

DIAGNÓSTICO DE TRICOMONOSIS BOVINA EN TOROS REPRODUCTORES DE LAS REGIONES HUETAR NORTE Y PACÍFICO NORTE DE COSTA RICA

Diagnosis of bovine trichomoniasis in breeding bulls from the North Huetar and North Pacific regions of Costa Rica

Navarro L^{1*}, Urbina A², Chacón J¹

¹Programa de Investigación en Andrología Animal Aplicada, ²Laboratorio de Zoonosis
Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica

*E-mail de contacto: leonel.navarro.rojas@una.cr

RESUMEN

La tricomonosis bovina es una enfermedad venérea que afecta seriamente la economía de la industria ganadera causando muerte embrionaria y disminución de la eficiencia reproductiva del hato. Se tomaron muestras de esmegma prepucial en 504 toros reproductores con experiencia sexual previa. Cada muestra se cultivó e incubó inmediatamente en el medio InPouch TF® para la detección de *Tritrichomonas foetus*. Los cultivos se examinaron diariamente a intervalos de 24 horas bajo microscopía de contraste de fase durante siete días. Posteriormente, se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para confirmar o descartar la presencia del ADN del parásito. Todos los toros examinados fueron negativos para la infección por *T. foetus* en ambos métodos de diagnóstico. Estos resultados difieren del informe previo en 1992, en el cual se reportó la prevalencia de esta enfermedad en el país diagnosticada en muestras de esmegma cultivadas. Es probable que la aplicación de herramientas de control productivo y de salud de hato en las fincas incorporadas en el presente estudio, pueda haber contribuido al resultado obtenido, en contraste con el manejo más extensivo en las explotaciones evaluadas en 1992. El presente estudio incorporó por primera vez en Costa Rica técnicas de diagnóstico molecular por ADN de *Tritrichomonas foetus*.

Palabras clave. Reproducción bovina, *Tritrichomonas foetus*, diagnóstico de laboratorio, InPouch TF®, PCR.

ABSTRACT

Bovine trichomonosis is a venereal disease affecting seriously the economy of livestock industry due to embryo losses and decreasing the reproductive efficiency of the herd. Preputial smegma samples were collected from 504 breeding bulls and immediately cultured and incubated in InPouch TF® media for detection of *Tritrichomonas foetus*. Cultures were examined daily at 24 hours interval under phase contrast microscopy for seven days. Thereafter, a conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to confirm or discard the presence of the *T. foetus* DNA. All the bulls tested negative for *T. foetus*. These results differ from the previous report published in 1992 regarding the diagnosis of trichomonosis in Costa Rica using smegma cultured. However, the current study incorporated for the first time in Costa Rica the use of molecular diagnosis for *T. foetus*. It is likely that the application of current sanitary and husbandry conditions in the farms could have contributed to the output reported, in contrast to the more extensive management practices in the farms tested in 1992.

Key words. Bovine reproduction, *Tritrichomonas foetus*, laboratory diagnosis, InPouch TF®, PCR.

Introducción

La tricomonosis bovina (TB) es una enfermedad de transmisión exclusivamente venérea (Peter 1997, Collantes-Fernández *et al.* 2019). La infección es causada por el protozoo flagelado *Tritrichomonas foetus*, que coloniza los pliegues del epitelio prepucial y mucosa del pene en los toros, los cuales se convierten en portadores crónicos asintomáticos (BonDurant 1997). Los machos infectados no muestran

cambios histopatológicos en sus órganos reproductivos ni en la calidad del semen (Clark 1971; Campero *et al.* 2017), no obstante, se ha demostrado mediante trabajos *in vitro* una citotoxicidad sobre los espermatozoides por parte de productos extracelulares secretados por *T. foetus*, la cual genera una reducción de la motilidad progresiva, aunque sin afectar la viabilidad espermática (Ribeiro *et al.* 2010). La

