

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

DISSERTAÇÃO

**PARABASALÍDEOS EM LEITÕES EM UMA CRIAÇÃO DE SUÍNOS
LOCALIZADA NA MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ, RJ**

Caroline Cunha Carreiro

2014



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

**PARABASALÍDEOS EM LEITÕES EM UMA CRIAÇÃO DE SUÍNOS
LOCALIZADA NA MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ, RJ**

CAROLINE CUNHA CARREIRO

*Sob a Orientação da Professora
Vera Lúcia Teixeira de Jesus*

*Coorientação
Daniel da Silva Guedes Junior*

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências** no
Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária.

Seropédica, RJ

Outubro, 2014

636.4089

Carreiro, Caroline Cunha, 1988-

C314p

T

Parabasalídeos em leitões em uma criação de suínos localizada na microrregião de Itaguaí / Caroline Cunha Carreiro. - 2014.

46 f.: il.

Orientador: Vera Lúcia Teixeira de Jesus.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 33-45.

1. Suíno - Doenças - Teses. 2. Suíno - Parasito - Teses. 3. Diarréia em suíno - Teses. 4. Tricomonose - Teses. I. Jesus, Vera Lúcia Teixeira de, 1959-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

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

CAROLINE CUNHA CARREIRO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:-...../...../2014.

Vera Lúcia Teixeira de Jesus (Prof^a. Dr^a.) UFRRJ
(Orientador)

Carlos Wilson Gomes Lopes (Prof. Dr.) UFRRJ

Marilene de Faria Brito (Prof^a. Dr^a.) UFRRJ

Daniel da Silva Guedes Junior (Dr.) FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rogério Gatti Carreiro e Mirian Fortes Cunha Carreiro por minha formação, pelo carinho e apoio em todos os momentos;

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;

Às minhas irmãs Aline Cunha Carreiro e Flora de Vasconcelos Paiva Moraes pelo incentivo;

À minha querida Alice Carreiro Carvalho Silva pelo simples fato de existir, tornando meus dias mais alegres e divertidos quando estamos juntas;

Às minhas amigas Wanessa Soares, Denise Navarro e Érica Vasconcelos por estarem sempre disposta a me aconselhar e ouvir sempre;

À minha orientadora Professora Dr^a. Vera Lúcia Teixeira de Jesus, pelo exemplo de profissionalismo e caráter, por ter me acolhido com amizade, pensando em mim e proporcionando a oportunidade de aprender com seus ensinamentos;

A Caroline Spitz, que me aconselhou, ajudou, amparou e incentivou nos momentos mais difíceis, sendo mais que uma amiga;

Ao meu Coorientador Daniel Guedes pela paciência e compreensão.

Ao professor José Eugênio Três 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;

Aos professores Carlos Wilson Gomes e Douglas McIntosh pela ajuda e colaboração para realizar este trabalho;

Ao colega de faculdade Jaime Cardoso pelo empenho e dedicação que contribuiu com a realização do trabalho;

Aos funcionários da Suinocultura da UFRRJ, Campus Seropédica, RJ, sobretudo ao Médico Veterinário Bruno Vasconcelos pelo carinho e colaboração para realizar este trabalho.

Ao Professor Emerson Pontes Guedes por me incentivar na Iniciação Científica, e todos os demais professores que colaboraram com a minha formação;

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio de Janeiro -FAPERJ por apoiar nosso trabalho, permitindo financeiramente que este fosse realizado.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

CARREIRO, Caroline Cunha, **Parabasalídeos em leitões em uma criação de suínos localizada na microrregião de Itaguaí, RJ**, Seropédica; UFRRJ, 2014. 68p (Dissertação, Medicina Veterinária).

