

Presencia de trichomonadidos y otros protozoos no patógenos durante 5 años de diagnóstico de trichomoniasis

Vet. Arg. ? Vol. XXX - Nº 303 ? Julio 2013.

Sánchez R. O.*; Boero C. A.*

Resumen.

Se realizó un análisis retrospectivo de 5 años de diagnóstico de trichomoniasis genital bovina en la zona central de la Mesopotamia Argentina. Todas las muestras que presentaron crecimiento de protozoos fueron nuevamente repicadas y teñidas para observación de morfología y recuento de flagelos. Un total de 63717 muestras fueron analizadas, siendo identificadas 687 muestras como *Tritrichomonas foetus* (1.08%), 72 muestras fueron identificadas como *Tetratrichomonas spp.* (0.11%), 15 muestras como *Pentatrichomonas spp.* (0.02%) y 44 muestras fueron identificadas como protozoos no trichomonadidos (0.07 %). La combinación del cultivo + tinción permitió detectar en promedio un 11.8 % de trichomonadidos no *T. foetus*, mejorando la especificidad de la utilización del cultivo solamente.

Palabras Clave: *Tritrichomonas foetus*; *Tetratrichomonas spp.*; *Pentatrichomonas spp.*; Flagelados; Ciliados; Toros.

Presence of Trichomonadidos and other non-pathogenic protozoa during diagnosis of genital bovine trichomoniasis.

A retrospective analysis of five years of diagnosis of bovine genital trichomoniasis in central Mesopotamia Argentina were performed. All samples showed growth of protozoa were peeled again and stained for morphology observation and counting of flagella. A total of 63717 samples were analyzed, 687 samples were identified as *Tritrichomonas fetus* (1.08%), 72 samples were identified as *Tetratrichomonas spp.* (0.11%), 15 samples as *Pentatrichomonas spp.* (0.02%) and 44 samples as protozoa non-trichomonadids (0.07%). The combination of culture + staining allowed detection on average 11.8% of trichomonadids non-*T. fetus*, improving the specificity of the growth in culture media only.

Key Words: *Tritrichomonas foetus*; *Tetratrichomonas spp.*; *Pentatrichomonas spp.*; Flagelates; Ciliates; bull.

*Laboratorio Mesopotámico de Diagnostico Veterinario. Ramirez 72, Concordia (CP 3200). Entre Ríos.

ricardosanchez74@gmail.com

Introducción.

La trichomoniasis genital bovina (TGB) es una enfermedad parasitaria de transmisión venérea, producida por *Tritrichomonas foetus*. Este parásito coloniza la mucosa del pene y prepucio del toro sin producir signos clínicos, pero en las hembras puede provocar la muerte embrionaria, generalmente antes de las 16 semanas de gestación y una infertilidad pasajera debido a la endometritis ocasionada por la colonización uterina del parásito (Campero y col. 1993, Corbeil, 1989, Rhyan y col. 1988). El principal signo que se observa en el rodeo es la repetición del celo y en ocasiones puede presentarse abortos y piómetras que suelen ser detectadas al momento del tacto. Un bajo porcentaje de preñez y un aumento de la cola de parición en rodeos estacionados suele observarse principalmente en vaquillonas cuando la infección es endémica, o en todas las categorías cuando TGB entra por primera vez a un rodeo libre de enfermedad.

El diagnóstico de rutina se basa en la demostración mediante cultivo del parásito, en condiciones de laboratorio. Para ello se realiza el muestreo de toros, vacas, e incluso fetos. Las muestras recogidas son sembradas en medios de cultivo, que permiten la multiplicación del parásito y la posterior observación al microscopio óptico.

En nuestro país la sensibilidad del cultivo para diagnóstico de TGB con 1 solo muestreo alcanzó el 72% con un intervalo de confianza del 95% que varía entre el 59% al 87% (Perez y col., 2006). Estos valores varían según la calidad de la toma de muestra, conservación de la misma, calidad del medio de cultivo, entre otras. La sensibilidad de la prueba aumenta a medida que aumentamos la cantidad de raspajes prepuciales, haciéndose necesario realizar 2 o más muestreos para disminuir la cantidad de falsos negativos (Parker y col. 1999, Perez y col., 2006).

