

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TESE

**IDENTIFICAÇÃO DE PARABASALÍDEOS EM AMOSTRAS FECAIS
DE PEQUENOS RUMINANTES E SUÍNOS**

Caroline Cunha Carreiro

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE PARABASALÍDEOS EM AMOSTRAS FECAIS
DE PEQUENOS RUMINANTES E SUÍNOS**

CAROLINE CUNHA CARREIRO

*Sob a Orientação da Professora
Dr^a. Vera Lúcia Teixeira de Jesus*

*Coorientação do Professor
Dr. Douglas McIntosh*

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ

Julho, 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C314i Carreiro, Caroline Cunha, 1988-
IDENTIFICAÇÃO DE PARABASALÍDEOS EM AMOSTRAS FECAIS
DE PEQUENOS RUMINANTES E SUÍNOS / Caroline Cunha
Carreiro. - 2018.
109 f.

Orientadora: Vera Lúcia Teixeira De Jesus.
Coorientador: Douglas McIntosh.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA, 2018.

1. Tricomonose. 2. Pentatrichomonas hominis. 3.
Tetratrichomonas sp. 4. Cultivo in vitro. 5.
Morfologia. I. De Jesus, Vera Lúcia Teixeira, 1959-,
orient. II. McIntosh, Douglas, -, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CAROLINE CUNHA CARREIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**,
no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM 31/07/2018

VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS (Ph. D) UFRRJ
orientador

MARILENE DE FARIAS BRITO QUEIROZ (Ph. D) UFRRJ

CARLOS WILSON GOMES LOPES (Ph. D) UFRRJ

ISABELLA DE MOURA FOLHADELLA PIRES (Ph. D) FIOCRUZ

SERGIAN VIANNA CARDOZO (Ph. D) UNIGRANRIO

Dedicatória...

Aos meus pais Rogério Gatti Carreiro e Mirian Fortes Cunha Carreiro por me incentivar e apoiar em todos os momentos. Por toda a paciência e compreensão em minha constante ausência.

Ao meu companheiro Cezar Augusto da Silva por tornar meus dias melhores.

À minha grande amiga Vera Lúcia sem ela nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Dr^a. Vera Lúcia Teixeira de Jesus, pela oportunidade, por acreditar em mim, por todo o carinho e dedicação. A grandeza da sua bondade é capaz de transformar; continuarei a me espelhar em ti mesmo que distante;

Ao meu amor Cezar Augusto da Silva pelo companheirismo, dedicação, paciência e por toda ajuda física e mental fornecida durante a realização de todo o trabalho. Meu cúmplice.

Aos meus pais Rogério e Mirian, meus ídolos, muito obrigada por todo tempo que dedicaram a mim, à minha formação e por sermos grandes amigos;

Às minhas queridas Alice, Aline, Flora e Denise por todos os momentos alegres que compartilhamos, vocês me fortalecem;

À Daniela Juliano por estar sempre disposta a me ajudar, pela parceria, pela amizade. Sua colaboração foi fundamental para a realização desse trabalho. Estarei sempre aqui pra retribuir em dobro;

Às companheiras de laboratório Calorine Spitz, Cleide Domingos e Tassia Furtado por me ensinar, ajudar, incentivar e por todos os conselhos;

Ao professor Dr. Carlos Wilson Gomes por toda ajuda e colaboração, obrigada pelo carinho e por me acolher como um dos seus;

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Douglas McIntosh por todos ensinamentos, incentivos e colaborações;

Ao professor José Eugênio Trés, pela amizade, conselhos e oportunidade de aprender que me oferece sempre com muito carinho;

Aos professores Júlio Jacob e Marco Mello pelo acolhimento e carinho durante a realização de toda essa etapa;

A todos os Alunos do Setor de Reprodução Animal, em especial Otávia Reis, quem se mostrou mais do que uma amiga, sempre disponível, sem importar hora e lugar,

Aos Médicos Veterinários Jorge e Nelson Oscaranha, funcionários do Colégio Técnico Nilo Peçanha, Campus Pinheral, RJ, pelo carinho e colaboração para realizar este trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

LISTA DE ABREVIACÕES

μ L - Microlitro
AX - Axóstilo
C - Costa
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético.
FA - Flagelos anteriores
FP - Flagelo posterior
g - Grama
IV - Instituto de Veterinária
Kg - Kilograma
LabMol - Laboratório de Biologia Molecular
mg - Miligrama
MO - Membrana ondulante
NU - Núcleo
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBS - Solução fisiológica fosfatada tamponada
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PE - Pelta pH - Potencial de hidrogênio
RFLP - Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição.
RNA - Ácido ribonucleico
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
mL- Mililitro

LISTA DE ANEXOS

	Págs.
Anexo 1. Declaração de aprovação CEUA 2614120717.....	99
Anexo 2 Declaração de aprovação CEUA 006/2014.....	101
Anexo 3. Composição do meio de cultura Diamond.....	102
Anexo 4. Composição do meio de cultura Hank's.....	103
Anexo 5. Composição do meio de cultura Caldo Peptonado.....	104
Anexo 6. Composição do meio de cultura CHD.....	105
Anexo 7. Composição do meio de cultura CH.....	106
Anexo 8. CARREIRO, C. C.; COELHO, C. D.; JORGE, J. L. B. P.; COSTA, N. O. G.; DO VALLE PAIVA, R.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; DE JESUS, V. L. T. Parasitos intestinais em suínos confinados em uma criação no município de Pinheiral, RJ. <i>Brazilian Journal of Veterinary Medicine</i> , v. 38, supl. 2, p. 117- 122, 2016.....	107
Anexo 9. DOS SANTOS, C. S.; DE JESUS, V. L. T.; MCINTOSH, D.; CARREIRO, C. C.; BATISTA, L. C. O.; DO BOMFIM LOPES, B.; LOPES, C. W. G. Morphological, ultrastructural, and molecular characterization of intestinal tetratrichomonads isolated from non-human primates in southeastern Brazil. <i>Parasitology Research</i> , v. 116, p. 2479-2488, 2017.....	108
Anexo 10. CARREIRO, C. C.; JESUS, V. T.; JULIANO, D. S.; DA SILVA, C. A.; FURTADO, T.T. Diagnóstico de parasitas gastrointestinais em cães em uma localidade da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. <i>Clinica Veterinária</i> . v. 22, supl 15, p. 68-73, 2017.....	109

LISTA DE QUADROS

	Págs.
Quadro 1. Organização taxonômica para os principais parabasalídeos de importância em saúde pública, exemplificando os principais gêneros (CEPICKA et al., 2010)	3
Quadro 2. Sequência dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos parabasalídeos isolados.....	24

LISTA DE TABELAS

	Págs..
Tabela 1. Frequências de endoparasitos encontrados em amostras fecais procedentes de suínos, do município de Pinheral, RJ	28
Tabela 2. Identificação das espécies de parabasalideos isoladas de suínos, após sequenciamento e a comparação com as sequencias disponíveis no GenBank.....	53
Tabela 3. Concentrações médias de <i>Tetratrichomonas</i> sp. (1×10^5) isolados de caprino e ovino (Cepa 48h e 60h) durante 84 horas de cultivo em meio CHD.....	57
Tabela 4. Comparação entre os tempos geração, em toda a fase de crescimentos celular (<i>Lag + Log</i>) e na fase de crescimento exponencial, fase <i>Log</i> ; entre os isolados de <i>Tetratrichomonas</i> sp. de caprino.....	64
Tabela 5. Comparação entre os tempos geração, em toda a fase de crescimentos celular (<i>Lag + Log</i>) e na fase de crescimento exponencial, fase <i>Log</i> , dos isolados de ovino com crescimento de 48 h (cepas 48) e 60 h (cepas 60)	64
Tabela 6. Velocidades médias (número de gerações/hora) de crescimento de <i>Tetratrichomonas</i> sp isolados de caprinos e ovinos, na fase <i>Lag</i> , <i>Log</i> e durante toda a fase de crescimento (<i>Lag + Log</i>), V_m total....	66
Tabela 7. Tamanho médio em micrometros, do corpo e núcleo dos trofozoítas de <i>Tetratrichomonas</i> sp. isolados de caprino e ovino, com valores mínimo e máximo encontrados, de acordo com o formato do corpo dos isolados.....	70
Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero <i>Tetratrichomonas</i> observadas em diferentes hospedeiros.....	75

LISTA DE FIGURAS

		Pag
Figura 1.	Esquema geral das famílias Tritrichomonadidae e Trichomonadidea, representadas por <i>Tritrichomonas foetus</i> (A) e <i>Pentatrichomonas hominis</i> (B), respectivamente, destacando as principais organelas e estruturas celulares. FA, flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente; Mo/UM, membrana ondulante; Pe, pelta; Ax, axóstilo; Co, costa; Ve, vesículas endocíticas; Nu, núcleo; Cp, Corpo parabasal; FP, Flagelo posterior. Barra de escala = 5 µm. Fonte: adaptado de Dos Santos (2015)	5
Figura 2.	Ilustração do processamento das fezes, manejo das amostras e manutenção das culturas através de passagens para novos meios.....	22
Figura 3.	Imagem ilustrativa da câmara de Newbauer, demonstrando os quatro quadrantes a serem contados e a fórmula utilizada para calcular a concentração (número de células/ml).....	23
Figura 4.	Ovos de Strongylida não larvado (A); <i>Trichuris</i> spp (B); oocisto não esporulado de <i>Eimeria</i> (C) em amostras fecais de caprinos. Objetiva de 40x.....	26
Figura 5.	Ovo de <i>Moniezia expansa</i> (A); oocistos de coccídios esporulado (B); ovo fértil de <i>Toxocara vitulorum</i> (C) em amostras fecais de ovinos. Objetiva de 40X.....	27
Figura 6.	Oocistos de coccídios não esporulado (A) e esporulado (B), em amostras fecais de suínos. Objetiva de 100X.....	28
Figura 7.	Ovos de Strongylida não larvado (A) e larvado (B), em amostras fecais de suínos. Objetiva de 40X.....	28
Figura 8.	Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo: Hank's (H), Caldo Peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com Caldo Peptonado e Hank's (CH) e Caldo Peptonado, Hank's e Diamond's (CHD). Amostras em anaerobiose.....	33
Figura 9.	Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo: Hank's (H), Caldo Peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com Caldo Peptonado e Hank's (CH) e Caldo Peptonado, Hank's e Diamond's (CHD). Amostras em anaerobiose.....	33
Figura 10.	Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo: Hank's (H), Caldo Peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com Caldo Peptonado e Hank's (CH) e Caldo Peptonado, Hank's e Diamond's (CHD). Amostras em anaerobiose.....	34
Figura 11.	Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, a cada 24 horas, cultivadas em aerobiose nos meios de cultivo: Hank's (H), Caldo Peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com Caldo Peptonado e Hank's (CH) e Caldo Peptonado, Hank's e Diamond's (CHD).....	34

Figura 12.	Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo CHD. Amostras em anaerobiose e aerobiose.....	35
Figura 13.	Concentração de células por ml das cepas de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, calculadas a cada 24 horas. Cultivadas nos meios de cultivo CHD, em anaerobiose, com vaselina, e em aerobiose, sem vaselina.....	36
Figura 14.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas no meio de cultivo Diamond, em anaerobiose e aerobiose.....	36
Figura 15.	Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, a cada 24 horas, cultivadas no meio de cultivo Diamond, em anaerobiose e aerobiose.....	38
Figura 16.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo Hank's, em anaerobiose e aerobiose.....	38
Figura 17.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo Hank's, em anaerobiose e aerobiose.....	39
Figura 18.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas em meio de cultivo Caldo Peptonado (CP), em anaerobiose e aerobiose.....	39
Figura 19.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas no meio de caldo Peptonado (CP), em anaerobiose e aerobiose.....	40
Figura 20.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo CH, em anaerobiose e aerobiose.....	41
Figura 21.	Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo CH, em anaerobiose e aerobiose.....	41
Figura 22.	Trofozoítas isolados de fezes de ovino, cultivados em meio CHD, antes do processo de axenização, com células piriformes (A) e durante axenização, com células maiores, multinucleadas (*), completa diferenciação (B). (Barra= 10µm). Panótico rápido®.....	43
Figura 23.	Trofozoítos de parabasalídeos de ovino de tamanhos distintos, com a presença de vacuolizações no citoplasma (*). Núcleo (Nu); Flagelos anteriores (FA); e Membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido®.....	45
Figura 24.	Trofozoítos de parabasalídeos de caprino no início do processo de divisão binária, apresentando dois núcleos no início divisão (A) e no final do processo de divisão (B). Núcleo (Nu); Flagelos anteriores (FA); Axostilo (Ax). Panótico rápido®. (Barra= 10µm)...	45

Figura 25.	Trofozoítos de parabasalídeos de ovino em processo de divisão múltipla apresentando quatro núcleos. Núcleo (Nu); Flagelos Anteriores (FA); e Membrana Ondulante (MO). Panótico Rápido® (Barra= 10 µm)	45
Figura 26.	Trofozoítos de parabasalídeos de caprino (A), ovino (B) e suínos (C) com a presença de vacuolizações no citoplasma (*). Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); Flagelos posteriores e membrana ondulante (MO). Panótico Rápido® (Barra= 10µm).	46
Figura 27.	Trofozoítos de parabasalídeos de caprinos. Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); costa (Co); pelta (Pe); corpo parabasal (CP); flagelo posterior (FP); e membrana ondulante (MO). Panótico rápido® (Barra= 10µm).....	46
Figura 28.	Diferença morfológica entre os parabasalídeos isolados de suíno de uma mesma amostra fecal de um leitão com diarreia. A e B- fagelados arredondados com dois flagelos anteriores (FA), membrana ondulante (MO) aderida ao corpo; B- fagelado piriforme com membrana ondulante destacada do corpo, Nucléo (Nu), axóstilo (Ax) e flagelo posterior (FP). Panótico rápido®, obj.100X.....	47
Figura 29.	Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Amostras de ovino (coluna 1-16); amostras de caprino (coluna 17-19); controle positivo de reação (coluna 20-22), correspondente a aproximadamente 379pb; controle negativo do ambiente (coluna 23 e 24), e marcador de peso molecular (coluna 25).....	48
Figura 30.	Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR3 e TFR4. Amostras de ovino (coluna 1-16); amostras de caprino (coluna 17-19); controle positivo de reação (coluna 20 e 21), correspondente a aproximadamente 372 pb; controle negativo.....	48
Figura 31.	Electroforese em gel de agarose (2%) das amostras amplificadas com iniciadores TFR1 e TFR2 e submetidas à digestão com enzima de restrição Alu I. Amostras de ovino (coluna 1-12); amostras de suíno (13-15); amostras de caprino (coluna 16-18); controle positivo de padrão de corte (coluna 19); controle negativo de corte, cepa K (coluna 20), e marcador de peso molecular (coluna 21).....	49
Figura 32.	Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo do mix (coluna 1); amostras de suínos TP1-TP15 (coluna 2-16); controle negativo da extração (coluna 17); controle negativo do ambiente (coluna 18); controle positivo de reação (coluna 19) correspondente a aproximadamente 379pb.....	50

Figura 33.	Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo do mix (coluna 1); amostras de suínos TP16-TP35 (linha 2-22); vazio (coluna 23, 27,28 e 29); controle negativo da extração (linha 24); controle negativo do ambiente (coluna 25); e controle positivo (coluna 26 e 30) correspondente a aproximadamente 379pb.....	50
Figura 34.	Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores Th3 e Th5. Controle negativo do mix (coluna 1); amostras de suínos TP1- TP15 (coluna 2-16); controle negativo de extração (coluna 18 e 19) e controle positivo (coluna 17 e 20) correspondente a aproximadamente 339pb.....	51
Figura 35.	Electroforese em gel de agarose (3%) das amostras amplificadas com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos à digestão com a enzima de restrição <i>Hinf I</i> (á esquerda) e <i>Hae III</i> (á direita). Amostras de suíno (coluna de 1 a 5); Controle positivo (coluna 6); Controle negativo (Coluna 7) e marcador de peso molecular (Coluna 8).....	51
Figura 36.	Curva de crescimento microbiano típico sob condições ambientais constantes. Fonte: Adaptado de Bernaerts et al. (2004).....	55
Figura 37.	Médias das concentração de trofozoíta de parabasalídeos viáveis, das três cepas isoladas das fezes de caprino, durante 84 horas de cultivo em meio CHD com vaselina líquida (anaerobiose) e sem vaselina líquida (aerobiose).....	56
Figura 38.	Médias das concentração de trofozoíta viáveis, das cepas isoladas das fezes de ovino, com crescimento até 48 horas, durante 84 horas de cultivo em meio CHD com vaselina líquida (anaerobiose) e sem vaselina líquida (aerobiose).....	56
Figura 39.	Médias das concentração de trofozoíta viáveis, das cepas isoladas das fezes de ovino, com crescimento ate 60 horas, durante 84 horas de cultivo em meio CHD com vaselina líquida (anaerobiose) e sem vaselina líquida (aerobiose).....	57
Figura 40.	Comparação entre a cinética de crescimento entre as cepas de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos e ovinos. Cultivadas em aerobiose (sem vaselina) no meio de cultivo CHD.....	58
Figura 41.	Comparação entre a cinética de crescimento entre as cepas de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos e ovinos. Cultivadas em anaerobiose (com vaselina) no meio de cultivo CHD.....	58
Figura 42.	Médias das concentração de trofozoíta (10^5 células/ml) de caprino viáveis, durante a fase de crescimento celular (60h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2	59

Figura 43.	Médias das concentração de trofozoíta viáveis, durante a fase de crescimento celular (48h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ²	60
Figura 44.	Médias das concentrações de trofozoíta viáveis, durante a fase de crescimento celular (60h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina) e aerobiose (sem vaselina), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ²	60
Figura 45.	Médias das concentração de trofozoíta (Ln/ml) de parabasalídeos viáveis, durante toda a fase de crescimento (0-60h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ²	61
Figura 46.	Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) de parabasalídeos viáveis, durante a fase <i>log</i> (24-60h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ²	61
Figura 47.	Médias das concentrações dos trofozoítas (Ln/ml) das cepas 48h, durante a fase de crescimento (0-48h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ² ...	62
Figura 48.	Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) das cepas 60h, durante a fase de crescimento (0-60h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ² ...	62
Figura 49.	Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) das cepas 48h, durante a fase <i>Log</i> (24-48h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ² ...	63
Figura 50.	Médias das concentrações dos trofozoítas (Ln/ml) das cepas 60h, durante a fase <i>Log</i> (24-60h) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R ² ...	63
Figura 51.	Trofozoítos de <i>Tetratrichomonas</i> sp de ovinos (A e B) e caprinos (C) com formato: fusiforme (A), arredondados (B) e oval (C). Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); flagelo posterior (FP); e membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido@.....	68
Figura 52.	Desenho esquemático caracterizando morfológicamente os trofozoítos de quatro diferentes cepas isolados de fezes de ovino em regiões e momentos distintos, de acordo com Andersen et al. (1962).....	69

Figura 53.	Trofozoítos de <i>Tetratrichomonas</i> sp de caprino com a presença de vacuolizações no citoplasma (*). Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). Panótico rápido®. Barra= 10µm.....	70
Figura 54.	Trofozoítos de <i>Tetratrichomonas</i> sp de caprino com a presença de quatro flagelos anteriores. Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); costa (Co); flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). Panótico rápido®. Barra= 10µm.....	72
Figura 55.	Trofozoítos de <i>Tetratrichomonas</i> sp de caprino com a presença múltiplos flagelos. Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido®. Obj. 100.....	72
Figura 56.	Trofozoítos de <i>Tetratrichomonas</i> sp de ovino no início da divisão celular, com núcleo em formato de coração e presença de dois peltas (A). Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); costa (Co); pelta (Pe) e membrana ondulante (MO). Panótico rápido®. Barra = 10µm.....	72
Figura 57.	Trofozoítos de <i>Tetratrichomonas</i> sp de ovino. A- citoplasma acompanhando o axóstilo (Ax) até seu término; B axóstilo se projetando para fora do citoplasma. Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA) e costa (Co). Panótico rápido®. Barra= 10µm.....	73
Figura 58.	Trofozoítos de de <i>Tetratrichomonas</i> sp de ovino em processo de divisão binária. Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido®. Obj. 100.....	73
Figura 59.	<i>Tetratrichomonas</i> sp de caprino em processo de divisão celular, múltipla (A e B) e pseudocisto em processo de divisão apresentando dois núcleos (C). Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax); costa (Co), flagelo posterior (FP). Panótico rápido®. Barra= 10µm.....	73

RESUMO

CARREIRO, Caroline Cunha, **Isolamento de Parabasalídeos de Amostras Fecais de Pequenos Ruminantes e Suínos**, Seropédica; UFRRJ, 2018. 109 p. Tese (Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

Tricomonose é causada por protozoários pertencentes ao filo Parabasalia, que são encontrados parasitando o trato digestório e geniturinário de diferentes espécies animais, inclusive humanos. Anteriormente esses parabasalídeos não eram considerados responsáveis por infecções emergentes por apresentar-se envolvidos não só em regiões específicas de infecção, como também hospedeiro-específico. No entanto, vem sendo observada a presença de um mesmo protozoário com uma grande diversidade de hospedeiros, sendo estes atribuídos a diferentes distúrbios clínicos. Em suínos, esses flagelados são descritos no trato intestinal, e estão associados a quadro de diarreia; na cavidade nasal, está associado à rinite atrófica, além de outros distúrbios respiratórios. No entanto, pouco se sabe a respeito das possíveis espécies de parabasalídeos envolvidas no parasitismo nos pequenos ruminantes. O objetivo desse estudo foi diagnosticar as espécies de parabasalídeos encontradas no trato gastrointestinal de caprinos, ovinos e suíno. Para tal, este estudo foi dividido em partes. Na primeira foi feita a triagem das amostras fecais, com avaliação de frequência destes protozoários, isolamento e cultivo, além da caracterização morfológica em nível de filo e identificação molecular dos isolados. A segunda e terceira partes consistiram na tipificação do comportamento de *Tetratrichomonas* sp isolados de amostras fecais de pequenos ruminantes em meio de cultivo e a caracterização morfológica dessa espécie, respectivamente. A frequência de parabasalídeos encontrada foi de 42,85 % em caprinos (6/14), 68% em ovinos (30/44) e 71,25% em suínos (57/80). O meio de cultivo CHD foi o melhor entre os testados para o isolamento desses flagelados; todos os isolados apresentaram características morfológicas compatíveis com o filo Parabasalia. O sequenciamento revelou que todos os isolados de pequenos ruminantes detinham 100% de similaridades com *Tetratrichomonas* sp isolados de prepúcio de touro. Em suínos, além de diagnosticadas diferentes espécie do gênero *Tetratrichomonas*, ainda foi isolado *Pentatrichomonas hominis*. Estes flagelados estão envolvidos em diversos distúrbios clínicos em diferentes hospedeiros, e o papel destes animais como reservatórios de parabasalídeos devem ser cautelosamente considerados. Este estudo foi o primeiro a relatar a ocorrência de *Tetratrichomonas* sp em pequenos ruminantes, e realizar a cinética de crescimentos destes espécimes em meio de cultivo.

Palavras chave: tricomonose, *Pentatrichomonas hominis*, *Tetratrichomonas*, Cultivo *in vitro*, morfologia.

ABSTRAT

CARREIRO, Caroline Cunha, **Isolation of Parabasalids in Fecal Samples: Small Ruminants and Pigs**, Seropédica; UFRRJ, 2018. 109 p. Tese (Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

Trichomoniasis is caused by protozoa belonging to the phylum Parabasalia, which are found parasitizing the digestive tract and genitourinary tract of different animal species, including humans. Previously, these parabasalids were not considered to be responsible for emerging infections because they were involved not only in specific infection regions, but also in host-specific regions. However, the presence of a same protozoan with a great diversity of hosts has been observed, being these attributed to different clinical disorders. In swine, these flagellates are described in the intestinal tract, and are associated with diarrhea; in the nasal cavity, is associated with atrophic rhinitis, in addition to other respiratory disorders. However, little is known about the possible parabasalid species involved in parasitism in small ruminants. The objective of this study was to diagnose the parabasalid species found in the gastrointestinal tract of goats, sheep and swine. For this, this study was divided into parts. In the first one the fecal samples were screened, with frequency evaluation of these protozoa, isolation and cultivation, besides the morphological characterization at phylum level and molecular identification of the isolates. The second and third parts consisted in typing the behavior of *Tetratrichomonas* sp isolated from fecal samples of small ruminants in culture medium and the morphological characterization of this species, respectively. The frequency of parabasalids was 42.85% in goats (6/14), 68% in sheep (30/44) and 71.25% in pigs (57/80). The CHD assay medium was the best among the tested for the isolation of these flagellates; all isolates showed morphological characteristics compatible with the Parabasalia phylum. Sequencing revealed that all isolates of small ruminants had 100% similarities with *Tetratrichomonas* sp isolated from bull prepuce. In pigs, in addition to diagnosed different species of the genus *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas hominis* was still isolated. These flagellates are involved in several clinical disorders in different hosts, and the role of these animals as parabasalid reservoirs should be carefully considered. This study was the first to report the occurrence of *Tetratrichomonas* sp in small ruminants, and to perform the kinetics of growth of these specimens in culture medium.

Key words: Trichomoniasis, *Pentatrichomonas hominis*, *Tetratrichomonas*, *In vitro* culture, morphology.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância da Agropecuária no Brasil	3
2.2 Parabasalídeos.....	4
2.3 Morfologia	6
2.3.1 Membrana plasmática	6
2.3.2 Citoesqueleto.....	6
2.3.3 Vacúolos e lisossomos	7
2.3.4 Hidrogenossomos	8
2.3.5 Retículo endoplasmático	8
2.3.6 Complexo de Golgi	8
2.3.7 Núcleo	8
2.4 Breve Histórico Sobre Patogenia	9
2.5 Formas de Transmissão.....	14
2.6 Potencial Zoonótico	15
2.7 Diagnóstico	15
2.7.1 Microscopia direta e cultivo.....	16
2.7.2 Métodos moleculares.....	16
3 Parte I: Diagnóstico de parabasalídeos isolada de fezes de pequenos ruminantes e suínos naturalmente infectados: isolamento, identificação fenotípico e genotípico dos isolados. .	20
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.1 Histórico dos animais	20
3.1.1.1 Caprinos	20
3.1.1.2 Ovinos	20
3.1.1.3 Suínos.....	20
3.1.2 Processamento das amostras no laboratório.....	20
3.1.2.1 Centrifugo flutuação em açúcar	21
3.1.2.2 Diagnóstico de parabasalídeos	21
3.1.3 Cultivo de parabasalídeos.....	21
3.1.3.1 Meios de enriquecimento para o isolamento	21

3.1.3.2 Isolamento inicial das cepas e manutenção em cultivo	21
3.1.4 Contagem das células em câmara de Newbauer.....	22
3.1.5 Seleção do meio ideal para o isolamento de parabasalídeos de pequenos ruminantes	23
3.1.6 Axenização	23
3.1.7 Análise morfológica	24
3.1.8 Identificação molecular	24
3.1.8.1 Extração de DNA genômico.....	24
3.1.8.2 Iniciadores (<i>primers</i>)	24
3.1.8.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	24
3.1.8.4 Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP)	25
3.1.8.5 Sequenciamento dos produtos da PCR.....	25
3.1.9 Análise estatística.....	25
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.2.1 Diagnóstico parasitológico.....	26
3.2.1.1 Pequenos ruminantes.....	26
3.2.1.2 Suínos.....	27
3.2.2 Diagnóstico de parabasalídeos	30
3.2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i>	31
3.2.2.2 Perfil de crescimento em diferentes meios de manutenção.....	32
3.2.2.3 Axenização	42
3.2.2.4 Análises morfológicas dos isolados de pequenos ruminantes e suínos.....	44
3.2.2.5 Análises moleculares dos isolados de pequenos ruminantes	48
3.2.2.6 Análises moleculares dos isolados de suínos.....	50
4 PARTE II: Comparação do perfil de crescimento em meio de cultivo CHD de <i>Tetratrichomonas</i> sp. isolados de caprinos e ovino	54
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1.1 Cinética de crescimento das cepas em meio CHD	54
4.1.2 Cálculo do coeficiente de crescimento e da taxa de geração das cepas	54
4.2 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	55
5 PARTE III: Estudo morfométrico das espécies de <i>Tetratrichomonas</i> cultivadas em meio CHD, isolados de caprinos e ovinos	67
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
5.1.2 Fotomicrografias e mensurações dos trofozoítos.....	67

52 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	82
8 ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

O filo Parabasalia é formado por protozoários flagelados amitocôndriais, sendo a maioria destes pertencentes às classes Trichomonadea (incluindo *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas* entre outros) e Tritrichomonadea (incluindo os gêneros *Tritrichomonas* e *Dientamoeba*). Estes parabasalídeos são amplamente conhecidos como tricomonas (CEPICKA et al. 2010) e são caracterizados pela presença de um citoesqueleto bem desenvolvido, consistindo de três a cinco flagelos anteriores, um flagelo recorrente que percorre toda a extensão do corpo formando ondas (membrana ondulante) e se projeta na porção final do corpo, dando origem ao flagelo posterior (BRUGEROLLE & LEE, 2001).

Diversos destes microrganismos são frequentemente encontrados no sistema gastrointestinal ou reprodutivo de seres humanos e de animais. Apesar de alguns possuírem baixa patogenicidade, algumas espécies são agentes etiológicos de patologias de grande importância médica e veterinária, como: *Trichomonas vaginalis*, que em humanos é responsável pela doença sexualmente transmissível não viral mais frequente no mundo; *Tritrichomonas foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) espécie de maior importância veterinária, por causar problemas reprodutivos em bovinos, levando a grandes perdas econômicas na pecuária. E atualmente, assim como a espécie *Pentatrichomonas hominis*, está em evidência por ser atribuída à diarreia crônica em animais de companhia. Além destas, *Tetratrichomonas gallinarum* e *Trichomonas gallinae* são espécies não menos importantes, que acometem diferentes espécies de aves, e causam lesões severas que frequentemente são fatais.

Em suínos, *T. foetus* (= *T. suis*) é descrito no trato intestinal, podendo levar a quadros de diarreias (quando ocorre invasão da mucosa intestinal), e na cavidade nasal, sendo associados à rinite atrófica e a outros distúrbios respiratórios, dentre eles bronquite e pneumonia. As enterites descritas na suinocultura, não respondem à antibioticoterapia convencional e são responsáveis por grandes perdas econômicas, sobretudo quando acometem os leitões, não só pela alta mortalidade, como também pela diminuição do ganho de peso e pelo alto custo para seu controle. Recentemente, outros flagelados foram descritos parasitando o trato gastrointestinal de suínos, alguns também foram atribuídos a distúrbios clínicos, como *P. hominis* e *Dientamoeba fragilis*, e outros em que a patogenicidade em suínos ainda é desconhecida (*Tetratrichomonas buttreyi*, *Hypotrichomonas acosta* e *Trichomitus batrachorum* e *Tritrichomonas rotunda*). No entanto, no Brasil não há relatos sobre a frequência destes flagelados em suínos, tão pouco sobre a patogenicidade das cepas isoladas.

Em pequenos ruminantes a literatura disponível sobre o assunto é muito escassa. Em um estudo recente, realizado na China, Li et al. (2018) fez um levantamento sobre a frequência de *P. hominis* em pequenos ruminantes e constatou infecção em duas cabras, mas em nenhuma ovelha. Antes dessa, não havia nenhum outro relato sobre a existência destes protozoários no trato intestinal de caprinos. Em ovinos, o relato mais recente foi feito por Andersen et al. (1962), no qual há a descrição morfológica de cepas de *Trichomonas ovis*, isolado anos antes do trato intestinal de ovinos. Além deste, existe apenas mais um relato de parabasalídeos em ovinos, *Ditrichomonas ovis* (ROBERTON, 1932).

Perante a falta de estudos sobre o assunto, a identificação desses flagelados é crucial

para o correto diagnóstico; sobretudo pela possibilidade desses animais albergarem cepas patogênicas, que já são descritas em uma variedade de espécies hospedeiras causando distúrbios clínicos, sobretudo em humanos. Deste modo, estes mamíferos podem ter sua saúde comprometida, ou mesmo serem portadores, responsáveis pela disseminação destes microorganismos.

Contudo, o objetivo deste trabalho foi relatar a frequência destes flagelados nestas espécies de animais domésticos (caprinos, ovinos e suínos); isolar e identificar quais as espécies de parabasalídeos envolvidos no parasitismo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da Agropecuária no Brasil

O agronegócio tem grande importância para a economia nacional, pois é um dos responsáveis pelo desenvolvimento econômico e social de muitos municípios brasileiros, gerando emprego no campo, na indústria, no comércio e nos serviços (RODRIGUES et al., 2009). A agropecuária brasileira participou em 2017 com 5,7% do produto interno bruto (PIB) do País, movimentou em apenas um trimestre (julho-agosto-setembro) cerca de R\$ 70,29 bilhões, contudo apresentou um crescimento acumulado no ano de 14,5% (IBGE, 2017).

Dentre as diferentes cadeias produtivas integrantes do sistema agroindustrial brasileiro, a de suínos vem se destacando, com um efetivo de 39,95 milhões de cabeças em 2016, um aumento de 0,4% em relação a 2015 (IBGE, 2016). Ocupa uma posição de destaque no ranking mundial, como o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo (ABPA, 2017). A Região Sul abriga 49,9% do plantel, seguido pelas Regiões Sudeste com 16,9%, Centro-Oeste com 14,9%, Nordeste com 14,6% e Norte com 3,6%.

A produção de pequenos ruminantes não possui tanta relevância para a economia nacional, mas é uma atividade produtiva, desenvolvida em quase todo o Brasil, e apresenta grande importância econômica e social, sobretudo para o semiárido nordestino, sendo a principal fonte de proteína para a população de baixa renda (AHID et al., 2008). Dados do IBGE (2016) apontam um rebanho efetivo de 9,78 milhões de caprinos e 18,43 milhões de ovinos, apesar da pequena produção comparada à de bovinos, com 218,23 milhões de cabeças (IBGE, 2016); o mercado mundial está em constante ascensão, sendo o Brasil o país com maior potencial de crescimento (ASSCO, 2014).

A maior parte do rebanho de caprinos do país está concentrado na Região Nordeste (93%), principalmente na Bahia e em Pernambuco, que juntos detêm mais de 50% do efetivo nacional. A exploração é destinada à produção principalmente de leite, que contém 20% mais cálcio e até 30% menos colesterol quando comparado ao leite bovino. No entanto, a carne é uma ótima opção nutritiva devido aos baixos teores de colesterol, calorias e gorduras, sobretudo a de animais jovens, que possui menor teor de açúcar e teores semelhantes de proteínas e vitaminas, além de seu sabor característico, maciez e suculência. O couro é de alta qualidade, sendo utilizado como matéria prima para a indústria de calçados e vestuário (MADRUGA et al., 2002; VILLARROEL et al., 2004).

A Região Nordeste concentrou 63,0% do rebanho nacional de ovinos, seguida pela Região Sul (23,9%). Esta espécie animal é destinada à produção de lã, sobretudo no Rio Grande do Sul, que detém 98% da produção nacional. E a produção de carne, que está concentrada na região Nordeste do país. Assim como a carne de caprino, esta tem alto valor nutritivo, com maior digestibilidade que a de bovino, além disso, a maior parte das gorduras da carne de ovinos é do tipo mono ou poli-insaturada, que reduzem o LDL, popularmente conhecido como colesterol ruim. Inclusive, a quantidade de gordura saturada, responsável pelo aumento do mau colesterol, é mais baixa na carne de cordeiro do que na bovina (ASSCO, 2014). Contudo, a demanda pela carne é bem maior que a produção nacional, e portanto, a maior parte da carne consumida no país é importada do Uruguai (IBGE, 2016).

Apesar de o consumo da carne ovina e caprina ainda ser baixo, comparado ao de outras espécies como bovina, suína e aves, os grandes centros têm aumentado o consumo destas, principalmente na Região Sudeste, onde a população tem maior poder aquisitivo e busca cada vez mais a introdução de alimentos mais saudáveis às dietas. Contudo, as perspectivas de comercialização são promissoras (GONSALVES et al., 2012),

Um dos maiores entraves na produção de caprinos, ovinos e suínos são os problemas de ordem sanitária, pois os sistemas de criação mais utilizados no país envolvem o confinamento desses animais, o que aumenta o contato entre os animais, aumenta a exposição desses aos dejetos, dificulta a sanitização do ambiente, aumentando assim a incidência de doenças, sobretudo as parasitárias. Este fato, às vezes, chega a inviabilizar a produção, não só pelo índice de mortalidade dos animais, sobretudo os mais jovens, mas também pelas consequências negativas no desenvolvimento dos animais, no decréscimo da taxa de ganho de peso e na conversão alimentar, além dos excessivos gastos com medicamentos para prevenção e controle (MORES et al., 1991; UNIGWE et al., 2017).

Conhecer as principais espécies que estão envolvidas no parasitismo, bem como a prevalência destas nessas populações animais é fundamental para que haja um sucesso nas medidas de controle e profilaxia.

2.2 Parabasalídeos

O Filo Parabasalia representa um grupo relativamente grande de flagelados, com 450 espécies descritas (ADL et al., 2007). Algumas destas são responsáveis por causar a tricomonose em diversas espécies animais (MOODLEY et al., 2002; LUN et al., 2005; RODNING et al., 2008; MELONI et al., 2011). Recentemente, estudos ultraestruturais e filogenéticos realizados em nível molecular permitiram uma nova organização taxonômica para este filo. De acordo com seis principais linhagens, os parabasalídeos foram organizados nas seguintes classes: Hypotrichomonadea, Cristamonadea, Trichonymphea, Spirotrichonymphea, Trichomonadea e Tritrichomonadea (CEPICKA et al., 2010). Nas duas últimas classes estão os protozoários de maior importância em saúde pública, agrupados dentro das ordens Trichomonadida e Tritrichomonadida, respectivamente. Dados estes apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Organização taxonômica para os principais parabasalídeos de importância em saúde pública, exemplificando os principais gêneros (CEPICKA et al. 2010).

Filo Parabasalia
Classe 1 Trichomonadea
Ordem1 Trichomonadida
Família 1 Trichomonadidae
Gênero <i>Trichomonas</i> , <i>Pentatrichomonas</i> , <i>Tetratrichomonas</i>
Classe 2 Tritrichomonadea
Ordem 1 Tritrichomonadida
Família 1 Tritrichomonadidae
Gênero <i>Tritrichomonas</i> ,
Família 2 Dientamoebidae
Gênero <i>Dientamoeba</i>

Estes protozoários são eucariontes, unicelulares e reproduzem-se por divisão binária, através de mitose do tipo fechada com fuso extranuclear. São caracterizados pela presença de até seis flagelos, um aparato parabasal - complexo de Golgi com filamentos parabasais associados (HONIGBERG, 1990) e do complexo pelta-axóstilo, que é formado por um sistema de microtúbulos (BENCHIMOL et al., 1993). Entretanto, a principal característica desses parabasalídeos é a presença de hidrogenossomos, local de formação de moléculas de hidrogênio, de fundamental importância, uma vez que esses flagelados não têm mitocôndrias nem peroxissomos (LINDMARK & MÜLLER, 1973). As principais estruturas e organelas celulares estão representadas na figura 1.

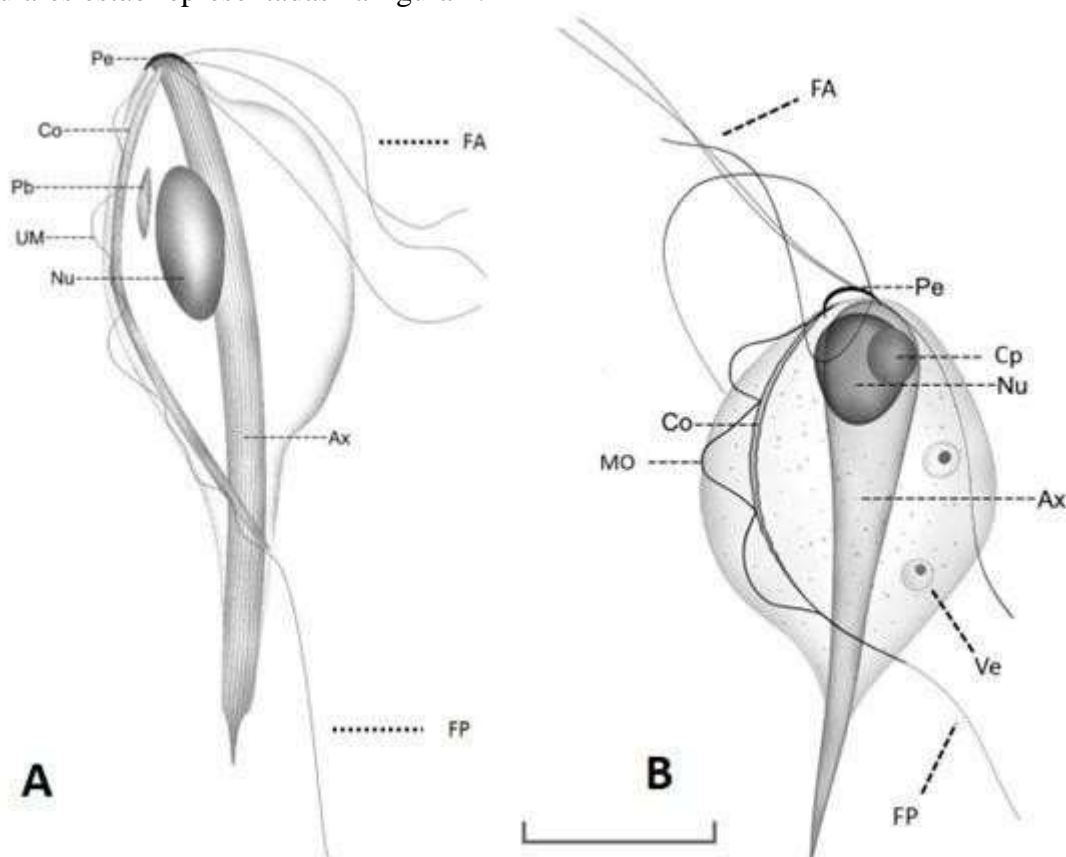


Figura 1. Esquema geral das famílias Tritrichomonadidae e Trichomonadidae, representadas por *Tritrichomonas foetus* (A) e *Pentatrichomonas hominis* (B), respectivamente, destacando as principais organelas e estruturas celulares. FA, flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente; Mo/UM, membrana ondulante; Pe, pelta; Ax, axóstilo; Co, costa; Ve, vesículas endocíticas; Nu, núcleo; Cp, corpo parabasal; FP, flagelo posterior. Barra de escala = 5 µm. **Fonte:** adaptado de Dos Santos (2015).

A costa é uma estrutura do citoesqueleto que pode auxiliar na distinção das famílias mais importantes. Devido às diferenças no padrão periódico de estriação de sua estrutura é classificada em tipo A e B (HONIGBERG et al., 1971), e segundo a nova classificação proposta por Cepicka et al. (2010) a família Trichomonadidae possui a costa do tipo B. Enquanto a família Tritrichomonadidae, possui a costa do tipo A e a família Dientamoebidae não apresenta costa. O padrão de estriação da costa do tipo A, é em bandas paralelas, alternando bandas eletrodensas (com cerca de 37 nm de largura) com bandas mais claras (com largura aproximada de 49 nm). O padrão de costa do tipo B apresenta estriações semelhantes à “espinha de peixe” com periodicidade de cerca de 42 nm (MIDDLEJ, 2010).

Esses protozoários são parasitos extracelulares e durante as fases iniciais de cultivo são

piriformes, com locomoção rápida e direcional. Quando se altera as características físico-químicas do meio, algumas espécies são capazes de ativar seu mecanismo de defesa (resistência), saem da forma vegetativa (trofozoíta) e assumem o formato arredondado, com os flagelos internalizados, formação de pseudocisto, transformação morfológica do protozoário em uma forma compacta, sem motilidade, sem uma parede de cisto verdadeiro. Benchimol (2004), em seu estudo com culturas puras de *T. foetus*, revelou que a formação de pseudocisto pode ser rápida, efetuada por determinados regimes de refrigeração e aquecimento e que os pseudocistos podem reverter para a sua forma trofozoíta sobre reaquecimento.

2.3 Morfologia

2.3.1 Membrana plasmática

A membrana plasmática desses protozoários apresenta três regiões fisiologicamente distintas: a membrana que recobre o corpo do parasito, a membrana ondulante e os flagelos. Benchimol et al. (1992) observaram, através da técnica de criofraturas, que a região da membrana que recobre o corpo do parasito apresenta um glicocálice bastante desenvolvido, com aspecto ondulado, e possui uma maior densidade de partículas intramembranas comparada à membrana que reveste os flagelos. Estas partículas são proteínas integrais, as quais teriam a função de conectar o citoesqueleto com o axonema. Nos flagelos anteriores essas partículas intramembranas poderiam ter funções sensoriais (BENCHIMOL et al., 1992).

Na membrana ondulante encontra-se concentrada uma extensa trama de filamentos estáveis do citoesqueleto (GERMOT et al., 1996); esta membrana liga o flagelo recorrente ao corpo do parasito.

A superfície celular é a membrana plasmática da célula associada ao seu glicocálice. Ela tem sido apresentada como um mosaíco composto de adesinas, receptores de proteínas da matriz extracelular e outras moléculas, que exercem uma função importante na interação parasita-hospedeiro e influenciam na patogênese da doença. Estudos que enfocam a interação do protozoário com a célula hospedeira mostram que os parasitas podem exercer seus efeitos citotóxicos através do contato físico estabelecido entre as duas superfícies, por toxinas lançadas dos parasitas no meio de interação, ou por associação de ambos os mecanismos (LÓPEZ et al., 2000; DE CARLI et al., 2004).

2.3.2 Citoesqueleto

Estes parabasalídeos apresentam um citoesqueleto bem desenvolvido, formado principalmente pelo complexo pelta-axóstilo, a costa (exceto nos flagelados que não possuem a membrana ondulante), os filamentos parabasais, os corpúsculos basais e numerosos microfilamentos, que têm suas funções desconhecidas (BENCHIMOL et al., 2000).

O complexo pelta-axóstilo possui uma participação importante no processo de divisão celular, promovendo a constrição do núcleo na etapa de cariocinese (RIBEIRO et al., 2000). O axóstilo é uma estrutura axial, formada por microtúbulos, que consiste em uma fita disposta longitudinalmente desde a porção anterior até o final da porção posterior da célula, onde esta estrutura empurra a membrana plasmática (BENCHIMOL et al., 2000). A pelta é formada por microtúbulos e está localizada na porção anterior da célula. Esta estrutura parece desempenhar o papel de sustentação da parede do canal periflagelar, do qual os flagelos emergem.

O sistema pelta-axostilar encontra-se associado com outras estruturas celulares como o retículo endoplasmático, grânulos de glicogênio, hidrogenossomos e o núcleo. O retículo endoplasmático rugoso deve fornecer Ca^{2+} aos microtúbulos do axóstilo como em outros sistemas celulares. Os hidrogenossomos provavelmente fornecem adenosina trifosfato (ATP),

como ocorre com microtúbulos e mitocôndrias (BENCHIMOL et al., 2000).

A costa é uma larga fibra estriada, presente em todos os tritrichomonádídeos e tritrichomonádídeos, que está sempre associada à membrana ondulante e ao flagelo recorrente. Sendo uma estrutura de sustentação da membrana ondulante. Assim como as fibras parabasais, a costa é cilíndrica e formada por proteínas que apresentam uma periodicidade com bandas claras e escuras. Contudo a costa é maior e mais larga do que as fibras parabasais (BENCHIMOL, 2004).

Os filamentos parabasais estão presentes em todos os parabasalídeos e são encontrados próximos ao complexo de Golgi. A associação destes filamentos com o complexo de Golgi forma o aparelho parabasal (HONIGBERG, 1990). Benchimol et al. (2001) sugeriram que esses filamentos têm um papel funcional na migração do Golgi, junto com os corpúsculos basais e os flagelos, durante a mitose.

Os corpúsculos basais são estruturas das quais se originam os flagelos e estão localizados na região anterior da célula. Essas estruturas encontram-se associadas a filamentos que podem ser contráteis, como as fibras de centrina ou não contrátil como é o caso da costa (HONIGBERG et al., 1971; VISCOGLIOSI, 1994).