Recibido: Marzo 2024

Aceptado: Mayo 2024

disminución de la fertilidad en las hembras bovinas, caracterizada por pérdidas tempranas de embriones y ciclos estrales irregulares son signos comunes en los rodeos infectados, así como abortos en menor frecuencia (Felleisen 1999; Anderson 2007; Campero et al. 2017). La TB se considera una de las principales causas de reducción de la eficiencia reproductiva en los rodeos bovinos, teniendo una distribución global en donde se manejen las pasturas compartidas y donde la monta natural es el principal sistema de reproducción (Pérez et al. 1992; Mshelia et al. 2010; Yao 2013). Los tratamientos farmacológicos y vacunas se consideran usualmente ineficaces para el control de *T. foetus* (Campero y Cobo 2006; Cobo et al. 2009; Baltzell et al. 2013). Por lo tanto, los toros infectados deben ser eliminados del rodeo, siendo el principal reservorio y diseminador de la enfermedad por su carácter de portador asintomático (BonDurant 1997). En el caso de las hembras se consideran capaces de eliminar la infección de *T. foetus* si permanecen en reposo sexual durante al menos tres ciclos reproductivos (BonDurant 1997; Peter 1997; Rae et al. 2004). Sin embargo, se ha demostrado que algunas hembras permanecen infectadas durante más de un año, siendo una fuente de infección en el rodeo. Esta persistencia de la infección en las hembras podría depender de la patogenicidad y de los mecanismos de evasión de las cepas de *T. foetus* frente a la respuesta inmune del huésped (Corbeil et al. 1998).

La prevalencia reportada de TB a nivel mundial es variada dependiendo de la zona, registrándose tasas de infección desde 0% hasta 44% (Kyasnicka et al. 1989; BonDurant et al. 1990; Pérez et al. 1992; Rae et al. 2004; Filho et al. 2018). Estas diferencias se han atribuido a la sensibilidad y especificidad de la técnica de diagnóstico, el genotipo del ganado y la presencia en mayor o menor grado de ciertos factores de riesgo para la TB (Pérez et al. 1992; Rae et al. 2004).

Para el diagnóstico de TB tradicionalmente se ha utilizado la detección por microscopía de *T. foetus* en al menos 3 raspados o lavados prepuciales (Kimsey et al. 1980; Kittel et al. 1998). No obstante, el método de diagnóstico más comúnmente utilizado es el cultivo de esmegma prepucial o de secreciones vaginales en medios como el Diamond's (Parker et al. 2003a), Plastringe (Martinez et al. 1985) o InPouch TF® (Borchardt et al. 1992). En el caso del InPouch TF® es un medio selectivo que permite el mantenimiento, transporte y multiplicación del patógeno, mientras que inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes (Rodning et al. 2008), reportándose una sensibilidad aproximada del 82%, incluso en toros sexualmente activos en el momento del muestreo (Pérez et al. 1992; Grahn et al. 2005). Un inconveniente ocasional de las técnicas de cultivo ha sido el diagnóstico de falsos positivos por la presencia de tricomonas no patógenos en muestras prepuciales, usualmente de origen intestinal (Taylor et al. 1994; BonDurant 1999; Hayes et al. 2003; Parker et al. 2003b; Cobo et al. 2003; Corbeil et al. 2008; Kennedy et al. 2008; Yao 2013; Michi et al. 2016; Irons et al. 2022). También se ha descrito que el diagnóstico utilizando únicamente los medios de cultivo y su observación al microscopio poseen una limitada sensibilidad, ya que a pesar de que esta puede estar entre el 84% al 96% en

condiciones experimentales (Parker et al. 2003a), la misma puede reducirse bajo condiciones de campo (Mukhufhi et al. 2003). En la actualidad para el diagnóstico del *T. foetus* se utiliza la combinación de los cultivos con métodos moleculares de detección de ADN como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una sensibilidad y especificidad alta (Felleisen et al. 1998; Campero et al. 2003; Michi et al. 2016; Rodning et al. 2008). El empleo de ambos métodos de manera complementaria ha demostrado ser idóneo para el diagnóstico de TB (Mukhufhi et al. 2003; Michi et al. 2016; Irons et al. 2022).

El único estudio para determinar la prevalencia de TB en rodeos bovinos de Costa Rica fue en 1992, utilizando el medio InPouch TF®. Se determinó una prevalencia por rodeo de 6,7% (6/89) y 15,9% (10/63) y por toro de 3,9% (6/153) y 6,2% (14/225) en las zonas de Tilarán y San Carlos, respectivamente (Pérez et al. 1992). Ante la ausencia de datos actualizados sobre el diagnóstico de *T. foetus* en Costa Rica, el objetivo del presente estudio fue estudiar su presencia mediante cultivo y PCR en muestras de esmegma prepucial de toros provenientes de rodeos lecheros, de doble propósito y dedicados a la cría de ganado para carne en las zonas Huetar Norte (HN) y Pacífico Norte (PN) del trópico costarricense.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio

El estudio se realizó en establecimientos ganaderos ubicadas en las zonas Huetar Norte (HN) y Pacífico Norte (PN) de Costa Rica, durante el período 2018-2020. Ambas regiones concentran la mayor población bovina del país (333.566 y 281.500 cabezas, respectivamente) (INEC 2015).

