por cambios en la temperatura y por la agitación. Además, una vez crecidas es complejo diferenciar con precisión la contaminación por tricomonas saprófitas, incluso para técnicos capacitados. Existen también factores inherentes a los toros, como la edad y estado reproductivo. La tasa de infección tiende a aumentar en toros mayores a 3 años y en animales en servicio. Las chances de detectar animales positivos aumentan con la cantidad de muestreos, por esto se recomienda la realización de tres tomas de muestras antes de diagnosticar un animal negativo (Yao, 2013).

Debido al alto costo de un resultado falso negativo o positivo a *T. foetus*, es primordial utilizar pruebas que permitan identificar la mayor cantidad de verdaderos positivos y negativos, incluso animales que podrían estar recientemente infectados. Con esta intención, y para lograr una comparación entre las dos pruebas más comúnmente usadas, utilizamos el cultivo y PCR de forma simultánea sobre las mismas muestras. Otra opción es utilizar el PCR en muestras positivas al cultivo para descartar cultivos falsos positivos de esmegma de toros, especialmente proveniente de toros vírgenes (Cobo et al., 2007).

El cultivo de *T. foetus* directamente de esmegma prepucial representa un desafío para los laboratorios diagnósticos ya que el me-

dio de cultivo utilizado promueve el crecimiento de otros microorganismos. Esto afecta directamente el crecimiento de *T. foetus*, por la replicación más rápida de la microbiota acompañante y la acumulación de sus productos metabólicos que disminuyen el pH del medio (Clothier et al., 2015). A su vez, la contaminación de las muestras con materia fecal es otro inconveniente. En las heces puede haber protozoarios saprófitos no patogénicos, como *Tetratrichomonas* spp., *Pentatrichomonas hominis* y *Pseudotrichomonas* spp. que crecen en el medio de cultivo utilizado y son similares en tamaño, forma y motilidad a *T. foetus* (Dufernez et al., 2007). Estas interferencias pueden conducir a un diagnóstico incorrecto de tricomoniasis bovina con importantes consecuencias debido a la eliminación de toros sanos o la perpetuación en el uso de reproductores falsos negativos.

Conclusiones

Tritrichomonas foetus es un patógeno que sigue circulando en Uruguay, tanto en bovinos de leche como de carne. El cultivo del parásito es la prueba que más se ha utilizado para el diagnóstico de tricomoniasis en el país, aunque es posible que su empleo como única técnica resulte en sub-detección de la infección por *T. foetus*. La PCR convencional podría ser implementada en la rutina de los laboratorios de diagnóstico veterinario para la detección de este agente en muestras prepuciales de toros vivos o faenados, aunque se requieren esfuerzos adicionales para la validación de la técnica en nuestras condiciones. Estudios epidemiológicos y de estimación de pérdidas económicas deberían realizarse para determinar la prevalencia y la real importancia de la tricomoniasis bovina para la ganadería uruguaya.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los veterinarios, productores y frigoríficos que permitieron la realización de los muestreos en sus establecimientos y a Fernando Paolicchi y Juan García de INTA Balcarce, Argentina por la provisión de los controles positivos. La investigación que da origen a los resultados presentados recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo a los códigos FSSA_X_2014_1_105696 y POS_FSSA_2015_1_1005321.

Referencias bibliográficas

- Altschul, S., Madden, T., Schäfer, A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D. (1997). Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389–3402.
- Alves, T. M., Stynen, A. P. R., Miranda, K. L., Lage, A. P. (2011). Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesqu Vet Bras*, 31, 336-344.
- BonDurant, R. H. (2005). Venereal diseases of cattle: natural