Os flagelos, tanto os anteriores como o recorrente, têm origem nos corpúsculos basais, localizados na região anterior da célula (HONIGBERG et al., 1971). O flagelo recorrente se mantém ao longo da superfície da célula, formando a membrana ondulante. Através de vídeo microscopia, Monteiro-Leal et al. (1996) demonstraram que todos os flagelos participam do movimento da célula, e que a batida dos flagelos anteriores é um tipo ciliar, exibindo traços eficazes e de recuperação, ao passo que o flagelo recorrente bate em uma forma típica de onda flagelar. Isto faz com que o corpo do parasito gire em torno do seu próprio eixo e produza uma rotação.

O número de flagelos varia dentre as diferentes espécies. *Tritrichomonas foetus*, por exemplo, possui três flagelos anteriores e um recorrente, enquanto *T. vaginalis* apresenta quatro anteriores e um recorrente. Porém pode haver uma variação do número de flagelos dentre indivíduos de uma mesma espécie. Flick (1954) descreveu que 80% dos trofozoítas de *P. hominis* apresentaram cinco flagelos anteriores, enquanto 15% tiveram quatro flagelos anteriores e 5% apenas três flagelos. Esta variação foi atribuída a fatores como a idade da cultura e a presença de bactérias.

Os flagelos são importantes na interação do parasita com a célula hospedeira, já que a citoadesão do protozoário às células se dá inicialmente com seu flagelo anterior e recorrente e, mais tarde, com o corpo celular (SILVA FILHO; DE SOUZA, 1988).

2.3.3 Vacúolos e lisossomos

O citoplasma desses protozoários possui várias vesículas de tamanhos distintos, como os lisossomos, endossomos e vacúolos, que compõem o sistema endocítico da célula. Esses organismos possuem uma alta atividade endocítica (pinocitose e/ou fagocitose), responsável pela aquisição de substâncias necessárias para seu crescimento e manutenção. *In vivo* eles endocitam substâncias secretadas pelo hospedeiro (BENCHIMOL et al., 1990). *In vitro*, a fagocitose tem sido estudada através da interação destes parasitos com outras células como espermatozoides, hemácias e células bacterianas (TASCA & DE CARLI, 2001; DE CARLI et al., 2004; BENCHIMOL et al., 2008). Nestes estudos o parasita foi capaz de estabelecer a adesão com estas células e posteriormente internalizá-las.

Os lisossomos são organelas envoltas por membrana única e estão presentes como grandes compartimentos citoplasmáticos. Apesar de não existir uma região preferencial para a ocorrência da endocitose, os lisossomos e fagolisossomos encontram-se localizados predominantemente na região posterior da célula. Já os vacúolos movimentam-se e são encontrados principalmente na região perinuclear, embora se possa encontrá-los em todo o

citoplasma (AFFONSO et al., 1997).

2.3.4 Hidrogenossomos

O hidrogenossomo é uma organela esférica ou levemente alongada, envolvida no metabolismo de energia, típico de eucariotos de vida anaeróbica ou que vivem em ambiente com baixa tensão de oxigênio e que carecem de mitocôndrias. Esta organela citoplasmática está presente em várias espécies de parabasalídeos e outros protistas como ciliados de vida livre, ciliados presentes no rúmen e em alguns fungos (BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

Os hidrogenossomos apresentam-se em grande número no citoplasma celular e geralmente estão associados a grânulos de glicogênio e a estruturas do citoesqueleto, como o axóstilo e a costa. Possuem dupla membrana e uma vesícula periférica, que é independente da dupla membrana e da matriz, formando um compartimento distinto. A associação dos hidrogenossomos com o retículo endoplasmático foi descrita, e poderia ser um indício de fornecimento de lipídios para o crescimento dos hidrogenossomos (BENCHIMOL et al., 1996; 2000; 2008). A proximidade dos hidrogenossomos com outras estruturas celulares deve estar relacionada ao fornecimento de ATP, tal como ocorre com a associação já descrita entre mitocôndrias e microtúbulos em células de eucariotos superiores (HEGGENESS et al., 1978).

Em condições anaeróbicas, o hidrogenossomo produz dióxido de carbono (CO₂), hidrogênio molecular (H₂) e acetato pela oxidação do piruvato. Este processo é acompanhado pela produção de ATP (MÜLLER, 1993; BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

2.3.5 Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático desses parabasalídeos é normalmente visualizado ao redor do núcleo formando a membrana externa do envoltório nuclear. Mas também pode ser encontrada próxima aos hidrogenossomos e ao axóstilo (BENCHIMOL et al., 2000). Os ribossomos podem ser visualizados aderidos à membrana do retículo endoplasmático, formando o retículo endoplasmático rugoso, ou livres no citoplasma (BENCHIMOL et al., 2001). Evidências têm demonstrado a participação do retículo endoplasmático em processos de autofagia e sequestro de cálcio (DE SOUZA; BENCHIMOL, 1988).

2.3.6 Complexo de Golgi

Nesses protozoários os filamentos parabasais encontram-se associados ao complexo de golgi formando o aparelho parabasal, que estão localizados dorsalmente e à direita do núcleo. Conexões filamentosas foram observadas interligando a cisterna *cis* com os filamentos parabasais, sugerindo que este sistema possa proporcionar uma sustentação às cisternas do Complexo de Golgi (HONINGBERG, 1990; BENCHIMOL et al., 2001). Diferente dos outros parasitas protistas, esses parabasilídeos têm um complexo de Golgi muito desenvolvido.

O complexo de Golgi participa da regulação de várias funções nas células, contudo, pouco se sabe sobre sua importância nesses flagelados. Benchimol et al. (2001), em seu estudo, sugerem que uma função do Complexo de Golgi em *T. foetus* pode ser a glicosilação, como ocorre em outras células eucariotas. Além disso, métodos bioquímicos revelaram a presença de uma bomba Ca²⁺-APTase nas cisternas do complexo de golgi, o que ressaltou seu importante papel no acúmulo de cálcio, sendo o principal sítio com esta função nestes organismos (ALMEIDA et al., 2003).

2.3.7 Núcleo

Quando não estão em processo de divisão, esses protozoários apresentam um único núcleo localizado preferencialmente na região anterior da célula. O envoltório nuclear é formado por duas membranas (BENCHIMOL et al., 1982). A matriz nuclear possui

filamentos organizados diferentes dos filamentos presentes em outros organismos, onde a região abaixo do envoltório nuclear apresenta uma malha mais frouxa que a região central. O envoltório nuclear se apresenta como em eucariotos superiores. A porção mais externa está em continuação com o retículo enquanto a membrana interna se encontra voltada para a matriz nuclear. Inúmeros complexos de poros típicos estão distribuídos ao longo do envoltório (BENCHIMOL et al., 1982; BENCHIMOL, 2004).

Estes protozoários apresentam um tipo diferente de divisão, chamada de mitose fechada, que é caracterizada por não apresentar fragmentação do envoltório nuclear e pela presença de um fuso extranuclear, que aparentemente, não estabelece contato direto com os cromossomos. Durante o processo, o envelope nuclear mantém-se, e o núcleo assume diferentes tamanhos e formas: oval na interfase; lobulado ou côncavo na prófase; na transição metáfase-anáfase o núcleo sofre uma constrição promovida pelo axóstilo duplicado passando a exibir uma forma em “S”; alongado na transição da anáfase para telófase e, finalmente, separado em dois núcleos. O nucleolo, única estrutura proeminente e esférica do núcleo, mantém-se durante a mitose (BENCHIMOL et al., 2000; RIBEIRO et al., 2002).

2.4 Breve Histórico Sobre Patogenia

Algumas espécies de parabasalídeos têm sido isoladas a partir de amostras ambientais e podem representar espécies de vida livre. No entanto, a maioria das espécies forma interações simbióticas ou parasitárias com vários hospedeiros animais. Habitam a cavidade oral, digestória e urogenital de hospedeiros invertebrados e vertebrados. Alguns desses flagelados são patogênicos tanto para os animais quanto para humanos.

Trichomonas vaginalis é um dos protozoários mais conhecidos, por causar problemas no trato genito-urinário de humanos, sendo considerada a doença não virótica mais frequente no mundo (GERBASE et al., 1998). Atualmente, a tricomonose humana ganhou maior importância pela Organização Mundial de Saúde ao ser considerada de alto risco, uma vez que o parasito poderia ser vetor de alguns vírus, como o HIV (COHEN et al., 1999; MOODLEY et al., 2002). Além disso, têm sido relatadas associações entre a presença dessa espécie e uma maior incidência ao câncer do colo uterino e à presença de HPV (KHARSANY et al., 1993; ZHANG; BEGG, 1994), aumentando ainda mais sua importância.

Os sinais clínicos da tricomonose genital são mais evidentes no sexo feminino, podendo variar desde o quadro assintomático à vaginite e baixa fertilidade. A grande variação de sinais e sintomas ocorre devido ao tipo de cepa isolada. Em geral, as mulheres com infecções agudas normalmente apresentam erosão cervical, petéquias na mucosa vaginal e descarga mucopurulenta. No entanto, as portadoras de cepas mais virulentas apresentam corrimento vaginal agudo, de cor amarelo-esverdeado, geralmente acompanhado de dor prurido, irritação, inflamação e descamação do epitélio vaginal (REIN, 1990). Em casos graves, a vulva se torna congesta, aumenta a vascularização, ocorre hiperplasia do epitélio cervical e podem aparecer até complicações nas glândulas de Bartholin. A vagina torna-se avermelhada, conhecida como *Colpitis macularis* ou cervice em morango (HEINE; MCGREGOR, 1993). Durante a menstruação e na gravidez, esses sintomas tornam-se ainda mais fortes pela presença de ferro e por flutuações hormonais (RYU et al., 2001). As gestantes estão mais predispostas à ruptura prematura da placenta, parto prematuro e ao nascimento de bebês de baixo peso. A infertilidade também pode ser relacionada à tricomonose (GRODSTEIN et al., 1993).

Embora sejam considerados portadores assintomáticos, os homens podem apresentar infecção urogenital periódica, com uretrite purulenta e até prostatite, infertilidade e uretrite não-gonocócica (LÓPEZ et al., 2000). Existem fortes indícios de que o alto teor de zinco (Zn^{+2}) encontrado no fluido espermático iniba a proliferação do parasito, criando um ambiente

hostil (KHAW & PANOSIAN, 1995). Este parece ser um dos fatores responsáveis pela curta duração da infecção nos homens.

Outras três espécies também são consideradas parasitas de humanos: *Trichomonas tenax*, *Pentatrichomonas hominis* e *Dientamoeba fragilis* (MARITZ et al., 2014), sendo que apenas *T. vaginalis* e *T. tenax* são considerados humano-específicos. *Trichomonas tenax* é considerado um comensal da boca humana e é encontrado em pacientes com má higiene oral (DUBOUCHER et al. 1995), mas pouco se sabe a seu respeito. *Pentatrichomonas hominis* e *D. fragilis* são encontradas no trato gastrointestinal, e podem causar sintomas gastrintestinais, tais como dor abdominal e diarreia (WANG et al., 2006; BARRATT et al., 2011); eles também são considerados como potenciais agentes etiológico causadores da síndrome do intestino irritável (SII) (STARK et al., 2010; MELONI et al., 2011).

Stark et al. (2010) destacaram o potencial patogênico de *D. fragilis*; 89% dos pacientes infectados apresentaram sintomas gastrintestinais, incluindo diarreia, fezes moles e dor abdominal, com duração média de 3-7 dias, porém em infecções crônicas os sintomas persistiram durante mais de duas semanas. *Dientamoeba fragilis* é considerada uma causa de doença gastrointestinal negligenciada por ser o protozoário mais comumente detectado e bem mais prevalente do que *Giardia intestinalis* (= *G. Duodenalis*) (CROTTI et al., 2005; SCHUSTER; JACKSON, 2008; STARK et al. 2010)

Pentatrichomonas hominis é encontrado na porção distal do intestino delgado e no intestino grosso de humanos e de outros primatas, assim como em cães e gatos. Embora sua patogenicidade seja discutida, sabe-se que este flagelado é o causador da tricomonose digestiva e é frequentemente identificado nas fezes diarreicas (CHUNGE et al., 1992; LEVY et al., 2003; LI, W-C et al., 2014). Sua prevalência em seres humanos é bem elevada, podendo chegar a 40% em países tropicais e subtropicais (SAKSIRISAMPANT et al., 2003). Geralmente, o aumento da prevalência do protozoário está diretamente associado a condições socioeconômicas precárias. E em virtude da principal via de transmissão ser fecal-oral e da imaturidade do sistema imunológico, as infecções são mais comuns e nocivas em crianças do que em adultos. Casos de diarreia grave associada a *P. hominis* foram relatados em crianças de até cinco anos de idade (YANG et al., 1990, CHUNGE et al., 1992); em recém-nascidos a infecção prolongada deste *Trichomonas* é um sério problema de saúde, em função da diarreia aquosa (MANCILLARAMIREZ; GONZALEZ-YUNES, 1989). *Pentatrichomonas hominis* também pode causar doença severa em pessoas com resposta imunitária diminuída. Além disso, casos de infecções mistas com *P. hominis* e outros protozoários, tais como *Entamoeba histolytica* e *G. intestinalis*, ou com bactérias, tais como *Campylobacter* e *Shigella* também foram descritos por Reinthalter et al. (1988) e Chung et al. (1992).

Inicialmente se acreditava que as espécies isoladas em um determinado hospedeiro eram próprias deste, e específicas de determinadas regiões do corpo. Por exemplo, *T. tenax* considerada espécie-específico de boca de humanos. Este fato permitiu que a identificação e diferenciação destes flagelados fosse por muito tempo baseada na característica morfológica. Deste modo, o gênero era determinado pelo número de flagelos anteriores, *Tritrichomonas*, *Tetratrichomonas* ou *Trichomonas*, e *Pentatrichomonas* e a espécie era determinada a partir da procedência, de onde o protozoário houvesse sido isolado, *P. hominis* (humanos), *T. ovis* (ovinos), *T. gallinae* (galinhas) e assim por diante. Entretanto, com o uso da biologia molecular é cada vez maior os questionamentos a respeito da real especificidade apresentada por algumas espécies de parabasalídeos, pois vários relatos clínicos têm demonstrado que estas espécies podem ser encontradas em locais atípicos. Por exemplo, *P. hominis* foi encontrada em áreas além do trato gastrointestinal, sendo descrito em abscessos hepáticos (JACOBSEN et al., 1987; HONIGBERG, 1990) e em amostras vaginais (CRUCITTI et al., 2004). Um caso fatal de derrame pleural exsudativo foi visto em uma mulher com lúpus

eritematoso sistêmico, que albergava *P. hominis*, tanto no trato intestinal quanto na pleura (JONGWUTIWES et al., 2000). Em 2013, *P. hominis* foi isolado de um homem de 68 anos que apresentava febre, diarreia mucosa, tenesmo e artralgia; sua presença foi atribuída à artrite reumática (COMPAORE et al., 2013). *Trichomonas tenax* foi identificado por microscopia e métodos moleculares em extensões do trato respiratório superior e inferior (LETERRIER et al., 2012). Assim como, *T. vaginalis*, *P. hominis* e *Tetratrichomonas* sp (DUBOUCHER et al., 2003; CARTER; WHITHAUS, 2008; MANTINI et al., 2009) também foram isoladas no trato respiratório. Esses achados sugerem que estas espécies são capazes de se adaptar e proliferar fora de seus locais usuais no corpo. Além disso, *P. hominis* já foi isolado de vários outros hospedeiro (DELGADO VISCOGLIOSI et al., 2000; LEVY et al., 2003; GOOKIN et al., 2007; MOSTEGL et al., 2012; TOLBERT et al., 2012; GRELLET et al., 2013; LI, W-C et al., 2014).

Dentre as espécies de parabasalídeos de importância veterinária, *T. foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) é a mais conhecida por causar a tricomonose genital bovina, que provoca graves prejuízos financeiros em varias regiões do mundo, sobretudo onde o controle sanitário é deficiente ou o sistema de produção é extensivo, com a prática de monta natural (ISLAM et al., 2017).

Em bovinos, *T. foetus* é sexualmente transmissível, sendo caracterizado por infecção crônica do trato genital com inflamação e falhas reprodutivas. Parasita inicialmente a vagina, causando vaginite, e então migra para o útero e ovidutos. A infecção procede lentamente, sem interferir na fertilização ou no desenvolvimento fetal, mas a evolução pode afetar o feto em desenvolvimento, o que resulta em abortamento e esterilidade (RODNING et al., 2008). O touro é portador assintomático e não exibe claramente a infecção, nem adquire naturalmente imunidade contra a mesma, e assim passa a infectar várias vacas. Com a idade, há aumento da profundidade das criptas prepuciais, o que favorece as condições de anaerobiose, por isso os touros mais velhos têm maiores riscos de adquirirem a doença e mantêm-se como portadores permanentes (ISLAM et al., 2017). Os prejuízos econômicos ocorrem em consequência de uma baixa taxa de natalidade e do aumento do intervalo entre partos, que resultam na redução da produção de leite e carne, e no aumento dos gastos com medicamentos.

Outros parabasalídeos estão sendo descritos no trato genital de bovinos, como é o caso de espécies dos gêneros *Pentatrichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pseudotrichomonas*, *Simplicimonas* (HAYES et al., 2003; COBO et al., 2007; DUFRERNEZ et al. 2007; HUBY-CHILTON et al., 2009; FREY et al., 2017), microrganismos presumidamente de origem intestinal e comumente encontrados em fezes diarréicas de bovinos e demais espécies (CASTELLA et al., 1997; MELONI et al., 2011; LI, W-C et al., 2014). Sendo alguns protozoários isolados da genitália de animais virgens (CAMPERO et al., 2003, COBO et al., 2003), no entanto o potencial patogênico dessas espécies no trato reprodutivo de bovinos ainda não é conhecido.

Assim como outros parabasalídeos, *T. foetus* já foi isolado em outros hospedeiros, como suínos, equinos e cervídeos (SKIRROW & BONDURANT, 1988), e mais recentemente foi isolado de cães com diarreia (GOOKIN et al., 2005) e de gatos com colite e piometra (YAEGER, GOOKIN, 2005; DAHLGREN et al., 2007). Desde então, *T. foetus* vem recebendo destaque na clínica de animais de companhia como agente etiológico causador da tricomoníase entérica felina (LEVY et al., 2003). Clinicamente, a infecção manifesta-se como doença do intestino grosso com sinais clínicos que variam de assintomáticos à diarreia crônica intratável, que pode ser contínua, ou pode apresentar picos em um determinado curso de tempo (GOOKIN et al., 2001; FOSTER et al., 2004; HALE et al., 2009). Muitas vezes há um aumento da frequência de defecação, que está associado com a flatulência e tenesmo, podendo ocorrer irritação anal grave e incontinência fecal. Tricomoníase felina é geralmente

predominante nas populações jovens, densamente alojados. Em gatos experimentalmente infectados, *T. foetus* é restrito ao íleo, ceco e cólon. Gookin et al. (2001) observaram um aumento da severidade da diarreia, assim como uma maior eliminação dos trofozoítas nas fezes, quando os gatos estavam com coinfeção com *Cryptosporidium* spp.

Tritrichomonas foetus e *T. suis* são espécies muito semelhantes fisiologicamente e compartilham muitos antígenos comuns, o que vem causando discussão quanto à identificação específica entre essas espécies, sendo consideradas como uma mesma espécie, por muitos (FELLEISEN, 1998; LUN et al., 2005; HAMPL et al., 2006). Todavia, a nomenclatura causa enorme discussão entre os pesquisadores. De acordo com as regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica, e apoiado por muitos pesquisadores (HIBLER et al., 1960; FELLEISEN, 1998; TACHEZY et al., 2002; LUN et al., 2005) *T. suis* foi o primeiro a ser descrito e por isso tem prioridade sobre *T. foetus*. Baseado nas diferenças genéticas e do hospedeiro foi proposto por Doi et al. (2013), que *T. suis* fosse dividido em dois genótipos “felino” e “bovino”, sendo que este infecta ambos hospedeiros: bovinos e suínos, causando quadro de diarreia em suínos. No entanto, Walden et al. (2013) propôs que o isolado de felinos recebesse a nomenclatura de *Tritrichomonas blagburni*, e apoiaram sua proposta com base nos resultados de estudos experimentais de infecção cruzada, nas diferenças de patogenicidade entre os dois parasitas para seus respectivos hospedeiros, e nas diferenças no sequenciamento de genes moleculares, entre os flagelados obtidos de gatos domésticos e de bovino.

Em 1938, foi evidenciado por Hegner e Alicata, que suínos jovens com histórico de disenteria, tiveram sinais clínicos visíveis de problemas respiratórios como espirros, epistaxe, dispneia, tosse, além de deformação da maxila. Esse quadro, mais tarde foi relatado com evolução agressiva, em que os animais apresentavam bronquite, pneumonia, encefalite, hemoptise uni ou bilateral, com índices de mortalidade entre 20% a 30% (RUTTER, 1985; SWITZER, 1951; SPLINDER et al. 1953), com comprovação do parasitismo por *T. suis* em 80 a 90% dos suínos que morreram com a doença. Contudo, a presença de *T. suis* na cavidade nasal de suínos permitiu a associação dessa espécie à rinite atrófica (HEGNER, ALICATA, 1938; SWITZER, 1951; SPLINDER et al. 1953; FITZGERALD et al., 1954; PINK, YAROSEVICK, 1957;).

No trato intestinal de suínos, o parasitismo por parabasalídeos foi relatado em 1960, quando Hibler et al. descreveram a presença de três espécies distintas: *T. suis*, que anteriormente já havia sido descrito na cavidade nasal; *T. buttreysi*, que é encontrado no rúmen e ceco de bovinos, e apesar de ter sido associado à diarreia em novilhas (CASTELLA et al., 1997), é considerado não patogênico para bovinos (COBO et al., 2004), e *Tritrichomonas rotunda*, que não é distinguível do *T. suis* pela microscopia óptica, além de não existir uma sequência de genes da espécie disponível, tornando duvidosa a existência definitiva desta espécie (RIVERA et al., 2008).

Tritrichomonas suis foi identificado em suínos que apresentavam enterite necrótica e relatado recentemente como agente etiológico invasor da lâmina própria da mucosa entérica, com grande multiplicação dentro das criptas intestinais, fatores estes que seriam responsáveis pelos sinais clínicos de diarreia (KITANO et al., 1991; DIMOCK, 1992; MOSTEGL et al., 2011). Kitano et al. (1991) descreveram que nas infecções por *T. suis* ocorre o espessamento da mucosa do ceco e do cólon, com epitélio coberto por numerosos nódulos de coloração esbranquiçada e tumefação dos linfonodos mesentéricos. Microscopicamente, observaram que ocorre degeneração, descamação e necrose epitelial, hiperplasia das criptas e necrose da submucosa. Contudo, estabeleceram a relação desse parasito no intestino de suínos jovens com a manifestação de diarreia seguida de morte do hospedeiro.

Dentre os parabasalídeos descritos em suínos, *T. suis* é o mais frequente e em virtude

de sua semelhança com *T. foetus* é o mais conhecido e estudado (KERR, 1958; ROBERTSON, 1960; DE CARLI, GUERRERO, 1975, 1976, 1977;).

Experimentalmente foi demonstrado que *T. suis* proveniente de suínos pode infectar o sistema genital de fêmeas de bovinos, e produzir um quadro clássico de tricomoníase. Touros podem transmitir venereamente *T. suis*, e podem se recuperar espontaneamente. Em contrapartida, *T. foetus* pode ser encontrado no ceco de suínos inoculados por via intranasal (FITZGERALD et al., 1958a; 1958b). Foram também evidenciadas infecções por *T. suis*, provenientes de suínos, em galinhas infectadas por via oral (SHAW; BUTTREY, 1959) e vaginite em porcas (KAZANOWSKA et al., 1965). O fato de que *T. foetus* também possa se estabelecer no ceco e na vagina de porcas, indica que esses protozoários têm baixa especificidade por hospedeiro, podendo ocorrer ocasionalmente, em condições naturais, infecções em hospedeiro e órgãos não habituais. E associado ao fato de *T. foetus* e *T. suis* serem muito semelhantes morfológicamente e praticamente indistinguíveis genotipicamente (TACHEZY et al., 2002; LUN et al., 2005), esses experimentos apoiariam a hipótese de que *T. foetus* e *T. suis* seriam a mesma espécie.

Em 2012, Cacciò et al. Demonstraram, com base na análise molecular de três fragmentos, que os suínos são hospedeiros de *D. fragilis*, espécie isolada do intestino de humanos. Nesse mesmo ano, duas outras espécies foram encontradas parasitando o trato gastrointestinal de suínos, *Hypotrichomonas acosta* e *Trichomitus batrachorum*, espécies isoladas previamente de répteis escamosos e de sapos, respectivamente (MOSTEGL et al., 2012).

Recentemente foi isolado *P. hominis* (LI, W et al., 2014) de um leitão com diarreia. Esta espécie é conhecida por parasitar o colón e o ceco de humanos. Assim como *T. foetus*, *P. hominis* tem se mostrado não específico quanto aos seus hospedeiros, por já ter sido isolado de outros mamíferos como macaco, rato, cão, gato e bovino, e está ganhando cada vez mais importância por ser atribuída a sérios episódios de diarreia, sobretudo, em cães e gatos (DELGADO VISCOGLIOSI et al., 2000; LEVY et al. 2003; GOOKIN et al., 2005; 2007; MOSTEGL et al., 2012; TOLBERT et al., 2012; GRELLET et al., 2013; LI, W-C et al., 2014).

Li, W et al. (2014) não só relataram a presença do protozoário, como através de infecção experimental conseguiram provar que o agente tem capacidade de se multiplicar no ceco dos leitões, e causar diarreia, e que a principal via de transmissão é feco-oral. Além disso, demonstraram que o parasitismo associado entre *P. hominis* e *Escherichia coli* pode intensificar e agravar os episódios de diarreia, sendo capaz de levar o animal à morte.

Em 2017, um leitão com 40 dias de idade que apresentava distúrbio respiratório grave, após necropsia foi diagnosticado com tricomonose pulmonar, depois de ter sido identificado molecularmente *Trichomonas* sp. em seu lavado bronco alveolar. Apesar de não conseguir identificar a espécie, os autores concluíram que estes foram os responsáveis pelos sinais clínicos apresentados pelo animal (SHI et al., 2017).

Em pequenos ruminantes, Robertson (1932) relatou a presença de parabasalídeos intestinais em 86 ovelhas na Inglaterra. Segundo seu relato, o protozoário em questão possuía apenas dois flagelos anteriores, e portanto propôs que sua denominação fosse *D. ovis*. Em 1946, Morgan publicou sobre tricomonose em bovinos e mencionou a existência de três espécies de *Trichomonas* em ovinos, *Trichomonas ruminatum*, *T. ovis* e *T. foetus*. Somente em 1962, Andersen et al. realizaram um estudo morfológico comparando cepas fecais de ovelhas; uma de *Trichomonas* isolada, em 1958, em Illinois, EUA, e quatro outras cepas isoladas, em 1961, (uma de uma ovelha criada em Illinois, uma de uma ovelha do Texas enviada para Illinois e duas de ovelhas mortas em Logan, Utah), todas estas cepas tiveram quatro flagelos, e eram semelhantes entre si, e completamente diferentes da descrição prévia

de Robertson, em 1932. Desde então, não houve mais investigações sobre esses parasitas ou de qualquer outro parabasalídeo em ovelhas. Até o presente ano, foi publicado um levantamento sobre a presença de *P. hominis* em 832 ovinos e 781 caprinos por Li et al. (2018), no qual apenas dois caprinos estavam infectados, mas nenhum ovino. Contudo, a literatura disponível sobre o assunto é muito escassa, e nenhum outro relato foi encontrado até a presente data.

2.5 Formas de Transmissão

Em sua grande maioria, os parabasalídeos que não são de vida livre, são encontrados parasitando o trato gastrintestinal e urogenital das espécies de animais em que acometem. Existem assim, duas principais formas de transmissão, a feco-oral e a sexual (GOOKIN et al., 2004).

A transmissão feco-oral é do tipo direto e acontece quando da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com fezes contendo os protozoários. Após a ingestão, o protozoário coloniza partes do trato digestório, como intestino grosso, podendo ou não causar patogenicidade (YAEGER et al., 2005). Algumas espécies são comensais que ajudam na digestão da celulose, outras se aderem às células do intestino, gerando efeitos citotóxicos (MIDDLEJ et al., 2009), o que leva à diarreia com descamação do epitélio intestinal, caracterizada por inflamação do tipo linfoplasmocitária (YAEGER; GOOKIN, 2005).

O isolamento desses flagelados em répteis e aves demonstra um possível modo de adaptação do parasito à clássica via feco-oral, onde estes animais poderiam ter se infectado através do solo contaminado com o agente ou em uma rota alternativa, se alimentando de um animal contaminado através de carnivorismo (DIMASUAY & RIVERA, 2013).

A capacidade de resistência desses parasitos ao ambiente foi estudada em diversas condições. Hale et al. (2009) observaram que *T. foetus*, isolado de gatos, pode sobreviver nas fezes por sete dias em temperatura ambiente. Desta forma, as fezes contaminadas são consideradas como fonte de infecção para outros animais e mantém o ciclo de transmissão feco-oral. Outros estudos demonstraram que cepas de *T. foetus* também podem resistir por 24h quando expostos à urina e água contaminada (ROSYPAL et al., 2012). Em outro estudo conduzido por Van Der Saag et al. (2011) foi assinalado que a viabilidade dos trofozoítas na ração úmida perdura por até cinco dias.

Os trofozoítas, em condições adversas, ou sob estresse ambiental, internalizam seus flagelos, se transformando em uma estrutura compacta, sem motilidade, e formam um pseudocisto (BRUGEROLLE, 1973; FARMER, 1993). Por não haver a formação de um cisto verdadeiro, estes protozoários são considerados de baixa resistência fora do hospedeiro e, para que a transmissão ocorra, deve haver contato mais próximo entre indivíduos contaminados e não contaminados (GOOKIN et al., 2004). Entretanto, estudos recentes indicaram que pseudocisto também pode ocorrer de forma natural dentro do hospedeiro (PEREIRA-NEVES et al., 2011) e sua infectividade nas fezes foi descrita em roedores e galinhas por Friedhoff et al. (1991) e Lipman et al. (1999). Contudo, o pseudocisto é uma estrutura importante no ciclo de transmissão feco-oral do protozoário, porque o processo de transformação da forma de trofozoíta em pseudocisto é um processo reversível (GRANGER et al., 2000) e que, mesmo nesta fase o protozoário é capaz de se dividir e manter as estruturas internas com morfologia normal. Portanto, também é considerada como uma forma infectante para o hospedeiro vertebrado (PEREIRA-NEVES et al., 2003).

Dois espécies são reconhecidas pela sua patogenicidade no trato reprodutivo de humanos e bovinos, *T. vaginalis* e *T. foetus*, respectivamente. Estes protozoários são encontrados no trato genito-urinário, tanto em macho quanto em fêmeas. E nesse caso, a forma de transmissão é sexual, através da cópula. Um estudo realizado por Rae e Crews

(2006) com sêmen bovino contaminado, revelou que o agente etiológico em questão coloniza o interior do trato reprodutivo da fêmea entre uma e duas semanas. Após a transmissão, o parasito se aloja no epitélio vaginal e inicia o processo infeccioso.

Apesar de não haver relatos da transmissão sexual de *T. foetus* para outras espécies que não bovinos, este já foi naturalmente isolado do útero de uma gata com piometra (DAHLGREN et al., 2007). Além disso, infecções experimentais foram realizadas, e *T. foetus* foi capaz de colonizar a mucosa vaginal de ovelhas (ANDREWS, 1936).

2.6 Potencial Zoonótico

No Japão, em 1998, foi relatado pela primeira vez um caso de tricomonose por *T. foetus* em humanos. O protozoário foi encontrado no líquido cefalorraquidiano e na urina de um paciente com leucemia; na necropsia foi relacionado à epididimite e prostatite, além de meningoencefalite (OKAMOTO et al., 1998). Em 2006, *T. foetus* foi considerado responsável por pneumonia pneumocística, após ter sido isolado do lavado bronco-alveolar de uma mulher soropositiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com diabetes tipo II (DUBOUCHER et al., 2006). Recentemente, foi isolado do líquido peritoneal de um homem imunocomprometido com peritonite (ZALONIS et al., 2011).

Pelo menos cinco espécies desses flagelados (*P. hominis*, *T. tenax*, *T. vaginalis*, *T. foetus* e *T. gallinarum*) foram identificados no trato respiratório humano. Essas espécies têm sido encontradas em até 60% dos pacientes com pneumonia pneumocística (PCP) e em até 30% de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (DUBOUCHER et al., 2003; 2005; 2006; MARITZ et al., 2014). Outro relato foi feito no Japão, onde foi isolado *Tetratrichomonas* de uma mulher de 66 anos, com empiema, apresentando febre, dispneia e retenção de líquido na pleural (amarronzado e fétido). Após drenagem torácica, o líquido purulento foi observado por microscopia óptica, onde foi possível detectar a presença de inúmeros *Tetratrichomonas* (ARASE et al., 2014). De acordo com Duboucher et al. (2005) esses parabasalídeos são microaerófilos, logo, é improvável que iniciem a doença pulmonar, mas são oportunistas que podem causar infecções secundárias e agravar os sinais clínicos, prolongando a doença. A frequência das infecções pulmonares por tricomonose pode ser maior do que o relatado em função da difícil diferenciação dos flagelados por microscopia óptica, em amostras clínicas.

Historicamente esses parabasalídeos não eram considerados responsáveis por infecções emergentes por estarem envolvidos, não só em regiões específicas de infecção, como também em hospedeiro-específico. No entanto, a presença de um mesmo protozoário com uma grande diversidade de hospedeiros, atribuído a diferentes distúrbios clínicos indicam que esses organismos são bem adaptáveis e se multiplicam em condições favoráveis. Infecções do trato digestório por parabasalídeos também estão cada vez mais reconhecidas como comuns a várias espécies de vertebrados (MARITZ et al., 2014).

Devido à intensa relação do homem com o animal, estes últimos podem agir como reservatórios de tricomoníase humana, por serem hospedeiros, não só de *P. hominis* como também de *T. foetus*, *Tetratrichomonas* sp e *D. fragilis*. O crescente interesse no estudo da tricomonose é justificado por apresentar constante ameaça para a saúde humana e animal, sobretudo pelo possível potencial zoonótico dos mesmos (OKAMOTO et al., 1998; DUBOUCHER et al., 2005, 2006; ZALONIS et al., 2011; CHAOQUN YAO, 2012; DIMASUAY; RIVERA, 2013; MARITZ et al., 2014).

2.7 Diagnóstico

A tricomonose genital ou digestiva não tem sinais clínicos patognomônicos, portanto o diagnóstico conclusivo deve ser laboratorial (PELLEGRIN, 1997). Esse pode ser realizado

principalmente através de dois métodos: o método direto e o indireto ou cultivo (SOUSA et al., 1991). Estes são considerados convencionais para o diagnóstico da tricomonose, que embora específicos, são de baixa sensibilidade, requerem muito tempo de execução e técnicos bem treinados para identificação desses agentes etiológicos. Para reduzir os efeitos de baixa sensibilidade desses métodos de diagnóstico, têm sido desenvolvidos métodos moleculares para identificação direta de agentes causadores de enfermidades infecciosas. Entre estas técnicas, destaca-se a hibridização utilizando-se sondas moleculares e a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilitam um diagnóstico preciso e seguro (MORGAN; THOMPSON, 1998; NICKEL et al., 2002).

2.7.1 Microscopia direta e cultivo

A identificação microscópica está baseada na morfologia e motilidade característica do parasito (CAMPERO et al., 2003). Para o exame direto, a amostra recém colhida é montada em lâmina de microscopia e observada em objetiva de 40. Não se consegue detectar este parasito em análises fecais de rotina, como centrifugação e flutuação, e os trofozoítas não sobrevivem à refrigeração (GUNN- MOORE et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2015). No entanto, este método é menos sensível que o cultivo, pois a quantidade de parasitos é relativamente baixa quando comparada à cultura o que pode induzir a resultados falso negativos; portanto a cultura é o principal método de isolamento e identificação dos microrganismos (SOUSA et al. 1991), mas deve ser usado com apoio da biologia molecular para garantir um diagnóstico mais preciso, visto à semelhança morfológica entre as espécies e a possibilidade de infecção de diferentes protozoários em diferentes hospedeiro.

Existe uma gama de meios de cultura destinado ao isolamento desses protozoários; uma das problemáticas do cultivo envolve a adaptação do parasita ao meio. Amin et al., em 2010, relataram, por exemplo, que *T. vaginalis* e *T. gallinarum* apresentam diferenças no padrão de cultivo quando foram utilizados diferentes meios, e que há diferenças no padrão de isolamento, quando são comparadas diferentes cepas da mesma espécie, mas poucos estudos sobre o isolamento desses organismos foram realizados.

Para a detecção do protozoário em amostras geniturinárias, o material coletado deve ser inoculado e transportado em meio de transporte e enriquecimento Diamond (DIAMOND, 1957) modificado, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e mescla de antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina B). Já as amostras fecais, podem ser transportadas a fresco ou em PBS. No entanto, todas as amostras clínicas devem ser transportadas à temperatura ambiente, protegidas da luz e o mais rápido possível ao laboratório, pois o diagnóstico dependente da viabilidade do microrganismo. Então estas são incubadas a 37°C, por 7 a 10 dias, com observação diária do crescimento em microscopia de contraste de fase. A presença de protozoários móveis, de morfologia piriforme confere positividade ao material; a presença de flagelos anteriores e um flagelo posterior deve ser confirmada pelos métodos de coloração (APPEL et al., 1993).

O diagnóstico por cultivo pode apresentar dificuldades quando às amostras a serem analisadas estiverem contaminadas, quando a quantidade de parasitos da amostra for pequena ou pela presença de parasitos inviáveis, resultando em falsos negativos. Outro desafio do cultivo é diagnosticar, com precisão, a espécie envolvida no parasitismo, já que a semelhança entre algumas espécies é muito grande, o que torna as análises moleculares ferramentas indispensáveis.

2.7.2 Métodos moleculares

Com os recentes avanços na área de biologia molecular está sendo possível reduzir os efeitos de baixa sensibilidade dos métodos de diagnósticos convencionais, através do

desenvolvimento de métodos cada vez mais eficiente para identificação direta de agentes causadores desta enfermidade. Entre estas técnicas, destaca-se a hibridização utilizando-se sondas moleculares e a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilitam um diagnóstico preciso e seguro (MORGAN & THOMPSON, 1998; NICKEL et al. 2002).

A hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de "sondas" específicas. As sondas são sequências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar. Para a visualização da reação entre as moléculas de DNA ou RNA em estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotinizadas (semelhante à técnica de imuno-histoquímica). Esta técnica é menos sensível que à PCR. No entanto, pode ser aplicada em material rotineiramente fixado em formol e em parafina, em alguns casos pode-se até utilizar material obtido de necropsias. Sendo uma alternativa quando não é possível de ser realizada a cultura e/ou a PCR. A abordagem *in situ* permite o reconhecimento, localização e identificação molecular de parabasalídeos dentro de tecido fixado, podendo ser um recurso único para as investigações de diagnóstico de tricomonose. Por isso, a técnica tem sido utilizada por alguns autores (GOOKIN et al., 2010; MOSTEGL et al., 2011; 2012).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação que consegue a replicação de milhões de cópias de um fragmento alvo, baseando-se na capacidade de duplicação do ácido nucléico. A metodologia consiste inicialmente pela extração de DNA, seguida da sua amplificação, havendo a necessidade do conhecimento prévio da sequência alvo, ou parte dela. Oligonucleotídeos (*primers*) são utilizados para iniciar de forma específica a amplificação. Com diferentes ciclos de temperatura, na presença de bases nitrogenadas, polimerase termorresistente, tampão e magnésio, a reação de amplificação ocorre. O resultado da análise é feito através de eletroforese em gel de agarose. Contudo, esta técnica é capaz de identificar um patógeno e simultaneamente fornecer réplicas da sequência alvo (SILVA-PEREIRA, 2003).

Ho et al. (1994) foram os pioneiros na utilização da PCR para detecção de *T. foetus*, e utilizaram os *primers* TF1 e TF2, a partir da digestão de um fragmento genômico (0,85kb) por enzimas de restrição (*HindIII*, *EcoRI*, *HaeIII* e *Sau3A*), além disso, neste estudo, o gene de interesse foi purificado e clonado em um vector plasmidial (PUC 19). Embora satisfatório para a detecção de *T. foetus*, os resultados apresentaram, como desvantagem, amplificação inespecífica de um fragmento de 400 pb do DNA genômico do bovino e múltiplas amplificações de *T. vaginalis*, implicando na necessidade da utilização de outra técnica, *Southern blot*, para confirmação da especificidade.

Em 1997, Felleisen analisou a sequência do gene 5,8S rRNA e as regiões interespaçadoras do DNA (ITS1 e ITS2), de *T. foetus*, isolados de várias regiões geográficas e de outras espécies de tricomonas. Concluiu-se que estas regiões interespaçadoras eram adequadas para estudos filogenéticos, uma vez que são sequências muito conservadas entre os isolados da mesma espécie e menos entre espécies de gêneros diferentes. Em associação com colaboradores, em 1998, Felleisen analisaram *primers* (TFR3 e TFR4) específicos ao gênero *Tritrichomonas*, localizado entre a porção terminal 3' do 18S rRNA e a porção inicial 5' do 28S rRNA. O que resultou em um fragmento de amplificação de 347pb. Estas regiões se mostraram específicas e sensíveis.

Nickel et al. (2002) criaram novos *primers*, TF211A e TF211B, localizados entre a extremidade 3' do gene 18S rRNA e o gene 5,8S rRNA, capazes de amplificar um fragmento único de 211 pb, com sensibilidade idêntica ao descrito por Felleisen et al. (1998). Grahn et al. (2005) também desenvolveram *primers* entre os genes 18S rRNA e o 5,8S rRNA de modo semelhante ao anterior. No entanto, seu método permitiu distinguir os gêneros *Tritrichomonas*

(amplicon de 157 pb), *Trichomonas* (163 a 164 pb) e *Tetratrichomonas* (174 a 175 pb) presentes na amostra em uma única reação, baseando-se nas diferenças existentes na sequência do ITS1 para os gêneros considerados, conforme relatado por Felleisen (1997). A única desvantagem é que os fragmentos gerados são de tamanhos próximos, portanto, há necessidade de cuidados especiais para separação destes por eletroforese.

Com intuito de elucidar as diferenças genotípicas entre os isolados de *T. foetus* oriundos de suínos, bovinos e felinos, pesquisas com novos genes e com toda a sequência genômica vêm sendo praticadas (BENCHIMOL et al., 2017). Como exemplo, temos o estudo de Slapeta et al. (2012), que analisou 10 regiões diferentes do gene, as que codificam as cisteínas proteínases 1,2 e 4-9 (CP1 e CP2, CP4-CP9), proteínases que estão envolvidas na patogênese da doença, e as regiões que codificam malato desidrogenase citossólica 1 (MDH1) e a ITS2. Como resultado foi possível verificar que não há diferença entre as cisteínas de proteases presentes nas cepas isoladas de bovinos e suínos, no entanto, há uma pequena diferença entre o as cisteínas (1,03%) e na sequência de nucleotídeos da MDH1 (0,36%) das cepas oriundas de felinos e bovinos, que possivelmente estariam relacionadas com a adaptação do flagelado ao hospedeiro. A partir dessas diferenças foi proposto a denominação

T. foetus “genótipo bovino” para as cepas oriundas de suínos e bovinos e *T. foetus* “genótipo felino” para as de origem felina. Sun et al. (2011) também produziram um novo marcador baseado no gene da cisteína 8 (C8), e encontraram dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs- *single nucleotide polymorphism*), o que modifica a sequência de aminoácidos, substituindo a serina, em bovinos, pela arginina, em felinos.

Em virtude das diferenças genotípicas, morfológicas e das inconsistências na especificidade do hospedeiro, Walden et al. (2013) afirmaram que *T. foetus* “genótipo felino” não deveria ser considerado a mesma espécie do “genótipo bovino” e sugeriram a denominação *T. blagburni*. No entanto, através das mesmas comparações, estes autores apoiaram a sinonímia proposta entre *T. foetus* e *T. suis* em acordo com demais autores (TACHEZY et al., 2002; SLAPETA et al., 2012). Walden et al. (2013) basearam sua pesquisa nos marcadores moleculares RAPD, técnica semelhante à PCR convencional, no entanto utiliza um único par de *primers*, que pode ser desenhado sem o conhecimento prévio do DNA a ser testado. Essa técnica foi utilizada por Felleisen (1998), na tentativa de diferenciar *T. suis*, *T. mobilensis* e *T. foetus*; seus resultados afirmam *T. suis* e *T. foetus* serem sinonímia, sendo espécies diferentes de *T. mobilense*, espécie previamente isolada de macacos.

A técnica de PCR possui outras variações como o nested-PCR e o multiplex-PCR, que permite a detecção simultânea, de dois ou mais genes em uma única reação. Nested-PCR utiliza dois pares de *primers* em etapas diferentes de amplificação. Uma primeira etapa com *primers* externos, produzindo um amplicon que é transferido para uma segunda etapa, com *primers* internos aos primeiros. A técnica aumenta a sensibilidade e a especificidade da primeira etapa a partir da segunda, sendo uma alternativa vantajosa em relação à reação de PCR simples. Com esse objetivo, os ensaios com nested-PCR para o diagnóstico de *T. foetus* e outros trichomonas têm sido cada vez mais comuns (FERNANDES et al., 2008; DOI et al., 2012; LI, et al., 2016; LI, et al., 2018). No entanto, depende de mais tempo, mais reagentes e oferecem maior risco de contaminação por manipulações excessivas dos amplicons no laboratório (PERSING, 1993). Contudo, estudos moleculares de *T. foetus* estão sendo amplamente utilizados em diferentes protocolos, com *primers* construídos a partir de diferentes genes, tanto com o objetivo de identificar a infecção por *T. foetus* (FREY et al. 2009; LI, W et al., 2015), como o de comparação com outros trichomonádídeos, sobretudo com *T. suis* (DOI et al., 2012; SLAPETA et al., 2012). E como resultado, já foi possível identificar diferentes espécies no trato gastrointestinal de suínos, *T. buttreysi* e *T. rotunda* (HIBLER et al., 1960), e recentemente identificou-se *D. fragilis* (CACCIÒ et al., 2012), *H.*

acosta e *T. batrachorum* (MOSTEGL et al., 2012), e *Pentatrichomonas hominis* (LI, W et al., 2014), fagelado bastante conhecido por causar desconforto em seres humanos e em outros mamíferos (DELGADO - VISCOGLIOSI et al., 2000).

Estas técnicas moleculares são eficazes para discriminar microrganismos de diferentes gêneros da família Tricomonadidae, entretanto são incapazes de diferenciar as espécies do gênero *Tritrichomonas*, bem como para diferenciar espécies dos outros gêneros, sem a utilização do sequenciamento gênico, que não está disponível em muitos laboratórios e seu custo é significativamente mais elevado. Em contrapartida, uma outra técnica muito pouco explorada para o diagnóstico de tricomonose é baseada na utilização de enzimas de restrição, conhecida como polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). O objetivo é diferenciar as espécies através do corte feito pelas enzimas de restrição no fragmento de DNA amplificado, cada espécie tem um padrão diferenciado no corte, com diferença no tamanho dos fragmentos gerados. Esta técnica pode servir para diferenciar as espécies sem a necessidade do sequenciamento genético, podendo ser muito útil como método de identificação de rotina (HAYES et al., 2003).

As análises moleculares apresentam especificidade e sensibilidade, tendo como vantagem maior rapidez de diagnóstico quando comparado ao método de isolamento em cultura, além de permitir detectar protozoários que não sobreviveriam ao serem retirados do hospedeiro, e que conseqüentemente não estariam viáveis para o cultivo, portanto não seriam detectados por este procedimento (NICKEL et al., 2002). Essa técnica é útil, sobretudo, no diagnóstico de tricomonose digestiva, em nível de rebanho, a fim de pesquisar agentes diretamente nas amostras clínicas de suínos sintomáticos ou não.

