



Asociación Argentina de Veterinarios
de **Laboratorios de Diagnóstico**

TRICOMONOSIS BOVINA Y CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA: TOMA DE MUESTRAS Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

SERIE MONOGRÁFICA N° 2

Comisión Científica de Enfermedades Venéreas
y Protozoarios Reproductivos

2026

**ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNÓSTICO**

**TRICOMONOSIS BOVINA y CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA:
TOMA DE MUESTRAS Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO

COMISIÓN CIENTÍFICA DE ENFERMEDADES VENÉREAS Y
PROTOZOARIOS REPRODUCTIVOS

Chile 1856 PB (1227), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos
Aires Argentina

Enero 2026

AUTORES

- **Consideraciones generales y diagnóstico convencional:**

Pedro Soto. Laboratorio Biológico de Tandil. Tandil, Buenos Aires, Argentina.

María Catena. Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP). Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, CIVETAN. Tandil, Buenos Aires, Argentina.

- **Diagnóstico molecular:**

Ignacio Álvarez. Laboratorio Alvarez, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

Juan Agustín García. Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET. Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

CO-AUTORES

Daniel Francisco Benítez. Laboratorio de Sanidad Animal, EEA INTA Mercedes. Mercedes, Corrientes, Argentina.

Fernando Luna. Centro Diagnóstico Veterinario (CDV). Pilar, Buenos Aires, Argentina.

Delia Susana Oriani. Laboratorio Oriani. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. General Pico, La Pampa, Argentina.

Fernando Paolicchi. Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP. Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Marcelo Fort. PampaLab. Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

Claudia Cagnoli. Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP). Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, CIVETAN. Tandil, Buenos Aires, Argentina.

EDITORES

Daniel Francisco Benítez y Juan Agustín García.

INDICE

1. Consideraciones generales
 - 1.1. Diagnóstico
 - 1.2. Toma de muestra
 - 1.2.1. Toro
 - 1.2.2. Vaca
 - 1.2.3. Feto

2. Procedimiento de diagnóstico
 - 2.1. Diagnóstico de tricomonosis bovina
 - 2.1.1. Métodos convencionales
 - 2.1.2. Aislamiento e identificación de *Tritrichomonas foetus*

 - 2.2. Diagnóstico de campilobacteriosis genital bovina
 - 2.2.1. Inmunofluorescencia directa (IFD)
 - 2.2.2. Cultivo e identificación de bacterias
 - 2.2.3. Identificación bioquímica

3. Diagnóstico molecular de tricomonosis y campilobacteriosis bovina
 - 3.1. Toma, transporte y conservación de muestras
 - 3.1.1. Recomendación crítica para el muestreo
 - 3.2. Extracción de ADN y preparación de reacción de PCR: metodología
 - 3.3. Primers utilizados en la qPCR para detección de *Campylobacter fetus* y *T. foetus*
 - 3.3.1. Interpretación de resultados de qPCR
 - 3.3.2. Puntos de Corte de Ct
 - 3.3.3. Controles de calidad
 - 3.3.4. En caso de dudas
 - 3.4. Primers utilizados para la PCR convencional para detección de *C. fetus* y *T. foetus*

4. Bibliografía

5. Anexos

1. Consideraciones generales

La tricomonosis bovina y campilobacteriosis genital bovina son dos enfermedades de transmisión venérea, producidas por el protozooario *Tritrichomonas foetus* y por la bacteria *Campylobacter fetus*, respectivamente. Si bien, taxonómicamente pertenecen a dominios diferentes, poseen varios aspectos en común como el hábitat, la forma de transmisión y ser causantes de fallas reproductivas.

Ambos microorganismos pueden localizarse en la cavidad prepucial del toro, donde colonizan la superficie de la mucosa prepucial, peneana y de la uretra distal. Existe una relación directa entre la edad del toro y la persistencia de la infección, encontrando una mayor predisposición a la colonización en toros de más de tres años. Esto se debe al incremento de la profundidad de los pliegues y de las criptas peneanas y prepuciales con la edad (Figura 1 y 2). En ese microambiente generado por la profundidad de las criptas, los pliegues con secreciones y descamación natural de las células epiteliales, el *T. foetus* y el *C. fetus* encuentran los nutrientes adecuados y las condiciones de bajo potencial de oxígeno para su colonización y crecimiento. Esto favorece al *C. fetus* que es una bacteria microaerófila y al *T. foetus*, un protozooario aerotolerante que tiene un metabolismo anaeróbico. Dichas condiciones son de suma importancia, ya que deben ser consideradas en la metodología de diagnóstico, cuando se requiera el cultivo *in vitro* de estos microorganismos (33).

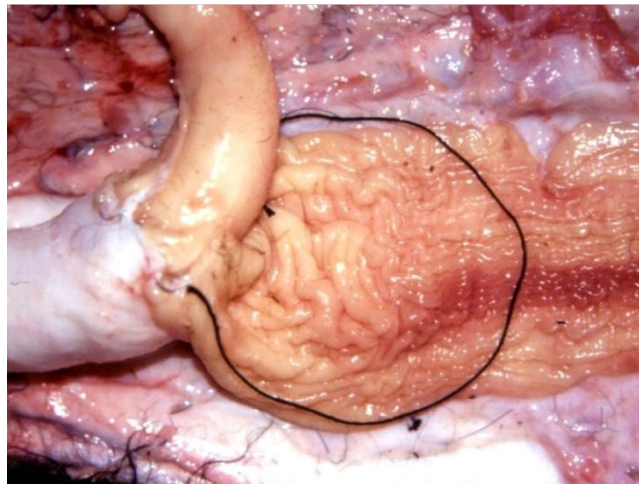


Figura 1. Pliegues del epitelio prepucial de un toro, señalando fondo de cavidad prepucial (hilo negro). *Adaptado de Soto et al. 2013.*

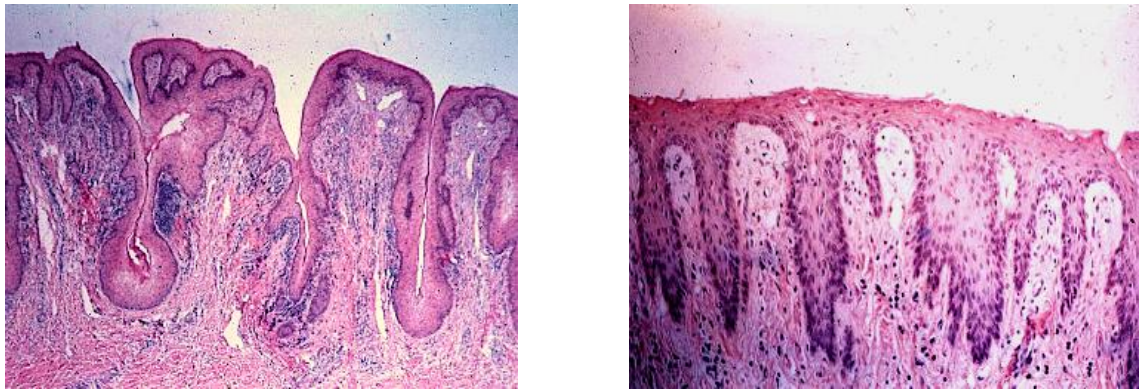


Figura 2. Corte histológico (H&E) de epitelio prepucial de un toro de 8 años (izquierda) con evidentes pliegues de mucosa comparado con el de un toro de 2 años (derecha). *Cortesía de Bruno Rutter, Cátedra de Teriogenología, FCV-UBA.*

Es importante tener en cuenta que la mayor concentración de estos microorganismos se encuentra en el fondo de la cavidad prepucial sobre la mucosa del pene y prepucio adyacente, con concentraciones que pueden variar entre 50 a 80.000 *T. foetus*/ml y 1.000 a 20.000 *C. fetus*/ml de esmegma prepucial (8; 14; 25). Por lo tanto, el fondo de la cavidad prepucial debe ser el sitio de elección para la extracción de la muestra, ya que la concentración de microorganismos influye directamente en la sensibilidad del método de diagnóstico.

La infección en la hembra es más compleja, ya que, a diferencia del toro, presenta cambios patológicos de relevancia en el tracto reproductor, con diferentes grados de vaginitis, cervicitis, endometritis y placentitis, asociados con la pérdida del embrión o feto. A su vez, la concentración de los agentes varía en función del tiempo post infección, respuesta inmunitaria local y sistémica y momento del ciclo estral.

En condiciones naturales, la hembra se infecta durante el período de servicio y en el inicio de la infección el *T. foetus* y el *C. fetus* colonizan la vagina. En el caso del *T. foetus*, luego de esta colonización inicial y a partir de la segunda semana post infección invaden el cérvix, útero y oviducto, disminuyendo el número de protozoarios en vagina a los 20 a 30 días post infección aproximadamente. Dependiendo del ciclo estral, los protozoarios pueden desaparecer de la vagina retornando a ella a fines del proestro y durante el estro. Esta alternancia durante la dinámica de la patogenia de la tricomonosis bovina y el tiempo post infección, influye significativamente en la sensibilidad del método de diagnóstico (27).

En el caso del *C. fetus*, luego de la colonización inicial en vagina pasan al cuerpo y cuerno del útero, pudiéndose encontrar en el oviducto al día 20 post infección. A partir del día 40 a 60, comienza

la eliminación en sentido inverso, encontrándose en el fondo de vagina durante todo el proceso patogénico, dependiendo de la persistencia de la infección. (5; 6)

Estos aspectos del hábitat y la dinámica de la patogenia son importantes tenerlos en cuenta, a los efectos de optimizar el diagnóstico de ambas enfermedades.

Cabe destacar para el caso de *T. foetus*, que puede sobrevivir al pasaje a través del tracto gastrointestinal bovino y eliminarse en las heces. Del mismo modo, se evidenció que puede sobrevivir varios días en fuentes de agua y heces (21). Aunque esto demuestra que puede resistir condiciones adversas y mantenerse temporalmente en el ambiente, quedan pendientes estudios de viabilidad que evalúen la relevancia epidemiológica en la transmisión de tricomonosis bovina.

1.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la tricomonosis y la campilobacteriosis tienen dos instancias:

- 1- Diagnóstico clínico: sustentado en la historia del rodeo y signos clínicos (repeticiones de celo, baja preñez, distribución irregular de la preñez, muerte embrionaria, abortos, entre otros).
- 2- Diagnóstico de laboratorio: basado en la detección del agente etiológico a partir de muestras clínicas. Ante este requerimiento, el veterinario es la persona calificada para obtener las muestras clínicas a partir de:

- Toro: Esmegma prepucial, semen fresco o criopreservado.
- Vaca: Mucus cérvico-vaginal (MCV), contenido de piometras.
- Feto: Fluidos o tejido placentario, contenido abomasal y/o pulmón.

El toro es el principal objetivo diagnóstico en programas de control y prevención, debido a su condición de portador crónico y a que, en las hembras, la infección es transitoria y de detección más variable.

El procedimiento y el instrumento para obtener las muestras deben ser elegidos cuidadosamente en concordancia con el método de diagnóstico del laboratorio actuante, ya que esto influye directamente en la sensibilidad de la metodología diagnóstica.

El número de *T. foetus* y *C. fetus*, varía en las diferentes muestras clínicas:

- Fetos abortados: “ALTA concentración”, principalmente en líquido abomasal.
- Útero: “ALTA concentración” hasta varios días después del aborto. Existiendo VARIACIONES de la concentración mientras evoluciona la infección en el tiempo.
- Mucus cérvico vaginal: “ALTA concentración” en vacas recién infectadas, luego hay diferencias en la dinámica de la patogenia de ambas enfermedades, VARIANDO de acuerdo con el tiempo post infección.

- Esmegma prepucial: “VARIABLE”. Tener en cuenta mayor concentración en fondo de cavidad prepucial. Entre 50 y 80.000 *T. foetus* y 1.000 a 20.000 *C. fetus*/ml de esmegma prepucial (8; 14; 25).

Por lo tanto, la sensibilidad del método de diagnóstico dependerá de:

- Momento de la infección en que es tomada la muestra.
- Número de microorganismos presentes en la muestra obtenida.
- La implementación adecuada del protocolo de diagnóstico, calidad de los insumos/reactivos y la formulación de los medios de cultivo.
- La calidad de la muestra clínica.
- Origen de la muestra clínica: toro, vaca, feto.

1.2 Toma de muestras

1.2.1 Toro. El examen clínico de los reproductores y la obtención de muestras prepuciales se realizan principalmente en el período pre-servicio. En el caso de realizarse pos-servicio, es conveniente dejar un periodo de descanso sexual de 20 a 30 días a los efectos de recuperar la carga microbiana en la cavidad prepucial.

El esmegma prepucial puede ser obtenido por:

- Raspaje: con raspador metálico o plástico.
- Raspaje y aspiración: con pipetas o vainas de inseminación artificial.
- Lavado: con jeringa y cánula flexible.