Por mucho tiempo la especificidad del cultivo de trichomonas ha sido considerada cercana al 100%, sin embargo, la descripción de otros parásitos que pueden ser recolectados del prepucio de toros, y crecer en el medio de cultivo, pone en duda su verdadero valor (Taylor y col., 1994, Bondurand y col., 1999, Walter y col., 2003). *Tetratrichomonas spp* y *Pentatrichomonas spp*, son los trichomonadidos más frecuentes que pueden ser confundidos con *T. foetus*. En nuestro país, *Tetratrichomonas spp* y *Pentatrichomonas spp* han sido identificadas mediante PCR, microscopía electrónica y/o tinción flagelar (Campero y Cobos, 2003, Cobo y col., 2003, Sanchez y col., 2005). Materiales y Métodos.

Se realizó el análisis retrospectivo de muestras ingresadas al Laboratorio Mesopotámico de Diagnóstico Veterinario durante en el período (2008 ? 2012) para diagnóstico de TGB. Las muestras fueron tomadas y sembradas por veterinarios

de actividad privada en condiciones de campo, en medio de transporte y cultivo a base de caldo de infusión de hígado (Sutherland modificado). Una vez llegadas al laboratorio, las muestras se mantuvieron en estufa a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 1 semana. Transcurridas las primeras 24hs de incubación y durante no menos de 5 días posteriores, se procedió a la lectura de una gota del fondo del tubo al microscopio óptico para la detección de crecimiento de protozoos.

Las muestras que presentaron crecimiento compatible con *T. foetus* fueron repicados nuevamente en un medio de cultivo nuevo, y se le realizó tinción flagelar con Giemsa (20% en buffer ph 6.8) x 30 min o mediante Tinción 15 (Biopur MR), siguiendo el siguiente protocolo:

Extender una pequeña gota del cultivo en el momento de mayor crecimiento, y realizar un extendido fino.

Acercar el portaobjeto a fuente de calor moderada (mechero o calefactor) para proceder a matar las tricomonas y secar la gota teniendo la precaución de no excederse con la temperatura

Fijación: 1-2 min con el fijador. Secar con calor suave.

Colorante 1: sumergir 1-2 min, Secar con calor suave.

Colorante 2 : sumergir 1 min. Enjuagar con agua de red suavemente y secar.

Observar con 1000 aumentos bajo aceite de inmersión.

Muestras incluidas en el análisis:

Se incluyó al total de muestras analizadas para diagnóstico de TGB sin discriminar categoría (macho, hembra), ni número de muestreo.

Análisis de datos:

Se analizó la metodología diagnóstica utilizada para identificar verdaderos T3 utilizando la siguiente fórmula:

$$\% T3 = 100 * (T3 / (T3 + T4 + T5)).$$

Donde: T3 corresponde a muestras identificadas como *T. foetus*.

T4 corresponde a muestras identificadas como *Tetratrichomonas sp.*

T5 corresponde a muestras identificadas como *Pentatrichomonas sp.*

Resultados.

Mediante la metodología utilizada en el diagnóstico de laboratorio se permitió generalizar algunas diferencias en el comportamiento de los diferentes

trichomonadidos en la que se basó el diagnóstico.

T. foetus, repicó generalmente en medios de cultivo nuevos y su movimiento espasmódico, enérgico y continuo fue característico. La tinción mostró 3 flagelos de similar longitud y de un largo aproximadamente igual al del cuerpo del parásito y una membrana ondulante bien definida. Se observaron diferencias en cuanto a la morfología y comportamiento en los medios de cultivo en diferentes aislados de campo. La morfología varió de alargadas, de aspecto delgado a forma de gota y hasta levemente globosas en ocasiones. Los flagelos tomaron bien la tinción.