Alguns autores afirmam que estes métodos podem ser utilizados com eficácia para o diagnóstico complementar à cultura ou até mesmo como diagnóstico primário e único de infecção (RILEY et al., 1995). No entanto, alguns trabalhos demonstram que as técnicas de PCR não podem substituir, por definitivo, a cultura, e que uma técnica não exclui a outra (GOOKIN et al., 2002; 2004). Estudos baseados na comparação entre o cultivo e as técnicas moleculares são escassos e apresentam resultados controversos, que dependem do material biológico na qual é feita a extração do DNA. Por exemplo, Cobo et al. (2007) revelaram taxas de positividade bem semelhantes entre as técnicas; 67,8% na cultura e 65,9% na PCR. Sua amostra clínica para a extração de DNA foi o lavado prepucial, teoricamente menos contaminado que as amostras fecais descritas por Gookin et al. (2002), cuja a diferença entre positividade das técnicas foi significativa; 55% na cultura e 39% na PCR.

A extração de DNA é um ponto crucial para o desenvolvimento de qualquer análise molecular. Se o DNA não for corretamente extraído e purificado, existem grandes possibilidades de não ocorrer à amplificação, seja pela ausência de DNA ou pela presença de inibidores, tal como as proteases, sobretudo em se tratando de amostras fecais, pois estas apresentam uma gama de inibidores de PCR. As amostras fecais dificultam os métodos de extração e deixa a técnica mais cara, quando comparada à extração de amostras oriundas de cultura, pois os métodos para extração de DNA de fezes são baseados na utilização de Kits comerciais (GOOKIN et al., 2002; FREY et al., 2009; LI, et al., 2016). E mesmo com a utilização de kits, uma pesquisa revelou que de 17 amostras em culturas positivas, apenas 12 obtiveram sucesso na extração do DNA quando foram extraídas diretamente das fezes (STOCKDALE et al., 2009). Contudo, para uma melhor sensibilidade do diagnóstico mais de uma técnica deve ser empregada no momento. Além disso, novos estudos ainda precisam ser desenvolvidos, não só em nível de extração de DNA fecal, bem como na utilização de outros genes e seleção de *primers* espécie-específicos, a fim de se obter um diagnóstico cada vez mais seguro, rápido e com preço acessível.

3. Parte I: Diagnóstico de parabasalídeos isolada de fezes de pequenos ruminantes e suínos naturalmente infectados: isolamento, identificação fenotípica e genotípica dos isolados.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Histórico dos Animais

Este estudo está de acordo com as normas do Comitê de Ética no uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CEUA/IV/UFRRJ # 006/2014 (ANEXO 1) e CEUA 2614120717 (ANEXO 2).

3.1.1.1 Caprinos

Foram coletadas amostras fecais, de forma aleatória, direto da ampola retal de 14 caprinos (13 fêmeas e 1 macho), que pertenciam a um capril localizado no município de Paulo de Frontin, RJ. O rebanho era destinado à produção de leite e constituído por 27 matrizes das raças Saanen e Parda Alpino e um reprodutor da raça Saanen. O capril apresentava histórico de abortamento, diminuição na produção de leite e emagrecimento progressivo das matrizes. A vermifugação do rebanho era realizada de forma inconstante, sem realização de exames parasitológicos e o fármaco empregado para o controle de parasitoses era escolhido aleatoriamente. Os caprinos eram criados em regime de confinamento e mantidos estabulados; recebiam concentrado e volumoso em suas respectivas baias. As baias onde as matrizes permaneciam possuíam pisos irregulares e não permitiam o escoamento das fezes, que se acumulavam por longo tempo.

3.1.1.2 Ovinos

Foram processadas amostras de 44 ovinos adultos, 34 fêmeas e 10 machos, da raça Santa Inês, provenientes de três pequenas propriedades particulares, localizadas na região Norte fluminense do Rio de Janeiro. Os animais eram criados no sistema semi-intensivo; a vermifugação do rebanho era realizada de forma inconstante, sem realização de exames parasitológicos e o fármaco empregado para o controle de parasitoses era escolhido aleatoriamente. Foi relatado redução no ganho de peso, disenterias, sobretudo nos cordeiros, e problemas de esfera reprodutivas nas fêmeas.

3.1.1.3 Suínos

Foram coletadas amostras fecais de 80 suínos, entre eles 30 matrizes, 5 cachos e 40 leitões nas fases de engorda e terminação. Estes animais eram mantidos em sistema de semi-confinamento, pertencentes à suinocultura do Colégio Técnico Nilo Peçanha, localizado no município de Pinheiral, RJ. Consta no protocolo de manejo que a vermifugação das matrizes (Ivermectina) é feita 15 dias antes do parto, e são vacinadas contra erisipela, leptospirose e parvovirose suína. Já os leitões, são desmamados aos 28 dias de idade, e vacinados contra circovirose (PCV tipo 2, CIRCOVAC) e micoplasmose (SPRINTVAC). Os animais apresentavam episódios frequentes de diarreia, sobretudo os leitões, com fezes de consistência que variava desde pastosa a aquosa e com coloração escura, que não respondem à antibioticoterapia convencional. Durante os quadros de disenteria o animal apresentava tenesmo, prostração, com tendência a se isolar dos outros animais, magreza e perda de apetite. Já as matrizes apresentavam histórico de repetição de cio, natimorto e nascimento de crias fracas.

3.1.2 Processamento das Amostras no Laboratório

As amostras de cada animal foram identificadas com a numeração ou nome

correspondente ao animal e armazenadas individualmente a fresco, em temperatura ambiente (cerca de 25 a 28 °C) até serem transportadas para o laboratório de Patologia da Reprodução, localizado no Anexo I do Instituto de Veterinária da UFRRJ. No laboratório, as fezes coletadas foram codificadas com a inicial da espécie e o número da amostra da espécie em questão, como por exemplo, fezes do Bode 6978, sendo esta a vigésima amostra de caprino recebida no laboratório, sua codificação seria Cap 20 (Cap = caprino). Após a codificação, parte das amostras foi destinada ao diagnóstico de parabasalídeos e a outra parte foi destinado para pesquisa dos demais parasitos intestinais (helmintos e coccídios) através da técnica de centrifugo-flutuação em açúcar (OSLANIA et al., 2005).

3.1.2.1 Centrifugo flutuação em açúcar

Um grama de fezes foi diluído em 15 ml de água em um copo descartável (50ml). O material foi filtrado para outro copo descartável (250 mL) com o auxílio de uma gaze e uma peneira de plástico. O filtrado foi transferido para um tubo de centrífuga (15 ml), onde foi centrifugado a 400 x g por 5 minutos. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado 5 ml de solução saturada de açúcar (1,25kg/L) para a homogeneização do sedimento; posteriormente acrescentou-se mais solução de sacarose até o volume final de 14 ml. Novamente o material foi centrifugado a 400 x g por 5 minutos. Ao final da centrifugação o tubo foi completado com a mesma solução de sacarose até formar um menisco, onde foi coberto por uma lamínula. Depois de 5 minutos em repouso a lamínula foi depositada sobre uma lâmina e submetida ao exame sob microscopia de luz, com objetiva de 40 (OSLANIA et al., 2005).

3.1.2.2 Diagnóstico de Parabasalídeos

Cinco gramas de fezes foram homogeneizados em 50 ml de PBS, e foi realizado o primeiro exame a fresco por microscopia óptica; colocando-se uma gota do material sobre uma lâmina e lamínula, para observação em objetiva de 10. A visualização de pelo menos um parasito vivo com os movimentos abruptos característicos confere positividade ao material. Após o primeiro exame a fresco, todas as amostras já diluídas em PBS, foram mantidas em estufas a 34 °C até novos exames de microscopia óptica, que foram realizados a cada 24 horas, durante 7 dias. Após esse prazo, as amostras eram reavaliadas semanalmente até completados 30 dias. As amostras positivas foram inoculadas em meios de enriquecimento e as demais foram descartadas e diagnosticadas como negativas.

3.1.3 Cultivo de Parabasalídeos

3.1.3.1 Meios de enriquecimento para o isolamento

Para o isolamento dos protozoários, os meios de cultura Hanks (HANKS; WALLACE, 1949), Diamond (DIAMOND, 1957) e Caldo Peptonado (LOPES, 1997) foram previamente preparados, asépticamente, no setor de meios de cultivo do laboratório de Patologia da Reprodução e mantidos em geladeira com a temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Esses meios só eram retirados da geladeira 30 minutos antes de serem utilizados para a inoculação dos protozoários. Além desses, dois novos meios foram utilizados: CHD, que consiste na homogeneização dos meios Caldo Peptonado, Hanks e Diamond, e CH, composto por Caldo Peptonado e Hanks (CARREIRO, 2014). A composição dos meios descritos se encontram nos anexos 3 a 9. Todos os meios foram acrescentados dos antibióticos anfotericina (2 mg/L) e gentamicina (400 mg/L).

3.1.3.2 Isolamento inicial das cepas e manutenção em cultivo

As amostras positivas foram inoculadas em meios de cultura seletivos Hank's (cultura mãe) e examinadas por até 10 dias, iniciando-se a triagem das culturas geralmente após 24 horas. As culturas onde houve a multiplicação dos protozoários tiveram uma alíquota de 200 µL transferida para novos frascos (1º repique) contendo 3mL dos meios Hank's, Diamond, Caldo Peptonado, CH e CHD. O cultivo foi realizado em aerobiose (sem vaselina líquida) e em anaerobiose (com vaselina). Para a realização da anaerobiose, aos frascos contendo as culturas foram adicionados 0,5 mL de vaselina líquida esterilizada. As culturas então foram mantidas por repiques para meio novo, a cada 72 horas, após serem avaliadas em microscopia óptica, em objetiva de 10, para detecção de trofozoítas móveis (Figura 2). Todo o material utilizado para a preparação dos meios, incluindo a vidraria que recebia as alíquotas dos mesmos, que seriam posteriormente usados para semeadura, foram previamente esterilizados por autoclavagem a 121°C, por 15 minutos, e posteriormente mantidos em condições assépticas.

Culturas negativas foram mantidas por pelo menos 10 dias sem repiques, e reavaliadas a cada dois dias. Se confirmado o resultado negativo após esse período, elas eram devidamente descartadas.

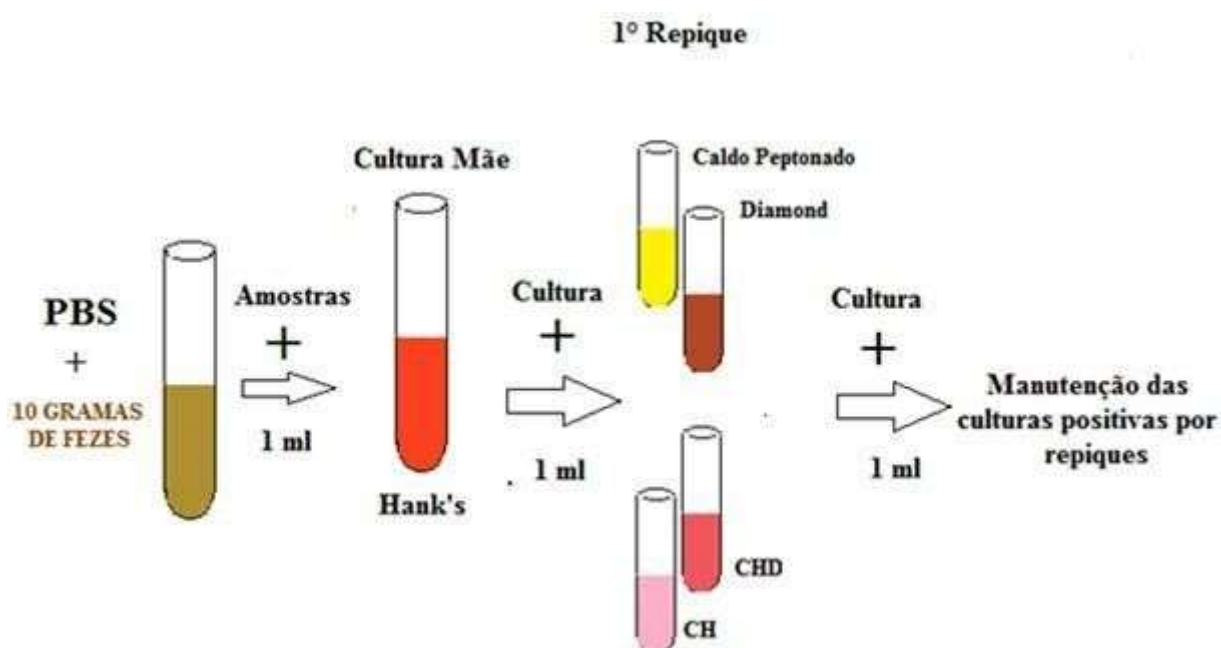


Figura 2. Ilustração do processamento das fezes, manejo das amostras e manutenção das culturas através de passagens para novos meios.

O meio de cultivo onde houve a melhor adaptação das cepas foi usado para a manutenção das culturas. A seleção do melhor meio foi baseada no acompanhamento da concentração de células a cada 24 horas, o que permitiu selecionar o meio em que as cepas apresentassem maior concentração de células por ml (melhor adaptação ao meio) e maior tempo de vida útil. A concentração de células foi calculada com o auxílio da câmara de Newbauer.

3.1.4 Contagem das Células em Câmara de Newbauer

Após a homogeneização da cultura, um volume de 50 µl foram transferidos para um microtubo plástico de 1,5 ml; esta mesma alíquota foi diluída em solução composta por formol salino (0,5%) e eosina citrato, na proporção de 1:1, com o objetivo de cessar a movimentação das células e diferenciar as células vivas (não coradas pela eosina) e células mortas (coradas de vermelho pela eosina). A diluição foi feita de acordo com a concentração de protozoário de cada amostra; as diluições mais utilizadas foram 1:2, em culturas com poucos protozoários, 1:4 quando a concentração de protozoário foi maior. Após a diluição, 10 µl foram colocados em câmara de Neubauer e contados nos quatro quadrantes maiores, contendo 16 quadrados menores cada; o valor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição da amostra e pelo fator de correção da câmara (10.000) como na Figura 3.

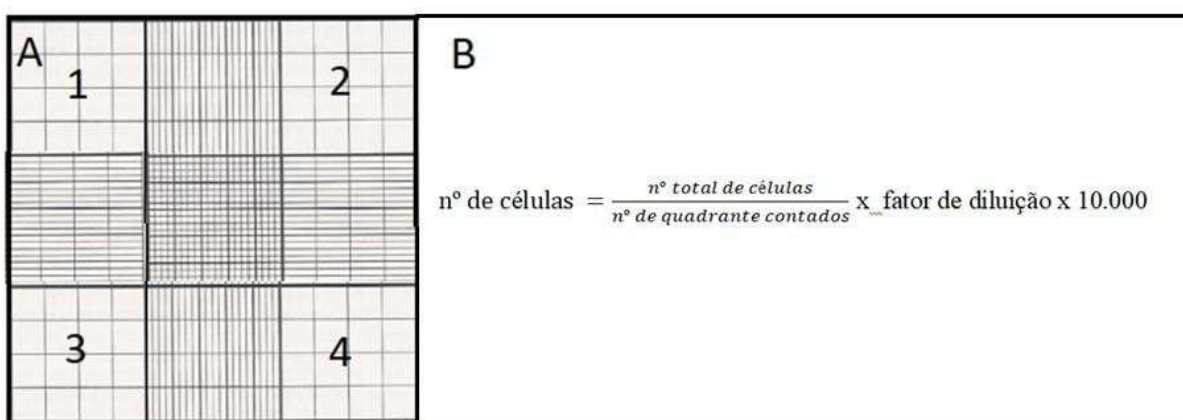


Figura 3. A. Imagem ilustrativa da câmara de Neubauer, demonstrando os quatro quadrantes a serem contados. B. Fórmula utilizada para calcular a concentração (número de células/ml).

3.1.5 Seleção do meio ideal para o isolamento de parabasalídeos de pequenos ruminantes

Após 24 horas de cultivo, as duas cepas mais bem adaptadas aos meios (uma de caprino e uma de ovino), foram usadas para estudar o padrão de crescimento em cada um dos meios de cultura utilizados (Diamond, caldo peptonado, Hank's, CH e CHD), com o objetivo de se selecionar o melhor meio para o cultivo. Para tal, 10 alíquotas de cada cepa, contendo 1×10^4 células/ml cada, foram transferidas para novos tubos de plástico de 1,5 ml, centrifugado a 400 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado; os sedimentos foram ressuspensos em 1 ml dos respectivos meios testados, com e sem vaselina (200 µl). A cada 24 horas uma nova contagem de células foi feita, durante o período de 144 horas. Após 144 horas houve o acompanhamento microscópico a cada 48 horas até que o protozoário não estivesse mais viável. Esse estudo foi realizado em triplicata, com três repetições. Os valores foram representados graficamente e o melhor meio foi selecionado para a realização dos estudos de morfologia, biologia molecular e para a manutenção das cepas, durante todo o período da realização da pesquisa.

3.1.6 Axenização

Com o objetivo de tentar eliminar as bactérias presentes no meio (axenização), além dos antibióticos utilizados rotineiramente, anfotericina (2 mg/L) e gentamicina (400 mg/L), os antibióticos meropenem (6 mg/L), estreptomomicina (200 mg/L) e penicilina (200 000 UI/L), como descrito por Amin et al., em 2010, para a axenização de cepas de *Tetratrichomonas galinarum* e *Trichomonas galinae*, foram acrescentados ao meio de cultivo CHD. Este meio com maior concentração de antibióticos foi utilizado para o repique das cepas. E o exame microscópico foi realizado a cada 24 horas.

3.1.7 Análise Morfológica

O exame morfológico foi realizado com 1 mL de cultura positiva centrifugada a 400 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi homogeneizado; 10 µL foram retirados e colocados em lâmina para a preparação de esfregaços que foram secados ao ar. Após a secagem as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 5 minutos e coradas pelo método do Panótico rápido® (Primo star iLEDZeiss®). A identificação morfológica foi realizada em microscopia óptica em objetiva de 100.

3.1.8 Identificação Molecular

As amostras de cultura foram encaminhadas para processamento e análise molecular no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LMBiomol), DPA, Anexo 1 do IV, UFRRJ.

3.1.8.1 Extração de DNA genômico

Amostras de culturas contendo de 2-6 x10⁶/ml de flagelados foram colocadas em tubos de micro-centrífuga de 1,5 ml e centrifugadas a 16.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 ml de solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,2). As células foram ressuspendidas em 100 µl de InstaGene Matrix ® (BIO RAD, EUA) e incubadas a 56 °C por 30 minutos e, a seguir, fervidas a 100 °C por 8 minutos. As amostras em tubos foram centrifugadas (16.000 x g por 5 minutos) para sedimentar os resíduos celulares junto com matriz de resina (chelexmatrix). Uma alíquota de 60 µl de cada sobrenadante foi transferida para um novo tubo e estocada a menos 20 °C.

3.1.8.2 Iniciadores (*primers*)

Para o diagnóstico molecular dos parabasalídeos foram utilizados iniciadores que amplificam as regiões interespaçadoras ITS 1 e 2 e gene ribossomal 5,8S, universais TFR1 e TFR2 para a triagem de espécies das famílias Trichomonadidae e Tritrichomonadidae. Para identificação espécie específica de *T. foetus* foram utilizados TFR3 e TFR4 (FELLEISSEN et al.,1998) cujo produto final apresenta 347 pares de bases. Além deste, outro par de *primers* que amplificam parcialmente o gene 18S de *P. hominis*, Th3 e Th5 (CRUCITTI et al. 2004) foi utilizado para diagnóstico diferencial (Quadro 2).

Quadro 2. Sequência dos iniciadores (*primers*) utilizados para a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos parabasalídeos isolados.

TFR1	5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3'	372 bp
TFR2	5' - CGG TAG GTG AAC CTG CCG TTG G-3'	
TFR3	5'- CGG GTC TTC CTA TAT GAG ACA GAA CC- 3'	347 pb
TFR4	5'- CCTGCC GTT GGA TCA GTT TCG TTA A-3'	
TH3	5'- TGT AAA CGA TGC CGA CAG AG -3'	339 pb
TH5	5'- CAA CAC TGA AGC CAA TGC GAG C-3'	

3.1.8.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi conduzida com um volume total de reação de 20 µl usando aproximadamente 20 ng DNA genômico, 0,2 mM de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl₂ e 0,5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, EUA). A reação foi realizada em termociclador (TProfessional 96, modelo 070-901 Biometra, EUA). Como controle positivo das reações utilizaram-se os iniciadores TFR3 e 4 e DNA de *T. foetus* cepa K isolada por Dr.

H. Guida, (Embrapa, Rio de Janeiro, Brasil) do trato urogenital de um touro, e já previamente identificado (GENBANK AY485677.1).

As condições foram otimizadas para cada par de *primers*. Para os iniciadores TFR1/TFR2 e TFR3/TFR4 utilizaram-se as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, a 94 °C por 30 segundos; anelamento a 66,5 °C por 15 segundos; extensão a 72 °C por 15 segundos, acompanhando 33 ciclos com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para os iniciadores Th3 e Th5, as condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, a 95 °C por 20 segundos; anelamento a 64 °C por 20 segundos; extensão a 72 °C por 30 segundos, acompanhando 40 ciclos com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Alíquotas de cada uma das reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2%. Para confirmar a presença dos produtos de peso molecular esperado, os géis foram corados em brometo de etídeo e a visualização dos ácidos nucleicos foi feita em transiluminador (BIO RAD® HOODII, EUA).

3.1.8.4 Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP)

Após a confirmação da amplificação do fragmento do tamanho esperada foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Primeiro foi feita uma análise de digestão *in silico* empregando programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA) utilizando-se sequências previamente depositadas no Genbank de *Tetratrichomonas* sp e *P. hominis*. Após análise pelo programa, para *Tetratrichomonas* sp foi escolhida a enzima Alu I, gerando dois fragmentos. Os produtos de PCR gerados com os iniciadores TFR 1 e 2 (372 pares de bases), foram digeridos utilizando-se 10 unidades de enzimas de restrição a 37°C por 2 horas. E para *P. hominis*, foram escolhidas duas enzimas que produziriam dois tipos de cortes diferentes, *Hae* III, gerando dois fragmentos e *Hinf* I que, geraria três padrões de corte. Os produtos de PCR gerados com os iniciadores TH3 e 4, específicos para *P. hominis* (339 pares de bases) foram digeridos utilizando-se 10 unidades de enzimas de restrição *Hae*III (Promega, EUA) e *Hinf*I (Invitrogen, EUA) a 37°C por 2 horas.

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 8%, corados com brometo de etídeo, visualizados e foto documentados. Os fragmentos gerados foram analisados com o auxílio do programa Quantity-One (BioRad, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, gerados pelos cortes com as enzimas e, estes foram comparados com os padrões gerados nas análises em sílico.

3.1.8.5 Sequenciamento dos produtos da PCR

O sequenciamento do gene foi feito da seguinte forma: 10µl dos produtos da PCR foram tratados com ExoSap-IT (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante e sequenciados em ambas as direções, empregando-se os iniciadores de amplificação pelo uso de *Big Dye Ready Reaction mix* (ABI Corp, EUA). Os produtos das reações foram analisados através do Analisador genético automatizado (ABI Corp). O alinhamento das sequências foi feito usando-se o programa *Sequencer* (Version 5.1, Genecodes Corporation, EUA). Todas as sequências foram inseridas no algoritmo de busca BLAST (ALTSCHUL et al. 1990) e no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para determinar a identidade genética. Todas as sequências obtidas nesta pesquisa serão depositadas e comparadas com as disponíveis no “GenBank”.

3.1.9 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado os testes Exato de Fisher e Qui-quadrado (SAMPAIO, 2000) com auxílio do programa Epi Info® versão 4.2. (www.cdc.gov).

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Diagnóstico Parasitológico

3.2.1.1 Pequenos Ruminantes

Todas as 14 amostras fecais de caprinos examinadas, através do exame parasitológico de centrífugo flutuação em açúcar, apresentavam-se positivas. Coccídios e Strongyloidea foram os mais frequentes, com 92,8% (13/14) e 86% (12/14) respectivamente, seguidos por *Toxocara vitulorum* (21,4%), *Moniezia expansa* (14%) e *Trichuris* spp. (7,0%). O índice de coinfeção foi relativamente alto (86%), sendo a infecção mista por Strongyloidea e coccídios (78,6%) a mais comum (Figura 4). Todas as amostras fecais de caprinos apresentaram OPG elevado.



Figura 4. Ovos de Strongyloidea não larvado (A); *Trichuris* spp (B); Oocisto não esporulado de *Eimeria* (C) em amostras fecais de caprinos. Solução saturada de açúcar. Objetiva de 40.

De 44 amostras de ovinos analisadas, 13 (29,54%) foram negativas para todos os parasitas pesquisados no exame de centrífugo flutuação em açúcar. Dentre os animais positivos (31/44), os coccídios foram os parasitas mais frequentes, 83,87% (26/31), seguido dos Strongyloidea, 32,25% (10/31), *Trichuris* spp. 12,9% (4/31), *Moniezia expansa* 9,67% (3/31) e *Toxocara vitulorum* 6,45% (2/31) (Figura 5). A coinfeção foi observada em 41,93% das amostras positivas (14/31).

Cem por cento dos caprinos estavam parasitados no momento da coleta, todos com EPG elevado; esses resultados estão intimamente ligados às péssimas condições de higiene das baias, que acumulavam fezes por longo período e não possuíam um adequado escoamento dos dejetos. Em ovinos, a frequência de parasitos intestinais também foi elevada (70,5%), no entanto foi menor que a encontrada em caprinos, certamente pelas diferenças quanto ao sistema de criação. Os caprinos eram criados no sistema intensivo (confinados), o que exige uma demanda muito maior por limpeza e desinfecção das baias, já que a restrição do espaço aumenta a exposição dos animais aos parasitos presente nas próprias fezes, o que possibilita as re-infecções. Enquanto os ovinos eram criados no sistema semi-intensivo, no qual o confinamento é limitado por um curto período de tempo ao longo do dia, normalmente apenas para o fornecimento de alimento concentrado. Nesse sistema de manejo, as instalações ficam vazias na maior parte do dia, enquanto os animais estão a pasto, o que facilita o manejo higiênico-sanitário do local. As falhas na sanidade do rebanho estavam presentes em todas as

propriedades, pois estas não possuíam um esquema de higienização periódico, bem como um protocolo de vermifugação regular.



Figura 5. Ovo de *Moniezia expansa* (A); Oocistos de coccídios esporulado (B); Ovo fértil de *Toxocara vitulorum* (C) em amostras fecais de Ovinos. Solução saturada de açúcar. Objetiva de 40X.

Os coccídios foram os parasitos mais frequentes, seguido da superfamília Stroglyloidea, tanto em caprino (92,8% e 86%) como em ovinos (83,87% e 32,25%). A alta frequência encontrada em caprinos também foi relatada por Martins Filho e Menezes em 2001 (89,53% e 80,72% respectivamente), e por Brito et al. em 2009 (69,79% e 91,66%, respectivamente), no entanto o sistema de criação, nesses dois estudos, era extensivo. Freitas et al. (2005) revelaram, em seu estudo, que 100% das fezes de caprinos analisadas estavam parasitadas por coccídios, e alegaram que a elevada frequência encontrada se deve ao tipo de exploração (leiteira), com destaque ao regime de manejo intensivo.

Em ovinos, maiores frequências de helmintos gastrointestinais foram relatadas por Brito et al., em 2009 (63,54%) e por Da Silva et al., em 2010 (88,95%), no entanto ambos os autores relataram frequência de coccídios (58,85% e 50,27%) menores que o presente estudo. Segundo Sotomaior et al. (2007), esta elevada frequência de helmintos estaria relacionada aos fatores de resistência gerados pelo uso indiscriminado e equivocado de anti-helmínticos, e pode ocorrer tanto em criações de caprinos como de ovinos.

As diferenças encontradas entre o nosso estudo e o dos demais autores, não estão somente relacionadas ao tipo de criação, mas diretamente ligadas à localização geográfica das propriedades, visto que climas quentes e a pluviosidade influenciam no ciclo dos parasitas, além dos fatores relacionados ao hospedeiro, como imunidade, idade, sexo, categoria animal, raça, estado nutricional e doenças concomitantes (TEIXEIRA et al., 2015).

3.2.1.2 Suínos

O exame de centrífugo-flutuação em açúcar foi realizado em 23 matrizes e 32 leitões, totalizando 55 suínos. Destes, 40 (72,7%) apresentavam-se positivas para pelo menos um parasito e apenas 15 animais (27,3%), que corresponde a 3 matrizes e 12 leitões, encontravam-se negativos para todos os agentes pesquisados. A coinfeção foi muito significativa, e a maioria dos animais (75%) estavam parasitados por mais de um agente. Esse resultado foi semelhante ao relatado por Aguiar em 2009 (75%). Nishi et al. (2000) fez um estudo semelhante em Minas Gerais e em São Paulo, e descreveram taxas de infecções bem menores (38,6 % e 39,7% respectivamente), o que possivelmente está relacionado às diferenças de manejo e instalações (D'ALENCAR et al., 2011). A taxa de positividade relatada no presente estudo (69,09%) foi semelhante aos dados apresentados por Pinto et al. (2007), o qual verificou 70% de positividade. No entanto, Pinto et al. (2007) fizeram o levantamento baseado em pequenas criações extensivas, na qual os animais não tinham

histórico de vermifugação e eram criados soltos durante o dia e presos à noite, em chiqueiros com precárias condições, sendo alguns animais criados em depósito de lixo. E foram coletadas apenas cinco amostras de cada um dos 10 criatórios, o que possivelmente não foi representativo para todo rebanho, mascarando as taxas de infecções. Outros levantamentos realizados em condições de semelhante precariedade descreveram taxas de infecção acima de 90% (AGUIAR, 2009; LODDI et al., 2015), e é importante ressaltar que as diferenças regionais também devem ser levadas em consideração.

Os dados relacionados aos parasitos intestinais encontrados (Figura 6-7) nas duas categorias analisadas (matrizes e leitões) então descritos na Tabela 1. A taxa de infecção das matrizes foram significativamente maiores que as dos leitões, ($p=0,004$).

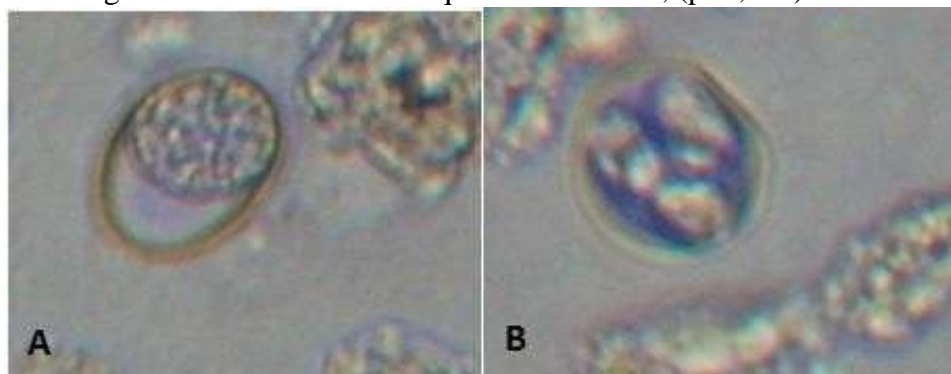


Figura 6. Oocistos de coccídios não esporulado (A) e esporulado (B), em amostras fecais de Suínos. Solução saturada de açúcar. Obj. de 100 X.

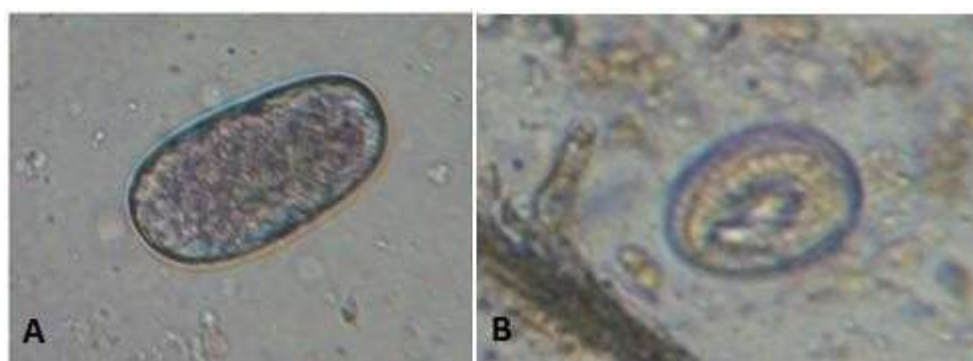


Figura 7. Ovos de Strongylida não larvado (A) e larvado (B), em amostras fecais de Suínos. Solução saturada de açúcar. Obj. de 40 X.

Tabela 1. Frequências de endoparasitos encontrados em amostras fecais de suínos, procedentes do município de Pinheral, RJ.

Parasitos	Matriz	Leitões	Total
Coccídios	60,87% (14/23)	25,0% (8/32)	40,0% (22/55)
Strongylida	47,8% (11/23)	18,75% (6/32)	32,72% (18/55)
<i>Balantidium</i> sp	26,08% (6/23)	12,4% (4/32)	18,18% (10/55)
<i>Ascaris suum</i>	4,34% (1/23)	-	1,8% (1/55)
<i>Trichuris suis</i>	4,34% (1/23)	-	1,8% (1/55)
Total	86,95% (20/23)*	56,25% (18/32)*	69,09 % (38/55)

A alta carga de parasitos gastrintestinais reflete na redução da fecundidade, retornos irregulares do cio, baixo número de leitões nascidos e desmamados, assim como baixo peso da leitegada ao nascer e ao desmame (FORMIGA et al., 1980). Além dos prejuízos relativos à elevada taxa de condenação de vísceras em abatedouros, há redução significativa do ganho de peso diário e da conversão alimentar dos animais em crescimento e engorda, o que gera aumento no custo de produção (STEWART et al., 1991). Verificamos que as matrizes apresentaram um maior índice de infecção (86,95%) quando comparado aos leitões (56,25%), o que também foi relatado por outros autores (NISHI et al., 2000; HOFF et al., 2005), e que possivelmente estaria relacionado ao fato das reprodutoras serem vermifugadas 15 dias antes do parto, o que reduz a transmissão vertical, consequentemente diminuindo a taxa de infecção da prole. Além disso, as matrizes são mantidas por mais tempo na granja, cinco anos em média (maior tempo de exposição), onde permanecem por longo período em um mesmo recinto, com contato direto com o solo, e com a presença de lâmina d'água, o que favorece a permanência dos parasitos no ambiente (reinfecção). Já os leitões são mantidos em baias suspensas, não tendo contato direto com as fezes, e sem a presença de lâmina d'água, sendo remanejados na instalação de acordo com a fase de desenvolvimento (amamentação, desmame, creche e engorda), respeitando sempre os períodos de vazio sanitário. Essas diferenças no manejo podem ser um dos fatores responsáveis pela redução das taxas de infecções nos leitões (NISHI et al., 2000; D'ALENCAR et al., 2011; CAMPOS et al., 2012).

No estudo de Nishi et al. (2000) a taxa de infecção das matrizes foi maior (57,2%), quando comparadas com as dos leitões (37,2%), e os coccídios também foram os parasitos mais encontrados em ambas as categorias, sendo observado 22,8% nas matrizes e 13,7% nos leitões. A grande incidência de coccídios descrita por muitos autores, independente da região geográfica, é de grande relevância, já que estão relacionados às enterites graves, aos surtos de diarreia e ao aumento de mortalidade, sobretudo nas primeiras semanas de vida (NISHI et al., 2000; HOFF et al., 2005; PINTO et al., 2007; CAMPOS et al., 2012).

A ocorrência de *Ascaris* sp neste rebanho foi de 1,8%, semelhante a valores encontrado em por outros autores em diferentes regiões (NISHI et al. 2000; HOFF et al; 2005), no entanto foi relativamente menor que o descrito em rebanhos de criação extensiva (PINTO et al., 2007). No estado de Santa Catarina, Hoff et al. (2005) relataram taxas de infecções para *Trichuris* sp (0,5%) e para ordem Strongylida (21,5%), próximas às descrita nesse estudo, de 1,8% e 32,72% respectivamente. Como consequência destes parasitismos, os animais infectados podem apresentar diarreia, má absorção dos nutrientes e desidratação, acarretando em atraso no desenvolvimento, podendo causar morte principalmente quando coparasitados (MONTEIRO, 2014).

A taxa de infecção por *Balantidium* sp (18,18%) descrita neste estudo foi semelhante àquela descrita por Nishi et al. (2000), em São Paulo (18,7%), e foram bem menores quando comparadas aos dados de Pinto et al. (2007) e Brito et al. (2012), os quais relataram uma ocorrência igual a 46% e 78% respectivamente. Nosso levantamento foi realizado em um sistema de produção intensiva, onde os animais são mantidos em confinamento, semelhante ao sistema utilizado por Nishi (2000). Já os outros estudos mencionados foram realizados em suínos de pequenos produtores familiares, com instalações precárias e más condições de higiene. *Balantidium* sp. são vistos como agente comensal do trato intestinal de suínos, apesar de serem escassos os dados disponíveis a cerca deste agente, pode ser invasor secundário na ocorrência de outras lesões intestinais. No entanto, é o único protozoário ciliado capaz de causar infecção em suínos, e com potencial patogênico no homem (BARBOSA, 2015).

Levando em consideração que os suínos são hospedeiros de agentes parasitários que causam infecções importantes no homem, como por exemplo *Balantidium* sp, parabasalídeos e coccídios, esta espécie animal pode ser considerada um importante disseminador dessas

parasitoses, não só para suinocultores de forma direta, mas também para a população de uma forma geral, uma vez que no Brasil não há uma correta destinação dos resíduos orgânicos (fezes) desses animais.

O manejo sanitário para o controle de helmintos baseia-se na aplicação rotineira de ivermectina em matrizes gestantes. E os tratamentos anti-helmínticos utilizando febendazole, são empregados de forma curativa quando há histórico de surto de disenteria, na maioria das suinoculturas do país. Esse manejo melhora significativamente o estado geral dos animais, mas ainda ocorre a permanência das infecções parasitárias. Essa permanência nos rebanhos está associada à contaminação e à resistência dos ovos destes helmintos ao meio ambiente. Contudo, apesar do sistema de criação ser considerado de confinamento, se as condições de manejo não forem apropriadas, as infecções parasitárias expressivas irão permanecer (D'ALENCAR et al. 2011).

Todos esses parasitos relatados são muito prevalentes na suinocultura no Brasil, e a diversidade e intensidade das infecções depende da região, instalações, e manejo aplicado em cada rebanho. O diagnóstico e controle são um constante desafio, porque vários fatores infecciosos e não infecciosos, participam da etiopatogenia, agindo de maneira sinérgica ou somatória contribuindo para instalação do quadro patológico de disenterias e aumentando seu impacto nas perdas econômicas. O confinamento total dos animais, a falta de qualidade e conforto ambiental, a má qualidade da matéria prima para rações, e as doenças intercorrentes, são fatores que contribuem para o aumento do estresse animal e atuam diretamente na imunidade, favorecendo a infecção e coinfeção por determinados agentes.

3.2.2 Diagnóstico de Parabasalídeos

No primeiro exame de microscopia óptica, exame direto, realizado cerca de 24 horas após a coleta do material, em nenhuma das amostras de fezes de caprino, ovinos e suíno (diluídas em PBS), foi possível a visualização do protozoário na forma trofozoíta, ou seja, com movimento progressivo e característico de parabasalídeos. Tão pouco, no exame de centrífugo-flutuação, nestas duas técnicas empregadas só foi possível observar a presença de pseudocistos, o que não permite um resultado conclusivo, uma vez que é impossível reconhecer as estruturas características desses flagelados. Portanto, foi necessário um tempo mínimo de 48 horas de repouso, em temperatura ambiente (25 a 28 °C), para o protozoário retornar à forma vegetativa e começar a se locomover.

Do total de amostras pesquisadas (14 de caprinos, 44 de ovinos e 80 suínos) seis amostras de caprinos (42,85 %), 30 de ovinos (68%) e 57 de suínos (71,25%) foram positivas para a presença de trichomonadídeos, com base na análise microscópica das fezes pelo exame direto. Os trofozoítos observados no material fecal diluído com PBS foram visualmente menores comparados aos trofozoítas observados durante os cultivos. O aspecto era de formato arredondado, com movimentos rápidos e motilidade característica de trichomonadídeos, ou seja, progressiva, errática e com movimento rotacionado (axial), o mesmo tipo de movimento descrito por Diamond (1957), em cepas de *Tritrichomonas foetus*. O acompanhamento dos protozoários nas fezes foi feito quinzenalmente, até as amostras não apresentarem protozoários viáveis e serem descartadas; a maioria das cepas se mantiveram viáveis em fezes por um período superior a seis meses.

Apesar da escassa literatura sobre a presença de parabasalídeos em pequenos ruminantes, o resultado da pesquisa revelou uma frequência significativa, com 42,85 % dos caprinos e 68 % dos ovinos acometidos. Estas frequências são maiores que as observadas no trato intestinal de outros hospedeiros (DOS SANTOS et al., 2015; CARREIRO et al., 2016), bem como as relatadas na cavidade oral e prepucial de outros animais (LI et al., 2016; KELLEROVÁ & TACHEZY 2017; OKAFOR et al., 2017). Os problemas sanitários dos

rebanhos podem ter influenciado negativamente nessa frequência, no entanto a necessidade de mais pesquisas é imprescindível.

A alta prevalência de Parabasalídeos encontrada em suínos, 71,25%, é muito semelhante à descrita por Cacciò et al. (2012) onde 52 dos 74 leitões examinados encontravam-se positivos, cerca de 70,27%. Assim como a prevalência descrita por Pakandl em 1994, no qual foram examinadas 842 matrizes, sendo 77% positivas. Mostegl et al. (2011) relataram uma prevalência relativamente menor, 52,1%, o que pode ser justificado pelas diferentes técnicas empregadas. Cacciò et al. (2012) e Pakandl (1994) analisaram amostras fecais, assim como no presente estudo, enquanto que Mostegl et al. (2011) empregaram a técnica de hibridização cromogênica *in situ*, que utiliza fragmentos de tecido epitelial para a detecção do parasita; essa técnica só é capaz de identificar os protozoários que penetram no epitélio. Além disso, em animais com baixa carga parasitária poderia ter sido coletado uma porção do epitélio intestinal na qual não há o parasitismo, não sendo representativo para todo o trato intestinal, o que possibilitou a menor prevalência relatada por Mostegl et al. (2011).

Em suínos algumas espécies de parabasalídeos, já foram descritas como potencial causador de diarreia (MOSTEGL et al., 2011; LI et al., 2014), e estão sendo amplamente estudados por causar distúrbios em muitas outras espécies animais, incluindo humanos (GOOKIN et al., 2005; MELONI et al., 2011, DIMASUAY; RIVERA 2013; DOS SANTOS et al., 2015). No entanto, infelizmente a pesquisa de parabasalídeos ainda não é incluída nas pesquisas de endoparasitas realizadas no país (PINTO et al. 2007, AGUIAR 2009, BRITO et al. 2012, LODDI et al. 2015).

3.2.2.1 Cultivo *in vitro*

Todas as amostras de fezes de pequenos ruminantes, positivas, em que houve a visualização do flagelado no exame direto, se mantiveram positivas em meio de cultura Hank's (cultura mãe). Porém, três isolados de caprinos (3/6) e (8 /30) não se adaptaram a nenhum dos meios utilizados (Hanks, Caldo Peptonado, Diamond, CHD e CH) se a concentração de fezes no meio não fosse alta, sendo assim, não foi possível repicá-las para meios novos (limpos). Contudo, estas amostras não puderam ser analisadas morfológicamente, em função do excesso de conteúdo fecal, que impediam a visualização do protozoário após fixação; tão pouco puderam ser identificadas molecularmente, uma vez que as fezes possuem muitos fatores de inibição para a PCR.

Os três isolados de caprinos e os 22 de ovinos, se desenvolveram bem à temperatura de 34 °C, apresentando-se como uma estrutura ovoide ou piriforme, sendo a maioria deles de formato arredondado. O tempo de multiplicação celular dos isolados de caprinos foi semelhante entre as amostras, e os repiques foram feitos a cada 72 horas. Sem que houvesse prejuízo no desenvolvimento das culturas. Porém, o tempo de multiplicação celular nos isolados de ovinos, foi distinto entre algumas amostras, e estas se perderam durante os repiques, pois algumas necessitavam de repique a cada 24 horas, enquanto outras precisavam de um tempo maior em cultura, mais de 144 horas para que pudesse ser repicada com sucesso. Algumas estratégias foram utilizadas, a fim de garantir o sucesso do repique, como por exemplo, exames microscópicos dos isolados a cada 48 horas e repique somente das que estivesse com concentração de células elevada. Mesmo assim, algumas amostras se perderam e não foi possível retomá-las. De 30 cepas, 16 foram analisadas molecularmente, e destas apenas oito continuam sendo mantidas em meio de cultivo CHD, por meio de repiques a cada 72 horas, bem como todos os três isolados dos caprinos.

Das amostras de fezes de suínos, positivas, em que houve a visualização do flagelado no exame direto, 57 se mantiveram positivas em meio de cultura Hank's (cultura mãe). Mas apenas 35 foram cultivadas com sucesso à temperatura de 34 °C, sobretudo no meio de

cultivo CHD. Nos outros meios testados houve diferença na adaptação; algumas se adaptaram a um determinado meio, enquanto outras não. Portanto, estas foram mantidas por repiques em meio CHD e congeladas em freezer comercial até serem analisadas molecularmente. No entanto, estes isolados apresentaram-se menos resistentes ao processo de repiques; muitas culturas se perderam e não foram analisadas morfológicamente. Em meio CHD, os trofozoítas apresentaram-se como uma estrutura ovoide ou piriforme, sendo a maioria deles de formato arredondado, e sob microscopia ótica, foram visualmente maiores que os protozoários encontrados em pequenos ruminantes.

Apenas 50% dos isolados de caprinos foram capazes de se adaptar aos meios testados, contra 61,40% dos isolados de suínos e 73% dos isolados de ovinos. No entanto, algumas isolados de ovinos necessitaram de repiques com tempos diferentes da maioria, e por isso apenas 53% (16/30) foram analisadas. Nas amostras positivas, nas quais os flagelados não se adaptaram ou mesmo que se adaptaram, mas que apresentaram comportamento diferenciado, podem se tratar de espécies ou mesmo de gênero de parabasalídeos distintos das que foram capazes de serem isoladas, o que justificaria necessidades metabólicas distintas. No entanto, Amin et al. 2010, fez um estudo com várias cepas de *Tetratrichomonas gallinarum* e *Trichomonas gallinae*, e demonstrou que diferentes cepas de uma mesma espécie podem se comportar de forma distinta em um mesmo meio de cultura, ou seja que a adaptação das cepas ao meio envolve um fator individual.

Cultivar esses flagelados *in vitro*, requer mimetizar as condições encontradas por eles dentro do hospedeiro, o que é um grande desafio, diante da fartura de nutrientes encontrada no trato intestinal, das diferentes pressões de O₂ (condições de anaerobiose estrita ou microaerofila), e da vasta microbiota disponível *in vivo*. É importante ressaltar que existem diferenças bioquímicas marcantes entre as espécies de parabasalídeos. Ou seja, os resultados obtidos com uma espécie não podem ser generalizados, sem que haja evidências experimentais (Mueller, 1990).

3.2.2.2 Perfil de crescimento em diferentes meios de manutenção

Todos os isolados de caprinos (3) e de ovinos (16) se adaptaram aos meios de cultivo testados, comportaram-se de forma semelhante, e por isso um exemplar de caprino e dois de ovinos foram utilizados para selecionar o melhor meio de isolamento. No entanto, nos isolados de suínos houve discrepância no perfil de isolamento entre cada amostra. Porém, em todos os 35 isolados, foi nítido o melhor desempenho das culturas quando em meio de cultivo CHD, comparado aos demais meios testados. Os 35 isolados também se multiplicaram em meio Hanks, mas com uma concentração de células baixa e menor tempo de vida em cultura. Apenas 13 se adaptaram ao meio de cultivo CH e 8 se adaptaram ao meio caldo peptonado, nenhum isolado foi capaz de se multiplicar quando cultivado em Diamond's. Por tanto, todas as cepas de suínos foram mantidas em meio CHD, sem que houvesse a necessidade de comparar o crescimento delas aos demais meios para que fosse eleito o mais adequado como foi feito para as amostras de caprinos e ovinos.

