

APLICACIÓN DE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) EN LA CONFIRMACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE LA TRICOMONIASIS BOVINA

R. Cobo(1), A. Odeón(2), A. Cipolla(2) y C.M. Campero(2). 2003. Presentado durante la XIVa. Reunión Anual de la AAVLD, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.

(1)CONICET, (2)INTA Balcarce, Argentina.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades de la reproducción](#)

INTRODUCCIÓN

La Tricomoniasis es una enfermedad venérea del bovino ocasionada por el protozoo *Trichomonas foetus*. El test diagnóstico de rutina es el cultivo de muestras prepuciales, fetales o vaginales en medios ad hoc y el examen microscópico directo. Una de las claves para la identificación de *T. foetus* es su característico movimiento y morfología en el cultivo (1, 4). El diagnóstico correcto depende de una adecuada obtención de la muestra, uso de medios de cultivo apropiados y la identificación microscópica de *T. foetus*(2, 3, 4). Pese a ello, en algunas circunstancias el crecimiento de *T. foetus* es inadecuado y el número de protozoos insuficiente para su detección (2), o bien es factible observa protozoos de origen intestinal, presumiblemente apatógenos e indistinguibles de *T. foetus*(1, 4). La presentación de casos falso diagnóstico positivo de tricomoniasis a partir de material prepucial de toros jóvenes mediante la técnica de la polymerase chain reaction (PCR) ha sido mencionado (1). El objetivo del presente trabajo es la aplicación de PCR para diferenciar *T. foetus* de otros protozoos con morfología similar presentes en cultivos de esmegma prepucial de toros jóvenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 45 cultivos con diagnóstico presuntivo de *T. foetus*. Las muestras provinieron de diferentes laboratorios de diagnóstico privados de la provincia de Buenos Aires y se remitieron al Laboratorio del INTA Balcarce para su confirmación. Los motivos de su envío eran la observación de un protozoo de morfología atípica pero con alguna similitud con *T. foetus*, o bien por que los antecedentes del animal (toros supuestamente vírgenes) no correspondían a casos de Tricomoniasis bovina. Las muestras fueron remitidas en medios de cultivo que diferían según el Laboratorio (caldo de hígado, Shuterland, Plastridge u otro similar). A partir de los cultivos sospechosos se utilizó PCR para amplificar secuencias específicas de ADN utilizando dos pares de primers que codifican genes 5.8S ARN ribosomal (1, 3). Un par de ellos (TF1 y TF2) amplifican material genómico de protozoos del género *Trichomonad* y el otro par de primers (TF3 y TF4) amplifican una secuencia específica para *T. foetus* (1, 3). Paralelamente, los cultivos recibidos fueron subcultivados en aerobiosis a 37°C en caldo infusión hígado (H), Diamond (D) y Schneider's (S) (con cáscara de huevo) (1, 4) durante un máximo de 7 días. Se realizaron tinciones de los organismos con Dic Quick (1), Giemsa y azul de metileno (4).

RESULTADOS

PCR: A partir de los 45 cultivos positivos amplificados con los dos pares de primers, 31 cepas no correspondían con la especie *T. foetus* (TF1/TF2: +, y TF3/TF4: -), resultando protozoos no específicos, o falsos positivos al cultivo, y 14 cepas correspondían con la especie *T. foetus* (TF1/TF2: +, y TF3/TF4: +).

Cultivos: La totalidad de los cultivos recibidos tuvieron crecimiento adecuado en el medio S. En la mayoría de los casos se observó una severa contaminación bacteriana. Los cultivos positivos alcanzaron su máximo crecimiento exponencial a las 48-72 h. En la Tabla 1 se detalla el comportamiento de los cultivos iniciales en los medios utilizados.

Tinciones: Todos los protozoos evidenciaron una forma ovoide/piriforme, de tamaño igual o levemente inferior al referido para *T. foetus*, con presencia de 3-4 flagelos anteriores, un flagelo posterior con su terminación libre prolongada, una membrana ondulante y un axostilo prominente, resultando prácticamente imposible la diferenciación entre los protozoos no específicos y *T. foetus* al microscopio óptico.

DISCUSIÓN

La aplicación de PCR en el diagnóstico de la tricomoniasis bovina a partir de cultivos positivos resulta de utilidad debido a su alta sensibilidad y especificidad (1, 2, 3). En el presente trabajo, se comprueba la eficacia de PCR para definir los diagnósticos conflictivos, sospechosos o falsos positivos. Además, estos hallazgos permiten

confirmar la presencia de otros protozoos Trichomonads o flagelados relacionados en el tracto genital de toros jóvenes, en coincidencia con otros autores (1, 4). Dichos protozoos inespecíficos cohabitan normalmente el tracto digestivo y colonizarían esporádicamente el prepucio y pene de toros debido a un comportamiento homosexual, común en toros jóvenes durante su crianza (1). El elevado porcentaje de cultivos falsos positivos observado en el presente trabajo se debe a que las cepas analizadas fueron casos sospechosos siendo necesaria su confirmación. Por otro lado, este trabajo pone de manifiesto la limitación que el cultivo ofrece como método de diagnóstico, ya que no permite diferenciar entre *T. foetus* y otros protozoos flagelados que pueden habitar esporádicamente la cavidad prepucial del toro. Además, se comprueba que diferentes protozoos pueden desarrollar en los medios de cultivo tradicionales, especialmente cuando las muestras se encuentran contaminadas con materia fecal o barro (1). Entre los medios de cultivos utilizados el medio S fue adecuado para el desarrollo de protozoos no específicos; ya que siendo rico en nutrientes permite el desarrollo de toda clase de protozoos, aunque también favorece el crecimiento de contaminantes bacterianos de origen prepucial y/o entérico. El medio D resultó el más específico ya que los protozoos inespecíficos desarrollaron sólo esporádicamente. La tinción de los cultivos permitió solo esporádicamente la observación de algunas de las características morfológicas (número de flagelos), requiriendo la observación microscópica con lente de inmersión y una adecuada formación en la morfología parasitaria, que no lo hacen un método muy práctico. Si bien la utilización de PCR en la confirmación de los cultivos sospechosos y/o positivos de *T. foetus* aporta alta especificidad en el diagnóstico, los elevados costos y equipamiento necesario son limitantes para implementar dicha técnica en la rutina de los laboratorios de diagnóstico veterinario.

Volver a: [Enfermedades de la reproducción](#)