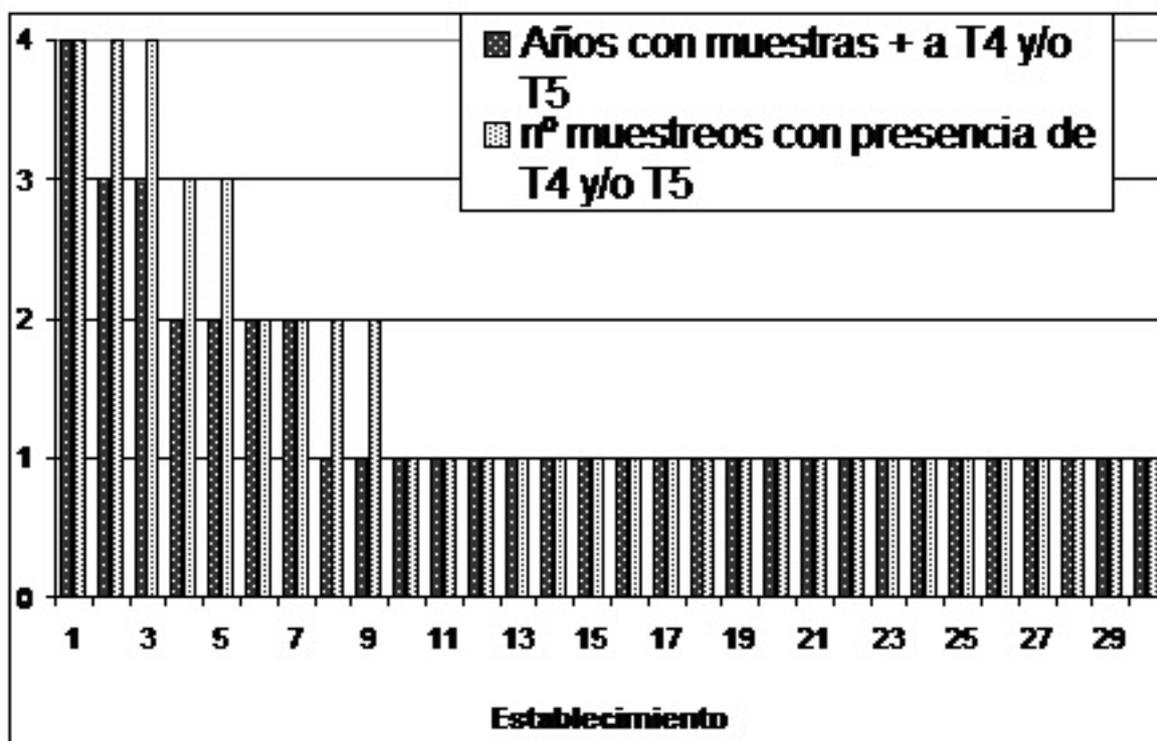
Tetratrichomonas sp., aparecieron generalmente relacionadas a la presencia de medios de cultivo con abundante contaminación, aunque de manera no excluyente; Tiende a ser más pequeña y globosa, con movimiento más lento y menos vigorosos que T3. En la tinción suelen presentar vacuolas con contenido basófilo en su interior. Los flagelos pueden presentar diferente longitud y son más difíciles de observar en los extendidos. En algunos aislados no se pudo observar membrana ondulante, y en otros esta fue bien definida. No repicaron en medios nuevos a pesar de que pudieron mantenerse viables 24 a 72 hs. En medios contaminados en ocasiones se las logro mantener viva, aunque solo por unos días.

Pentatrichomonas sp., Lograron repicar y mantenerse en medio de cultivo nuevos por varios meses en el laboratorio y es morfológicamente muy similar a T3 durante el diagnóstico de rutina, aunque de aspecto levemente más redondeada y movimiento menos enérgico. En la tinción se logró diferenciar ejemplares con 4,5 o mas flagelos anteriores, los cuales tomaron bien la tinción.

El resto de los protozoos observados durante la rutina diagnóstica, difieren significativamente con la morfología y patrón de movimientos compatibles con T3. Los Ciliados observados son redondeados a ovales, grandes (30-35 μm aprox) con movimiento lineal. Generalmente se asociaron a muestras contaminadas y en la tinción presentan todo el contorno rodeado de cilias. Los biflagelados, son mucho más pequeños (alrededor de 5-7 μm) y con un movimiento muy vigoroso en todas direcciones y en ocasiones se pudieron repicar en medios de cultivo usados y contaminados. En la tinción aparece de forma redondeada o alargada, con presencia visible de 1 o 2 flagelos hasta 3 o 4 veces el largo del cuerpo.

Se registraron 47 muestreos correspondientes a 30 establecimientos donde se identificaron muestras positivas a trichomonadidos no *T3*. La frecuencia en que dichos establecimientos presentaron muestreos positivos a T4 o T5 y la cantidad de años en los que se diagnosticaron en el mismo establecimiento se presenta en la figura 1.

Figura 1: número de años y muestreos en que se recuperaron T4 y/o T5 para los 30 establecimientos donde se diagnosticaron Trichomonados no *T. Foetus*.