Selección de los establecimientos y tamaño de muestra

Los establecimientos participantes en el muestreo corresponden a explotaciones ganaderas pertenecientes a programas de salud de rodeos ejecutados por la Universidad Nacional de Costa Rica y cámaras de productores adscritas, y contempló en todos los casos el interés y previo consentimiento de estas para participar en el estudio. El cálculo de la muestra mínima de toros a evaluar (n=379) se determinó con base en un margen de error de 0.02, con un intervalo de confianza del 95% y una prevalencia esperada en toros del 5%, con base en el último informe de TB en la misma región geográfica (Pérez et al. 1992). La muestra superó el tamaño mínimo en un 33%, permitiendo examinar 504 toros distribuidos en 157 establecimientos. Todos los toros muestreados estaban en monta natural.

Encuesta y toma de las muestras para el diagnóstico de TB

Se registró información sobre el manejo productivo y reproductivo en los establecimientos, edad y raza de los toros, número de animales por rebaño, relación vaca-toro, así como si estaban en reposo sexual o no al momento del muestreo. Para la recolección de las muestras de esmegma prepucial, cada toro fue inmovilizado en un cepo de trabajo. Posteriormente se cortaron los pelos del orificio prepucial y se limpió el mismo con gasa estéril, hasta aproximadamente 5 cm de profundidad en la cavidad (BonDurant 1985). Seguidamente, se aplicó un vigoroso masaje manual externo

a lo largo de la vaina del prepucio, dando énfasis a la zona caudal cercana al cuello escrotal. La muestra de esmegma se colectó mediante succión con una vaina de plástico rígido desechable introducida hasta el fórnix provocando un vacío con una jeringa estéril de 30 ml. Una vez tomada la muestra, se cultivó inmediatamente en el medio InPouch TF® (Biomedical diagnostics), acorde con Pérez *et al.* (1992) e instrucciones del fabricante. Cada medio fue identificado e incubado a 37°C y transportado al Laboratorio de Andrología de la Universidad Nacional para su posterior observación.

Cultivo y observación microscópica de *Tritrichomonas foetus*

Todos los medios InPouch TF® se examinaron a intervalos de 24 horas durante siete días consecutivos, comenzando el día posterior al muestreo. En cada cultivo se buscó la presencia o no de protozoarios flagelados viables mediante observación directa del InPouch TF® bajo microscopía de contraste de fase (400x, Zeiss®, modelo 872E, Alemania) de la misma forma descrita por BonDurant *et al.* (1990) y Pérez *et al.* (1992). Posterior al período de observación de 7 días, todos los cultivos fueron enviados al Laboratorio de Zoonosis de la Universidad Nacional para realizar el diagnóstico molecular mediante la prueba de PCR, utilizando el protocolo descrito por Felleisen *et al.* (1998).

Extracción y detección de ADN de *Tritrichomonas foetus* mediante PCR

Para la extracción de ADN se utilizaron 500 µl de cada medio de cultivo. Las muestras se centrifugaron (1500 g) (Beckman JE6B, Alemania) durante 10 min y el ADN se extrajo de los sedimentos utilizando el kit Dneasy Blood & Tissue® (Qiagen Laboratories, Maryland, EEUU), según el protocolo del fabricante. Cepas de *T. foetus* y *Tetratrichomonas* spp. mantenidos en cultivos InPouch TF® se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente, las cuales fueron identificadas, cultivadas y facilitadas para este trabajo por parte del Laboratorio Azul de Balcarce, Argentina.