O padrão de crescimento em anaerobiose, dos isolados de caprinos, em todos os meios testados estão representados graficamente nas Figuras 8, e em aerobiose na Figura 9.

Na presença de vaselina, anaerobiose, dos cinco meios de culturas testados, foi nos meios CHD (CARREIRO, 2014) e Diamond (DIAMOND, 1957) que o isolado de caprinos apresentou maior concentração de células por mL, $5,7 \times 10^5$ e $6,4 \times 10^5$ respectivamente, nos demais meios a concentração máxima de células viáveis por mL não passou de $2,44 \times 10^5$ céls/mL. No entanto, com exceção do meio Diamond, em todos os meios testados as cepas apresentaram padrão de crescimento semelhante nas primeiras 120 horas, com uma fase de adaptação que durou 24 horas, seguida da fase de crescimento exponencial até às 48 horas.

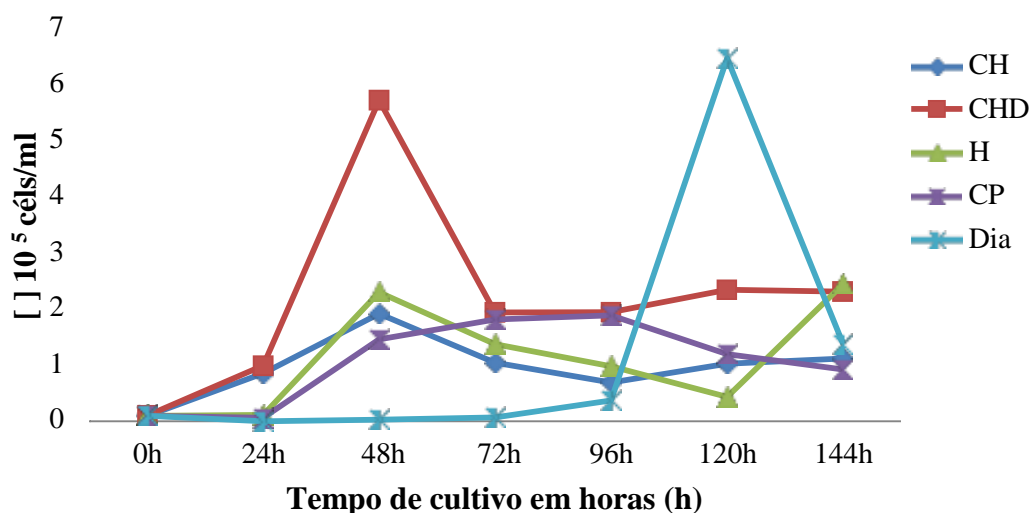


Figura 8. Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo: Hank's (H), caldo peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com caldo peptonado e Hank's (CH) e caldo peptonado, Hank's e Diamond's (CHD). Amostras em anaerobiose.

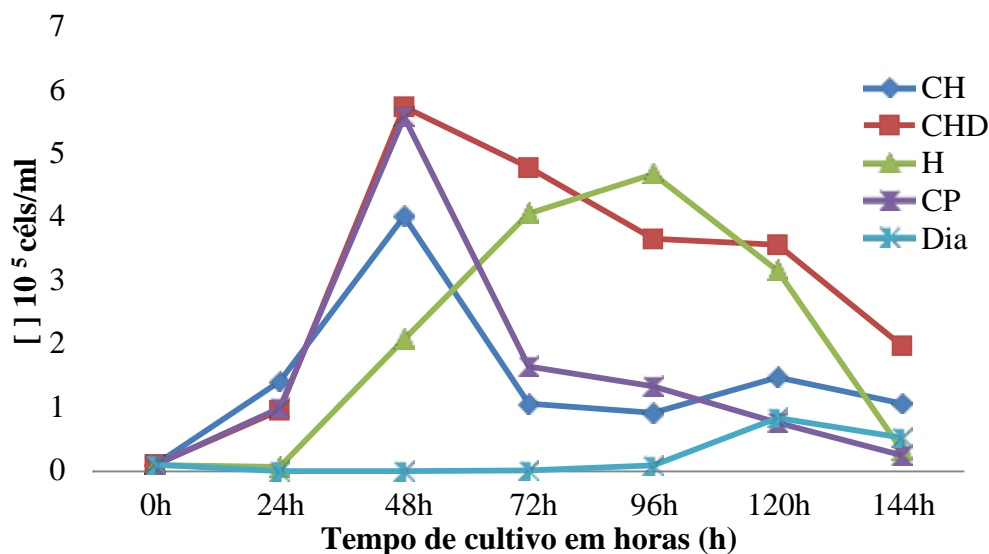


Figura 9. Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo: Hank's (H), caldo peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com caldo peptonado e Hank's (CH) e caldo peptonado, Hank's e Diamond's (CHD). Amostras em aerobiose.

Logo após, houve uma fase de declínio até às 72 horas, com posterior estabilização celular nos tempos seguintes, fase estacionária (Figura 8). Esse padrão de crescimento foi semelhante tanto em anaerobiose, quanto em aerobiose (Figura 9) nos meios CHD, CP e CH.

Dentre os isolados de ovinos, os dois mais adaptados aos meios de cultivo foram usados nesse estudo. Dos cinco meios testados, apenas no meio Diamond, os isolados de ??? não conseguiram se desenvolver, tanto em anaerobiose, com presença de vaselina líquida

(Figura 10), quanto em aerobiose, e na ausência de vaselina líquida (Figura 11). Em todos os outros meios os isolados apresentaram perfil de crescimento semelhante, sobretudo em anaerobiose.

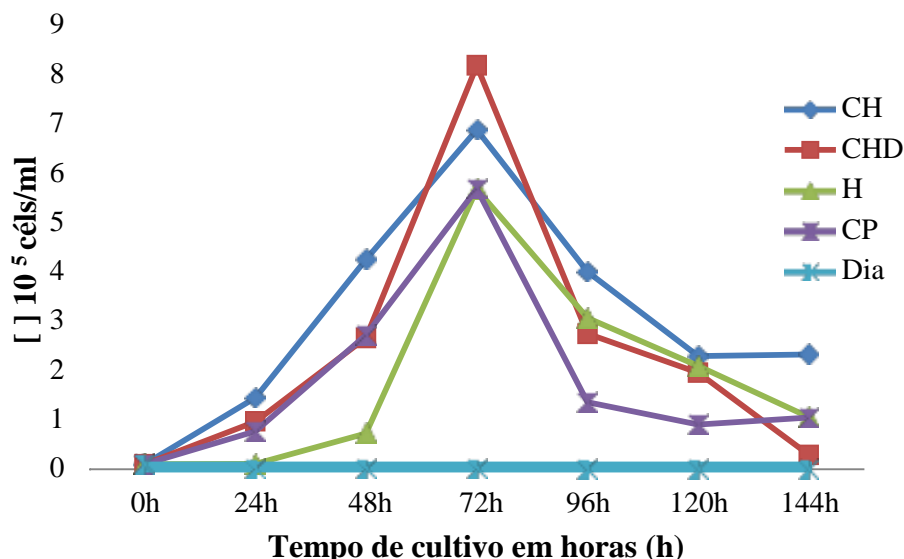


Figura 10. Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, a cada 24 horas, cultivadas nos meios de cultivo: Hank's (H), caldo peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com caldo peptonado e Hank's (CH) e caldo peptonado, Hank's e Diamond's (CHD). Amostras em anaerobiose.

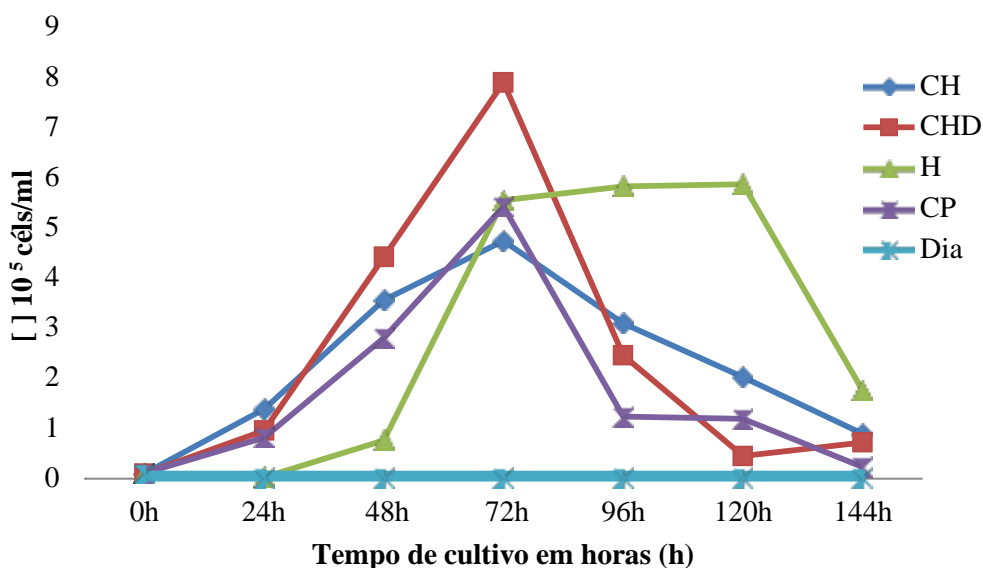


Figura 11. Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, a cada 24 horas, cultivadas em aerobiose nos meios de cultivo: Hank's (H), caldo peptonado (CP), Diamond's (Dia) e nos meios mistos com caldo peptonado e Hank's (CH) e caldo peptonado, Hank's e Diamond's (CHD).

Os isolados de ovinos apresentaram uma fase de adaptação, com duração de 24 horas, seguida de uma fase de crescimento progressivo até 72 horas de cultivo, quando atingiram o número máximo de células por ml; posteriormente seguiu-se a fase de declínio (Figura 10). Em aerobiose, este perfil se diferenciou em meio Hank's após 72 horas de cultivo, quando não ocorreu a fase de declínio como nos demais meios, e sim uma fase estacionária, que perdurou por 48 horas, seguida de uma fase de declínio que iniciou-se após 120 horas de cultivo (Figura 11).

No meio CHD, os isolados de caprinos, apresentaram concentração máxima de $5,7 \times 10^5$ células por ml, em 48 horas, tanto em presença quanto em ausência de oxigênio (Figura 12), no entanto, a fase de declínio foi mais lenta em aerobiose, apresentando concentração de células viáveis bem mais elevadas que os demais meios durante a fase de declínio (Figura 9). E a fase de estabilização só aconteceu após as 144 horas de cultivo, e perdurou por cerca de 720 horas de cultivo. Já em anaerobiose, esta fase de estabilização foi maior, cerca de 2000 horas através de acompanhamento microscópico.

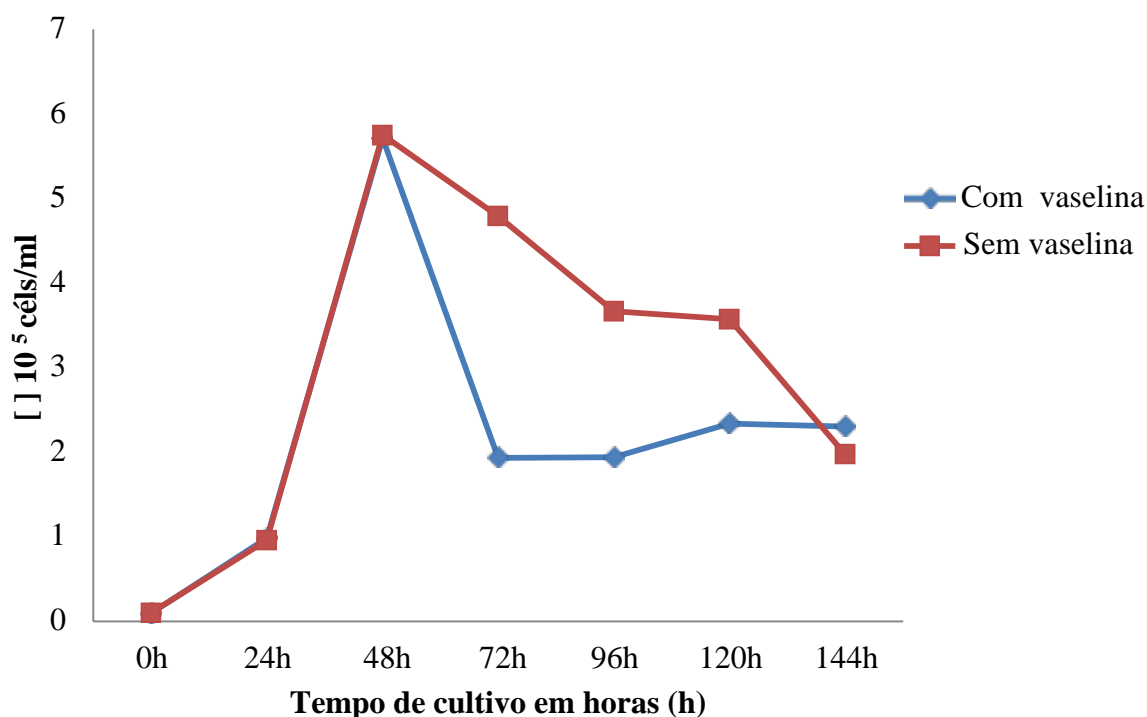


Figura 12. Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas. Cultivadas nos meios de cultivo CHD. Amostras em anaerobiose e aerobiose.

Foi também no meio de cultivo CHD em que os isolados de ovinos atingiram a maior concentração de células por ml ($8,2 \times 10^5$ céls/ml), comparado aos demais meios. Não houve diferença significativa no perfil de crescimento das cepas em meio CHD quando comparado o cultivo em aerobiose com anaerobiose, nas primeiras 96 horas (Figura 13).

Quando os isolados de ovinos foram cultivados em CHD em aerobiose, pós 96 horas de cultivo, houve uma tendência à estabilização, após a fase de declínio, que ocorreu entre 72 horas e 120 horas de cultivo, e permaneceram viáveis por até 192 horas; em anaerobiose, a fase de declínio se manteve de forma lenta entre 96 horas e 144 horas, e posteriormente não havia mais células viáveis.

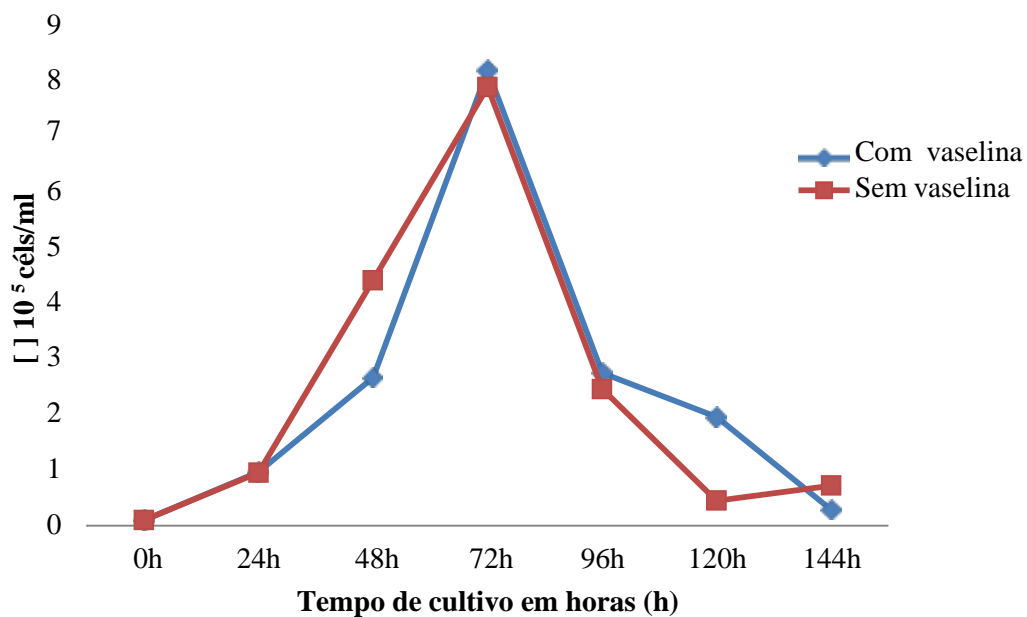


Figura 13. Concentração de células por ml das cepas de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, calculadas a cada 24 horas. Cultivadas nos meios de cultivo CHD. Em anaerobiose, com vaselina, e em aerobiose, sem vaselina.

No meio Diamond, a fase de adaptação dos isolados de caprinos foi muito longa, cerca de 96 horas; após iniciou-se a fase de crescimento que durou cerca de 24 horas (120h), seguido de posterior declínio, até zerar totalmente após 144 horas. Esse padrão de crescimento diferenciado do meio Diamond foi observado tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose (Figura 14). Porém, a concentração de células por mL foi muito maior em anaerobiose ($6,4 \times 10^5$), do que em aerobiose ($0,9 \times 10^5$). Esta foi a menor concentração celular apresentada entre todos os outros meios testados (Figura 9).

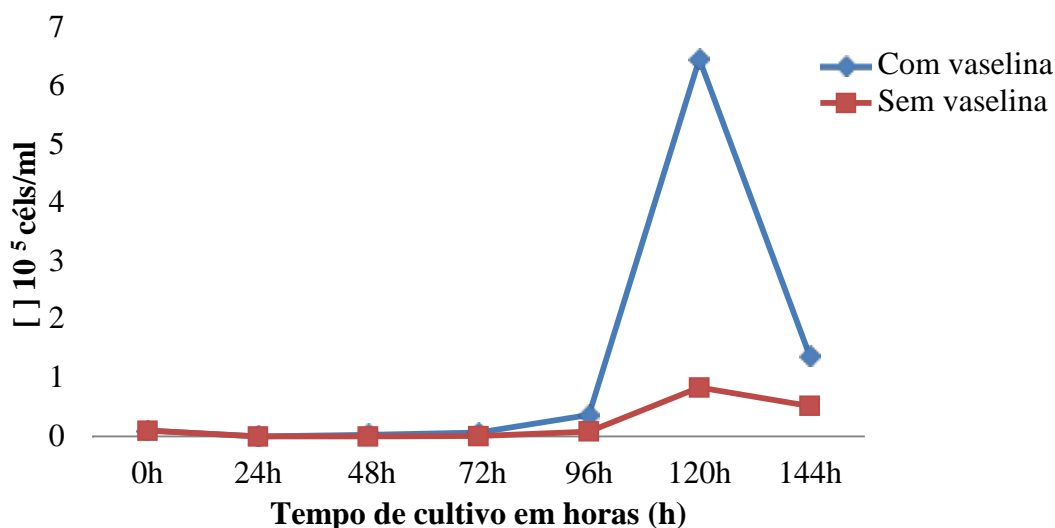


Figura 14. Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas. Cultivadas no meio de cultivo Diamond, em anaerobiose e aerobiose.

Em aerobiose, durante as primeiras horas de cultivo em meio Diamond's, os isolados de ovinos não conseguiam se adaptar, de tal modo que após 24 horas não havia mais nenhuma célula viável. Em anaerobiose, a concentração de células por ml reduziu drasticamente nas primeiras 24 horas, de 1×10^4 para $0,2 \times 10^4$ céls/ml, mais posteriormente a morte celular ocorreu de forma mais lenta, com declínio gradativo entre 24 e 96 horas de cultivo, chegando a zero somente após 96 horas de cultivo (Figura 15).

Diferente das cepas de ovinos, as cepas de caprinos conseguiram se estabelecer em meio Diamond, no entanto levaram muito mais tempo para se adaptar (96 horas), comparado aos demais meios. Em condições anaeróbicas, após esta longa fase de adaptação, o crescimento foi satisfatório, semelhante ao registrado em meio CHD, meio em que todas as cepas apresentaram um bom desempenho. No entanto, em aerobiose esse crescimento pós 96 horas foi sutil. Certamente o excesso de bactérias já previamente estabelecido dificultou o desenvolvimento dos protozoários. A dificuldade em cultivar esses flagelados em meio Diamond, também foi relatada por outros autores (COBO et al., 2003; IBAÑEZ- ESCRIBANO et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2017).

No meio Hank', em anaerobiose, a partir de 24 horas de cultivo dos isolados de caprinos, iniciou-se a fase de crescimento, atingindo uma concentração máxima de $2,3 \times 10^5$ céls/ml nas primeiras 48 horas. Posteriormente, ocorreu a fase de declínio até as próximas 120 horas. Após, iniciou uma nova fase de crescimento, semelhante à primeira, ($2,4 \times 10^5$ céls/ml), seguida por outra fase de declínio (Figura 16). E 240 horas após o início do cultivo, o número de células por ml era bem próximo de zero ou nulo. Esta drástica redução do número de células viáveis após 240 horas foi observada em todos os meios, com exceção do meio CHD, que se manteve em fase estacionária, concentração de $2,0 \times 10^5$ cél./ ml, por um período de tempo superior, mais de 720 horas de cultivo.

Quando isolados de caprino foram cultivadas em Hank's, em aerobiose, após a fase de adaptação (24 horas), houve uma fase de crescimento que perdurou por 96 horas, atingindo uma concentração de $4,7 \times 10^5$ céls/ml, bem maior que a apresentada em aerobiose ($2,4 \times 10^5$ céls/ml). Este crescimento foi seguido por uma fase de declínio abrupta, até redução total do número de protozoários viáveis, após as 144 horas de cultivo, não havendo uma fase de estabilização (Figura 16).

Os isolados de ovinos, em aerobiose e no meio Hank's, apresentaram comportamento bem diferenciado, comparado aos demais meios (Figura 11). Após as 72 horas de cultivo, houve uma fase de estabilização, em que a concentração de máxima de células ($5,8 \times 10^5$ céls/ml) se manteve por 48 horas. Passadas 120 horas de cultivo, as cepas entraram em fase de declínio, e atingiram concentrações próximas de zero após 144 horas de cultivo (Figura 17). Em anaerobiose, o perfil de crescimento em Hank's foi semelhante aos demais, e após as 144 horas, as cepas se mantiveram em concentração baixa, porém viáveis por até 192 horas de cultivo.

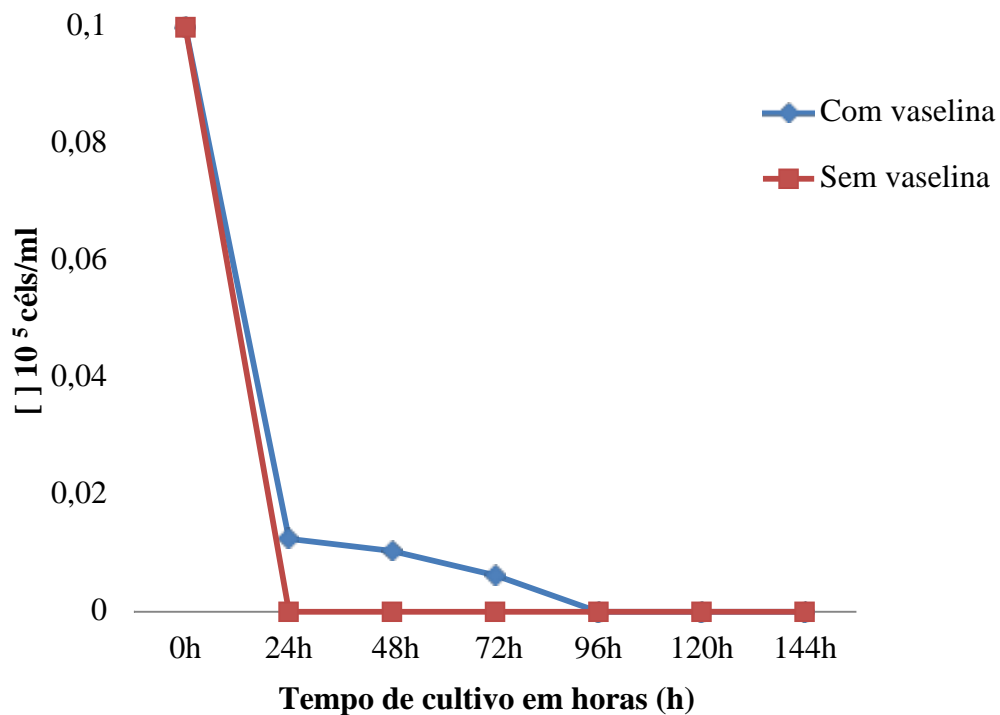


Figura 15. Concentração das células de parabasalídeos isoladas das fezes de ovinos, a cada 24 horas. Cultivadas no meio de cultivo Diamond, em anaerobiose e aerobiose.

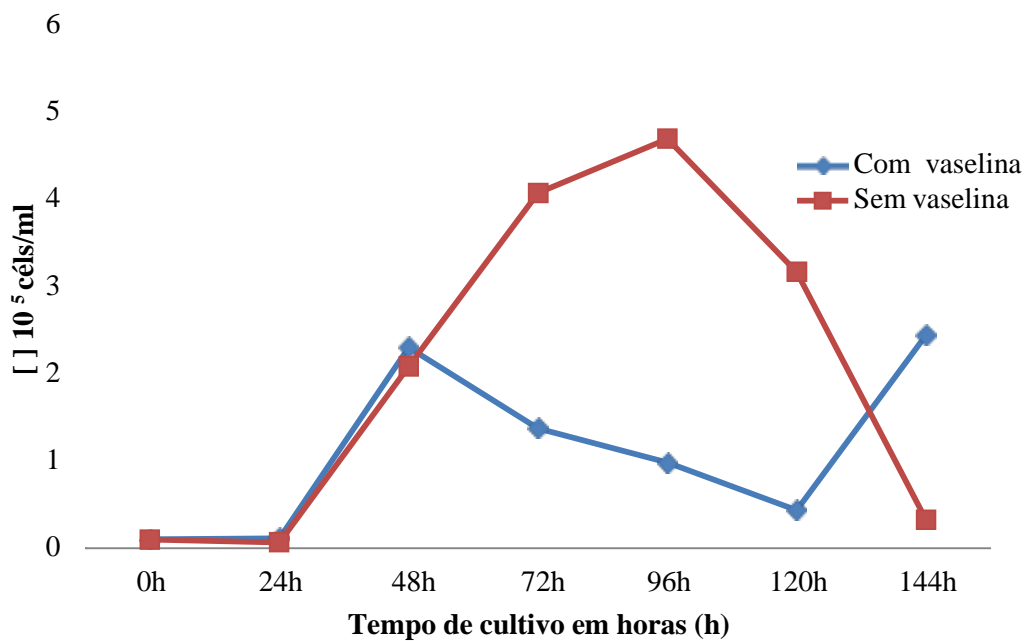


Figura 16. Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas. Cultivadas nos meios de cultivo Hank's, em anaerobiose e aerobiose.

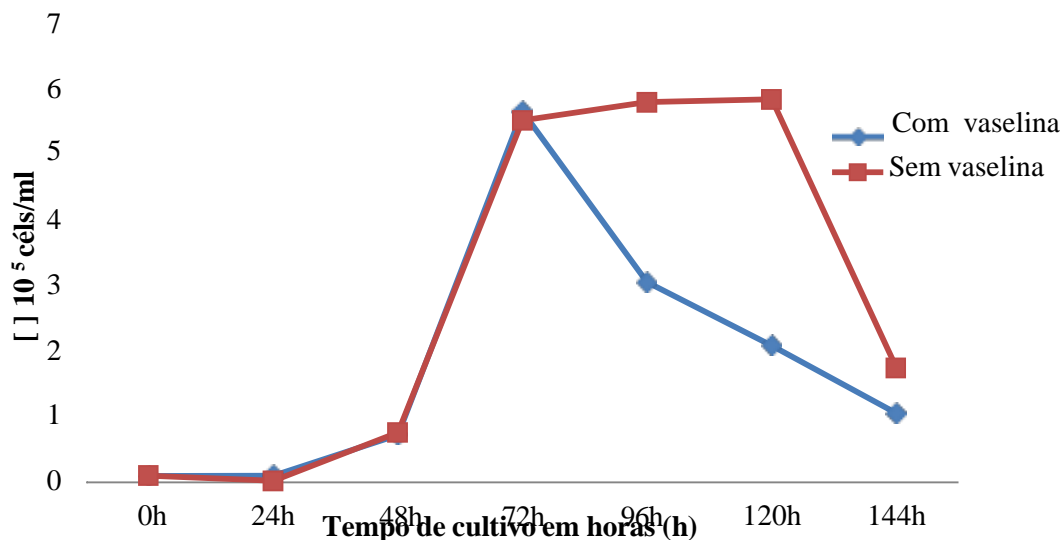


Figura 17. Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de ovino, a cada 24 horas. Cultivadas nos meios de cultivo Hank's, em anaerobiose e aerobiose.

No meio caldo peptonado (CP), em aerobiose, o padrão de crescimento nas primeiras 72 horas de cultivo dos isolados de caprinos, foi semelhante aos demais, com concentração de células por ml de $5,59 \times 10^5$. Após a fase de crescimento (48 horas), houve uma redução acentuada na concentração de células até 72 horas, em seguida a fase de declínio continuou, sendo que desta vez de forma lenta e gradual, até a redução total do número de células viáveis, após as 144 horas de cultivo (Figura 18).

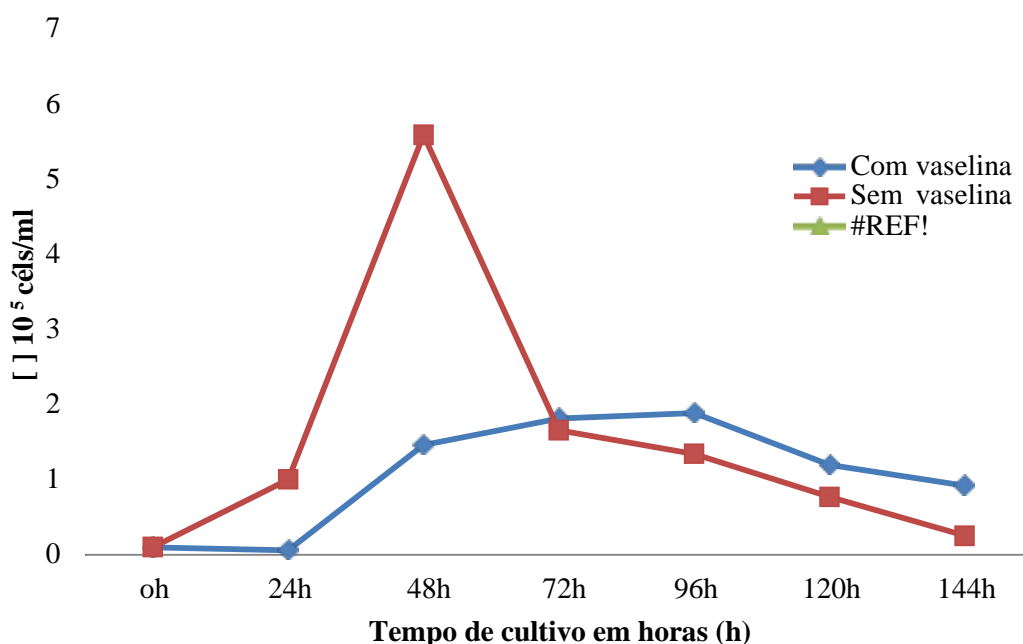


Figura 18. Concentração celular de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos, a cada 24 horas. Cultivadas em meio de cultivo caldo peptonado (CP), em anaerobiose, e aerobiose.

Em anaerobiose, o padrão de crescimento dos isolados de caprino em meio CP foi diferenciado, após as 24 horas de adaptação, houve um crescimento rápido nas primeiras 48 horas, de $0,06 \times 10^5$ para $1,4 \times 10^5$, seguido por uma fase de crescimento lento com uma certa estabilização na concentração de células ($1,8 \times 10^5$), até as próximas 96 horas, onde se iniciou uma queda gradual até a redução total do número de células viáveis, após as 144 horas de cultivo.

Quando os isolados de ovinos foram inoculados nesse mesmo meio, não houve diferença significativa no perfil de crescimento das cepas quando se comparou o cultivo em aerobiose com anaerobiose, nas primeiras 120 horas (Figura 19). No entanto, em aerobiose, após as 120 horas houve redução significativa da concentração de células, de $1,2 \times 10^5$ para $0,2 \times 10^5$ céls/ml, e depois das 144 horas não havia mais células viáveis. Em anaerobiose, após as 120 horas houve uma fase de estabilização com concentração de células em torno de $1,0 \times 10^5$ céls/ml que se manteve por mais 72 horas, ou seja, as cepas se mantiveram viáveis por pelo menos 192 horas de cultivo.

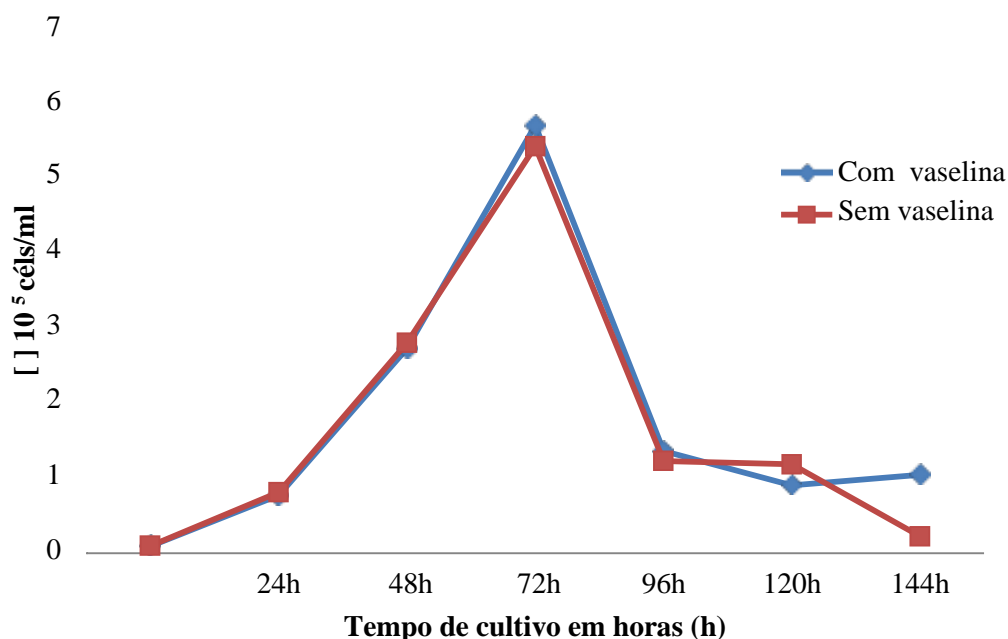


Figura 19. Concentração celular de parabasalídeos isolados das fezes de ovinos, a cada 24 horas. Cultivados no meio de caldo peptonado (CP), em anaerobiose e aerobiose.

No meio CH o padrão de crescimento dos isolados de caprinos foi semelhante, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose (Figura 20). No entanto, em aerobiose houve maior concentração de células por ml ($4,08 \times 10^5$) do que quando em anaerobiose ($1,91 \times 10^5$).

Após a fase de declínio, houve uma fase de estabilização, com concentração de células por ml constante e semelhante tanto na presença quanto na ausência de vaselina, até a redução total do número de células viáveis, após as 144 horas de cultivo.

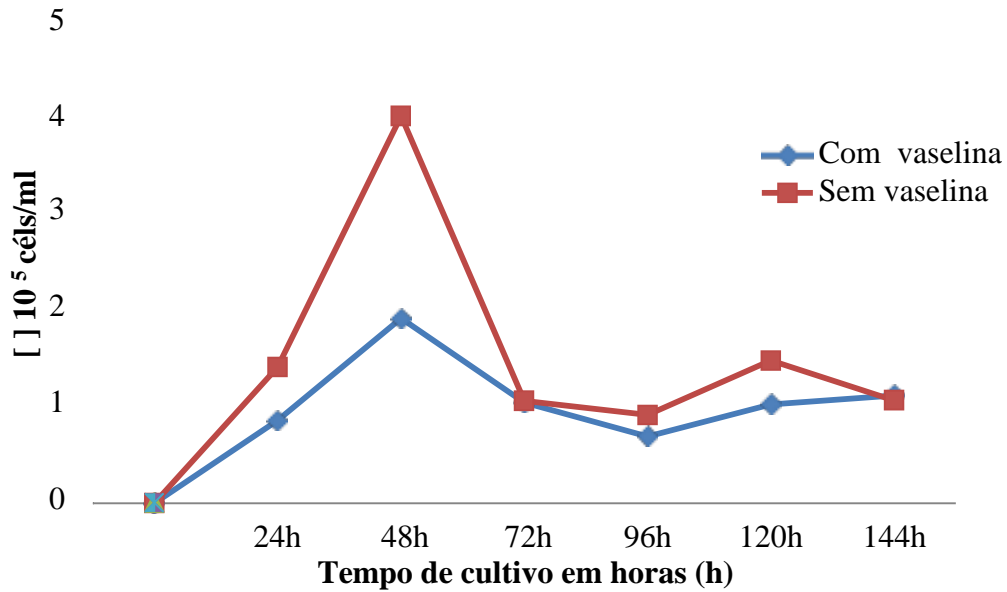


Figura 20. Concentração celular de parabasalídeos isolados das fezes de caprinos, a cada 24 horas. Cultivados nos meios de cultivo CH, em anaerobiose e aerobiose.

Os parabasalídeos isolados de ovinos também apresentaram um padrão semelhante, quando comparado à presença e ausência de vaselina (Figura 21). No entanto, as células se adaptaram mais ao meio quando cultivadas em anaerobiose do que em aerobiose. Pois em anaerobiose os isolados de ovinos apresentaram maior concentração de células por ml ($6,9 \times 10^5$) e após 120 horas iniciou uma fase de estabilização, que se manteve por mais de 144 horas, com uma concentração média de $2,3 \times 10^5$ céls/ml. Posteriormente, a concentração reduziu até zerar, com 192 horas de cultivo. Em aerobiose, após atingir a concentração máxima de células por ml ($4,7 \times 10^5$), iniciou-se a fase de declínio (72h), que foi gradual e progressiva, e zerou totalmente a concentração, após as 144 horas de cultivo.

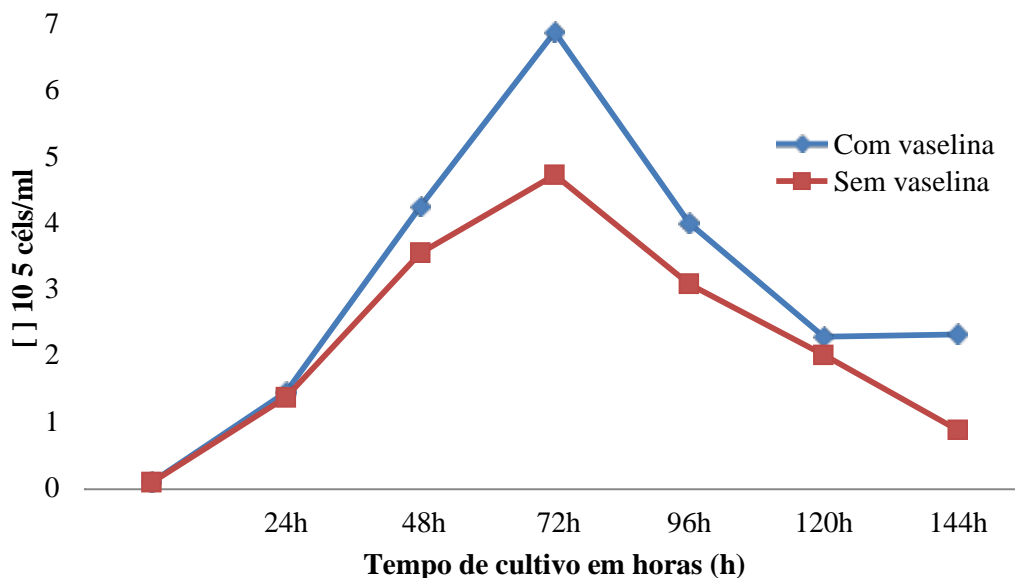


Figura 21. Concentração celular de parabasalídeos isolados das fezes de ovinos a cada 24 horas. Cultivadas nos meios de cultivo CH, em anaerobiose e aerobiose.

Em todos os meios testados, houve menor contaminação bacteriana e fúngica quando o cultivo era realizado em presença de vaselina líquida (anaerobiose), tanto para os isolados de caprinos, quanto para os de ovinos e suínos. Além disso, o tempo de vida da cultura foi maior. E por isso a vaselina foi utilizada durante os repiques para manutenção das culturas.

As bactérias presentes no meio podem aumentar a disponibilidade de alimentos para o protozoário, tanto por fornecer metabólitos, como por serem fontes diretas de obtenção de alimentos. Essa interação benéfica já foi comprovada com outras espécies de parabasalídeos (BENCHIMOL & DE SOUZA, 1995; DE CARLI, et al., 2004; OVCINNIKOV et al., 1975; STREET et al., 1984). Uma especulação é que o excesso de bactérias em condições aeróbicas disponibilize mais nutrientes para o protozoário fazendo com que as cepas se desenvolvam mais a curto prazo; mas a longo prazo, o aumento do número de microorganismo no meio, aumenta a competição por nutrientes, e a cultura não consegue manter-se viável por mais tempo. Quando em anaerobiose, a contaminação por bactérias é menor e, portanto, há certo equilíbrio no meio, e conseqüentemente maior tempo de vida em cultivo.

A partir dos resultados obtidos de maior concentração de células viáveis por mL, tanto em caprinos quanto em ovinos, e com a finalidade de facilitar o manejo das cepas em cultivo (padronizar os repiques), o meio de cultivo CHD foi selecionado para ser utilizado tanto para manutenção dos isolados durante todo o tempo de realização da pesquisa, como também para a elaboração dos demais estudos de morfologia, biologia molecular, axenização, além da realização do estudo mais detalhado de cinética de crescimento dos isolados, apresentado na Parte 4 deste estudo.

Apesar dos isolados de ovinos apresentarem maior concentração celular em todos os meios testados, em relação às de caprinos, não havia uma fase de estabilização duradoura após a fase de declínio. Portanto, após 144 horas de cultivo a maioria das culturas de ovinos não resistiam em um mesmo meio se não houvesse um novo repique. Este fato colaborou para que alguns isolados se perdessem ao longo da pesquisa. Enquanto os isolados de caprinos permaneciam em fase de estabilização por mais tempo, em meio CHD, por exemplo, com 2000 horas de cultivo ainda havia células viáveis.

3.2.2.3 Axenização

Com o objetivo de tentar eliminar as bactérias presentes no meio (axenização) além de dos antibióticos utilizados rotineiramente, anfotericina (2 mg/L) e gentamicina (400 mg/L), os antibióticos meropenem (6 mg/L), estreptomicina (200 mg/L) e penicilina (200 000 UI/L), foram acrescentados ao meio de cultivo CHD. Este meio com maior concentração de antibióticos foi utilizado para o repique dos isolados de caprinos, ovinos e suínos.

Quando os isolados de ovinos foram introduzidos no meio de cultivo com maior concentração de antibióticos, apenas um tolerou a introdução dos antibióticos. Este conseguiu se multiplicar, por dois repiques. No entanto, as células ficaram aumentadas de tamanho, e após a coloração foi possível observar células completamente diferenciadas das células originais, antes da introdução dos antibióticos (Figura 31), e estas começaram a morrer à medida que o meio foi ficando sem bactéria.

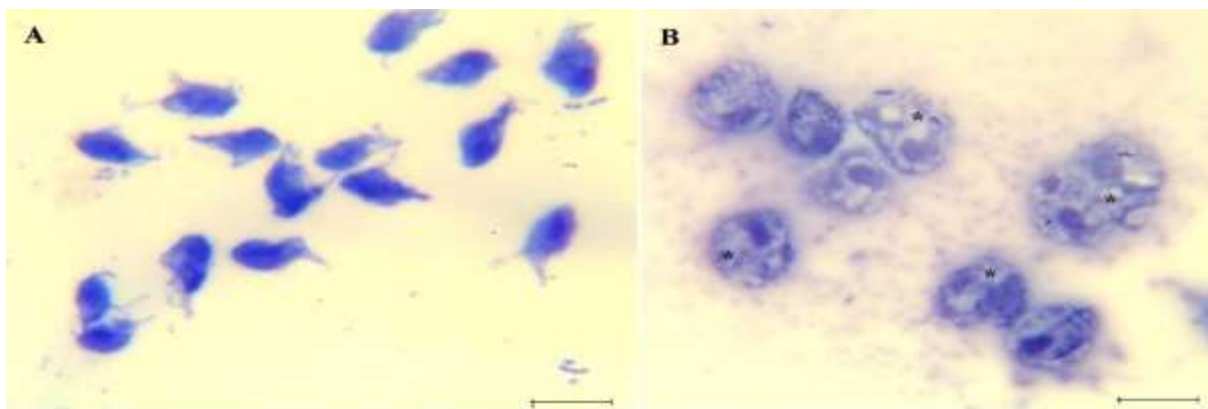


Figura 22. Trofozoítas isolados de fezes de ovinos, cultivados em meio CHD, antes do processo de axenização, com células piriformes (A) e durante axenização, com células maiores, multinucleadas (*), completa diferenciação (B). (Barra= 10µm). Panótico rápido®.

Assim como nos isolados de ovinos, apenas um dentre os três isolados de caprinos tolerou a introdução dos antibióticos, e permitiu a “axenização” dos meios após dois repiques (a cada 24 horas cada). Após a completa limpeza do meio, 48 horas em presença desses antibióticos, a cultura encontrava-se aparentemente sem bactérias, límpida/translúcida. Sob microscopia óptica, não havia presença de colônias bacterianas, e a concentração de protozoários era alta (mais de 100 células por campo). Os flagelados apresentavam-se maiores (mais de 11 µm de comprimento) que os observados no meio com os antibióticos de rotina (anfotericina e gentamicina) e arredondados, assim como os isolados de ovinos (Figura 22). Após as 48 horas de cultivo, houve um declínio na concentração celular, e os isolados não suportaram permanecer neste meio por mais de 72 horas.

Na tentativa de manter os isolados viáveis por mais tempo, optou-se por reintroduzi-los, logo após a suposta axenização, no meio de cultura com os antibióticos de rotina. Entretanto, esta medida permitiu que as bactérias voltassem a se multiplicar no meio. Ou seja, introduções desses novos antibióticos no meio teve efeito bacteriostático e não bactericida como era esperado. E os isolados de caprinos conseguiram se restabelecer no cultivo, mas os de ovinos não, certamente porque os danos estruturais celulares foram irreversíveis.

No cultivo dos isolados de suíno, foi evidente a dependência dos protozoários por bactérias. Após a adição dos antibióticos ao meio (axenização), as células começavam a ter dificuldade de se multiplicar e em 24 horas de cultivo não havia mais células viáveis. No entanto, sem a utilização desses antibióticos, as culturas resistiram em um mesmo meio, sem repiques, por cerca de 10 dias quando bactérias estavam presentes.

Ao contrário do relatado por Amin et al. (2010), que obteve sucesso na axenização de cepas de *T. gallinae* e *T. gallinarum*, com a utilização dos antibióticos meropenem, estreptomicina e penicilina, nenhum dos isolados suportaram o processo de axenização por mais de 72 horas. Logo após a introdução dos flagelados nos meios com estes antibióticos, a maioria das cepas foi incapaz de se multiplicar; apenas duas cepas conseguiram, mas por um curto período. Uma de caprino, que se multiplicou nas primeiras 48 horas, no entanto, houve formação de pseudocistos (forma de resistência), seguida de morte celular, se estas não fossem reintroduzidas em um novo meio sem estes antibióticos. E outra cepa de ovino ficou ainda menos tempo em cultivo, e houve alterações significativas na morfologia original das

células, e foram incapazes de se restabelecer, mesmo quando reintroduzidas em meios sem estes antibióticos.