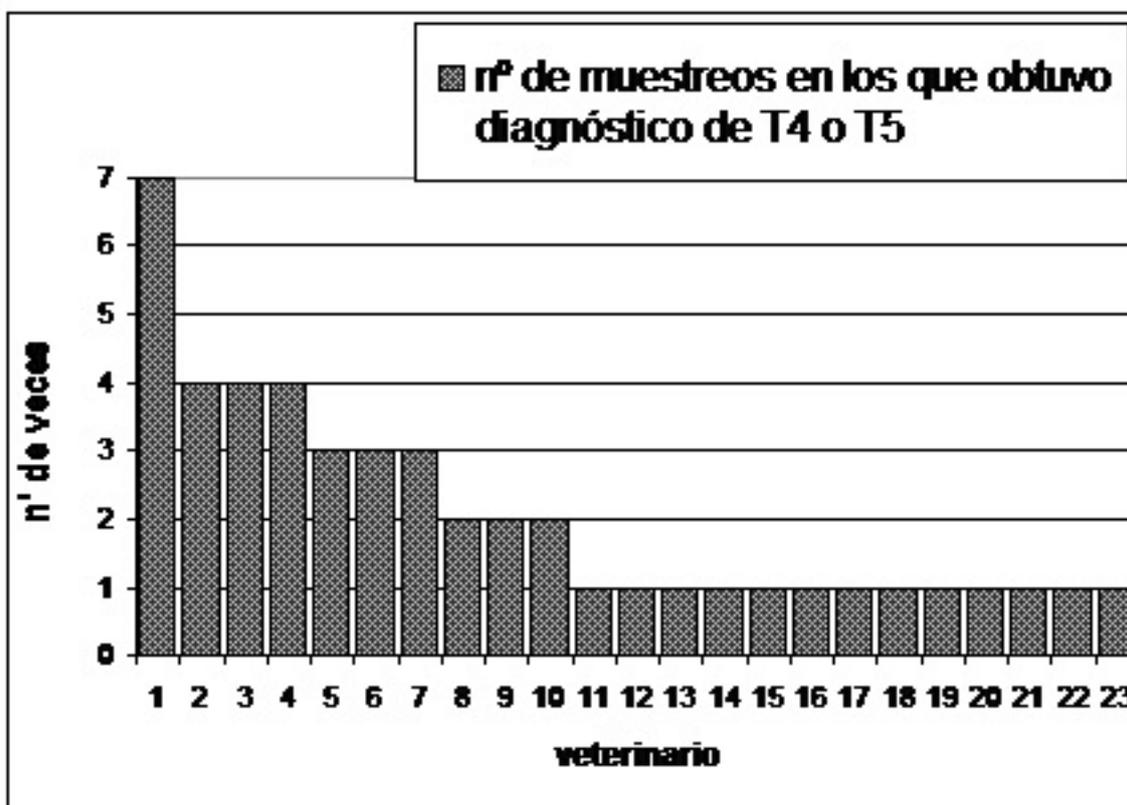
De estos establecimientos, la mayor frecuencia de diagnóstico correspondió a toros vírgenes de cabañas. No se pudo establecer un porcentaje exacto ya que no se obtuvo el dato en todos los casos acerca del tipo de establecimiento y categoría animal en todos los rodeos analizados. T4 y T5 se identificaron tanto en toros vírgenes como en adultos.

La mayor cantidad de toros con trichomonadidos no *T. foetus* (64%) correspondieron a animales integrantes de rodeos mayores a 25 animales.

En cuatro oportunidades, se encontraron rodeos albergando T3 y T4 durante el mismo muestreo, pero no se halló nunca la combinación (T3 + T5) o (T4 + T5) en una misma torada. No se halló durante el periodo en estudio infección mixta de protozoos en un mismo animal.

La frecuencia en que los veterinarios obtuvieron muestras positivas a T4 y/o T5 se presenta en la figura 2.