Tricomonose é uma infecção causada por diferentes espécies de flagelados do filo Parabasalia. Esses parasitos acometem o trato gastrointestinal de diferentes espécies animais, inclusive o homem. Em suínos, esses flagelados são descritos no trato intestinal, e podem estar associados a quadro de diarreia; na cavidade nasal, está associado a rinite atrófica, além de outros distúrbios respiratórios. As enterites descritas na suinocultura, não respondem a 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. A metodologia proposta neste trabalho foi avaliar a frequência destes parabasalídeos no plantel de suínos, que tiveram episódios frequente de diarreia em leitões, localizado na microrregião de Itaguaí/RJ. Para tal, foram coletadas 106 amostras de fezes diretamente da ampola retal, as quais foram cultivadas nos meios de cultura Hank's, Caldo Peptonado, Diamond, 199, Coquetel, CHD e CH; e analisadas por microscopia óptica, e os protozoários isolados foram identificados por biologia molecular. No exame microscópico foi possível constatar que 75 amostras positivas para a presença do protozoário flagelado (70,75%). Os meios de cultura Coquetel, CHD e CH tiveram menor crescimento bacteriano e maior concentração de protozoário, portanto são mais indicados para o isolamento dessas espécies. Trinta e cinco amostras positivas sob microscopia óptica tiveram o seu DNA extraído e foram amplificadas por PCR, sendo 85,71% (30 amostras) referentes à Tricomonádídeos e Tritricomonádídeos. Utilizando-se *primers* espécie-específico 10 amostras (33,33%) foram positivas para a espécie *Pentatrichomonas hominis*. Este é o primeiro isolamento de *P. hominis* em suínos no Brasil. O sequenciamento das demais espécies isoladas precisa ser realizado para se conhecer a diversidade de parabasalídeos em suínos, mediante a alta frequência de parabasalídeos isoladas e correlacionar os mesmos com distúrbios digestivos, para que estes sejam incluídos como diagnóstico diferencial de diarreia em suínos.

Palavras chave: Tricomonose; *Pentatrichomonas hominis*; suinocultura; diarreia.

ABSTRAT

CARREIRO, Caroline Cunha, **Parabasalids in piglets in a swine breeding located at Itaguaí's microregion, RJ**, Seropédica; UFRRJ, 2014. 68p. (Dissertation, Veterinary Medicine).

Trichomoniasis is an infection caused by different flagellates' species of to Parabasalia phylum. These parasites affect the gastrointestinal tract of several animal species, including man. In pigs, these flagellates are described in the intestinal tract, and may be related to diarrhea; in the nasal cavity, is associated with atrophic rhinitis and other respiratory disorders. Enteritis described in pigs farming, do not respond to conventional antibiotic therapy and are responsible for great economic loss, especially when affect the piglets not only by high mortality, but also by decreased weight gain and high cost control. The methodology proposed in this work was to evaluate the frequency of Parabasalidea in piglets located in the microregion of Itaguaí / RJ, that have had frequent diarrhea episodes. To this end, 106 stool samples collected directly from the rectum, which were grown in several culture media like: Hank's, Caldo Peptonado, Diamond, 199, Cocktail, CHD and CH; and analyzed by optical microscopy, and protozoa isolates were characterized by molecular biology. On microscopic examination it was found that 75 samples were positive for the presence of the flagellate protozoan (70.75%). Media Cocktail, CHD and CH culture had lower bacterial growth and greater concentration of protozoan therefore are more suitable for the isolation of the studied species. Thirty-five positive samples under light microscopy had their DNA extracted and were amplified by PCR, resulting in 85.71% (30 samples) positive for trichomonads. Using species-specific primers 10 samples (33.33%) were positive for *Pentatrichomonas hominis* species. This is the first isolation of *P. hominis* in pigs from Brazil. Sequencing of the isolated species must be performed to know the diversity of Parabasalidea in pigs, correlating the high frequency of isolation with the presence of digestive disorders, and thus these protozoa could be considered as diarrhea differential diagnosis in pigs.

Key words: Trichomoniasis, *Pentatrichomonas homini*, swine breeding, diarrhea.

LISTA DE ANEXOS

	Págs
Anexo A.	Tabela de composição do meio de cultura Diamond..... 47
Anexo B.	Tabela de composição do meio de cultura Hank's..... 48
Anexo C.	Tabela de composição do meio de cultura Caldo Peptonado..... 49
Anexo D.	Tabela de composição do meio de cultura 199..... 50
Anexo E.	Tabela de composição do meio de cultura Coquetel..... 51
Anexo F.	Tabela de composição do meio de cultura CHD..... 52
Anexo G.	Tabela de composição do meio de cultura CH..... 53
Anexo H.	Declaração de submissão CEUA/IV/UFRRJ..... 54

LISTA DE QUADROS

	págs.
Quadro 1. Principais agentes etiológicos responsáveis pela prevalência das diarreias por idade (Maternidade a Terminação), adaptado de ZLOTOWSKI et al., 2008.....	3
Quadro 2. Organização taxonômica para os principais parabasalídeos de importância em saúde pública, exemplificando os principais gêneros (Cepicka et al., 2010).....	4

