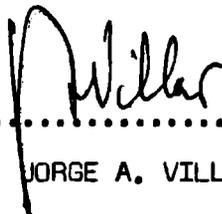


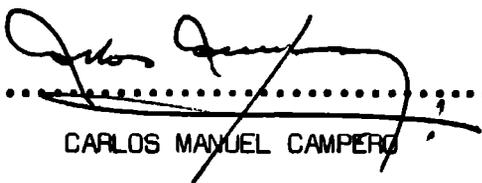
"MEDIOS DE TRANSPORTE PARA TRITRICHOMONAS FOETUS"

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Veterinarias, otorgado por la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

El mismo se efectuó en la Unidad de Investigaciones en Patología Animal (UNIPA), Departamento de Producción Animal, INTA EERA Balcarce.

Director de Tesis : 

DR. JORGE A. VILLAR

Autor: 

CARLOS MANUEL CAMPERO

Kad. 89

Liq 2278

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

AUTORIDADES:

RECTOR:

Profesor Dr. GUILLERMO G. GALLO

SECRETARIO GENERAL:

Odont. TOMAS FUCINI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. JORGE BOLZAN

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

Cdor. JUAN A. AREVALO

SECRETARIO DE EXTENSION CULTURAL Y DIFUSION:

Arq. JOSE MARIA MARQUINEZ

GUARDA SELLOS:

Dr. FEDERICO ENRIQUE CHRISTMANN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

AUTORIDADES:

DECANO

DR. JOSE H. FERNANDEZ DE LIGER

VICE-DECANO

DR. JORGE E. LED

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS

DR. FEDERICO CARLOS DEL CASTILLO

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA

SR. OMAR HUGO RAMIREZ

DIRECTORA DE ENSEÑANZA

SRA. HAYDEE C. R. DE PERETTO

DIRECTORA DE BIBLIOTECA

SRITA. HEBE PEDERNEIRA

DIRECTOR ECONOMICO-FINANCIERO

SR. HECTOR S. MOREIRA

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

ANGULO EUSEBIA	INVESTIGADORA	TITULAR
CARROZA JESÚS S.W.	INT. A LA BIOFÍSICA	TITULAR
ERRECALDE JORGE E.	MICROBIOLOGÍA	INTERINO
ETCHEVERRIGARAY MARÍA	VIROLOGÍA	REEMPLAZANTE
MARTIN ALCIDES A.	ANAT. Y FISIOL. PATOLOGICA	INTERINO
MENENDEZ NÉSTOR A.	PATOL. DE AVES Y PILIFEROS	INTERINO
QUINTEROS INDALECIO R.	GENETICA Y BIOMETRIA	TITULAR
ZACCARDI EDUARDO M.	FISIOLOGÍA	TITULAR

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE WALTER G.	MICROBIOLOGÍA ESPECIAL	TITULAR
ALBERDI CECILIO	TEC. Y SANID. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
ANDREATA JORGE N.	SEMIOLOGÍA Y PROPEDEUTICA	INTERINO
ARGERI NELSON J.	ANÁLISIS CLINICOS I Y II	REEMPLAZANTE
BERTOLINI JOSÉ M.	ANATOMÍA COMPARADA	INTERINO
DELPRATO ISMAEL O.	ANATOMÍA DESCRIPTIVA Y T.	EMERITO
JENSEN ALICIA D.	BIOESTADÍSTICA	INTERINO
LED JORGE E.	PARASIT. Y ENF. PARASITARIAS	INTERINO
MANZULLO ALFREDO	INMUNOLOGÍA I y II	EMERITO-REEM.
MAROTTA EDUARDO G.	ZOOTECNIA ESPEC. I (O.S. Y C.)	INTERINO
OCHOA MARIO E.	DIRECTOR INST. STA. CATALINA	INTERINO
OTTINO JULIO F.	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
PENNIMPEDE ENRIQUE F.	INMUNOLOGÍA GRAL. Y APLICADA	REEMPLAZANTE
PRACCA LYDIA G.	CLINICA DE PEQ. ANIMALES	TITULAR
RODRIGUEZ BENJAMIN R.	ZOOTECNIA ESPECIAL II (B. Y E.)	INTERINO

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE WALTER G.	MICROBIOLOGÍA APLICADA	TITULAR
ALBERDI CECILIO	TEC. Y SANID. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
DURANTE EDUARDO G.	PATOLOGÍA QUIRURGICA Y POD.	INTERINO
ERRECALDE JORGE E.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO
GIMENO EMILIO J.	HIGIENE EPIDEM. Y S. PUBLICA	TITULAR
ISEAS FORTUNATO B.	PATOLOGÍA MEDICA	INTERINO
MARTINO OLINDO A.L.	SALUD PÚBLICA	INTERINO
OSTROWSKI JORGE E.B.	PATOLOGÍA DE LA REP. Y OBST.	INTERINO
PANZONI ERICO EMIR	ECONOMÍA AGRARIA	TITULAR
PEROTTI RODOLFO M.	ZOOTECNIA ESPECIAL III (A. Y P.)	EMERITO
RUAGER JORGE	PATOLOGÍA GENERAL	INTERINO

SARACHU ALBERTO N.	GENÉTICA MICROBIANA	INTERINO-L/S/S.
SCIAMMARELLA ALFREDO M.	MEDICINA OPERATORIA	INTERINO

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BOCCIA FRANCISCO O.	CLÍN. DE PEQ. ANIMALES	REEMPLAZANTE
IDIART JULIO R.	ANAT. Y FISIOL. PATOLÓGICA	INTERINO
LAGRECA LILIANA	ZOOTECNIA GRAL. Y AGROST.	INTERINO
LASTA JORGE A.	HIGIENE EPIDEM. Y S. PÚBLICA	INTERINO
MONINA MARTA I.	CLÍNICA DE GRAND. ANIMALES	INTERINO

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BRANDETTI EUGENIO	PATOLOGÍA DE AVES Y PÍLIF.	INTERINO
CHAMPREDONE HUGO N.	PATOLOGIA GENERAL	INTERINO
DIBBERN ALBERTO R.	ZOOTEC. ESPECIAL II (B. Y E.)	REEMPLAZANTE
DURANTE EDUARDO J.	SERVICIO CENTRAL DE CIRUGÍA	INTERINO
ERRECALDE JORGE O. (H)	FARMACOLOGÍA F. Y TERAP.	INTERINO-I/S/S
FELDMAN RAQUEL E.	PARASITOLOGÍA COMPARADA	INTERINO
FERNANDEZ ENRIQUE J.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO
GOMEZ CARLOS M.	INMUNOLOGIA II	INTERINO
MAGGI NILDA B.	SERVICIO CENTRAL DE CIRUGÍA	REEMPLAZANTE
MARTINO JUAN J.	MICROBIOLOGÍA	TITULAR
NOIA MIGUEL A.	INT. A LA BIOFÍSICA	INTERINO
ORTEGA CESAR F.	SEMIOLOGIA Y PROPEDEUTICA	INTERINO
PENNIMPEDE MARIA T.	TEC. Y SANID. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
PIOVANO NICOLÁS MIGUEL	INT. A LA BIOQUÍMICA	INTERINO
REINOSO ENSO M.	MICOLOGIA MÉDICA E IND.	REEMPLAZANTE
RUAGER JORGE	ANAT. Y FISIOL. PATOLOGICA	INTERINO

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BACIGALUPO NÉSTOR R.	TEC. Y SANID. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
BAIGUN ROBERTO	PATOLOGÍA DE LA REP. Y OBST.	INTERINO
BRANDETTI EUGENIO	PARASITOLOGÍA Y ENF. PARASIT.	INTERINO
FERNANDEZ DE LIGER J.H.	CLINICA DE GRANDES ANIMALES	TITULAR
FINOCHIETTO HECTOR D.	PATOLOGÍA MÉDICA	INTERINO
GOMEZ CARLOS M.	INMUNOLOGÍA GRAL. Y APLICADA	INTERINO
GRILLO VIRGINIA E.	ZOOTECNIA ESPECIAL III (A. Y P.)	INTERINO
LASTA JORGE A.	MICROBIOLOGÍA APLICADA	INTERINO
MAGGI NILDA B.	PATOLOGÍA QUIRURGICA Y P.	INTERINO
MALIANDI F. BETAN S.	HIGIENE EPIDEMIOLOGÍA Y S. P.	INTERINO
MOISO ALEJANDRO C.	MICROBIOLOGÍA	TITULAR
NOVARINI MIGUEL A.	FARMACOLOGÍA F. Y TERAP.	INTERINO

OLIVA GRACIELA A.	VIROLOGÍA	INTERINO
PRILO LOFEUDO GRACIELA E.	ZOOTECNIA ESPECIAL III (AYP)	REEMPLAZANTE
RENNER JUAN E.	CLINICA DE GRAN. ANIMALES	INTERINO
ROJAS EDMUNDO R.	FISIOLOGÍA	INTERINO
RUTTER BRUNO	PATOLOGÍA DE LA REP. Y OBST.	INTERINO
TARSIA ELBA E.	INT. A LA BIOFÍSICA	INTERINO
TESORIERO CATALINA	FÍSICA Y QUÍMICA APLICADA	INTERINO
VENTURINI LUCILA M.	PARASIT. Y ENF. PARASITARIAS	INTERINO
VILLAR MARTHA E.	ANÁLISIS CLÍNICOS I PARTE	INTERINO
VILLAR MARTHA E.	ANÁLISIS CLÍNICOS II PARTE	INTERINO
YANNARELLA FRANCISCO	PARASITOLOGÍA Y E. PARASITARIAS	INTERINO

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACIÓN EXCLUSIVA"

BASCHAR HÉCTOR O.	CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES	INTERINO
FONROUGE REINALDO D.	HIGIENE EPIDEM. Y S. PÚBLICA	INTERINO
RONCINO ROBERTO O.	SECCIÓN RADIOISÓTOPOS	INTERINO
TEJEDOR EUGENIO D.	GENÉTICA Y BIOMETRÍA	INTERINO

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

ALIVERTI HÉCTOR M.	ZOOTECNIA ESPECIAL II (B. Y E.)	INTERINO
ALLENDE MIRIAM G.	SERVICIO CENTRAL DE CIRUGÍA	REEMPLAZANTE
ALLEVATO HUGO L.	HIGIENE EPIDEM. Y S. PÚBLICA	INTERINO
AMASINO CARLOS F.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO
AULICINO OSCAR O.	TEC. Y S. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
BABUSCI MÁXIMO	FISIOLOGÍA	INTERINO
BAMBILL EMILIA C.	ZOOTECNIA ESPECIAL I (O. S. Y C.)	INTERINO
BARRENA JAVIER E.	ANATOMÍA DESCRIPTIVA Y TOP.	INTERINO
BERNAGOZZI JORGE A.	INMUNOLOGÍA GRAL. Y APLICADA	INTERINO
BISCHOFF JORGE R.	GENÉTICA Y BIOMETRÍA	INTERINO
BUGALLO ANTONIO	FARMACOLOGÍA F. Y TERAP.	INTERINO
CARBONE CECILIA	ANIMALES DE LABORATORIO	INTERINO
CASTUMA MARÍA E.	INTR. A LA BIOQUÍMICA	INTERINO
COLL CARDENAS ERNESTO	INTR. A LA BIOFÍSICA	INTERINO-1/s/s.
CREDARO CRISTINA NOEMI	ANÁLISIS CLÍNICOS I PARTE	INTERINO
DE ANTONI GRACIELA L.	GENÉTICA MICROBIANA	INTERINO
DEL CASTILLO FEDERICO	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
DRAGONETTI ANA MARIA	CLÍNICA DE PEQ. ANIMALES	INTERINO
FORNER JESÚS J. A.	TEC. Y S. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
FREGOSI MARIO O.	ANATOMÍA DESCRIPTIVA Y TOP.	INTERINO
FRIGOLI ALICIA E.	INT. A LA BIOFÍSICA	INTERINO
FUENTES LETICIA S.	INT. A LA BIOFÍSICA	INTERINO

GARCIA VALENTI HORACIO	ZOOTECNIA ESP. II(B.Y E.)	INTERINO
GIANOTTI RICARDO S.	TECNOLOGÍA Y S. DE LOS ALIMENT.	INTERINO
GIMENO EDUARDO J.	ANATOMÍA Y F. PATOLOGICA	INTERINO-1/c/s
GIMENO EDUARDO J.	PATOLOGÍA GENERAL	INTERINO-1/c/s
GOITIA OSCAR F.	ZOOTECNIA ESPECIAL II(B.Y E.)	REEMPLAZANTE
GUAJARDO MARGARITA	INT.A LA BIOQUÍMICA	INTERINO
GUGLIELMETTI ELDA M.C.	INT.A LA BIOFÍSICA	INTERINO
IBARGOYEN GUILLERMO S.	PATOLOGÍA GENERAL	INTERINO
HERRERA CANALES FELIX	ANATOMÍA COMPARADA	INTERINO
LACCHINI RAÚL A.	ZOOTECNIA GRAL.Y AGROSTOLOGÍA	INTERINO
LINZITTO OSCAR R.	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGIA	INTERINO
MARCANTONI HUGO	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGIA	INTERINO
MASSONE RAÚL A.	CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES	REEMPLAZANTE
MILLAN MARGARITA D.	ANATOMÍA DESCRIPTIVA Y TOP.	INTERINO
MONTESINOS RAMOS I.G.	CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES	INTERINO
MURO ALICIA M.	CLÍNICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	INTERINO
ORELLANA JORGE	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
PASSIUCO MABEL N.	INTR. A LA BIOQUÍMICA	INTERINO
PELLON HORACIO S.	TEC.Y S. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
PEREZ CASTILLO NELLY	FÍSICA Y QUÍMICA APLICADAS	INTERINO
PERFUMO CARLOS J.	ANAT.Y FISILOGÍA PATOLOGICAS	INTERINO
PIACENTINI ENRIQUE	TEC.Y S. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
PIAZZA DELIA D.	MICROBIOLOGÍA ESPECIAL	INTERINO
POLI MARIO A.	GENÉTICA Y BIOMETRÍA	INTERINO
PONS EDUARDO E.	CLINICA DE GRANDES ANIMALES	INTERINO
RADMAN NILDA E.	PARASIT.Y ENF. PARASITARIAS	INTERINO
RAMIREZ LUIS E.	ANATOMÍA DESCRIPTIVA Y TOP.	REEMPLAZANTE
REPETTO SANCHEZ OLINDO	MEDICINA OPERATORIA	INTERINO
RODRIGUEZ TOLEDO JORGE	SERVICIO CENTRAL DE CIRUGIA	INTERINO
SALESSI ENRIQUE	FISIOLOGÍA	REEMPLAZANTE
SARA RAÚL C.	PATOLOGÍA DE LA REP.Y OBST.	INTERINO
SCAVIA RICARDO C.	ANATOMÍA COMPARADA	INTERINO
SIMPSON MARÍA I.	INTR.A LA BIOFÍSICA	REEMPLAZANTE
TABORCIA JUAN A.	PATOLOGÍA GENERAL	INTERINO-1/c/s
TARABUSO RICARDO	SEMIOLOGÍA Y PROPEDEUTICA	INTERINO
TREBUCQ RUBEN A.	INMUNOLOGÍA GRAL.Y APLICADA	INTERINO
VENTURINI MARÍA G.	INMUNOLOGÍA GRAL. Y APLICADA	REEMPLAZANTE
VOCOS GIMENEZ SARA T.	ZOOTECNIA ESPECIAL II(B.Y E.)	INTERINO

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION SIMPLE"

AVILA SILVIA M.	MICROBIOLOGÍA ESPECIAL	INTERINO
BERNAGOZZI JORGE A.	INMUNOLOGÍA GRAL. Y APLICADA	REEMPLAZANTE
BRAVO BARDALES TOMAS	ECONOMÍA AGRARIA	INTERINO
BUTLER EDUARDO A.	PATOLOGÍA QUIRURGICA Y POD.	INTERINO
CALONGE CARLOS A.	PATOLOGÍA MEDICA	INTERINO
CASTAÑEDA ALBERTO C.	CLÍNICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	INTERINO
CESAR NORBERTO	PATOLOGÍA MÉDICA	REEMPLAZANTE
CATALA GUSTAVO G.	PATOLOGÍA DE LA REP. Y OBST.	REEMPLAZANTE
CUETO EDUARDO R.	ZOOTECNIA ESPECIAL II (B. Y E.)	INTERINO
CHIARAVALLI JUAN C.	ZOOTECNIA GRAL. Y AGROSTOLOGÍA	INTERINO
DELGADO CAFE OSVALDO	HIGIENE EPIDEM. Y S. PÚBLICA	INTERINO
FERNANDEZ DE LIGER JOSE	PATOLOGÍA MEDICA	INTERINO
FORMENTI LILIANA E.	MICROBIOLOGÍA APLICADA	REEMPLAZANTE
FRIGOLI ALICIA E.	INTR. A LA BIOFÍSICA	REEMPLAZANTE
GALAN JORGE E.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO-L/C/S
GARCIA FRONTINI MARIA	PARASITOLOGÍA Y ENF. PARASIT.	INTERINO
GALLO GILLERMO F.	FISIOLOGÍA	INTERINO
GRAMIGNA TOMAS F.	TALLER DE EDUCACIÓN	INTERINO
GIMENEZ MABEL A.	ZOOTECNIA ESPECIAL I (O.S. Y C.)	INTERINO
HERNANDEZ ZULMA H.	SALUD PÚBLICA	INTERINO
LACCHINI RAÚL A.	ZOOTECNIA ESPECIAL I (O.S. Y C.)	INTERINO
LOJO MARIA E.	GENÉTICA MICROBIANA	INTERINO
MARILUNGO ANÍBAL J.	MEDICINA OPERATORIA	INTERINO
MELANI GUSTAVO H.	PATOLOGÍA MÉDICA	INTERINO
MORRIS MARTA RITA	MICOLOGÍA MÉDICA E IND.	INTERINO
NICODEMO MARÍA DEL C.	ZOOTECNIA ESPECIAL III (A. Y P.)	INTERINO
NOSETTO EDGARDO O.	CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES	INTERINO-I/C/S
OCAMPO JESÚS M.P.	INT. A LA BIOFÍSICA	INTERINO
ROMERO JORGE R.	PARASITOLOGÍA Y ENF. PARASIT.	INTERINO
RONSIÑO ROBERTO O.	FISIOLOGÍA	INTERINO
SALAS LAURA V.	SEMIOLOGÍA Y PROPEDEUTICA	INTERINO
SANCHO JOSE J. I.	MEDICINA OPERATORIA	INTERINO
TOBIA MARTA R.	MICROBIOLOGÍA APLICADA	INTERINO
TREBUCQ RÚBEN A.	INMUNOLOGÍA I	INTERINO
TUNES MARÍA DEL L.	MICROBIOLOGÍA	INTERINO
VALLEJOS ETHEL V.	PATOLOGÍA MÉDICA	INTERINO
VARELA JUAN A. H.	MICROBIOLOGÍA	INTERINO
WARD MIGUEL V.	FARMACOLOGÍA F. Y TERAPEUTICA	INTERINO

<u>AYUDANTES DIPLOMADOS</u>	<u>"DEDICACION EXCLUSIVA"</u>	
AVILA SILVIA M.	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
CASTELLANO MARIA C.	CLINICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	INTERINO
CATALANO VICENTE A.	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
CARRUTTI AUGUSTO S.	SECCIÓN RADIOISÓTOPOS	INTERINO

<u>AYUDANTES DIPLOMADOS</u>	<u>"DEDICACION TIEMPO PARCIAL"</u>	
BERISSO MARCELA M.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO
CABRAL MARTA S.	TECNOLOGÍA Y SANIDAD DE LOS A.	INTERINO
CAMINOA RICARDO A.	MICROBIOLOGIA ESPECIAL	INTERINO
FLAMINI MIRTA A.	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
GONZALEZ ESTER T.	VIROLOGÍA	REEMPLAZANTE
HUERTA ALICIA N.	INT. A LA BIOQUÍMICA	INTERINO
MILLAN ROBERTO G.	HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA	INTERINO
MARENGO ALEJANDRO G.	HIG.EPIDEM. Y S. PÚBLICA	INTERINO
PETRUCCELLI MIGUEL A.	PATOLOGÍA DE AVES Y PILIFEROS	INTERINO
RAMIREZ LUIS E.	CLINICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	INTERINO
RENARD JORGE L.	TEC. Y SANID. DE LOS ALIMENTOS	INTERINO
RIVADENEIRA ELISABETH	CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES	REEMPLAZANTE
RULE ROBERTO	FARMACOLOGÍA F.Y TERAPEUTICA	REEMPLAZANTE
TABORCIA JUAN A.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO-1/c/
URQUIOLA HORACIO M.	FISIOLOGÍA	REEMPLAZANTE
ZOHUAR EDHIT E.	CLÍNICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	INTERINO
GALOSI CECILIA M.	INTR. A LA BIOQUÍMICA	REEMPLAZANTE

<u>AYUDANTES DIPLOMADOS</u>	<u>"DEDICACION SIMPLE"</u>	
ALONSO JUAN C.	GENÉTICA MICROBIANA	INTERINO-1/c/
ALT CECILIA M.	MICROBIOLOGÍA ESPECIAL	INTERINO
ALLEVATTO SUSANA DEL C.	ZOOTECNIA GRAL.Y AGROSTOLOGÍA	REEMPLAZANTE
ANTONINI ALICIA G.	GENÉTICA Y BIOMETRÍA	INTERINO
ARCHELLI SUSANA MONICA	PARASITOLOGÍA COMPARADA	INTERINO
BEDOTTI DANIEL O.	CLINICA DE GRANDES ANIMALES	INTERINO
BUSCAGLIA CELINA	ZOOTECNIA ESPECIAL III(A.Y P.)	INTERINO
CALVO CARLOS J.	ANATOMÍA Y F. PATOLÓGICAS	INTERINO
CAMINOA RICARDO A.	ANIMALES DE LABORATORIO	INTERINO
CATALANO VICENTE A.	SECCIÓN AUDIOVISUALES	INTERINO
CERRUTTI AUGUSTO S.	FISIOLOGÍA	INTERINO
CORTEZ GILLERMO F.	HIGIENE EPIDEM.Y S. PUBLICA	INTERINO
COURREGES MARTA M.	PATOLOGÍA DE AVES Y PILIFEROS	INTERINO

CUELLO CARLOS E.	CLINICA DE GRANDES ANIMALES	REEMPLAZANTE
D'AGOSTINO LILIANA E.	INTR. A LA BIOQUÍMICA	INTERINO
DELGADO CAFE OSVALDO L.	BIOESTADISTICA	INTERINO
DI LEO JULIO A.	ZOOTECNIA ESPECIAL I PTE.	INTERINO
DOMINELLI HERALDO A.	PATOLOGIA QUIRURGICA Y POD.	INTERINO
ELSO LILIANA E.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	INTERINO
FEATHERSON PATRICIA	MICOLOGIA MEDICA E IND.	INTERINO
FERREYRA JUAN C.	FARMACOLOGIA F. Y TERAPEUTICA	INTERINO
GONZALEZ ESTER T.	MICROBIOLOGIA APLICADA	INTERINO
GOROSITO ALFREDO R.	ANATOMIA Y FISILOGIA PAT.	INTERINO-L/C/S.
GUILLEN GRISELDA	ANALISIS CLINICOS I PARTE	INTERINO
IRASTORZA JORGE A.	PATOLOGIA MEDICA	REEMPLAZANTE
IRIGOYEN ISABEL A.	INTR. A LA BIOQUIMICA	INTERINO
KNAVERHASE FEDERICO L.	PATOLOGIA DE LA REP. Y OBST.	INTERINO
LASTA GREGORIO	SEMILOGIA Y PROPEDEUTICA	REEMPLAZANTE
MEZZERA ANA MARIA	CLINICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	INTERINO
PEREZ LEON	INTR. A LA BIOFISICA	REEMPLAZANTE
PIAZZA DELIA D.	MICROBIOLOGIA APLICADA	REEMPLAZANTE
REGGIOSO ANA MARIA	INTRODUCCION A LA BIOFISICA	INTERINO
SANGUINETTI HECTOR R.	ANATOMIA Y FISILOGIA PAT.	INTERINO
VENTURINI MARIA CECILIA	PATOLOGIA DE AVES Y PILIFEROS	REEMPLAZANTE

DEDICACION

- A mi esposa e hija, a mis padres y hermanos que me alentaron espiritualmente.
- A los colegas de campo y docentes universitarios.

INDICE

	Pags.
INTRODUCCION	
1. Definición	1
2. Antecedentes e incidencia en nuestro país	1
3. Incidencia en otros países	3
4. Agente etiológico	6
4.1. Clasificación	6
4.2. Morfología	6
4.3. Ultraestructura	7
4.4. Propiedades bioquímicas	10
4.4.1. Metabolismo anaeróbico	10
4.4.2. Metabolismo aeróbico	11
4.5. Serotipos de T. foetus	13
4.6. Patogenicidad de T. foetus	15
4.6.1. Inoculación en ratones	15
4.6.2. Hallazgos citológicos y citoquímicos	16
5. Aspectos inmunológicos	17
5.1. Inmunidad en el macho	19
5.2. Inmunidad en la hembra	20
6. Susceptibilidad en el macho	23
7. Susceptibilidad en la hembra	25
8. Síntomas	25
8.1. En el macho	25
8.2. En la hembra	25
8.3. En el rodeo	27
9. Epizootiología	28
9.1. Importancia del macho	28
9.2. Importancia de la hembra	30
10. Hallazgos patológicos	31
10.1. Macho	31
10.2. Hembra	32

	Pags.
1.5. Secuencia de medio de transporte utilizado por muestreo	70
1.6. Medios de cultivos	71
1.6.1. Medio Thioglicolato	71
1.6.2. Leche Descremada	71
1.6.3. Medio Kupferberg	71
1.6.4. Sueros	72
1.6.5. Antibióticos	72
1.7. Temperatura y tiempos de transporte	72
1.8. Técnica de siembra	72
1.9. Observación de los cultivos	73
1.10. Método estadístico	74
 RESULTADOS	 75
1. Análisis total de datos para 24 y 48 hs. de transporte refrigerado	75
2. Comparación de los cuatro Medios de Transporte evaluados en medio Thioglicolato	77
3. Medio de Transporte Leche Descremada (C) sembrado en medio leche descremada y en medio Thioglicolato	82
4. Medio de Transporte Kupferberg (D) sembrado en medio Kupferberg y en medio Thioglicolato	89
5. Combinaciones de Medios de Transportes y medios de cultivos analizados según día de mayor número de cultivos positivos.	97
6. Grupos de toros con infección natural y artificial. Datos referidos a medios de transporte y cultivos.	100
7. Consideraciones sobre condiciones de muestreo y comportamiento de medios de cultivos.	106.

	Pags.
DISCUSION	108
CONCLUSIONES	119
FOTOGRAFIAS	120
APENDICE	128
BIBLIOGRAFIA	131
AGRADECIMIENTOS	145

INTRODUCCION

1.- Definición

La Tricomoniasis bovina es una enfermedad venérea provocada por un protozoo que ocasiona esterilidad temporaria en la hembra, abortos esporádicos y piómetras, con severos perjuicios económicos en las explotaciones ganaderas.

La enfermedad en el macho cursa en forma inaparente actuando éstos como portadores pasivos y cumpliendo por ende un papel muy importante en el aspecto epizootiológico.

2.- Antecedentes e incidencia en nuestro país

Existen referencias de esta enfermedad en nuestro país desde el año 1939, cuando P. Rosenbusch aisló el parásito de un feto abortado. Posteriores trabajos efectuados por Gelormini con material de matadero confirmaron este hallazgo (13).

Desde esa fecha, existen numerosas referencias sobre la presencia de la enfermedad, las que fueron expuestas en el Primer Congreso de Ciencias Veterinarias por Briano y col. (13).

A partir del año 1967 Roberts y col. (92) efectuaron el hallazgo en toros que habían servido rodeos con baja fertilidad y abortos. Desde ese momento el grupo de trabajo del INTA-Balcarce comenzó a efectuar tareas de relevamiento en distintos campos con problemas de baja fertilidad en la Pcia. de Bs. As. Dichos autores pusieron a punto la técnica diagnóstica haciéndola accesible a nuestro medio (93).

Los datos citados por Briano y col. (13) con respecto a 181 rodeos de cría con antecedentes de baja fertilidad examinados por el INTA, el 60.1% fueron positivos a Tricomoniasis mientras que 77 rodeos de fertilidad desconocida el porcentaje de positivos fue del 29.9%.

Cordero (30) en 1975, analizando 1.899 toros de 33 establecimientos de cría, la mayoría de la Pcia. de Bs. As. encontró 26 (78.9%) de ellos positivos a T. foetus, pero en todos los casos trabajó en establecimientos con antecedentes de baja fertilidad.

Bustingorri y col. (15) efectuando un relevamiento en establecimientos del centro de la Pcia. de Bs. As.; sur de Córdoba y Santa Fe, comprobaron la presencia de Tricomoniasis en 19 establecimientos y al revisar 1.204 toros encontraron que 253 (21%) de ellos eran positivos.

Allende y Miquet (4) revisaron 25 rodeos de las Pcias. de Santa Fe, Córdoba y Bs. As., siendo 12 (48%) de ellos positivos y de 1.396 toros muestreados 133(10.49%) presentaron la infección.