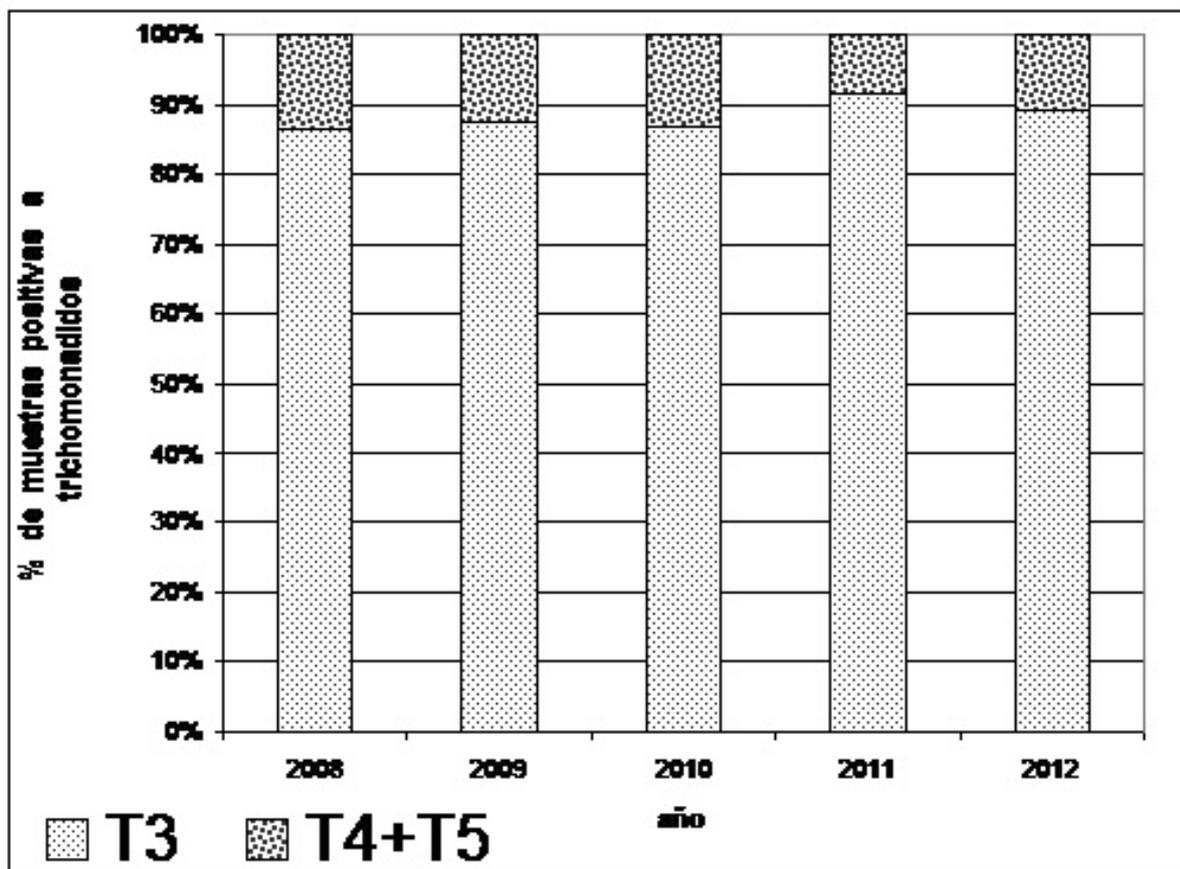
Figura 2: cantidad de muestreos positivos a T4 y T5 obtenidos por diferentes veterinarios



El porcentaje de muestras identificadas como *T. foetus* y de muestras identificadas como *Tetratrichomonas sp.* y *Pentatrichomonas sp.* en conjunto, en relación a total de muestras con presencia de trichomonadidos (T3+T4+T5) se presenta en la figura 3.

Figura 3: Porcentaje de muestras correspondientes a *T. foetus* (T3) y otros trichomonadidos (T4+T5) en relación al total de trichomonadidos identificados