Possivelmente, a simbiose entre este protozoário e as bactérias é fundamental para a sobrevivência do flagelado *in vitro*. Ou porque há *déficit* de algum nutriente nos meios testados, que seriam disponibilizados pelas bactérias, ou simplesmente porque necessitam de fagocitar as bactérias do meio, como ocorre com *Tetratrichomonas didelphidis*, flagelado isolado de fezes de gambá. Em um estudo feito com sua cinética de crescimento, foi demonstrado que as cepas de *T. didelphidis* apresentaram um tempo maior de crescimento e maior número de trofozoítos quando inoculados com *E. coli* do que quando cultivadas sozinhas (culturas axênicas). E concluiu-se que cultura *in vitro* de *T. didelphidis* depende da *E. coli* como parceira promotora de crescimento, e este requer cultivo monoxênico (TASCA & DECARLI, 2001). Neste mesmo estudo, ficou comprovado que não adianta ter os metabólitos produzidos pela *E. coli*, tão pouco a presença de *E. coli* inativada. Para que haja sucesso no cultivo de *T. didelphidis* é necessária a presença destas bacteriais viáveis. E estas são ativamente fagocitadas pelos flagelados.

3.2.2.4 Análises Morfológicas dos Isolados de Pequenos Ruminantes e Suínos

Os parabasalídeos em culturas axênicas foram visíveis na microscopia óptica em preparações não coradas, durante o cultivo, e coradas durante a realização das curvas de crescimento na *câmara de Neubauer*, em preparações úmidas (corante vital, eosina), bem como através de fixação em lâmina, e coloração com panótico rápido®. Durante o cultivo, só foi possível observar formato de célula e locomoção, já que estas se movimentam intensamente, o que dificulta a visualização de flagelos e membrana ondulante. As preparações úmidas com eosina reduziram a motilidade celular, e permitiram somente a visualização de características externas (corante não penetra nas células vivas), como membrana ondulante, flagelos e formato das células. As preparações de esfregaço, com posterior fixação e coloração em panótico rápido®, foi o melhor método de identificação morfológica.

Nos estudos morfológicos realizados nas amostras oriundas de pequenos ruminantes e suínos, foi possível visualizar organismos de tamanhos variados em uma mesma cultura (Figura 23), possivelmente por estarem em fases distintas do seu metabolismo.

A maioria das células apresentou um único núcleo localizado em sua porção anterior (Figura 23), no entanto, com frequência foram observadas células em mitose, com dois núcleos (Figura 24). Nos isolados de ovinos e caprinos, além do processo de divisão binária, foi observado, em menor frequência, células em divisão múltipla, com mais de dois núcleos (Figura 25). Esse tipo de divisão não foi observado em isolados de suínos.

Vacúolos foram vistos por todo o citoplasma, principalmente quando havia muita contaminação bacteriana no meio de cultivo. E bactérias frequentemente foram visualizadas aderidas à superfície das células, e dentro desses vacúolos, vesículas endocíticas (Figura 26). Reforçando o sugerido por alguns autores, de que esses flagelados fagocitam bactérias e que estas são importantes para a adaptação desses aos meios de cultivo (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1995; TASCA; DECARLI, 2001; ZERPA LARRAURI et al., 2016).

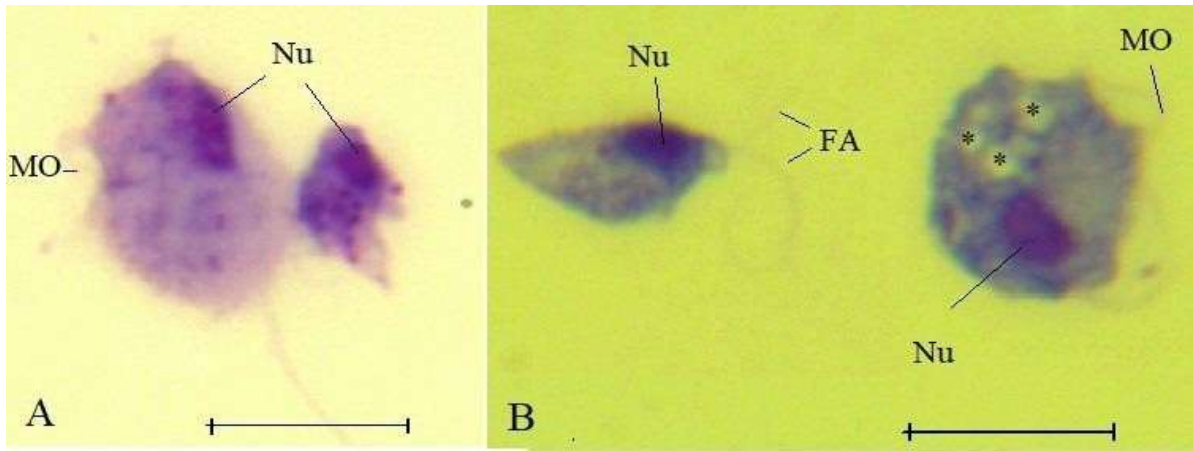


Figura 23. Trofozoítos de parabasalídeos de ovinos de tamanhos distintos, com a presença de vacuolizações no citoplasma (*). Núcleo (Nu); flagelos anteriores (FA) e membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido®.

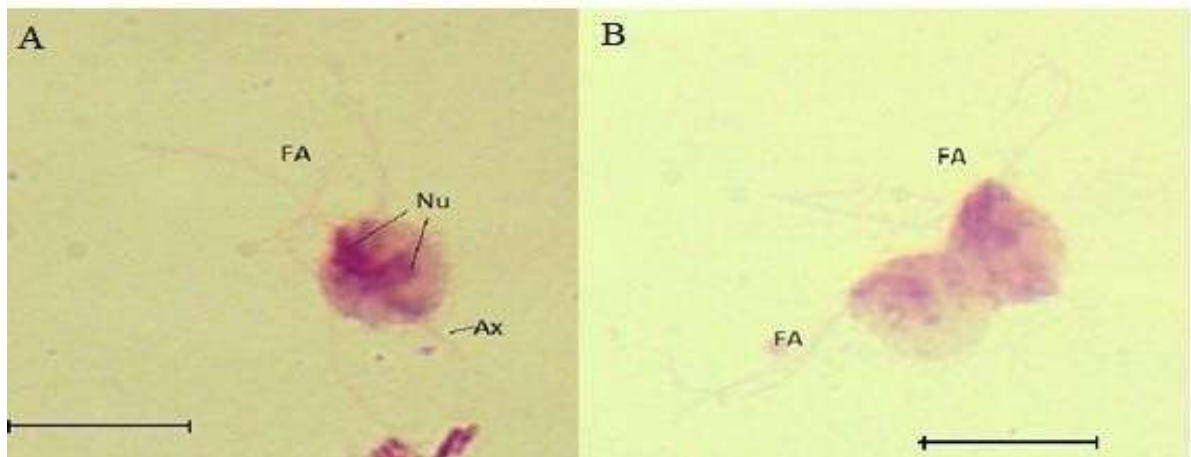


Figura 24. Trofozoítos de parabasalídeos de caprino no início do processo de divisão binária, apresentando dois núcleos no início divisão (A) e no final do processo de divisão (B). Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax). Panótico rápido®. (Barra= 10µm).

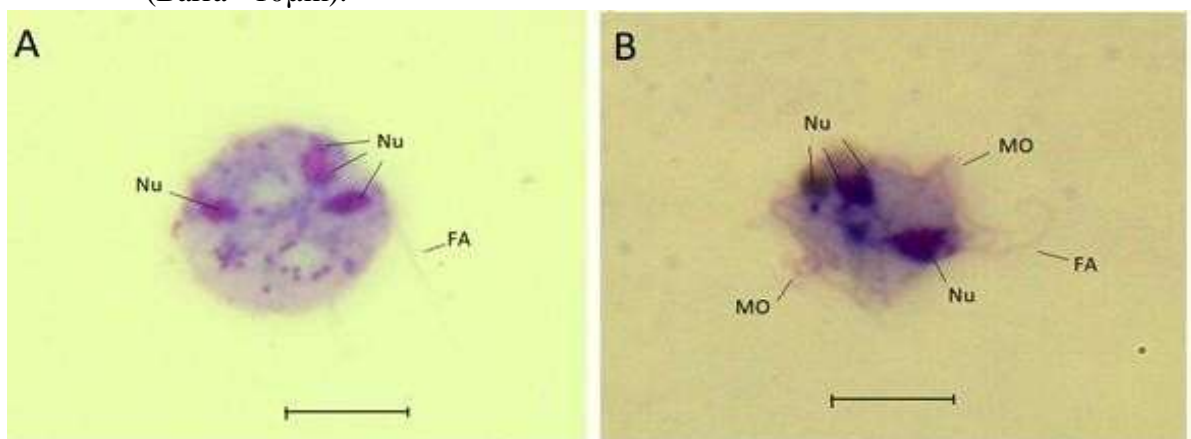


Figura 25. Trofozoítos de parabasalídeos de ovino em processo de divisão múltipla apresentando quatro núcleos. Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA) e membrana ondulante (MO). Panótico rápido® (Barra= 10µm).

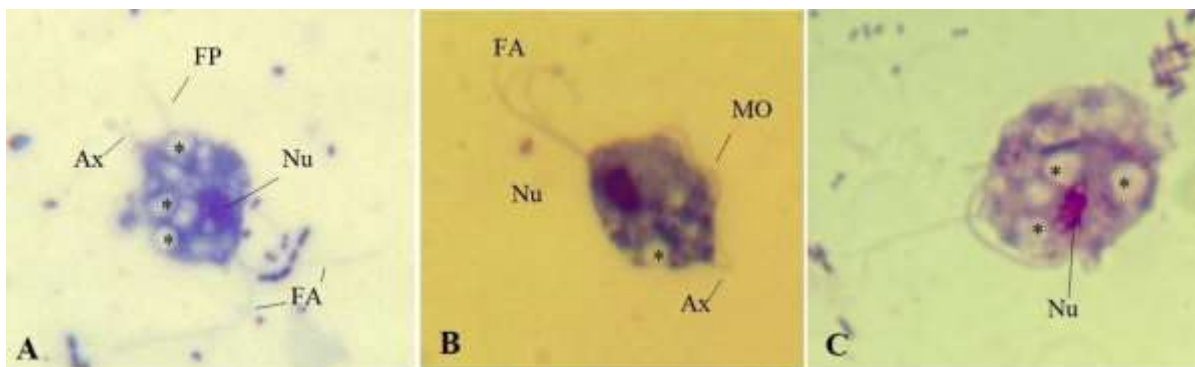


Figura 26. Trofozoítos de parabasalídeos de caprino (A), ovino (B) e suíno (C) com a presença de vacuolizações no citoplasma (*). Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax), flagelos posteriores e membrana ondulante (MO). Panótico rápido® (Barra= 10µm).

Os protozoários apresentaram formato que variava de arredondado a piriforme, com a presença de membrana ondulante percorrendo todo o corpo da célula e terminando como uma porção livre, flagelo posterior. O corpo parabasal foi visualizado acima do núcleo. O axóstilo apresentou-se percorrendo o corpo celular, se atenuando gradualmente até o seu término, visto como uma projeção para fora do citoplasma. Nem sempre foi possível distinguí-lo do flagelo posterior. O pelta apresentou-se pequeno e pouco discernível, na região de emergência dos flagelos. A costa se entendeu por todo o corpo, seguindo o comprimento da membrana ondulante (Figura 27).

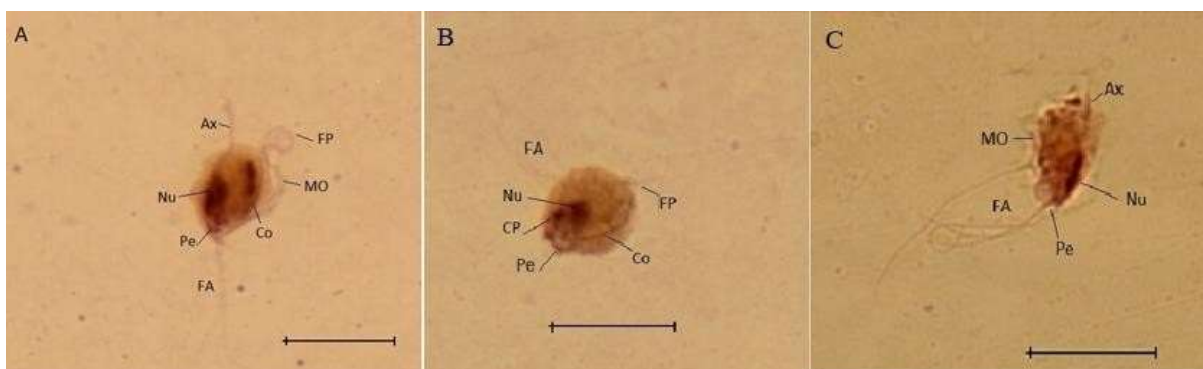


Figura 27. Trofozoítos de parabasalídeos de caprinos. Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA); axóstilo (Ax), costa (Co), pelta (Pe), corpo parabasal (CP), flagelo posterior (FP); e membrana ondulante (MO). Panótico rápido® (Barra= 10µm).

O método de coloração priorizado por esse estudo, panótico rápido®, para a identificação morfológica por microscopia óptica, permitiu a visualização de estruturas importantes para a identificação do protozoário, como o número de flagelos, o número de ondas da membrana ondulante e o formato do axóstilo. No entanto, as características dessas estruturas variavam de uma amostra para outra, e dentro de uma mesma amostra, sobretudo nas amostras de suínos. Um exemplo disso foi que uma das culturas apresentou protozoários arredondados com apenas dois flagelos anteriores incontestáveis, membrana ondulante aderida ao corpo, sem porção livre (Figura 28 A e B), além de protozoários piriformes com membrana ondulante destacada do corpo, com ondulações bem evidentes, porção final livre e flagelo posterior (Figura 28 C e D). Nos isolados de ovinos e caprinos, houve menor discrepância morfológica entre as amostras, no entanto, optou-se por fazer um estudo

morfológico mais detalhado, morfometria (Parte 4), somente após confirmação molecular de que as amostras isoladas dessas espécies animais não eram oriundas de infecções mistas, a fim de se evitar mensurações equivocadas que podem ocorrer quando há espécies ou mesmo gêneros distintos em uma mesma amostra.

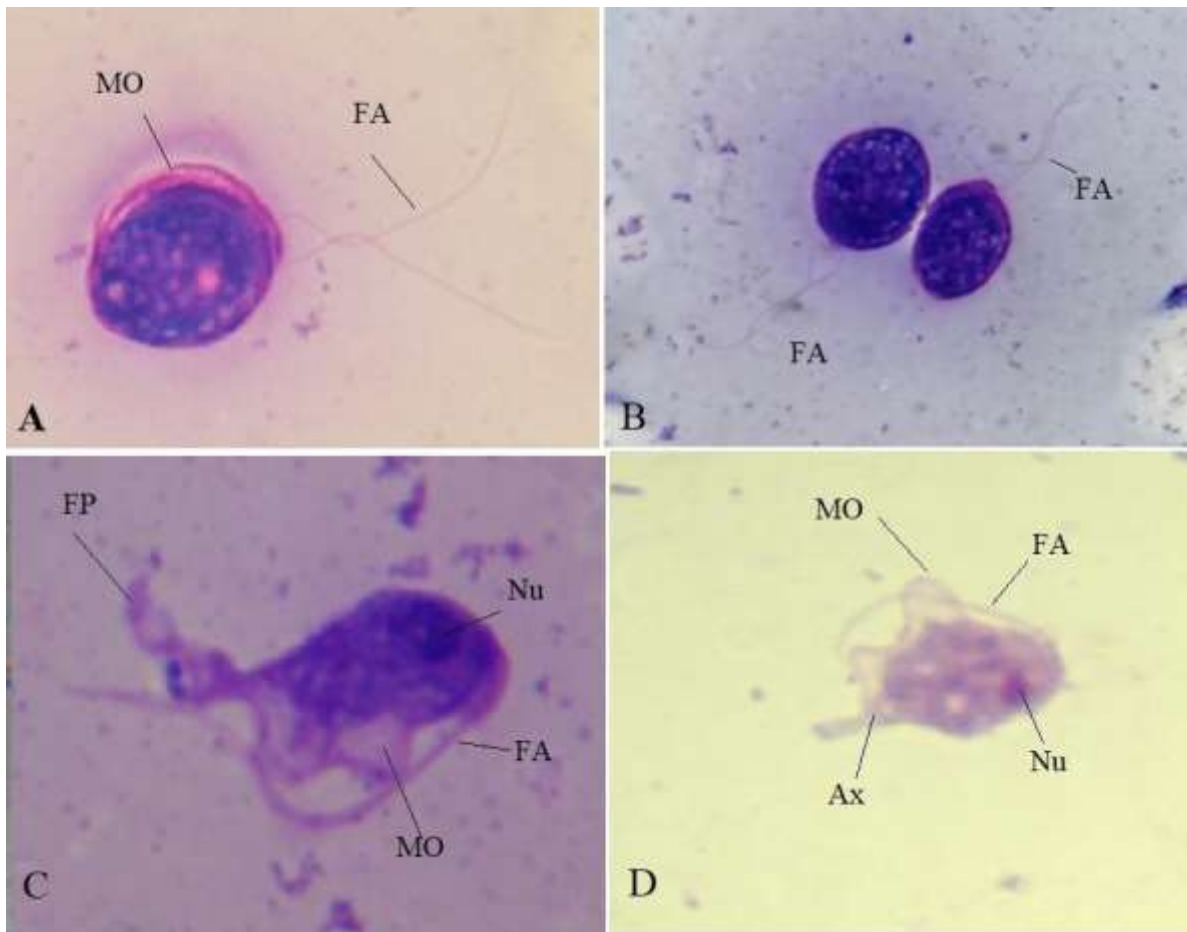


Figura 28. Diferença morfológica entre os parabasalídeos isolados de suíno de uma mesma amostra fecal de um leitão com diarreia. A-B. Flagelados arredondados com dois flagelos anteriores (FA), membrana ondulante (MO) aderida ao corpo. C-D. Flagelados piriformes com membrana ondulantes destacadas do corpo, núcleo (Nu), axóstilo (Ax) e flagelo posterior (FP). Panótico rápido®, obj.100X.

Esta amostra de suíno, exemplificada acima, foi isolada do conteúdo fecal (diarréico) de um leitão. O que pode ter favorecido a co-infecção devido às condições imunológicas no animal, ou mesmo, esta co-infecção pode ter intensificado a sintomatologia, como é proposto por alguns autores (GOOKIN et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2015). Portanto, as comparações morfológicas feitas até o momento levantaram a possibilidade de haver a presença de diferentes espécies num mesmo cultivo, culturas mistas, o que impossibilitou a realização de estudos morfométricos e de cinética de comportamento dos isolados de suínos.

Contudo, existe a possibilidade de haver culturas mistas, e de possíveis variações morfológicas dentro de uma mesma espécie, bem como de semelhanças morfológicas entre as diferentes espécies (CEPICKA et al., 2006; RIVERA et al., 2008). Em face da falta de estudos morfológicos desses protozoários, visto que a análise morfológica sozinha não seria suficiente

para a identificação de gênero e espécie, estudos mais aprofundados das análises genotípicas são necessários.

3.2.2.5 Análises Moleculares dos Isolados de Pequenos Ruminantes

O DNA foi extraído de 19 amostras em culturas; 16 isolados de ovinos e 3 isolados de caprinos, e posteriormente estas foram submetidas a PCR. Dezesesseis amostras produziram a amplificação das regiões ITS 1 e 2, do gene ribossomal 5,8S específicos para identificação das famílias Trichomonadidae e Tritrichomonadidae, com o produto da amplificação apresentando cerca de 379 pb usando os *primers* TFR1 e TFR2. E apenas um isolado de ovino e dois de caprinos (Figura 29A, colunas 15,17 e 19 respectivamente) não amplificaram, devido à grande contaminação das amostras em questão (inibição da reação); estas amostras foram novamente analisadas após várias diluições, o que permitiu que estas também fossem amplificadas com sucesso. Ou seja, todas as cepas de parabasalídeos isoladas de caprinos e ovinos que foram analisadas até o presente momento são pertencentes a uma dessas duas famílias.



Figura 29. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Amostras de ovinos (colunas 1-16), amostras de caprinos (colunas 17-19, controles positivos de reação (colunas 20-22), correspondente a aproximadamente 379pb, controle negativo do ambiente (colunas 23 e 24) e marcador de peso molecular (coluna 25).

Quando foram utilizados os *primers* espécie-específico para *T. foetus*, TFR3 e TFR4, não foram observados produtos de amplificação em nenhuma das amostras em questão (Figura 30). O mesmo ocorreu quando utilizados os *primers* espécie-específico para *P. hominis*.

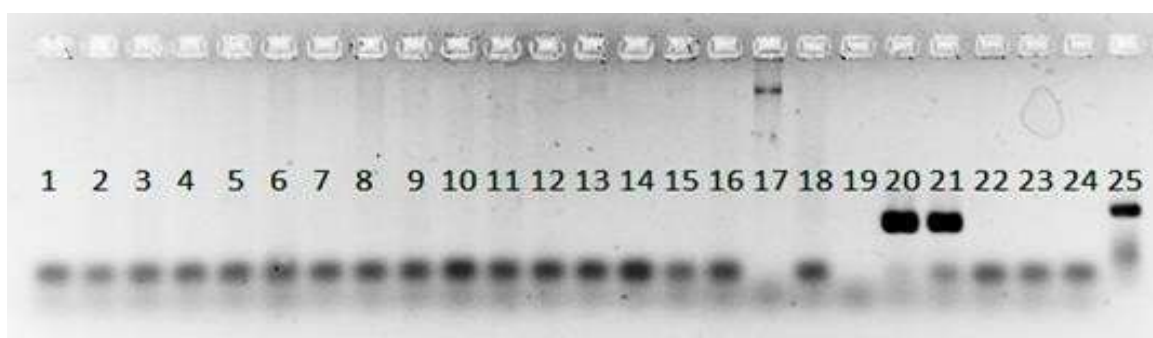


Figura 30. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR3 e TFR4. Amostras de ovinos (colunas 1-16), amostras de caprinos (colunas 17-19), controle positivo de reação (colunas 20 e 21), correspondente a aproximadamente 372 pb, controle negativo (coluna ?).

Inicialmente, cinco isolados de ovinos e três isolados de caprinos foram submetidas ao sequenciamento. Todos estes tiveram seqüências de nucleotídeos semelhantes entre si, com

100% de similaridade com a cepa de *Tetratrichomonas* sp depositada no GeneBank, de amostras isoladas de prepúcio de touro (COBO et al. 2003). Após o sequenciamento foi feito um levantamento das enzimas de restrição capazes de cortar o gene em questão. Então, a enzima Alu I foi selecionada, devido ao seu padrão de corte. Todas as amostras em cultura, no momento em questão, foram submetidas a PCR-RFLP (Figura 31), sendo 12 de ovinos, três de caprinos e três de suínos. Uma das amostras de suínos (Figura 31, coluna 13) e todas as amostras de ovinos e caprinos apresentaram o mesmo padrão de corte, o que por si só confirma que todas estas amostras são *Tetratrichomonas* sp. No entanto, a cepa K (*Tritrichomonas foetus*) utilizada como controle negativo, apresentou perfil de corte diferenciado (Figura 31, coluna 20) e duas das amostras de suínos testadas não foram cortadas por esta enzima, (Figura 31, colunas 14 e 15), indicando que estas cepas não correspondem a *Tetratrichomonas* sp nem a *Tritrichomonas foetus*.

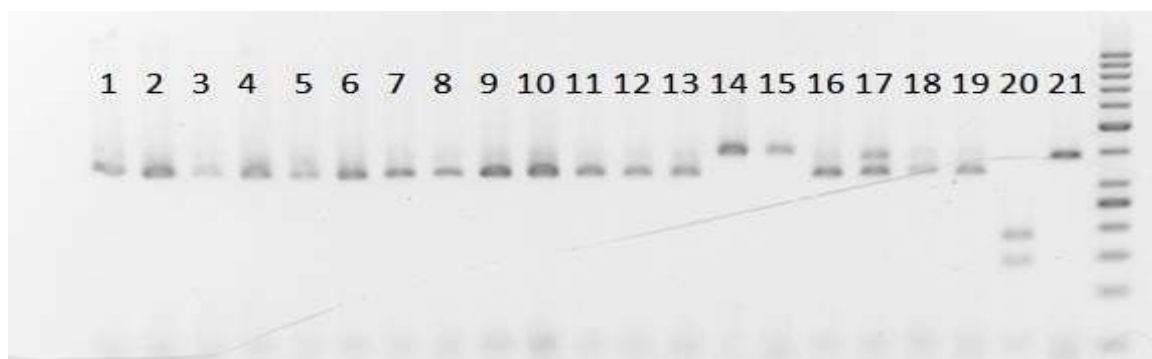


Figura 31. Electroforese em gel de agarose (2%) das amostras amplificadas com iniciadores TFR1 e TFR2 e submetidas a digestão com enzima de restrição Alu I. Amostras de ovino (colunas 1-12), amostras de suínos (13-15), amostras de caprino (colunas 16-18), controle positivo de padrão de corte (coluna 19), controle negativo de corte, cepa K (coluna 20) e marcador de peso molecular (coluna 21).

O gênero *Tetratrichomonas* é o maior entre os gêneros de parabasalídeos descritos, com 16 linhagens identificadas (CEPICKA et al., 2006). No entanto, há muita diversidade neste gênero e algumas caracterizações são questionáveis (DUFERNEZ et al., 2007; RIVERA et al., 2008; WALKER et al., 2003). Além disso, há diversas similaridades morfológicas entre as espécies (HIBLER et al., 1960; CASTELLA et al., 1997; COBO et al., 2003; WALKER et al., 2003; CEPICKA et al., 2005; DUFERNEZ et al., 2007) o que dificulta a correta identificação morfológica de novos isolados e torna as análises moleculares uma ferramenta imprescindível. No entanto, o uso de um único gene como forma de identificar e/ou caracterizar uma espécie é discutível e precisa ser revisto, sendo possível que haja sinônimos entre algumas das espécies descritas (RIVERA et al., 2008).

Cepas com sequências semelhantes a estas já foram isoladas de diferentes hospedeiros (IBAÑEZ-ESCRIBANO et al., 2013). E algumas já foram atribuídas a distúrbios clínicos, inclusive em humanos (ARASE et al., 2014). Estes resultados indicam que algumas espécies de *Tetratrichomonas* poderiam ter uma ampla gama de hospedeiros, sendo possível sobreviver em condições adversas, devido à sua alta capacidade adaptativa.

Ainda não foi possível correlacionar a presença desses flagelados a distúrbios gastrointestinais em pequenos ruminantes. Na ausência de quaisquer patologias intestinais, estes protozoários podem pertencer à microbiota intestinal comensal desses animais, interagindo ativamente com bactérias do meio, fagocitando-as, como foi observado no cultivo

in vitro. Portanto, sua capacidade de regular o crescimento de procarióticos deve ser considerado. E esta interação pode trazer benefício para o hospedeiro. Contudo, não se pode subestimar a importância de associações polimicrobianas, e a relação parasita-hospedeiro precisam ser abordadas como um todo (BÄR et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2017). Estudos mais detalhados precisam ser realizados para comprovar esta hipótese.

3.2.2.6 Análises Moleculares dos Isolados de Suínos

Dos 35 isolados submetidas à PCR, 30 produziram a amplificação das regiões ITS 1 e 2, do gene ribossomal 5,8S, específicos para identificação das famílias Trichomonadidae e Tritrichomonadidae, com o produto da amplificação apresentando cerca de 379 pb usando os *primers* TFR1 e TFR2 (Figuras 32 e 33). Ou seja, 30 das 35 cepas de parabasalídeos analisadas até o presente momento são pertencentes a uma dessas duas famílias.

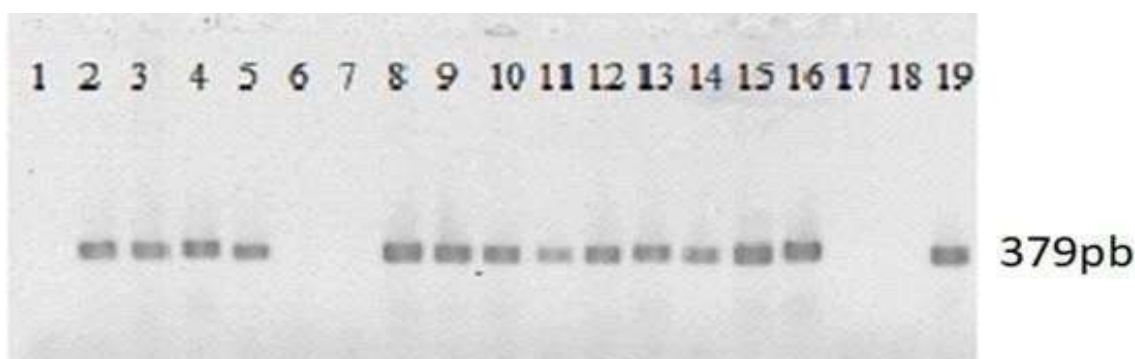


Figura 32. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo do mix (coluna 1), amostras de suínos TP1-TP15 (colunas 2-16), controle negativo da extração (coluna 17), controle negativo do ambiente (coluna 18), controle positivo de reação (coluna 19) correspondente a aproximadamente 379pb.

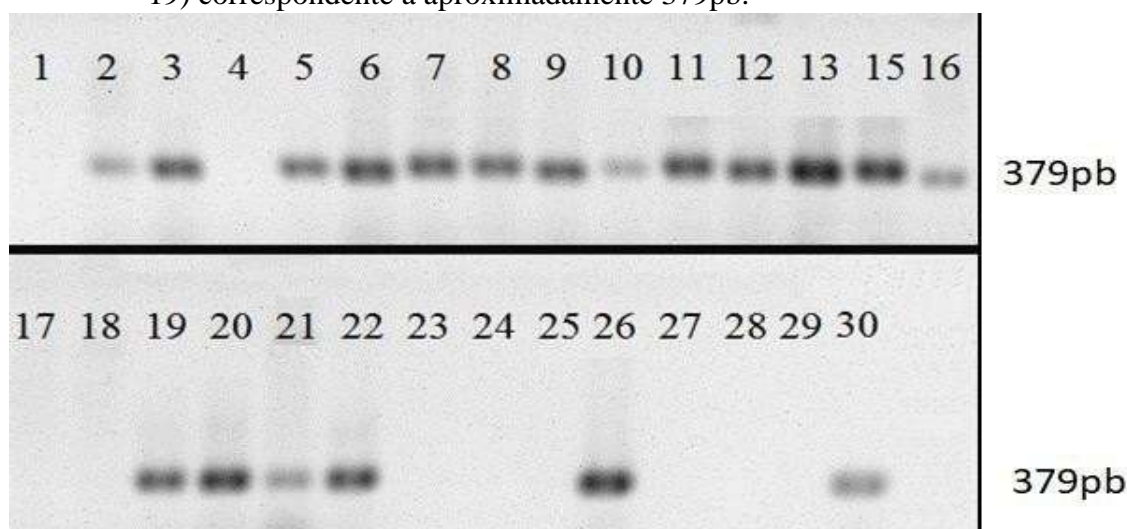


Figura 33. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo do mix (coluna 1), amostras de suínos TP16-TP35 (coluna 2-22), vazio (colunas 23, 27, 28 e 29), controle negativo da extração (linha 24), controle negativo do ambiente (coluna 25), e controles positivos (colunas 26 e 30) correspondente a aproximadamente 379pb.

Quando foram utilizados os *primers* espécie-específico para *T. foetus*, TFR3 e TFR4, não foram observados produtos de amplificação em nenhuma das amostras em questão,

apenas o controle positivo amplificou. Quando utilizados os *primers* espécie-específico para *P. hominis*, cinco amostras apresentaram amplificação (Figura 34).

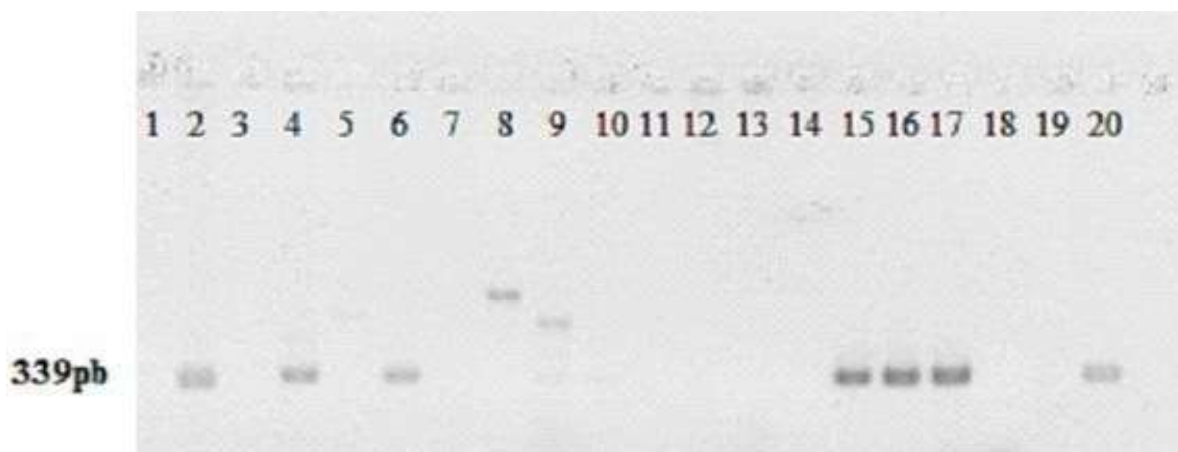


Figura 34. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores Th3 e Th5. Controle negativo do mix (coluna 1), amostras de suínos TP1- TP15 (colunas 2-16), controle negativo de extração (colunas 18 e 19) e controles positivos (colunas 17 e 20) correspondente a aproximadamente 339pb.

O objetivo foi avaliar se as cinco amostras isoladas de suínos tratavam-se realmente de cepas de *P. hominis*. Estas então foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição *HaeIII*, que é capaz de cortar o fragmento de DNA gerando duas bandas no gel, com tamanhos aproximados de 251 bp e 99 bp, e a enzima *Hinf I*, com a geração de três bandas de 163bp, 133bp e 62 bp. No entanto, apenas uma amostra foi cortada pelas enzimas de restrição (Figura 35, coluna 2), produzindo os fragmentos de DNA esperado. Semelhante ao controle positivo, as outras 4 amostras não foram cortadas pela enzima *Hae III*, contudo foram cortadas pela enzima *Hinf I* apresentando um perfil de corte completamente diferente do esperado. Além disso, a única amostra que foi cortada pelas duas enzimas, produzindo os fragmentos esperados (Figura 35, coluna 2), ainda apresentou uma outra banda, semelhante às demais, quando cortadas por *Hinf I*, certamente por se tratar de uma amostra mista, ou seja, além de *P. hominis*, há uma outra espécie de parabasalídeos.

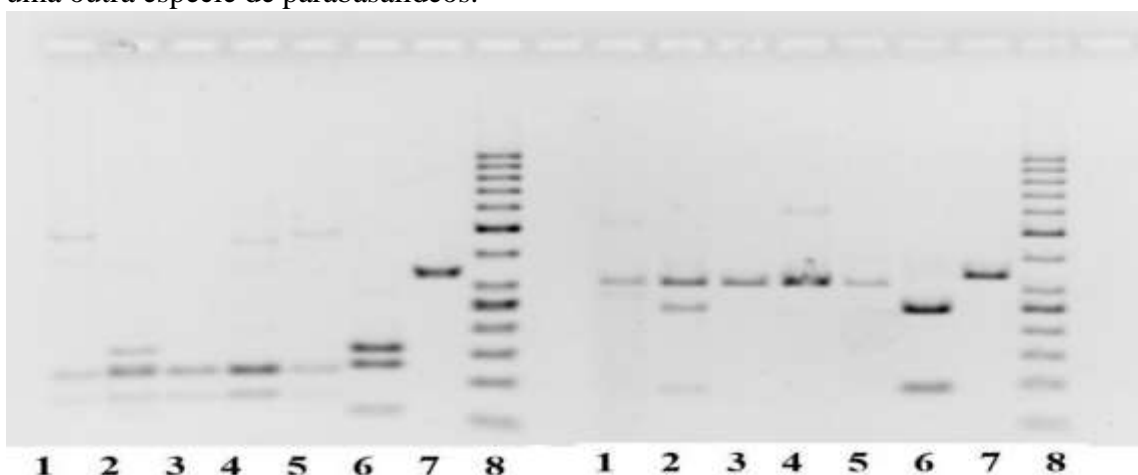


Figura 35. Electroforese em gel de agarose (3%) das amostras amplificadas com os iniciadores TH3 e 5 e submetidas à digestão com a enzima de restrição *Hinf I* (à esquerda) e *Hae III* (à direita). Amostras de controle positivo (coluna 6), controle negativo (coluna 7) e marcador de peso molecular (coluna 8).

Estes dados geram algumas controvérsias, visto que o *primer* usado é espécie- específico e não deveria replicar o DNA de outras espécies de parabasalídeos. Diante disto, essas amostras foram sequenciadas, e todas apresentaram sequências semelhantes entre si, e não se assemelham a nenhuma das sequências depositada no Genbank até o presente momento. Contudo, há necessidade de se empregar novas técnicas moleculares com o intuito de confirmar este resultado.

Se confirmados estes dados, este será o primeiro relato da ocorrência de *P. hominis* em leitões com histórico de diarreia no Brasil, e o segundo no mundo. O primeiro caso foi descrito na China (Li, W-C et al. 2014), quando foi isolado *P. hominis* do conteúdo do ceco, de um único leitão apático com menos de quatro semanas de idade, que teve episódios de diarreia aquosa antes de morrer. Esses pesquisadores experimentalmente reproduziram a infecção em outros leitões, e estes desenvolveram a patologia; um deles morreu logo após o início do quadro de diarreia. *Pentatrichomonas hominis* também tem sido relatado em associação com diarreia e distúrbios digestivos em humanos e em outros mamíferos, incluindo os cães e gatos. Portanto a capacidade da espécie de causar perturbação gastrointestinal nesses hospedeiros é indicada por muitos autores (LEVY et al. 2003; WANG et al. 2006; GOOKIN et al. 2007; COMPAORE et al. 2013; Li, W-C et al. 2014; DOS SANTOS et al. 2015b).

Todas as outras 25 cepas foram sequenciadas, no entanto quatro cepas apresentaram baixa qualidade nos resultados obtidos, certamente por serem culturas mistas, estas precisam serem purificadas para que possam serem reanalisadas com sucesso. Os resultados das 21 amostras sequenciadas encontram-se na Tabela 2.

Apenas três cepas apresentaram sequências semelhantes a *Tetratrichomonas buttrei*, espécie já isolada em porcos domésticos (CEPICKA et al., 2006), as demais são relacionadas a outras espécies hospedeiras. Um grande questionamento é como cepas de *Tetratrichomonas* tão semelhantes podem ser isolados de hospedeiros de espécies completamente diferentes, e tão distantes geograficamente. Torna-se evidente a capacidade desses flagelados de se adaptar a condições adversas, o que permite a eles parasitar hospedeiros com temperaturas e funções metabólicas completamente distintas, mamíferos insetívoros, onívoros, herbívoros, além de habitar aves e réptiles (WALKER et al., 2003; CEPICKA et al., 2006; AMIN et al., 2014).

Assim como outros parabasalídeos, *Tetratrichomonas* já foram isolados de humanos, cavidade oral e trato respiratório (KUTISOVA et al., 2005), e foi atribuído a sérios distúrbios respiratórios (MANTINI et al., 2009). De fato, estes flagelados são isolados com frequência do sistema respiratório de humanos causando pneumonias pneumocísticas e síndrome de desconforto respiratório (DUBOUCHER et al., 2005; 2006), além disso, já foi relatado em pelo menos 16 casos de efusão pleural com epiema (LEWIS et al., 2003; WANG et al., 2006; GILROY et al., 2007).

A habilidade desses protozoários de se desenvolver em uma ampla gama de hospedeiros e a baixa especificidade, também já foi observada em outros gêneros de parabasalídeos, como *T. foetus*, o agente causador de tricomoníase bovina, no qual foi isolado no trato respiratório de suíno (SHI et al., 2017) e em diarreia de intestino grosso de gatos (DOS SANTOS et al., 2015). E *P. hominis* tem sido isolado do trato intestinal de várias espécies de mamíferos, além do seu isolamentos em locais atípicos; *P. hominis* foi isolado do pulmão e da articulação de humanos. Essa casuística aumenta a preocupação frente aos riscos desses agentes etiológicos para a saúde humana e animal, sobretudo pelo possível potencial zoonótico (OKAMOTO et al., 1998, DUBOUCHER et al., 2005; 2006; MANTINI et al., 2009; ZALONIS et al., 2011; CHAOQUNYAO, 2012, DIMASUAY & RIVERA 2013;

MARITZ et al., 2014).

Tabela 2. Identificação das espécies de parabasalídeos isoladas de suínos, após sequenciamento, e a comparação com as sequências disponíveis no GenBank.

Nº	Espécie correspondente (Id Blast)	Espécie hospedeira	% Id
11	<i>Tetratrichomonas sp</i> PEKB (AY886829.1)	<i>Tayassu pecari</i> (Porco-do-mato ou Queixada)	100%
1	<i>Tetratrichomonas sp</i> CHERSI (AY886828.1)	<i>Chersina angulata</i> (Jabuti da África do Sul)	100%
	<i>Tetratrichomonas sp</i> 1999-5000 (AF342742.1)	Bovino (Cavidade prepucial)	99,7%
1	<i>Tetratrichomonas sp</i> SLON (AY886838.1)	Loxodonta africana (Elefante-da-savana)	99%
	<i>Tetratrichomonas brumpti</i> (AY886820.1)	<i>Geochelone nigra</i> Tartaruga-gigante-de-galápagos	97%
1	<i>Tetratrichomonas buttrey</i> (AY886835.1)	<i>Sus scrofa f. domestica</i> Porco doméstico	99,9%
2	<i>Tetratrichomonas buttrey</i> (AY886837.1)	<i>Sus scrofa f. domestica</i> Porco doméstico	99,7%
3	<i>Tetratrichomonas buttrey</i> (AY886778.1)	<i>Geochelone carbonária</i> Jabuti pitanga	98%
2	<i>Tetratrichomonas sp</i> PB (AY886804.1)	<i>Phacochoerus aethiopicus</i> Javali africano	99%

*Nº = número de cepas isoladas; % Id = % similaridade

Diante da grande população de suínos no Brasil, mais de 39 milhões, o papel destes como reservatórios de diferentes espécies de parabasalídeos devem ser cautelosamente considerados, visto que muitas dessas espécies já foram atribuídas a diversos distúrbios clínicos em humanos, não só pela existência de um contato próximo dos suínos com os seres humanos, mas também pela notória dificuldade na destinação dos resíduos orgânicos (fezes) desses animais.

4. PARTE II: Comparação do perfil de crescimento em meio de cultivo CHD de *Tetratrichomonas* spp isolados de caprinos e ovinos.

41 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Cinética de crescimento das cepas em meio CHD

Uma curva de crescimento foi realizada com todas os isolados de caprinos e ovinos, com o objetivo de acompanhar o comportamento individual destas em meio de cultura CHD, para tal, 1×10^4 células por ml de cada isolado, já adaptados ao meio CHD, foram repicadas em 1ml de meio CHD em tubos de 1,5 ml. Após, as culturas foram incubadas à 34°C, em anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), e a cada 12 horas uma alíquota de 30 µl de cada tudo foi retirado, e realizada a contagem de células em câmara de Neubauer com o intuito de determinar a concentração de células por ml. Esse experimento foi realizado em triplicata e as leituras das concentrações foram feitas em duplicata. Os valores encontrados foram reproduzidos graficamente através do Excell 2010.

4.1.2 Cálculo do coeficiente de crescimento e da taxa de geração das cepas

Para uma população de células em crescimento exponencial, quando transformamos os valores de concentração encontrados em Ln (Logaritimo Natural), é possível fazer uma regressão linear mais confiável, e graficamente os valores se tornam lineares (PIRT, 1975). Com a equação da reta linear em uma regressão linear é possível saber o coeficiente de crescimento das cepas, que é igual ao valor de “a” da equação da reta ($y = a x + n$). E através dele é possível calcular o tempo de geração (TG) e o tempo em que a população de células leva para duplicar seu número de células; este é o inverso do Coeficiente de crescimento ($TG = 1/$ Coeficiente de crescimento). O valor encontrado é proporcional ao tempo usado nas contagens de células, neste caso 12 horas. Ao se fazer uma regra de três é possível determinar o tempo, em horas, em que uma taxa de geração ocorre, número de geração/h, que equivale a velocidade de crescimento dos isolados (LONGHI, 2012). As conversões para Ln, bem como os gráficos e a equação da reta foram calculados através do Excell 2010.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a rotina de manutenção dos isolados em meio de cultivo, foi notória a diferença entre os isolados, sobretudo os de ovinos; alguns se multiplicavam rapidamente e necessitavam de um menor tempo de repasse para meios de cultivos novos (repique), outros levavam mais tempo para se adaptar e por isso o tempo de repique precisava ser maior, para que houvesse sucesso na manutenção deste em cultivo. As diferenças de comportamento entre os isolados foram responsáveis pela perda de algumas amostras durante o cultivo. Diante disto, surgiu a necessidade de se conhecer o padrão de crescimento em meio de cultivo de cada amostra. Para tal, 10 isolados de *Tetratrichomonas* sp. de fezes de ovinos e os três de caprinos foram acompanhados a cada 12 horas, durante 84 horas de cultivo em meio CHD, na presença e na ausência de oxigênio.

Os microrganismos em meio de cultivo sob condições ambientais constantes, apresentam uma curva de crescimento típica (Figura 36).

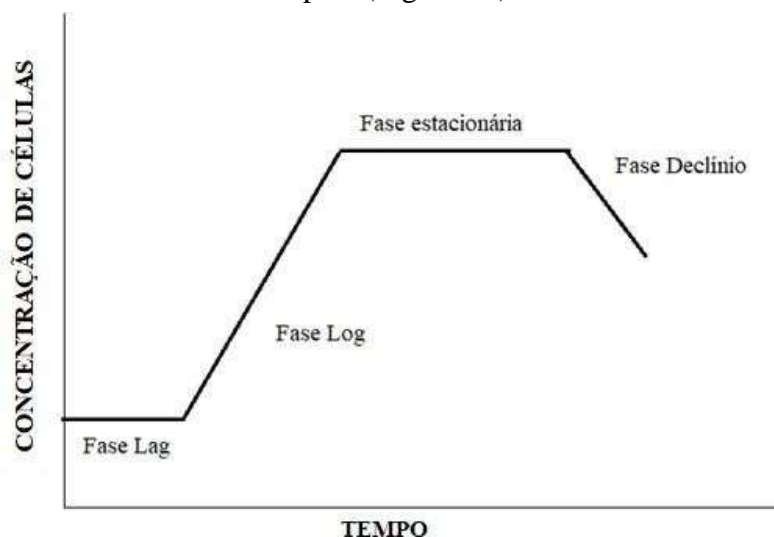


Figura 36. Curva de crescimento microbiano típico sob condições ambientais constantes. Fonte: Adaptado de Bernaerts et al. (2004).

Inicialmente ocorre uma fase de adaptação celular ao meio de cultivo, conhecida como fase *Lag*. Segundo Longhi (2012), esta fase é um atraso à resposta da população microbiana a uma súbita mudança no ambiente. É um período de ajuste, quando os microrganismos se adaptam a fim de obter as condições necessárias para crescer. Após, os organismos começam a se multiplicar rapidamente, que é a fase *Log* ou fase de crescimento exponencial. Com a redução dos nutrientes do meio, a velocidade de multiplicação das células reduz, e algumas células começam a morrer, mas a quantidade de células mortas é semelhante à de células vivas, com isso o número de células fica constante, fase estacionária. Em função da redução celular crescente, inicia-se a fase de declínio ou fase de morte.

Os três isolados de caprinos apresentaram comportamento de forma análoga entre si, tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose; com fase de adaptação (fase *Lag*) entre 0 e 24 horas, e fase *Log* entre 24 e 60 horas de cultivo, seguida pela fase de declínio (Figura 37).