Independientemente del instrumento y/o método a utilizar, se debe tomar la muestra del fondo de la cavidad prepucial (zona de mayor concentración de *T. foetus* y *C. fetus*), para garantizar una mayor sensibilidad analítica del método de diagnóstico (Figura 3). La elección de cualquiera de los instrumentos y/o métodos citados es válida para un diagnóstico correcto. En el caso de los raspadores, cabe mencionar que existen diferencias en la cantidad y calidad de la muestra prepucial extraída en función de su diseño y el material de construcción. Los raspadores con ranuras más profundas tienen un mayor rendimiento en la extracción de esmegma prepucial. En el caso de la toma de muestra para PCR es necesario utilizar raspadores descartables para evitar contaminación cruzada con ADN.

Previo a la introducción del instrumento en la cavidad prepucial para la toma de muestra, debe hacerse una tricotomía y limpieza del orificio prepucial para evitar la contaminación de la muestra clínica con flora bacteriana y protozoarios entéricos. Es importante evitar la micción del toro durante el muestreo. Para esto se sugiere que los toros sean encerrados el día anterior en plazoletas o corrales

sin barro, o realizar la estimulación de la micción previa al muestreo. Si el toro orina sobre la muestra se sugiere volver a muestrear.

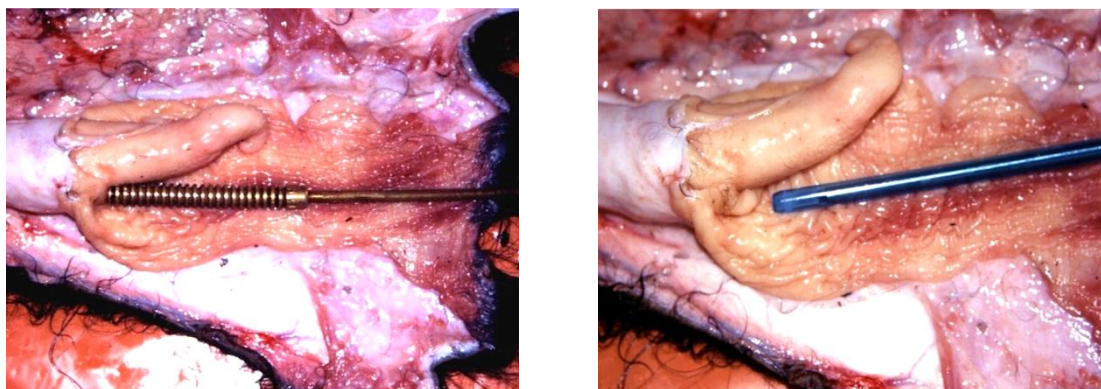


Figura 3. Extracción de esmegma prepucial mediante el uso de raspadores (izquierda) o aspiración (derecha) en fondo de cavidad prepucial. *Adaptado de Soto et al. 2013.*

Una vez obtenida la muestra, es aconsejable acondicionarla para el transporte en los elementos provistos por el laboratorio en función del método de diagnóstico:

- Tricomonosis por cultivo: transferirla de inmediato al medio de cultivo con el mismo instrumento que fue extraída o seguir las instrucciones del laboratorio. Los medios de cultivo utilizados cumplen la función de medios de transporte y cultivo selectivo del protozoario. Cuando se utilizan medios semisólidos, se recomienda sembrar el material prepucial en la parte superior de la columna del medio (primer tercio), en donde quedará retenida la muestra clínica dejando el fondo del medio limpio y libre de competencia para el crecimiento del protozoario (Figura 4).
- Campilobacteriosis por IFD: transferir la muestra prepucial a la solución de transporte (SFF) solución fisiológica formolada al 0,5 %, (Figura 4) o seguir las instrucciones del laboratorio.
- Tricomonosis y Campilobacteriosis por PCR: Transferir la muestra prepucial, directamente a un vial con 4 ml de PBS estéril.

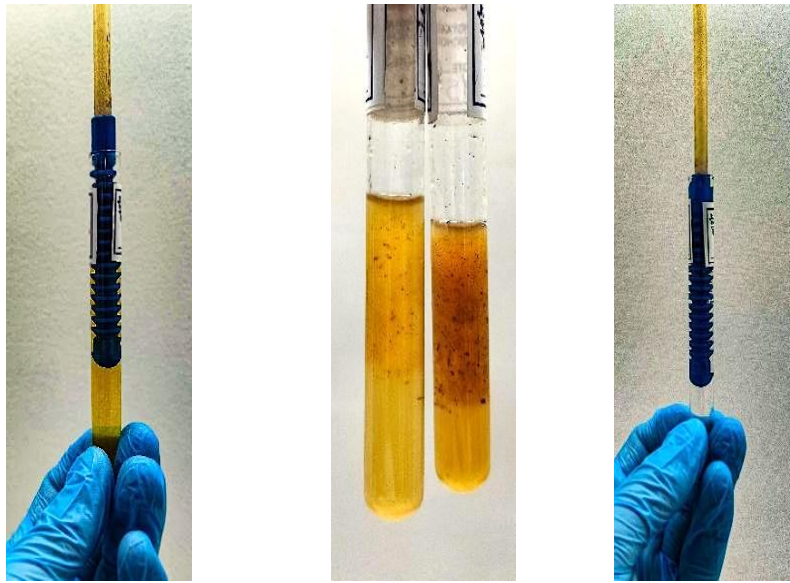


Figura 4. Siembra con raspador en medio de cultivo semisólido para *T. foetus* (izquierda y medio) y en SFF al 0.5-1% para diagnóstico de *C. fetus* mediante IFD.

Cortesía de P. Soto.

Para el transporte al laboratorio, las muestras deben acondicionarse de la siguiente manera:

- Medio de cultivo para *T. foetus*: evitar las temperaturas extremas; debe permanecer entre 5 °C y 37 °C. Se sugiere el transporte a 20-25 °C, seguido de la incubación en el laboratorio a 37 °C siendo la condición óptima para replicación del protozoario. Las temperaturas muy bajas inducen a la formación de pseudoquistes, modificando la dinámica de la curva de crecimiento.
- SFF para inmunofluorescencia directa (IFD): se puede transportar a temperatura ambiente, junto con los medios de cultivo para *T. foetus*.
- PBS para PCR: mantener refrigerado durante 48 h o congelada (-20 °C) hasta 5 días.

1.2.2 Vaca. El MCV se puede coleccionar de las vacas vacías en el momento del diagnóstico de gestación o lo más cerca posible al momento de cuando se produjo el aborto. Para esta práctica, se puede utilizar vainas con pipetas de inseminación artificial para la aspiración de MCV (Figura 5). La muestra obtenida se debe acondicionar de acuerdo con el protocolo de diagnóstico:

- Tricomonosis por cultivo: inocular el medio de cultivo, en el tercio superior de la columna del medio, de igual forma que con el esmegma prepucial.
- Campilobacteriosis por IFD: se recomienda transferir la muestra a un medio de transporte y enriquecimiento (*ver Anexo*: caldo *Brucella* semisólido, con suplemento de antibióticos).

- Tricomonosis y Campilobacteriosis por PCR: transferir la muestra obtenida a un vial con PBS estéril y mantener refrigerado durante el envío al laboratorio. Durante el transporte la muestra clínica puede mantenerse refrigerada durante 48 h o congelada (-20 °C) hasta 5 días.



Figura 5. Extracción de mucus cérvico vaginal (izquierda), con llegada al fondo de vagina (derecha) mediante aspiración. *Foto de la derecha adaptado de Soto et al. 2013.*

Al momento de extraer el mucus cérvico-vaginal y siempre que la apertura cervical lo permita, se recomienda obtener también exudado uterino. Esto se debe a que, en infecciones por *T. foetus*, los protozoarios pueden no encontrarse en el mucus, pero sí en el exudado. Asimismo, si durante la palpación transrectal se detecta una piometra, se aconseja tomar una muestra de su contenido, ya que suele asociarse a altas concentraciones de *T. foetus*.

También puede utilizarse para tomar muestras de útero, una vaina cubierta o el citobrush (Figura 6).



Figura 6. Instrumentos para extracción de mucus cérvico vaginal. Citobrush (izquierda) para cepillado endometrial (derecha). *Cortesía de M. Catena.*

1.2.3 Feto. Dependiendo del grado de conservación del feto, la tricomonosis y campilobacteriosis se pueden diagnosticar fácilmente a partir del líquido abomasal (LA), seguido de pulmón e hígado (este último particularmente para *C. fetus*). Dicha muestra de LA se puede obtener por punción del abomaso (Figura 7) y ser trasladada al laboratorio en la misma jeringa de extracción con el sellado y embalaje adecuado de bioseguridad o colocar el contenido en tubo colector estéril. También puede ser sembrado en el medio de cultivo para *T. foetus*, igual que el material prepucial y en el medio de transporte y enriquecimiento para *C. fetus*.

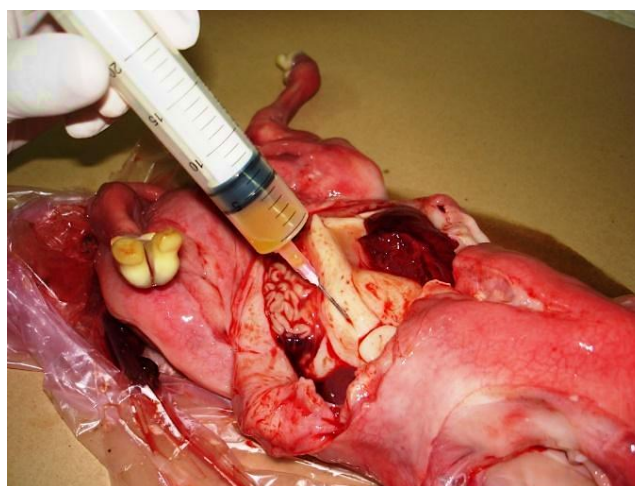


Figura 7. Extracción de líquido de abomaso de un feto bovino abortado. *Cortesía de Pedro Soto.*

2. Procedimientos de diagnóstico

En la siguiente sección se describirán los métodos convencionales de diagnóstico tanto para *T. foetus* como *C. fetus*. Los procedimientos que aborden el diagnóstico mediante técnicas moleculares (PCR y qPCR) se detallarán en la sección 3 para cada agente respectivo.

2.1 Diagnóstico de tricomonosis bovina

De acuerdo con la OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal, fundada como OIE), existen varios métodos validados para el diagnóstico de la tricomonosis bovina, siendo utilizados en función de las necesidades y propósito del diagnóstico, que se indican en la tabla siguiente (Tabla 1) (26).

Tabla 1. Descripción de métodos diagnósticos para la detección de *T. foetus* en secreciones genitales de bovinos y líquido/tejidos fetales bovinos.

Método	Propósito					
	Población libre de infección	Ausencia de infección del animal antes del movimiento	Contribución a políticas de erradicación	Confirmación de casos clínicos	Prevalencia de la infección en programas de vigilancia	Estado inmunológico en animales individuales o poblaciones post vacunación
Cultivo, con microscopía para identificación morfológica	+++	++	+++	+++	++	n/a
PCR convencional sobre muestras clínicas	+	++	-	++	-	n/a
PCR convencional combinado con cultivo	++	+++	-	+++	+	n/a
PCR real time	+++	+++	+++	+++	++	n/a

+++ : *Método recomendado y validado para el propósito indicado*

++ : *Método adecuado, pero puede necesitar validación adicional*

+ : *Puede ser usado en algunas situaciones, pero el costo, la confiabilidad u otros factores limitan su aplicación*

- : *No es apropiado para el propósito indicado*

n/a : *No aplicable*

Teniendo en cuenta el desarrollo histórico del diagnóstico de laboratorio, podemos agrupar los métodos en:

2.1.1 Métodos convencionales

- Observación microscópica directa de la muestra clínica, con una sensibilidad del 73 % a partir de muestras de toros (19; 37) y menor al 70% con muestras de vacas. Con líquido de abomaso se puede diagnosticar fácilmente por observación microscópica directa.
- Cultivo de la muestra clínica, con una sensibilidad en toros, que puede variar entre el 80 al 99,9 % dependiendo si se hacen 1 o 3 muestreos (3). En cambio, con muestras de mucus vaginal, la sensibilidad puede ser menor dependiendo del momento del ciclo estral. El cultivo de *T. foetus* a partir de un aborto, puede ser sencillo debido a que el número de protozoarios es elevado en el contenido abomasal y fluidos uterinos.

2.1.2 Aislamiento e identificación del *T. foetus*

Las muestras clínicas obtenidas de acuerdo con lo descrito anteriormente e inoculadas en los medios de cultivo, una vez recibidas en el laboratorio son incubadas a 37 °C y examinadas cada 24 horas durante 7 días, pudiendo extenderse hasta 10 días dependiendo de la dinámica de crecimiento del medio de cultivo. Normalmente en una curva de crecimiento adecuada, la fase exponencial del *T. foetus* se obtiene a las 48 a 72 horas del inicio de la incubación, siendo ese período el de mayor detección de cultivos con crecimiento. Los protozoarios en el medio de cultivo semisólido migran al fondo del tubo en busca de un menor potencial de oxígeno para realizar su metabolismo anaeróbico, siendo esa área importante para la observación microscópica.