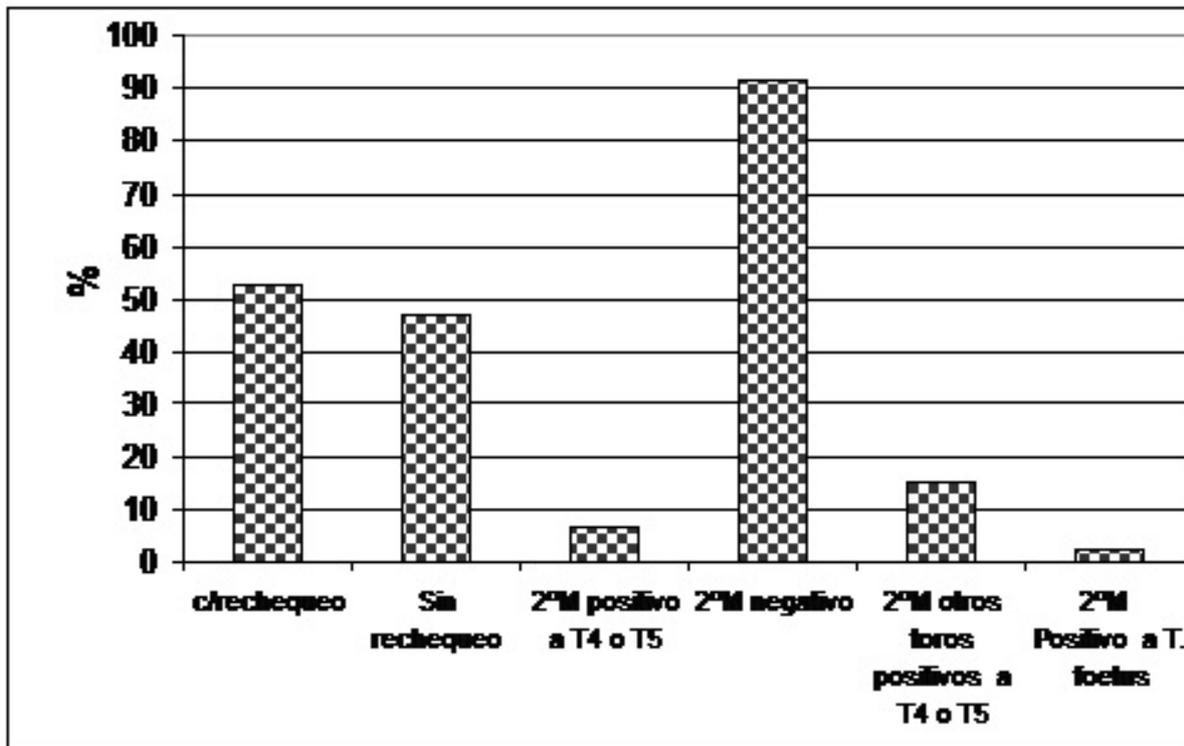
(T3+T4+T5).



Mediante la rutina diagnóstica aplicada para detectar *T. foetus* (calculado en base a el total de trichomonadidos identificados en los cultivos positivos (T3 + T4 +T5)), se logró detectar en promedio un 11.8 % (rango 8.4% ? 13,4%) de trichomonadidos no *T. foetus*.

El 47 % de las muestras con presencia de T4 o T5 no fueron reenviadas por los veterinarios para un segundo muestreo. De las que tuvieron 2 muestreos, solo el 6.5% volvió a dar positiva a T4o T5. En el 91.3% de los toros con diagnóstico de Trichomonadidos no *T. foetus*, en un muestreo, arrojó resultados negativos en una segunda oportunidad. Solo un toro diagnosticado como T4, (2.17%), se identificó como T3 en el siguiente muestreo. En el 15% de las veces en que se hizo 2 muestreos en rodeos con presencia de T4 o T5 se hallaron animales positivos a T4 o T5 diferentes a los animales positivos en el primer muestreo. (Fig. 4)

Figura 4: resultados del rechequeo de muestras diagnosticadas como T4 o T5.



Discusión.

La presencia de otros protozoos diferentes a *T. foetus* en la cavidad prepucial de toros ha sido previamente citada por varios autores (BondDuradt y col., 1999, Campero y col., 2003, Cobo y col., 2003, Sánchez y col. 2005, Taylor, 1994).

Si bien existen varios trabajos donde se informa la prevalencia de trichomonas a nivel mundial (BonDurandt, y col., 1990, Campero y col., 2006, Martin-Gomez y col., 1996), son escasos los datos acerca de lo que pasa con la prevalencia de otros trichomonadidos que pudieran estar influyendo en la especificidad de la prueba diagnóstica. Walker y col., en el año 2003 realizaron un estudio de 39 cultivos prepuciales positivos a trichomonadidos en el cual se utilizó la tinción, características morfológicas y PCR para el diagnóstico final. Mediante la tinción y recuento de flagelos lograron identificar correctamente todas las muestras identificadas como *T. foetus* posteriormente mediante PCR y además lograron diferenciar T4 de T5 en la mayoría de las muestras. El autor describe las dificultades de la interpretación de la tinción y concluye en que la biología molecular es una herramienta rápida y aplicable para la correcta identificación de estos protozoos. Dufernez y col., 2007, lograron identificar mediante tinción y confirmar con PCR la presencia de *Tetratrichomonas* spp, *Pentatrichomonas* spp y *Pseudotrichomonas* procedente de 12 muestras de toros.