Los *primers* utilizados para la PCR fueron el TFR1 (5'-TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC-3') y TFR2 (5'-CTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3') que amplifica un segmento de 372 pb común en *Trichomonas* spp., así como el TFR3 (5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACGAACC-3') y TFR4 (5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA-3') que amplifica un segmento de 347 pb específico de *T. foetus* (Felleisen 1997; Felleisen *et al.* 1998), y permite la diferenciación de este protozoario de otras *Trichomonas* comensales habitantes del tracto gastrointestinal (Campero *et al.* 2003). La PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720 de Applied Biosystems. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de reacción de 25 µl, (5 µl de 2X Dream Taq PCR Master Mix® (Thermo Fisher Scientific, Whatman, MA, EEUU), 2 µl de cada uno de los *primers*, 13 µl de agua y 5 µl de muestra de ADN), 1 ciclo de desnaturalización inicial a 90°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación a 67°C durante 30 segundos, extensión durante 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final a

72°C durante 7 segundos. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agar al 2%.

Resultados

De los 157 establecimientos muestreados, 79 (50,2%) y 78 (49,8%) estaban en las regiones PN y HN de Costa Rica, respectivamente. Al desglosar las explotaciones según el sistema de producción, el 55,4% (n=87), 24,2% (n=38) y 20,4% (n=32) pertenecían a rodeos bovinos lecheros, doble propósito y cría de carne, respectivamente. La mayoría de los productores reportaron el uso de registros productivos y reproductivos (95,4% versus 86,8% y 81,3%; p<0,05) y asistencia veterinaria (83,9% versus 47,4% y 50%; p<0,0001) en lecherías en comparación con doble propósito y hatos de cría de ganado de carne, respectivamente.

Acorde al sistema de producción, de los 504 toros evaluados, el 29,3% (n=148), 29,8% (n=150) y 40,9% (n=206) se distribuyeron en rodeos lecheros, de doble propósito y carne, respectivamente. El número promedio de cabezas de ganado por rodeo y de vacas por toro fue de 172,8±164,1 y 53,1±46,0, respectivamente. La edad promedio de los toros fue de 50,6±21,8 meses (rango 18-144), siendo el 52,4% mayores a 4 años. Además, la proporción de toros acorde al genotipo fue de 42,9% (n=216), 32,9% (n=166) y 24,2% (n=122) para *Bos taurus*, *Bos indicus* y cruza *Bos indicus* × *Bos taurus*, respectivamente.

En cuanto a las prácticas de manejo reproductivo, el 74,4% (n=375) de las explotaciones reportaron monta natural continua, mientras que estacional y controlada representaron un 13,7% (n=69) y 11,9% (n=60), respectivamente, siendo el periodo estacional de entre 3 y 6 meses dependiendo de la zona. La monta controlada es cuando las hembras son llevadas a servicio con el macho en el momento del celo. En cuanto al sistema de empadre, 66,5% (n=335) y 31,9% (n=161) reportaron practicar padre sencillo y múltiple, respectivamente, considerándose empadre sencillo cuando un solo toro se maneja con un grupo de vacas y múltiple cuando se maneja dos o más toros por grupo. Otras prácticas como la rotación de toros se registraron en un 1,6% (n=8). De los toros que se muestrearon, 209 (41,5%) se encontraban con al menos 15 días de descanso sexual previo versus 295 (58,5%) que se encontraban en monta, al momento del muestreo. La monta natural prevaleció como único sistema de crianza en los establecimientos independientemente del sistema de producción (54,0% en lechería, 73,7% en doble propósito y 62,5% en hatos de carne).

Respecto a otras prácticas de manejo reproductivas, el 8,3% de los ganaderos (13/157) reportaron la costumbre de intercambiar toros entre fincas vecinas. La compra de toros con experiencia sexual previa fue reportada por un 35% (55/157). Además, el 11,5% de los productores indicó acostumbrar a comprar toros y novillas de reemplazo en subastas comerciales de ganado (18/157).

No se detectaron casos de TB en ninguno de los 504 toros muestreados con los métodos utilizados para el diagnóstico en el presente estudio (tanto el cultivo utilizando medio InPouch TF como por el método PCR).