La observación del crecimiento de los protozoarios puede realizarse de dos formas:

- Si se utilizan tubos de borosilicato (tipo tubo de hemólisis), pueden observarse por microscopía a partir de las primeras 24 h a través del fondo del tubo, hasta una amplificación de 100 aumentos (20).
- Por extracción, con capilar o pipeta, de una alícuota del medio de cultivo del fondo del tubo colocando una gota sobre portaobjetos para la observación microscópica hasta 100 aumentos sin cubreobjetos.

Por ambos métodos, la presencia de protozoarios puede identificarse por su morfología piriforme y movimientos espasmódicos. En caso de requerirse una observación más detallada de sus componentes estructurales (núcleo, flagelos anteriores y posterior, membrana ondulante y axostilo), es necesario hacer una tinción (T15 o Giemsa) y observación microscópica a 1000 aumentos (Figura 8).

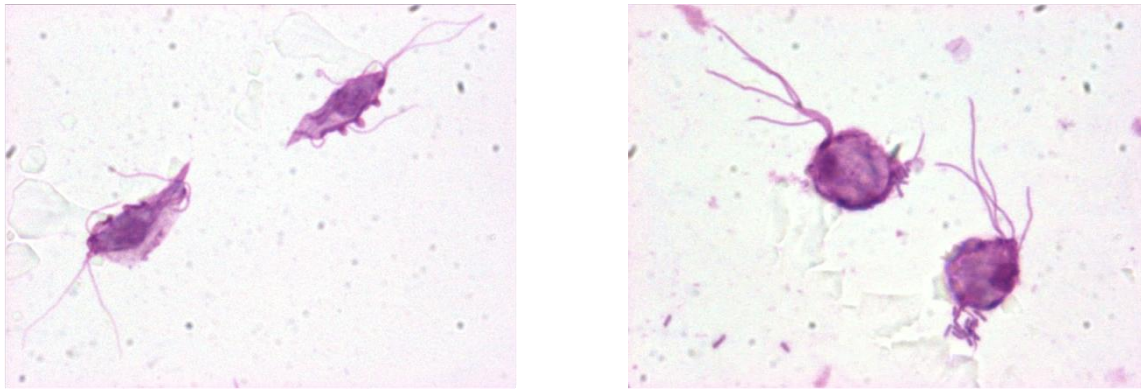


Figura 8. Observación microscópica de *T. foetus* (izquierda) y *Tetratrichomona* spp. (derecha) con tinción 15 o Giemsa modificado. 1000x. *Adaptado de Soto et al. 2013.*

La sensibilidad y especificidad del método de diagnóstico por cultivo está directamente relacionada con:

- La calidad de la muestra clínica, que depende de la metodología de extracción y del instrumento utilizado (tipo de raspador, vainas o pipetas).
- Origen de la muestra clínica (toro, vaca, abortos), que puede tener una mayor o menor concentración de protozoarios.
- Formulación del medio de cultivo y la calidad de sus insumos. Los medios de cultivos semisólidos ofrecen una mejor dinámica de crecimiento del *T. foetus*, ya que evita la oxigenación de la columna del medio ofreciendo un menor potencial de oxígeno en la profundidad para su metabolismo anaeróbico. (Fórmulas de medios de cultivo: *ver Anexo*).
- Periodicidad y número de muestreos: estadísticamente la probabilidad de no detectar un toro infectado con *T. foetus* es del 10 al 20 % con un solo muestreo; del 1 al 4 % con dos muestreos y del 0,1 al 0,16 % con tres muestreos (3). Teniendo en cuenta que solamente un toro infectado es suficiente para restablecer la infección en el rodeo, es recomendable realizar la cantidad de muestreos necesarios con un intervalo de 7 a 15 días hasta obtener dos de ellos en forma consecutiva con diagnóstico negativo.

La especificidad del diagnóstico por cultivo, en los últimos años ha sido discutida como consecuencia de que otros protozoarios han logrado desarrollarse en algunos medios formulados para *T. foetus*. Estos protozoarios “No *T. foetus*” se encuentran en el tracto digestivo del bovino, diseminándose con facilidad en el suelo y agua estancada con las heces de los animales. Por lo tanto, la presencia de estos protozoarios intestinales se observa en muestras clínicas contaminadas con heces y barro, con posibilidad de proliferar en medios de cultivo con escasa inhibición de la flora bacteriana entérica simbiótica de dichos protozoarios. Esta problemática observada en

Argentina (4) ya fue descrita presentando otros protozoarios “No *T. foetus*” en muestras clínicas remitidas para diagnóstico de tricomonosis (*ver Anexo*).

Si bien el hallazgo de estos protozoarios en los medios de cultivo puede confundir al operario durante la observación microscópica, existen herramientas y/o criterios microbiológicos y moleculares que permiten diferenciar los protozoarios intestinales del *T. foetus* en base a los siguientes parámetros:

- Dinámica de la curva de crecimiento
- Morfología
- Tamaño
- Motilidad
- Tinciones (Giemsa o T15), para observación microscópica a 1000 aumentos de los componentes estructurales característicos (Figura 9).
- PCR

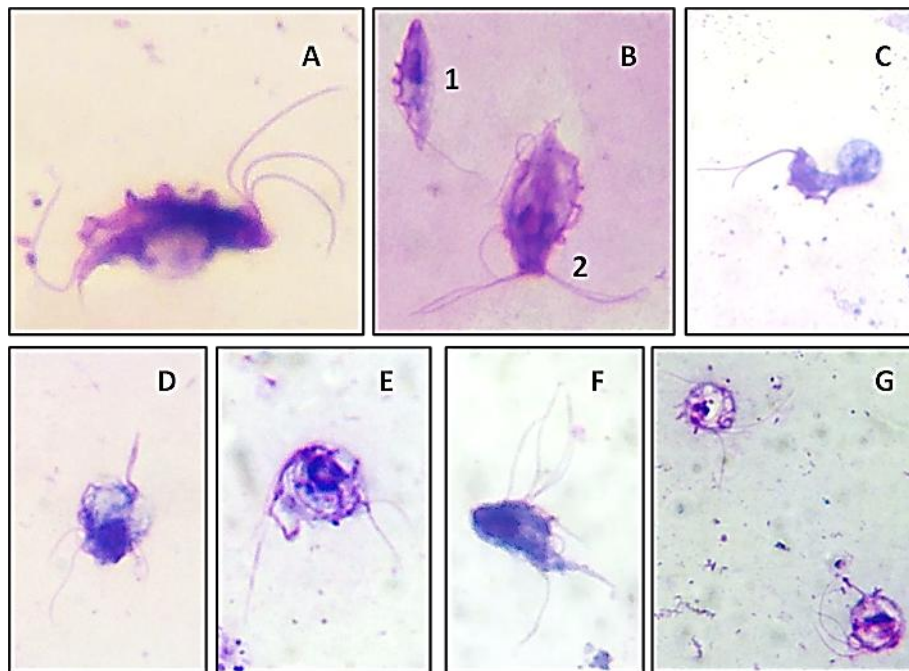


Figura 9. Tinción rápida T15 de protozoarios cultivados en medio de cultivo para *T. foetus*. Observación microscópica 1000x. A, B y C: *T. foetus*. A y B1, protozoarios en fase normal. B2, protozoario en fase de fisión binaria. C, protozoario en fase de reversión de pseudoquiste. D, E, F y G: protozoarios “no *T. foetus*”. Adaptado de Soto et al. 2018.

2.2 Diagnóstico de campilobacteriosis genital bovina

De acuerdo con la OMSA, existen varios métodos validados para el diagnóstico de la campilobacteriosis genital bovina, siendo utilizados en función de las necesidades y propósito del diagnóstico, que se indican en la tabla (Tabla 2) (26).

Tabla 2. Descripción de métodos diagnósticos para la detección de *C. fetus* en secreciones genitales de bovinos y líquido/tejidos fetales bovinos.

Método	Propósito					
	Población libre de infección	Ausencia de infección del animal antes del movimiento	Contribución a políticas de erradicación	Confirmación de casos clínicos	Prevalencia de la infección en programas de vigilancia	Estado inmunológico en animales individuales o poblaciones post vacunación
Identificación del agente						
Cultivo, con caracterización fenotípica	+++	+++	+++	+++	+++	-
Inmunofluorescencia directa (IFD)	++	++	++	++	++	-
ELISA -Mab	++	++	++	++	++	-
MALDI-TOF	+	+	+	+	+	-
MLST	+	+	+	+	+	-
PCR (<i>nahE</i>) para especie <i>C. fetus</i>	++	++	++	++	++	-
Detección de respuesta inmune						
Ac por ELISA	-	-	-	-	-	+

+++ : Método recomendado y validado para el propósito indicado

++ : Método adecuado, pero puede necesitar validación adicional

+ : Puede ser usado en algunas situaciones, pero el costo, la confiabilidad u otros factores limitan su aplicación

- : No es apropiado para el propósito indicado

En Argentina, los métodos más utilizados en la rutina de diagnóstico son:

- IFD
- Cultivo e identificación bacteriana
- PCR

2.2.1 Inmunofluorescencia directa (IFD)

La IFD es una técnica que nos permite detectar la presencia del agente directamente a partir de la muestra clínica.

El reactivo específico que se utiliza es una gamma-globulina policlonal anti- *C. fetus* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El fluorocromo FITC es estimulado por fotones a una longitud de onda de 495 nm (luz azul) y emite su máxima fluorescencia verde a 520 nm.

La IFD puede usarse para identificar al *C. fetus* directamente a partir de la muestra clínica o para confirmar la identificación de la cepa luego del primo-aislamiento, aunque no puede diferenciar entre las subespecies *C. fetus* subsp. *venerealis* y *C. fetus* subsp. *fetus* ya que ambas son antigénicamente casi idénticas.

Las ventajas de esta técnica han sido reconocidas por varios autores (2; 12; 13; 21; 23; 35). Puede utilizarse como un método de screening rápido o como complemento de los métodos culturales.

La muestra clínica más frecuente para el diagnóstico de la campilobacteriosis por IFD es esmegma prepucial, obtenidos por raspaje, lavaje o aspiración para su transporte al laboratorio en 4 ml de SF formolada al 0,5 a 1%. Posteriormente en el laboratorio las muestras son sometidas al procedimiento adjunto en el *Anexo*, para obtener como producto final una alícuota concentrada de la muestra clínica utilizada.

Una vez realizado el montaje de la muestra se procede a la observación microscópica de la misma (Figura 10).

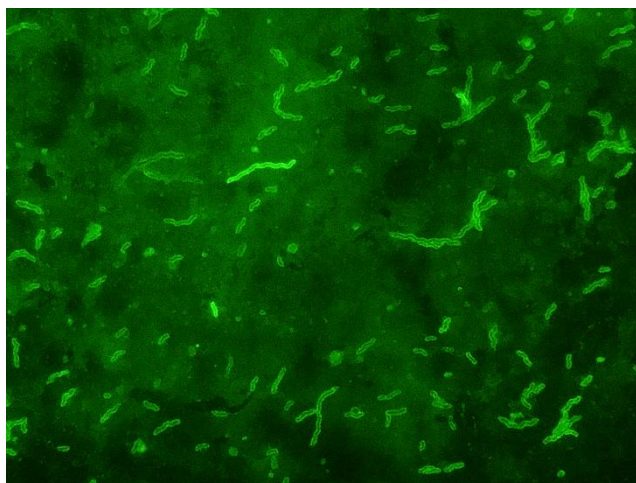


Figura 10. Observación microscópica 1000x, con epi-iluminación y filtro excitador en luz azul notando positividad a *C. fetus* a partir de cepa. *Adaptado de García et al. 2021.*

Cuando la muestra clínica es MCV, es conveniente colocarla al momento de su extracción en medio de transporte y enriquecimiento (TEM) para luego incubarla en el laboratorio durante 48 a 72 hs a 37°C. Este procedimiento ayudaría a la replicación del agente, facilitando el diagnóstico (mayor sensibilidad), para IFD como para el cultivo o PCR. Posteriormente se aplica el procedimiento técnico para diagnóstico de campilobacteriosis por IFD, a partir del ítem 5 del procedimiento técnico (*ver Anexo*).

Estos autores mencionan que la sensibilidad es de 92,58 % y la especificidad de 88,89 %, con límites de detección de 10.000 *C. fetus*/ml en muestras sin centrifugar y 100 *C. fetus*/ml en muestras centrifugadas (12).

2.2.2 Cultivo e identificación bacteriana de *C. fetus*

El cultivo bacteriano permite la identificación fenotípica del organismo para la detección, caracterización e identificación de las subespecies de *C. fetus*, a partir de muestras de campo. El aislamiento de *C. fetus* constituye un gran desafío porque el microorganismo es exigente en sus condiciones de cultivo.

Lograr el aislamiento depende del origen y calidad de la muestra clínica, del medio de transporte utilizado, del tiempo que transcurre entre la extracción de la muestra y la siembra, la formulación de los medios de cultivo que se utilicen y las condiciones de incubación.

