

Diagnostic procedures in bovine trichomonosis

Dąbrowska J., Karamon K., Kochanowski M.,
Division of Parasitology and Parasitic Diseases,
National Veterinary Research Institute in Pulawy

This paper aims at the enlightening the diagnostic procedures of an old protozoan bovine disease. *Trichomonas fetus* occurs under natural conditions in cattle, although it is also present in cats, pigs and even humans. This protozoan can cause however, substantial economic losses in cattle. Here, some frequently used methods for identifying *T. fetus* in cattle were presented. The easiest way is the direct microscopic examination of vaginal or preputial swabs. If the result is negative in the first microscopic observation, examined material is plated on artificial culture media. Serological methods in the diagnosis of trichomonosis are of limited significance, while molecular methods are very specific and sensitive and may be considered as referential.

Keywords: trichomonosis, diagnostic methods, cattle.

Rzęsistki są to pasożytnicze pierwotniaki, które mogą wywoływać chorobę zwaną rzęsistkowicą u wielu gatunków zwierząt i człowieka. W zależności od gatunku pasożyta i żywiciela, stanu odporności gospodarza oraz umiejscowienia się pasożyta w jego ciele wywoływane objawy chorobowe mogą być różne. Na przykład u kurowatyh inwazje wywoływane przez *Tetratrichomonas gallinarum* lokalizują się w jelicie i wątrobie. Jest to gatunek dość patogenny dla tych ptaków. Objawy kliniczne przypominają „czarną główkę”.

U gołębi natomiast stwierdzany jest *Trichomonas gallinae*, który lokalizuje się w jamie dzioba, przełyku i wolu, wywołując stany zapalne, którym towarzyszą żółtawe naloty i guzki w jamie dzioba i gardle. Choroba doprowadza do wyniszczenia młodych ptaków, a nawet ich śmierci. Dla większości ptaków kurowatyh *T. gallinae* jest jednak mało patogenny, a inwazja przebiega na ogół bezobjawowo. W przypadku rzęsistkowicy gęsi (*Tetratrichomonas anseris*) i kaczek (*Tetratrichomonas anatis*) pasożyt rozwija się w jelitach ślepych i rzadko staje się przyczyną stanów chorobowych.

Spśród wszystkich gatunków rzęsistków występujących u zwierząt gospodarskich na szczególną uwagę zasługuje *Tritrichomonas fetus* ze względu na duże straty ekonomiczne wywoływane w hodowli bydła. Pierwotniak ten najczęściej w warunkach naturalnych występuje u bydła, chociaż stwierdzano go również u kotów, świń, a nawet ludzi.

Rzęsistki bydłecze są kształtu wrzecionowatego lub gruszkowatego, o wymiarach

Metody diagnostyki laboratoryjnej zarazy rzęsistkowej bydła

Joanna Dąbrowska, Jacek Karamon, Maciej Kochanowski

z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

10–20 µm na 5–15 µm. Posiadają one 4 wici, jedną długą skierowaną do tyłu, która stanowi jednocześnie krawędź błony falującej i 3 krótsze w przedniej części ciała. W skład cytoszkieletu wchodzi aksostyl, kosta i pelta. Aksostyl jest zbudowany z mikrotubul i biegnie wzdłuż osi ciała rzęsistka. U *T. fetus* wystaje on poza tylny koniec ciała i tworzy tzw. kolec. Kosta, czyli żeberko znajduje się pod powierzchnią błony komórkowej i stanowi podstawę błony falującej. Pelta otaczająca kanał okołowiciowy zbudowana jest z mikrotubul i pełni funkcję narządu pomocniczego dla wici. Rzęsistek posiada duże jądro w przedniej części ciała. Niedaleko niego znajduje się ciało parabazalne. U rzęsistków brak jest typowych mitochondriów, a ich funkcje pełnią hydrogenosomy (1, 2, 3).

W niekorzystnych warunkach pierwotniak przyjmuje postać tzw. pseudocysty. Ma ona kulisty kształt i pozbawiona jest wici. Obecnie uważa się, że pseudocysty mają zdolność powrotu do formy trofozoitu, gdy warunki środowiska i dostęp substancji odżywczych są wystarczające.

