فراوانی آلودگی به تری تریکوموناس فتوس در گاوهای شهرستان اصفهان

حامد تفضلی [۱]، علی شریف زاده [۲*]

چکیده

تری تریکوموناس فتوس ، تک یاخته ای است که معمولا در گاو بیماری تولیدمثلی ایجاد کرده و باعث ناباروری و سقط جنین می‌گردد. روش مرسوم برای تشخیص آلودگی ، مشاهده مستقیم میکروسکوپی و درصورت زمان محدود برای بررسی،انتقال به محیط انتقالی یا محیط کشت است . هدف از این بررسی تنظیم روش مولکولی برای تشخیص آلودگی تریکوموناسی وتعیین میزان آلودگی درکشتارگاه اصفهان بود. در این بررسی از دو کشتارگاه متفاوت در شهرستان اصفهان ۷۳ گاونر و۲۷ گاوماده موردبررسی قرارگرفتند. با استفاده از سرنگ انسولین استریل و سواپ از رحم و مخاطات تناسلی نمونه گیری صورت گرفت. برای استخراج DNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت اقدام گردید(شرکت سیناژن – ایران). آزمایش واکنش زنجیره ی پلیمرازی (Nested PCR)، با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی RNA ریبوزومی تری تریکوموناس فتوس برای توالی جنس(TFR 1–2) وگونه(TFR3-4) صورت پذیرفت. همه نمونه ها با انجام آزمون Nested PCR مورد بررسی قرارگرفتند . تعداد ٦ گاونر(۸/۲٪)و۲ گاوماده (۷/٤٪) با نشان دادن باند۳۷۲ بازی آلودگی به جنس و۲ گاونرنیز آلودگی به گونه فتوس تری تریکوموناس رابابانند۳۷٤ بازی نشان دادند.سایر نمونه ها با گونه هایی غیر از گونه فتوس مرتبط بودند. بنابراین بر اساس نتایج این تحقیق، شیوع جنس تری تریکوموناس و خصوصا تری تریکوموناس فتوس در نمونه ها ، تاییدکننده لزوم توجه جدی به آزمایشهای غربالگری در گاو به خصوص گاوهای نر می باشد.

واژگان کلیدی: *تری تریکوموناس فتوس ، نشخوارکنندگان ،کشتارگاه ، Nested PCR*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲

مقدمه

تری تریکوموناس فتوس(*Tritrichomonas foetus*) یکی از گونه های جنس تری تریکوموناس می باشد (۱،۲،۳) . تری تریکوموناس فتوس برای بقاوابسته به گاونریاماده است ومدت زندگی آن درخارج ازبدن این دام ها بسیارکوتاه است، چراکه دردرجه حرارت های بالایا محیط خشک به سرعت ازبین می رود و به بسیاری ازضدعفونی کننده ها حساس است. باوجوداین، تعدادی از این انگل ها در روند انجماد اسپرم،زنده می مانند (٤). اغلب گاوهاوتلیسه هابه بیماری حساس اند .تریکومونیازیس به طورمشخص با علائمی چون ناباروری،مرگ زودرس جنین،گاهی سقط وتجمع چرک دررحم(پیومتر)درگله بروزمیکند (۵) . درگاونر، این انگل معمولا در حفره غلاف غضیب به تعدادکمتر وروی فورنیکس(انتهای داخلی آلت تناسلی)ورأس آن به میزان بیشتریافت شده و آسیب کمی ایجاد می‌کنند ، گرچه گزارشاتی در رابطه با التهاب دردناک ناشی از آلودگی به تری تریکوموناس فتوس که باعث ادرار کردن دردناک و عدم تمایل به جفت گیری وجود دارند. گاوهای نر جوان به دلیل سطحی تر بودن شیارها و چین خوردگی های در قضیب و غلاف آن ، نسبت به گاوهای پیر استعداد کمتری در ناقل بودن آلودگی دارا می باشند . گاوهای نر ممکن است تا آخر عمر به صورت ناقل بیماری باقی بماند. عفونت درگاوهای نر معمولا به دلیل جفت گیری با یک گاو ماده آلوده رخ می‌دهد . در گاو ماده عفونت ابتدا سبب التهاب واژن شده سپس عفونت به سمت رحم گسترش پیدا می‌کند که در اینجا باعث سقط های زودرس و عدم باروری حتی به صورت دائمی می‌شود. انگل درون حفرات باقی مانده ولی به لایه های زیرین بافتی نفوذ نمی کند (٦). علیرغم آن که استفاده ی صحیح از تکنولوژی تلقیح مصنوعی فراوانی آلودگی به این انگل را کاهش داده ولی هنوز هم تریکوموناس فتوس در سطح جهانی یکی از دلایل مهم ناباروری محسوب شده و در نواحی جغرافیایی زیادی که از جفت گیری طبیعی به عنوان روش اصلی باروری استفاده می‌شود از نرخ وقوع بالایی برخوردار است . نرخ بالای وقوع در بسیاری از کشورها از جمله در برخی از ایالت های آمریکا مثلا کالیفرنیا و فلوریدا ، کانادا، آفریقای