Avila y col. (5) ponen de manifiesto la enfermedad en un rodeo Aberdeen Angus de un establecimiento de cría en el sur de La Rioja.

Ultimamente Villar y Spina (122) recopilaron datos de un período de 10 años, sobre 6.149 toros de 351 establecimientos de cría de la Pcia. de Bs. As. y encontraron que 191 (54.4%) de ellos presentaban la infección y 926 toros (15%) resultaron positivos; mientras que en 37 establecimientos de otras provincias (Santa Fe, Córdoba, La Pampa, Entre Ríos, Corrientes) 8 (21.6%) de ellos presentaron el problema y de 356 toros revisados 39 (11%) resultaron infectados.

Dadas las características de dicho trabajo, especialmente por el significativo número de establecimientos revisados es destacable la alta incidencia de esta enfermedad, considerando que más del 50% de los establecimientos muestreados en la Pcia. de Bs. As. presentaron Tricomoniasis bovina.

Baenz Kohn (6), revisando 776 toros pertenecientes a 48 rodeos de carne, en la Provincia de Corrientes, obtuvo 7 rodeos (14.58%) positivos a la infección.

En el área de explotaciones tamberas, los informes preliminares de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza, mencionadas en el PRACIVE (13) fueron para 62 rodeos de baja fertilidad 19.3% de positivos mientras que de 234 rodeos de fertilidad desconocida 5.9% resultaron infectados (96).

Los estudios efectuados sobre sanidad animal en el noroeste en rodeos lecheros, Habich y col. (55) encontraron que de 37 establecimientos muestreados en Catamarca, con 43 toros revisados, 3 animales presentaron la infección. En tambos del área de Salta (56) de 61 establecimientos lecheros revisados, observaron que 29.5% de ellos estaban infectados y de 107 toros muestreados 20.6% de ellos eran positivos.

En la zona de Tucumán, Spath y col. (104) hicieron un relevamiento sanitario de 141 tambos, siendo positivos 18 de ellos y de 176 toros examinados 22 (12.5%) presentaron la infección.

3.- Incidencia en otros países

Luego de los trabajos de Riedmüller (1928) que puso en evidencia en Europa a la Trichomoniasis bovina, fue Mc Nutt quién la citó en los Estados Unidos de Norteamérica en el año 1933 (117).

En dicho país Fitzgerald y col.(50) examinaron 8 áreas de las montañas Rocosas y encontraron la infección en la mitad de ellas, mientras que de 383 toros examinados 23 (6%) portaban la infección. Johnson (63) examinando 34 rodeos de carne comprobó que 9 (26%) de ellos presentaron este problema y de 828 toros revisados obtuvieron 62 (7.4%) infectados.

Wilson y Kocan (123) en Oklahoma efectuaron un relevamiento en 280 toros de diferentes razas de carne, encontraron que 22 (7.8%) portaban la infección.

Kimsey y col.(65) en el Valle de California examinaron 328 toros con 19 positivos (5.8%)

Abbitt y Meyerholz (2) en el sur de Florida (EEUU) revisaron 109 toros de diversas razas de carne y encontraron 8 (7.3%) animales infectados con T. foetus.

En Brasil, Guida y col. (54) analizaron 202 establecimientos lecheros con 847 toros, 57 (28.3%) de los tambos y 124 (14.6%) de los toros estaban infectados.

Santos y col. (100) muestrearon toros pertenecientes a centros de inseminación artificial y de 490 animales obtuvieron 17 (3.4%) positivos.

Stoessel (111) cita el informe de sanidad animal de FAO sobre 168 países informantes en 61 (36%) de ellos la enfermedad está confirmada o se sospecha.

Akinboade (3) en Nigeria examinando 400 toros de razas autóctonas enviados a faena, encontró una incidencia de Tricomoniasis bovina del 8.5%.

En Australia, la enfermedad fue revelada por Dumaresq sin embargo no es bien conocida hasta años después (81).

Murnane (81) examinó 50 rodeos lecheros, en Victoria, y encontró la infección en sólo 1 de ellos.

Mylrea (82), en la costa sur de Nueva Gales del Sur, de 70 rodeos lecheros revisados con antecedentes de baja fertilidad encontró 11 de ellos con infección (16%).

Sutherland y col. (112) la diagnosticaron en Queensland, posteriormente trabajando con genitales de hembras faenadas provenientes de rodeos de cría con antecedentes de fallas reproductivas, de 74 genitales revisados encontró en 9 de ellos *T. foetus*.

Rogers y col. (95) examinaron genitales de 581 hembras de rodeos de crías faenados en el Noreste de Queensland y encontraron 30 positivas a *T. foetus*.

Ladds (67) realizó un relevamiento de genitales de toros en mataderos, de 265 animales faenados obtuvo 80 positivos (30.2%)

Dennett y col. (41) efectuaron en el Noreste de Australia un relevamiento en 47 rodeos en 19 de ellos obtuvieron *Trichomoniasis* y de 689 muestras de genitales extraídas, encontraron 122 positivos (17.7%).

Cockram y Stephens (28) examinaron 80 toros provenientes de 67 establecimientos, solo 1 toro fue positivo a *T. foetus*.

Christensen y Clark (33) encontraron en el área central de Queensland una prevalencia del 9.4% en toros de rodeos de carne afectados con *T. foetus*.

Bruere (14) mencionó la presencia de *T. foetus* en un rodeo Aberdeen Angus en la costa este de Nueva Zelandia.

4.- Agente etiológico

4.1 Clasificación

La Trichomoniasis bovina es causada por un protozoario flagelado perteneciente al subphylum Sarcomastigophora, superclase Mastigophora, Clase Zoomastogophora, orden Trichomonadida, familia Trichomonadidae, subfamilia Tritrichomonadinae, y especie Tritrichomonas foetus (Riedmüller) (61).

4.2 Morfología

Tritrichomonas foetus (T. foetus) tiene un tamaño variable según las mediciones se hayan efectuado sobre organismos fijados y coloreados (protargol, eosinato de Azul de Metileno, hematoxilina férrica, Giemsa o Leishman) o bien sobre parásitos vivos (36).

Para el primer caso las medidas más comunes son de 9-25 x 3-15 micras mientras que sobre organismos vivos, con microscopía de contraste de fase han sido de 18 x 8 micras.

Posee una forma alargada o piriforme cuando se trata de un organismo recientemente aislado, pero en medios de cultivos envejecidos toma un aspecto globoso.

Sus movimientos son zigzagueantes, enérgicos y no son fijos en un lugar determinado del campo microscópico, son realizados gracias a la presencia de membrana ondulante y sus tres flagelos anteriores y uno posterior. Estas formaciones son evidenciadas mediante microscopía con 300 aumentos o más. Los 3 flagelos anteriores miden 10 micras de largo por 0,25 a 0,32 micras de diámetro, el flagelo posterior es más largo, mide 16 micras y corre sobre el borde la mem-

brana ondulante, quedando su extremo posterior libre sobresaliente. La membrana ondulante es casi tan larga como el parásito en sí, posee 3 ó 4 ondulaciones y se apoya en el citoplasma mediante una formación llamada costa. El borde externo de la membrana ondulante forma el llamado "Filamento accesorio", el cual está formado por los puntos de unión entre dicho borde y el flagelo posterior o cuarto flagelo.

Existe una formación a modo de eje denominada axostilo que recorre como columna vertebral a todo lo largo del parásito haciendo protusión en la parte final posterior del parásito, dejando el citoplasma por un anillo cromático. Mediante técnicas tinte-riales especiales pueden verse abundantes gránulos en el interior del axostilo. La parte anterior del axostilo tiene forma de copa, denominado capítulo, antiguamente llamado citostoma, los flagelos anteriores se proyectan de esta área.

El núcleo es oval ó elipsoidal de 5 a 7 micras y está ubicado en la parte superior del tercio anterior del parásito.

En la extremidad anterior del axostilo existe un orgánulo con forma de medialuna denominada pelta, de escaso desarrollo, sería una protuberancia anterior del capítulo axostilar. El cuerpo parabasal, de 3-4 micras tiene forma de bastón doblado y está situado arriba y a la derecha del núcleo, se lo ha aceptado como el complejo de Golgi (61).

4.3 Ultraestructura

Mediante la microscopía electrónica se ha ampliado el conocimiento de las formaciones estructurales y así poder estudiar con más profundidad los aspectos fisiológicas y bioquímicos de este flageleado.

El origen de los flagelos se hace en la parte anterior del parásito a partir de unos orgánulos denominados cinetosomas de los que existen 4, uno para cada flagelo. El cuarto flagelo o posterior se inserta en forma perpendicular y distal con respecto a los 3 anteriores. Estos cinetosomas se encuentran unidos al citoplasma por láminas filamentosas que los relacionan entre sí y con otros orgánulos como el llamado filamento sigmoideo, el cual solo está presente en la subfamilia Tritrichomonadinae. La presencia de éste y otros orgánulos ha permitido clasificar y diferenciar a este parásito como Tritrichomonas foetus, de miembros de la subfamilia Trichomonadinae (Trichomonas gallinae) y que sólo la microscopía electrónica ha revelado. El tipo de costa es otra característica diferencial, se origina en el cinetosoma del flagelo posterior y es del llamado tipo A por estar formado por unidades lineales repetidas para Tritrichomona foetus; mientras que el género Trichomona es del tipo B, con otra morfología.

Existe otra formación denominada peine por tener un aspecto similar, se extiende entre la base de la costa y el cuerpo infracinetosomal. El peine contribuye a formar la lámina marginal y proximal de la membrana ondulante, ésta es un pliegue citoplasmático como una aleta, tiene una lámina marginal muy estirada y una porción distal doblada sobre sí misma, esto es lo que da la imagen de filamento accesorio.

El flagelo posterior está adherido por un material electrónico denso ó bien suelto, pero siempre adyacente a la membrana ondulante.

La pelta es una lámina con forma de medialuna constituida por microtúbulos y conectada al capítulo.

La membrana celular del flagelado mide de 50 a 65 Å y la sección transversal de los flagelos deja ver una estructura formada por un par de fibrillas centrales y 9 pares periféricos similares (61, 76, 103). Se han descubierto unas finas estructuras en la membrana que rodea a los tres flagelos anteriores, denominadas rosetas de 7 nm de tamaño las que no se observaron en el flagelo posterior. Las mismas jugarían un papel importante en la interacción del flagelado con el medio ambiente, serían los flagelos anteriores los que, comúnmente inactivos, determinarían los cambios direccionales del parásito al encontrar obstáculos en su marcha (10).

La costa es muy rica en glucosa (95%), jugaría un papel muy importante en la génesis de energía o bien como reserva, existiría una estrecha relación entre este orgánulo con los cinetosomas, y los flagelos para la motilidad del parásito (103).

Se han encontrado abundantes gránulos de glucógeno distribuidos en el citoplasma y axostilo y su proporción (10 - 30%) variaría según condiciones de crecimiento, existiría un rápido intercambio del glucógeno celular.

No se han encontrado mitocondrias en el citoplasma de T. foetus, sin embargo Lindmark y Müller (70) establecieron la presencia de orgánulos paracostales y paraxostilares de matriz granular, capaces de producir hidrógeno, razón por la cual les impusieron el nombre de Hidrogenosoma, los que cumplirían importantes funciones en el metabolismo energético en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (18, 19, 70).

4.4 Propiedades bioquímicas

T. foetus es considerado un anaerobio aerotolerante (73). El alto metabolismo energético endógeno del T. foetus depende de las concentraciones de glucógeno, el cual es sintetizado en un grado considerable bajo condiciones anaeróbicas, partiendo de diferentes substratos. Los glúcidos más fáciles de metabolizar son: glucosa, maltosa, galactosa y sacarosa, pero el protozoo es capaz de metabolizar hasta 21 carbohidratos diferentes.

4.4.1 Metabolismo anaeróbico

Los productos más abundantes del metabolismo endógeno son CO_2 , H_2 y ácidos orgánicos, tales como succinatos y acetatos, en menor proporción lactatos.

En una atmósfera del 5% de CO_2 y 95% N_2 la utilización del glucógeno endógeno produjo niveles similares de acetatos, succinatos e H_2 molecular, mientras que en ausencia de CO_2 , grandes cantidades de acetato y CO_2 fueron eliminados.

Bajo condiciones anaeróbicas la formación de succinato ha demostrado ser el metabolito más común, fijando el CO_2 por acción de diferentes enzimas como la maleato deshidrogenasa, piruvato quinasa y otras, las que se encontrarían en el citosol del parásito.

Las enzimas piruvato sintetasa y las hidrogenasas son sensibles al oxígeno declinando su actividad, así T. foetus funciona como anaerobio. La sobrevivencia del parásito en presencia de O_2 sería debido a que éste es consumido por ciertos substratos: se ha demostrado la presencia de catalasa (Müller, 1973), la misma contribuiría a la aerotolerancia de T. foetus. La superóxido dimutasa fue evidenciada por Lindmark y Müller (1974), esta enzima sería

de gran importancia por el papel protector que cumple en la aeroprotección, por convertir los peróxidos tóxicos en O_2 y H_2O_2 , actuaría además en conjunción con la catalasa y ambas enzimas se han encontrado en el citosol del parásito (61).

Lindmark y Miller (70) propusieron el nombre de Hidrogenosomas para aquellas formaciones citoplasmáticas que tienen un comportamiento citobioquímico basado en el uso del protón como aceptor del electrón terminal y producir hidrógeno molecular.

4.4.2 Metabolismo aeróbico

Existen evidencias de la falta del ciclo de ácidos tricarbóxicos en *T. foetus* y otras Tricomonas. Si bien no existirían grupos citocromo-oxidasas, tienen actividad respiratoria en presencia de O_2 (73). Se ha mencionado el incremento de la formación de acetato en condiciones aeróbicas y la reducción del succinato, la producción de H_2 molecular cesa en presencia de oxígeno lo que se debería a la conversión oxidativa del piruvato a acetato mientras que se suprimiría la reducción del oxal acetato a succinato en dichas condiciones.

Las enzimas involucradas en el metabolismo carbohidrogenado aeróbico de *T. foetus* estarían ubicadas en el citosol, sin conocerse el lugar exacto, los sitios de fosforilación aeróbica también son poco conocidos. Las principales enzimas son catalasas, NADH, NADHP, oxidasa, éstas serían estimuladas por el Mg^+ (80).

Existirían activas oxidasas, quizás flavoproteínas, que jugarían un papel importante en el transporte electrónico bajo condiciones aeróbicas. Estas ferredoxinas tendrían Fe y S junto a proteínas y participarían en la transferencia electrónica. Este

sería uno de los lugares de acción de los nitroimidazoles usados como tricomonocidas (76).

Cerkasovova y col.(18) comprobaron en los hidrogenosomas la existencia de gránulos oxidativos que contienen complejos enzimáticos del tipo superóxido dismutasas, piruvato oxidasa, adenilquinasa, más complejos estos compuestos que las catalasas, presentes en los peroxisomas.

Cerkasov y col.(17) estudiaron también el comportamiento de los hidrogenosomas en condiciones aeróbicas y comprobaron la presencia de complejos enzimáticos que les permitiría funcionar de igual forma en esas condiciones.

Los hidrogenosomas son diferenciables de las mitocondrias por tener la habilidad de formar H_2 bajo condiciones anaeróbicas, por no tener el complejo necesario para efectuar el ciclo de Krebs, ni tener enzimas citocromoxidasa y por presentar morfología y densidad específica.

Se ha detectado la presencia de hidrolasas en *T. foetus*, algunas con actividad proteolítica, localizadas en orgánulos citoplasmáticos (72, 78). Algunas enzimas como hialuronidasa y neuraminidasa tendrían un papel importante en la patogenia del protozoo.

Se ha estudiado el efecto de diversas tensiones de O_2 y CO_2 sobre la fisiología y crecimiento de *T. foetus* y *Trichomona vaginalis* en el medio de Diamond. Cuando no existía O_2 en la mezcla gaseosa el tiempo generacional fue corto, mientras que al aumentar las tensiones de O_2 la sensibilidad de *T. foetus* fue mayor inhibiendo su crecimiento (74).

Tiempo generacional (en horas) de Trichomonas en cultivos con mezcla gaseosa de diferente composición (74).

Mezcla gaseosa

O ₂ %	CO ₂ %	T.vaginalis	T.foetus
0	0	4.6	26.7
0	5	4.6	3.7
1	5	5.2	5
10	5	7.8	26.8
20	5	13	No crece

4.5 Serotipos de T. foetus

En esta especie existen tres serotipos antigénicamente bien diferenciables: T. foetus var. Belfast, var. Manley y var. Brisbane (45). Mylrea (82) comprobó que nueve rodeos presentaron la variedad Belfast y en un rodeo encontró la var. Manley.

Dennet y col.(41) y Christensen y col.(31) en Australia obtuvieron similares resultados: el 80% de las cepas tipificadas correspondieron a la var. Brisbane y el 20% a la var. Belfast.

No es posible la diferenciación morfológica de las tres variedades siendo indistinguibles también por cultivo y presentaron igual patogenicidad (21, 41).

Wosú señaló un cambio de serotipo en un toro, habiendo aislado inicialmente la var. Brisbane y posteriormente la var. Belfast; lo que se debería a una infección mixta (125).

Existen determinante antigénicos comunes que explicaría la resistencia cruzada en las hembras inmunizadas por una cepa como lo demostró Florent (1957), hay otros antígenos diferenciables. Robertson (1960) sostuvo que los pasajes mediante cultivos "in vitro" no cambiarían las características antigénicas mientras que Honigberg (61) pone en duda la invariabilidad de serotipos, en base a experiencias efectuadas con *Trichomona gallinae*.

Los serotipos aislados en Polonia por Stepkowski (1960) parecen ser distintos a las variedades Belfast o Manley.

Existirían antígenos comunes entre *Trichomonas suis* y *T. foetus* comprobados por inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión en gel e inmunoelectroforesis (34, 35, 37).

Las morfologías de ambos flagelados son similares aunque se encuentran en distintas especies, la presencia de identidad antigénica común indicaría un origen filogenético común (35). Sin embargo, las diferencias de patogenia, epizootiología y huésped las hacen perfectamente diferenciables (61, 76).

En nuestro país, el autor y col. (16) realizaron una serotipificación de cepas aisladas de toros A. Angus que resultaron resistentes a la terapia con un tricomonocida, resultando ser todos ellos de var. Belfast.

De todas formas, la demostración de tipos antigénicos no jugaría un papel importante en la adquisición de inmunidad ni en la epizootiología de la enfermedad.

4.6 Patogenicidad de T. foetus

En estudios hechos con cepas de *Trichomona vaginalis* y *Trichomona gallinae* que habían perdido su patogenicidad luego de 7 a 9 semanas de multiplicarse en los medios de cultivo, era debido al agregado de estreptomycin a dichos medios. Cuando las cepas se mantuvieron congeladas en atmósfera de nitrógeno líquido retuvieron la virulencia aún por períodos de 18 años. La multiplicación celular en medios no vivos sería responsable de la atenuación de la virulencia.

Dohnalová y Kulda (1975) sostienen que los cultivos in vitro de cepas *T. foetus* no pierden su patogenicidad al ser inoculadas en ratones y Honigberg menciona que la misma ~~se incrementaría~~ (62).

Se ha comprobado que los aislamientos recientes de cepas de *T. vaginalis* crecen con menor intensidad en los cultivos axénicos cuanto más patógenas son para el ratón; sin embargo esto no ha sido confirmado para *T. foetus* (61).

4.6.1 Inoculación en ratón

Esta prueba se ha usado ampliamente para evaluar la patogenicidad de cepas en aislamientos frescos.

La misma consiste en inocular a ratones por vía subcutánea, un número conocido de flagelados de un cultivo axénico. Luego de 6 días de inoculados se necropsian evaluando la patogenicidad de la cepa en base a las lesiones locales especialmente por la formación de abscesos. Este ensayo se ha hecho también usando la vía intraperitoneal, donde se formarían abscesos a nivel hepático

sin embargo, es preferible la vía subcutánea por ser más estandarizable el tipo de lesión producida.

No se puede esperar una perfecta correlación entre las alteraciones observadas en el sitio normal del huésped natural infectado con cepa patógena de trichomona y los cambios causados al ser inoculados en el tejido subcutáneo del ratón, donde muchos de los factores ambientales del tracto urogenital están ausentes (62).

4.6.2 Hallazgos citológicos y citoquímicos

Se ha estudiado la patogenicidad de cepas mediante la siembra directa en cultivos celulares, para ello se han empleado cultivos de células epiteliales, fibroblastos y macrófagos.

Honigberg (1964) demostró que cepas patógenas de *T. foetus* se multiplicarían dentro de los macrófagos y los destruirían.

La naturaleza de las sustancias tóxicas de *T. foetus* no son conocidas, aunque actuarían por vía indirecta, mediante toxinas difusibles y la vía directa, por contacto, las que serían responsables del daño en el huésped.

Las cepas patógenas ejercen una acción inhibitoria sobre la división celular en cultivos de fibroblastos, por inhibir estadios de la mitosis (62).

Müller y Seathoff (1972) demostraron en cultivos de aislamientos frescos de *T. foetus* grandes cantidades de una enzima neuraminidasa, ésta tendría acción sobre una amplia gama de glucoproteínas del suero humano. Los autores trataron de explicar la acción directa de esta enzima sobre el trofoblasto y placenta

o bien estaría involucrada en cambios inmunológicos que provocarían el aborto y esterilidad. La hialuronidasa jugaría también un papel importante; estas dos enzimas serían activas y presentes tanto en cepas virulentas como avirulentas (62).

En ensayos efectuados en ratón por Budilová y Kulda (1977) mediante la inoculación de una cepa de *T. foetus* por vía intraperitoneal a la dosis de 5×10^5 , junto a diferentes dosis (5 - 200 mg/kg) de sales férricas, por igual vía, encontraron un incremento de la patogenicidad del 13% al 85%. La disponibilidad del hierro por parte del parásito es un factor importante para la expresión de patogenicidad de cepas en el ratón.

Honigberg (62) demostró que cepas patógenas de *T. gallinae* fueron poco inmunógenas en conejos y viceversa; no existen trabajos con *T. foetus* y se desconoce su comportamiento.

5.- Aspectos inmunológicos

Hammond y Bartlett (1945) indicaron que la actividad fagocítica era el principal mecanismo de defensa del huésped y la reducción del número de parásitos en el curso de la infección se debería a esa actividad.

Kulda y Honigberg (1969) demostraron en cultivos de células hepáticas de pollos (61) que era muy común la ingestión de flagelados por macrófagos.

Stepkowski (1961) sugirió que el incremento de actividad fagocítica leucocitaria en conejos inmunizados con antígenos de *T. foetus* y *T. vaginalis* se debería a la formación de opsoninas específicas y sugirió que similar mecanismo ocurría en las infecciones del tracto genital animal y humano(61). Kerr y Robertson

(1943) y Morgan (1947) sugirieron que cierto grado de protección contra *T. foetus* puede esperarse luego de la administración repetida de este parásito por vía intramuscular o endovenosa.

Oka (1967) administró a ratones por vía intraperitoneal fracciones de *T. foetus* con adyuvante de Freund completo y comprobó que protegía a los animales contra posteriores descargas de antígenos vivos (61).

Ito (1975) y Hayashi (1975) inmunizaron ratones con *T. foetus* vivas; al incubar células derivadas de los linfonódulos de estos animales con una suspensión de *T. foetus* vivas provocaron la destrucción de los flagelados. Los leucocitos presentes en el exudado peritoneal de esos ratones fagocitaron rápidamente a los parásitos y los linfocitos destruyeron a las tricomonas en forma similar a lo ocurrido in vitro con el cultivo celular.

El papel de la inmunidad mediada por células en la protección del organismo contra *T. foetus* merece futuros estudios.

Se encontraron anticuerpos aglutinantes contra *T. foetus* en el suero normal de muchos vertebrados; en el equino es donde se obtuvieron los títulos más altos (1:1024); en el conejo (1:4 a 1:25) mientras que en el bovino los títulos hallados variaron (1:25 a 1:200) (61).

Por esto se deben inactivar los sueros por calentamiento cuando se los emplea para enriquecer los medios de cultivos.

No existirían anticuerpos naturales contra *T. foetus* en fetos ni en terneros recién nacidos; pero los mismos serían incorporados en forma pasiva al ingerir el calostro.

Los títulos séricos suben rápidamente durante los primeros 6 días de vida pero luego caen logarítmicamente entre 15 a 55 días de edad, Esta inmunidad pasiva es reemplazada, entre 30 y 60 días de vida, por la producción de anticuerpos autógenos naturales los que llegan a los máximos niveles entre 63 y 113 días (61).

La presencia de anticuerpos circulantes a T. foetus en vacunos natural y experimentalmente infectados fueron demostrados por pruebas, como fijación de complemento, aglutinación, hemoaglutinación pasiva; también se encontraron en animales de laboratorio experimentalmente infectados como conejos y ratones. La producción de anticuerpos humorales puede ser inducida experimentalmente por inoculación de parásitos vivos o bien por preparados de T. foetus inactivados, obteniendo títulos séricos elevados en conejos (1:10240).

En vacunos natural o artificialmente infectados no excedieron de 1:3000; estos anticuerpos humorales estarían en la fracción gamma-globulínica del suero y en las lactoglobulinas calostrales (60).

5.1 Inmunidad en el macho

Los procesos inmunitarios naturales en el macho no se producen y por ello el toro permanece infectado de por vida (21). La recuperación espontánea es rara aunque puede existir (20) pero de todas formas no tiene importancia en la epizootiología de la enfermedad (13, 21, 68, 94).

Los resultados preliminares efectuados en toros mediante el empleo repetido de vacunas homólogas daría una inmunidad artificial que si bien no es completa ayudaría a controlar la infección.

Para ello Clark y col. (27) emplearon en toros una vacuna de *T. foetus* var. Brisbane aplicada por vía subcutánea en tres oportunidades con un mes de intervalo entre sí y una repetición de una sola dosis anual en los otros 2 años posteriores. Los toros tenían inicialmente entre 2 y 3,5 años de edad y fueron puestos a servicio con vacas infectadas o bien les efectuaron una descarga de un cultivo intrapreputal de *T. foetus* var. Brisbane en 6 oportunidades entre octubre de 1977 y marzo de 1980. De 19 toros controles sin vacunar se infectaron 12, mientras que de 21 toros vacunados sólo se infectaron 4, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

5.2 Inmunidad en la hembra

La infección experimental de *T. foetus* en vagina solamente no forma anticuerpos circulantes mientras que cuando se instilan en el útero solución salina conteniendo extractos de *T. foetus* aparecen aglutininas detectables en suero. La absorción de antígenos del útero a sangre explicaría la génesis de anticuerpos humorales incrementados en los casos de piómetras y abortos. Estos anticuerpos humorales permanecerían por un tiempo limitado no superior a los 6 meses.

Robertson (1963) sostuvo que los anticuerpos humorales no entrarían en contacto con los parásitos confinados en útero y vagina y no jugarían ningún papel en el curso de la enfermedad.

Los anticuerpos circulantes son incapaces de contribuir a la protección del huésped contra *T. foetus* (26). Al contraer la hembra la infección formaría anticuerpos locales Ig A dentro de las

6 semanas posteriores al coito infeccioso. Estos anticuerpos serían responsables del fenómeno autolimitante en la hembra mediante el cual se inmuniza contra la infección.

Los anticuerpos vaginales serían responsables de eliminar a los flagelados por tener un efecto aglutinante e inmovilizador sobre *T. foetus*, fueron estudiados por Florent (1949); Kerr y Robertson (1953) y Pierce (1959).

El pasaje de *T. foetus* al útero acarrearía la formación de anticuerpos uterinos los que parecen tener algún efecto en la eliminación del parásito de las infecciones en las cuales la preñez no se interrumpe. Las aglutininas encontradas en el útero tendrían menor persistencia que los anticuerpos vaginales, debido a la destrucción cíclica de la mucosa uterina asociada a los períodos de celo. Los anticuerpos vaginales serían los responsables de eliminar a los parásitos de vagina, adonde llegarían como resultado del continuo pasaje a través del útero.

La técnica de mucoaglutinación se basa precisamente en la detección de anticuerpos presentes en el mucus cervicovaginal; la misma sería capaz de demostrar sólo el 60% de las vacas que están infectadas. Es usada únicamente como prueba de infección de rodeo y no tiene valor para el diagnóstico individual.

Se han encontrado antígenos comunes con *Campylobacter fetus*, los que fueron señalados inicialmente por Florent (1954) y Mylrea (82). Reece y col. (91) afirmaron que la vacunación con *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* con un adyuvante oleoso puede inducir aglutininas activas contra *T. foetus* lo que confirmaría la presencia de algunos antígenos comunes.

Murnane (81) detectó la presencia de aglutininas en vagina, mediante la prueba de mucoaglutinación en 29 vacas infectadas, entre 5 y 15 semanas posteriores a la infección, para desaparecer entre 3 y 4 meses posteriores; cita trabajos donde este período se prolongó hasta 10-12 meses.

Entre 2 y 5 meses posteriores a la infección inicial, las hembras que han mostrado celo se recuperan sin tratamiento (21). Las vacas con piómetras se recuperan al regresar el cuerpo lúteo y expulsar el contenido uterino. Los ciclos estrales posteriores provocarían la salida de los flagelados los que serían destruidos en vagina por las Ig A; el mecanismo inmune sería efectivo sólo durante el celo.