U buhajów rzęsistki lokalizują się na błonie śluzowej żołądki, w gruczołach śluzowych napletka i ujściu przewodu moczowo-płciowego. Badania wykazały ich obecność również w nasieniu (4). U samców inwazja przebiega najczęściej bezobjawowo, buhaje jednak stanowią główne źródło inwazji. Do zarażenia dochodzi podczas krycia. U samic *T. fetus* najczęściej wywołuje zmiany w błonie śluzowej macicy. Przejściowo lokalizuje się również w pochwie, powodując jej stany zapalne (5). Rzęsistki mogą też namnażać się w ropie w trakcie ropomacicza (6). Inwazja rzęsistków bydłeczych może być przyczyną nieregularnych rui oraz trudności w zapłodnieniu (7). Z kolei w okresie ciąży pierwotniaki mogą powodować uszkodzenia płodu i wczesne ronienia. Pasożyty te stwierdzone są na błonach płodowych poronionych płodów, w ich płucach i przewodzie pokarmowym (8).

W ostatnim czasie odnotowuje się liczne przypadki zarażeń kotów wywołanych przez *T. fetus*. U tych zwierząt pierwotniaki bytują w jelicie grubym i są odpowiedzialne za stany zapalne błony śluzowej

jelita. Nieleczona inwazja jest przyczyną długotrwałych biegunk (9).

Zarażenia rzęsistkiem bydłeczym obserwuje się również, choć bardzo rzadko, u psów, u których objawy są identyczne jak u kotów. Ponadto stwierdzono też kilka przypadków zarażenia u ludzi z dysfunkcją układu immunologicznego, np. z zespołem nabytego niedoboru odporności (AIDS) lub po licznych zabiegach chirurgicznych (10).

Tetratrichomonas fetus jest pasożytem kosmopolitycznym, w przeszłości w Polsce dość pospolitym. Od 1997 r. Polska jest krajem wolnym od zarazy rzęsistkowej bydła. W Europie Centralnej zwierzęta hodowlane podlegają kontroli w tym kierunku, co zapobiega rozprzestrzenianiu się rzęsistkowicy. Zaraza rzęsistkowa bydła znajduje się na liście chorób zakaźnych Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), a także w wykazie chorób zakaźnych podlegających obowiązkowi rejestracji na terenie kraju (załącznik nr 3 do ustawy z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt). W krajach gdzie krowy kryte są naturalnie, inwazja rzęsistka bydłeczego nadal jest przyczyną dużych strat ekonomicznych w stadach bydła.

Ze względu na brak charakterystycznych objawów bardzo trudno zdiagnozować trichomonozę na podstawie badań klinicznych. Dlatego też do rozpoznania rzęsistkowicy służą badania laboratoryjne, wśród których najczęściej stosowane są badania mikroskopowe, molekularne oraz serologiczne.

Badania mikroskopowe

Najpowszechniej w laboratoriach diagnostycznych używane są metody mikroskopowe, polegające na wykryciu żywych trofozoitów rzęsistków w badanym materiale – bezpośrednio lub po wcześniejszym namnożeniu na pożywkach.

Materiał do badań

Próbki do badań w kierunku wykrycia rzęsistków należy pobrać w odpowiedni sposób. Materiał do badań stanowi nabłonek oraz śluz z dróg rodnych krów (pochwa,

szyjki macicy) lub z worka napletkowego buhajów oraz tkanek poronionych płodów.

Materiał ten jest pobierany w postaci wypłuczyn, wymazów, zeszkrobin, a także wycinków tkanek w przypadku badań immunohistochemicznych.