۱. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی،شهرکرد، ایران

*۲. دانشیار، گروه آموزشی میکروبیولوژی،دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی،شهرکرد، ایران(sharifzadeh@iaushk.ac.ir).

جنوبی، برزیل، و استرالیا گزارش شده است (۷،۸). برنامه ریزی هایی که جهت حذف آلودگی درگله صورت می گیرند، باید بر مبنای جلوگیری ازانتقال آلودگی از گاونربه حیوانات ماده باشد.انجام آزمایش های تشخیصی درگاوهای نر، قبل ازاستفاده ازآنها برای اسپرم گیری،احتمال انتشاربیماری راکاهش می دهد.کنترل این بیماری نیاز به یک برنامه ی تشخیصی برای شناسایی، جداسازی و درمان ماده ها و ازبین بردن یا از دور خارج کردن نرها دارد. پیشرفت های تشخیصی با استفاده از روش های کشت بهبود یافته و به کار بردن روش های نوین مانند PCR، باعث افزایش احتمال یافتن حیوانات آلوده می‌شود.(۹) بنابراین هدف از انجام این تحقیق ارزیابی فراوانی آلودگی تریکوموناسی در گاوهای نروماده اعزامی به کشتارگاه بود.

مواد و روش‌کار

جمع آوری نمونه‌ها

این تحقیق توصیفی مقطعی در بازه زمانی تابستان ۱۳۹۸ صورت پذیرفت . نمونه گیری به روش تصادفی طبقه بندی شده از یک صد گاو شامل ۷۳ راس گاو نر و ۲۷ راس گاو ماده ارجاعی به دو کشتارگاه اصلی شهرستان اصفهان صورت پذیرفت . در جنس نر بلافاصله بعد از ذبح شدن دام از قضیب وغلاف قضیب گاوهای نرنمونه گیری به عمل آمد . پس از ایجاد خراش توسط سوزن سرنگ‌های استریل انسولین بر روی فورنیکس و غلاف قضیب ، لاواژغلاف قضیب صورت گرفت و محتویات به داخل سرنگ استریل انتقال یافت. در جنس ماده نیز با شستشوی واژن یا با خراش دادن گردن رحم بااستفاده ازپیپت تلقیح مصنوعی یابرس فلزی وسپس لاواژ، نمونه ها تهیه گردید . نمونه ها در کمتراز ۲٤ ساعت در داخل محیط انتقالی حاوی آنتی بیوتیک به آزمایشگاه منتقل میگردید. دمای محیط انتقالی بین ۳۸-۵ درجه سانتیگراد نگاه داشته می شد .