Discusión

La TB es una enfermedad venérea altamente contagiosa reportada en rodeos de ganado bovino con uso de servicio natural. En particular, se ha descrito que los toros mayores a los 4 años, en sistemas de empadre múltiple y con una alta proporción hembra-toro tienen un mayor riesgo de infección (Pérez *et al.* 1992). La profundidad de los pliegues de la mucosa prepucial aumenta significativamente en toros mayores de 4-5 años, proporcionando un ambiente óptimo para el crecimiento y persistencia de *T. foetus* (Clark *et al.* 1974; Pérez *et al.* 1992; BonDurant 1997; Michi *et al.* 2016). Además, a medida que el toro envejece, aumenta el riesgo de infección asociado a la mayor cantidad de exposición tras montas (Pérez *et al.* 1992; Michi *et al.* 2016). De manera similar, compartir toros reproductores entre granjas, junto con el hábito de adquirir animales de reemplazo en remates comerciales, también puede aumentar el riesgo de contagio (Campero 2002; Mardones *et al.* 2008).

El toro, debido a su característica de portador crónico, es el principal objetivo para el diagnóstico, siendo el esmegma prepucial el material más adecuado (BonDurant *et al.* 1990; Parker *et al.* 2003c). Las pruebas de diagnóstico actuales incluyen el cultivo y técnicas moleculares (Felleisen *et al.* 1998; Campero *et al.* 2003; Yao 2013; Irons *et al.* 2022). La capacidad de detección de *T. foetus* se mejora complementando métodos de cultivo con pruebas moleculares (Ondrak *et al.* 2010; Yao 2013; Michi *et al.* 2016; Irons *et al.* 2022). Recientemente Silveira *et al.* (2020), sobre 310 toros negativos mediante cultivo, 7 de ellos resultaron positivos luego de reevaluarlos con PCR. Este mismo principio se utilizó en el presente informe y arrojó una prevalencia del 0% en los toros muestreados para *T. foetus*.

Si bien la ausencia de toros positivos en el presente estudio difiere de lo reportado previamente por Pérez *et al.* (1992), quienes demostraron una prevalencia por rodeo de 6,7% y 15,9% en la misma área geográfica, se deben tomar en cuenta varios factores que posiblemente expliquen esta diferencia. Un factor importante es el periodo de descanso sexual previo a la toma de la muestra para el diagnóstico de *T. foetus*. En este estudio un 41,5% de los machos examinados tenían al menos 15 días de descanso sexual previo al muestreo, no obstante, el restante 58,5% estaban en servicio continuo, lo que podría influir en la no presencia del agente en este muestreo, ya que esta condición puede reducir la sensibilidad del diagnóstico (Noakes *et al.* 2001; Ondrak *et al.* 2010; Rodning *et al.* 2008).

Otra consideración que puede explicar los diferentes resultados entre ambos estudios es que la mayoría de los rodeos muestreados por Pérez *et al.* (1992) pertenecían a establecimientos de ganado de carne. Estos practicaban condiciones de manejo extensivas, incluida la falta de registros reproductivos y una gestión deficiente en programas de salud reproductiva, como una pobre frecuencia de asistencia veterinaria y ausencia de controles sanitarios, condiciones que sin duda podrían haber aumentado el riesgo de infección y la consiguiente permanencia de toros positivos en los rebaños. De hecho, los establecimientos positivos estaban epidemiológicamente asociados con una alta presencia de dichos factores de riesgo (Pérez *et al.* 1992). La ausencia de casos positivos en el informe actual podría

respaldarse por la menor frecuencia de préstamos de toros entre fincas y el menor uso de empadre múltiple comparado con el estudio de 1992 (8,3% versus 25,4% y 32% versus 66%, respectivamente). Además, alrededor del 88% de los productores examinados informaron el uso de registros productivos y reproductivos, en los cuales contaban con parámetros aceptables en su gran mayoría, así como recibir asistencia veterinaria de forma rutinaria, siendo ambos factores posibles factores que influyan en la ausencia de casos del *T. foetus* en los establecimientos evaluados.

Cabe destacar que similares resultados han sido señalados en Argentina, en donde se ha reportado una reducción en la prevalencia de la infección por *T. foetus*, pasando de un 29,1% en el año 2001 al 9,3% para el año 2006 en la provincia de Buenos Aires (Rojas *et al.* 2011). Mientras que Molina *et al.* (2020) reportan una disminución en la prevalencia de este agente del 7,48% al 3,06% en el periodo comprendido entre los años 2007 y el 2013, respectivamente, en La Pampa, Argentina. Repiso *et al.* (2005) no encontraron casos de TB en Uruguay luego de muestrear 1754 toros, y recientemente, Silveira *et al.* (2020) informaron una prevalencia del 2,25% en 310 toros evaluados. Esta disminución de la prevalencia de TB en estos países se ha atribuido al diagnóstico temprano y descarte inmediato de toros infectados y mejoras en los programas de manejo reproductivo (Silveira *et al.* 2020; Campero *et al.* 2021).