- Wymazy wykonuje się za pomocą jałowych wymazówek zanurzonych w płynie fizjologicznym lub za pomocą gotowych zestawów do wymazów zawierających często dodatkowo podłoże transportowe. Końcówką wymazówki pobiera się śluz oraz nabłonek z wewnętrznych ścian worka napletkowego lub z pochwy, zwracając przy tym uwagę, aby nie zanieczyścić pobieranego materiału mikroflorą z powłok zewnętrznych i przewodu pokarmowego
- Zeszkrobiny można pobrać za pomocą pipet inseminacyjnych poprzez kilkunastokrotne przesuwanie pipety po powierzchni pochwy i szyjki macicy lub po worku napletkowym.
- Wypłuczyny pobiera się najczęściej za pomocą jałowych pipet służących do sztucznej inseminacji połączonych z elastycznym naczyniem (np. butelką). Naczynie to wypełnione jest na ogół fizjologicznym roztworem chlorku sodu w ilości ok. 50 ml. W celu wykonania wypłuczyn pipetę wypełnia się płynem fizjologicznym i wprowadza do worka napletkowego. Zaslaniając palcami otwór jamy napletkowej, przemywa się ją kilkukrotnie płynem (11).
- Do badań histochemicznych mogą służyć utrwalone w formalinie tkanki poronionych płodów, np. płuca oraz łożysko.

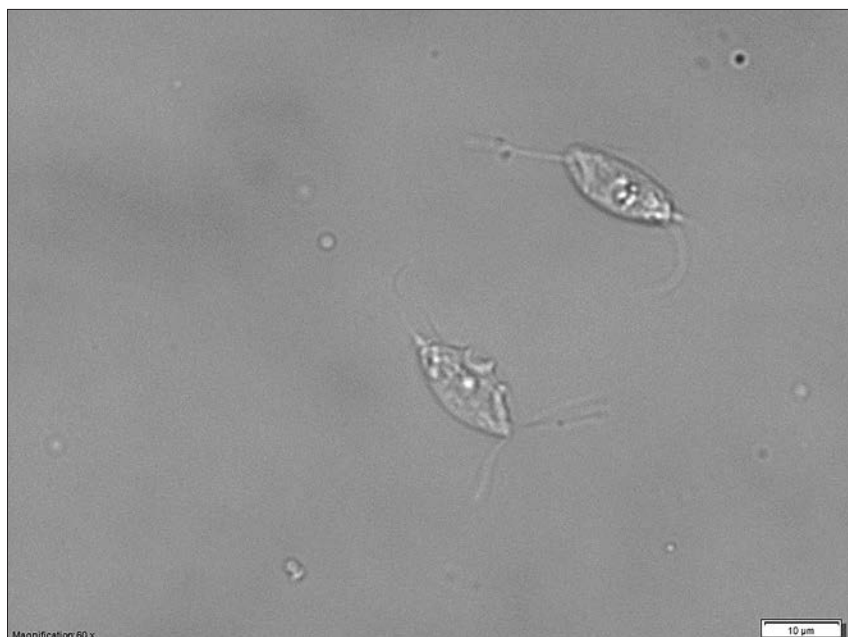
Materiał pobrany za pomocą wypłuczyn oraz wymazów może zostać zagęszczony poprzez wirowanie płynu (5 minut, 1000 rpm; 2, 12). Opinie dotyczące skuteczności tych metod są podzielone (13). Wydaje się jednak, że pobieranie wypłuczyn zapewnia uzyskanie próbki z większej powierzchni niż pozostałymi metodami, a skuteczność badania wypłuczyn może być jeszcze dodatkowo zwiększona poprzez wspomniane już wirowane pobranego materiału. Jak już wspomniano, bardzo ważnym elementem pobierania materiału jest zachowanie higieny. Zanieczyszczenie kałem może powodować wprowadzenie do próbek niepatogennych wiciowców bytujących w przewodzie pokarmowym. Może to być przyczyną fałszywie dodatnich wyników badań mikroskopowych. Okolice sromu lub otworu napletkowego przed pobraniem próbek powinny więc być obmyte wodą lub płynem fizjologicznym, jednak bez użycia roztworów środków dezynfekcyjnych, które mogą wpływać na zmniejszenie liczby żywych rzęsiśtek w pobieranych próbkach. Próbkę powinna zostać zbadana bezzwłocznie po pobraniu materiału. Jeżeli próbka nie

może być dostarczona do laboratorium w ciągu 24 godzin od pobrania, powinna zostać posiana w podłożu hodowlanym zawierającym antybiotyk. Szacuje się, że już po 24 godzinach od pobrania próbki następuje zmniejszenie czułości badania o około 10% (14).