- history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 21, 383-408.
- Cassamagnaghi, A., Cassamagnaghi, A. (1944). La trichomoniasis de los bovinos. Su reconocimiento en el ganado uruguayo. *Anal Fac Vet*, 4(3), 357-375.
- Clark, C. G., Diamond, L. S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev*, 15, 329-341.
- Clothier, K. A., Villanueva, M., Torain, A., Hult, C., Wallace, R. (2015). Effects of bacterial contamination of media on the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* by culture and real-time PCR. *Vet Parasitol*, 208, 143-149.
- Cobo, E. R., Favetto, P. H., Lane, V. M., Friend, A., VanHooser, K., Mitchell, J., BonDurant, R. H. (2007). Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology*, 68, 853-860.
- Culberson, D. E., Pindak, F. F., Gardner, W. A., Honigberg, B. M. (1986). *Tritrichomonas mobilensis* n. sp. (Zoomastigophorea: Trichomonadida) from the Bolivian squirrel monkey *Saimiri boliviensis boliviensis*. *J Protozool*, 33, 301-304.
- De Carli, G., Guerrero Ramirez, J. (1975). *Tritrichomonas suis*: isolamento, morfologia e incidência na cavidade nasal de porcos domésticos do Rio Grande do Sul. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ S Paulo*, 12, 269-276.
- Dufernez, F., Walker, R. L., Noël, C., Caby, S., Mantini, C., Delgado Viscogliosi, P., Ohkuma, M., Kudo, T., Capron, M., Pierce, R. J., Villanueva, M. R., Viscogliosi, E. (2007). Morphological and molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. *J Eukaryot Microbiol*, 54, 161-168.
- Eaglesome, M. D., Garcia, M. M. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet Bull*, 62, 743-775.
- Easton, C. (2006). *Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay* (Tesis de Maestría). Udelar, FV, Montevideo.
- Errico, F., Bosman, M., Tedesco, L., Bermúdez, J., Barriola, J. (1978). Enfermedades venéreas de los bovinos (vibriosis genital y trichomoniasis bovina). Presencia y distribución en el país. En *Anales de las Sextas Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 1-4). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Felleisen, R. S., Lambelet, N., Bachmann, P., Nicolet, J., Müller, N., Gottstein, B. (1998). Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Clin Microbiol*, 36, 513-519.
- Filho, R. B. O., Malta, K. C., Borges, J. M., Oliveira, P. R. F., Filho, G. J. S., Nascimento, G. G., Mota, R. A., Júnior, J. W. P. (2018). Prevalence and risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. *Acta Parasitol*, 63, 346-353.
- Goodger, W. J., Skirrow, S. Z. (1986). Epidemiologic and economic analyses of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *J Am Vet Med Assoc*, 189, 772-776.
- Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B., Levy, M. G. (2002). Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J Clinical Microbiol*, 40, 4126-4130.
- Herrera, B., Repiso, M. V., Silveyra, S. (1986). Algunos aspectos de la trichomoniasis y campylobacteriosis bovina, en la cuenca lechera del Uruguay. En *Anales de la XIV Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 1-7). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Ho, M. S. Y., Conrad, P.A., Conrad, P. J., LeFebvre, R. B., Perez, E., BonDurant, R. H. (1994). Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *J Clin Microbiol*, 32, 98-104.
- INALE (2014). Encuesta Lechera Inale 2014: resultados preliminares. Recuperado de: <https://www.inale.org/historico/wp-content/uploads/2018/08/Encuesta-lechera-2014.pdf>
- Lun, Z. R., Chen, X. G., Zhu, X. Q., Li, X. R., Xie, M. Q. (2005). Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends Parasitol*, 21, 122-125.
- 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.
- Molina, L. L., Angón, E., García, A., Caballero-Villalobos, J., Giorgis, A. O., Moralejo, R. H., Perea, J. (2018a). A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev Vet Med*, 161, 109-114.
- Molina, L. L., Angón, E., García, A., Moralejo, R. H., Caballero-Villalobos, J., Perea, J. (2018b). Time series analysis of bovine venereal diseases in La Pampa, Argentina. *PLoS ONE*, 13, 1-17.
- Mukhufhi, M., Irons, P. C., Michel, A., Peta, F. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogenology*, 60, 1269-1278.
- Mutto, A. A., Giambiaggi, S., Angel, S. O. (2006). PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. *Vet Parasitol*, 136, 357-361.
- Oliveira, J. M. B., Silva, G. M., Batista Filho, A. F. B., Borges,