La inmunidad adquirida sería sólida por un período de 2 a 6 meses para ir decayendo luego de 1 año de la infección inicial; posteriormente la vaca podría reinfectarse caracterizando ésto a los rebrotes de Tricomoniasis en los rodeos.

La reinfección ocurriría durante un corto lapso de tiempo (no más de 2 semanas) por la presencia de una sólida inmunidad cuando se efectúa entre 4 y 6 meses posteriores a la recuperación (8, 46). Murnane fracasó al querer reinfectar hembras a los 4 meses posteriores de la recuperación de su infección inicial, lo que confirmaría una buena inmunidad inicial. (81)

Clark y col. (27) señalaron una caída de la inmunidad luego de los 12 meses de la infección inicial, a los dos años la susceptibilidad era casi igual al de las vacas sin exposición previa al protozoo. Aquellas hembras que adquirieron inmunidad contra un serotipo de *T. foetus* adquieren resistencia cruzada hacia otros serotipos, este punto es de capital importancia para el control de la enfermedad.

6.- Susceptibilidad en el macho

No se han encontrado diferencias de susceptibilidad entre Bos Taurus y Bos Indicus y sus respectivas cruzas (2, 41).

Baez Kohn (6) al examinar 776 toros de razas de carne de 48 rodeos obtuvo en 304 toros Cebú revisados 2 rodeos infectados, de 45 toros Brangus con 1 rodeo afectado, de 80 toros Santa Gertrudis 1 rodeo afectado, 52 toros A. Angus y un solo rodeo afectado, 295 toros Hereford y 2 rodeos afectados.

No se conocen los factores que gobiernan la susceptibilidad en el macho, pero en un brote severo de la enfermedad, hasta un 50% de toros pueden encontrarse infectados (21), aunque lo usual es que sea menor del 15% (122).

Diversos autores comprobaron una mayor incidencia de la enfermedad en los animales adultos y viejos con respecto a los jóvenes, lo que podría deberse a que poseen mayor oportunidad de adquirir la infección (21, 122) o bien por el mayor desarrollo de criptas y pliegues prepuciales, lo que crearía condiciones ideales para que la infección se instale (94).

La susceptibilidad de los toros jóvenes es baja, Clark y col. (24) pudieron infectar en forma experimental toros de 3 a 7 años pero los animales de 1-2 años fueron poco susceptibles, la infección sería más difícil y de corta duración.

Ladds y col. (67) obtuvieron una incidencia del 34,9% en toros viejos, mientras que no encontraron infección en toros con edades de 9 meses a 3 años.

Dennett y col. (41) examinaron 425 genitales de toros faenados y hallaron porcentuales de infección mayores en animales viejos.

Hammond y Bartlett (57) al intentar infectar experimentalmente a toros comprobaron que los más jóvenes fueron difíciles de infectar. Existirían diferencias individuales en la resistencia natural y en la anatomía y fisiología prepucial.

Clark y col. (23) efectuaron un ensayo con 8 toros Hereford, de distintas edades y libres de infección y los hicieron servir a vaquillonas infectadas con T. foetus; necesitaron para contagiarse mayor cantidad de servicios a medida que la edad de los toros era menor. Emplearon 2 toros de 6 años que se infectaron luego de 4 saltos, 2 toros de 5 años que necesitaron 5 y 6 saltos respectivamente, 2 toros de 4 años que se contagiaron luego de 3 y 4 servicios, 2 toros de 3 años de los cuales se infectó sólo 1 luego de nueve servicios, mientras que el otro, con igual número de servicios no se infectó.

Christensen y Clark (33) encontraron que el 78% de los toros afectados de T. foetus eran de 4 años o mayores.

Kimsey y col. (65) informaron que cuatro toros de 2 años portaban la infección sospechando que pudieran existir diferencias de susceptibilidad entre razas de origen Europeo y ganado autóctono.

7.- Susceptibilidad en la hembra

Toda hembra no expuesta es altamente susceptible, Parsonson y col.(89) lograron infectar 19 de 20 vaquillonas servidas con un toro infectado, mediante un sólo servicio a cada una, similares conceptos fueron postulados por Bartlett (8) y otros autores (21, 26, 89).

Elder y Hall (46) lograron infectar a 5 vacas en la primera exposición las que nunca habían tenido contacto previo con la enfermedad. Utilizaron cepas de T. foetus de aislamiento reciente y también mantenidas in vitro durante 82 pasajes.

Roberts (94) sostiene que entre un 5 y 20% de vacas y vaquillonas serían naturalmente resistentes a la infección.

8.- Síntomas

8.1 En el macho

Los machos actúan como portadores inaparentes no observándose signos clínicos. No existen cambios en la calidad seminal y la fertilidad del macho no se ve afectada (9, 13, 21, 41, 64, 68).

Roberts (94) mencionó la presencia de una leve balanitis y postitis en los toros recién infectados aunque no suelen detectarse clínicamente. Las infecciones crónicas no tendrían signos clínicos.

8.2 En la hembra

El signo más importante es la esterilidad temporaria, con prolongación inicial del ciclo estral (28-35 días)(21). La esterilidad

es perceptible por las repeticiones de servicios, en muchos casos son necesarios hasta 6 servicios para obtener la preñez (94).

Al examinar la vagina puede notarse una vaginitis que puede ser catarral, aunque este signo no fue visto por Simmons y Laws (101), el mucus vaginal era indistinguible al compararlo con el de animales sin infectar.

Las lesiones de endometritis media provocadas en el útero pueden prolongar el período de infertilidad por períodos de 3 a 5 meses (11, 64).

Otros de los signos presentes son los abortos esporádicos y piómetra.

El aborto suele ocurrir antes de los 4 meses de gestación y no supera el 5%; en rodeos con reinfecciones este porcentaje puede aumentar.

Luego del aborto puede existir descarga de material uterino por 24-48 hs. Otras veces se produce la piómetra con muerte del feto y persistiendo el cuerpo lúteo puede macerarse con el consiguiente acúmulo de pus inodora, de color amarillento pálido y en volúmenes variables de 300 ml a 1.500 ml.

La piómetra es post coito y puede detectarse al efectuar el examen ginecológico.

Esta puede persistir hasta 8-9 meses o bien desaparecer cuando el tapón cervical se licúa y el contenido uterino se libera. La piómetra suele presentarse en menos del 10% de los casos. La retención de placenta es una complicación rara del aborto tricomniásico (94).

Cuando existe muerte embrionaria precoz con reabsorción o eliminación, éste no suele ser observado y la única manifestación puede ser el reinicio del ciclo estral.

Si en una vaca infectada se emplea inseminación artificial, con semen libre, la relación servicio/concepción llega a 1: 5 ó más.

8.3 En el rodeo

El signo más visible es la caída del porcentaje de preñez que disminuye a 40 - 50%, especialmente en vaquillonas con servicio estacionado (3 meses). En vacas que nunca han estado en contacto con la enfermedad, el porcentaje de preñez también es bajo. (50 - 60%). (12, 21).

Si el servicio es más largo, esta enfermedad puede permanecer enmascarada pudiendo existir preñeces muy chicas correspondientes a vientres que lograron cumplir el proceso de autoinmunidad, preñándose al final del servicio. Esto ocasiona pariciones muy desparejas existiendo varias "colas" de parición. Los abortos pueden ser difíciles de detectar por ser de poca edad.

En los rodeos donde la infección es crónica, los porcentajes de preñez en el lote de vacas puede llegar hasta 70 - 75% por existir animales que ya se han inmunizado, pero las vaquillonas tendrán porcentajes de preñez bajos (40 - 60%).

9.- Epizootiología

T. foetus tiene una localización estrictamente genital tanto en el macho como en la hembra.

La transmisión se hace del macho a la hembra o viceversa, también si se emplea la inseminación artificial con semen infectado o utensillos contaminados (21).

9.2 Importancia del macho

T. foetus es encontrada en mayor cantidad en el glande, pene y prepucio adyacente.

Hammond y Bartlett (58) estudiaron las cargas de protozoos en cavidad prepucial y los promedios fueron de 9.529/ml. en pene hasta 288/ml. en la parte media del prepucio.

Bartlett y col. (7) realizaron una serie de consideraciones sobre las variaciones poblacionales de T. foetus en toros infectados, tales como: 1) la vecindad del coito disminuye la población por arrastre mecánico, 2) agentes químicos introducidos en cavidad prepucial, 3) contaminación de la cavidad prepucial con cambios de flora; cambios en la fisiología de pene y prepucio, cambios de pH, etc.

Hammond y Bartlett (59) efectuaron recuentos de protozoos y obtuvieron variaciones entre 488.000/ml y 20.000/ml; se producirían fluctuaciones poblacionales importantes con intervalos de 5 - 10 días.

Clark (21) menciona que la población es muy variable y oscila entre 200 y 80.000/ml. La población en cavidad prepucial de *T. foetus* es mayor cuando el toro tiene descanso sexual (81).

Clark y col. (24) comprobaron que la infección experimental necesita, además de una edad adecuada del toro, una concentración mínima de parásitos establecida en 2×10^6 aunque mencionan el caso de 2 toros de 3 y 5 años respectivamente que se infectaron con sólo 10^2 células viables. *T. foetus* crece en medios de cultivos con orina y plasma seminal y dicho medio se lo utilizó para infectar a un toro (24).

Clark y col.(25) controlaron la infección en un rodeo de 11.000 vacas sustituyendo la población de toros adultos (más de 4 años) por toros libres de 1-3 años los que serían menos susceptibles.

Christensen y col. (31) reemplazaron 300 toros de raza Shorthorn de 8 años de edad por 325 toros Brahman de 2 años; cuando examinaron 30 toros viejos reemplazados encontraron 14 animales infectados (47%) con *T. foetus*. Luego de 2 años en servicio revisaron 80 toros Brahman y obtuvieron 3 animales positivos (4%). Posteriormente Christensen y Clark (32) examinaron en ese mismo rodeo 112 toros pero luego de 4 años de permanecer en servicio (6 años de edad) obtuvieron 15 positivos (13,4%). En rodeos infectados los toros de 4 años o más de edad deberían ser eliminados del servicio, como una de las normas a seguir para controlar la enfermedad, basándose en la menor susceptibilidad del toro joven a infectarse (32).

La posibilidad del contagio entre machos puede ocurrir cuando existe algún animal infectado y se encuentran agrupados en excesivo número, pudiéndose montar entre sí y adquirir la infección por acción mecánica (111).

9.2 Importancia de la hembra

Luego de un servicio infectante *T. foetus* puede persistir en vagina de 1 a 5 meses, invadiendo en ese lapso el útero(8, 21, 81); posteriormente no puede ser puesta en evidencia excepto durante el final del diestro cuando las descargas uterinas pasan hacia la vagina.

La infección inicial sería detectable en el mucus cervicovaginal entre 4 y 18 días post servicio infectante, siendo más frecuente entre 2 y 3 semanas posteriores (81).

La transmisión a la hembra se hace por el macho. Andrews y Müller (1938) suponían que mediante el contacto directo de la vulva o cola de hembras infectadas podría transmitir la infección o bien mediante moscas (Morgan 1944).

Clark y col. (26) demostraron la imposibilidad de reproducir la infección en 10 vacas al aplicar en los labios vulvares 2×10^6 células viables de *T. foetus* bar. Brisbane, lo que sugiere la incapacidad del protozoo de migrar desde esa localización. Cuando el inóculo fue colocado en la parte anterior de vagina se infectaron todas las hembras. Con sólo 100-200 células viables de *T. foetus* depositadas en la parte anterior de vagina es posible infectar una hembra sensible (21, 27).

Clark y col.(26) comprobaron la posibilidad de causar la infección genital pasiva mediante el servicio de un toro libre de *T. foetus* que hubiera servido con anterioridad a vacas infectadas y así infectar a otra hembra, para ello deben transcurrir menos de 20' entre un salto y otro, lo que lo hace poco factible en términos de servicio a campo.

10.- Hallazgos patológicos

10.1 Macho

Hammond y Bartlett (58) no pudieron demostrar la presencia de *T. foetus* en la parte baja de la uretra peniana.

Parsonson y col.(88) estudiaron la distribución de *T. foetus* en el tracto genital de 15 toros infectados en forma natural y 9 en forma experimental. En todos los casos aislaron el parásito de cavidad prepucial y pene y en 4 toros en orificio uretral externo.

Los cultivos de testículos, vesículas seminales, epidídimo, ampollas y uretra pelviana fallaron en detectar el parásito. El estudio micro y macroscópico de los genitales de los 24 toros no revelaron lesiones, teniendo el parásito exclusivamente localización en pene y prepucio a nivel superficial, sin invadir el epitelio. Esto ya había sido mencionado por Clark (21) al estudiar la influencia de las criptas prepuciales con respecto a la mayor concentración de flagelados, lo que no pudo ser confirmado por estudios histológicos. *T. foetus* al no penetrar en el epitelio no produce lesiones histopatológicas.

Las 57 muestras de semen extraídas de dichos toros, con la precaución de evitar toda contaminación en prepucio, fueron negativas al cultivo.

10.2 Hembra:

Dennett y col. (41) efectuaron aislamientos de T. foetus variedades Brisbane y Belfast del tracto reproductor femenino sin encontrar diferencias entre las patologías provocadas por dichas variedades. De 264 genitales de vacas examinadas obtuvieron T. foetus en 17 de ellas (6.4%); encontrando lesiones en 5 consistentes en perimetritis, endometritis, vaginitis, hidrosalpinx y en dos encuentran fetos macerados con endometritis catarral o purulenta.

Murnane (81) de 14 vacas servidas por un toro infectado obtuvo preñez en solo 3 animales luego de 1 mes de servicio, sin encontrar lesiones visibles en sus genitales.

Parsonson y col. (89) efectuaron un estudio sobre las lesiones del tracto genital femenino en vaquillonas infectadas con T. foetus en forma natural y enviadas a faena en un tiempo máximo de 100 días. Hubo un 61% de preñez (11 sobre 18); a la necropsia de 15 vaquillonas encontraron T. foetus en vagina o cérvix y en 11 de ellas además en útero y oviducto. En 8 animales faenados entre 15 y 50 días post servicio aislaron T. foetus de útero, oviducto, cérvix y vagina sin encontrar lesiones macro ni microscópicas, pese a estar preñadas 5 animales. El resto de las 12 vaquillonas se faenaron con 60 a 100 días post-servicio; en 7 de ellas se encontraron lesiones agudas o crónicas consistentes en: salpingitis y endometritis crónica; vaginitis severas con presencia de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos en el tejido epitelial y subepitelial. De los 11 animales preñados, dos tuvieron evidencias de

aborto, con hemorragia en los placentomas y separación de cotiledones con infiltración de neutrófilos y macrófagos. Los líquidos fetales eran de color amarillento pálido y con aspecto de fina suspensión coloidal. Los restantes 9 fetos eran normales. Encontraron piómetra en una vaca con 77 días de servicio y presencia de material amarillento pálido semisólido en cuernos, cérvix y oviducto, con severa endometritis e infiltración de macrófagos y neutrófilos. En las secciones histológicas de tejidos observaron el parásito en la superficie de las secreciones del tracto genital, en la luz de las glándulas endometriales o entre los componentes materno fetales de las placentomas. Esta localización en las secreciones mucosas del tracto genital femenino y la absorción de antígenos a nivel epitelial sería la explicación de la respuesta inflamatoria vista en dichos tejidos.

Del presente trabajo surge que *T. foetus* no produce lesiones reconocibles en el tracto genital hasta los 50 días post-infección.

Existiría una presencia precoz del parásito en oviducto ya a los 15 días post-infección, lo que indica la rápida progresión del parásito (81, 89).

T. foetus se aisló de vagina hasta 95 días post infección (89) aunque Simmons y Laws (101) encontraron en 3 vaquillonas infectadas en forma natural que la infección persistió durante 47 días, 136 y 163 días respectivamente.

Donaldson y col. (44) examinaron los genitales de 74 vacas siendo positivas a *T. foetus* 9 (12%). El exudado vaginal fue mucopurulento en 3 vacas y 3 tuvieron exudado uterino de tipo acuoso, mucoide o purulento.

Stalheim y col.(105) efectuaron un estudio con microscopía electrónica mediante cultivos in vitro de oviductos de vacas los que fueron expuestos a cultivos de T. foetus. No observaron lesiones en el epitelio ciliado del oviducto mientras que otros microorganismos como Campylobacter foetus produjo alteraciones.

11.- Diagnóstico

Los antecedentes reproductivos del rodeo permiten sospechar la enfermedad los que ya fueron citados al describir los síntomas individuales del rodeo.

La confirmación de la enfermedad se efectúa poniendo en evidencia al protozoo mediante observación microscópica directa, el uso de coloraciones específicas o bien la siembra en medios de cultivos específicos. Para ello los materiales sospechosos pueden extraerse tanto del macho como de la hembra o de fetos abortados.

11.1 Método de muestreo en el macho

Generalmente se utiliza el macho para confirmar una sospecha de enfermedad en el rodeo, por razones de practicidad existe más probabilidad de evidenciarla.

Para ello existen distintos métodos que tienden todos a detectar el protozoo del material extraído de cavidad prepuccial. Es fundamental partir de una buena muestra para un eficiente diagnóstico.

La viabilidad de los microorganismos cambia al sacarlos de su hábitat normal para condicionarla al medio donde son colocados y características de transporte hasta su observación o cultivo ulterior.

Existen diferentes métodos para poner en evidencia la infección en el toro.

11.1.1 Método de la vaquillona virgen

Consiste en hacer servir al toro sospechoso con 3-4 vaquillonas vírgenes, y posteriormente efectuar 2 muestreos semanales de vagina entre la primera y segunda semana post-servicio para evidenciar al parásito por observación directa o cultivo.

Si bien este método es seguro, resulta engorroso, poco práctico, lento y costoso.

11.1.2 Método de la pipeta

Hammond y Barlett (57, 58) utilizaron una pipeta de vidrio de 21 pulgadas de largo por 8 mm de diámetro, con una parte anterior recta y la parte final con una curvatura de 15° la cual lleva adosada una pera de goma. La parte anterior es introducida en la cavidad prepucial tratando de aspirar el exudado presente en los alrededores del glande y prepucio adyacente mediante compresión y relajación sucesivas de la pera de goma, luego la muestra era colocada en un tubo con escasos ml de solución fisiológica; del material sedimentado efectuaban la observación microscópica directa.

El método es llamado también método de Bartlett pues este autor la empleó en 1947 (7) señalando que un esquema de la pipeta fue publicado previamente por Hammond y Bartlett (57). Bartlett publicó en 1949 (9) un trabajo donde describe en detalle la técnica, mostrando un diagrama de la pipeta usada; a partir de allí es que muchos autores posteriores lo citan como Método de Bartlett.

El autor aconseja el área del glande y prepucio adyacente como el lugar ideal para efectuar la aspiración del esmegma pues según un trabajo anterior (58) era la zona de mayor concentración de flagelados. El volumen recogido oscila entre 0,5 y 1,5 ml, el cual es enjuagado en 5-10 ml de solución fisiológica al 0,85%, para ser examinado la capa superficial del sedimento, por microscopía directa luego de 1-2 horas de reposo.

La técnica fue también descrita por otros autores (99, 101, 111, 124). Hammond y col. (59) emplearon este método y sobre 242 muestras obtenidas, el volumen promedio de esmegma recolectado fue de 0,52 ml; los autores objetan el riesgo de rotura de alguna pipeta dentro de cavidad prepucial. Fitzgerald y col. (48) emplearon también este método.

Todorovic y Mac Nutt (117) utilizaron el Método de Bartlett (9) al ensayar el comportamiento de diferentes medios de cultivo a base de leche. Para ello utilizaron una pipeta de plástico unida a un bulbo de goma, el cual es comprimido y relajado 15 a 20 veces una vez que la pipeta es colocada en cavidad prepucial ubicando el área del glande y prepucio adyacente, sembrando el material recolectado directamente en los medios de cultivo.

Clark y col. (20) utilizaron una pipeta de plástico unida a una pera de goma de 90 ml de capacidad. La pipeta era dirigida al área del glande efectuando movimientos durante 1', en ese lapso el bulbo era comprimido de 15-20 veces, como Todorovic y Mc Nutt (117), obteniendo así de 0,5 a 2 ml de esmegma el cual era colocado directamente en 8 ml de caldo nutritivo, luego de 3-4 horas de reposo extraían 1 ml del fondo del tubo el cual era sembrado en el medio de Plastridge modificado por Sutherland (112).

Clark (21) describió nuevamente el método pero enjuagando el material recolectado en 3-4 ml de solución fisiológica o caldo nutritivo.

García y col. (51) utilizaron también este método sembrando las muestras en caldo thioglicolato.

Abbitt y Meyerholz (2) emplearon una pipeta de inseminación artificial unida a una pera de goma y sembraron el material en el medio de Diamond.

Kimsey y col. (65) utilizaron una pipeta de plástico de las empleadas en vacas para infusiones uterinas, a la cual le adosaron una jeringa de 12 ml, con la cual aspiraban volúmenes de 0,2 - 1 ml de esmegma, este era colocado en 3 ml de solución fisiológica o bien directamente en diferentes medios de cultivos.

El método de la pipeta ha sido usado por diferentes autores con buenos resultados (26, 41, 68, 75, 88, 115).

11.1.3 Método del Hisopo

Inicialmente fue descrito por Morgan en 1944. Consiste en un hisopo de algodón absorbente enroscado en una varilla metálica de 60 cm de largo y 4 mm de espesor; en uno de los extremos lleva el algodón con una superficie absorbente de 1 a 2 cm. Se introduce en cavidad prepucial muestreando alrededor del glande y luego es colocado dentro de un tubo con 1 ml de solución fisiológica donde se enjuaga comprimiéndolo contra las paredes para desprender el material extraído y luego se efectúa observación microscópica directa (99, 124).

Fitzgerald y col. (48) lo emplearon en un estudio comparativo con otros métodos. Estiman que puede quedar material en el algodón, aunque en su trabajo se comportó en forma eficiente; también fue empleado por Marquez y col. (75). Wilson y col. (123) utilizaron este método para muestrear 280 toros. Para ello emplearon un hisopo de algodón de 6 pulgadas introducido en cavidad prepucial y masajéandolo externamente para luego ser colocado en caldo thioglicolato y cultivado a 37°C. Coinciden que si bien el método es simple no es el ideal.

Akinboade (3) lo empleó en 400 toros efectuando posteriores frotis con ese material y coloración para su observación.

Una variación del método fue hecha por Witherspoon y Walker (124) y consiste en efectuar un hisopado directo del pene extendido, ya sea por masaje o bien mediante el uso de tranquilizantes. Una vez extraído de cavidad prepucial se lo hisopa directamente mediante una gasa embebida en solución fisiológica, luego se hace observación directa o bien centrifugado del material recolectado para examinar en forma directa el sedimento obtenido (99).

11.1.4 Método de la ducha

Inicialmente fue utilizado por Fitzgerald y col. (48), posteriormente es empleado por Fitzgerald y col. (49) pero utilizan además de la observación directa el cultivo en medio Plastridge modificado por los autores con un 8,1% más de eficiencia que con la observación directa sola. En otro trabajo también empleó este método (50), al igual que Murnane (81) al examinar rodeos lecheros en Australia.

Consiste en introducir en la cavidad prepucial de 50 a 250 ml de solución fisiológica estéril, manipulando de tal forma que con una mano se oblitera la abertura prepucial y con la otra se hacen masajes vigorosos en sentido antero posterior por varios minutos y luego el material es recogido colocándolo en un envase estéril para ser examinado en el laboratorio. Allí la muestra se centrifuga por 2.000 R.P.M. por 10 minutos descartando el sobrenadante, el sedimento es homogeneizado para ser observado en forma directa o bien sembrado en medios de cultivos (49, 63, 99, 124).

Johnson (63) efectuó una variación utilizando una pera de goma de 8 onzas de capacidad unida a un tubo de goma por el cual introdujo 125 ml de solución fisiológica en cavidad prepucial haciendo de 75 a 100 masajes; luego el líquido era colectado y refrigerado hasta ser sembrado en el medio descrito por Fitzgerald y col. (49). Laing (68) describió este método empleando una pipeta metálica unida a una manguera de goma por la cual introduce 50 ml de solución fisiológica al 0,85% o bien caldo Douglas.

Santos y Amaral (99) describieron el método usando una pipeta de plástico de inseminación artificial por la cual introducen 60 ml de solución fisiológica, mediante una jeringa de 100 ml, masajeando durante 2-3' la cavidad prepucial para después sembrar el material colectado en el medio de Rieck. Santos y col. (100) emplearon similar metodología.

Roberts y col. (92) emplearon el método de la ducha aconsejando que no transcurran más de 8 horas entre la extracción de la muestra y la observación microscópica o cultivo (93).

Stoessel (107) describió una pequeña variante, reduciendo el volumen de solución fisiológica en 30 ml, efectuando de 100 a 120 masajes de la cavidad prepucial en sentido antero-posterior; el material era colectado en envases estériles para luego centrifugarse y ser observado en forma directa o bien sembrado en los medios de leche descremada o Trichomona Medio OXOID.

Este método es empleado por otros autores (13, 30, 55, 56, 85, 104, 109). Dennet y col. (41) emplearon solución fisiológica tamponada pH 7,2 suplementada con suero fetal bovino al 5%, introducen mediante jeringa y pipeta de I.A., 20 ml en cavidad prepucial; el material extraído luego del masaje es centrifugado y sembrado en el medio de Plastridge modificado por Sutherland (112).

11.1.5 Método del Raspador

La técnica consiste en introducir en el prepucio un instrumento metálico y así desprender el esmegma para ser inoculado en solución fisiológica o en medio de cultivo.

Sutka y Katai (113) lo emplearon basados en trabajos efectuados en Ucrania por Kortchak, si bien no detallaron las características del instrumento. Previo lavado de la abertura prepucial con agua y jabón y posterior secado, introducían el instrumento efectuando de 21 a 30 movimientos en sentido antero-posterior para arrastrar el esmegma. Una gota del material era observada bajo microscopía directa y el instrumento era colocado en un tubo con 2 ml de solución fisiológica para cultivo de la muestra. El instrumento era esterilizado colocándolo en agua hirviendo durante 5-10' y luego enfriado en solución fisiológica. Del Campo y col. (40) lo describieron como método del resorte. El instrumento tenía un mango de 50 cm de largo por 3 mm de diámetro, llevando en uno de sus extremos un cilindro rodeado de un resorte de acero inoxidable. Este cilindro mide 2,5 cm de largo por 5 mm de diámetro presentando estrías que están dirigidas en sentido opuesto a las estrías del resorte; tendría además un tope anterior y otro posterior liso y liso; estas piezas son desarmables para facilitar su higiene.

Los autores indicaron efectuar con dicho instrumento 12 movimientos dentro de la cavidad prepucial en sentido cráneo caudal, la muestra extraída era colocada en un tubo con 2 a 5 ml de solución fisiológica girando el instrumento para desprender el material colectado, el instrumento era nuevamente introducido para repetir una vez el muestreo de forma similar. La desinfección del instrumento la efectuaban por flameado con alcohol. Las muestras eran sembradas en el medio de Plastringe obteniendo así buenos resultados.

Ostrowsky y col.(84) fueron los primeros en emplearlo en nuestro país, detallando las características del instrumento, el cual era un raspador a resorte similar al descrito por los chilenos Del Campo y col.(40).

Posteriormente Ostrowsky y col.(85) efectuaron un estudio comparativo de metodología de muestreo empleando toros infectados y usaron 2 tipos de raspadores; uno llamado torneado y el otro a resorte. Los autores no han detallado el primero de los instrumentos, citando que es similar al del resorte ya descrito (84), cambiando sólo su cabezal. La evaluación la hacían mediante observación microscópica directa y los resultados fueron nulos (0%) para el raspador torneado y de 41,6% para el raspador a resorte.

Stoessel y Haberkorn (110) emplearon el citado raspador a resorte en un estudio comparativo con el lavado prepucial.

Tedesco y col. (115) utilizaron en Uruguay este método con éxito, el instrumento descrito es un raspador torneado y consta de un mango metálico de 70 cm de largo y 3 mm de diámetro, llevando soldado en uno de los extremos un cilindro metálico de 13 cm de largo y 8 mm de diámetro, con 31 ranuras que permiten recolectar el esmegma (114).

Una vez colocado el instrumento dentro de la cavidad prepucial, se gira con la otra mano tratando de frotar el área dorsal y anterior del pene mediante 15-20 movimientos en sentido antero-posterior para luego extraerlo y ser enjuagado en un tubo con 8ml de sol. peptonada; este procedimiento era repetido por segunda vez efectuando otra serie de raspajes. Luego era sumergido

en agua hirviendo durante 5 y posteriormente enfriado entre cada muestreo en solución peptonada. Con esta técnica obtuvieron excelentes resultados.

Baez Kohn (6) lo empleó en forma similar a la descrita por Tedesco y col. (115) con la diferencia de enjuagar el instrumento en 10 ml de solución fisiológica tamponada, luego centrifuga el material para efectuar observación directa y cultivo en Trichomona Medio OXOID.

11.1.6 Comparación entre métodos de muestreo

Hammond y col. (59) compararon la eficiencia del método de la pipeta con el del hisopo propuesto por Morgan. Efectuaron a un toro positivo 9 muestreos en días alternados y la evaluación la realizaban mediante recuentos de parásitos en cámara hematométrica. El comportamiento del método de la pipeta fue superior al del hisopado.