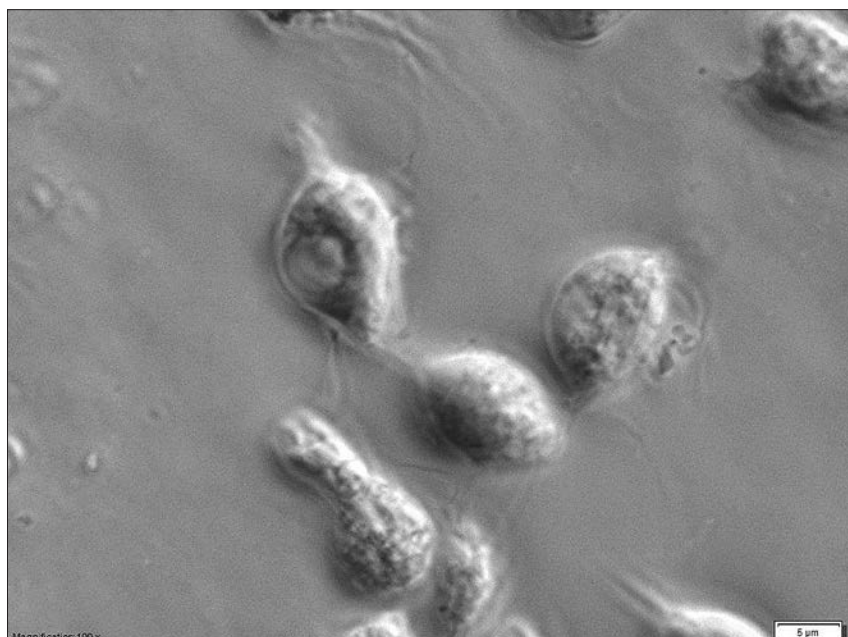
Bezpośrednie badanie mikroskopowe

Najprostszą metodą wykrywania *T. foetus* jest bezpośrednie badanie mikroskopowe materiału pobranego z pochwy krów oraz z worka napletkowego buhajów. Próbką zawierającą materiał zawieszony w płynie fizjologicznym przed badaniem powinna być przechowywana w ciemności (optymalna temp. 25–37°C), a jej

część posiewa się na podłoże hodowlane. Kroplę z dna próbówki zawierającej wypłuczyny nanosi się na szkiełko podstawowe i przykrywa szkiełkiem nakrywkowym, nie dociskając go. Preparat przegląda się za pomocą mikroskopu świetlnego (powiększenie 100–400×). W trakcie badania poszukuje się ruchliwych trofozoitów pasożyta (ryc. 1, 2). Należy jednak zaznaczyć, że w niesprzyjających warunkach środowiskowych można zaobserwować rzęsiśtki w formie kulistej, są to tzw. pseudocysty, które czasami mogą nawet dominować w wypłuczynach z worka napletkowego buhajów (15). Wykrycie nieruchomych form w badanym preparacie jest zdecydowanie trudniejsze niż identyfikacja trofozoitów rzęsiśotka bydłęcego.



Ryc. 1. *Trichostrongylus foetus* obserwowany w mikroskopie świetlnym w jasnym polu widzenia, pow. 60×



Ryc. 2. *Trichostrongylus foetus* obserwowany w mikroskopie świetlnym w kontraście Nomarskiego, pow. 100×

Czułość badania mikroskopowego jest szacowana od 38 do 82% (16) i zależy od liczby rzęsistków w próbce. Należy zaznaczyć, że niezwykle trudne jest odróżnienie *T. foetus* od innych wiciowców z rodziny Trichomonadidae. Dlatego bardzo ważne jest właściwe pobranie próbek.

Hodowle na podłożach

W przypadku gdy przy pierwszej obserwacji mikroskopowej nie wykrywa się rzęsistków, należy wówczas posiać pobrany materiał na sztuczne podłoża hodowlane. Na tych podłożach rzęsistki szybko się namnażają i metoda ta stanowi tzw. złoty standard w diagnostyce rzęsistka bydlęcego. Hodowle takie umożliwiają ponadto izolację rzęsistków z próbek zanieczyszczonych mikroflorą.