El uso de medios especiales de transporte o de transporte y enriquecimiento selectivo como, por ejemplo, Cary-Blair modificado con 0,16 % de agar y con o sin antibióticos agregados, medio con carbón activado Amies, caldo *Brucella* semisólido (TEM), pueden mejorar la sensibilidad del cultivo

para *C. fetus* al inhibir selectivamente el microbiota del tracto genital que compite por los nutrientes (ver Anexo). El medio de transporte y enriquecimiento (TEM) ofrece mayores ventajas ya que permite utilizar un mayor tiempo de transporte sin afectar la viabilidad. Posteriormente, en el laboratorio se realiza una incubación de 48 a 72 h, para aumentar el número de *C. fetus* obtenidos en la muestra clínica, mejorando significativamente la sensibilidad del método que se decida utilizar posteriormente, como:

- Siembra en placa con medios enriquecidos
- IFD
- PCR

El procedimiento sistemático para el aislamiento e identificación de *C. fetus* puede variar dependiendo de la muestra clínica (ver Anexo):

- En el caso de muestras de hembras, como MCV, se puede inocular directamente en medios nutritivos enriquecidos con sangre o en TEM. Estas muestras generalmente están menos contaminadas que las muestras prepuciales, pero aun así se recomienda el uso de suplementos inhibidores (antibióticos) en los medios enriquecidos con sangre y en los medios de transporte como el Cary Blair con agar al 0,16 %, o los medios de transporte y enriquecimiento (TEM) como el caldo *Brucella* semisólido.
- En caso de abortos, la placenta (si no está muy contaminada), hígado, pulmón y líquido de abomaso, son buenas muestras para el aislamiento de *C. fetus*. A partir de estas muestras, se puede realizar un examen microscópico en campo oscuro de montaje húmedo, entre portaobjeto y cubreobjeto o gota pendiente, de contenido abomasal o tejidos fetales o placentarios. Se puede observar la morfología típica de espirilo y movimiento característico tipo sacacorchos o tirabuzón.
- El esmegma prepucial, no es frecuente que se procese para aislamiento de *C. fetus*. Este tipo de muestra clínica ofrece mayores dificultades por la flora contaminante asociada a la cavidad prepucial. No obstante, con el esmegma prepucial obtenido en PBS se puede realizar:
 - Siembra directa en placa de medios enriquecidos con sangre, más antibióticos como suplemento inhibidor.
 - Siembra en TEM y posteriormente siembra en placa con medios enriquecidos.
 - Filtrado activo con jeringa a través de membrana de 0,65 μm y siembra en TEM y placa con medios enriquecidos.
 - Filtrado pasivo a través de membrana de 0,65 μm . La membrana se coloca directamente sobre la superficie del medio en la placa de Petri y sobre la membrana se

colocan 10 a 15 gotas de la muestra colectada en PBS o SF. Se colocan las placas a 37 °C durante 30 a 40 minutos y se retira la membrana para continuar con la incubación en condiciones microaerófilas durante 3 a 4 días.

Para el aislamiento de las especies de *C. fetus* se debe utilizar medios selectivos, atmósfera microaerofílica y una temperatura de incubación de 37 °C. Los medios de cultivo más utilizados son:

- Agar nutritivo o Tripteína soya agar (TSA), más 10% de sangre bovina/ovina.
- Skirrow: agar nutritivo más 18% de sangre equina hemolizada (37).

Ambos medios requieren el uso de agentes selectivos como: sulfato de polimixina B (2,5 UI/ml), trimetoprima (5µg/ml), vancomicina (10µg/ml) y cicloheximida (50 µg/ml). Existen suplementos comerciales aptos para uso en los medios indicados: Merk cod. 2249 y Oxoid cod. SR0069E (*ver Anexo*). Los inhibidores que posean cefalosporinas no son adecuados porque pueden inhibir al *C. fetus*.

Algunas cepas de *C. fetus* pueden ser sensibles a la polimixina B. Para estos casos la siembra del material sobre filtros de 0,65 µm directamente colocados sobre el agar no selectivo permite aislar cepas que son sensibles a estos antibióticos. En este contexto, se recomienda como protocolo de rutina utilizar medios enriquecidos “con” y “sin” antibióticos, combinados con los métodos de filtración. Es importante tener en cuenta que el proceso de filtrado puede disminuir la carga de *Campylobacter* de la muestra clínica.

Identificación de las especies de *Campylobacter*:

Las atmósferas microaerofílicas más adecuadas para el cultivo son las que contienen entre un 3 a un 6 % de oxígeno, un 10 % de anhídrido carbónico y saturación con nitrógeno o hidrógeno. Las atmósferas pueden ser suministradas mediante mezcla de gases o el uso de sobres comerciales generadores de gases para microaerofilia.

Las colonias aparecen en la superficie de los medios sólidos enriquecidos, después de 3 a 5 días de incubación a 37 °C; son pequeñas de color gris rosado, redondas, convexas, lisas y brillantes (Figura 11). La observación microscópica a 1000 aumentos luego de la tinción de Gram, permite ver bacilos incurvados (espirilos) Gram negativos (Figura 12).

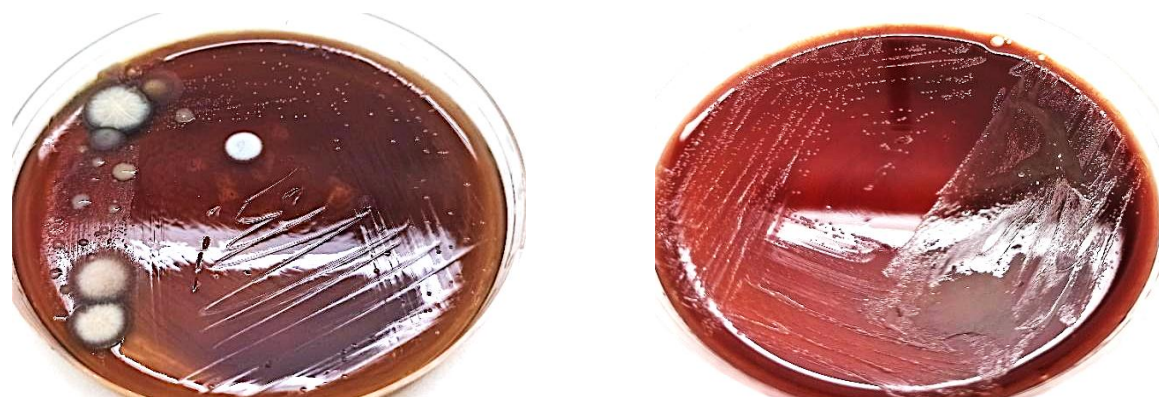


Figura 11. Esmegma prepucial sin filtrar, cultivado en TSA sangre con antibióticos (izquierda), notando colonias de flora contaminante y de *C. fetus venerealis* (superior de la placa correspondiente a segunda estría). Repique del primo cultivo en TSA sangre con colonias de *C. fetus venerealis* (cultivo puro) (derecha). *Cortesía de P. Soto.*

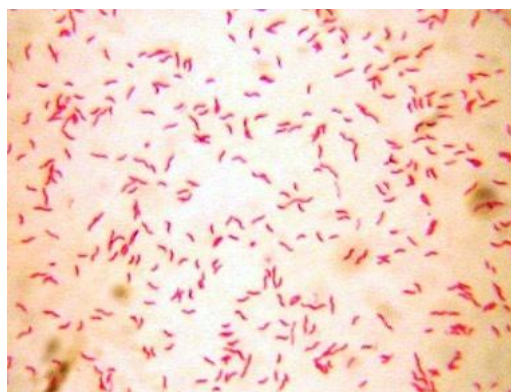


Figura 12. Observación microscópica de *Campylobacter fetus* mostrando característica Gram-negativo y forma de espirilos. Tinción de Gram, 1000x. *Cortesía de P. Soto.*

La observación microscópica directa por contraste de fase o campo oscuro, de la suspensión bacteriana a partir de la colonia, permite la visualización de *C. fetus* (comas, forma de “gaviota” y espirilos, o formas cocoides en cultivos viejos) y movimiento característico del mismo.

2.2.3 Identificación Bioquímica

La identificación fenotípica de género y especie se basan en caracteres morfológicos de las bacterias y colonias, pruebas metabólicas y tolerancia del crecimiento frente a determinados componentes y antibióticos.

Las campilobacterias son incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos, ya que carecen de la enzima fosfofructoquinasa para la fermentación de azúcares. Sin embargo, poseen el resto de las enzimas de la oxidación de la glucosa y de las pentosas fosfato. Ambas subespecies reducen nitratos a nitritos y poseen las enzimas oxidasa y catalasa.

Las pruebas más comunes para biotipificar a estas bacterias son la resistencia al ácido nalidíxico (NAL) y cefalotina (CEF), producción de hipurato de sodio y ácido sulfhídrico (SH₂) en medios Kligler o triple azúcar-hierro (TSI) y medio hierro-bisulfito-piruvato (FBP). Los *C. fetus* son resistentes al NAL y sensibles a la CEF, y es la única especie hipurato negativo. La producción de SH es negativa en ambas pruebas para las especies de *C. fetus* (Tabla 3).

Las subespecies de *C. fetus* pueden separarse mediante la prueba de producción de SH₂ en medio sensibilizado con cisteína y tiras de subacetato de plomo para captar la producción de SH₂ y las pruebas de tolerancia y reducción del selenito de sodio. La subespecie *fetus* es la única que crece con selenito de sodio y siempre produce SH₂. La subespecie *venerealis* nunca crece con selenito de sodio y varía la producción de SH₂ en el medio sensibilizado

Distintos porcentajes de glicina (del 0,6 % al 1,9 %) se han usado para subdividir a ambas subespecies en biotipos. Hay autores que han demostrado que esta prueba no es fiable para la diferenciación de ambas subespecies, porque la tolerancia puede ser adquirida por transducción o mutación (7). Además, se han descrito variantes de la subespecie *venerealis* glicina-tolerantes (denominadas biovar "intermedius"). De la misma manera, se han registrado cepas de *C. fetus* subsp. *fetus* sensibles a la glicina.

Otros autores compararon resultados de la prueba de tolerancia a la glicina (junto a otras pruebas fenotípicas de rutina) (31) y una PCR modificada coincidiendo los resultados de ambas técnicas para los *C. fetus* analizados (15).

Las cepas pueden ser conservadas a -70 °C o en nitrógeno líquido (-196°C). Se utiliza un caldo nutritivo conteniendo 17 % (p/v) de glicerina tindalizada y 5 % de suero equino estéril descomplementado.

Tabla 3. Identificación bioquímica para especies y subespecies del género *Campylobacter* y microorganismos relacionados de importancia veterinaria. *Adaptada de Chiapparrone (9), Manual Bergey, (40) y OMSA (26).*

	TMAO	T° de crecimiento		Catalasa	Oxidasa	Reducción de nitratos	Producción de SHz		Tolerancia a			Reducción selenito de Na	Hidrólisis del hipurato	TTC ^f	Susceptibilidad antimicrobiana	
		25 °C	42 °C				Medio sensibilizado ^e	T S I	1% glicina	1% bilis	3,5% CINa				Ácido nalidixico ^g	Cefalotina
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	-	+	-	+	+	v ^f	- ^e	-	+	-	-	-	-	-	R	S
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	R	S
<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	S	R
<i>C. coli</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	S	R
<i>C. faecalis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	v	v	v	s/d	-	-	R	S
<i>C. lari</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	R	R
<i>C. hyointestinalis</i>	+	v	v	+	+	+	+	+	+	+	-	s/d	-	-	R	S
<i>C. mucosalis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	s/d	-	s/d	v	S
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	+ ^a	-	v	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	S	S
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	s/d	v	-	-	+	+	+	+	+	-	+	v	-	s/d	R	S
<i>A. cryaerophilus</i>	+	+ ^b	-	v	+	+	-	-	-	-	v	s/d	-	-	S	R

+: reacción positiva o presencia de crecimiento

-: reacción negativa o ausencia de crecimiento

v: variable

S: sensible

a: requiere fumarato (0,2%) o nitrato (0,1%)

b: crecimiento también a 15 °C

c: 60 a 93% de las cepas son positivas

s/d: sin datos

TMAO: crecimiento anaeróbico en presencia de óxido N-trimetilamina

R: resistente

d: medio con 0,02% de cisteína, tiras con acetato de plomo como indicador de la reacción.

e: *C. fetus* subsp. *fetus* biotipo *intermedius* positivo

f: crecimiento en trifenil-tetrazolio (0,04%)

3. Diagnóstico molecular de tricomonosis y campilobacteriosis bovina

La PCR es una técnica de diagnóstico molecular que ofrece un enfoque más rápido, sensible y específico en comparación con los métodos tradicionales empleados para diagnosticar diversas enfermedades. En el ámbito de las enfermedades venéreas bovinas, las cuales incluyen a *C. fetus* y *T. foetus*, la PCR ha avanzado significativamente en los últimos años, convirtiéndose en una herramienta ampliamente utilizada y reconocida por la OMSA (4; 13; 26; 30; 32; 34; 43).

La repentina y creciente introducción de esta técnica en numerosos laboratorios de diagnóstico veterinario de nuestro país motivó a elaborar esta guía sobre las técnicas moleculares disponibles y evaluadas, para la detección de *T. foetus* y *C. fetus* en bovinos. **Cabe mencionar que este manual no pretende explicar el funcionamiento de la PCR, por lo que se recomienda que los usuarios tengan una formación previa, teórica y práctica, en centros de referencia antes de emplear estas técnicas para diagnósticos rutinarios.**

Como ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, las condiciones bajo las cuales se llevan a cabo las pruebas de PCR son exigentes e incluso variaciones menores pueden afectar el resultado. Los controles inadecuados, la contaminación de las muestras y de los reactivos, el incumplimiento de los requisitos de ciclos térmicos, etc. pueden dar resultados de valor cuestionable. La prueba de PCR es una herramienta valiosa cuando se usa correctamente.