Fitzgerald y col. (48) evaluaron los métodos de la pipeta, ducha e hisopado mediante recuento de parásitos/ml, efectuando los muestreos en días alternados.

Nº de toros muestreados	Nº muestras	Métodos	Promedio recuento de parásitos/ml	% negativos
7	62	Hisopo	4.200	8,1
	63	Pipeta	20.600	6,3
3	119	Pipeta	7.100	34,4
		Ducha	13.500	18,5

Las diferencias entre métodos estaría supeditada a las variaciones individuales de población en prepucio. Los autores sostienen que el método de la ducha sería más eficaz cuando existe baja población en prepucio, sin embargo, en condiciones prácticas, tanto el método de la ducha como el de la pipeta tendrían un comportamiento similar, en último lugar quedaría el método del hisopo.

Sutka y Katai (113) compararon el método del raspador con el método de la ducha, siendo más eficiente el raspador.

Del Campo y col. (40) efectuaron una comparación entre el método del raspador y el de la ducha en 14 toros. Las muestras eran sembradas en el medio de Plastridge y observadas a las 24-48 y 96 hs de incubación.

La totalidad de los toros fueron detectados mediante el método del raspador en tres muestreos, mientras que se necesitaron 6 muestreos con el método de la ducha para obtener el 100% de animales positivos.

Márquez y col. (75) evaluaron diferentes métodos de diagnóstico mediante el análisis de cuatro toros infectados examinados en 5 oportunidades con intervalos de 3 días; en todos los casos emplearon observación directa y cultivo en el medio Diamond. Los resultados se expresan en porcentaje de eficiencia.

Método	Observación directa%	Cultivo %
Hisopado	30	65
Pipeta	65	75
Ducha	70	95

De los 3 métodos evaluados, el de la ducha fue el mejor.

Ostrowski y col. (84) compararon tres métodos: lavaje prepucial, pipeta de Bartlett y raspador torneado. Para ello muestrearon 8 toros positivos a T. foetus, las muestras fueron evaluadas mediante observación directa y cultivo en el medio de Plastridge, sin encontrar diferencias entre los tres métodos.

Dennett y col.(41) efectuaron su trabajo empleando el método del lavaje prepucial y el de la pipeta, sin embargo, no evaluaron los métodos empleados.

Ostrowski y col.(85)emplearon 24 toros infectados para evaluar mediante la observación directa, los siguientes métodos de muestreos:

Métodos	% positivos
Lavaje prepucial	62,5
Pipeta de Bartlett	50
Raspador resorte	41,6
Raspador torneado	0

Stoessel y Haberkorn (110) compararon el método del lavado prepucial con el del raspador a resorte empleado en dos formas: suave y enérgica, para ello muestrean a 22 toros en 5 oportunidades con 1 semana del intervalo. Concluyeron que el raspador a resorte debe ser usado en forma enérgica para obtener similares resultados que con el lavado prepucial.

Tedesco y col.(115) muestrearon 3 toros semanalmente durante 33 semanas empleando como métodos la aspiración mediante pipeta y el raspador torneado, las muestras eran observadas en forma directa, dentro de las 2 horas extraídas y además eran sembradas en el medio de Sutherland (112).

La observación directa fue superior para las muestras extraídas con raspador, mientras que al evaluar ambos métodos mediante la observación del medio de cultivo, los resultados eran similares.

Al mismo tiempo, emplearon un medio de transporte para evaluar ambos métodos luego de refrigeración de 24, 48 y 72hs. Las diferencias no fueron significativas, entre ambos métodos, para las muestras mantenidas por 48 hs, mientras que las conservadas por 72 hs, el método del raspador obtuvo una eficiencia del 89,8% contra 70,8% por parte del método de la pipeta.

Villa (119) comparó el método del raspador torneado con el método de la pipeta. Para ello muestreó 175 toros en dos oportunidades para cada método con 10-15 días de intervalo. Obtuvo así 28 toros positivos los que fueron evidenciados en su totalidad por el método de la pipeta mientras que mediante el raspador la eficacia para los dos muestreos fue del 85,7%.

11.2 Métodos de muestreo en hembras

El momento ideal para hacerlo sería entre 2-4 días antes del celo, donde los flagelados migrarían del útero a vagina, para ser posteriormente destruidos por los anticuerpos aglutinantes locales.

El método de la pipeta fue empleado por Murnane (81) y Mylrea (82) en Australia, en hembras de rodeos con baja fertilidad. Este método fue detallado por Laing(68), Simmons y Laws(101), Santos y Amaral (99). La técnica original se basó en los trabajos de Andrews y Miller (1938) y empleado luego por Bartlett (9) quién

reproduce un dibujo sobre el tipo de pipeta de vidrio empleado. La pipeta se introduce en vagina efectuando un lavado con 5-7ml de solución fisiológica al 0,85% y aspirando ese material con una pera de goma adosada en la parte externa. El material extraído puede ser observado en forma directa o sembrado en medio de cultivo, dentro de las (-8) horas de extraídos. Este método fue también usado por Clark en Australia (21, 26) y Santos y col. (100) en Brasil.

Abbit y Ball (1) efectuaron un trabajo empleando para la extracción del mucus vaginal pipeta de I.A. unida a jeringa mediante la cual aspiraban el mucus (1-5 ml), el cual era sembrado en el medio de Diamond.

Otro método es el del hisopo, descrito por Morgan (1944) y últimamente por Santos y Amaral (99).

Dennet y col. (41) lo emplearon, hisopando vagina y luego transfiriendo dicho material a un tubo de 5 ml de sol.fisiológica tamponada con 5% de suero fetal bovino. También utilizaron en hembras que iban a faena el raspado con bisturí del cérvix, endometrio o vagina. Las muestras provenientes del tracto genital femenino se incubaban entre 10-14 días a 38°C.

Parsonson y col.(89) cultivaron muestras de mucus cérvico-vaginal extraídas mediante hisopado y posterior siembra en el medio modificado de Sutherland, examinando los cultivos entre los 4 a 10 días de incubación.

Akinboade (3), en Nigeria, empleó el hisopado al examinar genitales de hembras, haciendo un frotis y coloración con dicho material.

11.3 Procesamiento de otros materiales

La eventual presencia de fetos, placenta o líquidos fetales pueden ser excelentes materiales para el diagnóstico, tomando las precauciones del caso, por desconocer la presencia de otra enfermedad infecciosa.

El líquido de abomaso del feto es una excelente muestra para el diagnóstico, o bien el hisopado de sus fauces.

En los casos que se obtenga material de alguna piómetra puede hacerse observación directa o cultivo.

11.4 Examen por microscopía directa

Consiste en extender el material a analizar sobre un portaobjeto y se lo observa bajo microscopía con 80-100 aumentos. La presencia de flagelos y membrana ondulante se efectúa con 300-400 aumentos.

Si bien este método tiene como ventaja su bajo costo y diagnóstico inmediato resulta poco seguro debido a los cambios poblacionales a nivel prepucial y a la concentración de flagelados en la muestra, habilidad del operario, condiciones de temperatura y deshidratación del extendido que restan finalmente movilidad al parásito, fundamental para su visualización (21). Cuando se deben revisar varias muestras, el tiempo empleado en cada una de ellas es largo, siendo poco práctico.

Hammond y Bartlett (57, 58) utilizaron la observación directa en sus trabajos, efectuándola siempre dentro de las 2 horas de extraídas las muestras y suspendidas en solución fisiológica.

Los trabajos de Bartlett y col.(7) permitieron confirmar la baja población de parásitos en cavidad prepucial así como la variabilidad de la misma. Los autores insisten en que la solución fisiológica empleada para recolectar las muestras debería ser al 0,85% para una correcta tensión osmótica; de 800 muestras prepuciales observadas obtuvieron 68,8% de positivas a la observación directa.

Hammond y col. (59), en un estudio poblacional de T. foetus en prepucio sobre 241 muestras encontraron 90% de positivas mediante la observación directa.

Fitzgerald y col.(48) compararon diferentes métodos de muestreo haciendo observación directa y recuento de parásitos en cámaras hemocitométricas.

Laing (68) sugiere el centrifugado de las muestras extraídas mediante lavado prepucial, para luego observar el sedimento entre porta y cubre.

Witherspoon y Walker (124) centrifugan las muestras a 2.000 R.P.M. durante 3 a 5', para observar luego el sedimento bajo microscopía directa.

Roberts y col.(92, 93) efectuaron el centrifugado del material de lavaje prepucial a 2.000 R.P.M. por 15' y examinaron el sedimento por este método.

Ostrowski y col.(85) la utilizaron al evaluar diferentes métodos de muestreo, las muestras fueron centrifugadas a 2.500 R.P.M. durante 5' y luego de eliminar el sobrenadante colocaron el sedimento entre porta y cubre y observando con 100-135 aumentos, recorriendo por cada muestra, 64 campos microscópicos.

La posibilidad de confundir a *T. foetus* con otros protozoos que pudieran existir en muestras prepuciales, especialmente si están contaminadas con heces, es factible.

Los protozoos con los cuales debe diferenciarse son *Bodo foetus*, *Monocercomonas ruminantium*, *Pentatrichomonas* spp., entre otros. Estos se caracterizan por carecer de membrana ondulante, morfología diferente y distinta movilidad y generalmente no desarrollan en los medios de cultivo para *T. foetus* (12, 13, 61).

11.4.1 Comparación entre observación directa y cultivo

Varios autores la han empleado como complemento unido a la siembra en medios de cultivos (6, 30, 84, 104, 113, 115).

Fitzgerald y col.(49) examinaron 152 muestras dentro de la hora de extraídas, mediante centrifugado y observación directa obteniendo 110 muestras positivas, mientras que cuando utilizaban cultivo encontraban 8,1% más de muestras positivas.

Simmons y Laws (101) examinaron un toro infectado durante dos años, mediante observación microscópica directa y cultivo en el medio de Sutherland modificado (112). La eficiencia de cada método por separado fue del 80%, mientras que al emplearlos juntos, el 90% de las muestras eran positivas.

Fitzgerald (50) encontró más eficiente al cultivo que la observación directa de las muestras.

Stoessel (107) confirma una mayor eficiencia empleando el cultivo que con la observación directa.

Stoessel y Haberkorn (109) demostraron la superioridad del cultivo de las muestras frente a la observación directa

directa sola (90% y 70% respectivamente) existiendo diferencias significativas entre cualquiera de los medios empleados y la observación directa.

12.- Medios de transporte

Bartlett y col.(7) muestrearon a toros infectados mediante el método de la pipeta y cada muestra fue puesta en 7 ml de sol. fisiológica al 0,7% y refrigerado entre 4 y 8 hs posteriores a su extracción. Algunas muestras fueron conservadas a 7,2°C durante una noche, para ser luego observadas al otro día en forma directa.

Los autores sostienen que es preferible refrigerar las muestras antes que agregar preservativos para controlar el desarrollo bacteriano y con esta medida sería suficiente para un tiempo máximo de 18 hs.

Posteriormente Bartlett (9) recomendó refrigerar el material que no va a ser observado en forma inmediata.

La protección debe ser extrema por los efectos deletéreos del calor y la desecación, factores que disminuyen la población de flagelados en la muestra inicial.

Fitzgerald y col.(49) efectuaron un estudio sobre la influencia de la temperatura y tiempo de conservación de muestras en la sobrevivencia del flagelado.

Compararon dos formas de transporte de las muestras, a 4°C y a temperatura ambiente. Las mismas fueron extraídas de toros positivos por el método de la ducha, empleando para evaluar los

resultados la observación directa y el cultivo en el medio de Plastridge modificado por los autores.

Refrigeración a 4°C

Nº de muestras	Horas	Cultivo	Observ.Directa
18	12	18	18
20	24	20	8
20	48	17	2

Temperatura Ambiente

Nº de muestras	Horas	Cultivo	Observ.Directa
21	12	19	12
21	24	12	2
20	48	5	0

Quando la forma de conservación fue a temperatura ambiente existió una disminución progresiva de flagelados, lo que fue en detrimento de la observación directa y se necesitó el cultivo para evidenciarlos.

Las muestras refrigeradas tuvieron un mejor porcentaje de recuperación, especialmente cuando se utilizó el cultivo complementario.

Niak (83) evidenció que *T. foetus* puede ser mantenida a temperatura ambiente por varios días empleando el medio de Stuart. Cuando ensayó pruebas de supervivencia a temperatura ambiente los mejores resultados fueron obtenidos con un medio compuesto por:

ágar 0,075%, glucosa 0,25%, peptona 0,2%, extracto de hígado 0,2% y extracto de carne 0,2%. En este medio la supervivencia fue superior a los 9 días a temperatura ambiente. La baja concentración de ágar disminuiría la actividad flagelar y la demanda metabólica sería menor; la adición de glucosa proveería los requisitos energéticos mínimos.

Todorovic y Mc Nutt (117) utilizaron la leche como medio de cultivo a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración inicial y posterior incubación a 37°C. Obtuvieron 31 muestras prepucciales de 5 toros positivos muestreados por el método de la pipeta con los que sembraron 124 medios, tres de ellos a base de leche y los compararon con el medio de Plastridge modificado por los autores. Las muestras se mantuvieron entre 1 y 10 días a temperatura ambiente (22-24°C).

En otro ensayo, empleando 6 toros infectados y muestreados de igual forma les efectuaron 43 muestreos prepucciales. De los mismos fueron sembrados 174 muestras, las que se mantuvieron refrigeradas 24 hs a 3-5°C, para luego ser incubadas a 37°C comparando nuevamente tres tipos de medios a base de leche con el medio de Plastridge modificado, mientras que 124 muestras de 5 toros quedaron a temperatura ambiente.

Medios	% Cultivo a temp. ambiente (22-24°C)	% Refrigeración por 24 hs a 3-5°C y cultivo poste- rior a 37°C
Leche cruda	54,7%	41,6%
Leche homogeneizada	48,3%	45,3%
Leche en polvo	67,6%	58,6%
Plastridge modificado (control)	76,5%	68,8%

De los tres medios a base de leche empleados, el que mejor comportamiento tuvo fue el de la leche en polvo, para ambas condiciones de transporte el medio Plastridge modificado fue el superior de todos.

Stoessel (107) mencionó el empleo del medio Trichomonas OXOID, el cual una vez sembrado es factible dejarlo hasta 72 hs sin colocarlo en estufa; manteniéndolo refrigerado a 5°C, fueron obtenidos resultados similares comparando con muestras incubadas en forma inmediata.

Guida y col.(53), emplearon el medio de Rieck modificado, conservaron muestras a temperatura ambiente, entre 16 y 25 días después de colectadas.

Denney y col. (41) efectuaron un amplio relevamiento en Australia y utilizaron como medio la solución fisiológica tamponada pH 7,2, enriquecida con suero fetal bovino al 5%, siendo las muestras transportadas a temperatura ambiente, para luego ser sembradas en el medio de Sutherland y col.(112).

Tedesco y col. (115) muestrearon a 3 toros por 33 veces, mediante la aspiración con pipeta y el raspador torneado. Las muestras fueron recogidas en 10 ml de solución peptonada de donde, luego de 10' de reposo, se mojaban tres hisopos de algodón del sedimento así obtenido, los que eran introducidos en el medio de transporte utilizado por Clark y col. (22). Los hisopos eran refrigerados por 24, 48 y 72 hs a 4°C y posteriormente cada uno fue sembrado en el medio semisólido de Sutherland y col.(112). Los resultados obtenidos fueron halagüeños, especialmente con aquellas muestras extraídas mediante raspador, donde la eficiencia fue del 98%, 96% y 89,8% para las mantenidas por 24, 48 y 72 hs respectivamente. Cuando emplearon la aspiración con pipeta los porcentajes

de recuperación para los mismos tiempos de transporte antedichos fueron 98%, 83,3% y 70,8%.

Kimsey y col.(65) ensayaron diferentes medios de transporte y dos temperaturas de mantenimiento; a 4° C y a temperatura ambiente (26°C). Las muestras fueron extraídas según la técnica de la pipeta (20) y colocadas en los medios de Kupferberg, Diamond, solución salina tamponada, solución salina tamponada más 5% de suero fetal bovino y solución de Ringer Lactato. Una alícuota de 1 ml era extraída de cada medio y cultivada con intervalos de 12 hs hasta un máximo de 120 horas. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la temperatura de mantenimiento era de 4°C y los medios de transporte más eficientes fueron Kupferberg, solución de Ringer Lactato y solución salina tamponada enriquecida con suero, no existiendo diferencias, entre estos medios en las primeras 48 horas.

Villa (119) utilizó el medio Trichomonas OXOID el cual fue una vez sembrado mantenido hasta 36 hs a temperatura entre 5 y 25°C para ser luego incubadas las muestras a 37°C, con buenos resultados.

13.- Medios de cultivo

El cultivo de este protozoo en condiciones axénicas se efectúa en diversos medios y los requerimientos mínimos son aportados por substratos variados siendo ellos: una fuente proteica, tales como lisados (tripticasa, triptona, peptona, etc.) un glúcido (maltosa, dextrosa, etc.) una sustancia reductora de la tensión de oxígeno: L. cisteína, thioglicolato, ionagar, etc. y suero de varias especies o yema de huevo; parecería que la presencia del ácido

linoleico sería un factor importante para estimular el crecimiento (76).

Las técnicas de criopreservación en atmósfera de nitrógeno líquido han permitido conservar al parásito en condiciones fisiológicas similares a aislamientos frescos, especialmente empleado para estudios fisiológicos (61).

Plastridge (90) desarrolló un medio de cultivo que fue empleado en Chile por Del Campo y col.(40) y por Ostrowski y col.(84) en nuestro país, con buenos resultados. Este medio fue modificado por Sutherland y col.(112) agregándole suero bovino al 50% inactivado y esterilizado, adicionado de 200 UI Estreptomina y 500 UI Penicilina por ml; el medio lo incubaban a 33°C, haciendo las observaciones luego de 3 días.

Fue usado también por Simmons y Laws (101), Clark (21) describió la preparación del mismo medio, aumentando los niveles de antibióticos (Apéndice 5), y utilizando como temperatura de incubación 37°C.

Dicho medio fue ampliamente usado por diversos autores con muy buenos resultados (20, 24, 26, 28, 44, 45, 67, 88, 89, 104, 115, 118, 125).

Dennett y col. (41) emplearon el medio de Sutherland pero con las siguientes concentraciones de antibióticos: penicilina 800 UI/ml, estreptomina 0,8 mg/ml, polimixina B 160 U/ml, kanamicina 0,32 mg/ml y anfotericina B 0,010 mg/ml.

Fitzgerald y col.(49) efectuaron una modificación al medio de Plastridge e incubaron a 39°C durante 3 a 5 días, obteniendo buenos resultados; esta modificación fue también usada por Johnson (63).

Mylreu (82) empleó un eficiente medio el cual estaba compuesto por tryptosa 1%, dextrosa 2%, ambos en infusión de hígado, suero bovino inactivado al 40%, penicilina 1.000 U/ml y estreptomycinina 1 mg/ml. T. foetus creció en concentraciones de $4-6 \times 10^6$ /ml luego de 2-3 días de cultivo para los aislamientos primarios, los subcultivos se efectuaron cada 14 días.

Diamond (42) basado en los resultados del medio C.P.L.M. (cisteína, peptona, extracto de hígado, maltosa) de Johnson y Trussel (1943) y en el medio S.T.S. de Kupferberg y col.(66) desarrolló un medio que fue ampliamente utilizado.

Marquez y col.(75) obtuvieron con el medio de Diamond una eficiencia del 95% al examinar toros positivos.

Martínez Fernández (76) lo probó con suero al 10%, sin suero y reemplazando el suero por yema de huevo al 10% y 20%. La duración fue mayor cuanto menor era la proporción de yema, por el contrario, la densidad de tricomonas fue mayor cuando el porcentaje de yema aumentaba. Los mejores resultados se obtuvieron con suero al 10% a pH 7 y a 37°C. En estas condiciones T. foetus demuestra una fase inicial de crecimiento retardado de 2 hs, comienza luego el desarrollo dentro de las 4 horas posteriores, para luego duplicarse a intervalos generacionales de 5,3 hs. Esta fase logarítmica se extiende entre 5 y 38 hs. posteriores a la siembra. Dicho autor logró obtener crecimiento en el mismo medio con 10% de suero, pero mantenidos a temperatura ambiente (20°C).

Abbitt y Ball (1) efectuaron una modificación del medio original de Diamond sustituyendo el suero ovino por bovino inactivado, y le agregaron fosfatos para estabilizar el pH a 7,2 - 7,4 , en trabajos posteriores también fue empleado (2).

Fernández y Dutra (47) emplearon como medio líquido amniótico obteniendo buen crecimiento con 48 hs de incubación a 37°C, la supervivencia a temperatura ambiente fue buena hasta 15 días.

Kupferberg y col.(66) desarrollaron un medio con buenos resultados para *T. vaginalis*, el mismo medio lo utilizaron para *T. foetus*, elevando el pH a 7.

Este medio fue empleado también por Kimsey y col.(65), Santos y col.(100) con buenos resultados. Santos y col.(98) lo comparan con una solución de Hanks enriquecida (97) encontrando un mejor desarrollo en el medio de Kupferberg ocurriendo el pico máximo a las 182 hs de incubación con 1.676.250 células/ml.

Lyle y col. (71) emplearon el thioglicolato caldo enriquecido con 10% de suero bovino inactivado, adicionado de antibióticos. Este medio fue usado también por Sledge y col.(103), García y col. (51), Wilson y col.(123), Palladino y col.(87) y es recomendado también por el Comité Americano de Veterinarios Laboratoristas quienes le adicionan además anfotericina B (79).

De Carneri y col.(39) utilizaron el medio llamado C.P.L.M. (cisteína, peptona, extracto de hígado y maltosa) al cual le agregaron como antibióticos cloranfenicol 50 ug/ml, 1 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 1.000 UI/ml de penicilina G potásica.

Roberts y col.(93) emplearon en nuestro país con éxito el *Trichomonas* medio de OXOID (116) (Apéndice 4), al cual le agregaron suero equino o bovino al 10%, incubando por 6 días a 37°C y

haciendo las observaciones microscópicas cada 48 hs.

Stoessel (107) lo usó, junto con la leche descremada, como dos medios de buena eficiencia diagnóstica.

Stoessel y Haberkorn (109) compararon este medio con otros dos a base de diferentes leches descremadas en polvo, no encontrando diferencias con respecto a la sensibilidad diagnóstica, siendo superior al 90% para los tres medios; apareciendo las muestras positivas dentro de las primeras 72 hs de incubación (109, 110). El medio Trichomonas OXOID fue utilizado por otros autores y tiene amplia difusión (6, 30, 55, 110, 119, 120).

De Carli y De Carli (38) emplearon el medio desarrollado por Feinberg y Whittington para *T. vaginalis* y tuvo buen comportamiento para el cultivo in vitro de *T. foetus*. La movilidad de los flagelados se mantuvo hasta 72-84 hs de incubación, su composición es similar al Trichomonas medio OXOID (116).

Este medio fue usado por Benchimol y col.(10) para estudios de ultraestructura de *T. foetus*; los autores le adicionaron suero equino al 10%.

Wosú (126) empleó con buenos resultados el medio 199, utilizado usualmente para cultivos celulares, enriquecido con suero fetal bovino inactivado a 65° 30' y adicionado de antibióticos: Penicilina 800 UI/ml, sulfato de Poliximina B 160 UI/ml, sulfato de estreptomomicina 0,8 mg/ml, kanamicina 0,32 mg/ml y anfotericina B 0,010 mg/ml.

Santos y col.(97) lograron buenos resultados con solución balanceada de Hanks, adicionada de lactoalbúmina al 0,5% y ágar al 0,5% enriquecida con suero bovino al 20% y penicilina G sódica 1000 UI/ml, sulfato de estreptomomicina 500 mcg/ml, fraccionado a razón de 10 ml en tubos de ensayo. Los autores consideran que este

medio es adecuado por ser barato, fácil de preparar y eficiente tanto para el mantenimiento como para el aislamiento de cepas.

Santos y col.(100) utilizaron la solución salina balanceada de Hanks, sembrando en ella 1-2 gotas del sedimento de muestras prepueriales obtenidos por lavaje y efectuaron las lecturas a las 24-48 y 72 hs de incubación.

Los trabajos iniciales de Abelein y Günzler, Andrews y col. Avery y Garlick, Bartlett y col., Diamond, le permitieron a Todorovic y Mc Nutt (117) probar la utilidad de trece medios a base de leche, empleando el medio de Plastridge modificado por ellos, como comparación, el cual era sembrado en primer lugar. Así, trabajando con 7 toros infectados en forma artificial y natural, a los cuales les efectuaron 464 extracciones mediante el método de Hammond y Bartlett (57), de los 1166 muestras cultivadas a 37°C los porcentajes de eficiencia fueron: leche fresca 77,4%, leche homogeneizada 74,8%, leche en polvo 87,1% y medio de Plastridge modificado 92,4%.

Los medios a base de leche fueron fraccionados a razón de 6 ml agregándoles 10.000 UI de penicilina y 10 mg de estreptomicina a cada tubo, en algunos casos emplearon sulfato de polimixina B a razón de 5.000 U por tubo.

En nuestro país, Stoessel (107) usó la leche descremada al 10%, siendo un medio barato y eficiente para el cultivo in vitro de *T. foetus* (Apéndice 6). Sugiere en dicho trabajo, la posibilidad de adicionar el antibiótico a cada frasco con medio de cultivo, a partir de lo que levanta un ansa bacteriológica de 3 mm de diámetro de abertura, de una mezcla que contiene: 1 millón UI de penicilina G sódica, 1 gr sulfato de Estreptomicina y 500.000 UI de Nistatina. Se indicaba inicialmente la incubación a 37°C durante 6 días con observaciones cada 48 hs.

Stoessel y Haberkorn (109) compararon la eficiencia de dos medios de cultivo a base de leche en polvo descremada al 10% enriquecidas con suero equino al 10% y antibióticos con respecto al Trichomona Medio OXOID, siendo los resultados satisfactorios para los tres medios.

Los medios a base de leche descremada dan una imagen más opaca al microscopio, la misma no dificulta la observación. La leche debe ser descremada para que no interfieran los glóbulos de grasa en la visualización microscópica.

Entre las 24 y 48 horas de producirse el máximo de crecimiento muchos medios coagulan y se cortan, pero ésto no puede tomarse como índice de crecimiento, pues la contaminación bacteriana también produce el mismo efecto.

Por la practicidad, eficacia y bajo costo, este medio se usa ampliamente en nuestro país (30, 55, 56, 85, 104).

Martínez Fernández (76) mencionó la posibilidad de reemplazar el suero equino o bovino por yema de huevo en similares porcentuales.

14.- Tratamiento

Considerando los mecanismos autoinmune que se producen en la hembra los tratamientos se han orientado hacia el macho, por sus características epizootiológicas y la carencia de formación de inmunidad para esta enfermedad.

Inicialmente se utilizó la vía local, pero la misma además de impráctica demostró ser poco segura y con ciertos riesgos debido a las lesiones dejadas sobre pene y prepucio con algunas drogas.

La vía sistémica es la más utilizada, existiendo abundante experiencia en el empleo de los 5 nitroimidazoles. Se basan en la capacidad de los anaerobios para reducir los grupos nitro por ferredoxina y flavodoxina, productos reducidos que se comportan como citotóxicos, siendo uno de los más empleados el Dimetridazole (76). Esta droga fue usada por la vía oral bajo la forma de bolos a la dosis de 50 mg/kg durante 5 días seguidos con eficacia probada por varios autores (13, 30, 106, 107). La eficiencia de la droga no es absoluta, por ello se han efectuado reiteradas recomendaciones, entre otras, las de hacer controles post-tratamiento (13, 107).

El advenimiento de las sales de Dimetridazole (metano-sulfonato y clorhidrato) permitió su utilización por la vía subcutánea e intramuscular con probada eficacia (108). Una serie de factores han hecho que esta eficiencia haya disminuído a lo largo de los años, los mismos fueron enunciados por Villar y col.(121) quienes alertan sobre la presencia de cepas de *T. foetus* quimioresistentes.

Estas consideraciones actualizan un concepto vertido por Bartlett (9) hace más de tres décadas "aquellos toros infectados que no superen al menos tres veces su valor en carne deberán ser faenados".

15.- Control

Los principios teóricos fueron expresados por Stoessel (107) y Briano y col.(13); pudiéndose insistir en:

El empleo de la inseminación artificial será el sistema de elección para erradicar esta enfermedad venérea, aunque las condiciones de nuestros establecimientos de cría no la hacen adoptable en forma masiva por razones de infraestructura y económicas.

En los rodeos con servicio natural se basa en el estacionamiento del servicio, con un tacto posterior al mismo; las vacas vacías deberían apartarse y tener como destino final la venta a faena.

Toda vaca dada como preñada al tacto, que no tenga su ternero al pie, finalizada la parición debería ser eliminada. El riesgo de existir una vaca portadora que lleve su preñez a término pese a alojar T. foetus, si bien es bajo, podría eliminarse mediante un reposo sexual de 90 días post parto, lo que altera totalmente el manejo de un servicio estacionado dificultando la coincidencia de requerimientos nutricionales con la disponibilidad forrajera.

El hecho de manejarse en el mismo establecimiento con dos rodeos: uno limpio y otro sucio, hacen demasiado riesgoso e inseguro este método, pues una mezcla de vientres o toros es muy factible en las condiciones extensivas de nuestra ganadería aunque en determinadas circunstancias puede ser útil (12, 13, 14).