Metoda hodowlana jest dużo bardziej czuła niż bezpośrednia obserwacja mikroskopowa (16). Polega na posiewie rzęsistków na odpowiednie podłoża i okresowej obserwacji ich wzrostu. Podłoże jest inkubowane w temperaturze 37°C przez co najmniej 5 dni (17). W trakcie inkubacji niewielka objętość podłoża jest badana kilkakrotnie pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 100–400×. Aby uniknąć kontaminacji bakteryjnej hodowla może być okresowo przesiewana na nowe podłoża. Obecnie do namnażania rzęsistków używane są najczęściej komercyjne, gotowe do użycia pożywki. Zawierają one różne substancje wzrostowe, np. surowicę, węglowodany, żółtko i białko jaja kurzego oraz antybiotyki powstrzymujące rozwój bakterii lub grzybów, które mogą hamować wzrost *T. foetus* (18).

Historycznie jedną z najwcześniejszych stosowanych pożywek było zaproponowane przez Kerr (19) podłoże, zawierające zagęszczoną surowicę bydlęcą, trypsynę i glukozę. Nieco później Kupferberg (20) opracował podłoże, w którego skład wchodziły: hydrolizowana enzymatycznie kazeina, maltoza, hydrochlorek L-cysteiny, błękit metylenowy, agar, surowica bydlęca i chloramfenikol.

W ciągu ostatnich 50 lat podłożem bardzo często stosowanym do hodowli różnych gatunków pierwotniaków, w tym także *T. foetus*, była pożywka Diamonda, stosowana w różnych modyfikacjach. Podłoże to składa się z peptonów, wyciągu z drożdży, maltozy, hydrochlorek L-cysteiny, kwasu L-askorbinowego, wody destylowanej, diwodorofosforanu potasu, wodorofosforanu potasu, kwasu solnego, inaktywowanej surowicy bydlęcej oraz antybiotyków – penicyliny krystalicznej i siarczanu streptomycyny. Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez Gelbart i wsp. (21) podłoże Diamonda zapewnia wyższą skuteczność wykrycia *T. foetus* niż w przypadku hodowli na

podłożu Kupferberga. Powszechnie stosowane jest także podłoże Oxoid CM0161, zawierające ekstrakt z wątroby, glukozę, chlorek sodu, agar, inaktywowaną surowicę końską, streptomycynę oraz chloramfenikol.

W ostatnich latach w diagnostyce rzęsistkowicy coraz częściej stosowany jest gotowy do użycia komercyjny zestaw InPouch™ TF Test. Składa się on z dwóch komór (worków) z tworzywa sztucznego połączonych wąskim kanałem i wypełnionych podłożem hodowlanym. System ten umożliwia bezpośrednie oglądanie próbki. Według producenta InPouch™ TF Test zapewnia uzyskanie wyniku pozytywnego już przy zawartości jednego rzęsistka bydlęcego w badanej próbce. Jednak określona przez Kittel i wsp. (22) czułość badania tym testem wyniosła jedynie 88%. Skuteczność badania testem InPouch™ TF jest porównywalna z hodowlą na podłożu Diamonda (23). Ponadto porównanie przeżywalności i namnażania rzęsistków w trakcie transportu w podłożu Diamonda i w zestawie InPouch™ TF nie wykazuje różnic między tymi pożywkami (24). Zaletą testu InPouch™ TF jest brak konieczności samodzielnego przygotowywania podłoży hodowlanych. Metody hodowlane mogą stanowić wstępny etap, który jest wykorzystywany do przeprowadzenia bardziej czułych badań molekularnych.

Badania molekularne

Metody molekularne są coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce rzęsistkowicy (33, 34, 35, 36). Pozwalają one na skuteczną identyfikację rzęsistka *T. foetus*, co często jest trudne w przypadku badań mikroskopowych. Ponadto za pomocą testów PCR można wykryć te pasożyty, nawet gdy są martwe oraz w przypadku ich małej liczby w próbce (14). Materiał do badań molekularnych mogą stanowić zarówno próbki pobrane z narządów płciowych, jak i fragmenty tkanek poronionych płodów (37).