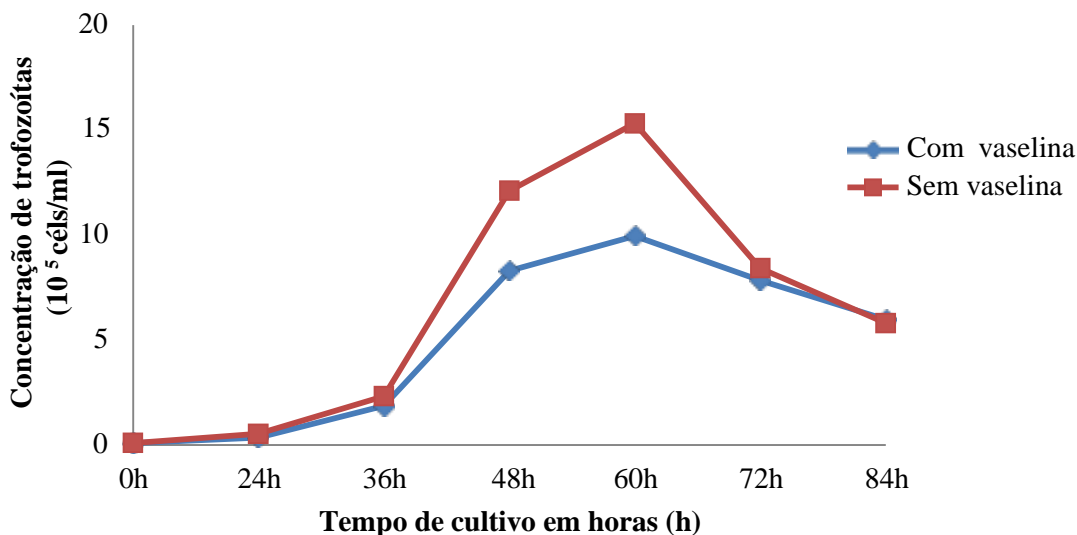


Figura 37. Médias das concentração de trofozoíta de parabasalídeos viáveis, das três cepas isoladas das fezes de caprinos, durante 84 horas de cultivo em meio CHD com vaselina líquida (anaerobiose) e sem vaselina líquida (aerobiose).

Os isolados de ovinos apresentaram dois padrões de crescimento diferentes. Oito isolados apresentaram comportamento semelhante entre si, com pico de crescimento em 48 horas de cultivo (cepa 48 horas) (Figura 38). Os outros dois isolados, também apresentaram crescimento semelhante entre si, mas diferente dos demais isolados de ovinos, pois apresentaram pico de crescimento com 60 horas de cultivo (cepa 60 horas) (Figura 39), semelhante ao crescimento observado nos isolados de caprinos.

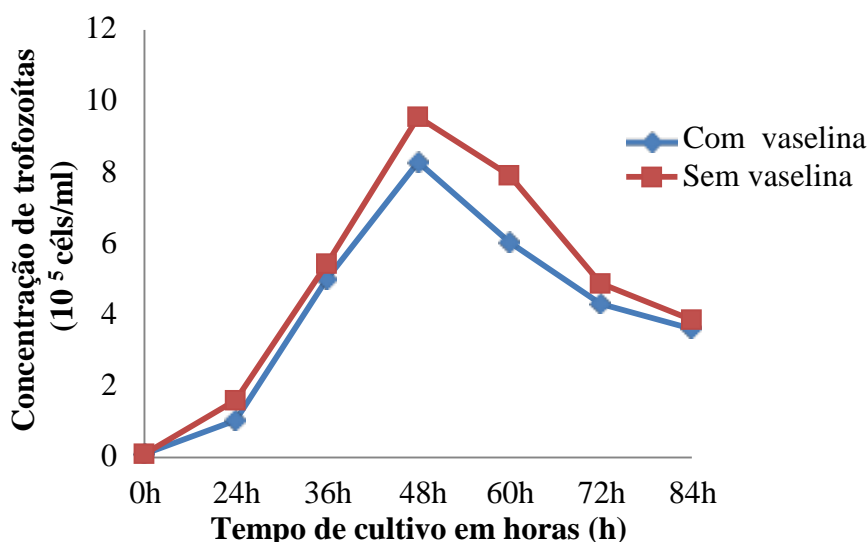


Figura 38. Médias das concentrações de trofozoítas viáveis, das cepas isoladas das fezes de ovinos, com crescimento até 48 horas, durante 84 horas de cultivo em meio CHD com vaselina líquida (anaerobiose) e sem vaselina líquida (aerobiose).

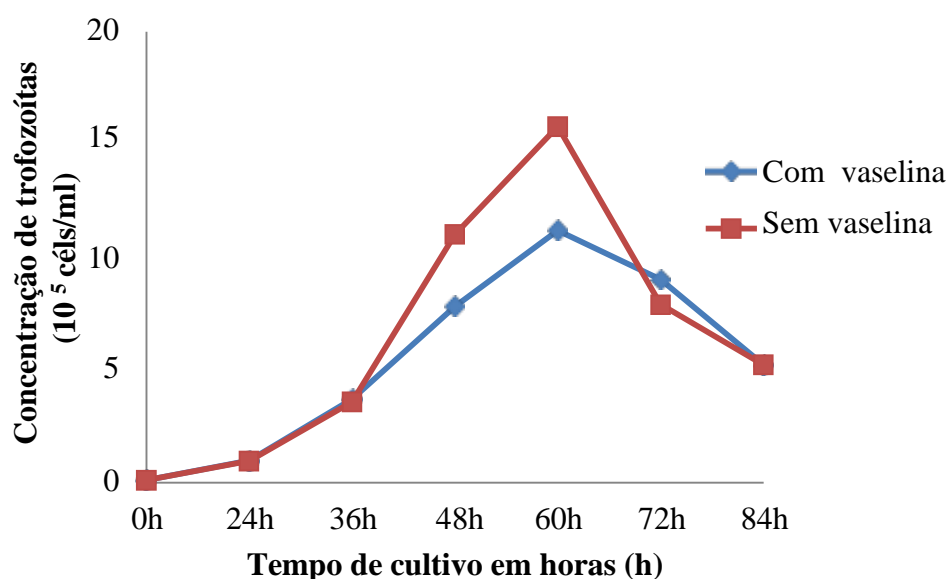


Figura 39. Médias das concentrações de trofozoítas viáveis, das cepas isoladas das fezes de ovinos, com crescimento até 60 horas, durante 84 horas de cultivo em meio CHD com vaselina líquida (anaerobiose) e sem vaselina líquida (aerobiose).

A fase de adaptação (fase *lag*) dos isolados de ovinos também ocorreu entre 0 e 24 horas de cultivo, como os de caprino, no entanto, a maioria dos isolados (8/10) apresentaram uma fase de crescimento, fase *Log*, entre 24 e 48 horas. Os outros dois isolados de ovinos comportaram-se como os de caprinos, com a fase *Log* de 24 a 60 horas. Após a fase de crescimento, houve a fase de declínio em todas as cepas analisadas.

Em anaerobiose todos os isolados de caprinos e ovinos apresentaram menor contaminação bacteriana e fúngica, e apresentaram maior sobrevivência em um mesmo meio (sem repiques). E apesar de todos os isolados apresentarem menor concentração de células por ml em anaerobiose, estatisticamente não houve diferença significativa. As médias das concentrações de trofozoítas viáveis de caprinos e ovinos estão representadas na Tabela 3, respectivamente.

Tabela 3. Médias das concentrações de *Tetratrichomonas* sp. (1×10^5) isolados de caprinos e ovino (cepa 48 e 60 horas) durante 84 horas de cultivo em meio CHD.

Isolados		Tempo em cultivo						
		24h	36h	48h	60h	72h	84h	
Caprinos	SV	0,53	2,33	12,11	15,32	8,42	5,81	
	CV	0,36	1,86	8,30	9,96	7,84	5,98	
Ovinos	48h	SV	1,60	5,43	9,56	7,92	4,88	3,86
		CV	1,04	5,01	8,29	6,05	4,31	3,61
	60h	SV	0,95	3,57	11,00	15,77	7,89	5,21
		CV	0,96	3,69	7,81	11,17	8,99	5,21

*SV- sem vaselina líquida; CV- com vaselina líquida.

Os três perfis de crescimento em cultivo, um de caprino e os dois de ovinos, foram comparados, tanto em anaerobiose quanto em aerobiose (Figuras 40 e 41), e o perfil de crescimento das amostras isoladas do caprino foram muito semelhantes às dos ovinos que apresentaram pico de crescimento em 60 horas (cepa 60 horas), principalmente quando em aerobiose (Figura 40). E estas apresentaram perfil distinto das amostras de ovinos com pico em 48 horas (cepa 48 horas). Essa diferença pode estar relacionada ao fato de haver alguma diferença metabólica entre os isolados com perfil 48 horas e com perfil 60 horas. Ou por haver algum fator individual inerente, que de alguma maneira permite esse padrão distinto. Como já foi proposto por Amin et al. (2010), quando eles observaram que cepas de uma mesma espécie podem apresentar comportamentos diferentes em um mesmo meio de cultivo (axênico). Vale ressaltar que nosso estudo não foi feito com culturas axênicas, e não são conhecidas as bactérias presentes no meio, e portanto, os isolados podem realmente pertencer à mesma espécie de *Tetratrichomonas*, com metabolismo semelhante. Sendo assim a microbiota é o potencial agente causador das diferenças observadas, ou seja, a microbiota presente no meio de cultivo dos isolados com pico de crescimento em 48 horas é diferente dos de crescimento em 60 horas. Outra possibilidade, e que sejam as mesmas bactérias, no entanto com concentração distinta no meio. Segundo Tasca et al. (2007) a presença de *E. coli* no meio prolonga o tempo de vida dos isolados em cultivo, por fornecer nutrientes importantes, o que pode ter prorrogado a fase de crescimento dos isolados de caprinos e dos isolados de ovinos com crescimento para até 60 horas. Mas ainda nenhuma dessas hipóteses pode ser confirmada até o momento.

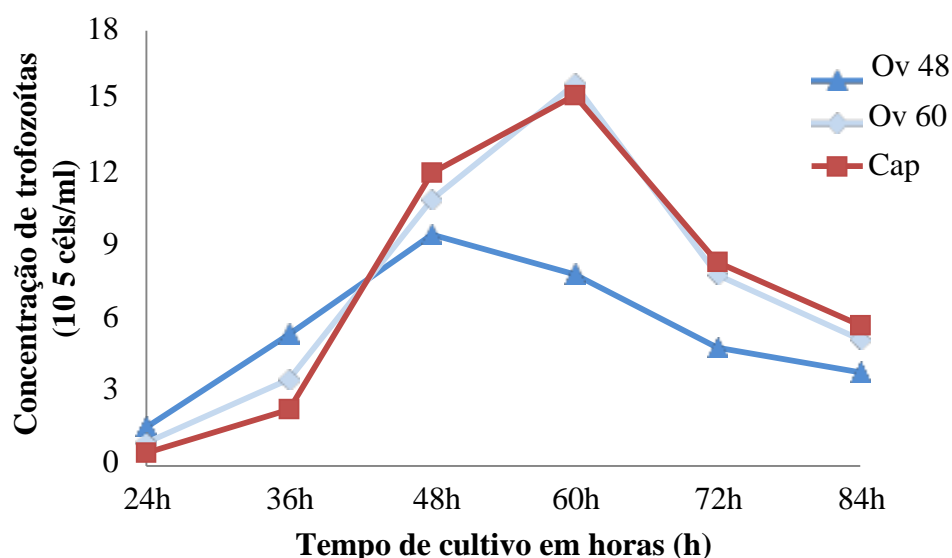


Figura 40. Comparação entre a cinética de crescimento entre as cepas de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos e ovinos, cultivadas em aerobiose (sem vaselina) no meio de cultivo CHD.

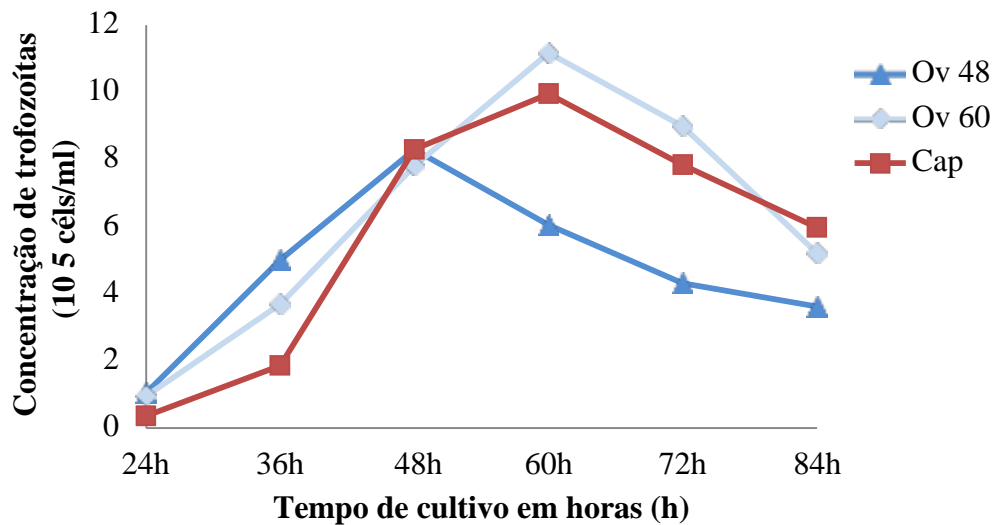


Figura 41. Comparação entre a cinética de crescimento entre as cepas de parabasalídeos isoladas das fezes de caprinos e ovinos, cultivadas em anaerobiose (com vaselina) no meio de cultivo CHD.

Explorar o comportamento dos isolados em meio de cultivo é importante para o sucesso do cultivo, pois o tempo entre os repiques precisa ser adequado a cada isolado. Se for breve pode ocorrer na fase *Lag*, e por não estar adaptado ao meio, o microrganismo terá muita dificuldade de se estabelecer, reduzindo as chances de sucesso. E longo de mais, pode ocorrer na fase de morte, não havendo chances da cultura se restabelecer. O ideal é que ocorra na fase exponencial, para isso é necessário conhecê-la. Para tal, os valores das concentrações médias dos isolados, referentes apenas ao período de crescimento, foram representados graficamente. E foi possível confirmar que estes isolados, independente de cultivo aeróbico ou anaeróbico, apresentam crescimento exponencial, tanto os de caprino, quanto os de ovinos (Figuras 42,43 e 44), com linha de tendência com valores de R^2 igual ou maiores que 0,9.

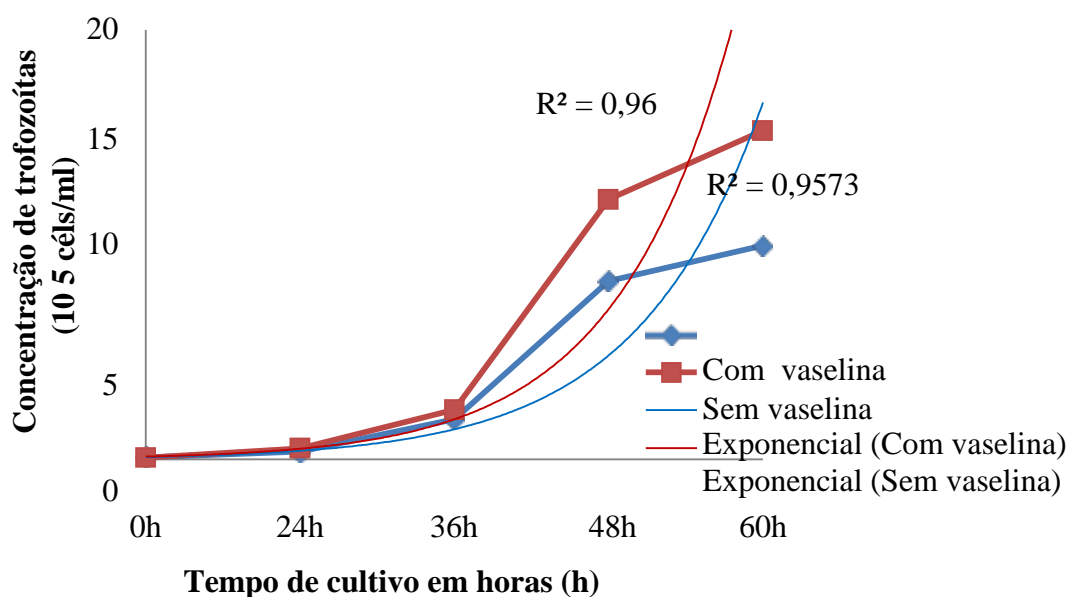


Figura 42. Médias das concentrações de trofozoítas (10^5 células/ml) de caprino viáveis, durante a fase de crescimento celular (60 horas) em meio de cultivo CHD em

anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

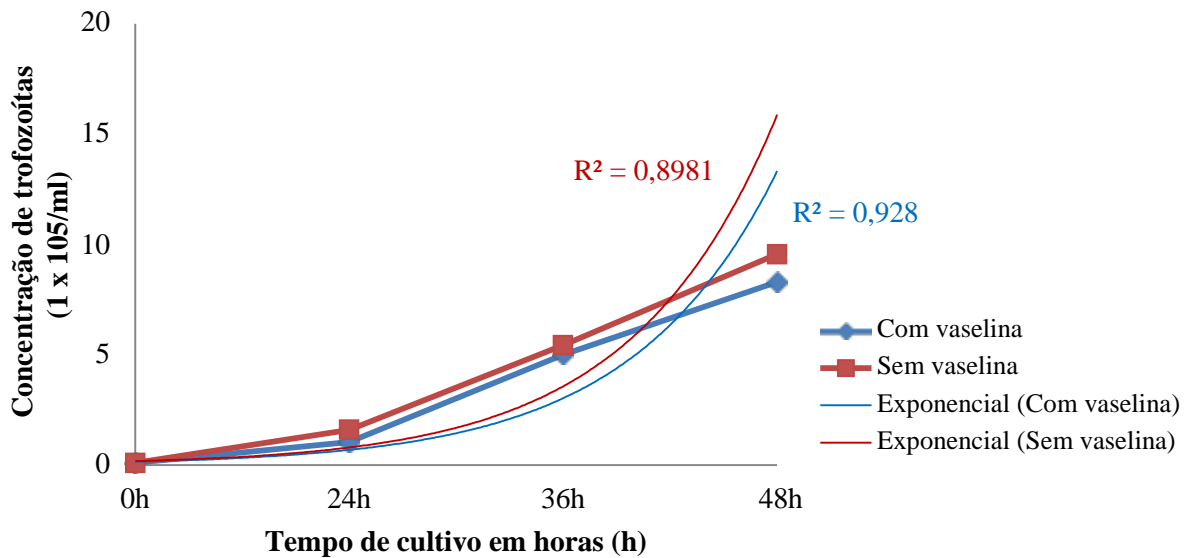


Figura 43. Médias das concentrações de trofozoítas viáveis, durante a fase de crescimento celular (48 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

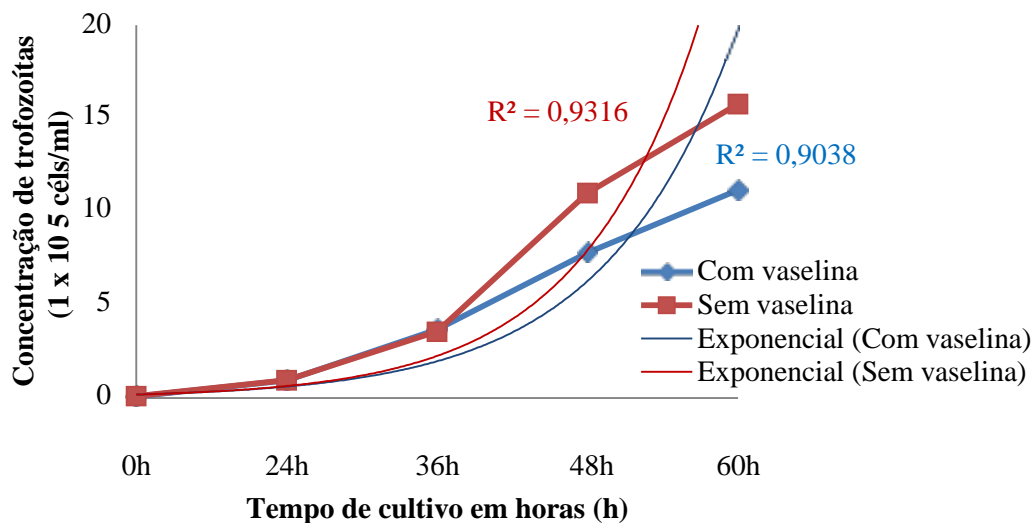


Figura 44. Médias das concentrações de trofozoítas viáveis, durante a fase de crescimento celular (60 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

Por ter caráter exponencial, os valores de concentração de trofozoítas foram transformados em Ln (Logaritmo Natural), e regressões lineares foram realizadas para os três tipos de isolados, caprinos, ovinos 48 horas e ovinos 60 horas. Uma regressão abrangendo toda a fase de crescimento, correspondente às fases *Lag* e *Log*, de 0 a 60 horas (Figuras 45 e 46) ou de 0 a 48 horas (Figura 47), dependendo da característica do pico de crescimento de cada

isolado. E outra regressão apenas na fase de crescimento exponencial, fase *Log*, entre 24

e 60 horas (Figuras 48 e 49) ou 24 e 48 horas de cultivo (Figura 50). Através da equação da reta destas regressões lineares foram obtidos os coeficientes de crescimento dos isolados em anaerobiose e aerobiose.

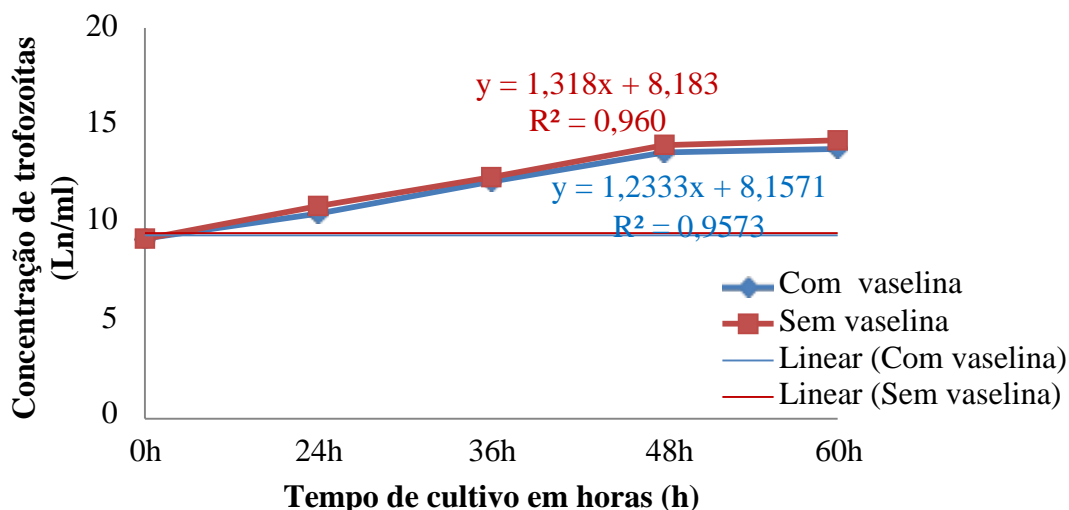


Figura 45. Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) de parabasalídeos viáveis, durante toda a fase de crescimento (0-60 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

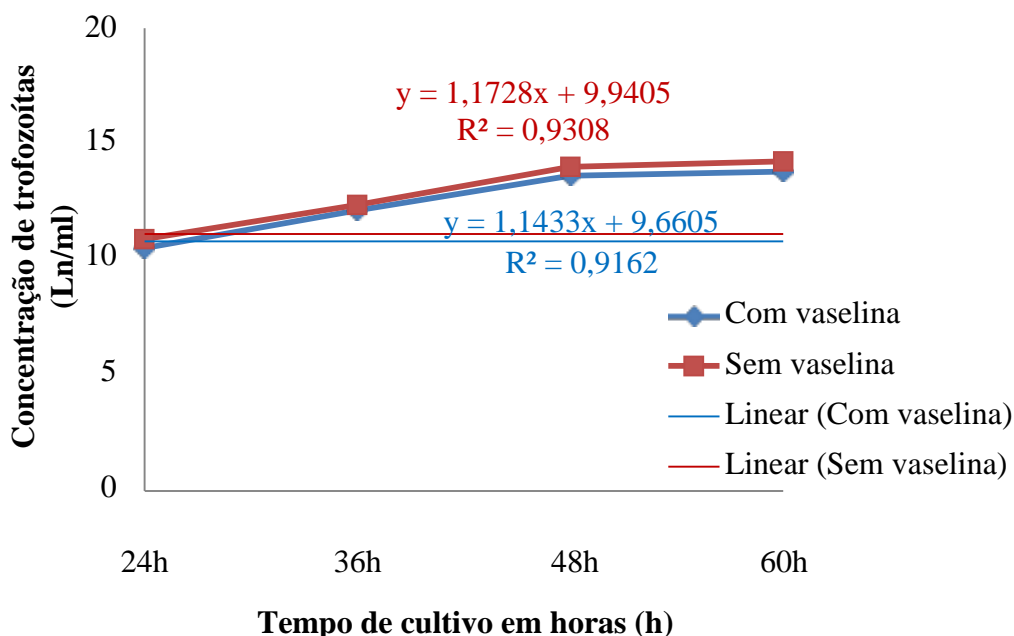


Figura 46. Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) de parabasalídeos viáveis, durante a fase *log* (24-60 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

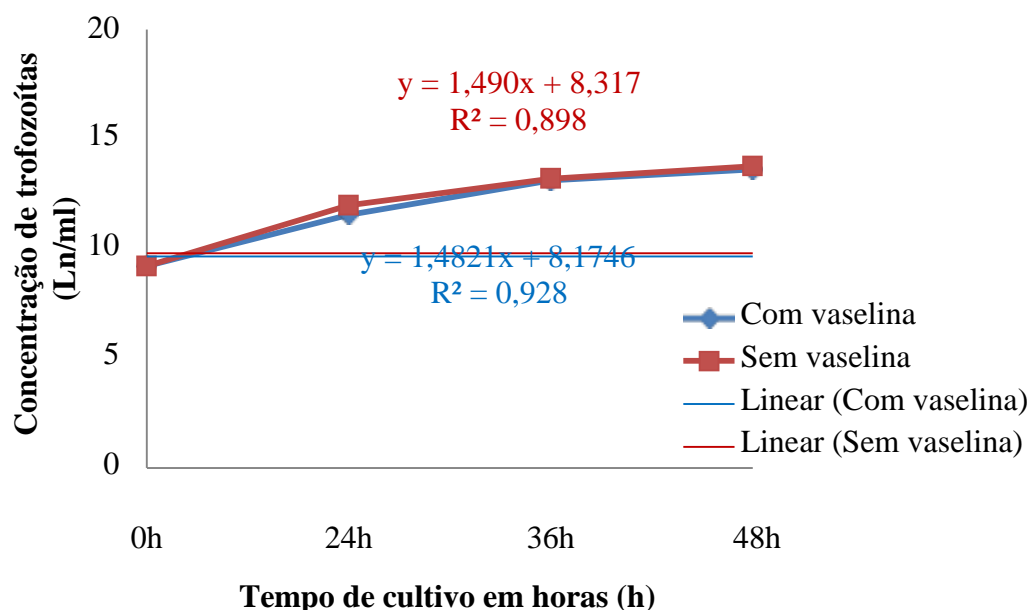


Figura 47. Médias das concentrações dos trofozoítas (Ln/ml) das cepas 48 horas, durante a fase de crescimento (0-48 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

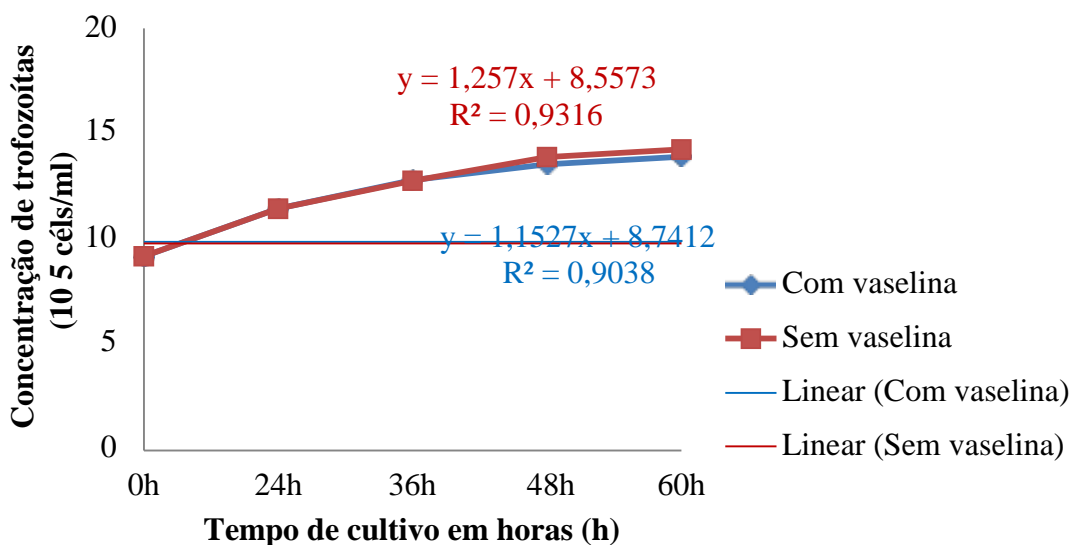


Figura 48. Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) das cepas 60 horas, durante a fase de crescimento (0-60 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

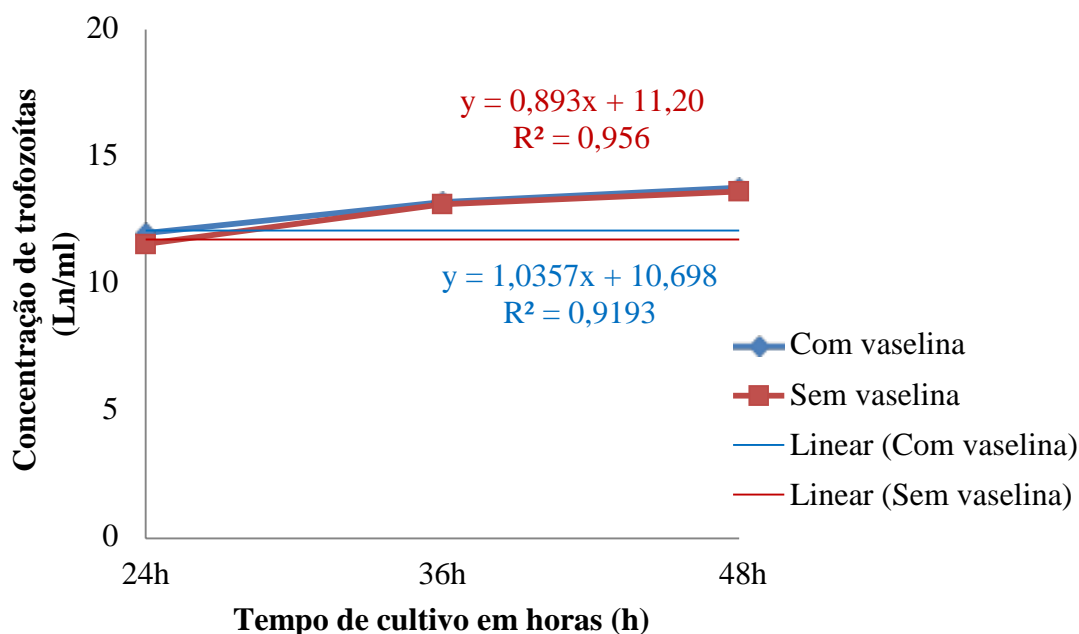


Figura 49. Médias das concentrações de trofozoítas (Ln/ml) das cepas 48 horas, durante a fase *Log* (24-48 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o valor de R^2 .

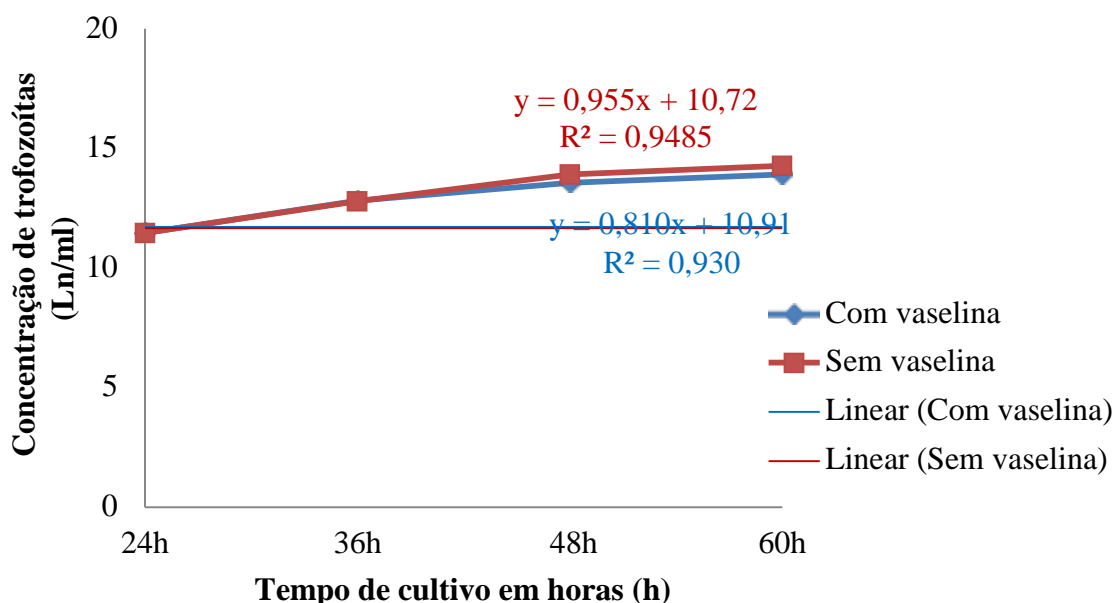


Figura 50. Médias das concentrações dos trofozoítas (Ln/ml) das cepas 60 horas, durante a fase *Log* (24-60 horas) em meio de cultivo CHD em anaerobiose (com vaselina líquida) e em aerobiose (sem vaselina líquida), com suas respectivas linhas de tendências e o

valor de R^2 .

Através destes coeficientes foram calculadas as taxas de geração, a cada 12 horas, os tempos de geração, tempo necessário para que uma geração duplique; estes estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, para os isolados de caprinos e ovinos, respectivamente.

Tabela 4. Comparação entre os tempos geração, em todas as fases de crescimento celular (*Lag* + *Log*) e na fase de crescimento exponencial, fase *Log*; entre os isolados de *Tetratrichomonas* sp de caprino.

Cultivo	Fase	R ²	Coefficiente de crescimento	Geração (12 horas)	Tempo de geração	
Aerobiose	<i>Log</i>	0,930	1,17	0,85	14,06 h	14'03''50''''
	<i>Lag</i> + <i>Log</i>	0,960	1,32	0,76	15,82 h	15'48''57''''
Anaerobiose	<i>Log</i>	0,916	1,14	0,87	13,72 h	13'42''57''''
	<i>Lag</i> + <i>Log</i>	0,957	1,23	0,81	14,80 h	14'47''45''''

Os isolados de caprinos apresentaram menor tempo de geração em anaerobiose, quando comparados aos isolados em aerobiose. No entanto, o número de geração a cada 12 horas foi próximo de 0,8, tanto na fase de crescimento total (*Lag* + *Log*), quanto na fase de crescimento exponencial, o que sugere que esses isolados se adaptam bem rápido ao meio. Fato que não foi observado nos isolados de ovinos.

Tabela 5. Comparação entre os tempos geração, em todas as fases de crescimento celular (*Lag* + *Log*) e na fase de crescimento exponencial, fase *Log*, dos isolados de ovinos com crescimento de 48 horas (cepa 48 horas) e 60 horas (cepa 60 horas).

Cultivo	Fase	R ²	Coefficiente de crescimento	Geração (12 horas)	Tempo de geração		
Cepas 48h	SV	<i>Log</i>	0,956	0,89	1,12	10,72 h	10'43''12''''
		<i>Lag</i> + <i>Log</i>	0,90	1,49	0,67	17,88 h	17'46''48''''
	CV	<i>Log</i>	0,919	1,03	0,97	12,42 h	12'25''00''''
		<i>Lag</i> + <i>Log</i>	0,93	1,48	0,67	17,78 h	17'52''48''''
Cepas 60h	SV	<i>Log</i>	0,948	0,96	1,05	11,46h	11'27'36''''
		<i>Lag</i> + <i>Log</i>	0,93	1,26	0,80	15,08h	15'5''2''''
	CV	<i>Log</i>	0,930	0,81	1,23	9,72h	09'43''12''''
		<i>Lag</i> + <i>Log</i>	0,90	1,15	0,87	13,82h	13'49''33''''

*SV- sem vaselina; CV- com vaselina.

A taxa de geração na fase exponencial desses isolados foi próxima de 1,0, chegando a 1,2 nas cepas 60 horas quando em anaerobiose, maior do que quando analisado toda a fase de crescimento (*Lag* + *Log*), 0,67 nas cepas 48 horas e 0,8 nas cepas 60 horas em aerobiose, e 0,87 em anaerobiose. Ou seja, os isolados de ovinos, tiveram uma fase *Lag* maior, maior tempo de adaptação, e por isso a taxa de geração da fase de crescimento total foi menor. No entanto, depois de adaptados, o tempo de geração foi menor.

Com o número de gerações em 12 horas foi possível chegar no número de gerações em uma hora, equivalente à velocidade de crescimento. Os valores de velocidade de multiplicação celular estão detalhados na Tabela 6.

É possível observar que os isolados de caprino, quando cultivados em condições anaeróbicas se multiplicaram mais rápido do quando cultivados em condições aeróbicas. Sendo, 1,2 vezes mais rápida na fase *Lag*, 1,1 vezes mais rápida em velocidade média de

crescimento total, na fase log, e não houve diferença significativa (1,02). Ou seja, em anaerobiose, se adaptam mais rápido ao meio, mas depois que estão adaptados, crescem na mesma velocidade, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. E a diferença na velocidade de crescimento inicial (fase *Lag*) interfere na velocidade de crescimento final.

Tabela 6. Velocidades médias (número de gerações/hora) de crescimento de *Tetratrichomonas* sp isolados de caprinos e ovinos, na fase *Lag*, *Log* e durante toda a fase de crescimento (*Lag* + *Log*), *Vm* total.

Isolados	Cultivo	<i>Vm</i> fase <i>Lag</i>	<i>Vm</i> fase <i>Log</i>	<i>Vm</i> total
Caprinos	SV	$5,14 \times 10^{-2}$	$7,11 \times 10^{-2}$	$6,32 \times 10^{-2}$
	CV	$5,96 \times 10^{-2}$	$7,29 \times 10^{-2}$	$6,76 \times 10^{-2}$
Ovinos	Cepas 48h SV	$1,85 \times 10^{-2}$	$9,33 \times 10^{-2}$	$5,59 \times 10^{-2}$
	Cepas 48h CV	$3,20 \times 10^{-2}$	$8,05 \times 10^{-2}$	$5,62 \times 10^{-2}$
	Cepas 60h SV	$4,64 \times 10^{-2}$	$7,96 \times 10^{-2}$	$6,63 \times 10^{-2}$
	Cepas 60h CV	$7,96 \times 10^{-2}$	$6,75 \times 10^{-2}$	$7,23 \times 10^{-2}$

*SV- sema vaselina; CV- com vaselina; *Vm* (velocidade média).

Os isolados de ovinos, que apresentaram crescimento até 48 horas, quando cultivadas em condições anaeróbicas, se multiplicaram 1,7 vezes mais rápido do que os isolados cultivados em condições aeróbicas na fase *Lag*. Já na fase *Log* a multiplicação celular foi 1,16 vezes mais rápida quando cultivadas em aerobiose. Ou seja, em anaerobiose também se adaptam mais rápido, com maior velocidade de multiplicação. Mas depois que já estão adaptados, eles crescem mais rápido em aerobiose. Consequentemente, as velocidades médias finais foram equivalentes ($5,62 \times 10^{-2} / 5,59 \times 10^{-2} = 1$).

Os isolados de ovinos que apresentaram crescimento até 60 horas, tiveram velocidade de crescimento maior que as cepas de 48 horas, em todos os momentos analisados, no entanto quando comparado o cultivo em anaerobiose X aerobiose das cepas 60 horas, o resultado foi semelhante com os dados das cepas 48 horas, ou seja, na fase *Lag*, as cultivadas em anaerobiose foram 1,7 vezes mais rápida ($7,96 \times 10^{-2} / 4,64 \times 10^{-2}$), e na fase *Log* as cultivadas em aerobiose foram 1,17 ($7,96 \times 10^{-2} / 6,75 \times 10^{-2}$) vezes mais rápidas, e também não houve diferença significativa entre as velocidades médias finais de crescimento ($7,23 \times 10^{-2} / 6,63 \times 10^{-2} = 1,09$).

Na fase de crescimento *Log*, as cepas 60 horas deram origem a uma nova geração 45 minutos antes que as cepas 48 horas em aerobiose; já em anaerobiose, as cepas 48 horas deram origem a uma nova geração 2 horas e 42 minutos antes que as cepas 60 horas. Durante a fase de crescimento total (*Lag* + *Log*), as cepas 60 horas deram origem a uma nova geração 2 horas e 48 minutos antes das cepas 48 horas em aerobiose; em anaerobiose deram origem a uma nova geração 3 horas e 57 minutos antes que as cepas 48 horas. No entanto, através de análise estatística foi comprovado que não há diferença significativa entre as velocidades médias finais de crescimento de cada um dos isolados de caprinos e ovinos (cepa 48 horas e 60 horas), ou seja, as cepas crescem com velocidade média semelhante, apesar do padrão diferenciado de crescimento.

O cultivo *in vitro* desses protozoários é um grande desafio, pois exige simular as condições encontradas por eles dentro do hospedeiro, o que é complexo, diante da riqueza de nutrientes disponíveis *in vivo*, sobretudo no trato intestinal. Não é à toa que a literatura pertinente ao cultivo é escassa. E segundo Mueller (1990), existem muitas diferenças bioquímicas entre as espécies de parabasalídeos. Ou seja, os resultados obtidos com uma espécie não podem ser generalizados, sem que haja evidências experimentais.

Apesar das diferenças encontradas no perfil de crescimento destes isolados não se pode afirmar que estes possuem diferenças metabólicas, tão pouco que são espécies distintas. Mas reforçou que há muito a se pesquisar sobre esses flagelados. E nos permitiu determinar os tempos de repiques ideais para esses isolados, o que possibilitou estabelecer um protocolo e manutenção destes em meio de cultivo, de forma a facilitar o manejo, sem que haja prejuízo para amostras importantes.

5. PARTE III: Estudo morfométrico das espécies de *Tetratrichomonas* cultivadas em meio CHD, isolados de caprinos e ovinos.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.2 Fotomicrografias e mensurações dos trofozoítos

Todas as análises morfológicas foram realizadas em microscopia óptica (microscópio triocular Zeiss, RFA), após a preparação de esfregaços secados ao ar, corados em panótico rápido® (Primo star iLEDZeiss®), como descrito na Parte 1. As fotomicrografias foram feitas com auxílio de câmera digital AxioCamERc 5s acoplada ao referido microscópio. A análise morfométrica dos trofozoítos foram feitas com 250 trofozoítas de cada espécie hospedeira (caprino e ovino), utilizando-se o programa AxionVision Release 4.8.2 (2010). Os desenhos foram editados com auxílio de dois programas CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version11.0, Corel Corporation, Canada), especificamente Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINTE.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parabasalídeos em culturas xênicas foram visíveis à microscopia óptica em preparações não coradas, durante o cultivo, e coradas durante a realização das curvas de crescimento na câmara de Newbauer, preparações úmidas (eosina), bem como através de fixação em lâmina, e coloração com panótico rápido®. Durante o cultivo, só foi possível observar formato de célula e locomoção, já que estas se movimentam intensamente, o que dificulta a visualização de flagelos e membrana ondulante. As preparações úmidas com eosina reduziram a motilidade celular, e permitiram somente a visualização de características externas (corante não penetra nas células vivas), como membrana ondulante, flagelos e formato das células. As preparações de esfregaço, com posterior fixação e coloração em panótico rápido®, foi o melhor método de identificação morfológica.

O formato dos trofozoítas de caprino (n=250), após a fixação, variou entre as formas arredondadas (44,8%) e piriformes/fusiformentes (44,4%), com uma pequena porção de células com formato oval (10,8%); formas irregulares também foram visualizadas, mas com pouca frequência (menos de 1%) e por isso não foram mensuradas. A maioria dos trofozoítas de ovinos apresentou formato piriforme/fusiforme (84%), com uma menor porção de células com formato oval (8,8%) e arredondado (7,2%) (Figura 51).

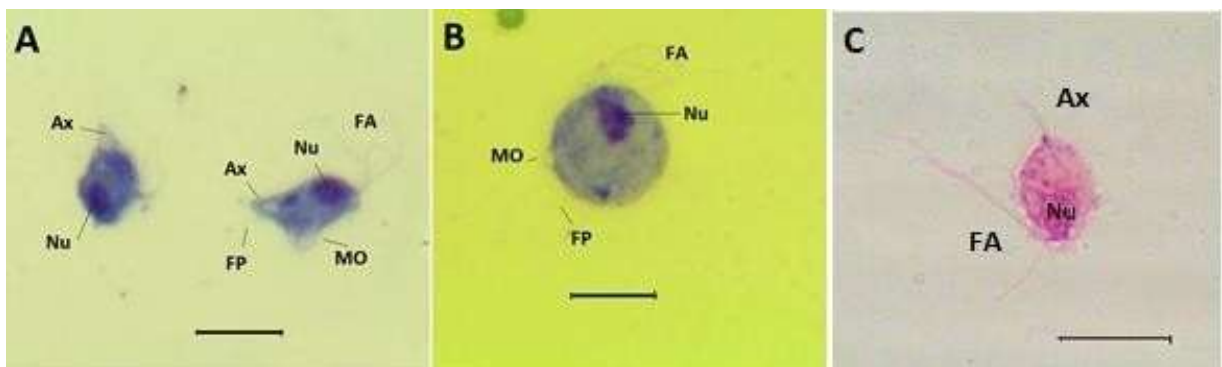


Figura 51. Trofozoítas de *Tetratrichomonas* sp de ovinos (A e B) e caprino (C) com formato: fusiforme (A), arredondado (B) e oval (C). Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax), flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido®.

Andersen et al. (1962) ao estudar a morfologia de flagelados isolados do conteúdo fecal de ovino, denominado por eles de *T. ovis*, descreveram maior ocorrência dos formatos arredondados e ovais, e as células de formato piriforme foram raramente visualizadas por eles, diferente do que observamos nos isolados de ovinos, porém semelhante ao que foi observado nos isolados de caprino. No entanto, inúmeras semelhanças foram observadas ao comparar os esquemas morfológicos de Andersen et al. (Figura 52), com as imagens dos isolados neste presente estudo.

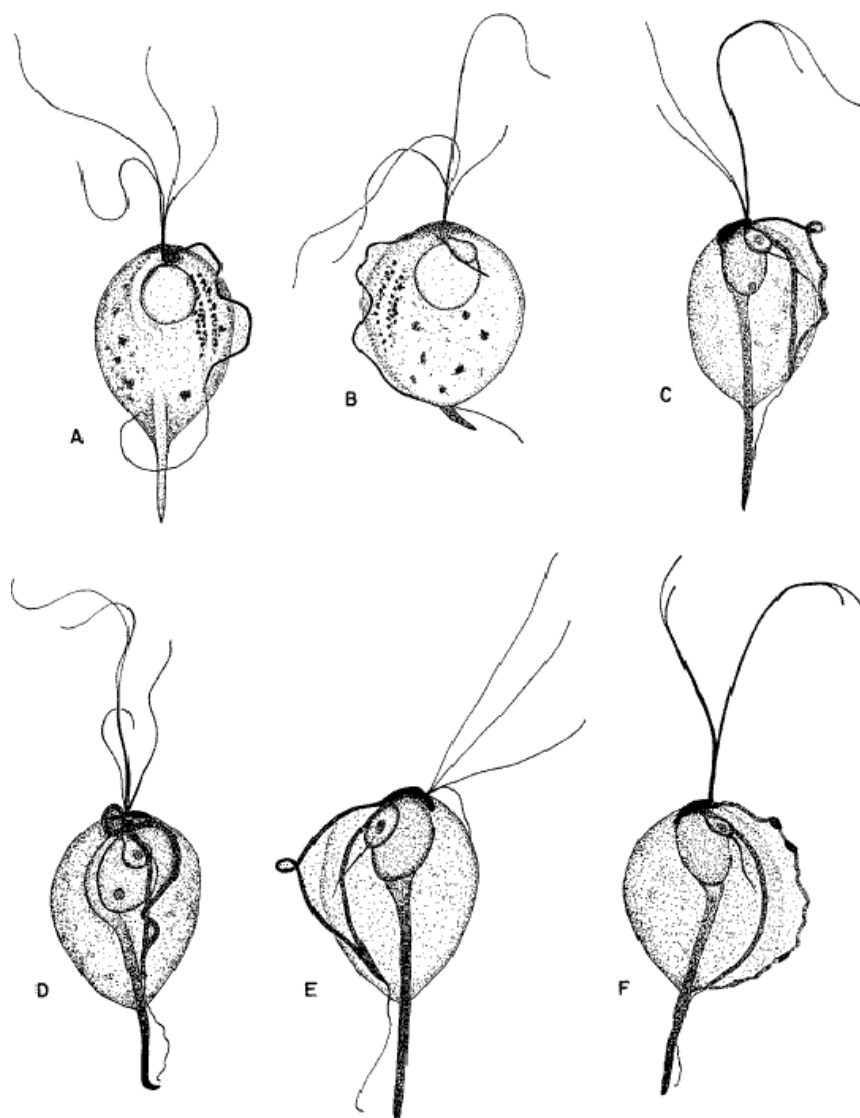


Figura 52. Desenho esquemático caracterizando morfológicamente os trofozoítos de quatro diferentes cepas isoladas de fezes de ovinos, em regiões e momentos distintos, de acordo com Andersen et al. (1962).