Por otra parte, se ha descrito que el tamaño de los rodeos puede inferir en la prevalencia de *T. foetus*. Se ha demostrado que rodeos de tamaño pequeño o mediano (100-499 vacas) presentan una prevalencia menor de TB comparado con rodeos de gran tamaño (≥ 500 vacas) (Rae *et al.* 2004). Esta situación debería ser tomada en cuenta en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que los establecimientos muestreados presentaron en promedio 173 hembras bovinas.

Finalmente cabe mencionar que según Rodning *et al.* (2008) existen varios factores que pueden explicar esta reducción en la prevalencia de TB, en los cuales incluyen el origen de la muestra, el tamaño de los rodeos, la técnica del muestreo y la evaluación de la muestra mediante métodos con mayor sensibilidad y especificidad. Por ende, para futuros muestreos se debe tener en cuenta que la prevalencia puede llegar a ser más representativa si se muestrea una población aleatoria o en la cual se determine la presencia de factores de riesgo, así como rodeos en los cuales se presenten bajos índices de fertilidad, lo cual, en conjunto con la utilización de técnicas de diagnóstico molecular, podría reflejar de manera más precisa la situación actual de *T. foetus* en Costa Rica.

Conclusiones

Los resultados de este estudio sugieren que las prácticas sanitarias implementadas en los establecimientos investigados pueden explicar la ausencia de *T. foetus* en los animales muestreados en este estudio. No obstante, este resultado nunca debe interpretarse como una subestimación de la importancia de la infección por *T. foetus* en los rodeos bovinos. Por el contrario, persiste la necesidad de implementar el diagnóstico rutinario de esta enfermedad venérea en los establecimientos de producción bovina del país.

Agradecimientos

Agradecemos profundamente el apoyo otorgado por el personal del INTA Balcarce-Argentina, por brindar los controles y capacitación para el diagnóstico de los agentes estudiados. Especialmente a sus funcionarios Dora Beatriz Cano y Dr. Carlos Campero (INTA, Balcarce, Argentina). Este estudio recibió apoyo financiero del proyecto UEPS-CRIOSEMEN del laboratorio de Andrología de la Universidad Nacional (SIA-UNA 020-05) y del Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT), Costa Rica.

Contribuciones de los autores

Navarro L: cultivo de muestras y diagnóstico de laboratorio, recolección de datos, edición del manuscrito. Urbina A: diseño experimental, diagnóstico de laboratorio, edición del manuscrito. Chacón J: diseño experimental, cultivo de muestras, diagnóstico de laboratorio, recolección de datos, edición del manuscrito.

Consideraciones de ética y bienestar animal

Los autores declaran que los animales muestreados para cumplir con los objetivos del estudio fueron manejados de acuerdo con los requisitos de ética de bienestar y derechos de los animales del país (Ley 7451, CR-Gobierno del 16 de noviembre de 1994).