Pierwsze próby identyfikacji rzęsistków bydlęcych metodami z zakresu biologii molekularnej podjęto już w latach 90. XX w. (38). Dalsze badania doprowadziły do opracowania skutecznych metod PCR do diagnostyki rzęsistka bydlęcego. Szczególnie przydatne okazały się metody bazujące na wynikach uzyskanych przez Felleisen i wsp. (39), które obecnie są rekomendowane przez OIE. Autor ten wykorzystał startery: TFR3 i TFR4 amplifikujące fragment wielkości 347 bp, genu 5,8S rybosomalnego RNA. Metoda PCR z zastosowaniem starterów TRF3 i TRF4 charakteryzuje się dużą czułością – możliwe jest wykrycie DNA pojedynczego rzęsistka z podłoża hodowlanego. Nieco niższą skuteczność stwierdza się w przypadku

amplifikacji materiału pochodzącego bezpośrednio z worka napletkowego, ze względu na wpływ inhibitorów reakcji PCR zawartych w próbce. Dlatego też autor metody sugeruje, aby badania nad identyfikacją *T. foetus* prowadzić z zastosowaniem podłoży hodowlanych. Metoda z użyciem starterów TRF3 i TRF4 charakteryzuje się swoistością wystarczającą do zastosowania w diagnostyce rzęsistkowicy bydła. Badania prowadzone z użyciem izolatów różnych gatunków pierwotniaków z rodziny Trichomonadidae wykazały niespecyficzne reakcje tylko w dwóch przypadkach: *Trichomonas mobilensis* i *Trichomonas suis*. Jednak nie ma to większego znaczenia diagnostycznego, ponieważ *T. mobilensis* występuje tylko u jednego z gatunków małp, natomiast odrębność gatunkowa *T. suis* i *T. foetus* według wielu autorów jest wątpliwa. Istnieje przypuszczenie, że wiciowce z rodzaju *Trichomonas* występujące u świń i bydła są jedynie szczepami tego samego gatunku.

Mutto i wsp. (40) opisali metodę wykrywania *T. foetus* w wypłuczynach z worka napletkowego za pomocą testu PCR, przy zastosowaniu wspomnianych wyżej starterów TRF3 i TRF4, z pominięciem wstępnej hodowli rzęsistka na podłożach oraz izolacji DNA. Wyniki otrzymane w tych badaniach były porównywalne do uzyskanych przy zastosowaniu hodowli rzęsistków na podłożach. Na 203 przebadanych próbek, w 67 stwierdzono rzęsistki w badaniach hodowlanych, a 58 z nich dało także pozytywny wynik w badaniu metodą PCR (czyli uzyskano 9 fałszywie negatywnych wyników). Według autorów ta procedura PCR umożliwia wykrycie materiału genetycznego *T. foetus* przy obecności co najmniej pięciu rzęsistków.

Campero i wsp. (41) proponują natomiast zastosowanie dodatkowej pary starterów (TFR1 i TFR2) specyficznych dla rodziny Trichomonadidae. Badanie wykonuje się wtedy w dwóch etapach. W pierwszym z nich stwierdza się obecność form Trichomonadidae, zaś w kolejnym, z zastosowaniem wcześniej wspomnianych starterów TFR3 i TFR4, wykrywa się *T. foetus*.

Metody immunologiczne

Metody serologiczne w diagnostyce *T. foetus* u bydła mają ograniczone znaczenie. Wynika to z wywoływania słabej odpowiedzi immunologicznej u bydła przez tego pierwotniaka (25). Opracowane zostały różne testy serologiczne, np. wykonywane dość powszechnie w przeszłości test aglutynacji z śluzem pochwowym. Test ten wykorzystuje zjawisko występowania swoistych aglutynin w śluzie pochwowym zarażonego bydła. Jednak stosunkowo mała czułość oraz swoistość tego testu nie pozwala na

dokładną diagnostykę. Opracowano również test ELISA do wykrywania w słuźwie pochwowym przeciwciał IgA skierowanych przeciwko antygenowi powierzchniowemu TF1.17 *T. foetus* (26). Przeciwciała IgA utrzymują się na wysokim poziomie nawet po 24 tygodniach od zarażenia. Wykorzystanie w opracowanym teście antygeny powierzchniowego TF1.17 zapewniło większą swoistość testu niż w przypadku całych komórek rzęsiśtków bydlęcych. Jednakże metoda ta nie może być stosowana do wykrywania rzęsiśtka bydlęcego u buhajów (14). Wykrycie *T. foetus* jest możliwe również metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Metoda ta została zastosowana przez Rhyana i wsp. (27) do wykrycia rzęsiśtka bydlęcego w tkankach utrwalonych formaliną pochodzących z poronionych płodów bydlęcych. Wykorzystanie metody immunohistochemicznej może być pomocne, w przypadku gdy próbki nie nadają się do założenia hodowli.