Existen dos tipos de PCR comúnmente utilizados: la PCR convencional o también llamada punto final y la PCR en Tiempo Real (qPCR). A continuación, se describen brevemente sus características, ventajas y desventajas:

Característica	PCR Convencional	PCR en Tiempo Real (qPCR)
Descripción	Amplifica ADN del patógeno para su detección visual en gel de agarosa.	Amplifica y detecta ADN en tiempo real mediante sondas o fluoróforos, y su visualización es mediante el análisis de curva de amplificación y/o curva de melting
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Alta sensibilidad y especificidad - Económica y accesible - Equipo menos costoso 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor sensibilidad y especificidad - Resultados rápidos y cuantitativos - Menor riesgo de contaminación cruzada - Aplicable en diagnóstico de rutina a gran escala
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Cualitativa, depende de la visualización en gel - Mayor tiempo de procesamiento y de riesgo de contaminación intra-laboratorio - Limitado para el procesamiento de un gran volumen de muestras 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere equipo especializado y mayor inversión - Configuración más compleja que demanda personal capacitado - Mayor costo

Los puntos relevantes para mejorar la detección de las enfermedades venéreas en bovinos a partir de secreciones genitales, particularmente esmegma prepucial de toros, serán abordados teniendo en cuenta desde la toma y conservación de la muestra hasta el procesamiento por parte del laboratorio.

3.1 Toma, transporte y conservación de muestras

IMPORTANTE: ninguna técnica de diagnóstico, por más avanzada que sea, podrá contrarrestar las falencias de una muestra incorrectamente tomada o remitida al laboratorio.

Para asegurar la mayor precisión de los resultados, es fundamental garantizar la calidad de las muestras recolectadas. La recolección de muestras, al igual que con métodos tradicionales, puede llevarse a cabo mediante raspaje, aspiración o lavado prepucial de los toros, teniendo en cuenta las mismas condiciones de tricotomía y limpieza mencionadas para las técnicas tradicionales. Aunque la técnica de PCR es más sensible y específica, esto no implica que se pueda flexibilizar los estándares de calidad o el nivel de contaminación de la muestra remitida al laboratorio. Es necesario tener en

cuenta que al igual que en las técnicas tradicionales, la presencia de contaminantes comunes tras la recolección de esmegma prepuccial en toros, como materia fecal, barro, sangre, orina, entre otros, pueden tener un impacto negativo en la eficacia de detección. Por lo expuesto anteriormente y a pesar de ser una técnica de diagnóstico con mayor sensibilidad y especificidad, recomendamos obtener dos muestreos consecutivos negativos para declarar a un toro como libre de la enfermedad. Es importante realizarlos con un intervalo mínimo de 10 días entre cada muestreo. En contextos específicos, como planes de erradicación, condiciones geográficas particulares o situaciones epidemiológicas evaluadas por el veterinario responsable, donde la prevalencia y el riesgo de la enfermedad son muy bajos, es posible modificar el número de raspajes siempre y cuando se garantice una continua negatividad anual de todos los toros del rodeo o establecimiento.

3.1.1 Recomendaciones críticas para el muestreo

- **Instrumentos de recolección:** Se recomienda la utilización de un raspador descartable por animal, teniendo en cuenta que la reutilización de raspadores (sean de plástico o cobre) puede conducir a contaminación cruzada, ya que el ADN de muestras positivas puede persistir, incluso tras procesos de ebullición.
- **Medio de transporte:** utilizar solución salina o PBS estéril. En mercados donde esté disponible, los medios de transporte especializados para PCR pueden ser útiles para una mejor conservación de la muestra en el tiempo. Tener en cuenta que los medios con formol pueden ocasionar fragmentación o modificación del ADN reduciendo la cantidad y calidad del material genético disponible para la PCR, y también puede tener efecto negativo, inhibiendo la polimerasa y reduciendo la eficiencia de la amplificación.
- **Conservación y envío de muestras: refrigeración (4 °C)** (si la muestra llega al laboratorio dentro de las primeras 48 horas) o **congelación (-20 °C)** (si el envío al laboratorio se demora más de 48 horas, hasta 7 días).

Tener en cuenta que tanto la conservación de la muestra por tiempos más prolongados o cambios bruscos de variación de temperatura (ej. congelado y descongelado frecuente) afecta la calidad del ADN, impactando en menor sensibilidad, potencialmente derivando en resultados falsos negativos.

Importante: es esencial comunicar al laboratorio cualquier variación en las condiciones de tiempo y temperatura para que puedan realizar ajustes en los protocolos de análisis e interpretación de resultados. Esto es un punto crítico para las condiciones de trabajo en nuestro país donde las distancias pueden ser muy amplias con grandes variaciones de temperaturas.

3.2 Extracción de ADN y preparación de reacción de PCR: metodología

La elección del método de extracción de ADN depende principalmente del tipo de muestra, del volumen de muestras que se necesitan procesar, y de los recursos y capacidades disponibles en el laboratorio. Es un paso clave donde se busca una buena extracción: alta cantidad, alta calidad (integridad) y pureza (ausencia de contaminantes).

Para propósitos diagnósticos, se recomienda utilizar métodos comerciales como columnas de sílice o perlas magnéticas, reconocidos por su alta eficiencia, lo que garantiza la consistencia y repetibilidad de los resultados, brindando un ADN de calidad y puro. Particularmente, para las muestras de esmegma prepucial se recomienda el uso de kits comerciales con columnas ya que permiten minimizar o eliminar posibles inhibidores provenientes de contaminación, brindando un ADN de mayor calidad. Tener en cuenta que los protocolos de extracción de kits comerciales varían según tipo de muestra, existiendo específicos por ejemplo para extracción a partir de esmegma prepucial. Esto es importante tenerlo en cuenta por la variación de los pasos que tienen entre tipo de muestras.

Otros métodos más económicos involucran técnicas llamadas *in house*, principalmente asociadas a extracción de ADN por lisis térmica. Aunque presentan mayor rendimiento respecto a tiempos de procesamiento, es necesario tener en cuenta que puede afectar la sensibilidad diagnóstica. Brevemente, esto se da por razones claves, donde a través de la lisis térmica pueden quedar restos celulares, proteínas, ARN y otros inhibidores que podrían afectar la amplificación de PCR (menor calidad y mayor cantidad de inhibidores). Esto último de relevancia en las muestras de secreciones genitales bovinas para detección de enfermedades venéreas, donde puede haber contaminación con sangre, materia fecal, barro, pelo, orina, entre otros. En contraste, los kits comerciales utilizan columnas que tienen como objetivo eliminar contaminantes/impurezas y lograr una muestra de ADN pura. A su vez la lisis térmica, presenta menor reproducibilidad (varía por muestra, temperatura y tiempo de lisis), y no siempre es compatible con matrices complejas como mucus cérvico vaginal (MCV) o esmegma con barro u otro contaminante. Por lo expresado, los métodos *in house*, no son recomendados de no contar con experiencia suficiente.

Particularmente las muestras de MCV requieren de un procesamiento previo a la extracción de ADN, donde se logre diluir la consistencia muco-gelatinoso a líquido para poder llevar a cabo la extracción por columnas evitando se tapen. Este proceso previo se basa principalmente en el agregado de un buffer de lisis (BL) y proteasas (se sugiere entre 150 y 200 μ l de MCV a relación 1:1 con el BL y agregado de 20 a 40 μ l de proteasa) a temperaturas de 37 a 60°C con tiempos variables hasta que resulte en lisis total; ciertos protocolos de extracción comerciales ya incluyen este paso.

El ADN extraído puede **almacenarse** en heladera a 4 °C para su uso inmediato, a -20 °C dentro de los próximos 15 días, o a -80 °C para almacenamiento prolongado.

En una reacción de PCR de punto final o qPCR, hay que determinar la *mix* a utilizar, la cual puede venir en una mezcla pre-formulada que incluye todos los reactivos necesarios para la reacción de PCR (como Taq polimerasa, dNTPs y buffer) en proporciones optimizadas, o componentes separados y prepararlos de forma independiente. **Para fines diagnósticos, se recomienda el uso de MasterMix comercial (mezclas preparadas que contienen todos los componentes necesarios para realizar una reacción de PCR, excepto el ADN y los cebadores), ya que está optimizada y probada para garantizar la precisión y consistencia en los resultados, y disminuye tiempos de preparación y error de pipeteo al ser una sola solución.**

También deben determinarse los *primers* (**iniciadores o cebadores**) a utilizar para agregar a la *mix*, siendo su diseño y secuencia esenciales para que la reacción sea específica, evitando la amplificación de secuencias no deseadas. Se recomiendan primers probados y publicados los cuales nombraremos algunos más adelante para cada patógeno en cuestión.

De utilizar primers con diseño propio se debe realizar su validación, chequeando su especificidad preferiblemente mediante pruebas BLAST o In Silico PCR, para verificar posibles reacciones cruzadas con otras especies o géneros bacterianos. Además, se debe asegurar la especificidad y sensibilidad del protocolo de detección del patógeno con controles positivos, junto con controles negativos de otras bacterias del mismo género y bacterias comunes en el tracto reproductor bovino o contaminantes. Se sugiere en la puesta a punto, chequear en gel de agarosa el producto amplificado con iniciadores evaluados en la literatura.

Dentro de la qPCR, los protocolos de detección emplean **sondas específicas o fluoróforos intercalantes** como SYBR Green/EvaGreen. Ambas ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad en la reacción comparado con la PCR de punto final, brindando a su vez la sonda una mayor especificidad. La sonda, presenta un costo mayor al uso de fluoróforos intercalantes, pero reduce tiempos de laboratorio en el diagnóstico de rutina al no requerir una segunda etapa de interpretación basada en la observación e interpretación de curva de melting como con los agentes intercalantes, sumado a su mayor especificidad.

No se recomienda el uso de metodologías **multiplex** cuando se emplea qPCR con **agentes intercalantes**, debido al riesgo de amplificaciones inespecíficas. Esto particularmente en el caso de *C. fetus* cuando se quiere realizar diferenciación de subespecie en un paso. En caso de querer implementar métodos multiplex, se sugiere optar por sondas específicas.

3.3 Primers utilizados en la qPCR para detección de *C. fetus* y *T. foetus*

A continuación, se proporciona una serie de *primers* publicados que la comisión recomienda para la detección de *C. fetus* (Tabla 4) y *T. foetus* (Tabla 5) (17, 22, 24, 28, 30, 32, 41, 42). Estos *primers* tienen una sensibilidad que varía del 80 al 98% y una especificidad cercana al 100%. Tener en cuenta que los rangos de sensibilidad varían no solo por los *primers* sino también por los procesos previamente mencionados en este documento (tipo de muestra y su conservación, tipo de extracción de ADN y preparación del proceso de PCR).

Tabla 4. Primers para la detección de *C. fetus* mediante qPCR registrados en la bibliografía y evaluadas en ámbito científico.

Publicación científica	Tipo de PCR y marcadores	Gen objetivo	Primers y sondas
Persson et al. 2012 (28)	qPCR (sonda)	gyrB	Fw: 5'-CTGTAAGAAAACGTCCAGGAATGT-3' Rv: 5'-CCATAGATTCGTCTATAGAGTTATCA-3' FAM: 5'-CWACTTCATAAAATCATATGATGAAG-MGB-NFQ-3'
van der Graaf-van Bloois et al. 2013 (41)	qPCR (sonda)	nahE e ISCfe1	Fw: 5'-TGTTATGGTGATCAAAATAGCTGTTG-3' Rv: 5'-GAGCTGTTTTTATGGCTACTCTTTTTTTA-3' FAM: 5'-TGTATATGCACTTTTAGCAACTT-NFQ-3' Fw: 5'-AGGCGAAGAGAATGTTAAATTTGAA-3' Rv: 5'-CATAAAGCCTAGCTGAAAAACTG-3' VIC: 5'-CCAAAGATGTCTTAGAAATA-NFQ-MGB-3'
Iraola et al. 2016 (17)	qPCR (sonda)	16S	Fw: 5'-GCACCTGTCTCAACTTTC-3' Rv: 5'-CCTTACCTGGGCTTGAT-3' 16SPb 5'-VIC-ATCTCTAAGAGATTAGTTG-MGB-NFQ-3'
Silva et al. 2022 (32)	qPCR (sybr)	Hit family protein	Fw: GAGTGCATGGAGTTCCGTTTTT Rv: TCCGCCAGACATCTTACTTTCA.
Van der Graaf van Bloois et al. 2024 (42)	qPCR (sonda)	Ppx/GppA family phosphatase <i>asd</i>	Fw: GAGCTGCGTCAAAATCCTCAA Rv: CGTGGTTGCCTTAAACTTGGA Fw: TCTTTGGTGCGTTGCTGATCA Rv: GATGACGGGCAAAATAGTCACGT FAM-TGGTGTCAAATACAAGAATTAACC-BHQ HEX-AAATGGTGTCAAATACAAGACCA-BHQ

Actualmente, no existen protocolos 100% estandarizados que permitan la diferenciación correcta de *C. fetus* subsp. *fetus* y *C. fetus* subsp. *venerealis*, pudiendo ocurrir reacciones cruzadas entre las subespecies y con otras especies de *Campylobacter*. Particularmente, el biovar Intermedius aún no tiene un gen objetivo validado para su detección específica, valiéndose de descarte por

detección en dos pasos, o en ciertos protocolos está incluido como Cfv donde se han reportado errores de cruzamiento con Cff. Por lo expuesto, **al momento no se recomienda la discriminación de subespecie de *C. fetus* por métodos moleculares para dirimir en la interpretación final del diagnóstico (29).**

Tener en cuenta que existen otros primers reportados en la bibliografía, como así también protocolos con variaciones en el ciclado, modificaciones en primers, tipo de PCR, entre otros. Esto último es importante tenerlo en cuenta ya que, al poner a punto la técnica en cada laboratorio pueden ser necesarios variaciones para su optimización.