استخراج DNA

برای استخراج DNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سیناژن اقدام گردید. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ(ND-1000 PeqLab)موردارزیابی قرارگرفت. DNA های استخراج شده تا زمان مصرف در فریزر -۲۰درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایشNested PCR

آزمون Nested PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن هایRNA ریبوزومی تریکوموناس(ITS) انجام شد.توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه تقریبی محصول به دست آمده در جدول ۱و۲ آمده است. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران – ایران) سنتز گردیدند. تکثیر ژنTFR با استفاده از پرایمر F وR منجر به تولید فرآورده ای با طول تقریبی ۳۷۲ جفت باز در مورد جنس تریکوموناس(۱۰) و قطعه داخلی ۳٤۷ بازی در مرحله دوم آزمایش در مورد گونه فتوس(۱۱)گردید که مورد انتظار بود . در روش Nested PCR به منظور افزایش حساسیت از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود. ابتدا با جفت پرایمر اول ، قطعات مشخصی ازDNA هدف تکثیر یافته و سپس محصولPCR حاصل به لوله دیگری منتقل و به عنوان الگو استفاده گردیده تا با جفت پرایمرهای دوم، مرحله دوم PCR انجام گیرد .واکنش PCR با استفاده از کیت تجاری شرکت سیناژن (CinnaGen PCR master kit) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس با غلظت ۰/٤،2X میکرومولار از هر یک ازجفت پرایمرها و ٤ میکرولیتر از نمونه اولیه DNA یا محصول مرحله اول PCR انجام گرفت. تکثیر در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف،آلمان)انجام شد. چرخه های PCR شامل مراحل دناتوراسیون اولیه در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه و ٤۰ چرخه شامل دناتوراسیون

PCR	Sequence	Size,bp
Forward	5_-TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC-3_	372
Reverse	5_-CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3_	

جدول۱- توالی پرایمری TFR1-2 مورد استفاده در مرحله اول PCR(۱۰)

PCR	Sequence	Size,bp
Forward	5_-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3_	347
Reverse	5_-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3_	

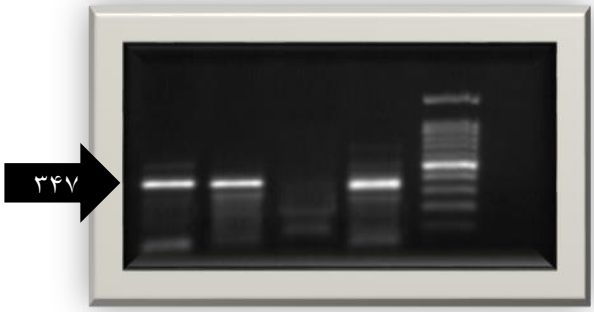
جدول ۲- توالی پرایمری TFR3-4 مورد استفاده در مرحله دوم PCR(11)

در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و امتداد در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود. در نهایت امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. در مرحله دوم PCR نیز چرخه ها شامل مراحل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه ، اتصال پرایمرها در ٥٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ثانیه و امتداد در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود. در نهایت امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت . واکنش های ذکرشده علاوه برنمونه ها، روی نمونه های کنترل مثبت و منفی نیز صورت پذیرفت. نمونه های کنترل مثبت از نمونه های DNA فریز شده از تحقیقات قبلی در مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاداسلامی واحد شهرکرد تهیه گردید. در نمونه های کنترل منفی نیز بجای DNA نمونه به همان میزان آب مقطر تزریقی استفاده گردید . برای استفاده از پرایمرها نیز ابتدا پرایمرهای مورد استفاده توسط شرکت سیناژن ساخته و سپس طبق دستور العمل شرکت سازنده رقیق واستفاده گردید. پس از انجامPCR، به منظورمشخص کردن اندازه محصولات تولیدشده ازروش الکتروفورزاستفاده شده و محصولات روی ژل آگاروز۱درصدحاوی اتیدیوم بروماید‌منتقل و به همراه مارکرهایDNA در ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند .اندازه باندهای حاصل از تکثیرژن های مختلف بااستفاده از مارکرهای (SM0241-Fermentase,Germany) 100bp تعیین گردید.

نتایج

متعاقب آزمایشات PCR انجام گرفته از ۷۳ راس گاو نر و۲۷ راس گاو ماده ارجاعی به کشتارگاه ۸ مورد آلودگی به جنس تریکوموناس شناسایی گردید. ۸/۲٪ گاوهای نر و ۷/٤٪گاوهای ماده این آلودگی را نشان دادند. در مرحله بعدی برای تشخیص گونه فتوس، با استفاده از پرایمرهای خاص این گونه PCR روی محصولات نمونه های مثبت مرحله قبل صورت گرفت که در این مرحله صرفا دو نمونه باند مثبت را نشان دادند و در نهایت از ۱۰۰ نمونه‌ی اخذ شده دو نمونه ی قطعی آلودگی به تری تریکوموناس فتوس ثبت گردید.