Inne badania serologiczne, takie jak odczyn wiązania dopełniacza, test aglutynacji z surowicą (28), mikroaglutynacja (29, 30, 31) czy test śródskórny (32) nie są obecnie powszechnie stosowane ze względu na małą swoistość i duże ryzyko wystąpienia wyników fałszywie dodatnich.

Ze względu na brak objawów patognomicznych oraz skutecznego leczenia wykrywanie *T. foetus* metodami laboratoryjnymi ma kluczowe znaczenie dla kontroli choroby rzęsiśtkowej bydła. Jednakże metody laboratoryjne mają także swoje ograniczenia, które w dużej mierze dotyczą problemów z identyfikacją gatunkową w najpowszechniej stosowanych badaniach mikroskopowych. Wydaje się, że szersze zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji gatunkowej wykrytych pierwotniaków (tj. potwierdzenia lub wykluczenia obecności *T. foetus*) może zapewnić odpowiednią swoistość diagnostyczną.

Piśmiennictwo

- Felleisen R.S.J.: Host-parasite interaction in bovine infection with *Trichomonas foetus*. *Microbes and Infect.* 1999, **1**, 807–816.
- Adeyeye A.A., Ate I.U., Bale J.O., Lawal A.I.: Bovine Trichomoniasis: An Overview. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 2012, **60**, 7–18.
- Benchimol M., Diniz J.A., Ribeiro K.: The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. *Tissue Cell.* 2000, **32**, 178–87.
- Joyner L.P.: The elimination of *Trichomonas foetus* from semen by storage in the presence of glycerol. *Vet. Rec.* 1954, **66**, 727.
- Singh B.N., Lucas J.J., Hayes G.R., Kumar I., Beach D.H., Frajblat M., Gilbert R.O., Sommer U., Costello C.E.: *Trichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 4151–8.
- Stefański W.: *Parazytologia weterynaryjna*. Tom 1. 1968, s. 88–89.
- Mukhufi N., Irons P.C., Michel A., Peta F.: Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriotogenology.* 2003, **60**, 1269–78.
- Rhyana J.C., Wilson K.L., Burgess D.E., Stackhouse L.L., Quinn W.J.: Immunohistochemical detection of *Trichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995, **7**, 98–101.
- Zygnier W.: Diagnostyka i zwalczanie rzęsiśtkowicy u kółów. *Zycie Wet.* 2013, **88**, 132–135.
- Dubouché Ch., Caby S., Dufernez F., Chabé M., Gantois N., Delgado-Viscogliosi P., Billy Ch., Barré E., Torabi E., Capron M., Pierce R.J., Dei-Cas E., Viscogliosi E.: Molecular identification of *Trichomonas foetus*-like organisms as infecting agents of human pneumocystis pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2006, **44**, 1165–1168.
- Stefański W.: *Parazytologia weterynaryjna*. Tom 1. PWRiL, Warszawa 1968, s. 91.
- Laing J.A.: *Vibrio fetus* infection of cattle. *F.A.O. Agric. Study.* 1960, **62**.
- Schönmann M.J., BonDurant R.H., Gardner I.A., Van Hooser K., Baltzer W., Kachulis C.: Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Trichomonas foetus* infection in bulls. *Vet. Rec.* 1994, **134**, 620–622.
- Irons P.C.: *Diagnosis of Trichomonas foetus in bulls by culture and PCR methods*. University of Pretoria. 2002.
- Pereira-Neves A., Campero C.M., Martinez A., Benchimol M.: Identification of *Trichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Vet. Parasitol.* 2011, **175**, 1–8.
- McMillen L., Lew A.E.: Improved detection of *Trichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet. Parasitol.* 2006, **141**, 204–215.
- Bryan L.A., Cambell J.R., Gajadhar A.A.: Effects of temperature on the survival of *Trichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch™ TF media. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 227–232.
- Ribeiro L.M.M.: An efficient medium for the isolation of *Trichomonas foetus*. *J. Vet. Res.* 1990, **57**, 209–210.
- Kerr W.R.: The intradermal test in bovine trichomoniasis. *Vet. Rec.* 1941, **97**, 351–363.