En este sentido, algunos de los protocolos mencionados permiten, a través de técnicas como el 'high resolution melting' y el uso de multiplex con sondas, realizar la diferenciación de subespecies de *C. fetus*. No obstante, como se indicó previamente, debido a que no se ha reportado un protocolo validado con un número adecuado de muestras y considerando la posible confusión sanitaria que podría generar, no recomendamos su implementación para la diferenciación de subespecie.

Tabla 5. Primers para la detección de *T. foetus* mediante qPCR registrados en la bibliografía y evaluadas en ámbito científico.

Publicación científica	Tipo de marcadores	Gen objetivo	Primers y sondas
McMillen & Lew 2006 (22)	qPCR (sonda)	ITS	Fw: GCG GCT GGA TTA GCT TTC TTT Rv: GGC GCG CAA TGT GCAT FAM: ACAAG TTC GAT CTTTG-MGB-BHQ
Mueller et al. 2015 (24)	qPCR (sybr)	ITS	Fw: GCG GCT GGA TTA GCT TTC TTT Rv: GGC GCG CAA TGT GCAT
Polo et al. 2022 (30)	qPCR (sonda)	EF	Fw: AGT CCG CCGCC AAA TCA A Rv: CTC TTC AAC TTC GGC TGT GA FAM: ATC ATC AAG TAC GGC TCA GT-MGBNFQ

A pesar de la existencia de un protocolo publicado para la detección de *T. foetus* en pools de muestras de esmegma prepucial, su aplicación en la Argentina se desaconseja por el momento debido a diversas consideraciones, principalmente condiciones epidemiológicas y programas sanitarios y de control de la enfermedad. Además, el protocolo requiere el uso de kits comerciales de altísima eficiencia tanto para la extracción de ADN como para la identificación del patógeno, junto a evaluaciones mediante pruebas inter-laboratorio. Para el caso de *C. fetus*, hasta la fecha, no se han publicado protocolos que validen la utilización de pools.

3.3.1 Interpretación de resultados de qPCR

La interpretación de los resultados de la qPCR se basa en la curva de amplificación observando principalmente los valores de Ct (umbral de ciclo), los cuales indican el ciclo en que la señal de ADN amplificado supera un umbral detectable. Esto debe considerarse junto a la forma de la curva de amplificación de productos, con una fase exponencial pronunciada y consistente, seguida de una fase plateau donde alcanza una meseta. En casos donde se utilizan intercalantes, es crucial el análisis de la curva de melting para discriminar secuencias de ADN según una temperatura específica del gen objetivo, corroborando así el tamaño del amplicón mediante un único pico bien definido. Este pico no debe variar en más de 1 °C respecto al control positivo. Esto último permite identificar de amplificaciones inespecíficas. Tener en cuenta que múltiples picos pueden indicar productos inespecíficos o dímeros de primers. Esta interpretación debe estar siempre asociada a la curva de amplificación de productos.

3.3.2 Puntos de Corte de Ct:

- Si se usan primers comerciales, se deben seguir los puntos de corte recomendados por el fabricante.
- En caso de usar primers diseñados o validados internamente, se deben realizar pruebas para establecer los valores mínimos de detección y definir los Ct apropiados para diferenciar positivos de negativos. Esto debe realizarse, junto a curvas estándar (curva de sensibilidad) con concentraciones conocidas del patógeno objetivo.
- Tener en cuenta que el Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADN, por lo tanto, a mayor concentración de ADN, menor valor de Ct, tomándose como regla general $Ct < 35$.

3.3.3 Controles de calidad:

- **Control Positivo:** Confirma que la qPCR funciona correctamente y detecta el ADN objetivo.
- **Control Negativo:** Verifica ausencia de contaminación en los reactivos. Un Ct positivo sugiere contaminación y requiere revisar la técnica. La misma incluye agua y mix sin templado.
- **Control Endógeno:** Garantiza la calidad del ADN extraído y ausencia de inhibidores en la muestra. Se sugiere de origen de especie animal, de donde proviene las muestras a estudiar, bovino en este caso (por ej. β -actina, GADPH, entre otros).

3.3.4 En caso de dudas:

Por ejemplo, con valores de Ct cercanos al límite de detección o resultados inesperados, se recomienda:

- Repetir la prueba para asegurar la precisión del diagnóstico.

- Repetir la extracción ADN y corrida
- Volver a sacar muestra del animal

La validez de la reacción y sus resultados depende exclusivamente de que los controles positivos, negativos y endógenos, con sus respectivos duplicados, sean correctos.

Debido a esto, es que todos los controles previamente mencionados deben analizarse en cada corrida de PCR. Es fundamental validar los protocolos de PCR en cada laboratorio siguiendo estas pautas mínimas. Además, dicha validación debe confirmarse de manera continua en los procesos de rutina, mediante la implementación y revisión de los controles mencionados en cada corrida, garantizando así la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados. Ante anomalías en la curva de PCR, los controles sirven como referencia clave para identificar posibles factores a revisar. Si el control negativo muestra amplificación, puede indicar contaminación; si el control positivo no amplifica correctamente, sugiere problemas con los reactivos o la técnica. Además, valores Ct inesperados en muestras diluidas pueden señalar problemas en la pureza del ADN o en la eficiencia de la reacción.

Evaluar estos controles permite ajustar el protocolo, optimizar las condiciones de amplificación y asegurar resultados confiables.

3.4 Primers utilizados para la PCR convencional para detección de *C. fetus* y *T. foetus*

Se han reportado varios métodos de PCR específicos para determinar *C. fetus* tipo singleplex (1; 16; 23; 40; 41), y más recientemente, tipo multiplex para diferenciación de subespecie (16) (Tabla 6). Sin embargo, como previamente fue mencionado para qPCR, no se dispone de ninguna PCR que permita identificar con fiabilidad las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie; particularmente varias publicaciones denotan un alto porcentaje de cruzamiento entre propias subespecies. A su vez se detallan los métodos de PCR específicos para determinar *T. foetus* (Tabla 7)

Tabla 6. Primers para la detección de *C. fetus* mediante PCR convencional registrados en la bibliografía y evaluadas en ámbito científico.

Publicación científica	Gen objetivo	Primers
Hum et al. 1997 (15)	cstA (<i>C. fetus</i>)	Fw: 5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3' Rv: 5'-TAGCTACAATAACGACAACT-3'
	parA (Cfv)	Fw: 5'-CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT-3' Rv: 5'-GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT-3'
Abril et al. 2007 (1)	nahE (<i>C. fetus</i>)	FW: 5' GGTTATTTTTTATAACTGTAGGAATGCAGAT 3' Rv: 5' GATCGCTTAAATCTTGTACTTTTAGCTTTT 3'
	ISCfe1 (Cfv)	Fw: 5' ATTAGTATTTGCAATATGTGAA 3' Rv: 5' AATTGATATTAATTTGATTGA 3'

Iraola et al. 2012 (16)	cstA (<i>C. fetus</i>)	Fw: 5'GGTAGCCGCGAGCTGCTAAGAT 3' Rv: 5'TAGCTACAATAACGACAACCT3'
	virB11 (Cfv)	Fw: 5'AGGACACAAATGGTAACTGG3' Rv: 5'GATTGTATAGCGGACTTTGC3'

Tabla 7. Primers para la detección de *T. foetus* mediante PCR convencional registrados en la bibliografía y evaluadas en ámbito científico.

Publicación científica	Gen objetivo	Primers
Felleisen et al. 1997, 1998 (10;11)	ARNr 5.8S (trichomonad)	Fw: 5'-TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC-3' Rv: 5'-CGGTA GGTGAACCTGCCGTTGG-3'
	ARNr 5.8S – ITS1 y 2 (Tf)	Fw: 5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3' Rv: 5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA-3'

Aunque la PCR convencional (o de punto final) puede resultar en alta sensibilidad y especificidad, las mismas suelen ser menores a las obtenidas por qPCR. A su vez, requiere de un método extra para la visualización e interpretación de resultados por electroforesis en gel de agarosa, para analizar los fragmentos de ADN obtenidos tras la amplificación por PCR, de acuerdo con el tamaño del objetivo. Esta visualización se acompaña del agregado de una escalera o Ladder de peso molecular lo que permite observar el tamaño del producto amplificado, para posteriormente, comprobar que el mismo sea acorde al objetivo.

4. Bibliografía

1. Abril C, Vilei EM, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R. 2007. Discovery of insertion element ISCFel1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. Clin Microbiol Infect. Oct;13(10):993-1000. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01787.x. Epub 2007 Aug 13. PMID: 17697006.
2. Belden EL, Robertstad GW. 1965. Application of fluorescent antibody technique for serotyping *Vibrio fetus*. Am J Vet Res. Nov;26(115):1437-41. PMID: 5327088.
3. BonDurant RH, Honigberg BM. 1994. Trichomonads of Veterinary Importance. Ed. Julius P. Kreier, Parasitic Protozoa (Second Edition). Ed. Academic Press. Ch. 2, pag. 111-188, ISBN 9780124260191, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-426019-1.50007-6>.

4. Campero C, Moore D, Odeón A. *et al.* 2003. Aetiology of Bovine Abortion in Argentina. *Vet Res Commun* 27, 359–369. <https://doi.org/10.1023/A:1024754003432>.
5. Catena M. 2002. Campilobacteriosis genital bovina: inmunopatogenia de la mortalidad embrionaria. Tesis doctoral para obtener el grado académico de Doctor en Ciencia Animal. FCV-UNCPBA.
6. Catena MC, Callejas S, Soto P, Aba M, Echevarria H, Monteavaro C, Mazzolli A. 2003. Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. *InVet*, v. 5, n. 1, p. 37-44.
7. Chang W, Ogg JE. 1971. Transduction and mutation to glycine tolerance in *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.* 32:649-653.
8. Clark B. 1971 Venereal diseases of cattle. *Veterinary Review* N° 1 University of Sidney. Australia, pp 526.
9. Chiapparrone ML. 2018. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Campylobacter fetus* aisladas de rodeos bovinos; Tesis doctoral FCV-UNCPBA.
10. Felleisen RSJ. 1997. Comparative sequence analysis of 5· 8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology*, 115(2), 111-119.
11. Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B. 1998. Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *Journal of clinical microbiology*, 36(2), 513-519.
12. Ferreira Figueiredo J, Oliveira Pellegrin A, Bastos Fóscolo C, Paula Machado R, Leite Miranda K, Pereira Lage A. 2002. Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Rev Latinoam Microbiol.* Jul-Dec;44(3-4):118-23. PMID: 17063594.
13. García J, Soto J, Soto P, Malena R, Morsella C, Méndez A, Fiorentino MA, Acuña J, Lucchesi E, Paolicchi, F. 2021. Evaluation of direct immunofluorescence test for *Campylobacter fetus* In bulls experimentally infected and commensal bacteria from the reproductive tract of bulls. *InVet* 2021, 23 (1): 1-14.
14. Hammond D, Bartlett. 1943. The distribution of *Trichomonas foetus* in the preputial cavity of infected bulls. *Am. J. of Vet. Res.* 4: 143-149.
15. Hum S, Quinn K, Brunner J, On SLW. 1997. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, 75, 827–831.
16. Iraola G, Hernández M, Calleros L, Paolicchi F, Silveyra S, Velilla A, Carretto L, Rodríguez E, Pérez R. 2012. Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and

- subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *J Vet Sci.* Dec;13(4):371-6. doi: 10.4142/jvs.2012.13.4.371. PMID: 23271178; PMCID: PMC3539122.
17. Iraola G, Pérez R, Betancor L, Marandino A, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Piccirillo A, Tomás G, Velilla A, Calleros L. 2016. A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Vet Res.*;12(1):286. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0913-3>
 18. Johnson AE. 1965. The diagnosis of trichomoniasis in the bull. *Proceeding of the United State Livestock Sanitary Association*, 69, 183-189
 19. Kita E, Ogimoto K, Suto T. 1966. Detection of *Vibrio fetus* from bulls by means of fluorescent antibody technique. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quad.*: 223 - 232.
 20. Lucchesi EE, Soto P. 1988. Métodos para aislamiento de *Tritrichomonas foetus* en grandes rodeos de toros con análisis microscópico del culot en tubo de hemólisis. IV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Tandil, 2 y 3 de diciembre de 1988.
 21. Martínez CI, Iriarte LS, Salas N, Alonso AM, Pruzzo CI, Dos Santos Melo T, Pereira-Neves A, de Miguel N, Coceres VM. 2023. Prolonged survival of venereal *Tritrichomonas foetus* parasite in the gastrointestinal tract, bovine fecal extract, and water. *Microbiol Spectr.* Dec 12;11(6):e0042923. doi: 10.1128/spectrum.00429-23.
 22. Mc Millen L, Lew AE. 2006. Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet. Parasitol.*, 141, 204–215.
 23. Mellick PW, Winter AJ, McEntee K. 1965. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technique. *Corn Vet* 55: 280-294.
 24. Mueller K, Morin-Adeline V, Gilchrist K, Brown G, Šlapeta J. 2015. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* ‘bovine genotype’ in faecal samples from domestic pigs at a farm where bovine trichomonosis has not been reported for over 30 years. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.010>
 25. 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, (7): 1269–1278.
 26. OMSA Terrestrial Manual 2021, Chapter 3.4.16. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>.
 27. Parssonson IM, Clark B, Dufty J. 1976. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *J. Comp. Path.* 86: 59-66.