Campero y col., en el año 2003, describieron una prevalencia cercanas al 8.5% de protozoos no *T. foetus* en un rodeo de toros vírgenes de 1 a 2 años de edad. Además, encontraron que entre un 14% y un 42% de los animales, repitieron el resultado en un segundo muestreo. Cobos y col., en el año 2004, luego de una infección experimental en toros con *Tetratrichomonas spp*, no lograron recuperarla en muestreos prepuciales posteriores a la infección. Nuestros resultados arrojaron que en solo el 6.52% de los toros que se rasparon por segunda vez, se volvió a aislar Trichomonadidos no T3 y en un 15.2% de los re chequeos se encontraron otros toros con T4 o T5 el mismo lote de animales. Estos datos sugieren la posibilidad de que existan varias especies de *Tetratrichomonas* involucradas y que tengan diferentes características de adaptación al prepucio y al medio de cultivo.

Tetratrichomonas spp, pareciera ser el trichomonadido no T3 más frecuentemente hallado. Sanchez *et al.* (2006), informa que sobre 232 tinciones de cultivos prepuciales positivos, un 2.7% de muestras correspondieron a *Tetratrichomonas spp*. y un 1.35 % de los muestras a otros protozoos no trichomonadidos. Estos datos son sustancialmente menores a los encontrados durante el presente reporte. Las diferencias de razas y cruza de bovinos existentes en el norte de nuestro país, como así también el tamaño de los rodeos podrían tener algún efecto los resultados obtenidos. La presencia de sangre cebuina, con mayor temperamento en la manga, podría dificultar la maniobra de muestreo o hacerla menos higiénica. Si bien, la frecuencia de muestras con barro o materia fecal no se contabilizó en los análisis, pudo haber sido significativamente diferente.

La conducta de monta entre toros, especialmente en animales jóvenes ha sido propuesta como la fuente de contaminación del prepucio con trichomonadidos intestinales (Campero y col., 2003). El mayor tamaño de los rodeos pareciera tener también alguna relación, ya que en nuestro estudio la mayor cantidad de toros con presencia de T4 o T5 se realizó sobre toradas de más de 25 animales al igual que lo descrito por otros autores (Campero y col., 2003). En uno de los establecimientos en el que se aisló T4 de 19 toros vírgenes sobre un total de 194 animales, el veterinario afirmó que las condiciones climáticas previas al muestreo y de la manga podrían haber influido en la calidad de las muestras.

En 2 oportunidades, y en ocasión de reclamos post venta, se muestreó por segunda vez al animal diagnosticado con trichomonadidos no T3 por tinción mediante PCR, siendo los resultados de las mismas negativas a T3. Estos animales fueron hasta el momento los únicos comparados con una técnica altamente específica como es la PCR.

Todas muestras con presencia de trichomonadidos (T4 y T5) fueron informados al veterinario con la recomendación de volver a muestrear para confirmar, sin embargo, solo el 53% de los animales fueron nuevamente muestreados. La presencia de protozoos con 4 o 5 flagelos, junto con los antecedentes sanitarios del establecimiento y/o la categoría animal (toro virgen o no) le alcanzó a en

muchas ocasiones a el profesional veterinario para definir el estatus sanitario del animal.

La presencia de toros albergando T3 y T4 ha sido informado previamente (Boullon y col., 2006). En nuestro estudio, solo en una oportunidad un animal al que se informo como T4 fue identificado como T3 en el siguiente muestreo. Este animal fue informado como T4 debido al escaso desarrollo en el cultivo original, que dificultó la observación microscópica y a la falta de repique en medios nuevos. No se pudo confirmar fehacientemente que halla estado albergando ambos protozoos en el 1er muestreo.

A pesar de que no se calculó la especificidad del diagnóstico de *T. foetus* por falta de la comparación del resultado con una prueba de oro que la avale, se pudo estimar que en promedio el 11.8% de los cultivos positivos con presencia de trichomonadidos, no correspondieron a *T. foetus*. Este resultado, fue al menos avalado en parte por algunos muestreos posteriores al diagnóstico y la historia de rodeos (libres de *T. foetus*) categoría de animal (*toros vírgenes*), higiene del muestreo etc.