Bibliografía

- Anderson ML (2007) Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology* **68**, 474-486.
- Baltzell P, Newton H, O'Connor AM (2013) A critical review and metaanalysis of the efficacy of whole-cell killed *Tritrichomonas foetus* vaccines in beef cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **27**, 760-770.
- BonDurant RH (1985) Diagnosis, treatment, and control of bovine trichomoniasis. *The Compendium on Continuing Education* **7**, S179-188.
- BonDurant RH, Anderson ML, Blanchard P, Hird D, Danaye-Elmi C, Palmer C, Sisco WM, Suther D, Utterback W, Weigler BJ (1990) Prevalence of trichomoniasis among California beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **196**, 1590-1593.
- BonDurant RH (1997) Pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **13**, 345-361.
- BonDurant RH, Gajadhar A, Campero CM, Johnson E, Lun Z-R, Nordhausen RW, Van Hoosear KA, Villanueva MR, Walker RL (1999) Preliminary characterization of a *Tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial smegma of virgin bulls. *The Bovine Practitioner* **33**, 124-127.
- Borchardt KA, Norman BN, Thomas MW, Harmon WM (1992) Evaluation of a new culture method for diagnosing *Tritrichomonas foetus* infection. *Veterinary Medicine* **87**, 104-112.
- Campero CM (2002) Pérdidas ocasionadas por las enfermedades venéreas de los bovinos. *Revista Idia* **21**, 127-131.
- Campero CM, Rodríguez Dubra C, Bolondi A., Cacciato CS, Cobo ER, Pérez SE, Odeón A, Cipolla A., BonDurant RH (2003) Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus trichomonads* from genitalia or virgin beef bulls in Argentina. *Veterinary Parasitology* **112**, 167-175.
- Campero CM, Cobo ER (2006) *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. *Revista de Medicina Veterinaria* **87**, 47-56.
- Campero CM, Cantón GJ, Moore DP (2017) Tricomoniasis bovina. En 'Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos: diagnóstico y control'. (Eds. CM Campero, GJ Cantón, Moore DP) pp. 67-192. (Hemisferio Sur: Buenos Aires, Argentina).
- Campero CM, Martínez A, Combessies G (2021) Las enfermedades de transmisión sexual en los bovinos. Tricomoniasis y Campylobacteriosis. En 'Toros para carne: evaluación sanitaria y productiva'. (Eds CM Campero, JA Bartolomé, LM Campero) pp. 383-422. (Hemisferio Sur: Buenos Aires, Argentina).
- Clark BL (1971) Review of bovine vibriosis. *Australian Veterinary Journal* **47**, 103-107.
- Clark BL, Parsonson IM, Dufty JH (1974) Experimental infection of bulls with *Tritrichomonas foetus*. *Australian Veterinary Journal* **50**, 189-191.
- Collantes-Fernández E, Moreno-Gonzalo J, Sánchez-Sánchez R., García-Bocanegra I, Horcajo P, Ortega-Mora LM (2019) Prevalence of bovine trichomonosis and associated risk factors in bulls from Spanish beef herds. *Theriogenology* **128**, 116-121.
- Corbeil LB, Anderson ML, Corbeil RR, Eddow JM, BonDurant RH (1998) Female reproductive tract immunity in bovine trichomoniasis. *American Journal of Reproductive Immunology* **24**, 189-198.
- Corbeil LB, Campero CM, Van Hoosear K, BonDurant RH (2008) Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. *Veterinary Parasitology* **154**, 226-232.
- Cobo ER, Campero CM, Mariante RM, Benchimol M (2003) Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from preputial smegma of virgin bulls. *Veterinary Parasitology* **117**, 195-211.
- Cobo ER, Corbeil LB, Gershwin LJ, BonDurant RH (2009) Preputial cellular and antibody responses of bulls vaccinated and/or challenged with *Tritrichomonas foetus*. *Vaccine* **28**, 361-370.
- Felleisen RS (1997) Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* **115**, 111-119.
- Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B (1998) Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 513-519.
- Felleisen RS (1999) Host parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes and Infection* **1**, 807-816.
- Filho RBO, Malta KC, Borges JM, Oliveira PRF, Filho GJDS, Nascimento GG, Mota RA, Júnior JWP (2018) Prevalence and risk factors associated with *Tritrichomonas foetus*

- infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. *Acta Parasitológica* **63**, 346-353.
- Grahn RA, BonDurant RH, van Hoosear KA, Walker RL, Lyons LA (2005) An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Parasitology* **127**, 33-41.
- Hayes DC, Anderson RR, Walker RL (2003) Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation* **15**, 390-394
- [INEC] Instituto Nacional de Estadística y Censos (2015) VI Censo Nacional Agropecuario. San José, Costa Rica.
- Irons PC, McGowan M, de Assis PM, Randhawa I, Awawdeh L, Mugwabana J, Barnes TS, Boe-Hansen G, McCosker K, Fordyce G (2022) Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in beef bulls slaughtered at two abattoirs in northern Australia. *Australian Veterinary Journal* **100**, 201-204.
- Kennedy JA, Pearl D, Tomky L, Carman J (2008) Pooled polymerase chain reaction to detect *Tritrichomonas foetus* in beef bulls. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 97-99.
- Kimsey PB, Darien BJ, Kendrick JW, Franti CE (1980) Bovine trichomoniasis: Diagnosis and treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **177**, 616-619.
- Kittel DR, Campero CM, Van Hoosear KA, Rhyhan JC, BonDurant RH (1998) Comparison of diagnostic methods for detection of active infection with *Tritrichomonas foetus* in beef heifers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **213**, 519-522.
- Kyasnicka WG, Taylor RE, Huang JC, Hanks D, Tronstad RJ, Bosomworth A, Hall MR (1989) Investigations of the incidence of bovine trichomoniasis in Nevada and of the efficacy of immunizing cattle with vaccines containing *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology* **31**, 963-971.
- Mardones FO, Perez AM, Martínez A, Carpenter TE (2008) Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology* **153**, 231-237.
- Martinez AH, Bardon JC, Nosedá RP, Cordeviola JM (1985) Diagnóstico de trichomoniasis en toros. Propuesta de un esquema de diagnóstico. *Veterinaria Argentina* **220**, 966-977.
- Michi AN, Favetto PH, Kastelic J, Cobo ER (2016) A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* **85**, 781-791.
- Molina LL, García A, Angón E, Moralejo R, Caballero-Villalobos J, Perea J (2020) Incidence, prevalence and persistence of bovine venereal diseases in La Pampa (Argentina): estimations for the period 2007 - 2020. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* **52**, 1.
- Mshelia GD, Amin JD, Woldehiwet Z, Murray RD, Egwu G (2010) Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: Geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in Domestic Animals* **45**, 221-230.
- Mukhufhi N, Irons PC, Michel A, Peta F (2003) Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: Effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogenology* **60**, 1269-1278.
- Noakes D, Parkinson T, England G, Arthur H (2001) Specific infectious diseases causing infertility in cattle. In 'Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics'. (Eds. DE Noakes, GH Arthur, TJ Parkinson, GCW England) pp 473-509. (Saunders Elsevier: London).
- Ondrak JD, Keen JE, Rupp GP, Kennedy JA, McVey DS, Baker WD (2010) Repeated testing by use of culture and PCR assay to detect *Tritrichomonas foetus* carrier bulls in an infected Nebraska herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **237**, 1068-1073.
- Parker S, Campbell J, Gajadhar A (2003a) Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Tritrichomonas foetus* in bulls. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **15**, 460-465.
- Parker S, Campbell J, McIntosh K, Gajadhar A (2003b) Diagnosis of trichomoniasis in 'virgin' bulls by culture and polymerase chain reaction. *Canadian Veterinary Journal* **44**, 732-734.
- Parker S, Campbell J, Ribble C, Gajadhar A (2003c) Sample collection factors that affect the sensitivity of diagnostic test for *Tritrichomonas foetus* in bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research* **67**, 138-141.
- Pérez E, Conrad PA, Hird D, Ortuño A, Chacón J, BonDurant RH, Noordhuizen J (1992) Prevalence and risk factors for *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in northeastern Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine* **14**, 155-165.
- Peter D (1997) Bovine Venereal Diseases. In 'Current therapy in large animal theriogenology'. (Ed. RS Youngquist) pp. 355-363. (Saunders Company: Philadelphia).
- Rae DO, Crews JE, Greiner EC, Donovan GA (2004) Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology* **61**, 605-618.
- Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernández L, Gaurino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva, M (2005) Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* **40**, 1-28.
- Ribeiro CM, Falleiros MB, Bicudo SD, Araujo Júnior JP, Golim MA, Silva Filho FC, Padovani CR, Modolo JR (2010) *Tritrichomonas fetus* extracellular products decrease progressive motility of bull sperm. *Theriogenology* **73**, 64-70.
- Rodning SP, Wolfe DF, Carson RL, Wright JC, Stockdale HD, Pacoli ME, Busby HC, Rowe SE (2008) Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. *Theriogenology* **69**, 212-217.
- Rojas M, Vázquez P, Verdier M, Campero CM (2011) Distribución de las enfermedades de transmisión sexual del partido de Rauch, provincia Buenos Aires. *Revista Veterinaria Argentina* **XXVIII**, 273.
- Silveira CDS, Fraga M, Monesiglio C, Delpiazzi R, Macías-Rioseco M, Giannitti F, Riet-Correa F (2020) Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR in preputial smegma of bulls in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* **56**, e404.

Taylor MA, Marshall RN, Stack M (1994) Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *British Veterinary Journal* **150**, 73-80.

Yao C (2013) Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *Journal of Medical Microbiology* **62**, 1-9