Si se introducen vaquillonas o vacas vacías, a un rodeo deberían tener un descanso sexual mínimo de 5 meses a los fines de asegurar el proceso autoinmune.

Los toros deberán controlarse mediante diagnóstico individual evaluando la posibilidad de tratamiento en base a costos, antecedentes de quimioresistencia y tiempo disponible, teniendo la seguridad de que a todo toro que se medique deberá efectuarse cuatro controles post tratamientos para constatar la eficacia terapéutica.

Otras consideraciones de importancia son:

- No efectuar tratamientos masivos pues se medican hasta un 75% de toros inutilmente (122).
- No rotar los toros en servicio.
- Emplear toros jóvenes, libres de infección (2 años)
- Reemplazar los toros luego de 3 años de servicio.
- Efectuar 4 controles post tratamientos para considerar a un toro libre de infección.
- Enviar los toros positivos con destino exclusivo a faena.
- Controlar el ingreso de los toros haciendo las revisiones correspondientes.
- Asegurar el buen estado de los alambrados para evitar los servicios por robos.
- Educar al personal del establecimiento sobre la importancia del control de esta enfermedad.

TRABAJO EXPERIMENTAL

La carencia de laboratorios oficiales o privados ubicados a una distancia accesible para procesar en forma adecuada los diversos materiales empleados en el diagnóstico de la Trichomoniasis bovina constituye un factor limitante.

Las circunstancias económicas que han motivado el desplazamiento de las áreas de cría a zonas marginales agrava aún más el problema diagnóstico. La escasa sobrevivencia de *T. foetus* fuera de su medio natural obliga a que se deban extremar los cuidados para que las muestras sean útiles a los fines diagnósticos.

Los plazos críticos con los cuales una muestra debe ser procesada con éxito son exiguos si se consideran las distancias a recorrer para llegar a los centros de diagnóstico.

Todas estas circunstancias perjudican e interfieren con el aislamiento de *T. foetus* y lo tornan dificultoso en nuestras condiciones de campo.

Una de las formas de contribuir a solucionar este problema es mediante el empleo de medios de transporte, los que además de eficientes, deben ser de fácil preparación y bajo costo.

Un mejor control de estos aspectos facilitaría el diagnóstico posterior de la enfermedad.

OBJETIVOS

- 1) Establecer los niveles de recuperación de T. foetus en toros infectados mediante la utilización de cuatro medios de transporte conservados a 4°C durante 24 y 48 hs.
- 2) Evaluar los medios Kupferberg y Leche Descremada, ya sea como medios de transporte o como medios de cultivos.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Se emplearon dos grupos de seis toros cada uno. El primer grupo (I) estaba formado por 5 toros de raza Aberdeen Angus y un toro de raza Hereford infectados con T. foetus var. Belfast en forma artificial; las edades oscilaron entre 5 y 10 años:

El segundo grupo (II) estaba compuesto por toros de raza Aberdeen Angus infectados en forma natural con T. foetus var. Belfast; las edades variaron entre 3 y 6 años.

Ambos grupos fueron identificados mediante numeración a fuego. Los animales permanecieron en dos potreros de 10 has. de pastura cultivada, uno por cada grupo dentro de la Reserva Nº 5 de INTA EERA Balcarce, distante a 4 km de los laboratorios donde se procesaron las muestras.

1.2. Infección artificial de los toros

Los animales del grupo (I) fueron infectados en forma artificial mediante el empleo de una cepa de T. foetus var. Belfast proveniente de un toro con infección natural.

Dicha cepa fue cultivada en el medio Trichomona Oxoid (Apéndice 4) y subcultivada por dos veces consecutivas en dicho medio para su purificación. Conseguido ello, se efectuó un cultivo madre en el mismo medio incubado durante tres días a 37°C. Se efectuó recuento de flagelados empleando la cámara de Neubauer, siguiendo la metodología descrita por Palladino y col. (86). El inóculo fue estandarizado a razón de 2×10^6 células de T. foetus viable por ml. de medio, empleando 20 ml del mismo para cada toro. Dicho cultivo fue introducido en la cavidad prepucial mediante el empleo de pipeta de inseminación artificial y jeringa, efectuando masajes en ser-

tido ántero-posterior durante 3 minutos por animal.

A los 10 días posteriores de esta descarga inicial se hicieron otras dos inoculaciones con 10 días de intervalo entre sí. En las dos oportunidades se utilizaron volúmenes de 3 ml por toro de un cultivo de 72 hs. de T. foetus conteniendo 5×10^6 /ml. células viables en el medio de Sutherland descrito por Clark (Apéndice 5). Dicho inóculo fue introducido y manipulado en forma similar a lo ya expuesto.

Las cepas empleadas (T. foetus var. Belfast) fueron obtenidas siempre del mismo toro dador infectado en forma natural, efectuando un primoaislamiento y dos subcultivos posteriores, para su purificación, en el mismo medio que el utilizado para la inoculación.

La infección artificial fue confirmada a los 10 días posteriores de la última descarga intraprepucial empleando para ello la técnica de la ducha con solución fisiológica tamponada y cultivo en leche descremada (Apéndice 1, 2) descrito por Stoessel y Haberkorn (109).

La totalidad de los seis toros del grupo (I) resultaron infectados luego de dicho control.

1.3. Método de muestreo

1.3.1. Contención de los animales

Los toros fueron encerrados en la manga momentos previos al muestreo, efectuando la contención mediante el uso del cepo (Fotografía N° 1), sin empleo del apreta vacío.

Se trabajó del lado izquierdo de los animales (Fotografía N° 2) sin higiene previa de la abertura prepucial y con la única precaución de cortar los pelos que rodean dicha abertura (Fotografía N° 3).

1.3.2. Técnica

Se utilizó el método del raspador torneado empleando un instrumento de bronce* de 59 cm de largo por 0,5 cm de espesor, presentando en la parte anterior un cilindro de 6,5 cm x 1 cm compuesto por 28 ranuras circulares de 3 mm de profundidad (Fotografía N° 4).

El instrumento fue introducido en la cavidad prepucial mientras que con una mano se lo palpaba a través de la piel verificando que el extremo anterior del raspador contactara con el glande del pene (Fotografías N° 5 y 6). Se efectuaron 10 movimientos en sentido ántero posterior en la cavidad prepucial y posteriormente el aparato fue extraído y enjuagado mediante rotación para desprender el esmegma recolectado en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml. del medio de transporte correspondiente. Luego el raspador se introdujo en un balde conteniendo agua para su limpieza y posteriormente se esterilizó a la llama directa de un mechero a gas durante 2'. Para ello el instrumento fue colocado en forma vertical para que el calor actuara no solamente en la parte anterior activa sino también en el resto del raspador, (Fotografía N° 7). Posteriormente se enfrió introduciéndolo en una probeta conteniendo solución fisiológica tamponada (Fotografías N° 8 y 9).

Esta maniobra fue realizada en 4 oportunidades para cada toro en cada muestreo.

1.3.3. Frecuencias de muestreos

Los grupos de toros I y II se muestrearon en forma alternada con una semana de intervalo entre sí, durante 6 oportunidades para cada uno. De esta forma transcurrían dos semanas para que el mismo grupo de toros fuera nuevamente muestreado.

* Siluform, Angel J. Carranza 999, Buenos Aires.

1.4. Medios de Transporte

Se emplearon cuatro diferentes medios de transporte los que se envasaron estérilmente en volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo de 160 x 10 mm tapados con tapón de goma estéril (Fotografía N° 10).

1.4.1. Solución fisiológica tamponada (Medio de Transporte A)

El mismo estaba constituido por solución fisiológica tamponada estéril (Apéndice 2), con pH 7,4 y adicionada de suero fetal bovino estéril al 9% (65).

1.4.2. Solución Ringer Lactato (Medio de Transporte B)

Se utilizó una solución comercial estéril* cuyo pH era controlado a 7,4 (Apéndice 3) (65, 69).

1.4.3. Leche descremada (Medio de Transporte C)

Se la preparó según figura en Apéndice 6.

1.4.4. Medio Kupferberg Bacto Trichomona base (Medio de Transporte D)

Se preparó según figura en el Apéndice 7.

1.5. Secuencia de Medio de Transporte utilizado por muestreo

La cantidad de esmegma prepucial recolectado durante el muestreo es más abundante para la primera extracción del raspador, lo que implica la posibilidad de mayor cantidad de T. Foetus en dicho material. Esto beneficiaría aquel medio de transporte que recibe a dicha muestra, por lo que se decidió cambiar el orden del medio de transporte empleado en primer lugar en cada muestreo. De esta forma todos los medios de transportes tendrían las mismas oportunidades a lo largo de la totalidad del trabajo. (Ver esquema adjunto).

* Laboratorio Roux-Ocefa.

Grupo de Toros	Nº de muestreos	1	2	3	4	5	6
I	Orden del trans. empleado	ABCD	BCDA	CDAB	DABC	ABCD	BCDA
II		DABC	CDAB	BCDA	ABCD	DABC	CDAB

Se efectuaron así un total de 12 muestras con una semana de intervalo. En todos los casos se anotaba el estado de los corrales con respecto a presencia de tierra, barro, heces, etc.

El proceso del muestreo se efectuaba en un tiempo de 30 minutos. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio inmediatamente de extraídas, siendo transportadas en una conservadora de telgopor a temperatura ambiente.

1.6. Medios de cultivos

Se utilizaron tres medios fraccionados estérilmente en volúmenes de 4 ml en envases de tapa a rosca de 7 ml de capacidad correctamente identificados.

1.6.1. Medio Thioglicolato

Se utilizó el medio comercial Oxoid, cuya composición figura en el Apéndice B (Fotografía Nº 11).

1.6.2. Leche descremada

Su preparación es similar a la expuesta en el punto 1.4.3. (Fotografía Nº 12).

1.6.3. Medio Kupferberg Bacto Trichomona base

Fue descrito en 1.4.4. (Fotografía Nº 13).

Se utilizó el medio comercial Difco.

1.6.4. Sueros

72.-

Los sueros de feto, bovino y equino empleados tanto para enriquecer medios de cultivo como medios de transporte fueron filtrados a través de membranas filtrantes Seitz grado 53 tipo L6 de 0,22 μ de poro. La inactivación se hizo calentando a Baño María, a 56°C durante 30'.

1.6.5. Antibióticos

Los antibióticos empleados en los medios de cultivos fueron pesados en una balanza electrónica Mettler H20 y agregados a los mismos en las cantidades especificadas para cada caso*.

1.7. Temperatura y tiempos de transporte

Las muestras una vez en el laboratorio eran puestas inmediatamente a refrigeración a 4°C. Los plazos de tiempo que se emplearon como transporte fueron de 24 y 48 hs. a dicha temperatura.

1.8. Técnica de siembra

Cumplidas las 24 hs. de refrigeración las muestras se colocaron en tubos de vidrio cónicos estériles de 15 ml de capacidad, centrifugándose a 2.500 R.P.M. durante 15'. Se extrajo 0,5 ml del sedimento del medio de transporte mediante pipeta estéril de 1 ml. Este inóculo fue sembrado en cada medio de cultivo por duplicado. El remanente del medio de transporte fue colocado nuevamente en el tubo de ensayo original para ser refrigerado nuevamente 24 hs. y repetir similar procedimiento de siembra al cumplirse las 48 hs. de transporte refrigerado (Fotografía N° 14).

Todos los medios de transporte (A-B-C-D) fueron sembrados en medio Thioglicolato. Las muestras recolectadas en los medios de transporte C y D fueron además sembradas en sus respectivos medios

* Penicilina G. Sódica 1.000.000 U.I. Squibb, Estreptomycin Lepetit por 1 gr y Nystatin Sigma Chemical Company.

de cultivo por duplicado (leche descremada para C y medio Kupferberg para D).

De esta forma cada muestreo de un toro fue sembrado en 16 medios thioglicolato, 4 medios de leche descremada y 4 medios Bacto Kupferberg. Esto hacía un total de 144 muestras sembradas para los 6 toros muestreados por semana (ver a continuación Esquema de siembra para un toro).

Tiempo de refrigeración a 4 ° C	Medios de Transporte			
	A	B	C	D
24 hs.	2 MTh	2 MTh	2 MTh 2 MLD	2 MTh 2 MK
48 hs	2 MTh	2 MTh	2 MTh 2 MLD	2 MTh 2 MK
TOTAL	4	4	8	8

MTh : Medio Thioglicolato.

MLD Medio leche descremada.

MK : Medio Kupferberg.

1.9. Observación de los cultivos

Una vez sembradas las muestras, los cultivos fueron incubados a 37°C en aerobiosis durante 8 días. En dicho lapso se efectuó una lectura diaria mediante la extracción de un anse del medio de cultivo previamente homogeneizado. La abertura del anse empleada fue de 2 mm de diámetro. El material recogido fue extendido sobre una superficie de 0,5 cm en un portaobjeto realizando la observación mediante un microscopio de contraste de fase con 100 aumentos. Cuando un cultivo resultó negativo se estandarizó el tiempo de observación en 1 mi-

nuto . La confirmación de *T. foetus* se efectuó mediante la observación de la membrana ondulante y los flagelos con lente microscópica de 1000 aumentos (Fotografía N° 15).

Para evaluar la intensidad del desarrollo de *T. foetus* en los diferentes medios de cultivo se utilizó una escala subjetiva del cero al 4 que era equivalente a porcentajes de protozoos estimados por campo microscópico del 0- 25 - 50 - 75 y 100 % (Fotografía N° 16).

Se efectuaron así 13.824 observaciones microscópicas de los 1.728 medios de cultivos sembrados durante los 12 muestreos realizados.

1.10. Método Estadístico

La totalidad de las observaciones microscópicas de los respectivos cultivos fueron evaluadas según lo expuesto en 1.9 y dichos datos se codificaron y tabularon. Esta información fue procesada mediante el empleo de una computadora marca Digital modelo PDP 8/E con que cuenta la Estación Experimental del INTA Balcarce. Los resultados obtenidos de este procesamiento fueron analizados estadísticamente mediante el método del "Ji cuadrado" (29).

RESULTADOS

1.- Análisis total de datos para 24 y 48 hs de transporte refrigerado.

La totalidad de los 1728 medios de cultivos sembrados correspondieron a 1152 medios Thioglicolatos, 288 medios de leche descremada y 288 medios Kupferberg, los que al ser observados durante 8 días totalizaron 13824 observaciones microscópicas.

El análisis del total de los cultivos para cada día de incubación considerando los plazos de 24 y 48 hs de transporte refrigerado se observa en la tabla siguiente:

TABLA N° 1: Número y porcentaje () de observaciones de cultivos positivos para todos los Medios de Transporte según tiempos de refrigeración y días de observación.

Tiempos de refrigeración a 4°C.	1	2	3	4	5	6	7	8	\bar{X}
24 hs	308 (35,6) a	517 (59,8) c	608 (70,3) bc	636 (73,6) b	583 (67,4) bc	454 (52,5)	345 (39,9) ad	247 (28,5) ae	(53,50)
48 hs	105 (12,1)	300 (34,7) a	449 (51,9) b	496 (57,4) bc	482 (55,7) bcd	415 (48) bod	332 (38,4) ae	243 (28,1) af	(40,83)

P \leq 0.05; letras iguales no difieren estadísticamente, leer en sentido horizontal.

n = 864 cultivos para cada uno de los plazos de refrigeración.

El mayor número de cultivos positivos se obtuvo en los días 3, 4 y 5 para las muestras previamente refrigeradas en transporte por 24 hs, aunque las diferencias no fueron significativas. Cuando el transporte fue de 48 hs los días de mayor número de cultivos positivos correspondieron a 3, 4, 5 y 6, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos; aunque el día 4 fue el de mayor número de observaciones positivas.

El promedio de cultivos positivos para las muestras con 24 hs de transporte fue de 53,50% y 40,83% para las 48 hs, siendo las diferencias significativas ($P < 0.05$). Los porcentuales fueron menores para todos los días de incubación cuando el transporte de los medios se hizo por 48 hs.

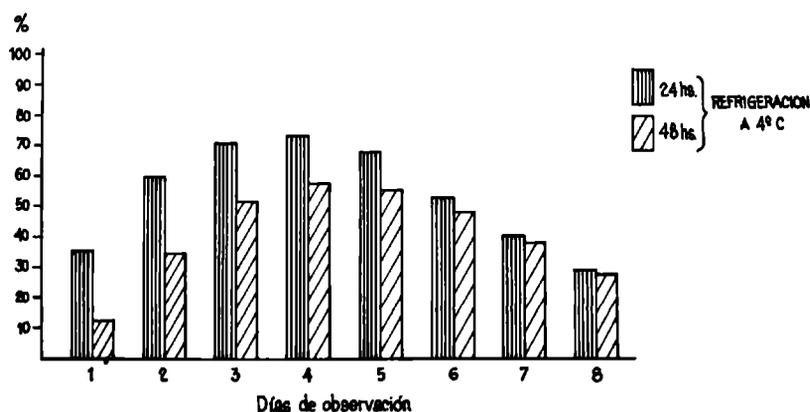
Análisis de Ji cuadrado de los datos de la Tabla N° 1

() Fuente de variación	Grados de libertad	Valor Ji cuadrado
Factor 1	1	117,70*
Factor 2	7	626,68*
Interacción 1 x 2	7	60,32*

* $P < 0.05$. Total general de datos 13824; total general de positivos 6520.

(*) Las fuentes variaron según las combinaciones empleadas para cada caso siendo los días de incubación, plazos de refrigeración o medios de transporte y cultivos y las diferentes interacciones entre sí.

Gráfico Nº1 - PORCENTAJE DE OBSERVACIONES DE CULTIVOS POSITIVOS PARA TODOS LOS MEDIOS DE TRANSPORTE EN DOS PLAZOS DE REFRIGERACION SEGUN DIAS DE OBSERVACION.



El Gráfico 1 permite apreciar las diferencias entre los plazos de refrigeración y la evolución de los cultivos según los días de incubación.

2.- Comparación de los cuatro Medios de Transporte evaluados en medio Thioglicolato.

Cada uno de los cuatro medios de transporte (A, B, C, D) refrigerados a 4°C durante 24 y 48 hs, fueron sembrados en 144 medios Thioglicolatos y se incubaron durante 8 días, lo que hizo un total de 1152 observaciones para cada medio de transporte y en cada plazo de refrigeración (24 y 48 hs). Al analizar los promedios de las observaciones positivas para los cuatro medios de transporte, se obtuvo 50,53% para el período de 24 hs de refrigeración y 36% cuando el mismo fue de 48 hs, siendo ambas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

La Tabla N° 2 muestra el total de observaciones positivas de los cuatro medios de transporte, evaluadas según el medio Thioglicolato.

TABLA N° 2: Comparación de cuatro Medios de Transporte (A, B, C, D) refrigerados por 24 y 48 hs a 4°C, evaluados según número y porcentaje () del total de observaciones microscópicas positivas en medio Thioglicolato durante 8 días.

Medios de Transporte.	Tiempo de refrigeración a 4°C	
	24 hs	48 hs
A	505 (43,84)	390 (33,85)
B	479 (41,58)	184 (15,97)
C	680 (59,03)	572 (49,65)
D	655 (56,86)	513 (44,53)
$\bar{X} =$	(50,33)	(36)

$P < 0.05$; $n = 1152$ observaciones para cada Medio de Transporte y en cada plazo de refrigeración.

Las diferencias fueron significativas entre cada Medio de Transporte y en los dos plazos de tiempos ($P < 0.05$).

De la misma surge que el medio de transporte leche descremada (C) fue el más eficiente para los dos plazos de refrigeración, siguiéndole luego el transporte en medio Kuperferberg (D); luego la solución fisiológica tamponada (A), siendo la solución Ringer lactato (B) el de menor eficiencia, especialmente al emplearlo como transporte durante 48 hs.

En la Tabla N° 3 se observa la distribución de muestras positivas para cada transporte, con 24 hs de refrigeración, según días de observación.

TABLA N° 3: Comparación entre Medios de Transporte (A, B, C, D) refrigerados por 24 hs a 4°C, expresados como observaciones positivas en medio Thioglicolato.

Medios de Transporte.	Días de observación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	51 ab	83 a	90 ab	91 ab	77 a	56 a	33 a	24 a
B	34 a	59	80 a	87 a	78 a	65 a	47 ab	29 a
C	69 b	102 a	117 b	124 c	112 b	73 a	51 b	32 a
D	59 b	99 a	112 b	118 bc	109 b	73 a	50 ab	35 a

$P < 0.05$; letras iguales no difieren estadísticamente, leer en sentido vertical.

n = 144 cultivos para cada uno de los Medios de Transporte

Así en el primer día de lectura los medios de transporte A y B no difieren entre sí como tampoco D, C y A. El cuarto día correspondió al de mayor número de cultivos positivos para todos los transportes, mientras que al 8° día todos los transportes llegaron con un número de cultivos positivos similar y no significativo.

La Tabla N° 4 permite ver los resultados de cultivos positivos con 48 hs de transporte refrigerado. Se observa un comportamiento similar entre los medios de transporte C y D, los que no difieren entre sí en ninguno de los 8 días. Nuevamente el cuarto día fue el de mayor número de cultivos positivos para los cuatro medios de transporte. El medio B difiere de todos los demás hasta

el 6º día inclusive. ($P \leq 0.05$)

TABLA N° 4: Comparación entre Medios de Transporte (A, B, C, D) refrigerados por 48 hs a 4°C, expresados como observaciones positivas en medio Thioglicolato.

Medios de Transporte.	Días de observación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	24 a	44 a	69 a	75 a	69 a	53 a	35 a	21 a
B	2	16	31	36	34	27	23 a	15 a
C	19 a	66 b	96 b	102 b	100 b	83 b	62 b	44 b
D	29 a	58 ab	82 ab	91 ab	87 ab	73 ab	56 b	37 b

$P \leq 0.05$ letras iguales no difieren estadísticamente, leer en sentido vertical.

n = 144 cultivos para cada uno de los Medios de Transporte.

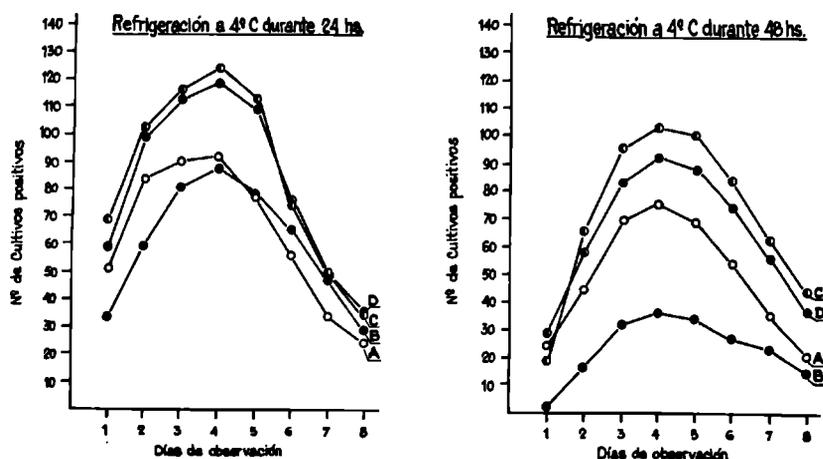
Análisis por Ji cuadrado de las Tablas Nos. 2, 3 y 4.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor Ji cuadrado
Factor 1	3	215,72*
Factor 2	1	108,83*
Interacción 1 x 2	3	22,74*
Factor 3	7	487,94*
Interacción 1 x 3	21	31,77
Interacción 2 x 3	7	52,73*

* $P < 0.05$ total general de datos 9216, total general de cultivos positivos 3978.

Los datos de las Tablas Nos. 3 y 4 se graficaron, lo que permite apreciar la mayor eficiencia del Medio de Transporte C en ambos plazos de transporte. La tendencia de todos los cultivos fue similar para cada transporte, dando curvas con pico más marcado para el plazo de 24 hs, correspondiendo al mayor número de cultivos positivos.

Gráfico Nº 2 - MEDIOS DE TRANSPORTES (A-B-C-D) REFRIGERADOS POR 24 hs. y 48 hs., CULTIVADOS EN MEDIO THIOGLICOLATO, EXPRESADOS COMO CULTIVOS POSITIVOS DURANTE 8 DIAS DE OBSERVACIONES.



3.- Medio de Transporte Leche Descremada (C) sembrado en medio leche descremada y en medio Thioglicolato.

Quando el medio de transporte C (Leche Descremada) fue sembrado en el medio leche descremada se obtuvieron los datos consignados en la Tabla N° 5, los que incluyen también el tipo de desarrollo obtenido.

Si bien no existieron diferencias significativas entre los cultivos positivos de los días 2, 3, 4, 5, 6 y 7 para muestras transportadas durante 24 hs correspondió al cuarto día el de mayor número de cultivos positivos. Quando el transporte fue de 48 hs el número de cultivos positivos no tuvo diferencias entre los días 3, 4, 5, 6 y 7, aunque los días 4 y 5 tuvieron el mayor número. (P > 0.05).

La intensidad de crecimiento 100 (+++) fue máxima en el 4° día para ambos plazos de transporte, siguiéndole el quinto día de observación.

**TABLA N°5: Medio de Transporte "C" refrigerado por 24 y 48 hs a 4°C evaluado en el medio leche des-
 cremada según número de cultivos positivos e intensidad de desarrollo en 8 días de obser-
 vación.**

Intensidad de desarrollo.	Días de observación y plazos de refrigeración																	
	1	2	3	4	5	6	7	8										
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48						
(+)	64	17	79	68	51	50	23	31	27	29	33	31	44	36	40	46		
(++)	—	—	26	5	23	42	26	36	14	31	22	24	24	24	25	27	10	
(+++)	—	—	6	—	41	12	35	28	34	33	31	34	22	24	12	16		
(++++)	—	—	—	—	12	—	46	18	49	20	28	19	13	13	2	9		
Total cultivos positivos.	64	17	111	73	127	104	130	113	124	113	114	108	103	98	81	81	81	ef
	c	a	a	e	a	df	a	d	a	d	a	d	ab	de	bc	bc	ef	

(+) \angle 25%; (++) \angle 50%; (+++) \angle 75%; (++++) 100%

n = 144 cultivos para 24 y 48 hs

P \angle 0.05 letras iguales no difieren estadísticamente; se compararon los datos de 24 hs entre sí y 48 hs de igual forma.

Al emplear el Medio de Transporte "C" sembrado en el medio Thioglicolato los datos obtenidos así como los diferentes tipos de desarrollo se expresan en la Tabla N° 6.

TABLA N° 6: Medio de Transporte "C" refrigerado por 24 y 48 hs a 4°C evaluado en Medio Thioglicolato según número de cultivos positivos e intensidad de desarrollo en 8 días de observación.

Intensidad de desarrollo.	Días de observación y plazos de refrigeración															
	1	2	3	4	5	6	7	8								
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48				
(+)	69	19	65	59	37	51	35	29	57	36	41	41	31	32	18	31
(++)	--	--	26	7	24	15	20	28	18	27	13	16	11	10	9	2
(+++)	--	--	11	--	39	22	23	20	18	18	14	13	6	14	5	9
(++++)	--	--	--	--	17	8	46	25	19	19	5	13	3	6	--	2
Total cultivos positivos.	69	19	102	66	117	96	124	102	112	100	73	83	51	62	32	44
	l	~	k	k	k	m	k	m	k	m	l	mn	no	no	o	o

(+) \angle 25%; (++) \angle 50%; (+++) \angle 75%; (++++) \angle 100%

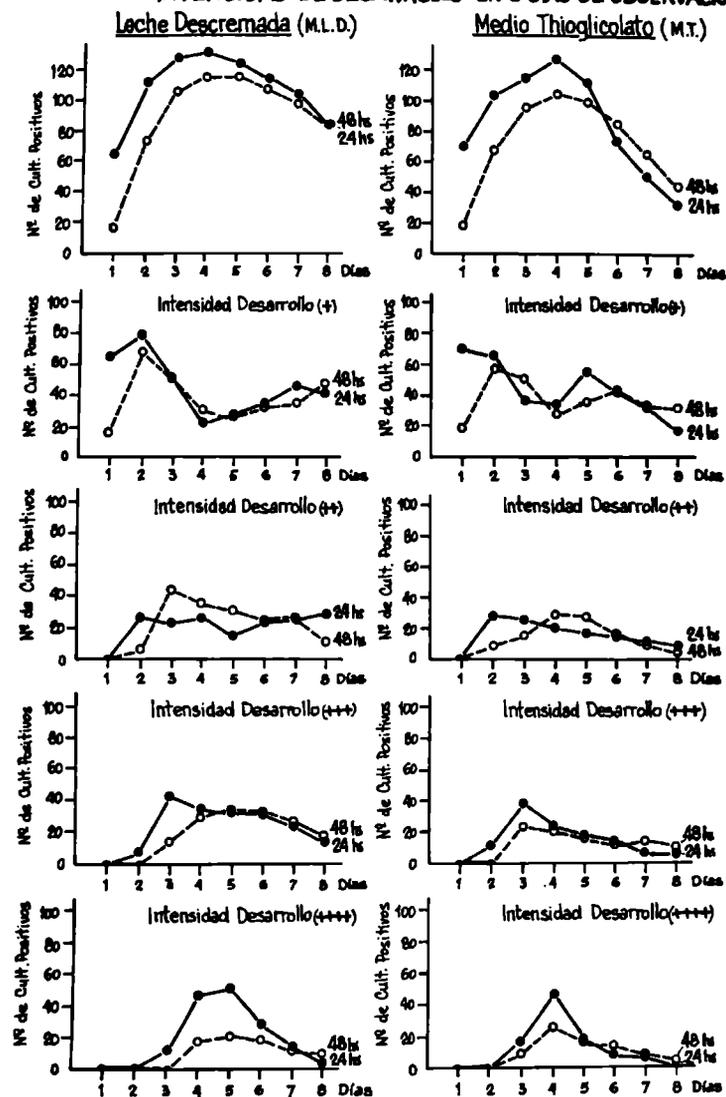
n = 144 cultivos para 24 y 48 hs.