28. Persson S, Petersen HM, Jespersgaard C, Olsen KE. 2012. Real-time TaqMan polymerase chain reaction-based genus-identification and pyrosequencing-based species identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* directly on stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;74(1):6-10.
29. Polo C, García-Seco T, Hernández M, Fernández V, Rodríguez-Lázaro D, Goyache J, Domínguez L, Pérez-Sancho M. 2021. Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples. *Theriogenology*. Sep 15;172:300-306. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.06.020. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34311221.
30. Polo C, García-Seco T, Fernández V, Hernandez M, Briones V, Diez-Guerrier A, Dominguez L, Perez-Sancho M. 2022. Molecular detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine samples: a novel real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting *EF1-alpha-Tf1* and a comparative study of published PCR techniques. *Parasitol Res*, 121, 1725–1733. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07487-7>
31. Schulze A, Bagon W, Muller H, Hotzel. 2006. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J Clin Microbiol*, 44, pp. 2019-2024. doi: 10.1128/JCM.02566-05.
32. Silva MF, Kienesberger S, Pereira G, Mateus L, Lopes-da-Costa L, Silva E. 2022. Molecular diagnosis of bovine genital campylobacteriosis using high-resolution melting analysis. *Frontiers in Microbiology*, 13, 969825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969825>
33. Soto P, Monteavaro C, Echevarría H. 2013. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiante, Cap. 17 Epidemiología y control de la Tricomonosis bovina. Ed. Cesar Fiel, Armando Nari Ed Agropecuaria Hemisferio Sur SRL. pag 381 a 402.
34. Soto J, Forletti A, Lucchesi EE, Soto P. 2018. Sensibilidad y especificidad de la PCR como método de Diagnóstico de la Tricomonosis venérea bovina. XXII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, Río Cuarto, Córdoba.
35. Taul LR, Kleckner AL. 1968. Fluorescent antibody studies of *Vibrio fetus*: staining characteristics in semen, preputial exudate, and pure culture. *Am J Vet Res*. Mar;29(3):711–715.
36. Tedesco LF, Errico F, Del Baglivi LP. 1979. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls using two sampling methods and a transport medium. *Aust Vet J.*; 55(7):322–324.
37. Terzolo H, Paolicchi F, Moreira AR, Homse A. 1992. Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *The Veterinary record*. 129. 531-2. 10.1136/vr.129.24.531.

38. van Bergen MA, Dingle KE, Maiden MC, Newell DG, van der Graaf-Van Bloois L, van Putten JP, Wagenaar JA. 2005. Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin Microbiol.* Dec;43(12):5888-98. doi: 10.1128/JCM.43.12.5888-5898.2005.
39. van Bergen MA, Linnane S, van Putten JP, Wagenaar JA. 2005b. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev Sci Tech.* Dec;24(3):1017-26.
40. Vandamme P, Dewhirst FE, Paster BJ, On SLW. 2005. *Campylobacter*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. DR Boone, RW Castenholz, GM Garrity. Ed. The Williams & Wilkins Co. 2^a ed., Vol. 2, Parte C, pag 1147.
41. van der Graaf-van Bloois L, van Bergen MA, van der Wal FJ, de Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA. 2013. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J Microbiol Methods*.;95(1):93-7. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.005.
42. van der Graaf-van Bloois L, Zomer AL, Duim B, Wagenaar JA. 2024. *Campylobacter fetus* subspecies specific PCR assays inferred from comparative genomic analysis for accurate subspecies identification. *Journal of Microbiological Methods*, 226, 107049. doi: 10.1016/j.mimet.2024.107049.
43. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin. Microbiol.* Dec; 40(12):4744-7. doi: 10.1128/JCM.40.12.4744-4747.2002.

5. Anexos

Medios de cultivo para *Tritrichomonas foetus*

Plastridge:

Extracto de carne.....	3 g.
Peptona	10g.
Dextrosa.....	10 g.
Cloruro de Sodio	1 g.
Agar	0,8 g.
Agua Destilada	1000 mL
pH = 7,2 – 7,4	

Sutherland

Infusión de Hígado	1000 mL
Peptona	10 g.
Agar	0,8 g.
pH = 7,4	

Diamond (TYM)

Trypticase*	20 g.
Ext. Levadura	10 g.
Maltosa	5 g.
L - Cisteína	1 g.
L - Ácido Ascórbico	0,2 g.
Fosfato de Potasio (dibásico).....	0,8 g.
Fosfato de Potasio (monobásico).....	0,8 g.
Agar	0,5 g.
Agua destilada	900 mL.

* Opciones de reemplazo de la Trypticase: Tripteína bacteriológica (peptona por hidrólisis de la caseína) y pluripeptona (mezcla de peptona de carne y de caseína) en las mismas cantidades indicadas en la fórmula.

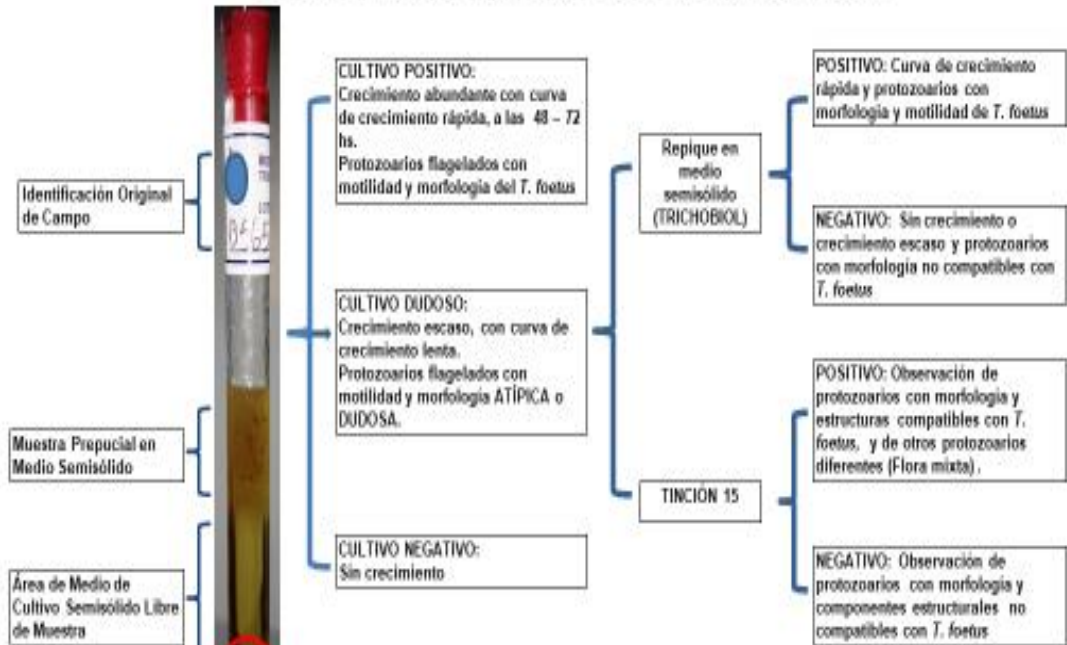
Los medios deben suplementarse con:

- Suero equino o bovino inactivado (30 minutos a 56 °C) al 10%
- Antibióticos: Penicilina 1.000 UI/mL, Estreptomicina 1.000 UI/mL y Nistatina 200 UI/mL.

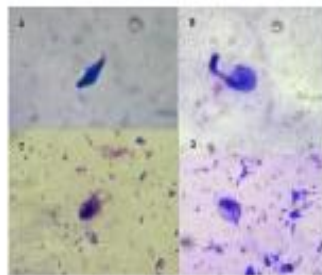
Observaciones: las fórmulas expresadas son las originales de sus autores. La concentración de agar se puede aumentar hasta 1,4 g/litro a los efectos de lograr una mayor densidad del medio semisólido.

En la fórmula del TYM se puede modificar el uso de los dos fosfatos por uno solo (de sodio o potasio: usar dibásico) a una concentración mínima de 1,6 g hasta 4 g en los 900 ml.

PROCEDIMIENTO Y CRITERIOS APLICADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TRICHOMONOSIS BOVINA POR CULTIVO EN MEDIO SEMISÓLIDO . Soto P. et al, 2014 -AAVLD



Área de inicio del crecimiento de *T. foetus* y sitio de observación microscópica



TINCION 15: Observación con microscopio óptico X1000.
 A: *Trichomonas foetus* (Trophozoite, estado normal)
 B: *Trichomonas foetus* (Reversión de pseudopodiste a trofozoite, en condiciones óptimas de cultivo)
 C y D: Protozoarios Intestinales (No *T. foetus*)



CALLES 1 a 10: Cepas de campo diagnosticadas por cultivo como *T. foetus*.
 CALLE 11: Control Positivo (*T. foetus*).
 CALLE 12: Control Negativo, Protozooario No *T. foetus*.
 CALLE 13: Control Negativo (Agua destilada).

A: Amplificones con Primers TFR1 – TFR 2: Fla. Trichomonadidae (372 bp)
 B: Amplificones con Primers TFR 3 – TFR 4: *Trichomonas foetus* (347 bp)

Protozoarios hallados en muestras clínicas enviadas para el diagnóstico de tricomonosis bovina.
 Copyright 1944: Banner Bill Morgan, Parasitologist and Assistant Professor of Veterinary
 Science, University of Wisconsin. United States

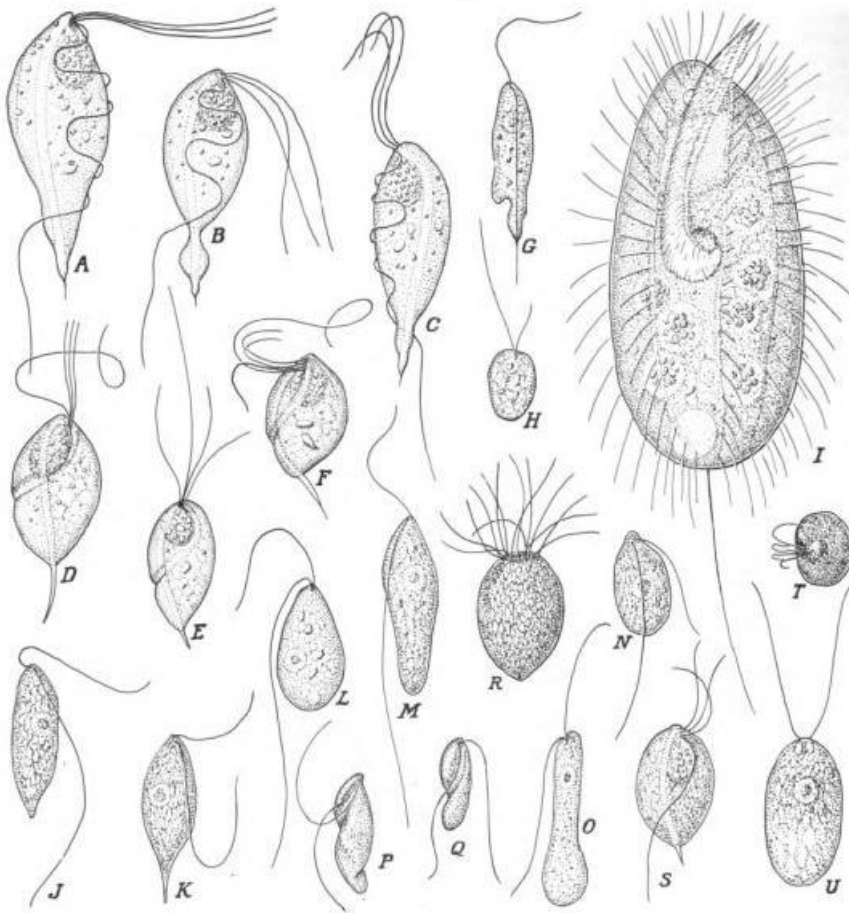


PLATE IV

SOME PROTOZOA ENCOUNTERED IN EXAMINATION OF MATERIAL SENT IN
 FOR DIAGNOSIS OF TRICHOMONIASIS

- | | |
|---|--|
| Fig. A-C.-- <i>Trichomonas foetus</i> (14-21u) | Fig. P-Q.-- <i>Spiromonas angusta</i> (7-9u) |
| Fig. D-F.-- <i>Eutrichomastix</i> sp. (8-13u) | Fig. R.-- <i>Callimastix</i> sp. (11u) |
| Fig. G.-- <i>Cercomonas crassicauda</i> (14u) | Fig. S.-- <i>Eutrichomastix</i> sp. (11u) |
| Fig. H.-- <i>Monas obliqua</i> (6u) | Fig. T.--Same, end view |
| Fig. I.-- <i>Lembus pusillus</i> (33u) | Fig. U.-- <i>Polytoma uvella</i> (12u) |
| Fig. J-O.--Different forms of <i>Bodo</i> (8-14u) | |