O tamanho dos trofozoítos excluindo a parte protrusa do axóstilo, dos isolados de caprinos foi de 10,3 (4,6–19) μm de comprimento e 7,2 (3,5-13,5) μm de largura, e dos isolados de ovinos foi de 10,0 (7–15) μm de comprimento e 5,7 (3-13) μm de largura. Todas as células apresentavam apenas um núcleo localizado na região anterior da célula (Figura 1), exceto quando estavam em processo de divisão celular. O núcleo possuía formato variando entre oval ou arredondado, com 3,8 (2,0- 6,0) μm de comprimento e 2,7 (1,0-4,5) μm de largura, nos isolados de caprinos; e 3,9 (1,8- 5,7) μm de comprimento e 2,8 (1,5- 4,8) μm de largura, nos isolados de ovinos. A diferença observada entre as médias de larguras do corpo dos isolados de caprinos e ovinos é referente ao fato de a maioria das células dos isolados de ovinos apresentarem formatos piriformes/fusiformes (84%), com isso a média ficou menor que a encontrada em isolados de caprinos. No entanto, quando comparado os isolados de acordo com o formato do corpo da célula, não houve diferença. As médias de comprimento e

largura do corpo e núcleo dos trofozoítas isolados de caprinos e ovinos, de acordo com cada formato celular encontrado, estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7: Tamanho médio em micrometros, do corpo e núcleo dos trofozoítas de *Tetratrichomonas* sp. isolados de caprinos e ovinos, com valores mínimo e máximo encontrados, de acordo com o formato do corpo dos isolados.

	Formato	Nº	Corpo (µm)		Núcleo (µm)	
			Comp.	Larg.	Comp.	Larg.
Caprinos	Arredondadas	112	7,0 ⁹ -16,7,5	8,3 (5,3-13,4)	4,0 (3,1-5,7)	2,5 (1,4-4,5)
	Piriformes	111	4,6 ¹⁰ -19,0	5,7 (3,5-13,5)	3,4 (2,5-5,5)	2,9 (1,6-2,4)
	Ovais	27	9,6 (6,7-11,4)	7,4 (5,4-9,0)	4,0 (2,0-6,0)	2,4 (1,0-4,0)
Ovinos	Piriformes	210	9,9 (6,5-13,7)	5,2 (3,1- 8,5)	3,8 (1,8 - 5,1)	2,8 (1,5 - 4,3)
	Ovais	22	10,9 (7,8-15,7)	7,4 (4,0-10,2)	4,1 (2,7-5,8)	3,0 (2,4-3,4)
	Arredondadas	18	10,8 (8,0-14,8)	8,8 (6,3-13,1)	4,3 (2,8- 5,6)	3,2 (2,4-4,8)

As células de formato piriforme, isoladas de ovinos, apresentaram comprimento relativamente menor que as células arredondadas e ovais. E o inverso foi observado nos isolados de caprinos. No entanto, não houve diferença significativa entre o comprimento das células de diferentes formatos.

Em algumas células, foi possível visualizar a presença de vacuolizações no citoplasma, quanto maior o número de vacúolos, maiores eram estas células. Estas eram observadas principalmente quando os meios de cultura estavam muito contaminados. Sendo possível visualizar bactérias, em geral bastonetes, aderidos à superfície e/ou dentro dos vacúolos de endocitose do protozoário (Figura 53).

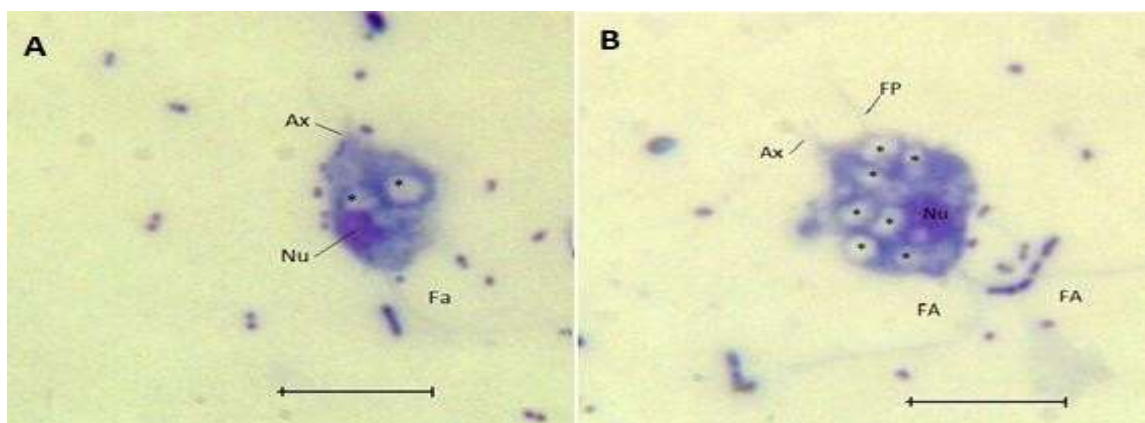


Figura 53. Trofozoítos de *Tetratrichomonas* sp de caprino com a presença de vacuolizações no citoplasma (*). Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax), flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). Panótico rápido®. Barra= 10µm.

Esse fenômeno de fagocitose sugere que a endocitose é um dos mecanismos de interação entre estes flagelados e as bactérias. Isto explicaria o crescimento acentuado destes quando a contaminação bacteriana era alta. Segundo Tasca e De Carli (2004) após a adesão à superfície de protozoários, as bactérias induzem o aparecimento de depressões semelhantes a crateras, que seriam provavelmente canais de endocitose, e que as bactérias ingeridas são degradadas intracelularmente pelo protozoário, *T. didelphidis*.

A atividade fagocítica de outros parabasalídeos já foi comprovada, como as de *Trichomonas vaginalis* sobre bactérias Gram positivas e negativas (OVCINNIKOV et al., 1975), bem como a habilidade específica deste de digerir *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* e *Chlamydia trachomatis* (STREET et al., 1984), além de, lactobacilos, células epiteliais, leucócitos e eritrócitos (RENDOÑ-MALDONADO et al., 1998). Outros estudos realizados com outras espécies de parabasalídeos só reforçam a capacidade fagocítica e endocítica desses flagelados de englobar partículas do meio (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1995; ZERPA LARRAURI et al., 2016).

Quatro flagelos anteriores de tamanhos desiguais foram observados na grande maioria das amostras, sendo um quase sempre orientado em direção ventral. Os flagelos eram maiores que o comprimento do corpo da célula, alguns chegavam a ser duas vezes maior (Figura 54). No entanto, apesar de raras, algumas formas multiflagelares também foram observadas (Figura 55). A membrana ondulante foi visível na maioria das células contendo quase sempre apenas 2 ondulações, nos isolados de caprinos, e variando de 2 a 4 ondulações nos isolados de ovinos. Esta membrana se estendia por todo o corpo do trofozoíta, terminando em uma porção livre, o flagelo posterior (Figura 54). Não foi possível mensurar o flagelo posterior na maioria dos isolados de caprinos; nos de ovinos o comprimento médio dessa estrutura foi de 6,6 µm.

A costa apresentou-se delgada, com diâmetro pouco maior que o de um flagelo, e se estendeu por todo o corpo, seguindo o comprimento da membrana ondulante. O pelta é delgado, pequeno e pouco discernível (Figura 56). O corpo parabasal é redondo e situado próximo ao núcleo. Essas estruturas, costa, pelta, e corpo parabasal não foram visualizadas com frequência, e por isso não foram mensuradas.

O axóstilo percorre o corpo celular e atenua-se gradualmente até o seu término; em algumas células o citoplasma acompanhava o axóstilo até o fim (Figura 57A), em outra o axóstilo se projetava para fora do citoplasma, apresentando-se mais espesso que o flagelo posterior (Figura 57B), mas em certos momentos era impossível distinguí-los. Seu comprimento médio foi de 4,3 µm nos isolados de caprinos e 3,0 µm nos isolados de ovinos.

Algumas células apresentavam-se em processo de divisão celular, sendo constante a observação de células com dois núcleos, bem como em processo de separação, citocinese (Figura 58). A multiplicação observada na grande maioria das cepas foi de divisão binária, iniciada pela parte anterior do corpo (Figura 58), mas também foram observadas formas de divisão múltipla com trofozoítos apresentando mais de dois núcleos (Figura 59).

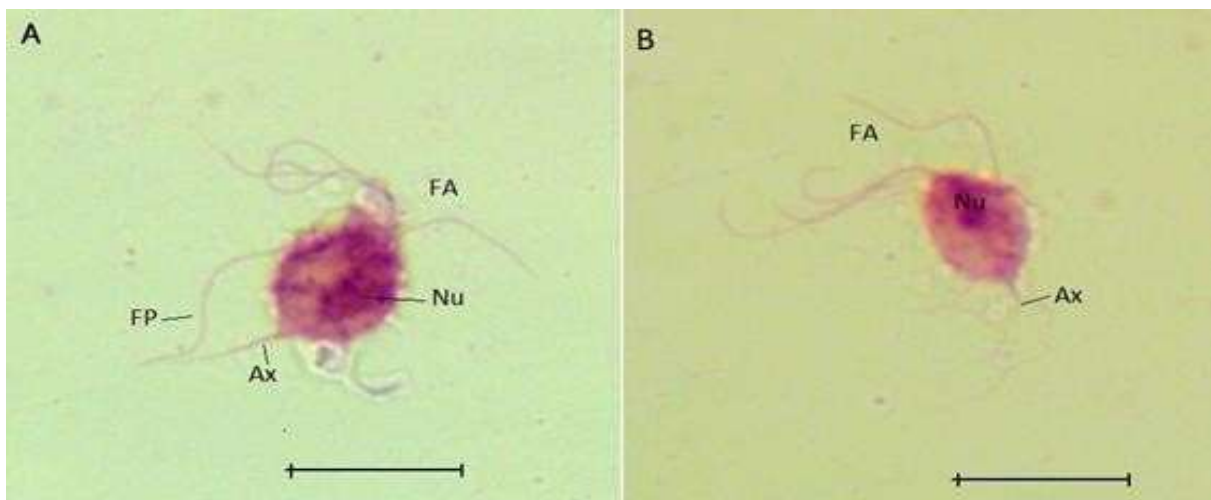


Figura 54. Trofozoítos de *Tetratrichomonas* sp de caprino com a presença de quatro flagelos anteriores. Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax) e flagelo posterior (FP). Panótico rápido®. Barra= 10µm.

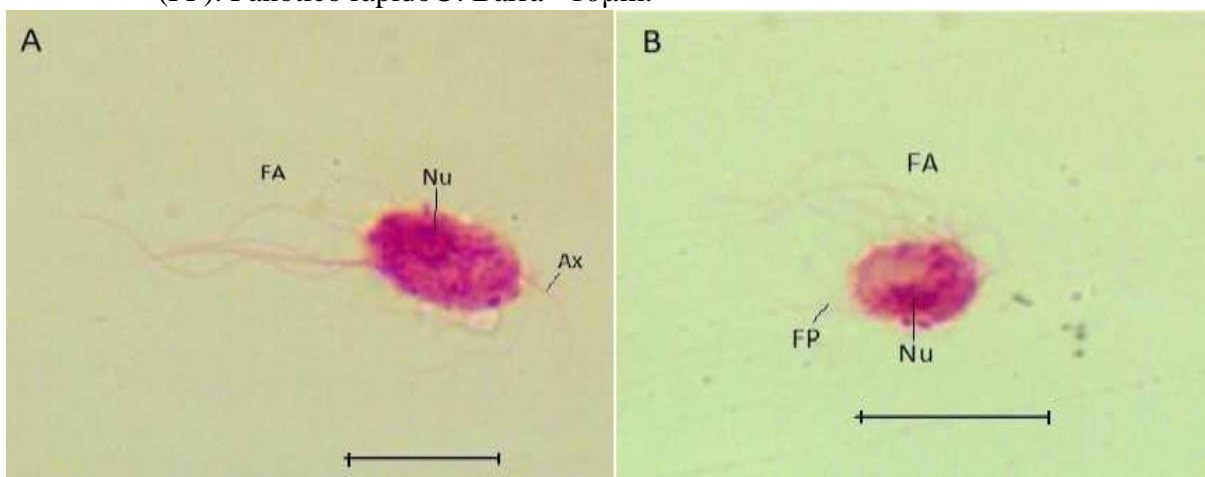


Figura 55. Trofozoítos de *Tetratrichomonas* sp de caprino com a presença múltiplos flagelos. Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax) e flagelo posterior (FP). Panótico rápido®. Obj. 100.

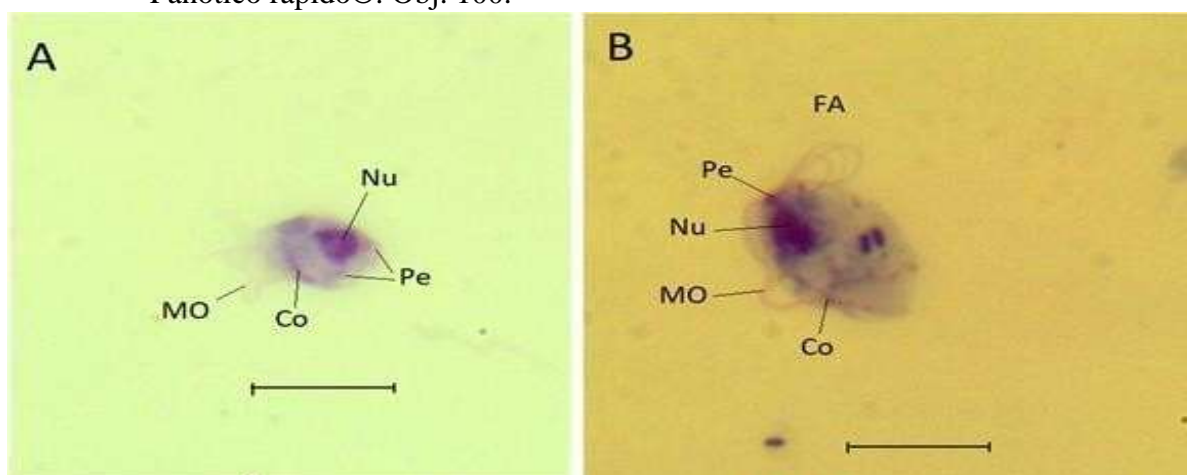


Figura 56. Trofozoítos de *Tetratrichomonas* sp de ovinos no início da divisão celular, com núcleo em formato de coração e presença de dois peltas (A). Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax), costa (Co), pelta (Pe) e membrana ondulante (MO). Panótico rápido®. Barra = 10µm.

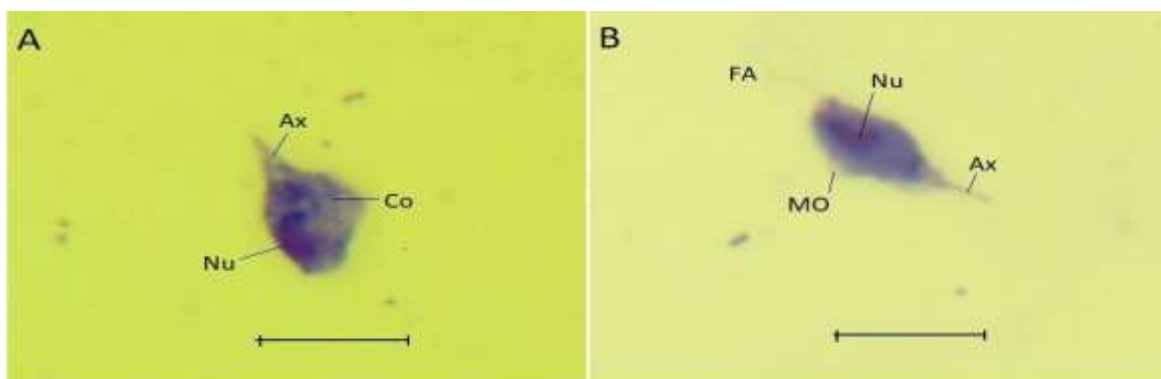


Figura 57. Trofozoítos de *Tetratrichomonas* sp de ovino. A. Citoplasma acompanhando o axóstilo (Ax) até seu término; B. Axóstilo se projetando para fora do citoplasma. Núcleo (Nu), flagelo anterior (FA) e costa (Co). Panótico rápido®. Barra= 10µm.

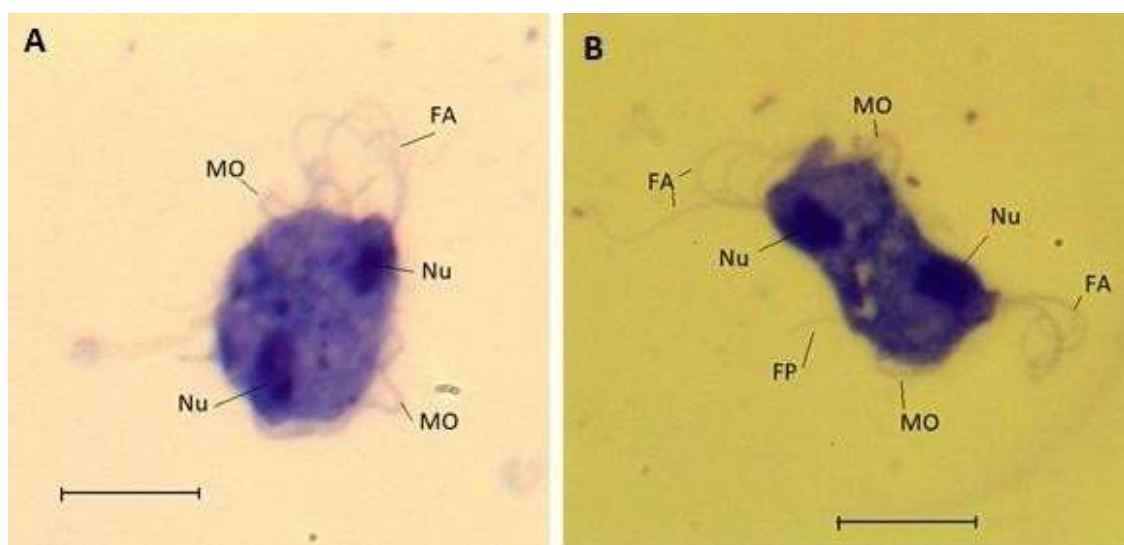


Figura 58. Trofozoítos de de *Tetratrichomonas* sp de ovinos em processo de divisão binária. Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax), flagelo posterior (FP) e membrana ondulante (MO). (Barra= 10µm). Panótico rápido®. Obj. 100.

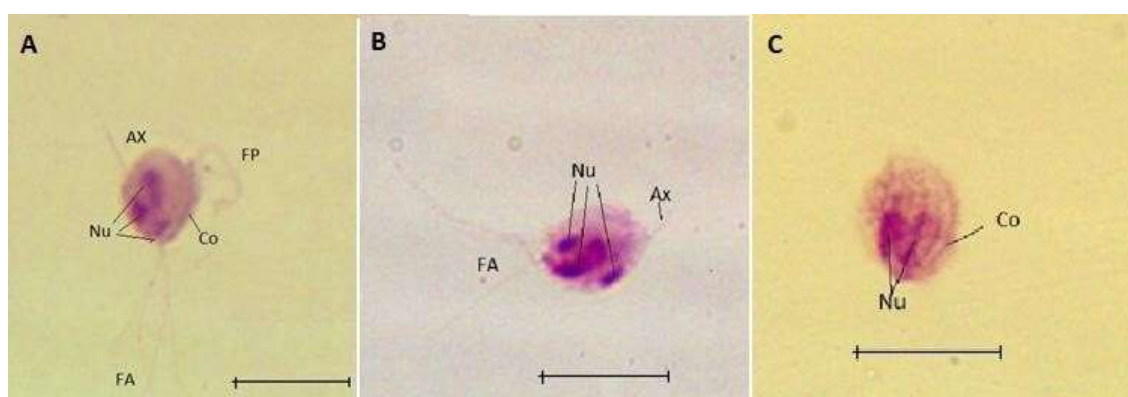


Figura 59. *Tetratrichomonas* sp de caprino em processo de divisão celular, múltipla (A e B) e Pseudocisto em processo de divisão apresentando dois núcleos (C). Núcleo (Nu), flagelos anteriores (FA), axóstilo (Ax), costa (Co) e flagelo posterior (FP). Panótico rápido®. Barra= 10µm..

Em condições desfavoráveis, estes flagelados internalizam seus flagelos e assumiam o formato arredondado, saindo da forma vegetativa, trofozoíta, e assumindo a forma de resistência, com formato arredondado, sem membrana ondulante, conhecido como pseudocisto. Esta forma de resistência foi observada nos isolados de caprinos, mas não nos de ovinos. Segundo Samuels (1957) os pseudocistos são formas degenerativas desses protozoários. No entanto, nós observamos pseudocistos em processo de divisão celular (Figura 59 C), como relatado por Pereira-Neves et al. (2003). Segundo eles, a formação de pseudocistos é um processo reversível, e as estruturas internas das células possuem morfologia normal. Além disso, já foi comprovado que os pseudocistos são capazes de causar infecção *in vivo*, sendo mais infectante que a forma trofozoíta (AFZAN et al., 2012; CASTRO et al., 2016).

O tamanho médio dos isolados de caprinos e ovinos foi semelhante, no entanto estas médias são maiores que as relatadas em outras espécies de *Tetratrichomonas*, inclusive *T. ovis* (ANDERSEN et al., 1962). Na Tabela 8 é possível comparar as mensurações entre estes isolados e outros descritos como pertencentes ao gênero de *Tetratrichomonas*. A partir destas comparações foi possível observar que os isolados de caprinos e ovinos apresentaram características compatíveis com as do gênero *Tetratrichomonas*, como tamanho, forma, número de flagelos anteriores, tipo de membrana ondulante, flagelo recorrente e axóstilo (CEPICKA et al., 2006; RIVERA et al., 2008).

Com este estudo podemos ampliar nosso conhecimento a cerca da espécie *Tetratrichomonas* sp, até então nunca descrita em pequenos ruminantes, e o achado de dois isolados com tantas semelhanças, morfológicas, fisiológicas e genotípicas em espécies distintas, caprina e ovina, de regiões geográficas distantes é particularmente interessante.

Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero *Tetratrichomonas* observadas em diferentes hospedeiros.

Espécie (Referências/hospedeiros)	<u>Corpo</u>		<u>Núcleo</u>		Flagelo Anterior	Membrana Ondulante	Projeção do Axóstilo
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura			
<i>T. gallinarum</i> Martin e Robertson (1911)	- (5,4-15)	- (3-9)	-	-	Comp. Igual	Comp. Total do corpo.	(1-6)
<i>T. brumpti</i> Alexeieff (1912)	9 (5,5-13)	7,25 (3,5-11)	3 (2,4)	2,5 (1,5-2,5)	3 a 4 (15,5-23)	9 (6,5 -12)	Pequeno e fino
<i>T. didelphidis</i> Hegner and Ratcliffe (1927)	7,7 (4,8-11,2)	4,2 (3,2-8,8)	(3,6-4,7)	(2,4-3,6)	(14-17)	17,2 (11-29,2)	(0,16- 0,14)
<i>T. limacis</i> Kozloff (1945)	14 (11-17)	10,5 (8,0-13)	- (3,6-4,7)	- (2,4-3,6)	- (10-15)	-	(0,16- 0,14)
<i>T. microti</i> Wenrich and Saxe (1950)	(4-9)	-	-	-	-	-	Pequeno
<i>T. prowazeki</i> Honigberg (1951)	10,5 (5,5-22)	5,5 (3,5-18,5)	(2-4)	(1,5-3,5)	Tamanho desiguais	10 (7,5-13)	(2,0 -7,5)
<i>T. buttreysi</i> Hibler et al. (1960)	6 (4-7)	3 (2-5)	(2-3)	(1-2)	Tamanho desigual	(3-5)	(3-6)

Continua

Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero *Tetratrichomonas* observadas em diferentes hospedeiros.

Continuação

Espécie (Referências/hospedeiros)	Corpo		Núcleo		Flagelo Anterior	Memb. Ondulante	Projeção do Axóstilo
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura			
<i>T. buttreysi</i> Hibler et al. (1960)	6 (4-7)	3 (2-5)	(2-3)	(1-2)	Tamanho desigual	(3-5)	(3-6)
<i>T. ovis</i> Andersen et al. (1962)	7 (6-9)	6 (4-8)	3 (2,2-3,9)	2,4 (1,7-3,4)	Tamanho desigual	(2-3)	5,2 (2,2-7,8)
<i>T. undula</i> Cepicka et al. (2010)	6,4 (4,5-7,8)	5,8 (4,1-7,9)	-	-	Tamanho desigual	Pequena ondulação	(1,6-4,3)
<i>Teratrichomonas sp</i> Ibañez-Escribano et al. (2013) Tamanduá	6,8 (6,1-9)	4,6 (3,5-6)	-	-	Tamanho desigual	(3-4)	(4-6)

Continua

Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero *Tetratrichomonas* observadas em diferentes hospedeiros.

Continuação

Espécie (Referências/hospedeiros)	Corpo		Núcleo		Flagelo Anterior	Memb. Ondulante	Projeção do Axóstilo
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura			
<i>Teratrichomonas</i> sp. Dos Santos et al. (2017) Primatas não humanos	8,8 (5,8-12,6)	5,9 (3,3- 9)	2,8 (1,7-3,9)	2 (1,6-2,9)	4 Tamanho Semelhante	4 ondulações (3- 10,4)	(3- 10,4)
<i>T. ovis</i> Andersen et al. (1962)	7 (6-9)	6 (4-8)	3 (2,2-3,9)	2,4 (1,7-3,4)	Tamanho desigual	(2-3)	5,2 (2,2-7,8)
Ovinos							
<i>Teratrichomonas</i> sp. Isolado de caprinos Presente estudo	10,3 (4,6–19)	7,2 (3,5-13,5)	3,8 (2,0- 6,0)	2,7 (1,0-4,5)	4 Tamanho desigual	2-4 ondulações	4,3
<i>Teratrichomonas</i> sp. Isolado de ovino Presente estudo	10,0 (7–15)	5,7 (3-13)	3,9 (1,8- 5,7)	2,8 (1,5- 4,8)	4 Tamanho desigual	2 ondulações	-

Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero *Tetratrichomonas* observadas em diferentes hospedeiros.

Espécie (Referências/hospedeiros)	<u>Corpo</u>		<u>Núcleo</u>		Flagelo Anterior	Membrana Ondulante	Projeção do Axóstilo
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura			
<i>T. gallinarum</i> Martin e Robertson (1911)	- (5,4-15)	- (3-9)	-	-	Comp. Igual	Comp. Total do corpo.	(1-6)
<i>T. brumpti</i> Alexeieff (1912)	9 (5,5-13)	7,25 (3,5-11)	3 (2,4)	2,5 (1,5-2,5)	3 a 4 (15,5-23)	9 (6,5 -12)	Pequeno e fino
<i>T. didelphidis</i> Hegner and Ratcliffe (1927)	7,7 (4,8-11,2)	4,2 (3,2-8,8)	(3,6-4,7)	(2,4-3,6)	(14-17)	17,2 (11-29,2)	(0,16- 0,14)
<i>T. limacis</i> Kozloff (1945)	14 (11-17)	10,5 (8,0-13)	- (3,6-4,7)	- (2,4-3,6)	- (10-15)	-	(0,16- 0,14)
<i>T. microti</i> Wenrich and Saxe (1950)	(4-9)	-	-	-	-	-	Pequeno
<i>T. prowazeki</i> Honigberg (1951)	10,5 (5,5-22)	5,5 (3,5-18,5)	(2-4)	(1,5-3,5)	Tamanho desiguais	10 (7,5-13)	(2,0 -7,5)
<i>T. buttreysi</i> Hibler et al. (1960)	6 (4-7)	3 (2-5)	(2-3)	(1-2)	Tamanho desigual	(3-5)	(3-6)

Continua

Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero *Tetratrichomonas* observadas em diferentes hospedeiros.

Continuação

Espécie (Referências/hospedeiros)	Corpo		Núcleo		Flagelo Anterior	Memb. Ondulante	Projeção do Axóstilo
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura			
<i>T. buttreysi</i> Hibler et al. (1960)	6 (4-7)	3 (2-5)	(2-3)	(1-2)	Tamanho desigual	(3-5)	(3-6)
<i>T. ovis</i> Andersen et al. (1962)	7 (6-9)	6 (4-8)	3 (2,2-3,9)	2,4 (1,7-3,4)	Tamanho desigual	(2-3)	5,2 (2,2-7,8)
<i>T. undula</i> Cepicka et al. (2010)	6,4 (4,5-7,8)	5,8 (4,1-7,9)	-	-	Tamanho desigual	Pequena ondulação	(1,6-4,3)
<i>Teratrichomonas sp</i> Ibañez-Escribano et al. (2013) Tamanduá	6,8 (6,1-9)	4,6 (3,5-6)	-	-	Tamanho desigual	(3-4)	(4-6)

Continua

Tabela 8. Aspectos comparativos das espécies do gênero *Tetratrichomonas* observadas em diferentes hospedeiros.

Continuação

Espécie (Referências/hospedeiros)	Corpo		Núcleo		Flagelo Anterior	Memb. Ondulante	Projeção do Axóstilo
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura			
<i>Teratrichomonas</i> sp. Dos Santos et al. (2017) Primatas não humanos	8,8 (5,8-12,6)	5,9 (3,3- 9)	2,8 (1,7-3,9)	2 (1,6-2,9)	4 Tamanho Semelhante	4 ondulações (3-10,4)	(3- 10,4)
<i>T. ovis</i> Andersen et al. (1962)	7 (6-9)	6 (4-8)	3 (2,2-3,9)	2,4 (1,7-3,4)	Tamanho desigual	(2-3)	5,2 (2,2-7,8)
Ovinos							
<i>Teratrichomonas</i> sp. Isolado de caprinos Presente estudo	10,3 (4,6–19)	7,2 (3,5-13,5)	3,8 (2,0- 6,0)	2,7 (1,0-4,5)	4 Tamanho desigual	2-4 ondulações	4,3
<i>Teratrichomonas</i> sp. Isolado de ovino Presente estudo	10,0 (7–15)	5,7 (3-13)	3,9 (1,8- 5,7)	2,8 (1,5- 4,8)	4 Tamanho desigual	2 ondulações	-

6. CONCLUSÕES

- Parabasalídeos são frequentes em pequenos ruminantes e suínos, e deve ser incluídos como diagnóstico diferencial de disenterias não só em suínos como em pequenos ruminantes;
- O meio CHD foi o melhor para se isolar parabasalídeos, com menor contaminação bacteriana e maior multiplicação de trofozoítas; sendo a vaselina líquida é um excelente aliado no isolamento desses flagelados;
- Os estudos de cinética de crescimento auxiliam na manutenção desses isolados em meio de cultivo;
- Esses parabasalídeos são incapazes de se desenvolver em meio de cultivo CHD sem a presença de bactérias;
- *Tetratrichomonas* spp pode pertencer à microbiota comensal e sua atividade probiótica, precisa ser investigada;
- O método de panótico rápido auxilia na identificação desses flagelados;
- *Tetratrichomonas* spp é frequentemente encontrados em pequenos ruminantes, e a relação parasita-hospedeiro precisa ser investigada;
- A análise morfológica forneceu dados suficientes para caracterizar o gênero de *Tetratrichomonas* spp isolados de fezes de pequenos ruminantes;
- As análises moleculares confirmaram a presença de *Tetratrichomonas* spp nas amostras de pequenos ruminantes estudadas, e o sequenciamento apresentou similaridades entre a cepa estudada com outras sequencias da mesma espécie depositadas no Genbank;
- As análises moleculares confirmaram que suínos podem ser acometidos por diferentes espécies de parabasalídeos, sendo imprescindível um correto diagnóstico, visto que alguns desses podem acarretar prejuízos ao animal;
- As enzimas de restrição são ferramentas moleculares importantes e podem ser utilizadas com segurança para auxiliar na identificação das espécies;
- Os *primers* atualmente utilizados para a detecção de *P. hominis* não são espécie-específico como proposto;
- A junção das técnicas de diagnóstico empregadas permitiu um diagnóstico mais específico de *Tetratrichomonas* sp isolados de amostras fecais de pequenos ruminantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S. M.; LEANDER, B. S.; SIMPSON, A. G. B.; ARCHIBALD, J. M.; ANDERSON, O. R.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FARMER, M. A.; KARPOV, S.; KOLISKO, M.; LANE, C. E.; LODGE, D. J.; MANN, D. G.; MEISTERFELD, R.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STAN-DRIDGE, S. E.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology*, v. 56, p. 684-689, 2007.
- AFFONSO, A. L.; ALMEIDA, J. C. A.; BENCHIMOL, M. Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. *European Journal of Cell Biology*, v. 72, p. 247-256, 1997.
- AFZAN M. Y.; SURESH K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitology Research*, v. 111, p. 371-381, 2012.
- AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; COSTA, V. M. M.; SOARES, H. S. Parasitas gastrintestinais de caprinos e ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, p. 212-218, 2008.
- ALEXEIEFF, A. Sur quelques protistes parasites d'une tortue de Ceylan (*Nicoria trijuga*). *Zoologischer Anzeiger*, v. 40, p. 97-105, 1912.
- ALMEIDA, J. C.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W.; OKOROKOV, L. A. Ca^{2+} sequestering in the early-branching amitochondriate protozoan *Tritrichomonas foetus*: an important role of the Golgi complex and its Ca^{2+} -ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1615, p. 60-68, 2003.
- ALSTAD, A. D.; KROGH, D.; FISCHER, K.; GUSTAFSON, S.; CASSEL, G.; REICHERT, L.; BASZLER, T. Trichomoniasis in a beef herd. *Veterinary Medicine*, v. 79, p. 708-709, 1984.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J.; Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMIN, A.; NEUBAUER, C.; LIEBHART, D.; GRABENSTEINER, E.; HESS, M. Axenization and optimization of in vitro growth of clonal cultures of *Tetratrichomonas gallinarum* and *Trichomonas gallinae*. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 202-208, 2010.
- ANDERSEN, F. L.; LEVINE, N. D.; HAMMOMD, D. M. The morphology of *Trichomonas ovis* from the cecum of domestic sheep. *Journal of Parasitology*, v. 48, p. 589-595, 1962.
- ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 10, p. 439-461, 1994.
- ANDREWS, J. M.; REES, G. W. Experimental *Trichomonas foetus* infection in sheep. *Journal of Parasitology*, v. 22, p. 108-108, 1936.

- APPEL, L.; MICKELSEN, W. D.; THOMAS, M. H.; HARMON, W. M. A comparison of techniques used for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infections in beef bulls. *Agri-practice*, v.14, p. 30-34, 1993.
- ARASE, M.; YAMASHITA, M.; MIMASU, M.; MIZUNO, S; YAMADA, K.; OHKUSU, K. A first case report of empyema caused by *Tetratrichomonas* species in Japan. *The Japanese Journal of Clinical Pathology*, v. 62, p. 1197-1202, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório anual 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em: 03 Abr. 2018.
- ASSOCIAÇÃO SERGIPANA DOS CRIADORES DE CAPRINOS E OVINOS (ASCCO). Vantagens e benefícios da carne de carneiro. *Equipe Capril Virtual*, 2014. Disponível em: <<http://www.caprilvirtual.com.br/noticias3p.php?recordID=5625>>. Acesso em: 02 abr. 2018.
- BÄR A. K.; PHUKAN N.; PINHEIRO J.; SIMÕES-BARBOSA A. The interplay of host microbiota and parasitic protozoans at mucosal interfaces: Implications for the outcomes of infections and diseases. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 9, p. 1-12, 2015.
- BARRATT, J. L.; HARKNESS, J.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. T.; STARK, D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes*, v. 2, p. 3-12, 2011.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v.10, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, v. 81, p. 459-464, 1995.
- BENCHIMOL, M.; ALMEIDA, J. C.; DE SOUZA, W. Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue and Cell*, v. 28, p. 287-299, 1996.
- BENCHIMOL, M.; BATISTA, C.; DE SOUZA, W. Fibronectin and lamin mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 22, p. 39-45, 1990.
- BENCHIMOL, M.; DE ALMEIDA, L. G.; VASCONCELOS, A. T.; DE ANDRADE ROSA, I., BOGO, M. R.; KIST, L. W.; DE SOUZA, W. Draft genome sequence of *Tritrichomonas foetus* strain K. *Genome announcements*, v. 5, p.16-17, 2017.
- BENCHIMOL, M.; DE ANDRADE R. I.; DA SILVA F. R.; BURLA D. A. J. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitology Research*, v. 102, p. 597-604, 2008.
- BENCHIMOL, M.; DINIZ, J. A.; RIBEIRO, K. The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. *Tissue and Cell*, v. 32, p. 178-187, 2000.
- BENCHIMOL, M.; ELIAS, C. A.; DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of basic proteins and carbohydrates. *Experimental Parasitology*, v.54, p. 135-144, 1982.
- BENCHIMOL, M.; ENGELKE, F. Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biology of the Cell*, v. 95, p. 283-293, 2003.

- BENCHIMOL, M.; KACHAR, B.; DE SOUZA, W. Surface domains in the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Protozoology*, v. 34, p. 480-484, 1992.
- BENCHIMOL, M.; KACHAR, B.; DE SOUZA, W. The structural organization of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus* as seen in replicas of quick frozen, freeze fractured and deep etched cells. *Biology of the Cell*, v. 77, p. 289-295, 1993.
- BENCHIMOL, M.; RIBEIRO, K. C.; MARIANTE, R. M.; ALDERETE, J. F. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *European Journal of Cell Biology*, v. 80, p. 593-607, 2001.
- BONDURANT, R. H. Diagnosis, treatment and control of bovine trichomoniasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 7, p. 179- 188, 1985.
- BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; TEIXEIRA, W. C.; GUERRA, R. M. S. N. C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no Estado do Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 967-974, 2009.
- BRUGEROLLE, G. Sur l'existence de vrais kystes chesles Trichomonadines intestinalis. Ultrastructure des kystes de *Trichomitus batrachorum* Perty 1852, *Trichomitus sanguisugae* Alexeieff 1911, et *Monocercomonas tipulae* Mackinnon 1910. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v. 277, p. 2193-2196, 1973.
- BRUGEROLLE, G.; LEE, J. J.; *Phylum Parabasalia, illustrated guide to the protozoa*. In: LEE, J.J.; LEEDALE, G.F.; PATTERSON, D.J.; BRADBURY, P.C. (Eds.), Allen Press Inc, 2nd ed. Lawrence, p. 1196-1249, 2001.
- CACCIÒ, S. M.; SANNELLA, A. R.; MANUALI, E.; TOSINI, F.; SENSI, M.; CROTTI, D.; POZIO, E. Pigs as Natural Hosts of *Dientamoeba fragilis* Genotypes Found in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, p. 838-841, 2012.
- 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 beef bulls in Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 112, p. 167-175, 2003.
- CARREIRO, C. C.; COELHO, C. D.; JORGE, J. L. B. P.; COSTA, N. O. G.; DO VALLE PAIVA, R.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; DE JESUS, V. L. T. Parasitos intestinais em suínos confinados em uma criação no município de Pinheiral, RJ. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 38 (Supl. 2), p.117-122, 2016.
- CARREIRO, C.C. *Parabasalídeos em leitões em uma criação de suínos localizada na microrregião de Itaguaí, RJ*. 2014. 71 f. Dissertação. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Seropédica, 2014.
- CARTER, J. E; WHITHAUS, K. C. Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 78, p. 17-19, 2008.
- CASTELLA, J.; MUNOZ, E.; FERRER, D.; GUTIERREZ, J. Isolation of the trichomonad *Tetratrichomonas buttrei* (Hibler et al., 1960) Honigberg, 1963 in bovine diarrhoeic faeces. *Veterinary Parasitology*, v. 70, p. 41-45, 1997.

- CASTRO C.; MENNA-BARRETO R. F. S.; FERNANDES N. D. S.; SABOIA-VAHIA L.; DIAS-LOPES G.; BRITTO C.; CUERVO P.; DE JESUS J. B. Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology*, v. 143, p. 1034-42, 2016.
- CEPICKA, I.; HAMPL, V.; KULDA, J.; FLEGR, J. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular and Phylogenetics Evolution*, v. 39, p. 542–551, 2006
- CEPICKA, I.; HAMPLB, V.; KULDAB, J. Taxonomic Revision of Parabasalids with description of one New Genus and three New Species. *Protist*, v. 161, p. 400-433, 2010.
- CEPICKA, I.; KUTISOVÁ, K.; TACHEZY, J.; KULDA, J.; FLEGR, J.; Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 11–21, 2005.
- CHAOQUN YAO, M. D. Opportunistic Human Infections Caused by *Tritrichomonas* species. A Mini-Review. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 34, p. 128-131, 2012.
- CHUNGE, R. N.; SIMWA, J. M.; KARUMBA, P. N.; KENYA, P. R.; KINOTI, S. N.; MATTUNGA, J.; NAGELKERKE, N. Comparative aetiology of childhood diarrhoea in Kakamega and Kiambu Districts, Kenya. *East African Medical Journal*, v. 69, p. 437-441, 1992.
- COBO, E. R.; CAMPERO, C. M.; MARIANTE, R. M.; BENCHIMOL, M. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 195-211, 2003.
- COBO, E. R.; CANTON, G.; MORRELL, E.; CANO, D.; CAMPERO, C. M. Failure to establish infection with *Tetratrichomonas* sp. in the reproductive tracts of heifers and bulls. *Veterinary Parasitology*, v. 120, p. 145-150, 2004.
- COBO, E.R.; FAVETTO P.H.; LANE, V. M.; FRIEND, A.; VANHOOSER, K.; MITCHELL, J.; BONDURANT, R.H. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology*, v. 68, p. 853-860, 2007.
- COHEN, C. R.; PLUMMER, F. R.; NUGO, N.; MACLEAN, I.; SHEM, C.; BURKUSI, E. A.; IRUNGU, E.; SINEI, S.; BWAYO, I.; BRUNHAM, R. C. Increased interleukin-10 in the endocervical secretions of women with not-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission? *Aids*, v.13, p. 327-332, 1999.
- COMPAORE, C.; KEMTA, L. F.; NEBIE, L.; NIAMBA, P.; NIAKARA, A. *Pentatrichomonas hominis* infection in rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Rheumatology*, v. 52, p. 1534-1535, 2013.
- CROTTI, D.; D'ANNIBALE M. L.; FONZO, G; LALLE, M.; CACCIO, S. M.; POZIO, E. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite*, v. 12, p. 165-170, 2005.
- CRUCITTI, T.; ADELLATI, S.; ROSS, D. A.; CHANGALUCHA, J.; DYCK, E.; BUVE, A. Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, p. 510-516, 2004.
- DA SILVA, M. R. L.; DE SOUZA, E. A.; BONELLI, E. A.; MEDEIROS, M. O.; DA SILVA, G. F.; QUEIROZ, E. O. Parasitas gastrintestinais de ovinos criados na região de Rondonópolis-MT. *Biodiversidade*, v. 9, p. 67-73, 2011.
- DAHLGREN, S. S.; GJERDE, B.; PETTERSEN, H. Y. First record of natural *Tritrichomonas*

- DE CARLI, G. A.; GUERRERO, J. Antigenic comparison between *Tritrichomonas suis* and *T. foetus*. II. Gel immunodiffusion. *Reviews Microbiology*, v. 18, p. 167-171, 1976.
- DE CARLI, G. A.; GUERRERO, J. Comparação antigênica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. Imunofluorescência indireta (IFI). *Revista Latinoamericana Microbiologia*, v. 6, p. 55-58, 1975.
- DE CARLI, G. A.; GUERRERO, J. Comparação antigênica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. III. Imunoeletroforese (IEF). *Revista Latinoamericana Microbiologia*, v. 8, p. 107-109, 1977.
- DE CARLI, G.A.; TASCA, T.; PIRES BORGES, F. *Tritrichomonas foetus*: a scanning electron microscopy study of erythrocyte adhesion associated with hemolytic activity. *Veterinary Research*, v. 35, p. 123-130, 2004.
- DE SOUZA, W.; BENCHIMOL, M. Electron spectroscopic imaging of calcium in the hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 20, p. 619-621, 1988.
- DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; VISCOGLIOSI, E.; GERBOD, D.; KULDA, J.; SOGIN, M.L.; EDGCOMB, V. P. Molecular phylogeny of parabasalids based on small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Trichomonadinae subfamily. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 47, p. 70-75, 2000.
- DIAMOND, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology*, v. 43, p. 488-490, 1957.
- DIMASUAY, K. G. B.; RIVERA, W. L. Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology*, v. 196, p. 289-295, 2013
- DIMOCK, W. W. Infectious necrotic enteritis in swine. *News American Veterinary*, v. 3, p. 39-405, 1992.
- DOI, J.; ABE, N.; OKU, Y. Molecular survey of *Tritrichomonas suis* (*T. foetus*) “cat” and “cattle” genotypes in pigs in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 75, p. 475-479, 2013.
- DOS SANTOS, C. S. D.; JESUS, V. L. T. D.; MCINTOSH, D.; BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, p. 980-988, 2015.
- DOS SANTOS, C. S.; DE JESUS, V. L. T.; MCINTOSH, D.; CARREIRO, C. C.; BATISTA, L. C. O.; DO BOMFIM LOPES, B.; LOPES, C. W. G. Morphological, ultrastructural, and molecular characterization of intestinal tetratrichomonads isolated from non-human primates in southeastern Brazil. *Parasitology research*, v. 116, p. 2479-2488, 2017.
- DUBOUCHER, C. D; NOËL, G. B.; DURAND-JOLY, I.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; LECLERC, C.; PHAM, S.; CAPRON, M.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI, E. Frequency of trichomonads as coinfecting agents in *Pneumocystis pneumonia*. *Acta Cytologica*, v. 49, p. 273-277, 2005.
- DUBOUCHER, C.; DUBOUCHER, C.; CABY, S.; DUFRERNEZ, F.; CHABÉ, M.; NAUSICAA, G.; VISCOGLIOSI, P. D.; BILLY, C.; BARRÉ, E.; TORABI, E.; MONIQUE, C.; PIERCE, R. J.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI, E. Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. *Human Pathology*, v. 34, p. 508-511, 2003.