- J. M., Oliveira, P. R. F., Brandespim, D. F., Mota, R. A., Pinheiro Junior, J. W. P. (2015). Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 47, 549–555.
- Ondrak, J. D. (2016). *Tritrichomonas foetus* prevention and control in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 32, 411–423.
- Oyhenart, J. (2018). Direct detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle genital fluid through loop mediated isothermal amplification of elongation factor 1 alpha 1. *Vet parasitol*, 261, 67–72.
- Perez, A., Cobo, E., Martínez, A., Campero, C., Späth, E. (2006). Bayesian estimation of *Tritrichomonas foetus* diagnostic test sensitivity and specificity in range beef bulls. *Vet Parasitol*, 142, 159–162.
- Rae, D. O., Crews, J. E., Greiner, E. C., Donovan, G. A. (2004). Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology*, 61, 605–618.
- Rae, D. O., Crews, J. E. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 22, 595–611.
- Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernandez, L., Guarino, H., Herrera, B., Nuñez, A., Olivera, M., Osawa, T., Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria (Montev.)*, 40, 5–28.
- Ribeiro, C. M., Falleiros, M. B., Bicudo, S. D., Júnior, J. A., Golim, M. A., Silva Filho, F. C., Padovani, C. R., Modolo, J. R. (2010). *Tritrichomonas fetus* extracellular products decrease progressive motility of bull sperm. *Theriogenology*, 73, 64–70.
- Riley, D. E., Wagner, B., Polley, L., Krieger, J. N. (1995). PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. *J Clin Microbiol*, 33, 1308–1313.
- Rocha, F. S., Jesus, V. L. T., Torres, H. M., Gomes, M. J. P., Figueiredo, M. J., Nascimento, E. R., Ferreira, T., Aquino, M. H. C. (2009). Investigacao de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Medio Paraiba, RJ. *Cienc Rural*, 39, 1586–1589.
- Rojas, M., Vazquez, P., Verdier, M., Campero, C. (2011). Evolución y distribución de las enfermedades de transmisión sexual en bovinos del partido de Rauch, prov. Buenos Aires, años 2001–2009. *Vet Arg*, 27, 1–14.
- Schild, C. (2017). Estimación de la tasa de mortalidad anual de terneros y caracterización de los sistemas de crianza en establecimientos lecheros de Uruguay (Tesis de Maestría en Salud Animal). Udelar. FV, Montevideo.
- Schönmann, M. J., BonDurant, R. H., Gardner, I. A., Van Hoosear, K., Baltzer, W., Kachulis, C. (1994). Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *Vet Rec*, 134, 620–622.
- Slapeta, J., Müller, N., Stack, C. M., Walker, G., Lew-Tabor, A., Tachezy, J., Frey, C. F. (2012). Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int J Parasitol*, 42, 1143–1149.
- Suarez, V. H., Miranda, A. O., Arenas, S. M., Schmidt, E. E., Lambert, J., Schieda, A., Felice, G., Imas, D., Sola, E., Pepa, H., Bugnone, V., Calandri, H., Lordi, L. V. (2008). Prevalencia de patologías e incidencia de la sanidad en los sistemas bovinos en el este de la provincia de La Pampa, Argentina. *Vet Arg*, 25, 258–280.
- Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Sedinová, M., Vanacová, S., Vrlík, M., Van Ranst, M., Flegr J, Kuldaa 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.
- Tedesco, L. F., Errico, F., Del Baglivi, P. L. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust Vet J*, 53, 470–472.
- Terzolo, H. R., Argento, E., Catena, M. C., Cipolla, A. L., Martínez, A. H., Tejada, G., Villa, C., Betancor, R., Campero, C. M., Cordeviola, J. M., Pasini, M. I. (1992). Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de campylobacteriosis y trichomoniasis genital bovina. En *Documento de la Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos*. Balcarce: INTA.
- 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.

Notas de contribución

Todos los autores participaron en igual medida en todos los procesos de diseño, recolección de datos, análisis, redacción y revisión.

El editor Cecilia Cajarville aprobó este artículo.