Medios de transporte para *Campylobacter fetus*

Cary blair

Tioglicolato de sodio 1,5 g

Fosfato disódico 1,1 g

Cloruro de sodio 5 g

Agar 5 g

Cloruro de Calcio (sol 1%) 9mL

Agua destilada 991 mL

pH 8,4

Ácido nalidíxico 60 µg/ mL

Verde brillante 10 µg/ mL

Cicloheximida 100 µg/ mL

Polimixina B 5 UI/ mL

Irgazan 5 µg/ mL

Caldo Brucella semisólido

Caldo Brucella 28g/L (BBL™ Brucella Broth)

Agar- agar 0,15 % (p/v)

Suplemento antibiótico

Medios de cultivo para *Campylobacter fetus*

Medio de skirrow (para 1000 mL)

Agar Brucella 43 g

Sangre equina hemolizada 50 mL

Suplemento antibiótico*

El medio se prepara disolviendo la base en agua destilada a baño María y se esteriliza en autoclave (121 °C, 15 minutos). Se deja enfriar y a los 56 °C se agrega la sangre equina hemolizada y la mezcla antibiótica. Se distribuye en placas de Petri.

Sangre equina hemolizada: se calienta la sangre desfibrinada a 56 °C en baño María, agitándola cada 5 minutos, durante 40 minutos. Se puede conservar a -20 °C.

Medio de Skirrow modificado (para 1000ml)

Agar Brucella 43 g

Suplemento FBP:

Piruvato de sodio: 0,5 g

Metabisulfito de sodio: 0,5 g

Sulfato ferroso: 0,5 g

Suplemento antibiótico*

Sangre equina hemolizada en la misma proporción indicada anteriormente.

Medio de Butzler

Caldo tioglicolato 30 gr/litro

Agar agar 12 gr

Mezcla antibiótica:

Bacitracina 25000 UI
Novobiocina 5 mg
Cicloheximina 50 mg
Colistin 10000 UI
Cefazolina 15 mg
Sangre 150 ml

Medio de preston

Caldo nutritivo N° 2 (OXOID)
Agar agar 12 gr

Mezcla antibiótica:

Polimixina B 2500 UI
Trimetroprim 10 mg
Actidiona 100 mg
Rifampicina 10 mg
Sangre 50 ml

Agar sangre

Agar nutritivo o TSA, más 10 % de sangre bovina/ovina/ equina
Con o sin suplemento antibiótico*

***Suplemento antibiótico selectivo para *Campylobacter*:**

MERK, cod. 2249

Vancomycin 2 mg
Polymyxin 0,05 mg
Trimethoprim 1 mg

OXOID, cod SR 0069E

Vancomycin..... 5 mg
Polymyxin B 125 UI
Trimetoprim..... 2,5 mg

Procedimiento técnico

Para diagnóstico de campilobacteriosis por IFD

Procesado de las muestras:

Si se trata de exudados uterinos, cérvico vaginales o líquido de abomaso, comience en el punto 5.

En caso de muestra prepucial obtenida por raspaje, lavaje o aspiración con vainas o pipetas, se debe realizar el siguiente procedimiento:

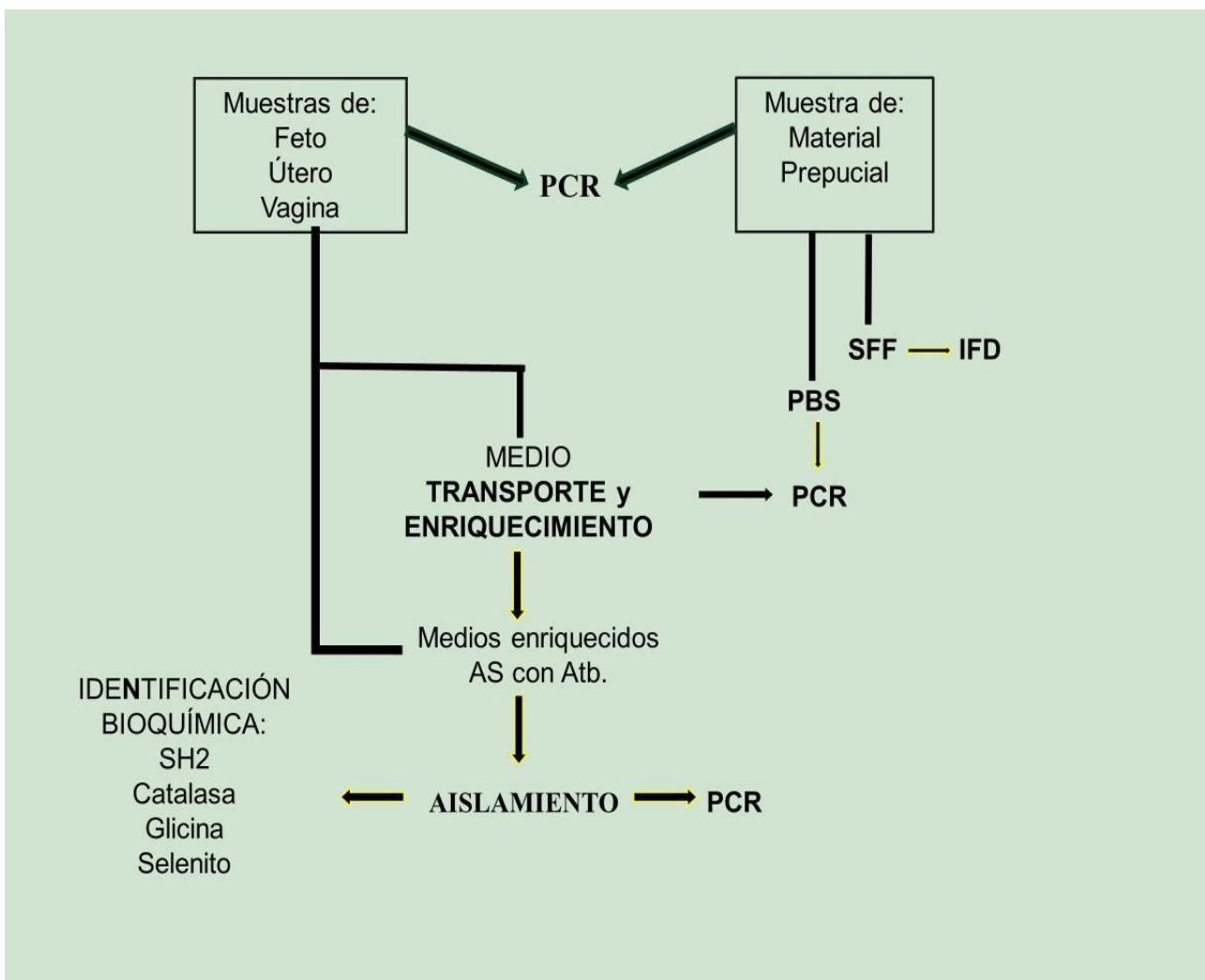
1- Centrifugado de limpieza a 1.000 rpm (190 g para rotor con diámetro de 32 cm), 3 a 5 minutos.

- 2- Trasvasar el sobrenadante a otro tubo debidamente identificado y centrifugar a 4.500 rpm (3.500 g para rotor con diámetro de 34 cm), 30 minutos.
- 3- Descartar el sobrenadante por inversión rápida del tubo.
- 4- Resuspender el sedimento con el líquido del sobrenadante que quedó en el tubo (aproximadamente entre 100 – 200 μ l) utilizando una pipeta de tamaño y calibre adecuado (capilar, pipeta Pasteur o micropipeta con tips).
- 5- Colocar en cada área marcada del portaobjetos (existen en el mercado portaobjetos con 12 áreas circulares de 7 mm de diámetro c/u) una alícuota de la muestra, sin desbordar el área y sin hacer un menisco muy elevado, para evitar fijar un exceso de muestra.
- 6- Dejar secar en estufa a 37°C (en estante nivelado).
- 7- Fijar 15 minutos por inmersión en etanol absoluto, a temperatura ambiente, acetona en freezer por 15 minutos.
- 8- Retirar los portaobjetos del etanol y secarlos en estufa a 37°C
- 9- Enjuagar con agua destilada: 5 segundos.
- 10- Secar en estufa a 37°C.
- 11- Cubrir cada área de la muestra con el conjugado diluido de acuerdo con su titulación.
- 12- Incubar en cámara húmeda 1 hora (estante y cámara nivelados).
- 13- Lavar con PBS, pH 7,2 por inmersión durante 30 minutos, haciendo cambios del PBS cada 10 minutos (Al resguardo de la luz).
- 14- Enjuagar con agua destilada: 5 segundos.
- 15- Eliminar el exceso de humedad del portaobjeto, evitando el secado completo del área con la muestra.
- 16- Colocar una gota pequeña de glicerina bufferada en cada área del portaobjeto y colocar un cubreobjetos (24 x 50 mm) sobre la glicerina, evitando la formación de burbujas.
- 17- Dejar al abrigo de la luz hasta su observación microscópica, con objetivo de inmersión (100X). Previamente se debe colocar sobre el cubreobjetos aceite de inmersión (No usar la glicerina bufferada)
- 18- Las muestras clínicas en las que se observen bacterias con fluorescencia específica y con forma de espirilos serán consideradas positivas para *Campylobacter fetus*.
- 19- Cada vez que realice este procedimiento con muestras clínicas, recuerde colocar un portaobjetos con el control positivo y negativo correspondiente

Observaciones: Titulación del conjugado

Cuando se utilicen Kits comerciales se recomienda tener en cuenta las instrucciones del fabricante. La dilución del conjugado a utilizar como dilución de trabajo se realiza mediante titulación. Esta se basa en la evaluación de diferentes diluciones del conjugado puro frente a una cepa control. Como dilución de trabajo se recomienda seleccionar la anterior a la mayor dilución titulada. Por ejemplo: si la mayor dilución titulada (es decir la mayor dilución en la que observa fluorescencia positiva) es 1/200, deberá seleccionar 1/100 como su dilución óptima. Este proceso deberá repetirse de forma previa a la utilización de una nueva partida de conjugado, cambios de microscopio.

Diagrama del proceso sistemático para el diagnóstico de campilobacteriosis genital bovina a partir de diferentes muestras clínicas



ABACO PARA DETERMINACION DE LA FUERZA CENTRIFUGA

Con el fin de conocer las FCR correspondientes a un diámetro de giro de, por ejemplo 44 cms., cuando la centrífuga opera a una velocidad de 2500 RPM, se enfila la tabla en el punto de 44 cms., valor de la escala de rotación (A) con las 2500 RPM (B) punto de 1a Escala de velocidades, leyendo en la escala central el valor de FCR (C), en este caso, 1537 x gravedad.

MÉTODOS

FCR : $FCR = 0.0001118 \times r \times N^2$
 FCR = Fuerza centrífuga relativa G
 r = Radio de rotación en centímetros.
 N = Velocidad de rotación en RPM.

IRAM : 5521 de setiembre de 1950 30 ml.
 3500 RPM \pm 200 RPM a 260 mm. \varnothing \pm 10 mm.
 Por sustitución de diámetro $V = 3500 \sqrt{\frac{260}{D}}$
 Donde V = velocidad en RPM
 D = Diámetro en cm.

IRAM : 5521 de diciembre de 1961 100 ml.
 2500 RPM. 440 mm. \varnothing 1500 G.
 $FCR = \frac{S^2 \times D \times 0.56}{100000}$
 $S^2 = RPM^2$
 D = Diámetro de giro en cm.

IRAM : 6541 para determinar agua y sedimentos en petróleo $V = 1500 \times \sqrt{\frac{40.64}{D}}$
 V = Velocidad en RPM
 D = Diámetro de giro en cm.

ASTM : Para determinar agua y sedimentos en petróleo.
 1500 RPM 16" 500 G.
 Por sustitución de $\varnothing V = 1500 \sqrt{\frac{16''}{D}}$
 " " " $\varnothing V = 1500 \sqrt{\frac{40.64}{D}}$ cm.

OBTENCION DE RPM

$$V = \sqrt{\frac{FCR \times 100000}{D \times 0.56}}$$

V Velocidad en RPM FCR Fuerza centrífuga relativa requerida.

D Diámetro de rotación de los tubos.