- Kupferberg A.B., Johnson G., Sprince H.: Nutritional requirements for *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948, **67**, 304–308.
- Gelbart S.M., Thomason J.L., Osypowski P.J., Kellett A.V., James J.A., Broekhuizen E.F.: Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. *J. Clin. Microbiol.* 1990, **5**, 962–4.
- Kittel D.R., Campero C., Van Hooser K.A., Rhyana J.C., BonDurant R.H.: Comparison of diagnostic methods for detection of active infection with *Trichomonas foetus* in beef heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, **15**, 519–22.
- Parker S., Campbell J., Gajadhar A.: Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Trichomonas foetus* in bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003, **8**, 460–465.
- Bryan L.A., Cambell J.R., Gajadhar A.A.: Effects of temperature on the survival of *Trichomonas foetus* in transport, Diamond's and In Pouch TF media. *Vet. Rec.* 1999, **144**, 227–232.
- BonDurant R.H., Corbeil R.R., Corbeil L.B.: Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Trichomonas foetus*. *Infect. Immun.* 1993, **61**, 1385–1394.
- Ikeida J.S., BonDurant R.H., Corbeil L.B.: Bovine vaginal antibody response to immunoaffinity-purified surface antigen of *Trichomonas foetus*. *J. Clin. Microb.* 1995, **33**, 1158–1163.
- Rhyana J.C., Wilson K.L., Burgess D.E., Stackhouse L.L., Quinn W.J.: Immunohistochemical detection of *Trichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995, **1**, 98–101.
- Robertson M.: *J. Path. Bact.* 1941, **53**, 391.
- Trussell R.E.: Microagglutination tests with *T. vaginalis*. *J. Parasit.* 1946, **32**, 563–569.
- Kott H., Adler S.: A serological study of *Trichomonas* sp. parasitic in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1961, **55**, 333–344.
- Elder J.K.: Examination of twelve strains of *Trichomonas foetus* (Reidmuller) isolated in Queensland and the description of a new serotype. *T. foetus* var. Brisbane. *Queensl. J. Agri. Sci.* 1964, **21**, 193–203.
- Kerr W.R., Robertson M.: A Study of the passively acquired antibody to *Trichomonas foetus* in the blood of young calves and its behaviour in agglutination tests and intradermal reactions. *J. Comp. Path. Therap.* 1946, **56**, 38–48.
- Campero C.M., Rodriguez D.C., Bolondi A., Cacciato C., Cobo E., Perez S., Odeon A., Cipolla A., BonDurant R.H.: Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.* 2003, **112**, 167–175.
- Cobo E.R., Favetto P.H., Lane V.M., Friend A., Van Hooser K., Mitchell J., BonDurant R.H.: Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Trichomonas foetus*. *Theriotogenology.* 2007, **68**, 853–60.
- Felleisen R.S.: Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology.* 1997, **8**, 111–9.
- Parker S., Lun Z.R., Gajadhar A.: Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Trichomonas foetus* in cultured preputial samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001, **11**, 508–13.
- BonDurant R.H., Campero C.M., Anderson M.L., Hooser K.A.: Detection of *Trichomonas foetus* by polymerase chain reaction in culture isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003, **15**, 579–584.
- Felleisen R.S.: Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology.* 1997, **8**, 111–9.
- Felleisen R.S.J., Lamblet N., Bachmann P., Nicolet J., Muller N., Gottstein B.: Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 513–519.
- Mutto A.A., Giambiaggi S., Angel S.O.: PCR detection of *Trichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. *Vet. Parasitol.* 2006, **136**, 357–366.
- Campero C.M., Rodriguez Dubra C., Bolondi A., Cacciato C., Cobo E., Perez S., Odeon A., Cipolla A., BonDurant R.H.: Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.* 2003, **112**, 167–175.

Joanna Dąbrowska,
e-mail: joanna.dabrowska@piwet.pulawy.pl