- DUBOUCHER, C.; CABY, S.; DUFRERNEZ, F.; CHABE, M.; GANTOIS, N.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; BILLY, C.; BARRE, E.; TORABI, E.; CAPRON, M.; PIERCE, R. J.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI, E. Molecular identification of *Tritrichomonas foetus* like organisms as coinfecting agents of human Pneumocystis pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 165-1168, 2006.
- DUBOUCHER, C.; MOGENET, M.; PÉRIÉ, G. Salivary trichomoniasis: a case report of infestation of a submaxillary gland by *Trichomonas tenax*. *Archives of Pathology*, v. 119, p. 277-279, 1995.
- DUFRERNEZ, F.; WALKER, R.; NOE, C.L.; CABY,S.; MANTINI,C.; DELGADOVISCOGLIOSI, P.; OHKUMA, M.; KUDO, T.; CAPRON, M.; PIERCE, R. J.; VILLANUEVA, M. R.; VISCOGLIOSI, E. Morphological and Molecular Identification of Non-*Tritrichomonas foetus* Trichomonad Protozoa from the Bovine Preputial Cavity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 54, p. 161-168, 2007.
- FARMER, M.A. Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n. g., n. sp. (Parabasalia) and its relationships to amitochondrial protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 40, p. 619-626, 1993.
- FELLEISEN, R. S. J. Comparative genetic analysis of Tritrichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique. *Parasitology Research*, v. 84, p. 153-156, 1998.
- FELLEISEN, R. S. J. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology*, v. 115, p. 111-119, 1997.
- FERNANDES, P. R.; DA SILVA, A. C.; GAMBARINI, M. L.; LINHARES, G. F. C. Construção de iniciadores e otimização de ensaios de PCR e de nested-PCR para a detecção específica de *Tritrichomonas foetus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 133-138, 2008.
- FITZGERALD, P. R.; HAMMOND, D. M.; SHUPE, L. G. Studies on the role of thichomonads in the production of atrophic rhinitis in pigs. *Cornell Veterinarian*, v. 44, p. 302-310, 1954.
- FITZGERALD, P. R.; JOHNSON, A. E.; HAMMOND, D. M.; THORNE, J. L.; HIBLER, C. P. Experimental infection of young pigs following intranasal inoculation with nasal, gastric or cecal trichomanads from swine or with *Trichomnas foetus*. *Journal of Parasitology*, v. 44, p. 597-602, 1958a.
- FITZGERALD, P. R.; JOHNSON, A. E.; THORNE, J. L.; HAMMOND, D. M. Experimental infection of the bovine genital tract with Trichomonads from swine. *Journal of Parasitology*, v. 19, p. 775-779, 1958b.
- FLICK, E. W.; Experimental analysis of some factors influencing varation in the flagellar number of *Trichomonas hominis* from man and other primates and their relationship to nomenclature. *Experimental Parasitology*, v. 3, p. 105-121, 1954.
- FOSTER, D. M.; GOOKIN, J. L.; POORE, M. F.; STEBBINS, M. E.; LEVY, M. G. Outcome of cats with diarrhoea and *Tritrichomonas foetus* infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 225, p. 888-892, 2004.
- FREITAS, F. L. D. C.; ALMEIDA, K. D. S.; DO NASCIMENTO, A. A.; MACHADO, C. R.; VESCHI, J. L.; MACHADO, R. Z. Espécies do gênero *Eimeria Schneider*, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) em caprinos leitros mantidos em sistema intensivo na região

de São Jose do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia veterinária*, v. 14 , p. 7-10, 2005.

- FREY, C. F.; MÜLLER, N.; STÄUBER, N.; MARREROS, N.; HOFMANN, L.; HENTRICH, B.; HIRSBRUNNER, G. Simplicimonas-like DNA in vaginal swabs of cows and heifers cross-reacting in the real-time PCR for *T. foetus*. *Veterinary parasitology*, 237, 30-36, 2017.
- FREY, C. F.; SCHILD, M.; HEMPHILL, A.; STÜNZI, P.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B.; BURGNER, I. A. Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR. *Parasitology Research*, v. 104, p. 783-788, 2009.
- FRIEDHOFF, K. T.; KUHNIGK, C.; MÜLLER, I. Experimental infections in chickens with *Chilomastix gallinarum*, *Tetratrichomonas gallinarum*, and *Tritrichomonas eberthi*. *Parasitology Research*, v. 77, p. 329-334, 1991.
- GERBASE, A. C.; ROWLEY, J. T.; BERKLEY, S. F. D.; PIOT, P. Global prevalence and incidence estimates of selected curables STDs. *Sexually Transmitted Infections*. v. 74, p.12-16. 1998.
- GERMOT, A.; PHILIPPE, H.; AND LE GUYADER, H. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, p.14614-14617, 1996.
- GILROY, S. A.; SIMCUSKI, E.; RAWLING, R. A.; GRANATO, P. A. *Trichomonas* species empyema coinfection in an alcoholic female. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.29, p. 69–71, 2007.
- GONSALVES, H. R. O.; DE SOUSA MONTE, A. L.; VILLARROEL, A. B. S.; DAMACENO, M. N.; CAVALCANTE, A. B. D. Qualidade da carne de caprinos e ovinos: uma revisão. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 8, p. 11-17, 2012.
- GONSALVES, H. R. O.; DE SOUSA MONTE, A. L.; VILLARROEL, A. B. S.; DAMACENO, M. N.; CAVALCANTE, A. B. D. Qualidade da carne de caprinos e ovinos: uma revisão. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 8, p. 11-17, 2012.
- GOOKIN, J. L.; BIRKENHEUER, A. J.; St JOHN, V.; SPECTOR, M.; LEVY, M. G. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 939-943, 2005.
- GOOKIN, J. L.; LEVY, M. G.; MAC LAW, J.; PAPICH, M. G.; POORE, M. F.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 1690-1697, 2001.
- GOOKIN, J. L.; STAUFFER, S. H.; COCCARO, M. R.; MARCOTTE, M. J.; LEVY, M. G. Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. *American Journal of Veterinary Research*, v. 68, p. 783-787, 2007.
- GOOKIN, J.L., BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERDT, E.B., LEVY, M.G., Single-Tube Nested PCR for Detection of *Tritrichomonas foetus* in Feline Feces. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 4126–4130, 2002.
- GOOKIN, J.L.; STEBBINS, M.E.; HUNT, E.; BURLONE, K.; FULTON, M.; HOCHEL, R.; TALAAT, M.; POORE, M.; LEVY, M.G. Prevalence of and risk factors for feline

- Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 2707–2710, 2004.
- GOOKIN, J.L.; STONE, M.R.; YAEGER, M.J.; MEYERHOLZ, D.K.; MOISAN, P. Fluorescence *in situ* hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomonosis. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 139-143, 2010.
- GRAHN, R. A.; BonDURANT, R. H.; HOOSEAR, K. A.; WALKER, R.L.; LYONS, L.A. An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p. 33-41, 2005.
- GRANGER, B.L.; WARWOOD, S.J.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, v. 86, p. 699-709, 2000.
- GRELLET, A.; BRUNOPOLACK, F. A.; BOUCRAUT-BARALON, C.; GRANDJEAN, D.; VANDEWYNCKEL, L.; CIAN, A.; MELONI, D.; VISCOGLIOSI, E. Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Veterinary Parasitology*, v. 197, p. 418-26, 2013.
- GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B., CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, p. 577-584, 1993.
- GUNN-MOORE, D.; McCANN, T.; SIMPSON, K. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhea in the UK. *Journal of Feline Medicine Surgery*, v. 9, p. 214- 218, 2007.
- HALE, S.; NORRIS, J. M.; S LAPETA, J. Prolonged resilience of *Tritrichomonas foetus* in cat faeces at ambient temperature. *Veterinary Parasitology*, v. 166, p. 60-65, 2009.
- HANKS, J. H.; WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, v. 71, p. 196-200, 1949.
- HAYES, D. C.; ANDERSON, R. R.; WALKER, R. L. Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, p. 390-394, 2003.
- HEGGENESS, M. H.; SIMON, M.; SINGER, S. J. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 75, p. 3863-3866, 1978.
- HEGNER, R.; ALICATA, J. E. Trichomonad flagellates in facial lesion of a pig. *Journal of Parasitology*, v. 24, p. 554, 1938.
- HEGNER, R.; RATCLIFFE, H. Trichomonads from the vagina of the monkey, from the mouth of the cat and man, and from the intestine of the monkey, opossum and prairie- dog. *Journal of Parasitology*, v. 14, p. 27–35, 1927.
- HEINE, P.; MCGREGOR, T. A. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 36, p. 137-144, 1993.
- HIBLER, C. P.; HAMMOND, D. M.; CASKEY, F. H.; JOHNSON, A. E.; FITZGERALD, P. R. The morphology and incidence of the trichomonads of swine, *Tritrichomonas suis*

- (Gruby & Delafond), *Tritrichomonas rotunda*, n.sp. and *Trichomonas buttreysi* sp. *Journal of Protozoology*, v. 7, p. 159-171, 1960.
- HO, M. S.; Conrad, P. A.; Conrad, P. J.; LeFebvre, R. B.; Perez, E.; & BonDurant, R. H. Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *Journal of clinical microbiology*, v. 32, p. 98-104, 1994.
- HONIGBERG B. M. Trichomonad found outside the urogenital tract of humans. *Trichomonads Parasitic in Humans. Springer New York*, p. 342-393, 1990.
- HONIGBERG, B. M.; MATTERN, C. F.; DANIEL, W. A. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *Journal of Protozoology*, v. 18, p. 183-198, 1971.
- HONIGBERG, B.M. Structure and morphogenesis of *Trichomonas prowazeki* Alexeieff and *Trichomonas brumpti* Alexeieff. *Zoology*, v. 55, p. 337-394, 1951.
- HUBY-CHILTON, F.; SCANDRETT, B. W.; CHILTON, N. B.; GAJADHAR, A. A. Detection and identification of *Tetratrichomonas* in a preputial wash from a bull by PCR and SSCP. *Veterinary parasitology*, v. 166, p. 199-204, 2009.
- IBAÑEZ-ESCRIBANO, A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; DELCLAUX, M.; MARTINEZ-NEVADO, E.; PONCE-GORDO, F. Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Research in veterinary science*, v. 95, p. 176-181, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (IBGE). Agropecuária puxa o PIB de 2017. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>>. Acesso em: 03 Abr. 2018.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (IBGE). Produção da agropecuária municipal 2016, v. 44, p.1-51, 2016. Disponível em:< https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>. Acesso em: 03 Abr. 2018.
- ISLAM, M. R.; TALUKDER, M. H.; HOSSAIN, M. B.; KARIM, M. A. Investigation of sexually transmitted protozoan parasite *Tritrichomonas foetus* in cattle in Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, v.15, 47-54, 2017.
- JACOBSEN E. B.; FRIIS-MOLLER A.; FRIIS J. *Trichomonas* species in a subhepatic abscess. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 6, p. 296-297, 1987.
- KAZANOWSKA, W. A.; KUCZYNSKA, K.; DUBIEL, C. The behaviour of vaginal mucosa in guinea pig infected with various species of Trichomonads. *Wiadomości Parazytologiczne*, v. 11, p. 53-56, 1965.
- KELLEROVÁ, P.; TACHEZY, J. Zoonotic *Trichomonas tenax* and a new trichomonad species, *Trichomonas bixi* n. sp., from the oral cavities of dogs and cats. *International journal for parasitology*, v. 47, p. 247-255, 2017.
- KERR, W. R. Experiments in cattle with *Tritrichomonas suis*. *Veterinary Record*, v. 70, p. 613-615, 1958.
- KHARSANY, A. B.; HOOSEN, A. A.; MOODLEY, J.; BAGARATER, J.; GOWNS, E. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourinary Medicine*, v. 69, p. 357-365, 1993.

- KHAW, M.; PANOSIAN, C.B. Human antiprotozoal therapy: past, present and future. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, p. 427-432, 1995.
- KITANO, Y.; MAKINODA, K.; FURUKAWA, M.; TOYOMITSU, Y.; FUKUYAMA, T.; HIGASHIMA KAFAWA, M.; YONEMARU, M.; TOBIMATSU, M. Diarrhoea in piglets associated with trichomonad parasitism. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, v. 44, p. 473-77, 1991.
- KOZLOFF, E.N. The morphology of *Trichomonas limacis* Dujardin. *Journal of Morphology*, v. 77, p. 53-61, 1945.
- KUTISOVA, K., KULDA, J., CEPICKA, I., FLEGR, J., KOUDELA, B., TERAS, J., TACHEZY, J., Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology*, v. 131, p. 309-319, 2005.
- LETERRIER, M.; MORIO, F.; RENARD, B. T.; POIRIER, A. S.; MIEGEVILLE, M.; CHAMBREUIL, G. Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. *Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences*, v. 35, p. 83-87, 2012.
- LEVY, M. G.; GOOKIN, J. L.; POORE, M.; BIRKENHEUER, A. J.; DYKSTRA, M. J.; LITAKER, W. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. *Journal of Parasitology*, v. 89, p. 99-104, 2003.
- LEWIS, K. L.; DOHERTY, D. E.; RIBES, J. J.; SEABOLT, P.; BENSADOUN, E. S. Empyema caused by *Trichomonas*. *Chest*, v. 123, p. 291-292. 2003.
- LI, W. C.; GONG, P. T.; YING, M.; LI, J-H.; YANG, J.; LI, H.; YANG, Z-T.; ZHANG, G-C.; ZHANG, X-C. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in China. *Parasitology Research*, v. 113, p. 1795-1801, 2014.
- LI, W. C.; WANG, K.; GU, Y. Occurrence of *Blastocystis* sp. and *Pentatrichomonas hominis* in sheep and goats in China. *Parasites & vectors*, v. 11, p. 93-100, 2018.
- LI, W. C.; YING, M.; GONG, P. T.; LI, J. H.; YANG, J.; LI, H.; ZHANG X. C. *Pentatrichomonas hominis*: prevalence and molecular characterization in humans, dogs, and monkeys in Northern China. *Parasitology Research*, v. 115, p.569-574, 2016.
- LI, W.; LI, W.; GONG, P.; MENG, Y.; LI, W.; ZHANG, C.; LI, S.; YANG, J.; LI, H.; ZHANG, X.; LI, J. Molecular and morphologic identification of *Pentatrichomonas hominis* in suine. *Veterinary Parasitology*, v. 202, p.1-7, 2014.
- LINDMARK, D. G.; MÜLLER, M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 248, p. 7724-7728, 1973.
- LIPMAN, N. S.; LAMPEN, N.; NGUYEN, H. T. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. *Laboratory Animal Science*, v. 49, p. 313-315, 1999.
- LONGHI, D. A. *Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas*, 2012, 116f. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Santa Catarina, 2012.
- LOPES, L.M.S. *Tritrichomonas suis* (GRUBY & DELAFOND, 1843): diagnóstico e avaliação clínica através de diferentes meios de cultivo. 1997. 70f. Tese. Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro, IB, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Parasitologia Veterinária. Seropédica, 1997.

- LÓPEZ, L. B.; BRAGA, M. B. M.; LÓPEZ, J. O.; ARROYO, R.; FILHO, F. C. S. Strategies by which some Pathogenic Trichomonads integrate Diverse Signals in the Decision-making Process. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v. 72, p. 173-186, 2000.
- LUN, Z.-R.; CHEN, X.-G.; ZHU, X.-Q.; LI, X.-R.; XIE, M.-Q. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends in Parasitology*. v. 21, p. 122–125, 2005.
- MADRUGA, M.S; NARAIN, N.; ARRUDA, S. D.; SOUZA, J. G.; COSTA, R. G.; BESERRA, F. J. Influência da idade de abate e da castração nas qualidades físico-químicas, sensoriais e aromáticas da carne caprina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 1562-1570, 2002.
- MANCILLA-RAMIREZ, J.; GONZALEZ-YUNES, R. Diarrhea associated with *Trichomonas hominis* in a newborn infant. *Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico*, v. 46, p. 623-625, 1989.
- MANTINI C, SOUPPART L, NOEL C, DUONG TH, MORNET M, CARROGER G, DUBOUCHER, C. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in apatient with empyema. *Journal of clinical microbiology*, v. 47, p. 2336–9, 2009.
- MARITZ, J. M.; LAND, K. M.; CARLTON, J. M.; HIRT, R. P. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? *Trends in Parasitology*, v. 30, p. 333-341, 2014.
- MARTIN, C.H.; ROBERTSON, M.; Further observations on the cecal parasites of fowls, with some reference to the rectal fauna of other vertebrates. *Quarterly Journal of Microbiological Sciences*, v. 57, p. 53–81, 1911.
- MARTINS FILHO E.; MENEZES R. C. A. A. Parasitos gastrintestinais em caprinos (*Capra hircus*) de uma criação extensiva na microrregião de Curimataú, Estado da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 10, p. 41-44, 2001.
- MELONI, D.; MANTINI, C.; GOUSTILLE, J.; DESOUBEAUX, G.; MAAKAROUN-VERMESSE, Z.; CHANDENIER, J.; GANTOIS, N.; DUBOCHER, C.; FIORI, P. L.; DEI-CAS E.; DUONG, T. H.; VISCOGLIOSI E. Molecular idefication of *Pentatrichomonas hominis* in two patiens with gastrointestinal symptoms. *Journal of Clinical Pathology*, v. 64, p. 933-935, 2011.
- MIDLEJ, V. V. P. Efeitos citotóxicos de *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* em células epiteliais de oviduto bovino. 2010. 146 f. Dissertação (Biologia Celular). Universidade Federal do Rio de Janeiro, IB, CCS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. Rio de Janeiro, 2010.
- MIDLEJ, V.; VILELA; DIAS, A. B.; BENCHIMOL, M. Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 216- 230, 2009.
- MONTEIRO-LEAL, L. H.; FARINA, M.; DE SOUZA, W. Free movement of *Tritrichomonas foetus* in a liquid medium: A video-microscopy study. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v. 34, p. 206-214, 1996.
- MOODLEY, P.; CONNOLLY, C.; STURN, A. W. Interrelation ships among human immunodeficiency virus type I infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis and theprevalence of yeasts. *Journal of Infectious Diseases*, v. 185, p. 69-73, 2002.

- MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; CIACCI, J.R.; AMARAL, A.L.; BARIONI, W. JR. Comunicado técnico. EMBRAPA. CT / 178 / EMBRAPA–CNPQA, p. 1–4. Junho/1991.
- MORGAN, B. B. *Bovine trichomoniasis*. Minneapolis: Burgess. 1946.
- MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Molecular detection of parasitic protozoa. *Parasitology*, v. 117, p. 73-85, 1998.
- MOSTEGL, M. M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; DINHOPL, N.; WEISSENBOCK, H. Investigations on the prevalence and potential pathogenicity of intestinal trichomonads in pigs using in situ hybridization. *Veterinary Parasitology*. v. 12, p. 1-6. 2011.
- MOSTEGL, M. M.; WETSCHER, A.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; DINHOPL, N.; WEISSENBOCK, H. Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. *Veterinary Parasitology*, v. 183, p. 209-214, 2012.
- MÜLLER, M. Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: Honigberg BM (ed) *Trichomonads parasitics in humans*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p.53–83, 1990.
- MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 2879-2889, 1993.
- NICKEL, D. D.; OLSON, M. E.; SCHULTZ, G. A. An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, v. 43, p. 213-216, 2002.
- OKAFOR, C. C.; STRICKLAND, L. G.; JONES, B. M.; KANIA, S.; ANDERSON, D. E.; WHITLOCK, B. K. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in tennessee bulls. *Veterinary Parasitology*, v. 243, p.169-175, 2017.
- OKAMOTO, S.; WAKUI, M.; KOBAYASHI, H.; SATO, N.; ISHIDA, A.; TANABE, M.; TAKEUCHI, T.; FUKUSHIMA, S.; YAMADA, T.; IKEDA, Y. *Trichomonas foetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v. 21, p. 89-91, 1998.
- OSLANIA F.A.; GOMES A.G.; SILVA A.C. Ocorrência de enteroparasitos em cães e gatos do município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. *Ciência Animal Brasileira*, v. 6, p. 127-133, 2005.
- OVCINNIKOV, N.M.; DELEKTORSKIJ, V.V.; TURANOVA, E.N.; YASHKOVA, G.N. Further studies of *Trichomonas vaginalis* with transmission and scanning electron microscopy. *British Journal of Venereal Diseases*, v. 51, p. 357–375, 1975.
- PELLEGRIN, A. O. Tricomonose bovina (Bovine trichomoniasis). In: ANAIS DO II SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1997, Caxambu. Anais... Caxambu, p. 60-65, 1997.
- PEREIRA-NEVES, A.; CAMPERO, C. M.; MARTINEZ, A.; BENCHIMOL, M. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Veterinary Parasitology*, v. 175, p. 1-8, 2011.
- PEREIRA-NEVES, A.; RIBEIRO, K.C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. *Protist*, v. 154, p. 313-329, 2003.

- PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. *Diagnostic molecular microbiology – principles and applications*. Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication, p. 641 p, 1993.
- PINK, A. N.; YAROSEVICH, G. A. Outbreak of porcine rhinitis caused by trichomonads. *Veterinary*, v. 34, p. 27-29, 1957.
- PIRT, S. J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Oxford: Blackwell, 1975.
- RAE, D. O.; CREWS, J. E. *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 22, p. 595-611, 2006.
- REIN, M. F. Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: *trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, p. 225-234, 1990.
- REINTHALTER, F. F.; MASCHER, F., KLEM, G.; SIXL, W. A survey of gastrointestinal parasites in Ogun State, southwest Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 82, p. 181-184, 1988.
- RÉNDON-MALDONADO J.G.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; GONZA´ LEZROBLES A.; MARTINEZ-PALOMO A. *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Experimental Parasitology*, v. 89, p. 241–250, 1998.
- RIBEIRO, K. C.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; BENCHIMOL, M. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 47, p. 481-492, 2000.
- RIBEIRO, K. C.; PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. *Biology of the Cell*, v. 94, p. 157-172, 2002.
- RIEDMÜLLER, L. Über die morphologie, übertragungsversuche, und klinischebedeutung der beimsporadischen abortus des rindesvorkommenden Trichomonaden. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung 1-Originale Medizinisch Hygiensche Bakteriologie Virusforschung und Parasitologie*, v. 108, p. 103-118, 1928.
- RILEY, D. E.; WAGNER, B.; POLLEY, L.; KRIEGER, J. N. PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 1308-1313, 1995.
- RIVERA, W. L.; LUPISAN, A. J. B.; BAKING, J. M. P. Ultrastructural study of a *Tetratrichomonad* isolated from pig fecal samples. *Parasitology Research*, v. 103, p. 1311-1316, 2008.
- ROBERTSON, A. Note on a *Trichomonas* sp. Cultivated from the gut of a sheep. *Ditrichomonas ovis*. *Veterinary Journal*, v. 88, p. 151-157, 1932.
- ROBERTSON, M. The antigens of *Tritrichomonas foetus* isolated from cows and pigs. *Journal of Hygiene*, v. 58, p. 207-213, 1960.
- RODNING, S.P.; WOLFE, D.F.; CARSON, R.L.; WRIGHT, J.C.; STOCKDALE, H.D.; PACOLI, H. E.; BUSBY, H. C.; ROWE, S. E. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. *Theriogenology*, v. 69, p. 212-217, 2008.

- RODRIGUES, G. Z.; GOMES, M. F. M.; CUNHA, D. A.; SANTOS, V. F.; Evolução da produção de carne suína no Brasil: uma análise estrutural-diferencial. *Revista de Economia e Agronegócio*, v. 6, p 343-366, 2009.
- ROSYPAL, A. C.; RIPLEY, A.; WALDEN, H. D. S.; BLAGBURN, B. L.; GRANTE, D. C.; LINDSAY, D. S. Survival of a feline isolate of *Tritrichomonas foetus* in water, cat urine, cat food and cat litter. *Veterinary Parasitology*, v. 185, p. 279-281, 2012.
- RUTTER, J. M. Atrophic rhinitis in swine. *Advance in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v. 29, p. 239-279, 1985.
- RYU, J. S.; CHOI, H. K.; MIN, D. Y.; HA, S. E.; AHN, M. H. Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 457-460, 2001.
- SAKSIRISAMPANT, W.; NUCHPRAYOON, S.; WIWANITKIT, V.; YENTHAKAM, S.; AMPAVASIRI, A. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *Journal of the Medical Association of Thailand*, v. 86, p. 263-270, 2003.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 221, 2000.
- SAMUELS R. Studies of *Tritrichomonas batavorum* (perty) 2. Normal mitosis and morphogenesis. *Transactions of the American Microscopical Society*, v. 76, p. 295–307, 2057.
- SCHUSTER, H.; JACKSON, B. M. Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among patients consulting complimentary medicine practitioners in the British Isles. *Journal of Clinical Pathology*, v. 62, p. 182-184, 2008.
- SHAW, R. F.; BUTTREY, B. W. Inoculation of *Trichomonas* sp from the nasal cavity of swine into parasite-free chickens. *Proceedings of the South Dakota Academy of Sciences*, v.37, 1959.
- SHI, Y.; JIANG, W.; MA, Z.; QIU, Y. A case report of pulmonary tritrichomonosis in a pig. *BMC Veterinary Research*, v. 13, p. 348-352, 2017.
- SILVA FILHO, F. C.; DE SOUZA, W. The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. *Cell Structure and Function*, v. 13, p. 301-310, 1988.
- SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. 1.ed. Editora Universidade de Brasília, p. 99-10, 2003.
- SINGH, B. N.; LUCAS, J. J.; BEACH, D. H.; SHIN, S. T.; GILBERT, R. O. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 3847-3854, 1999.
- SKIRROW, S.; BONDURANT, R. Bovine trichomoniasis. *Veterinary Bulletin*, v. 58, p. 591-603, 1988.
- ŠLAPETA, J.; MÜLLER, NORBERT.; STACK, C. M.; WALKER, G.; LEW-TABOR, A.; TACHEZY, J.; FREY, C. Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller,1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonassuis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *International Journal for Parasitology*, v. 42, p. 1143-1149, 2012.

- SOTOMAIOR, C. S.; DE CARLI, L. M.; TANGLEICA, L.; KAIBER, B. K.; DE SOUZA, F. P. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, v. 5, p. 397-412, 2007.
- SOTOMAIOR, C. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Infecção parasitária em ovinos criados em sistema intensivo: acompanhamento de evolução do parasitismo durante um ano. *A Hora Veterinária*, v. 20, n. 119, p. 10-15, 2001.
- SOUSA, S. T. B.; FERNANDES, J. C. T.; SILVA, C. E.; GOMES, M. J. P. Métodos para colheita de *Tritrichomonas foetus* em fêmeas e machos bovinos. *Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 19, p. 125-132, 1991.
- SPINDLER, L. A.; SHORB, D. A.; HILL, C. H. The role of trichomonads in Atrophic Rhinitis of swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 122, p. 151-157, 1953.
- STARK, D.; BARRATT, J.; ROBERTS, T.; MARRIOTT, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 614-619, 2010.
- STOCKDALE, H. D.; GIVENS, M. D.; DYKSTRA, C. C.; BLAGBURN, B. L. *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Veterinary Parasitology*, v. 160, p. 13-17, 2009.
- STREET, D. A.; WELLS, C.; TAYLOR-ROBINSON, D.; ACKERS, J. P. Interaction between *Trichomonas vaginalis* and other pathogenic micro-organisms of the human genital tract. *Sexually Transmitted Infections*, v. 60, p. 31-38, 1984.
- SUN, Z.; STACK, C.; SLAPETA, J. Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Tritrichomonas foetus* parasites of cats and cattle. *Veterinary Parasitology*, v.186, p. 445-449, 2011.
- SWITZER, W. P. Atrophic rhinitis and trichomonads. *Veterinary Medicine*, v. 46, p. 478- 481, 1951.
- TACHEZY, J.; TACHEZY, R.; HAMPL, V.; ŠEDINOVA, M.; VRLÍK, M.; RANST, M. V.; FLEGR, J.; KULDA, J. Cattle Pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmueller, 1928) and Pig Commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) Belong to the Same Species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 49, p. 154-163, 2002.
- TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Electron microscopic study of *Tetratrichomonas didelphidis* and its interaction with a prokaryotic cell. *Parasitology research*, v. 92, p.106-109, 2004.
- TASCA, T.; DE CARLI, G.A.; GLOCK, L.; JECKEL-NETO, E.A. Morphologic aspects of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from opossums *Didelphis marsupialis* and *Lutreolina crassicaudata*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 265–271, 2001.
- TASCA, T.; DE CARLI, G.A. Growth kinetic study of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from *Lutreolina crassicaudata* and interaction with a prokaryotic cell. *Parasitology Research*, v. 87, p. 626–630, 2001.
- TEIXEIRA, M.; CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L. S. Controle de verminose em caprinos e ovinos. Embrapa Caprinos e Ovinos - Folheto (INFOTECA-E). Sobral, CE, 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/10199891/cnpc2015Controledeverminose.pdf>>. Acesso em: 30 mar 2018.

- TOLBERT, M. K.; LEUTENEGGER, C. M.; LOBETTI, R.; BIRRELL, J.; GOOKIN, J. L. Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. *Veterinary Parasitology*, v. 187, p. 319-322, 2012.
- UNIGWE, C. R.; BALOGUN, F. A.; OLONA, J. F.; NWUFOH, O. C.; ODAH, I. S. Gastrointestinal helminths of West African Dwarf (WAD) goats in Ido Local Government Area, Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, v. 2, p. 133-138, 2017.
- VAN DER SAAG, M.; McDONELL, D.; SLAPETA, J. Cat genotype *Tritrichomonas foetus* survives passage through the alimentary tract of two common slug species. *Veterinary Parasitology*, v. 177, p. 262-266, 2011.
- VILLARROEL, A. B. S.; COSTA, R. G.; OLIVEIRA, S. M. P. Características físico-mecânicas do couro de caprinos mestiços Boer e Anglo Nubianos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, p. 2369-2372, 2004.
- VISCOGLIOSI, E.; BRUGEROLLE, G.; Striated fibers in trichomonads: costa proteins represent a new class of proteins forming striated roots. *Cell Motil Cytoskeleton*, v. 29, p. 82-93, 1994.
- WALDEN, H. S.; DYKSTRA, C.; DILLON, A.; RODNING, S.; GIVENS, D.; BIRD, R. NEWTON, J.; LINDSAY, D. A new species of *Tritrichomonas* (Sarcomastigophora: Trichomonida) from the domestic cat (*Felis catus*). *Parasitology research*, v. 112, p. 2227-2235, 2013.
- WALKER, R.L.; HAYES, D.C.; SAWYER, S.J.; NORDHAUSEN, R.W.; VAN HOOSEAR, K.A.; BONDURANT, R.H. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, p. 14-20, 2003.
- WANG, H. K.; JERNG, J. S.; SU, K. E.; CHANG, S. C.; YANG, P. C. *Trichomonas empyema* with respiratory failure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, p. 1234-1236, 2006.
- WENRICH, D.H., SAXE, L.H., 1950. *Trichomonas microti*, n. sp. (Protozoa, Mastigophora). *Journal of Parasitology*, v. 36, p. 261-269, 1950.
- YAEGER, M. J.; GOOKIN, J. L. Histologic Features Associated with *Tritrichomonas foetus*-induced Colitis in Domestic Cats. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 797-804, 2005.
- YANG, C. R.; MENG, Z. D.; WANG, X.; LI, Y. L.; ZHANG, Y. X.; ZHAO, Q. P. Diarrhoea surveillance in children aged under 5 years in a rural area of Hebei Province, China. *Journal of diarrhoeal diseases research*, v. 8, p. 155-159, 1990.
- ZALONIS, C. A.; PILLAY, A.; SECOR, W.; HUMBURG, B.; ABER, R. Rare case of trichomonal peritonitis. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, p. 1312-1313, 2011.
- ZERPA LARRAURI R, HUIZA A, PAUCAR C, ESPINOZA Y, CABEZAS C. Capacidad predatora de trofozoítos de *Trichomonas hominis* para destruir y/o fagocitar a *Blastocystis hominis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, v. 33, p.168-70, 2016.
- ZHANG, Z.; BEGG, C. B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasma? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology*, v. 23, p. 682-690, 1994.

8 ANEXOS

Anexo 1 Protocolo Comissão de Ética-PRPPG/UFRRJ



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAIS DE PARABASILÍDEOS OPORTUNISTAS EM AMOSTRAS FECAIS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS", protocolada sob o CEUA nº 2614120717 (02/00034), sob a responsabilidade de **Vera Lucia T. de Jesus** e equipe; *Caroline Cunha Carneiro; Daniele dos Santos Juliano; Nelson Oscaranha Gonsales Costa; Jorge Luis Baroto Pereira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 07/12/2017.

We certify that the proposal "EVALUATION OF LABORATORY DIAGNOSTIC METHODS OF OPPORTUNIST PARABASILÍDEOS IN FECAL SAMPLES OF DOMESTIC ANIMALS", utilizing 50 Dogs (males and females), 50 Bovines (males and females), 50 Caprines (males and females), 50 Ovines (males and females), 50 Swines (males and females), protocol number CEUA 2614120717 (02/00034), under the responsibility of **Vera Lucia T. de Jesus** and team; *Caroline Cunha Carneiro; Daniele dos Santos Juliano; Nelson Oscaranha Gonsales Costa; Jorge Luis Baroto Pereira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 12/07/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2017 a 05/2018

Área: Reprodução E Avaliação Animal

Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	10 a 3650 dias	N:	50
Espécie:	Cães						
Linhagem:	Diversas raças				Peso: 100 a 50000 g		
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 120 meses	N:	50
Espécie:	Bovinos						
Linhagem:	mestiços				Peso: 35 a 1000 kg		
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 120 meses	N:	50
Espécie:	Caprinos						
Linhagem:	mestiços				Peso: 30 a 150 kg		
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 120 meses	N:	50
Espécie:	Ovinos						
Linhagem:	mestiços				Peso: 30 a 150 kg		
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	10 a 3650 dias	N:	50
Espécie:	Suínos						
Linhagem:	mestiços				Peso: 15 a 300 kg		

Local do experimento: Laboratório de patologia da Reprodução

Seropédica, 16 de abril de 2018

Anexo 1 Protocolo Comissão de Ética-PRPPG/UFRRJ- Continuação



Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



Seropédica, 13 de julho de 2017
CEUA N 2614120717

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 700.346.107-44

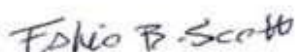
Título do projeto: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAIS DE PARABASALÍDEOS OPORTUNISTAS EM AMOSTRAS FECAIS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

Responsável: Vera Lucia T. de Jesus

Equipe: Caroline Cunha Carreiro, Daniele dos Santos Julliano, Nelson Oscaranha Gonsales Costa, Jorge Luis Baroto Pereira

Telefone: (21) 991225418 e-mail: jesus@ufrj.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://r1.ufrj.br/ceua/>) por meio da sua senha de acesso.



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Anexo 2. Declaração de aprovação da Ceua 006/2014



Seropédica 24 de junho de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 006/2014 intitulado **“IDENTIFICAÇÃO DE TRICHOMONADÍDEOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS: DIAGNÓSTICO, FREQUÊNCIA, ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR.”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Carlos Wilson Gomes Lopes. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 24 de junho de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

Anexo 3: Composição do meio de cultura Diamond.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Ácido ascórbico	120
Cisteína	600
Extrato de levedura	6000
Fosfato de potássio monobásico	400
Fosfato de potássio dibásico	400
Maltose	3000
Peptona de caseína	12000
Soro bovino inativado	0,1 L
Água destilada q.s.p	1 L

Anexo 4: Composição do meio de cultura Hank's.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Bicarbonato de sódio	350
Cloreto de cálcio dihidratado	140
Cloreto de potássio	400
Dextrose	1000
Extrato de levedura	100
Fosfato de sódio monobásico	120
Fosfato dibásico de potássio	60
Hidrolisado de lactoalbumina	5000
Sulfato de magnésio hepta hidratado	200
Vermelho de fenol	24
Soro bovino inativado	0,1 L
Água destilada q.s.p	1 L

Anexo 5: Composição do meio de cultura Caldo Peptonado.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Cloreto de sódio	3000
Dextrose	25
Extrato de carne	3000
Fosfato dibásico de sódio 12xhidratado	2000
Peptona bacteriológica	10000
Vitamina C	500
Soro bovino inativado	0,1 L
Água destilada q.s.p	1 L

Anexo 6: Composição do meio CHD.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/ mL
Bicarbonato de sódio	175
Cisteína	150
Cloreto de cálcio dihidratado	70
Cloreto de potássio	200
Cloreto de sódio	750
Dextrose	506,25
Extrato de carne	750
Extrato de levedura	1550
Fosfato de potássio monobásico	100
Fosfato de sódio monobásico	60
Fosfato dibásico de potássio	130
Fosfato dibásico de sódio 12xhidratado	500
Hidrolisado de lactoalbumina	2500
Maltose	750
Peptona bacteriológica	2500
Peptona de caseína	3000
Sulfato de magnésio hepta hidratado	100
Vermelho de fenol	12
Vitamina C	155
Soro bovino inativado	0,1 L
Água destilada q.s.p	1 L

Anexo 7: Composição do meio de cultura CH.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/mL
Bicarbonato de sódio	175
Cloreto de cálcio dihidratado	70
Cloreto de potássio	200
Cloreto de sódio	1500
Dextrose	512,5
Extrato de carne	1500
Extrato de levedura	50
Fosfato de sódio monobásico	60
Fosfato dibásico de potássio	30
Fosfato dibásico de sódio 12xhidratado	1000
Hidrolisado de lactoalbumina	2500
Peptona bacteriológica	5000
Sulfato de magnésio hepta hidratado	100
Vermelho de fenol	12
Vitamina C	250

Anexo 8 CARREIRO, C. C.; COELHO, C. D.; JORGE, J. L. B. P.; COSTA, N. O. G.; DO VALLE PAIVA, R.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; DE JESUS, V. L. T. Parasitos intestinais em suínos confinados em uma criação no município de Pinheiral, RJ. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 38, p. 117-122, 2016.

Parasitos intestinais em suínos confinados em uma criação no município de Pinheiral, RJ*

Caroline C. Carreiro^{1*}, Cleide Domingues Coelho², Jorge Luis B. Pereira Jorge³, Nelson Oscaranha Gonsales Costa⁴, Rafael do Valle Paiva⁵, Walter Leira Teixeira Filho⁶, Adriane Garcia da Rosa⁷ e Vera Lúcia T. de Jesus⁸

ABSTRACT. Carreiro C.C., Coelho C.D., Jorge J.L.B.P., Costa N.O.G., Paiva R.V., Teixeira Filho W.L., Rosa A.G. & de Jesus V.L.T. [Intestinal parasites in pigs confined in a creation in the municipality of Pinheiral - RJ.] Parasitos intestinais em suínos confinados em uma criação no município de Pinheiral - RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.2):117-122, 2016. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, BR 465 Km 7, Campus Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: carolinecarreiro@yahoo.com.br

Gastrointestinal disorders are frequently observed in pigs in different age groups. It is responsible for important economic losses, not only the mortality rate of piglets, as the reduction of weight gain and medical expenses. Moreover, in sows it is associated with reduced fertility and irregular repetitions of heat. Despite the great development of intensive pig farming, little is known about the occurrence of endoparasites in this species. Considering that enteritis cause serious economic losses, the objective of this study was to identify the main parasites in stool confined sows and piglets. Fifty-five fecal samples (23 sows and 32 piglets) were subjected to the examination of fresh and centrifugal technique - fluctuation in sugar, and observation by optical microscopy. The results showed that 72.7% of the animals were positive for at least one parasite, being quite significant co-infection, where 75% of infected animals had more than one agent. In matrices, coccidia presented more frequent (60.87%), followed by Parabasalidea (52.17%), Strongyloidea (47.8%) and Balantidium (26.08%). Coccidia are also more common in piglets (25%), followed by Strongyloidea (18.75%), Balantidium (12.4%) and parabasalideo (9.37%). Thus, we can conclude that despite the great development of intensive pig farming, the intestinal parasites are a major obstacle in the production, with the need for more effective programs of prevention and control.

KEY WORDS. Pigs, endoparasits, helminths, coccidia, parabasalids.

*Recebido em 21 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 20 de outubro de 2016.

¹ Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: carolinecarreiro@yahoo.com.br - bolsista CAPES.

² Médica-veterinária, DSc, Anexo 1, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: Domingues.cleide@yahoo.com.br

³ Médico-veterinário, Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Estado do Rio de Janeiro, Campus Nilo Peçanha, Rua Pereira de Almeida, 55, Praça da Bandeira, Pinheiral, RJ 20260100. E-mail: jorge.jorge@itfrrj.edu.br

⁴ Médico-veterinário, Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Estado do Rio de Janeiro, Campus Nilo Peçanha, Rua Pereira de Almeida, 55, Praça da Bandeira, Pinheiral, RJ 20260100. E-mail: nelson.coستا@itfrrj.edu.br

⁵ Médico-veterinário, MSc, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, Anexo 1, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: rafael.paiva11@gmail.com

⁶ Biólogo, DSc, Anexo 1, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: leira@ufrrj.br

⁷ Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: Adriane.vet@hotmail.com

⁸ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. *Autora para correspondência. E-mail: jesus@ufrrj.br

Anexo 9. DOS SANTOS, C. S.; DE JESUS, V. L. T.; MCINTOSH, D.; CARREIRO, C. C.; BATISTA, L. C. O.; DO BOMFIM LOPES, B.; LOPES, C. W. G. Morphological, ultrastructural, and molecular characterization of intestinal tetratrichomonads isolated from non-human primates in southeastern Brazil. *Parasitology research*, v. 116, p. 2479-2488, 2017.

Parasitol Res (2017) 116:2479–2488
DOI 10.1007/s00436-017-5552-5



ORIGINAL PAPER

Morphological, ultrastructural, and molecular characterization of intestinal tetratrichomonads isolated from non-human primates in southeastern Brazil

Caroline Spitz dos Santos¹ · Vera Lúcia Teixeira de Jesus² · Douglas McIntosh³ · Caroline Cunha Carreiro¹ · Lilian Cristina Oliveira Batista¹ · Bruno do Bomfim Lopes⁴ · Daniel Marchesi Neves⁵ · Carlos Wilson Gomes Lopes²

Received: 30 March 2017 / Accepted: 30 June 2017 / Published online: 13 July 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Non-human primates are our closest relatives and represent an interesting model for comparative parasitological studies. However, research on this topic particularly in relation to intestinal parasites has been fragmentary and limited mainly to animals held in captivity. Thus, our knowledge of host-parasite relationships in this species-rich group of mammals could be considered rudimentary. The current study combined morphological, ultrastructural, and molecular analyses to characterize isolates of intestinal tetratrichomonads recovered from the feces of three species of South American, non-human primates. Fecal samples were collected from 16 animals, representing 12 distinct species. Parabasalid-like organisms

were evident in five samples (31%) of feces: two from *Alouatta sara*, two from *Callithrix penicillata*, and one from *Sapajus apella*. The five samples presented morphologies consistent with the description of *Tetratrichomonas* sp., with four anterior flagella of unequal length, a well-developed undulating membrane, and a long recurrent flagellum. Sequencing of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region demonstrated that the isolates from *A. sara*, and *C. penicillata* were closely related and highly similar to isolates of *Tetratrichomonas brumpti*, recovered previously from leishanias (*Geochelone* sp.). The flagellate recovered from *S. apella* demonstrated a similar morphology to those of the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00436-017-5552-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Caroline Spitz dos Santos
carolinespitz@yahoo.com.br

Vera Lúcia Teixeira de Jesus
jesus@ufrj.br

Douglas McIntosh
pus972@yahoo.co.uk

Caroline Cunha Carreiro
carolincarreiro@yahoo.com.br

Lilian Cristina Oliveira Batista
liliancobatista@hotmail.com

Bruno do Bomfim Lopes
biolopesbb@hotmail.com

Daniel Marchesi Neves
danielm35@hotmail.com

Carlos Wilson Gomes Lopes
lopescwg@ufrj.br

- 1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Anexo 1, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil
- 2 Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil
- 3 Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil
- 4 Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, Anexo 1, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil
- 5 Hoto Florestal Mário Xavier, Centro de Triagem de Animais Silvestres, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/IBAMA/Ministério do Meio Ambiente e Recursos Renováveis, Seropédica, RJ 23835-400, Brazil

Anexo 10. CARREIRO.CC; JESUS;V.T; JULIANO D.S; DA SILVA, C;A; FURTADO, T.T.
Diagnóstico de parasitas gastrointestinais em cães em uma localidade da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. *Revista Clínica Veterinária*. Ano XXII (suplemento), p. 68-73, 2017.



Diagnóstico de parasitas gastrointestinais em cães em uma localidade da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ

Diagnosis of gastrointestinal parasites in dogs at a locality in the Rio de Janeiro Metropolitan Region, RJ

Diagnóstico de parásitos gastrointestinais en perros en una localidad de la Región Metropolitana de Río de Janeiro, RJ

Caroline Cunha Carreiro¹, Vera Teixeira de Jesus², Daniele dos Santos Juliano³,
Cezar Augusto da Silva⁴, Tássia Torres Furtado⁵

1-MV, aluna de doutorado do PPGMV da UFRRJ, Bolsista Capes. 2-Professora associada do DRAA, IZ da UFRRJ. 3-Aluna de graduação em medicina veterinária da UFRRJ. 4-Aluno de graduação de engenharia de alimentos da UFRRJ. 5-Aluna de doutorado do PPGCV da UFRRJ.
carolinecarreiro@yahoo.com.br

As parasitoses gastrointestinais estão entre as enfermidades mais comuns em animais de companhia, podendo ser especialmente graves em animais jovens ou em imunocomprometidos. Alguns destes parasitos são considerados zoonóticos, representando importante risco à saúde humana. O objetivo deste estudo foi determinar a presença de formas utilizadas como diagnóstico de parasitos gastrointestinais encontradas em fezes de cães domiciliados em São João de Meriti, Baixada Fluminense, RJ, a sua prevalência, e identificar os fatores que interferem na epidemiologia e transmissão zoonótica destas infecções. Para tal, quarenta e cinco amostras de fezes de cães foram coletadas e a cada proprietário foi solicitado a responder um formulário contendo informações relevantes a respeito do risco de infecção e transmissão de zoonoses parasitárias. As amostras foram submetidas ao exame direto e a técnica de centrifugo flutuação em açúcar, obtendo-se uma positividade de 64,44% das amostras. Dentre as amostras parasitadas, vinte (68,96%) foram positivas para ovos de Ancylostomatídeos; sete delas positivas para oocistos de coccídios (24,14%); quatro positivas para ovos de *Toxocara* spp. (13,79%), três para trofozoítos de Parabasalídeos, e apenas uma para a presença de cistos de *Giardia intestinalis* e cápsulas ovigeras de *Dipylidium caninum* (2,22%). Os animais que conviviam com outros animais, bem como os cães com acesso à rua, tiveram maior chance de desenvolver pelo menos uma das parasitoses mencionadas. Além disso, a maioria dos filhotes apresentaram fezes de consistência pastosa (mole), enquanto que em cães adultos não se observaram alterações dignas de nota, fato este, reforça a importância da realização de exames parasitológicos de rotina, pois animais com parasitose subclínica podem ser importantes fonte de infecção tanto para humanos e outros animais. Além de contaminar o meio ambiente. A alta prevalência de parasitos gastrointestinais na amostra estudada está associada as precárias condições de saneamento básico da região e ressalta a importância de um maior controle parasitológico nesses animais, como tentativa de melhorar não só as condições de vida dos animais, como também, evitar que sirvam de fonte de propagação de organismos zoonóticos.

Unitermos: parasitos gastrointestinais, helmintos, protozoário, parabasalídeos, baixada fluminense

Gastrointestinal parasites are among the most common diseases in companion animals, and severe in young or immunocompromised animals. Some of these parasites are considered as zoonotics, representing an important risk to human health. The objective of this study was to determine the prevalence of forms used to diagnose gastrointestinal parasites found in dogs feces domiciled at the Municipality of São João de Meriti, Rio de Janeiro Metropolitan area, RJ, as well as to identify the factors that interfere in the epidemiology and zoonotic transmission of these infections. To that end, forty-five samples of dog feces were collected and each owner was asked to respond to a form containing relevant information regarding the risk of infection and transmission of parasitic zoonoses. The samples were submitted to direct examination and the centrifugal sugar fluctuation technique, obtaining a positivity of 64.44% of the samples positive for parasites. Among the parasitized samples, twenty (68.96%) were positive for hookworm ggs; seven of them were positive for coccidia oocysts (24.14%); four positive for ascariids (13.79%); three for Parabasalid trophozoites; and only one for the presence of *Giardia intestinalis* cysts, and ovigerous capsules of *Dipylidium caninum* (2.22%). Animals that lived with other animals, as well as dogs with access to the street, had a greater chance of developing at least one of the aforementioned parasites. In addition, the majority of the pups presented feces of pasty consistency, whereas in adult dogs no noteworthy changes were observed.