نگاره ۱- تصویر ژل الکتروفورز نمونه ها در آزمایش با پرایمر اختصاصی TFR1,2 از سمت راست به ترتیب M سایز مارکر(100bp) ، کنترل مثبت ، کنترل منفی ، نمونه منفی ، نمونه های آلوده



نگاره۲- تصویر ژل الکتروفورز نمونه های آلوده به تری تریکوموناس فتوس در آزمایش با پرایمر اختصاصیTFR3,4 از سمت راست به ترتیب M سایز مارکر(100bp) ، کنترل مثبت ، کنترل منفی ، نمونه های آلوده

بحث

اساس نتایج این تحقیق ، ۸ درصد گاوها آلودگی به جنس تری تریکوموناس و ۲ درصد نیز آلودگی به تری تریکوموناس فتوس را از خود نشان دادند . فراوانی آلودگی در این تحقیق با نتایج سایر محققین همخوان است به شکلی که اسدپور و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ برو بررسی میزان آلودگی اسپرم در شهر تبریز ، ٦ نمونه (۱۳/۳درصد) از ٤٥ نمونه اسپرم‌های مورد آزمایش را مثبت به لحاظ جنس (پرایمرهای TFR1-2) ارزیابی نمودند . در آزمایش با پرایمر TFR3-4(پرایمر اختصاصی گونه فتوس)هیچ گونه باند مثبتی مشاهده نشد. مشاهدات حاکی از وجود تریکوموناس‌هایی غیر از تریکوموناس فتوس بود . انواع مختلفی از تریکوموناس ها وجود دارند به عنوان مثال تری تریکوموناس واژینالیس که عامل بیماری مقاربتی انسان، در دستگاه گوارش دامهای اهلی یافت می شود. اما آلودگی با این گونه ها از راه جفت گیری انتقال نمی یابد و با ناباروری در گاو نیز مرتبط نمی باشد . (۱۲) . گونه انتریس نیز یکی دیگر از گونه های سازش یافته با گاو است. البته از تتراتریکوموناس ها نیز میتوان به گونه های بوترئی و پاولوی اشاره نمود یا از دسته پنتاتریکوموناس ها میتوان از گونه هومینیس که در پریماتها ، انسان ، سگ ، گبه و گاو مشاهده می شود می توان اشاره نمود (۱۳). تریکومونازیس در گاو سبب تحمیل هزینه‌ی بسیار زیادی از لحاظ اقتصادی در مناطقی که برای گاوها از تلقیح طبیعی استفاده شده است می‌شود. آلودگی در گاوهای نر معمولا بدون نشانه و علائم است و تری تریکوموناس فتوس در گاو ناقل تا سال ها بر روی کریپت‌های اپیتلیال غلاف قضیب باقی خواهد ماند. آلودگی‌ها در گاوهای ماده و تلیسه‌ها می‌تواند سبب سقط زودرس، مرگ زودهنگام رویان، پایومترا و ناباروری شود، که بر روی ارزش اقتصادی و سود آوری صنعت گاوداری بسیار موثر است. تریکوموناس فتوس فقط به فرم تروفوزوایت وجود داشته و به صورت خاصی به شکل گلابی همراه با سه تاژک قدامی و یک تاژک پرچمی به سمت خلف می باشد . با این حال در شرایط محیطی نامطلوب مانند کاهش مواد مغذی موجود، حضور داروها و تغییرات ناگهانی دما، این ارگانیسم به شکلی شبیه کیست در می‌آید (١٤) . مطالعات بسیاری در کشورهای متعدد جهان نیز در مورد تریکومونازیس صورت گرفته است، که نشان دهنده‌ی وجود درگیری با این تک‌یاخته در اغلب گله‌ها می-باشد. کمپرو و همکاران در سال ۲۰۰۳ ، مایعات اخذ شده از ٥٦٧ گاو نر نژاد انگوس(Angus) و هرفورد(Hereford) ۲- ۱ ساله را در محیط کشت ساترلند(Satherland) بررسی و حدود ٤/٨درصد پروتوزاها را نشان دادند که بیانگر وجود تریکوموناس بود . هم چنین این محقق در آزمایش PCR انجام شده روی تمامی نمونه‌های مثبت در کشت در یک بازه زمانی دوساله ، باندهای bp۳۷۲ در مواجهه با پرایمر