El factor profesional veterinario y establecimiento podría llegar a tener también alguna importancia, aunque es difícil de determinar debido a que los veterinarios realizan raspajes generalmente en los mismos establecimientos, Sin embargo algunos veterinarios tuvieron diagnóstico de trichomonadidos no *T. foetus* en diferentes establecimientos muestreados.

La confirmación mediante PCR es altamente específica para el diagnóstico de *T. foetus* y hoy en día esta disponible en nuestro país, aunque en pocos laboratorios debido a su costo de implementación (Campero y col 2003). Otras técnicas moleculares como el LAMP, (loop mediated isothermal amplification) podría ser una alternativa económica de diagnóstico molecular a nivel de pequeños laboratorios (Gracia Martinez et al, 2010)

Conclusión.

La metodología diagnóstica utilizada puede ser implementada por los laboratorios de diagnóstico veterinario a un bajo costo y mejorar la especificidad del diagnóstico. Mediante la misma, se logro diferenciar un 11.8% de toros infectados con trichomonadidos no *T. foetus*. Esta metodología podría ser utilizada como primera alternativa económica y rápida para mejorar la especificidad del diagnóstico de TGB y dejar la utilización de PCR para los casos de reclamo o aquellos de difícil resolución debido a su alta sensibilidad y especificidad.

Bibliografía.

- BONDURANT R.H., ANDERSON M. L., BLANCHARD P., HIRD D., DANAYE-ELMI C., PALMER C., SISCHO W. M., SUTHER D., UTTERBACK W., WEIGLER B. J. 1990. Prevalence of trichomoniasis among California beef herds. J Am Vet Med Assoc. 196:1590-1593.
- BONDURANT R.H., GAJADHAR A., CAMPERO C.M., JOHNSON E., LUN Z.-R., NORDHAUSEN R.W., VAN HOOSEAR K.A., VILLANUEVA M.R., WALKER R.L. 1999. Preliminary characterization of a *Tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial smegma of virgin bulls. Bovine Practitioner 33, 124-127.
- BOULLON M.C., PALLADINO M.R., FERNANDEZ A.M. 2006. Presencia De *Tritrichomonas foetus* Y *Tetratrichomonas* En Muestras Prepucales De Toros. Boletín de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Volumen 9 N° 1.
- CAMPERO C.M., COBO E.R. 2006. *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. Revista de Medicina Veterinaria, Bs As Argentina vol 87: 47-56. 2006.
- CAMPERO C.M., RODRIGUEZ DUBRA C., BOLONDI A., CACCIATO C., COBO E., PEREZ S., ODEON A., CIPOLLA A., BONDURANT R.H. 2003. Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. Vet Parasitol 112, 167-175.
- CAMPERO C.M., PATITUCCI A., MEDINA D., 1993. Tricomoniasis bovina: infección experimental y natural en hembras. Vet Arg 10, 662-670.
- COBO E.R., CAMPERO C.M., MARIANTE R.M., BENCHIMOL M. 2003. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. Vet Parasitol 117, 195-211.
- COBO E.R., CANTÓN G., MORRELL E., CANO D., CAMPERO C.M. 2004. Failure to establish infection with *Tetratrichomonads* sp. in the reproductive tracts of heifers and bulls. Vet Parasitol 12, 145-150.
- 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(2):161-8.
- GRACIA MARTINEZ, F. FUCHS L.; FORT M.; BRECCIA J., OYHENART J. 2010. Detección de *Tritrichomonas Foetus* Mediante LAMP. Revista Argentina de Microbiología 42 ? Supl. 1.pag 99.
- MARTÍN-GÓMEZ S., GONZÁLEZ-PANIELLO R., PEREIRA-BUENO J., ORTEGA-MORA L.M. 1998. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef bulls in northwestern Spain. Vet. Parasitol . 75(2-3):265-268.

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.

SANCHEZ R.O., SANABRIA R.E.F, ROMERO J.R, TRAVERÍA G. RAMÍREZ B. 2005. Frecuencia de *Tetratrichomonas sp.* y otros flagelados en toros de la Zona Deprimida Del Salado (Provincia de Buenos Aires- Argentina). 12º Simposio Internacional de la Asociación Mundial De Laboratorio De Diagnostico Veterinario. Montevideo Uruguay, Resumen 183.

WALKER R.L., HAYES D.C., SAWYER S.J., NORDHAUSEN R.W., VAN HOOSEAR K.A., BONDURANT R.H. 2003. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of tritrichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. J Vet Diagn Invest 15:14?20