P \angle 0.05 letras iguales no difieren estadísticamente; se compararon los datos de 24 hs entre sí y 48 hs de igual forma.

El número de cultivos positivos fue máximo en el día 4º, sin embargo no existieron diferencias significativas entre los días 2, 3, 4 y 5 para muestras transportadas durante 24 hs; cuando el transporte fue de 48 hs tampoco existieron diferencias significativas entre los días 3, 4, 5 y 6 ($P > 0.05$).

El Gráfico N° 3 permite apreciar el comportamiento del Medio de Transporte leche descremada (C) evaluado en los dos medios de cultivos utilizados. En la parte superior se aprecia el total de cultivos positivos para cada medio de cultivo, notando un mayor número en el medio leche descremada para ambos plazos de refrigeración. La intensidad de desarrollo varía en cada medio, pero es marcada la mayor permanencia de los cultivos con (+++) y (++++) en los plazos de 24 hs para la leche descremada. El medio Thioglicolato en la máxima intensidad (++++) hace una curva en pico y luego cae por agotarse mucho más rápidamente.

Gráfico N°3- MEDIO DE TRANSPORTE 'C' REFRIGERADO POR 24 y 48 hs. A 4° C EVALUADO EN DOS MEDIOS DE CULTIVOS (MLD y M.T.) SEGUN NUMERO DE CULTIVOS POSITIVOS E INTENSIDAD DE DESARROLLO EN 8 DIAS DE OBSERVACION



Los cultivos con intensidad de desarrollo 100 fueron máximos en el día 4º de incubación.

Al comparar el total de cultivos del Medio de Transporte C sembrado en medio leche descremada con respecto al sembrado en el medio Thioglicolato, para cada día de observación y tiempo de transporte, sólo se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los días 6, 7 y 8 con transporte de 24 hs, mientras que al emplear 48 hs de transporte las diferencias fueron significativas los días 7 y 8 de observación ($P \leq 0.05$).

Al analizar la totalidad de las observaciones positivas, el Medio de Transporte leche descremada (C) fue significativamente más eficiente al ser sembrado en el medio leche descremada que en medio Thioglicolato para los dos plazos de transporte. Así se obtuvieron 1561 observaciones positivas (67,75%) para el Transporte C cultivado en leche descremada contra 1252 observaciones positivas del medio Thioglicolato (54,34%) de un total de 2304 observaciones hechas para los dos plazos de transporte ($P \leq 0.05$).

Análisis por Ji cuadrado de los datos de las Tablas Nos. 5 y 6,

Fuente de variación	Grado de libertad	Valor Ji cuadrado
Factor 1	1	33,94*
Factor 2	1	23,12*
Interacción 1 x 2	1	0,54
Factor 3	7	227,99*
Interacción 1 x 3	7	25,89*
Interacción 2 x 3	7	31,11*

* $P \leq 0.05$ total general de datos:4608; total general positivos 2813.

4.- Medio de Transporte Kupferberg (D) sembrado en medio Kupferberg y en medio Thioglicolato.

El Medio de Transporte D al ser cultivado en el medio de Kupferberg arrojó los resultados que se aprecian en la Tabla N° 7.

TABLA N° 7: Medio de Transporte "D" refrigerado por 24 y 48 hs a 4°C evaluado en el medio Kupferberg según número de cultivos positivos e intensidad de desarrollo en 8 días de observación.

Intensidad de desarrollo.	Días de observación y plazos de refrigeración															
	1	2	3	4	5	6	7	8								
24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48					
(+)	31	13	59	37	71	59	69	70	64	69	59	60	54	48	40	37
(++)	--	--	4	4	10	6	10	7	12	6	7	8	4	8	5	8
(+++)	--	--	--	1	1	2	5	--	7	4	5	1	3	1	1	--
(++++)	--	--	--	--	--	--	2	1	--	--	2	2	--	--	--	--
Total cultivos positivos.	31	13	63	42	82	67	86	78	83	79	73	71	61	57	46	45
	d	abc	abc	f	ab	e	a	e	ab	e	a	e	bc	ef	cd	f

(+) \angle 25%; (++) \angle 50%; (+++) \angle 75%; (++++) 100%

n = 144 cultivos para 24-48 hs

P \angle 0.05 letras iguales no difieren estadísticamente, se compararon los datos de 24 hs entre sí y 48 hs de igual forma.

Los días de mayor número de observaciones positivas para 24 hs de transporte correspondieron al 2, 3, 4, 5 y 6, siendo el 4º día el de mayor número, aunque las diferencias entre dichos días no fueron significativas. Cuando el tiempo de transporte fue de 48 hs los días de mayor número de positivos fueron el 3, 4, 5, 6 y 7 sin existir diferencias entre ellos, aunque el 5º día fue el de superior número de positivos ($P > 0.05$).

La intensidad de crecimiento se caracterizó por ser pocos los cultivos con 50% o más de desarrollo y sólo dos cultivos llegaron al máximo de crecimiento en los días 4 y 6 de incubación.

Cuando el medio de Transporte "D" fue sembrado en el medio Thioglicolato los datos obtenidos se muestran en la Tabla Nº 8.

TABLA N° 8: Medio de Transporte "D" refrigerado por 24-48 hs. a 4°C evaluado en el medio Thioglicolato según número de cultivos positivos e intensidad de desarrollo en 8 días de observación.

Intensidad de desarrollo	Días de observación y plazos de refrigeración							
	1	2	3	4	5	6	7	8
24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48
(+)	59 29	71 48	43 46	34 45	53 49	44 48	33 29	27 26
(++)	- -	24 9	25 10	23 18	25 19	17 13	14 17	5 6
(+++)	- -	4 1	28 16	27 9	16 13	5 7	1 6	2 5
(++++)	- -	- -	16 10	34 19	15 6	7 5	2 4	1 -
Total cultivos positivos	59 29	99 58	112 82	118 91	109 87	73 73	50 56	35 37
ij	n h	h m	h h	h h	h i	lm i	jk	k n

(+) \angle 25%; (++) \angle 50%; (+++) \angle 75%; (++++) 100%

n= 144 cultivos para 24 y 48 hs.

$P \angle$ 0.05 letras iguales no difieren estadísticamente, se compararon los datos de 24 hs entre sí y 48 hs. de igual forma.

Los días de mayor número de cultivos positivos para 24 hs de transporte fueron 2, 3, 4 y 5; sin existir diferencias significativas entre sí ($P \geq 0.05$), cuando el transporte se efectuó por 48 hs dichos días correspondieron al 3, 4, 5 y 6 sin existir diferencias estadísticas entre sí. De todas formas, para ambos plazos de transporte, el cuarto día fue el de mayor número de cultivos positivos.

El Medio de Transporte D al ser sembrado en medio Thioglicolato tuvo mejor desempeño obteniéndose mayor número de cultivos con intensidades del 100%, los que correspondieron al 4to. día de incubación para ambos plazos.

Cuando se analizaron la totalidad de los datos del Transporte D sembrados en medio Kupferberg tuvo menor eficiencia que al sembrarse en el medio Thioglicolato, así de 2.304 observaciones microscópicas efectuadas se obtuvieron 977 positivos (42,40%) en el medio Kupferberg, contra 1.168 (50,69%) al ser sembrados en el medio Thioglicolato siendo ambas diferencias significativas ($P < 0.05$). Los mismos corresponden a la sumatoria de los cultivos de ambos plazos de transporte empleados.

Cuando se analizaron individualmente los datos para 24 y 48 hs el Transporte D sembrado en medio Kupferberg no tuvo diferencias significativas, se obtuvieron 525 observaciones positivas (45,57%) contra 452 (39,24%) para 24 y 48 hs respectivamente, de un total de 1.152 observaciones hechas para cada plazo de tiempo ($P \geq 0.05$).

El Medio de Transporte D sembrado en medio Thioglicolato tuvo una eficiencia mayor, siendo mejores los resultados para 24 hs de transporte, 655 (56,86%) que para 48 hs, 513 (44,53%), siendo ambas diferencias significativas ($P < 0.05$), de un total de 1152 observaciones para cada plazo de transporte.

Finalmente al comparar los cultivos positivos para el caso de sembrarse el Medio de Transporte D en el medio Kupferberg o en el medio Thioglicolato y analizarse por día, las diferencias fueron significativas en los días 1, 2, 3 y 4 para las muestras transportadas durante 24 hs, mientras que en el transporte por 48 hs lo fueron en el primer día solamente.

Análisis por Ji cuadrado de los datos de las Tablas N° 7 y 8

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor Ji cuadrado
Factor 1	1	17,01*
Factor 2	1	21,55*
Interacción 1 x 2	1	2,22
Factor 3	7	211,57*
Interacción 1 x 3	7	21,61*
Interacción 2 x 3	7	16,06*

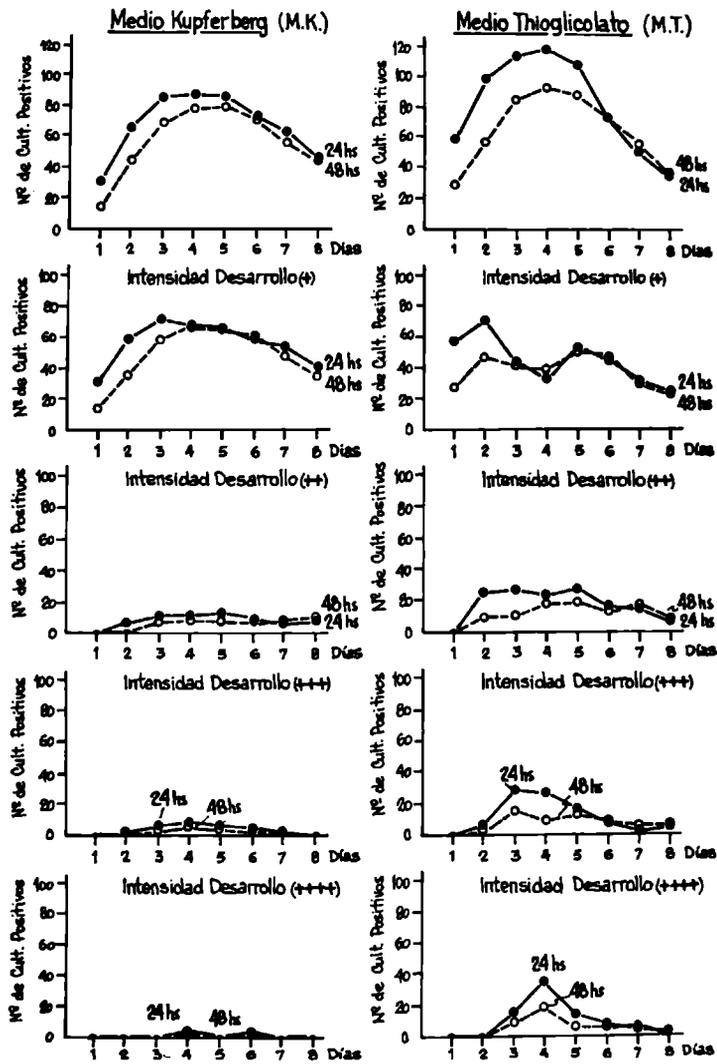
* $P < 0.05$, total general de datos 4608, total general positivos 2145.

El Gráfico N° 4 permite ver las curvas de los cultivos del Medio de Transporte D al ser sembrado en los medios Kupferberg y medio Thioglicolato.

En la parte superior del gráfico se observan los totales de los cultivos para ambos medios, siendo evidente el mayor número en el medio Thioglicolato.

Al comparar las diferentes intensidades de desarrollo se observa escaso crecimiento en el medio Kupferberg donde casi no existieron cultivos con el máximo de desarrollo. En el medio Thioglicolato en cambio la eficiencia fue superior, especialmente en las intensidades de (++) , (+++) y (++++) para ambos plazos de transporte refrigerado.

Gráfico N°4 - MEDIO DE TRANSPORTE 'D' REFRIGERADO POR 24 y 48 hs. A 4°C EVALUADO EN DOS MEDIOS DE CULTIVOS (M.K. y M.T.) SEGUN NUMERO DE CULTIVOS POSITIVOS E INTENSIDAD DE DESARROLLO EN 8 DIAS DE OBSERVACION.



5.- Combinaciones de Medios de Transportes y medios de cultivos
analizados según día de mayor número de cultivos positivos.

Al efectuar el análisis de datos teniendo en cuenta las combinaciones posibles de Medios de Transporte con los medios de cultivos, pero evaluados según el día de incubación de mayor número de cultivos positivos, se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla N° 9.

TABLA N° 9: Número y porcentaje () de cultivos positivos resultantes de la combinación de Medios de Transporte (A, B, C, D) refrigerados por 24 y 48 hs a 4°C en tres medios de cultivo. Se evalúan considerando el día de mayor número de cultivos positivos.

Combinaciones de Medios de Trans. y medios de cultivos.	Plazos de refrigeración a 4°C		
	24 hs	48 hs	
A/MTh	91 (63,19) abc	71 (52,08)	e
B/MTh	87 (60,42) a c	36 (25)	
C/MTh	124 (86,11) b d	102 (70,83)	efg
C/MLD	130 (90,28) d	113 (78,47)	g
D/MTh	118 (81,94) bcd	91 (63,19)	efg
D/MK	86 (59,72) c	79 (54,86)	ef

n = 144 cultivos para cada combinación y plazo de transporte efectuados; $P < 0.05$; letras iguales no difieren estadísticamente; deben leerse en sentido vertical.

MTh = Medio Thioglicolato; MLD = Medio Leche Descremada; MK = Medio Kupferberg.

Al comparar los datos de cada combinación para los cultivos de 24 hs. de transporte con los de 48 hs., la única combinación que difirió fue el Transporte B en el medio Thioglicolato ($P < 0.05$).

Del mismo surge que si bien la combinación del Medio de Transporte C cultivado en leche descremada obtuvo el mayor porcentaje de cultivos positivos, las diferencias no fueron significativas al compararlo con el transporte C/medio Thioglicolato ni con el Transporte D sembrado en medio Thioglicolato, tanto para las 24 como para las 48 hs. de transporte ($P > 0.05$).

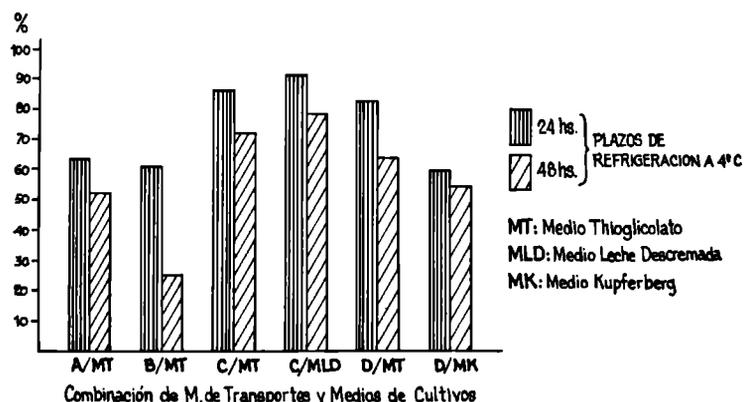
Análisis por Ji cuadrado de los datos de la Tabla 9.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valores de Ji cuadrado
Factor 1	5	53,77*
Factor 2	1	17,31*
Interacción 1 x 2	5	6,05

* $P < 0.05$; total general de datos 1728; total general de positivos 1132.

El Gráfico N° 5 muestra las distintas combinaciones en los dos plazos de tiempo de refrigeración. Aunque los mejores porcentajes se obtuvieron con las combinaciones de los transportes C/MTh, C/MLD y D/MTh las diferencias no fueron significativas para ninguno de ellos en ambos plazos de tiempo.

Gráfico Nº5- PORCENTAJE DE EFICIENCIA DE LAS COMBINACIONES DE MEDIOS DE TRANSPORTE (A-B-C-D, REFRIGERADOS POR 24 y 48 hs. a 4°C) Y MEDIOS DE CULTIVOS.



6.- Grupos de toros con infección natural y artificial. Datos referidos a medios de transporte y cultivos.

Considerando las mejores combinaciones de Medios de Transporte y medios de cultivos, se analizaron los datos correspondientes a los grupos de toros I (Infección artificial) y II (Infección natural). Para ello se emplearon las observaciones positivas de los Medios de Transporte C sembrado en leche descremada y en medio Thioglicolato para ambos grupos de toros, solo en las primeras 24 hs de transporte, por considerarse el período de tiempo de mayor eficiencia.

Los datos referentes al grupo de toros con infección artificial se detallan en la Tabla Nº 10.

TABLA N° 10: Grupo I (Toros con Infección Artificial). Evaluación según número de observaciones positivas durante 8 días de dos Medios de Transporte (C y D) refrigerados a 4°C por 24 hs y sembrados en dos medios de cultivos (MLD y MTh)

Combinaciones de Medios de Trans. y cul- tivo.	Días de observación								n
	1	2	3	4	5	6	7	8	
C/MTh	14	35	49	56	53	42	30	17	72
C/MLD	14	47	61	65	64	59	53	45	72
D/MTh	19	47	58	61	60	45	33	12	72

MTh = Medio Thioglicolato.

MLD = Medio Leche Descremada

El Grupo II (Infección Natural) se evaluó según lo refleja la Tabla N° 11.

TABLA N° 11: Grupo II (Toros con Infección Natural). Evaluación según número de observaciones positivas durante 8 días de dos Medios de Transporte (C y D) refrigerados a 4°C por 24 hs. y sembrados en dos medios de cultivos (MLD y MTh).

Combinaciones de Medios de Transporte y cultivo.	Días								n
	1	2	3	4	5	6	7	8	
C/MTh	55	67	68	68	59	31	21	15	72
C/MLD	50	64	66	65	60	55	50	46	72
D/MTh	40	52	54	55	49	28	17	13	72

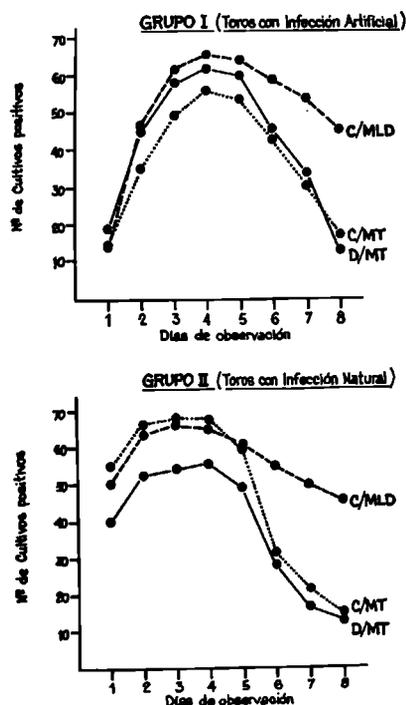
MLD = Medio Leche Descremada

MTh = Medio Thioglicolato

Al analizar la totalidad de las observaciones positivas para cada grupo de toros según los días de observación se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los días 1 y 2, siendo mayor el número de cultivos positivos en el grupo de toros con infección natural lo que indicaría una mayor población de flagelados en dichos animales.

En el Gráfico N° 6 se observan las curvas para ambos grupos de toros, notándose el mayor número de cultivos positivos con que inicia el desarrollo para el grupo con infección natural, lo que indicaría mayor población de flagelados, esto hace que luego de logrado el máximo de crecimiento en las combinaciones que tienen medio Thioglicolato la caída es brusca, mientras que en leche descremada es más tenue dicho descenso. Para ambos grupos este hecho ocurre luego del quinto día de incubación.

Gráfico N° 6 - EVALUACION SEGUN NUMERO DE OBSERVACIONES POSITIVAS DURANTE 8 DIAS DE DOS MEDIOS DE TRANSPORTE (C y D) REFRIGERADOS A 4°C POR 24 hs Y SEMBRADOS EN MEDIO LECHE DESCREMADA Y MEDIO THIOGLICOLATO (MLD y M.T)



Quando se compararon la totalidad de las observaciones positivas de las tres combinaciones analizadas del Grupo I (Infección Artificial) con el Grupo II (Infección Natural) sobre un total de 1728 observaciones efectuadas para cada grupo se obtuvieron 1039 (60,13%) observaciones para el Grupo I y 1148 (66,44%) para el Grupo II, siendo ambas diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Esta diferencia confirmaría la mayor población de *T. foetus* existente en toros con infección natural con respecto a aquellos infectados artificialmente.

En la Tabla siguiente se expresan los resultados de 576 observaciones microscópicas correspondientes a los 72 medios de cultivos observados durante 8 días, para cada combinación de medios y para cada grupo de toros.

TABLA N° 12: Número y porcentaje () de observaciones microscópicas positivas durante 8 días, de dos medios de transporte (C y D) refrigerados por 24 hs a 4°C y sembrados en dos medios de cultivos (MLD y MTh).

Grupo de toros	Combinación de Medios de Transporte y medios de cultivos		
	C/MTh	C/MLD	D/MTh
Grupo I (Infección Artif.)	296 (51,39) a	408 (70,83) b	335 (58,16) abe
Grupo II (Infección Nat.)	384 (66,67) c	456 (79,17) c	308 (53,42) e

n = 576 para cada combinación y grupo de toros.

$P < 0.05$ letras iguales no difieren estadísticamente entre sí; deben leerse en ambos sentidos.

MLD = Medio Leche Descremada

MTh = Medio Thioglicolato

Para el Grupo I no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las combinaciones del Medio de Transporte C/MLD con el Medio de Transporte D/MTh, aunque el mayor porcentaje correspondió a la primera combinación citada; tampoco existieron diferencias entre C/MTh y D/MTh.

En el Grupo II en cambio no existieron diferencias significativas entre las combinaciones C/MTh y C/MLD siendo esta última la combinación de mayor porcentaje de positivos, el Medio de Transporte D/MTh fue el de menor eficiencia.

Quando se compararon los comportamientos de cada combinación según grupo de toros las combinaciones C/MTh y C/MLD difirieron estadísticamente ($P \leq 0.05$) entre los Grupos I y II; mientras que no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos con la combinación D/MTh ($P \geq 0.05$).

Análisis por Ji cuadrado de los datos de las Tablas N° 10, 11 y 12.

Fuente de variación	Grado de libertad	Valor Ji cuadrado
Factor 1	1	5.95*
Factor 2	2	39,43*
Interacción 1 x 2	2	9,04*
Factor 3	7	186,40*
Interacción 1 x 3	7	49,13*
Interacción 2 x 3	14	27,98*

* $P \leq 0.05$; total general de datos 3456; total general de positivos 2187

7.- Consideraciones sobre condiciones de muestreo y comportamiento de medios de cultivos.

Cabe consignar algunos datos referentes a los muestreos y medios de cultivos. La totalidad de los muestreos se efectuaron con buenas condiciones climáticas y por ende no existió barro en los corrales. El número de muestras con heces o tierra fue escaso aunque no se disponen de datos que estadísticamente se puedan correlacionar con el comportamiento en los medios de cultivos.

Algunos medios de leche descremada solían coagular luego de llegar a la máxima intensidad de crecimiento y permanecían así durante dos días, aunque otros lo hacían por acción bacteriana. La contaminación con *Pseudomona aeruginosa*, se observó en pocos cultivos dándole una coloración verde típica especialmente sobre el final del período de incubación,; cuando las concentraciones activas de antibióticos habían decaído.

Con el medio Thioglicolato se obtuvo siempre una imagen microscópica clara; la máxima intensidad de desarrollo era mantenida por 48 hs, agotándose rápidamente. Así mismo los contaminantes bacterianos competían con los protozoos, y por ser un medio muy rico en nutrientes no siempre los antibióticos lograban una buena inhibición.

El medio Kupferberg daba una buena imagen a la observación microscópica aunque la intensidad de crecimiento fue siempre baja, algunos cultivos se contaminaron con hongos.

El comportamiento atípico de algunos cultivos ocurrió con una incidencia baja, sobre 1728 medios de cultivos sembrados solamente 11 (0,63%) dieron positivo únicamente en un día de incubación. Asimismo, 61 cultivos (3,53%) fueron positivos recién a partir del 5º día de incubación con el siguiente detalle: 38; 14,6 y 3 respectivamente para los días 5, 6, 7 y 8 de incubación.

De los tres medios de cultivos empleados el Kupferberg tuvo 7,29% de cultivos que dieron positivos luego del 5º día de incubación; mientras que para los medios Thioglicolato y leche descremada ese porcentaje fue del 2,77%.

DISCUSION

La infección experimental en toros con *T. foetus* ha tenido resultados dispares según los autores, existiendo diversos factores como susceptibilidad individual, tipo de cultivo empleado, cantidad de pasajes de las cepas, características del inóculo, etc., que pueden hacer fracasar el intento.

En este trabajo la totalidad de los toros se infectaron luego de tres descargas intraprepuciales con cultivos de cepas de aislamiento reciente, coincidiendo con lo expresado por Clark y col. (24) que se necesita un mínimo de 10^6 células viables para infectar a toros de 3 a 6 años de edad; aunque dichos autores emplearon menores volúmenes que en este ensayo. Todorovic y Mc Nutt (117) tuvieron éxito al infectar artificialmente a 4 toros empleando volúmenes de 50 a 120 ml con 10^6 /ml células viables de *T. foetus*, efectuando también inoculaciones repetidas para lograr tal fin. Stoessel y Haberkorn (109) infectaron a 12 de 15 toros A. Angus de 3 a 9 años de edad, mediante la primer descarga de un cultivo de 20 ml de *Trichomona* medio Oxoid con 2×10^4 /ml células viables. Las sucesivas reinfecciones en los otros 3 toros fracasaron, aún cuando los inóculos llegaron hasta 2×10^7 células viables de *T. foetus*.

Parsonson y col. (88) establecieron la infección en 12 toros Hereford de 2 a 7 años de edad mediante la introducción de un cultivo intraprepucial. Hammond y Bartlett (57) infectaron sólo a 2 de 6 toros luego de introducir material de lavado vaginal de hembras infectadas conteniendo 3×10^3 a 3×10^6 /ml de células viables.

En otro trabajo pudieron infectar a 3 toros sobre 3 con similar técnica (58).

Murnane (81) fracasó al querer infectar 3 toros jóvenes con cepas de *T. foetus* variedad Belfast y Manley repicadas durante un año in vitro, dichos toros adquirieron la enfermedad al servir hembras infectadas. Gasparini y col. (52) lograron infectar a 1 de 8 toros, mediante la introducción de cultivos de *T. foetus* intraprepucial. Sin embargo al inocular material de lavado prepucial de un toro infectado lograron establecer la infección en el resto, necesitando para ello un promedio de 2,75 inoculaciones. Elder y Hall (46) infectaron sólo 1 toro de 8 (7 Shorthorn de 2 años y 1 Hereford de 8 años) mediante la introducción de cultivos de *T. foetus* variedad Brisbane a razón de $2 \text{ a } 7 \times 10^6$ viables con 24 hs de crecimiento. Emplearon cepas de aislamiento reciente y otras con 80 pasajes in vitro.

Según Clark y col. (23, 24) los toros jóvenes (1-2 años) serían menos susceptibles. Estos autores sólo lograron infectar a 3 toros de 19 de 1 a 2 años, mientras que *T. foetus* fue establecida en 12 de 13 toros de 3 a 7 años. Sin embargo otros autores establecieron la infección en animales de 2 años (46, 58, 88, 117).

La duración de la infección sería menor en animales jóvenes e incluso temporaria (21), aunque Hammond y Barlett (58) citaron que toros de 16 a 18 meses de edad experimentalmente infectados, permanecieron positivos durante 6 meses y 1 año respectivamente Elder y Hall (46) citaron el caso de un toro de 2 años de edad que portó la infección durante 59 semanas.

En este trabajo los toros artificialmente infectados permanecieron positivos durante el tiempo que demandaron los muestreos.

La población de T. foetus a nivel prepucial es muy variable y está sujeta a diversos factores; Bartlett y col.(7) pusieron énfasis en la escasa población de flagelados lo que puede hacer fracasar los métodos de muestreo. El comportamiento individual de los toros sería la causa por la cual las variaciones son tan amplias. Los autores obtuvieron de 10 toros infectados 800 muestras, siendo el porcentaje de muestras positivas entre 45 y 85% en 8 toros, mientras que los dos toros restantes tuvieron una conducta atípica con 19,5 y 8,5% de muestras positivas respectivamente. Los cambios poblacionales de T. foetus en cavidad prepucial se producirían cada 5 a 10 días (59) lo que sería importante para la periodicidad del muestreo y justificaría las diferencias individuales de concentración de flagelados (7, 21, 58).

Stoessel y Haberkorn (109) mencionaron que la población de T. foetus en cavidad prepucial sería similar a la observación directa en cada muestreo, existiendo variaciones en la población individual de los toros.