TFR1-2 (خاص جنس تری تریکوموناس)را نشان داده در حالی که هیچ باند 347bp برای پرایمر TFR3-4 (خاص گونه فتوس)مشاهده نگردیده بود(۱۵) . کوبو و همکاران نیز میزان شیوع آلودگی گاو نر به تریکوموناس فتوس در گله را ٦ درصد اعلام نمودند (١٦) . هم چنین در تحقیق دیگری از مجموع گاو های نر برای وجود تری تریکوموناس فتوس در چهار کشتارگاه امریکا که با استفاده از پی پت‌های تخریش کننده‌ی غلاف قضیب جمع آوری شده و ظرف مدت ٢٤ ساعت به آزمایشگاه منتقل شده بود ، کمتر از ۱ درصد (۰/۱۷۲٪) تریکومونازیس در جمعیت گزارش نمود. هم چنین در بررسی اپی دمیولوژیک فاکتورهای خطر در رابطه با این بیماری، مشاهده گردید که احتمال بیماری در گله‌های بزرگ با گستردگی بیشتری زیادتر بوده و حدود ۱۰٪ گزارش گردید . هم چنین آلودگی با تری تریکوموناس فتوس با عوامل متعددی در گاوهای نر از جمله سن، نژاد، گله و شیوه‌های مدیریتی گله ارتباط داشت (۱۷) . بر اساس اطلاعات پایگاه داده‌های TVMDL برای سال ۲۰۱۰ ، از مجموع آزمایشات تریکوموناس ، نسبت کلی تست‌های مثبت ۳/۷٪ بوده که در این میان میزان حداکثری شیوع مشاهده شده در ماه آگوست با ۵/۵٪ و پایین ترین میزان ٢٪/٦ در ماه نوامبر بود (۱۸). در سال ۲۰۱۱ به بررسی میزان شیوع کمپیلوباکتر فتوس و تریکوموناس فتوس در آفریقای جنوبی با استفاده از روش PCR پرداخته و٤/١٪ از نمونه-های اخذ شده در آزمایش PCR داری باند مثبت بودند (۱۹). در سال ۲۰۱۱ نیز ، به بررسی امکان وجود شبه کیست‌های تریکوموناس فتوس که به طور طبیعی در گاوهای آلوده وجود دارند پرداخته و بر همین اساس از غلاف قضیب هفت گاو بالغ که به طور طبیعی آلوده به تریکوموناس فتوس بودند نمونه گرفته شد تا با بررسی‌های تکمیلی نظیر ویدیوی میکروسکوپی، فلورانس میکروسکوپی، اسکن و انتقال به میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گیرد. تجزیه و تحلیل‌ها نشان داد که تقریبا بیش از ۵۵٪ از انگل‌ها در هر نمونه ی اخذ شده به فرم شبه کیست بودند، در حالی که تقریبا ۲۵٪ از تریکوموناس‌ها ساختاری گلابی شکل داشتند. تحقیقات گذشته نشان می-دهد که شبه کیست‌های تریکوموناس فتوس از طریق جوانه زدن تقسیم می‌شوند. در اینجا این تقسیمات در بیش از ۲۰٪ از تریکوموناس‌های تازه نمونه گرفته شده از غلاف غضیب مشاهده شد. بنابراین، این مطالعه نشان می‌دهد که در گاوهای آلوده، شبه کیست‌ها وجود دارند و تعدادشان از انگل‌های گلابی شکل بیشتر است (١٤). حضور جنس تری تریکوموناس و خصوصا گونه فتوس این جنس در نمونه ها ی اخذ شده از گاوهای نر و ماده در کشتارگاه اصفهان، تاییدکننده حضور این باکتری در گاوداری ها می باشد. باتوجه به اهمیت بالای تری تریکوموناس فتوس در گاو بخصوص گاونر ونقشی که در انتقال عامل آلودگی می تواند داشته باشد، لازم است به خصوص در مناطقی که از تلقیح طبیعی استفاده می گردد توجه جدی به آزمایشهای غربالگری صورت پذیرد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر دوستی ، رییس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد وآقای مومنی ،کارشناس مرکز تحقیقات که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری نمودند ، کمال تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