Todorovic y Mc Nutt (117) mencionaron la costumbre de los toros de raza Aberdeen Angus de protruir su pene y prepucio, aumentando considerablemente la contaminación con heces y tierra, lo cual es frecuente de ver y fue confirmado en este ensayo, no habiéndose observado tal actitud en el toro de raza Hereford.

El corte de pelos de la abertura prepucial es importante cuando el método de muestreo usado es el raspador torneado, pues se evitan contaminantes frecuentes al introducir el instrumento en la cavidad, no siendo práctica la higiene con agua y jabón como fue indicado por algunos autores (40, 84, 113).

El empleo del raspador torneado aporta un elemento práctico en las condiciones de muestreo en nuestro medio siendo su uso muy extendido en la actualidad. Resultan llamativos los resultados obtenidos por Ostrowski y col. (85) al comparar distintos métodos de muestreos, obtienen una eficiencia del 0% para el raspador torneado y 41,6% para el raspador a resorte, contrastando estos resultados con los mencionados en una publicación anterior (84) donde la eficiencia del raspador a resorte fue similar a otros métodos. Tedesco y col. (115) usaron un raspador torneado de mayores dimensiones que el empleado en éste trabajo y lo comparan con el método de la pipeta; obtuvieron diferencias a favor del raspador en las muestras observadas en forma directa pero al cultivarlas en forma inmediata los resultados fueron similares para ambos métodos. Al refrigerar las muestras por más de 48 hs la superioridad fue para las muestras extraídas con raspador. También Baez Kohn (6) lo empleó con buenos resultados. Ultimamente Villa (119) empleó un raspador torneado similar al utilizado en este trabajo y la eficiencia fue menor (87,5%) para el método del raspador al compararlo con la pipeta (100%).

Los resultados de otros autores están referidos al raspador a resorte, de diferentes dimensiones y estructura (40, 84, 110).

La refrigeración de las muestras a 4°C luego de extraídas hasta su observación o cultivo ulterior fue aconsejado por Bartlett y col. (7, 9). Fitzgerald y col. (49) obtuvieron mejores resultados al refrigerar las muestras a 4°C por 12, 24 y 48 hs con respecto a otras mantenidas a temperatura ambiente, donde la eficiencia fue mucho menor. Contrariamente Todorovic y Mc Nutt (117), tuvieron mayor recuperación al conservar las muestras a temperatura ambiente (22-24°C) en medios de leche descremada y Plastridge modificado con respecto a otras que fueron refrigeradas por 24 hs y posteriormente incubadas a 37°C. Stoessel (107) también prefirió la refrigeración de muestras sembradas en el medio Trichomona Oxoid hasta 72 hs y posterior incubación a 37°C, cuando las circunstancias así lo exigieron, siendo sus resultados buenos. Villa (119) utilizó temperaturas de transporte variables (5 a 25°C) durante 36 hs en el medio Trichomona Oxoid con buenos resultados, aunque no efectuó estudios comparativos. Tedesco y col. (115) tuvieron excelentes resultados al refrigerar las muestras a 4°C durante 24, 48 y 72 hs.

Kimsey y col. (65) también lograron una eficiencia muy superior al refrigerar las muestras a 4°C que al transportarlas a temperatura ambiente (26°C).

El empleo de la solución fisiológica tamponada con la adición de 5% de suero fetal bovino fue también empleada por Kimsey y col. (65) quienes obtuvieron muy buenos resultados cuando las muestras se transportaron hasta 48 hs a 4°C; pero su eficiencia disminuyó paulatinamente hasta las 120 hs de transporte, y a su vez fue superior a la solución fisiológica tamponada y solución fisiológica en todos los plazos. Dennett y col. (41) la emplearon, pero manteniendo las muestras a temperatura ambiente.

En este trabajo el medio de transporte A tuvo un desempeño mediocre, ocupando el tercer lugar tanto para 24 como para 48 hs, siendo los porcentajes de cultivos positivos 43,84% y 33,85% respectivamente ($P < 0.05$).

La solución Ringer lactato tuvo una excelente eficiencia según Kimsey y col. (65) hasta las 48 hs de transporte, sin tener diferencia con los resultados obtenidos con el medio Kupferberg y la solución fisiológica tamponada con 5% de suero fetal bovino, lo que contrasta con los malos resultados logrados en el presente trabajo donde fue el transporte de menor eficiencia (41,58%) para 24 hs y (15,97%) para 48 hs ($P < 0.05$).

No existen referencias en nuestro medio del empleo de la leche descremada como medio de transporte. Todorovic y Mc Nutt (117) emplearon diferentes medios a base de leche, en dichos medios *T. foetus* se conservaría en mejores condiciones que en solución fisiológica. Obtuvieron una mejor eficiencia en medios a base de leche en polvo que con leches crudas u homogeneizadas;

los porcentajes de cultivos positivos en leche en polvo fueron superiores cuando las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente 22-24°C (67,6%) que refrigeradas 4°C (58,6%).

La leche descremada (medio de transporte C) fue el más eficiente de todos los medios de transportes en los dos plazos de refrigeración analizados, siendo para las 24 hs 59,03% y 49,65% para las 48 hs ($P < 0.05$). Cuando el medio de transporte C fue cultivado en medio leche descremada su eficiencia fue mayor obteniéndose para las 24 hs de transporte 74,13% de cultivos positivos, mientras que en las 48 hs fue del 61,37%. Al comparar el total de datos (24 y 48 hs) para las dos formas en que se empleó este transporte las diferencias obtenidas fueron significativas ($P < 0.05$) siendo superior la combinación del transporte C sembrado en leche descremada.

Los valores citados por Todorovic y Mc Nutt (117) para muestras conservadas en medio a base de leche en polvo a temperatura ambiente (67,6%) y refrigeradas por 24 hs (58,6%) serían aproximados a los valores obtenidos en el presente trabajo.

Con respecto al medio Kupferberg empleado como transporte fue utilizado por Kimsey y col.(65) con y sin agregado de agar, teniendo buena eficiencia en ambos casos siendo aconsejado por los autores cuando las muestras fueran transportadas por muchas horas (120 hs). En el presente trabajo el transporte D sembrado en medio Thioglicolato ocupó el segundo lugar en eficiencia tanto para los plazos de 24 hs (56,86%) como para 48 hs (44,53%).

Sin embargo este transporte tuvo un desempeño peor aún al ser sembrado en el medio Kupferberg, siendo su eficiencia de 45,57% para 24 hs y 39,24% para las 48 hs, sin existir diferencias significativas entre ambos plazos ($P > 0.05$).

Cuando se comparó el Medio de Transporte D cultivado en medio Thioglicolato con respecto a la siembra en medio Kupferberg tuvo mejor desempeño la primera combinación, siendo las diferencias significativas ($P < 0.05$)

Niak (83) mencionó la importancia de bajas concentraciones de ágar que reduciría la motilidad de *T. foetus* durante el transporte a temperatura ambiente. Si bien el medio Kupferberg cumple este requisito, la leche descremada carece de ágar y no parece ser un factor importante en condiciones de refrigeración donde el frío inhibiría el metabolismo del flagelado.

Los porcentuales de eficiencia obtenidos por Tedesco y col. (115) de 98%, 96% y 89,8% para los plazos de 24, 48 y 72 hs de transporte al muestrear con raspador torneado fueron muy superiores a los aquí expresados. De forma similar ocurrió cuando emplearon para dichos toros el método de aspiración por pipeta, obteniendo 98%, 83,3% y 70,8% en los mismos plazos de transporte. Sin embargo, cabe consignar que los autores solo sacaron 2 muestras por vez y por toro, siendo la metodología de siembra diferente. En el presente trabajo se extrajeron 4 muestras por toros y por vez, siendo colocadas en los medios de transporte y refrigeradas, luego sembradas por duplicado en medios de cultivos, donde las alícuotas empleadas para la siembra terminan por disminuir el número total de flagelados.

Quizás la incubación directa de las muestras mantenidas en aquellos medios de transporte más eficientes (medio leche descremada C y medio Kupferberg D) luego de cumplidos los plazos de 24 y 48 hs de refrigeración hubieran dado porcentajes mayores a los aquí obtenidos.

Sin embargo el hecho de centrifugar el medio de transporte para ser posteriormente sembrado permitió cultivos con escasa contaminación, no interfiriendo la tierra o pelos que pudiera acompañar a la muestra y que por el centrifugado caen al fondo del tubo, quedando el esmegma y los flagelados en la parte superior del sedimento obtenido.

La importancia de la contaminación bacteriana en las muestras ya fue citada por Bartlett y col. (?); a su vez Mazurová y col. (77) estudiaron la flora bacteriana de cavidad prepucial y encontraron predominio de *Proteus* y *Pseudomonas aeruginosa* junto a *E. coli*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

Sledge y col. (103) citaron la presencia de hemólisinas de *Pseudomonas aeruginosa* capaces de lisis a *T. foetus*. La contaminación fecal con predominio de enterobacterias sería un factor negativo para el aislamiento de *T. foetus* por agotar los nutrientes del medio y también por los cambios en la tensión de O_2 del cual dependería el tiempo generacional del flagelado (74), además de la acción tóxica de las catalasas producidas por dicha flora.

De lo expuesto surge la necesidad de emplear combinaciones y concentraciones adecuadas de antibióticos. Todorovic y Mc Nutt (117) encontraron que la Polimixina B reduciría la supervivencia de *T. foetus* al agrgarla a razón de 833 UI/ml; mientras que otros autores la emplearon en menor concentración (160 UI/ml) como parte de combinaciones más complejas, sin problemas (41, 126). La mezcla de penicilina, estreptomycin y nistatina es una eficiente combinación aunque se deben agregar en cantidades adecuadas, no siendo siempre suficientes los miligramos adicionados según lo expuesto por Stoessel (107) al utilizar un ansa de la mezcla antibiótica.

T. foetus en el medio de cultivo Kupferberg demostró tener una baja intensidad de desarrollo (Tabla N° 7) siendo pocos los cultivos que lograron el máximo lo que aconteció en los días 4 y 6 de incubación. Santos y col. (98) también obtuvieron el máximo de desarrollo a las 182 hs de incubación, lo que confirma el lento desarrollo en este medio. El hecho de obtener en este medio 7,29% de cultivos positivos recién a partir de los 5 días de incubación avala esta afirmación pues fue el mayor porcentaje de los tres medios de cultivos empleados.

El medio de leche descremada fue el más eficiente de los tres utilizados. Todorovic y Mc Nutt (117) llegaron a similar conclusión al comparar distintos medios a base de leche. Stoessel y Haberkorn (109) mencionaron el hecho de la coagulación de los cultivos luego de 24 - 48 hs de haber llegado al máximo de su desarrollo aunque este hecho no puede ser tomado como referencia pues con cultivos contaminados ocurrió lo mismo, con lo que coincidimos. Todorovic y Mc Nutt (117) encontraron que la coagulación ocurría en dichos medios luego del 4 al 8 día de desarrollo; siendo más frecuente en medios a base de leche cruda.

Stoessel y Haberkorn (109) obtuvieron el máximo desarrollo en los días 3 y 4 de incubación, aunque los autores no efectuaron transporte de muestras. En éste trabajo dicho evento ocurrió al 4 día.

Las muestras con baja población de T. foetus suelen dar negativas en los primeros tres días de incubación, por lo que se aconsejó la observación diaria de las muestras durante los 8 días de incubación (109). En nuestro caso, no existieron diferencias significativas en el medio de leche descremada entre los días 2 al 7 para las muestras transportadas previamente por 24 hs y entre los días 3 y 7 cuando el transporte fue por 48 hs. Los cultivos de leche descremada que dieron positivos recién a partir del 5 día de incubación fueron 2,77%. Stoessel y Haberkorn (109) mencionaron que sólo 1,2% de cultivos fueron positivos durante 24 y 48 hs mientras que en otro trabajo este porcentaje ascendió a 6,9% (110); en nuestro caso las muestras positivas durante 1 día fueron 0,63%; considerando la totalidad de los cultivos.

Al comparar los resultados de los dos grupos de toros, con infección artificial y natural, la población de T. foetus fue mayor en los animales del segundo grupo siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). A similar conclusión habían llegado Hammond y Bartlett (58) al estudiar la distribución de los flagelados en la cavidad prepucial.

CONCLUSIONES

- 1) La infección artificial de toros fue factible, a pesar de la diferente susceptibilidad entre individuos y entre cepas de T. foetus.
- 2) El raspador torneado resulta eficiente, práctico y cómodo en condiciones de campo, como método de muestreo en toros.
- 3) De la comparación entre cuatro medios de Transporte refrigerados a 4°C durante 24 y 48 hs. surge que los mejores resultados se obtuvieron con leche descremada. Le siguen el medio de Transporte Kupferberg y la solución fisiológica tamponada con 5% de suero fetal bovino. La solución Ringer Lactato fue de mucho menor eficiencia.
- 4) En el medio Leche descremada se obtuvieron los mejores resultados tanto al usarlo como medio de Transporte o como medio de cultivo. Otras ventajas adicionales son su bajo costo y la sencillez de su preparación.
- 5) El medio de Transporte Kupferberg resultó más eficiente cuando se sembró en medio Thioglicolato que cuando se lo hizo en el medio de cultivo Kupferberg.
- 6) En todos los casos, la recuperación de T. Foetus fue menor cuando las muestras fueron conservadas por más de 24 hs. en refrigeración a 4°C.
- 7) El cuarto día de observación de los cultivos fue el de mayor número de positivos, sin existir diferencias con el tercero y el quinto, para ambos plazos de transporte empleados.
- 8) La población de T. foetus fue mayor en los toros con infección natural que aquellos infectados artificialmente.



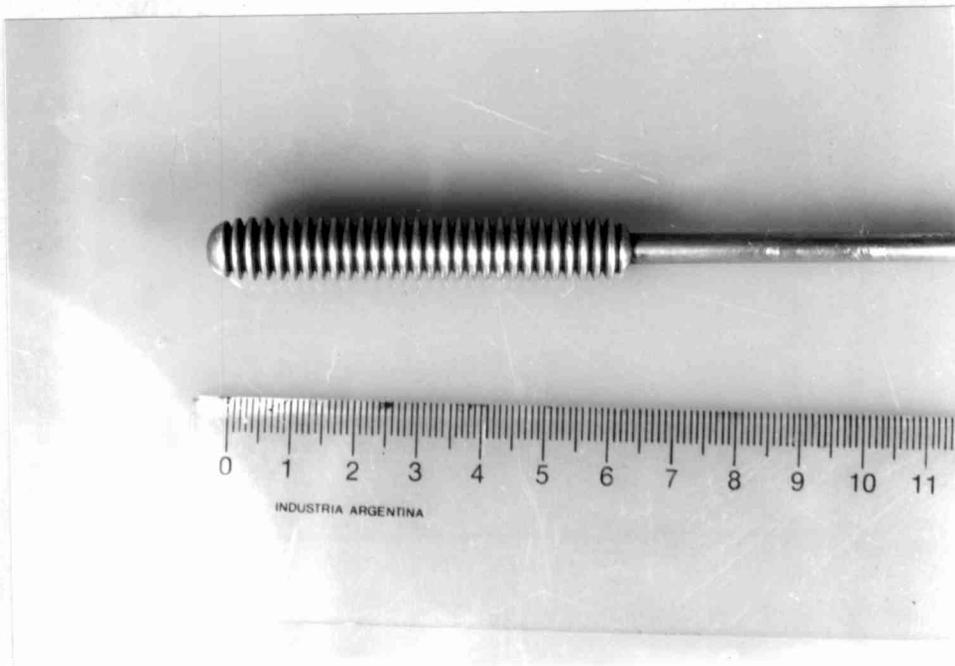
Nº 1: Contención mediante el empleo del cepo.



Nº 2: Se trabajó del lado izquierdo del toro. La identificación se hizo por numeración a fuego.



Nº 3: Corte de los pelos prepuciales



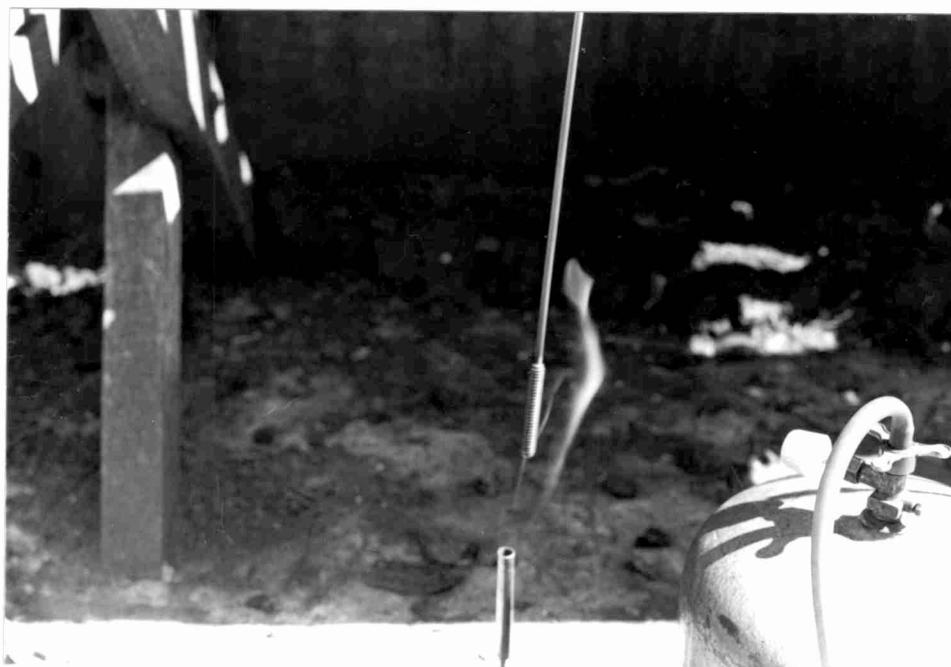
Nº 4: Parte anterior del raspador torneado.



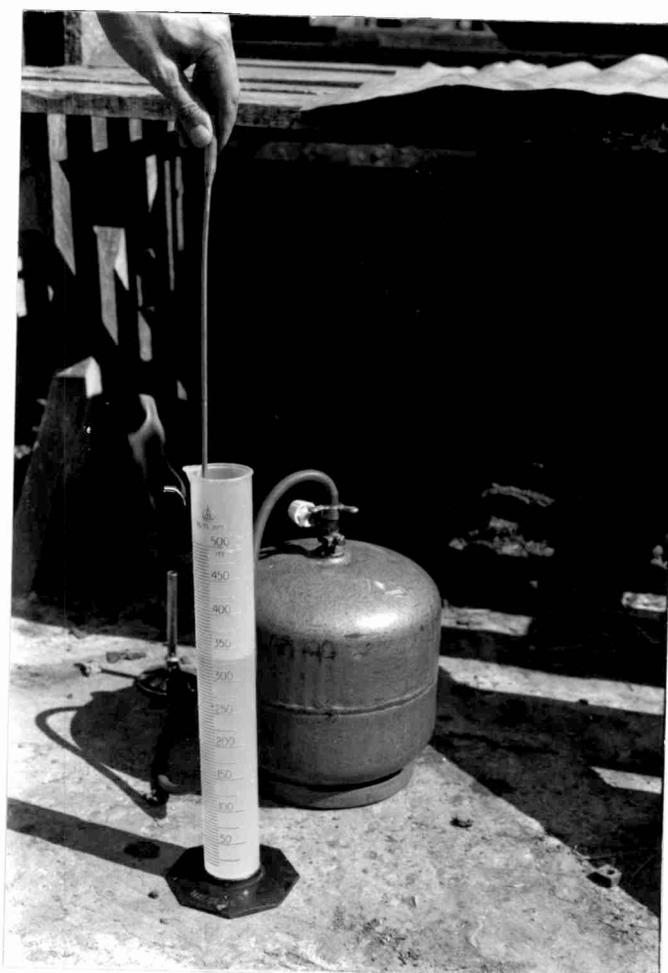
Nº 5: Introducción del instrumento por la abertura prepucial.



Nº 6: Raspador muestreando en cavidad prepucial. Nótese la otra mano que ubica al pene a través de la piel prepucial.



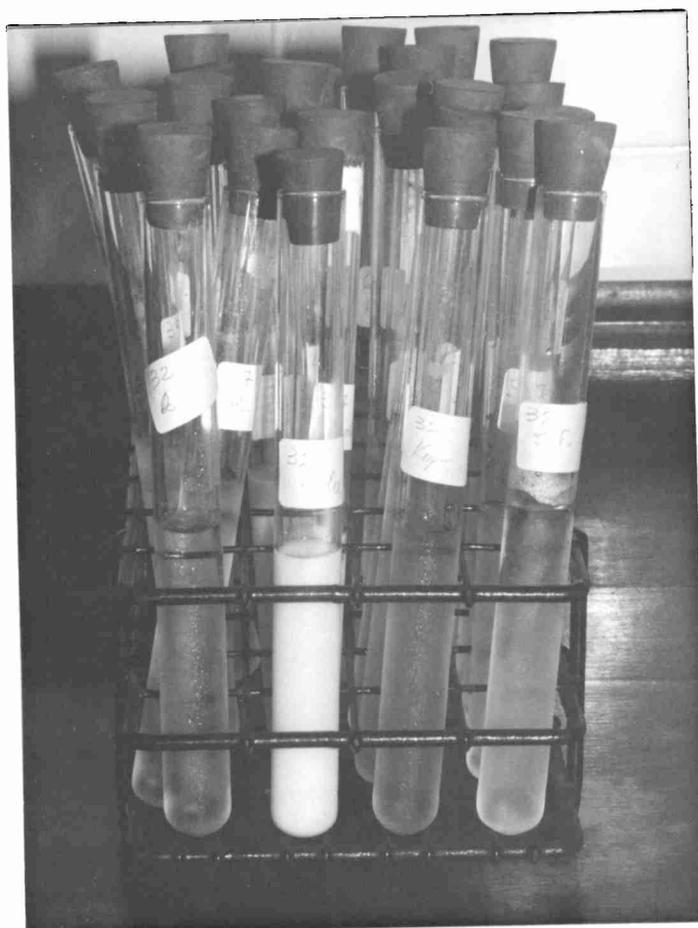
Nº 7: Desinfección del raspador a la llama de un mechero.



Nº 8: Enfriado en solución salina tamponada.



Nº 9: Raspador, probeta y mechero a gas para el muestreo.



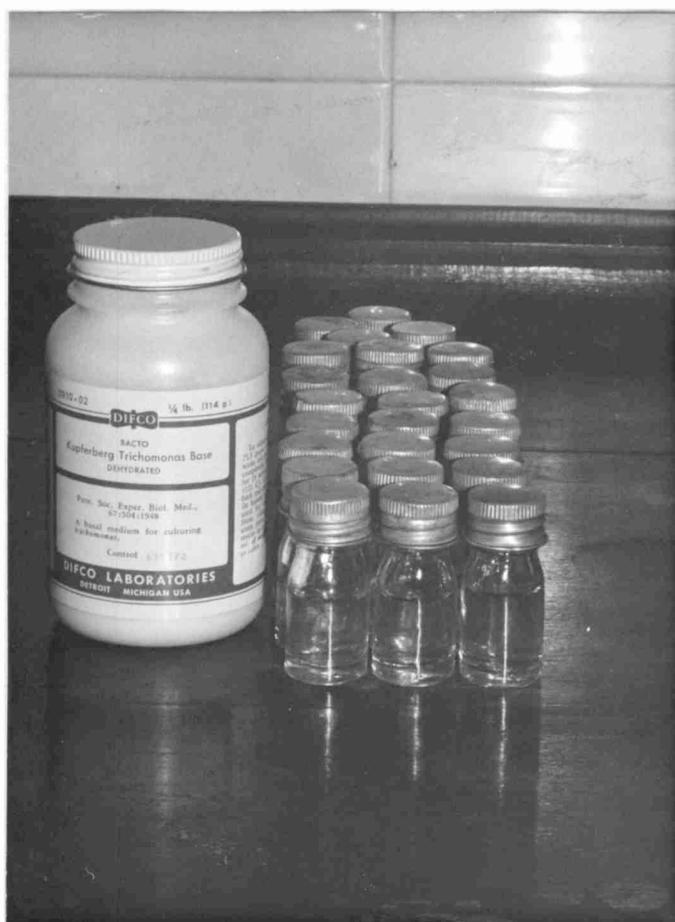
Nº 10: Medios de Transporte refrigerados e identificados.



Nº 11: Medio de cultivo Thioglicolato.



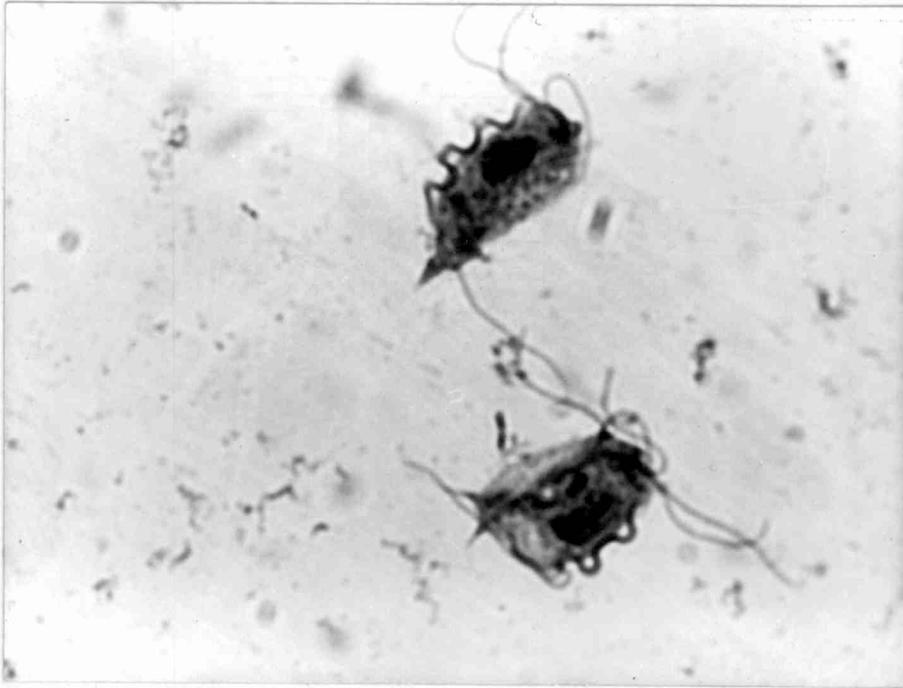
Nº 12: Medio de cultivo Leche Descremada.



Nº 13: Medio de cultivo Kupferberg.



Nº 14: Siembra del material en los diferentes medios.



Nº 15: Tritrichomonas foetus coloreados con Giemsa; se notan claramente los flagelos, membrana ondulante, núcleo y extremo final libre del axostilo (1000X).



Nº 16: Observación microscópica de los cultivos.

APENDICE

1. Solución tamponada Sørensen

Fosfato sódico anhidro	8,33 grs.
------------------------	-----------

Fosfato monopotásico anhidro	1,09 grs.
------------------------------	-----------

Agua destilada csp.	1000 ml.
---------------------	----------

pH 7,6

2. Solución fisiológica tamponada

Solución fisiológica (Cl Na 0,85%)	1,840 ml
------------------------------------	----------

Solución tamponada de Sørensen	160 ml
--------------------------------	--------

pH final 7,4

3. Solución Ringer lactato (69)

Cloruro de sodio	6 gr.
------------------	-------

Cloruro de potasio	0,30 gr.
--------------------	----------

Cloruro de calcio	0,20 gr.
-------------------	----------

Lactato de sodio	3,10 gr.
------------------	----------

Agua destilada csp.	1000 ml.
---------------------	----------

4. Medio Trichomona Oxoid (116)

Digestión de Hígado	25 grs.
---------------------	---------

Cloruro de sodio	6,5 grs.
------------------	----------

Dextrosa	5 grs.
----------	--------

Ion Agar N° 2	1 grs.
---------------	--------

Pesar 37,5 gr. en 1000 ml de agua destilada, calentar hasta disolución, llevar el pH a 7,4.

Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 15 minutos, enfriar a 45-50°C y agregar suero equino o bovino estéril e inactivado al 10% con respecto al medio. Al momento de su uso adicionar 1000 UI de penicilina/ml, 1mg/ml de estreptomycinina y 500 UI Nistatina/ml.

Fracccionar estérilmente a razón de 3 ml en tubos de tapa a rosca de 7 ml de capacidad.

5. Medio de Sutherland descrito por Clark (21)

Infusión de Hígado (450 grs.) 1000 ml

Se puede reemplazar con Bacto liver Difco 122 gr. en 1000 ml.

Bacto peptona 10 grs.

Agar 3 grs.

pH 7,4

Esterilizar por autoclave a 1 atmósfera durante 15', luego fraccionar en volúmenes de 8 ml en frascos de tapa a rosca de 30 ml de capacidad.

Agregar a cada frasco en el momento de su uso, 8 ml de suero bovino estéril e inactivado, más 1000 UI/ml de Penicilina, 1 mg/ml de estreptomycin y 200 UI/ml de nistatina.

6. Leche descremada (107, 109)

Leche en polvo descremada Molico (Nestlé) al 10% en agua destilada estéril, disolviendo por calentamiento suave, adicionada de suero equino al 10% estéril e inactivado, 1000 UI/ml de Penicilina sódica, 1 mg/ml de estreptomycin y 500 UI/ml de Nistatina.

Fracccionar estérilmente a razón de 10 ml en tubo de ensayo al emplearla como transporte o en volúmenes de 4 ml en frascos de tapa a rosca de 7 ml de capacidad, al usarla como medio de cultivo.