1. Frey C. Hemphill A. Scild M, Stunzi P .Intestinal Tritrichomonas foetus infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR.Parasit Res.2009. 104: 783–788.
2. Reinmann K. Muller N. Kuhnert P. Campero CM. Leitsch D. Hess M. Henning K. Fort M. Muller J. Gottstein B. Frey C. Tritrichomonas foetus isolates cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1. Vet Parasit .2012.185: 138-144

3. Alan G. Sarah J. Parasitology an Integrated Approach. UK. John Wiley & Sons, Ltd.2012.
4. Owen R. John E. (2006). Tritrichomonas foetus. Vet Clin Food Anim.2006. 22: 595–611.
5. Noakes D. Parkinson T. Englamd G. Arthur's Veterinary Reproduction and Obsthetrics. UK. Elsevier.2001.
6. Greenwell P.Younes M. Roughooputh S. Purification of DNases of Tritrichomonas foetus: evidence that these enzymes are glycoproteins. Inter J Parasit. 2008.38: 749–756.
7. Jesus A. Mendoza I. Susana P. High prevalence of Tritrichomonas foetus infection in Asturiana de la Montana beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. Vet J.2012. 193: 146-151.
8. Oliveria M. Fitho A.Borges J. Soares L.Tritrichomonas Foetus in bulls in the state of parnambuco,Brazil.Rev Brast Med Vet.2016.38:449-453
9. Rae D. Crews J. (2006).Tritrichomonas foetus. Vet Clin Food Anim.2006. 22: 595–611.
10. Felleisen RS. Lambelet N. Bachmann P. Nicolet J. Muller N. Gottstein B. (1998).Detection ofTritrichomonas foetusby PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences.J Clin Microb. 1998.36: 513–519.
11. Grahn RA. BonDurant R H. VanHoosear KA. Walker RL. Lyons LA. (2005).An improved molecular assay for Tritrichomonas foetus.Vet Parasit.2005.127: 33–41.
12. Asadpour R. Salehi N. Jafari R. PCR Detection oh Trichomonad Species in the Semen of Bulls.Bulg J Vet Med. 2011.14: 215-220.
13. Buller N. Corney B. Bovine Trichomonosis. Australian New Zealand Standard Diagnostic Procedure. 2013 http://www.agriculture.gov.au/SiteCollection Documents/animal/ahl/ANZSDP-Bovine-trichomoniasis.pdf (assessed 1 August 2017).
14. Antonio P. Carlos M. Alfredo M. Marlene B. Identification of Tritrichomonas foetus pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. Vet Parasit. 2011.175: 1-8.
15. Campero C. Rodriguez C. Bolondi A. Cacciato C. Cobo E. Perez S. Odeon A. Cipolla A. Bondurant RH. Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-T.foetus trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. Vet Parasit.2003. 112: 167-175.
16. Cobo E. Favetto P. Lane V. Friend A. VanHooser K. Mitchell J. BonDurant R. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with Tritrichomonas foetus. Theriogen.2007. 68: 853-860.
17. Rae D. Crews J. Greiner E. Donovan G. Epidemiology of Tritrichomonas foetus in beef bull populations in Florida.Theriogen.2004. 61: 605-618.
18. Barbara S. Indumathi S. Andy S. Alfonso C. Renata I. Spatio-temporal epidemiology of Tritrichomonas foetus infection in Texas bulls based on state-wide diagnostic laboratory data.Vet Parasit. 2012.186: 450-455.
19. Evelyn M. Awoke G. Tiny H. Mkhevu M. Prevalence of Campylobacter foetus and Trichomonas foetus among cattle from Southern Africa.Afri. J. Biotec.2011.10:10313-10314