7. Bacto Kupferberg Trichomonas base (43, 66)

Bacto Triptona Difco 20 gr.

Bacto Maltosa Difco 1 gr.

Hidrocloreuro de Cisteína 1,5 gr.

Bacto Agar 1 gr.

Bacto Azul de Metileno 0,003 gr.

Pesar 23,5 gr. en 950 ml de agua destilada, calentar hasta disolución, llevar el pH a 7,4. Esterilizar a 1 atmósfera durante 15', enfriar a 50°C y agregar suero bovino estéril e inactivado al 10%. Adicionar de penicilina 1000 UI/ml, estreptomomicina 1 mg/ml y nistatina 500 UI/ml.

Fraccionar estérilmente a razón de 10 ml en tubo de ensayo si el medio es empleado como transporte o 4 ml en frascos de tapa a rosca de 7 ml de capacidad si es empleado como cultivo.

8. Medio Thioglicolato (71, 79, 116).

Extracto de levadura	5 gr.
Triptona	15 gr.
Dextrosa	5,5 gr.
Thioglicolato de sodio	0,5 gr.
Cloruro de sodio	2,5 gr.
L. cistina	0,5 gr.
Resazurina	0,001 gr.
Ion Agar N° 2	0,5 gr.
pH	7,2

Disolver 29,5 gr. en 1000 ml de agua destilada, autoclavar a 1 atmósfera durante 15 minutos, enfriar a 50°C, y agregar suero bovino estéril e inactivado al 10% y antibióticos a razón de 1000 UI/ml de penicilina, estreptomomicina 1 mg/ml y nistatina 500 UI/ml. Fraccionar en tubos tapa a rosca con volúmenes de 4 ml, en envases tapa a rosca de 7 ml de capacidad.

BIBLIOGRAFIA

1. ABBITT, B.; BALL, L. Diagnosis of Trichomoniasis in pregnant cows by culture of cervical-vaginal mucus. *Theriogenology*, 9(3): 267-270. 1978.
2. ABBITT, B.; MEYERHOLZ, G.W. Trichomonas fetus infection of range bulls in South Florida. *Vet. Med. Sm. Anim. Clin.*, 74 (9): 1339-1342, 1979.
3. AKINBOADE, O.A. Incidence of bovine trichomoniasis in Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop.* 33(4): 381-384. 1980.
4. ALLENDE, R.; MIQUET, P. CIAVT, Boletín Informativo N° 21. 1980.
5. AVILA, J.D.; VERA, J.C.; FERRANDO, C.; SAGER, R.; ROSSANIGO, C.; VAZQUEZ, R. Diagnóstico y control de Tricomoniasis en un establecimiento ganadero de los llanos de La Rioja. *Rev. Med. Vet.* 63 (1): 5-11. 1982.
6. BAEZ KOHN, A. Relevamiento de Trichomonas foetus y Campylobacter (vibrio) foetus en la provincia de Corrientes-Argentina. Serie técnica N° 18. INTA Mercedes, Corrientes. 1980.
7. BARTLETT, D.E.; HASSON, E.V.; TEETER, K.G. Occurrence of Trichomonas foetus in preputial samples from Infected Bulls. *J.A.V.M.A.* 110: 114-120. 1947.
8. BARTLETT, D.E. Trichomonas foetus infection and Bovine Reproduction *Am. J. Vet. Res.*, 8: 343-352. 1947.
9. BARTLETT, D.E. Procedures for diagnosing bovine venereal Trichomoniasis and handling affected herds. *J.A.V.M.A.*, 114: 293-305. 1949.
10. BENCHIMOL, M.; ELIAS, C.A., de SOUZA, W. Specializations in the flagellar membrane of Tritrichomonas foetus. *J. Parasitol.*, 67 (2): 174-178. 1981.

11. BOERO, J.J. Parasitosis Animales. Tercera Edic., Bs.As., EUDEBA, 1974.
Tomo II. pp. 264, 99-105.
12. BRIANO, R.F.L. Bovine Trichomoniasis. Academic Post Graduate Course
in Animal Health. Royal Veterinary College, University of
London. 1-65. 1970.
13. BRIANO, R.; CORDERO, A.S.; MERLINI, J.; ROLDAN, R.; ROMANO, L.;
TOSO, J.; VILLALBA PALACIOS, J.A.; VILLAR, J.; WITT, A.C.
Trichomoniasis y Vibriosis Bovina. PRACIVE, Bs.As., 1973.
14. BRUERE, S.N. Trichomonas foetus infection in a beef herd. New Zea-
land Vet. J., 30: 15-16. 1981.
15. BUSTINGORRI, J.M.; MARTINEZ, E.J; BUSTINGORRI, J.B.; BUSTINGORRI, G.F.
Evaluación estadística del nivel de eficiencia de cría en
vacunos por influencia del control de las enfermedades de la
reproducción. IV. Congreso Regional de los CREA del Sudeste
de Bs.As. Mar del Plata, 16/11/78.
16. CAMPERO, C.M.; PALLADINO, M.R.; VILLAR, J.A. Primera tipificación de
Cepas de Trichomonas foetus quimioresistentes en Argentina.
Rev. Med. Vet. (en prensa). 1982.
17. CERKASOV, J.; CERKASOVOVA, A.; KULDA, J.; VILHELMOVA, D. Respiration
of Hydrogenosomes of Tritrichomonas foetus. J. Biol. Chem.,
253 (4): 1207-1214. 1978.
18. CERKASOVOVA, A.; KULDA, J.; CERKASOV, J. Hydrogenosomes, a new type
of oxidative and phosphorylating organelle. Bid. Listy.,
41 (2): 118-121. 1976.
19. CERKASOVOVA, A.; CERKASOV, J.; KULDA, J.; REISCHIG, J. Circular D.N.A.
and cardiolipin in hydrogenosomes mycrobody like organelles
of trichomonads. Folia Parasitol. (PRAGUE), 23 (1): 33-37.
1976.

20. CLARK, B.L.; WHITE, M.B.; BANFIELD, J.C. Diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls. *Aust.Vet.J.*, 47: 181-183. 1971.
21. CLARK, B.L. Venereal diseases of cattle. Published by the University of Sidney, the post-Graduate foundation in Veterinary Science. *Vet. Review*. N° 11, 5-25. 1971.
22. CLARK, B.L.; DUFTY, J.H.; MONSBOURGH, M.K. A method for maintaining the viability of *V. fetus* var. *venerealis* in samples collected from carrier bulls. *Aust.Vet.J.*, 48: 462-464., 1972.
23. CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M.; DUFTY, J.H. Infection of bulls with *Trichomonas foetus* trough wating with infected heifers, *Aust.Vet. J.*, 50: 180., 1974.
24. CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M.; DUFTY, J.H. Experimental infection of bulls with *Tritrichomonas foetus*. *Aust.Vet.J.* 50:189-191. 1974.
25. CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M.; WHITE, M.B.; BANFIELD, J.C.; YOUNG, J.S. Control of *Trichomoniasis* in a large herd of beef cattle. *Aust.Vet.J.*, 50: 424-426. 1974.
26. CLARK, B.L.; DUFTY, J.H.; PARSONSON, I.M. Studies on the transmission of *Tritrichomonas foetus*. *Aust.Vet.J.*, 53: 170-172. 1977.
27. CLARK, B.L.; DUFTY, J.H.; PARSONSON, I.M.; CHRISTENSEN, H.R. *Trichomoniasis* and reproductive performance. Division of animal health. CSIRO; 28-29. 1979/80.
28. COCKRAM, F.A.; STEPHENS, J.R. *Vibriosis* and *Trichomoniasis* in beef bulls in new south wales. *Aust.Vet.J.*, 55: 252-253. 1979.
29. CONOVER, W.J. *Practical nonparametric statistics*. 1°Ed. New York, USA. Editey by J. Wiley and Sons inc. 1971, pp. 462,140-202.

30. CORDERO, A.S. Tricomoniass en rodeos de cria. *Gac.Vet.*, 299; 238-250, 1975.
31. CHRISTENSEN, H.R.; CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M. Incidence of *Tritrichomonas foetus* in young replacement bulls following introduction into an infected herd. *Aust.Vet. J.*, 53; 132-134, 1977.
32. CHRISTENSEN, H.R.; CLARK, B.L. Spread of *Tritrichomonas foetus* in beef bulls in an infected herd. *Aust.Vet. J.*, 55; 205; 1979.
33. CHRISTENSEN, H.R.; CLARK, B.L. Control of Trichomoniasis in Station herds. Division of Animal Health. CSIRO 29, 1979/80.
34. DE CARLI, G.A.; GUERRERO, J. Comparacao antigénica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. Imunofluorescencia indirecta (I.F.I.) *Rev.Microbiol. (S.Paulo)*, 6 (3): 55-58, 1975.
35. DE CARLI, G.A.; GUERRERO, J. Antigenic comparison between *Tritrichomonas suis* and *T. foetus*. II. Gel immunodiffusion. *Rev. Lat.amer.Microbiol.* 18; 167-171, 1976.
36. DE CARLI, G.A.; GUERRERO, J.; FREIRE, Z.; NUNES, E. Fixacao e coloracao de flagelados do genero *Tritrichomonas* *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 8(2): 53-54. 1977.
37. DE CARLI, G.A.; GUERRERO, J. Comparacao antigénica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. III imunoeletroforese (IEF). *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 8 (4): 107-109, 1977.
38. DE CARLI, G.; DE CARLI, M. Um meio simples para o cultivo de *Tritrichomonas foetus* in vitro. *Acta Biológica Leopoldensia, Universidade do vale do Rio dos Sinos*, 2, 2 (1): 89-90, 1980.
39. de CARNERI, I.; EMANUELI, A; SIGNERELLI, I. Efficiency of Microscopic Examination of fresh smears and cultures in Diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 100, 299. 1968.

40. del CAMPO, M.R.; MUÑOZ, O.; del CAMPO, C.H. Comparación de dos métodos para aislamiento de *Trichomona foetus* en toro. Arch.Med.Vet.(Valdivia) III, 2: 84-87, 1971.
41. DENNETT, D.P.; REECE, R.L.; BARASA, J.O.; JOHNSON, R.H. Observations on the incidence and distribution of serotypes of *Tritrichomonas foetus* in beef cattle in North-eastern Australia. Austr.Vet. J., 50: 427-431, 1974.
42. DIAMOND, L.S. The establishment of various *Trichomonads* of animal and man in axenic cultures. J. Parasitol., 43: 488-490. 1957.
43. DIFCO SUPPLEMENTARY LITERATURE. U.S.A. Difco Laboratories, Michigan. 1972, pp. 480, p. 201.
44. DONALDSON, L.E.; LUCAS, M.H.; JOHNSTON, L.A.Y.; RITSON, J.B. The reproductive efficiency of several north Queensland beef herds. 2. Influence of *Vibriosis*, *Trichomoniasis* and lesions of the Reproductive tract. Aust.Vet. J. 43: 41-44, 1967.
45. ELDER, J.K. Examination of twelve strains of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller) isolated in Queensland and the description of a new serotype, *T. foetus* var. Brisbane. Qd. J. Agric. Sci., 21: 193-203. 1964.
46. ELDER, J.K.; HALL, W.T.K. Experimental infection of cattle with *Tritrichomonas foetus* var. Brisbane. Qd.J.Agric.Sci.26: 671-675. 1969.
47. FERNANDES, J.C.T.; DUTRA, V. Conservacao de *Trichomonas foetus* em líquido amniótico. Arq.Fac.Vet.UFRGS, Porto Alegre, 7:149-151, 1979.
48. FITZGERALD, P.R.; HAMMOND, D.M.; MINER, M.L.; BINNS, W. Samples for diagnosis of *Trichomoniasis* in bulls. Am.J.Vet. Res.13 (49): 452-457. 1952.

49. FITZGERALD, P.R.; HAMMOND, D.M.; SHUPE, J.L. The role of cultures in Immediate and delayed examinations of preputial samples for trichomonas foetus. Vet.Med. 49: 409-413. 1954.
50. FITZGERALD, P.R.; JOHNSON, A.E.; THORNE, J.; DAVIS, L.H., HAMMOND, D.M. Trichomoniasis in Range cattle. Vet.Med. 53: 249-252. 1958.
51. GARCIA, M.M.; EAGLESOME, M.D.; HAWKINS, C.F.; ALEXANDER, F.C.M. Campylobacteriosis in Jamaica cattle. Vet.Rec. 106: 287-288. 1980.
52. GASPARINI, G.; VAGHI, M.; TARDANI, A. Treatment of bovine trichomoniasis with Metronidazole (8823 R.P.). Vet.Rec. 75 (37): 940-943. 1963.
53. GUIDA, H.G.; MEDEIROS, P.M.; PIZELLI, G.N. Conservacao do Trichomonas foetus no meio de fiece modificado. Instituto de Zootecnia, Rio de Janeiro. Publicacao N° 35; 1960.
54. GUIDA, H.G.; ALMEIDA RAMOS, A.; COELHO MARTINS, N.; RAMOS, A.J.; MENDONZA, T.R. Incidencia de Trichomonas foetus em reprodutores bovinos da Regiao Central-Sul do Brasil. Pesq.Agrop.bras., Ser.Vet., 7:23-25. 1972.
55. HABICH, G.E.; BROADBENT, D.W.; NOGUES, E.M.; SPATH, E.J.A.; GUGLIELMONE, A.A.; GONZALEZ DE RIOS, L. Estudios sobre sanidad animal en el Noroeste Argentino. I. Brucelosis, tuberculosis y tricomoniasis en tambos de Catamarca. Gac.Vet. 326: 647-656. 1977.
56. HABICH, G.E.; SPATH, E.J.A.; BROADBENT, D.W.; GONZALEZ de RIOS, L.; GUGLIELMONE, A.A. Estudios sobre sanidad animal en el noroeste argentino. II. Brucelosis, tuberculosis y tricomoniasis en tambos de Salta y otras características sanitarias y de explotación de estos. Gac. Vet. 329: 197-207. 1978.

57. HAMMOND, D.M.; BARTLETT, D.E. Establishment of infection with *Trichomonas foetus* in bulls by Experimental Exposure. *Am. J. Vet. Res.* 4: 61-65. 1943.
58. HAMMOND, D.M.; BARTLETT, D.E. The distribution of *Trichomonas foetus* in the preputial cavity of infected bulls. *Am. J. Vet. Res.* 4: 143-149. 1943.
59. HAMMOND, D.M.; BISHOP, V.B.; JEFFS, G.; BINNS, W. A quantitative study of *Trichomonas foetus* in preputial samples from infected bulls. *Am. J. Vet. Res.* 11: 308-314. 1950.
60. HONIGBERG, B.M. Trichomonads, in "Immunity to Parasitic Animal". New York Appleton Century Crofts, 1970, Vol. II, 517-550.
61. HONIGBERG, B.M. Trichomonads of Veterinary importance in "Parasitic Protozoa". London, U.K., Academic Press, 1978. Vol. II, 163-273.
62. HONIGBERG, B.M. Biological and Physiological factors affecting pathogenicity of Trichomonads. in "Biochemistry and physiology of Protozoa". 2n.Ed. New York, U.S.A., Academic Press, 1979. Vol. 2, 409-427.
63. JOHNSON, E.A. Incidence and diagnosis of Trichomoniasis in Western Beef bulls. *J.A.V.M.A.*, 145.(10): 1007-1010, 1964.
64. JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. Pathology of domestic animals. 1st.Ed., New York, U.S.A. Academic Press, Inc. 1970. Vol. 1, pp. 592, 515-543.
65. KIMSEY, P.B.; DARIEN, J.D.; KENDRICK, J.W.; FRANTI, C.E. Bovine trichomoniasis: Diagnosis and treatment. *J.A.V.M.A.*, 177 (7): 616-619. 1980.
66. KUPFERBERG, A.B.; JOHNSON, G.; SPRINCE, H. Nutritional requirements of *trichomonas vaginalis*. *Proc.Soc.Exper.Biol.Med.*, 67: 304-308. 1948.

67. LADDS, P.W.; DENNETT, D.P.; GLAZEBROOK, J.S. A survey of the genitalia of bulls in northern Australia. *Aust.Vet.J.*, 49: 335-340; 1973.
68. LAING, J.A. La Tricomoniasis de los bovinos. FAO. Estudio Agropecuario, N° 33: 1-38. 1956.
69. LITTER, M. Farmacología. 2a. Ed.Reimp., Bs.As.; Edit. El Ateneo, 1963, pp. 1499. p. 771.
70. LINDMARK, D.G.; MULLER, M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the Anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol.Chem.*, 248 (22) 7724-7728. 1973.
71. LYLE, W.E.; BROWN, L.N., BRYNER, J.H.; KIRKBRIDE, C.A.; LARSEN, A.B. Recommended uniform diagnostic procedures for qualifying bulls for the production of semen. In proceeding of 16th. Annual Meeting. Am.Assoc.Vet.Lab.Diagn. and 77 th. Ann. Meeting U.S.Animal Health Assoc.; 455-473, 1973.
72. LLOYD, D.; LINDMARK, D.G.; MULLER, M. Adenosine triphosphatase Activity of *Tritrichomonas foetus*. *J.of.Gen.Microb.* 115:301-307, 1979.
73. LLOYD, D.; LINDMARK, D.G.; MULLER, M. Respiration of *Tritrichomonas foetus*: Absence of Detectable Cytochromes. *J.Parasit.*, 66 (3): 466-469, 1979.
74. MACK, S.R.; MULLER, M. Effect of oxygen and carbon dioxide on the growth of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.*, 64 (5): 927-929; 1978.
75. MARQUEZ, N.A.; BENZ, G.W.; WALKER, D.F.; HUDSON, R.S. An Evaluation of Techniques for the Diagnosis of Tricomoniasis in bulls. *Auburn Veterinarian*, 29 (1): 22-27, 1972.

76. MARTINEZ FERNANDEZ, A. Tricomoniasis Bovina y fertilidad. 9º Congreso Internacional sobre Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Madrid, España. Edit. Garsi. Vol. II. 1980. p. 409-422.
77. MAZUROVA, J.; RYSANEK, M.; DOUBRAVOVA, L.; MACHACOVA, Z.; SVACINOVA, D. The microbial population of the preputial sac of Young bulls. Vet. Med., Praha, 26 (8): 469-479. 1981.
78. Mc LAUGHLIN, J.M.; MULLER, M. Purification and characterization of a low Molecular weight thiol proteinase from the flagellate protozoon *Tritrichomonas foetus*. J. Biol. Chem. 254 (5): 1526-1533. 1979.
79. MICROBIOLOGIC EXAMINATION OF SEMEN COMMITTEE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS. Recommended procedures for the microbiologic Examination of semen. 21st. Annual Meeting, Buffalo, New York, 1-51; 1978.
80. MULLER, M. Biochemical Cytology of Trichomonad flagellates. I) Subcellular localizacion of Hydrolases, deshidrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*. J. cell. Biol., 57: 453-474, 1973.
81. MURNANE, D. Field and Laboratory observations on trichomoniasis of dairy cattle in Victoria. Aust.Vet.J., 35: 80-83. 1959.
82. MYLREA, P.J. The differential diagnosis of the causes of herd infertility in cattle. Aust.Vet. J. 38: 15-20, 1962.
83. NIAK, A. The viability of *Trichomonas foetus* at room temperatures Vet. Rec. 78 (1): 35, 1966.
84. OSTROWSKI, J.E.B.; BAIGUN, R.; FRENE, A.J.; RODRIGUEZ DUBRA, C.; RUTTER, B. Obtención de muestras prepuciales para el diagnóstico de *Trichomonas foetus* por raspado de mucosa. Rev.Med.Vet., 55 (6): 525-528, 1974.

85. OSTROWSKI, J.E.B.; RODRIGUEZ DUBRA, D.; FRENE, A.J.; BULLO ANADON, J.A. Eficiencia comparativa por análisis microscópico directo de varios métodos de toma de muestras prepuciales para el diagnóstico de *Trichomona foetus* en el toro. Producción Animal (AAPA), Bs.As.1978, 6: 554-566.
86. PALLADINO, M.R.; CAMPERO, C.M.; VILLAR, J.A. Resistencia de *Trichomonas foetus* a tricomonicidas. Parte I: Acción terapéutica in vitro de cuatro drogas sobre cepas resistentes sensibles. Gac.Vet. 368: 165-174. 1982.
87. PALLADINO, M.R.; CAMPERO, C.M.; VILLAR, J.A. Resistencia de *Trichomonas foetus* a tricomonicidas. Parte II. Prueba en hamster Gac.Vet. 370: 400-406; 1982.
88. PARSONSON, I.M.; CLARK, B.L.; DUFTY, J. The pathogenesis of *Trichomonas foetus* infection in the bull. Aust.Vet.J. 50: 421-423. 1974.
89. PARSONSON, I.M.; CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. Early pathogenesis and pathology of *Trichomonas foetus* infection in virgin Heifers. J. Comp. Path. 86:59-66. 1976.
90. PLASTRIDGE, W. Cultivation of a bacteria free strain of *Trichomonas foetus*. J. Bact., 45: 196-197. 1943.
91. REECE, R.L.; DENNETT, D.P.; JOHNSON, R.H. *Trichomonas foetus* agglutination tests upon samples collected from cattle; cross reactions associated with vaccination against *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Aust. Vet.J. 57: 352; 1981.
92. ROBERTS, R.M.; STOESEL, F.R.; VILLAR, J.A. Investigación de la Vibriosis y Trichomoniasis en el ganado bovino de la Rep. Argentina (comunicación). Boletín Técnico N° 52; INTA EERA Balcarce, 1967. •

93. ROBERTS, R.M.; STOESEL, F.R.; BRIANO, R.F.; VILLAR, J.A. Trichomoniasis y Vibriosis bovina en la República Argentina. Bol.Tec. 64, INTA-EERA Balcarce, 1967.
94. ROBERTS, S.J. Obstetricia Veterinaria y Patología de la reproducción (Teriogenología). Traducido por Eduardo Prieto.Ira. Edición, Bs.As. (Argentina), Edt. Hemisferio Sur. 1979. 1020 pp., 522-536.
95. ROGERS, R.J.; FLANAGAN, M.; HILL, M.W. A survey of infectious causes of Reproductive failure in beef cattle in north-eastern Australia. Aust.Vet.J., 48; 203-207. 1972.
96. ROMANO, L.A. Relevamiento reproductivo en tambos de la Cuenca Lechera Santaefecina. Rev. de la Escuela de Agronomía y Veterinaria de Esperanza, Santa Fe. Vol. 1 N° 1, 1977.
97. SANTOS, S.M., AMARAL, V., REBOUCAS, M.M. Observacoes sobre a multiplicacao do Tritrichomonas foetus (Ried Muller, 1928) em solucao salina balanceada de Hanks. XIV Congresso brasileiro de Medicina Veterinaria. Sao Paulo; 3 (18): 64; 1974.
98. SANTOS, S.M.; AMARAL, V.; REBOUCAS, M.M. Observacoes sobre o cultivo do Tritrichomonas foetus (Riedmuller, 1928). Nos meios de Kupferberg e solucao salina balanceada de Hanks. XIV Congresso brasileiro de Medicina Veterinaria. Sao Paulo. 3 (18); 64-65; 1974.
99. SANTOS, S.M., do AMARAL, V. Tricomfase bovina: Métodos de coleta de material para fins diagnósticos.O.Biológico (S. Paulo), 40 (12): 342-352; 1974.
100. SANTOS, S.M.; do AMARAL, V.; REBOUCAS, M.M. Observações sobre a distribuicao do Tritrichomonas foetus (Riedmuller, 1928) en bovinos do Estado de Sao Paulo, Brasil. O. Biológico (S. Paulo), 41 (8): 234-237, 1975.

101. SIMMONS, G.S.; LAWS, L. Observations on bovine trichomoniasis. 1.T. foetus infection in three heifers. 2. T. foetus infection in a bull. Aust. Vet. J., 33: 249-253, 1957.
102. SIMPSON, C.F.; WHITE, F.H. Structure of Trichomonas foetus as revealed by electron microscopy. Am. J. Vet. Res., 25 (106): 815-824, 1964.
103. SLEDGE, W.E.; LARSON, A.D.; HART, L.T. Costae of Tritrichomonas foetus: Purification and Chemical composition. Science, 199 (4325): 186-188. 1978.
104. SPATH, E.J.A.; GONZALEZ, R.N.; GONZALEZ de RIOS, L.; CONDRON, R.J.; NOGUES, E.M.; GUGLIELMONE, A.A.; KUHNE, G.I., BROADBENT, D.W.; HABICH, G.E. Estudios sobre sanidad animal en el noroeste argentino. V. Brucelosis, tuberculosis, trichomoniasis y vibriosis en tambos de Tucumán y otras características sanitarias y de explotación de estos. Gac. Vet. 343: 506-517. 1979.
105. STALHEIM, O.H.V.; GALLAGHER, J.E. Effects of Mycoplasma spp. Trichomonas fetus, and Campylobacter fetus on ciliary activity of bovine uterine tube organ cultures. Am.J.Vet.Res, 36 (8): 1077-1080; 1975.
106. STOESSEL, F.R.; BRIANO, R.F. Algunos resultados de tratamientos con trichomonocidas. Boletín Técnico N° 72, INTA-EERA Balcarce, 1968.
107. STOESSEL, F.R. Trichomoniasis y Vibriosis. Bol.Téc.74, INTA EERA Balcarce, 1971.
108. STOESSEL, F.R.; HABERKORN, S.E. Efecto del metanosulfonato de dimetridazole inyectado por vía intramuscular o subcutáneo como trichomonocida en los toros. Gac.Vet. 323: 457-461. 1977.
109. STOESSEL, F.R.; HABERKORN, S.E.M. Leche descremada como medio de cultivo para trichomonas foetus. Gac.Vet. 327;24-32. 1978.

110. STOESEL, F.R.; HABERKORN, S.E.M. Estudio comparativo entre el método del raspador a resorte y el del lavaje prepucial en el diagnóstico de tricomoniasis y vibriosis genital bovina. *Gac.Vet.* 330:270-279; 1978.
111. STOESEL, F.R. Las enfermedades venereas de los bovinos; tricomoniasis y vibriosis genital. Zaragoza, España. Ed.Acribia, 1982, pp. 163; 13-56.
112. SUTHERLAND, A.K.; SIMMONS, G.C.; BELL, A.T. An outbreak of bovine tricomoniasis. Part.2: Diagnosis. *Aust.Vet.J.* 29:67-69; 1953.
113. SUTKA, P.; KATAI, P.L. Rapid demonstration of bull *Trichomonas* in unstained smear preparations from preputial scrapings. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 19(4): 385-389, 1969.
114. TEDESCO, L.F., ERRICO, F.; DEL BAGLIVI, P. Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital *Vibriosis* in the bull. *Aust.Vet.J.* 53: 470-472; 1977.
115. TEDESCO, L.F.; ERRICO, F.; DEL BAGLIVI, L.P. Diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls using two sampling methods and a transport medium. *Aust.Vet.J.* 55: 322-324; 1979.
116. THE OXOID MANUAL. Thir Edition (Reprint). London Published by Oxoid Limited. 1969, pp. 310, 260-266.
117. TODOROVIC, R.; McNUTT, S.H. Diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls. *Am.J.Vet.Res.*, 28(126); 1581-1590; 1967.
118. TURNBULL, B.P.A. An Abattoir survey of bull genitalia. *Aust.Vet. J.*, 53:274-279, 1977.
119. VILLA, C.E. Tricomoniasis: la importancia de obtener una buena muestra para su diagnóstico por cultivo. *Gac.Vet.* 370: 438-442, 1982.

120. VILLALBA PALACIOS J.A. Resultados obtenidos luego del tratamiento de toros afectados de Trichomoniasis y Vibriosis. Rev.Med. Vet., 55(5): 431-435. 1974.
121. VILLAR, J.A.; PALLADINO, M.R.; CAMPERO, C.M. Tricomoniiasis bovina: Resistencia a tratamientos, un problema actual. Gac.Vet. 365: 892-893. 1981.
122. VILLAR, J.A.; SPINA, M.E. Tricomoniiasis bovina; Una recopilación de datos sobre su incidencia en el período 1966-1977. Gac. Vet. 371: 544-554. 1982.
123. WILSON, S.K., KOCAN, A.A. The prevalence of Trichomoniasis in Oklahoma Beef bulls. Bov.Pract. 14:109-110, 1979.
124. WITHERSPOON, D.M.; WALKER, D.F. New way to diagnose Trichomoniasis in Bulls. Mod.Vet.Pract. 17:50-54. 1966.
125. WOSU, L.O. Trichomonas infection in a bull. An Apparent change in serotype of the infecting organism. Aust.Vet.J. 53: 340-341, 1977.
126. WOSU, L.O. Improved cultural methods for trichomonas foetus. Vet. Microbiol., (2): 89-93; 1977.

AGRADECIMIENTOS

- A los Doctores:

- . Jorge A. Villar
- . Mario R. Palladino
- Anselmo Odeón

- Al Ing. Agr. José Luis Bustamante

- A los ayudantes de Laboratorio:

- Mirta E. Spina
- Mabel Altuna

- A los ayudantes de Campo:

- Hugo Erquiaga
- Aquelay Muñoz
- Guillermo Di Gerónimo

- A la Secretaría del Departamento de Producción Animal.



La Facultad no se hace solidaria con las
opiniones vertidas en este trabajo.