LISTA DE TABELAS

	Págs
Tabela 1. Resultado do exame direto das amostras dos leitões com disenteria, segundo sexo, para a presença de parabasalídeos, na suinocultura.....	22
Tabela 2. Resultado do exame direto das amostras dos leitões com disenteria, segundo faixa etária, para a presença de parabasalídeos, na suinocultura.....	23
Tabela 3. Resultados das culturas positivas em microscopia óptica, em relação os resultados com análise genotípica (PCR) para as famílias Tritrichomodidae e Trichomonadidae, e para espécie-específica (<i>Pentatrichomonas hominis</i>) de 35 amostras oriundas de leitões com disenteria, na suinocultura.....	29

LISTA DE FIGURAS

Págs.

- Figura 1** Esquema geral das famílias Tritrichomonadidae e Trichomonadidea, representadas por *Tritrichomonas foetus* (a) e *T. vaginalis* (b), respectivamente, destacando as principais organelas e estruturas celulares. AF, flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente; UM, membrana ondulante; P, pelta; Ax, axóstilo; C, costa; H, hidrogenossomos; V, vacúolos; G, complexo de Golgi; N, núcleo; Nu, nucléolo; ER, retículo endoplasmático; S, filamento sigmóide; BB, corpúsculos basais; PF, filamento parabasal..... 5
- Figura 2** Fotografias (A-F) ilustrando os sinais clínicos dos leitões do rebanho da suinocultura da UFRRJ, Campus Seropédica, RJ. Animais apresentando disenteria (A), prostração (A, B, C e D), Desidratação, magreza (D) e Tenesmo (E e F)..... 17
- Figura 3** Fotografias (A-F) ilustrando a coleta de amostras fecais diretamente da ampola retal (C,D,E e F), após a dactostimulação anal (A e B) dos leitões, suinocultura da UFRRJ, Campus Seropédica, RJ..... 18
- Figura 4** Ilustração do processamento das fezes, manejo das amostras e manutenção das culturas através de repiques..... 20
- Figura 5** Morfologia dos parabasalídeos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M), coradas pelo método Panótico rápido®. ax: axóstilo; cp: corpo parabasal; fa: flagelo anterior; fp: flagelo posterior; mo: membrana ondulante; n: núcleo; v: vacúolos; vb: vacúolos com bactérias..... 26
- Figura 6** 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..... 27
- Figura 7** 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..... 28
- Figura 8** 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 TP2-TP4 e TP7-TP14 (coluna 2-14); controle negativo de extração (coluna 18 e 19); controle positivo (linha 15-17 e 20) correspondendo a aproximadamente 339pb..... 28

Figura 9 Esquematização de todas as 106 amostras de leitões analisadas e diagnosticadas por microscopia óptica e PCR..... 30

LISTAS DE ABREVIACES

ABIPECS- Associao Brasileira da Industria Produtora e Exportadora de Carne Suína
DNA- cido desoxirribonucléico
FAO- Organizao das Naes Unidas para a Alimentao e Agricultura
g- Grama
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
HPV- Papilomavírus humano
kg- Kilograma
mg- Miligrama
OMS- Organizao mundial de saúde
PBS- Soluo fisiológica fosfatada tamponada
PCR- Reao em cadeia de polimerase
PIB- Produto Interno Bruto
pH- Potencial de hidrogênio
RNA- cido ribonucléico
SII- Síndrome do Intestino Irritvel
UFRRJ- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 μ L- Microlitro

SUMÁRIO

	Págs
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Importância econômica das disenterias na suinocultura.....	2
2.2 Complexo gastrenterites.....	2
2.3 Parabasalídeos.....	4
2.4 Morfologia.....	6
2.4.1 Membrana plasmática.....	6
2.4.2 Citoesqueleto.....	6
2.4.3 Vacúolos e lisossomos.....	7
2.4.4 Hidrogenossomos.....	8
2.4.5 Retículo endoplasmático.....	8
2.4.6 Complexo de Golgi.....	8
2.4.7 Núcleo.....	9
2.5 Patogenia.....	9
2.5.1 Tricomonose Suína.....	12
2.6 Potencial zoonótico.....	13
2.7 Diagnóstico.....	14
2.7.1 Microscopia direta e cultivo.....	14
2.7.2 Métodos Moleculares: PCR e Hibridização <i>in situ</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Local de execução.....	16
3.2 Animais.....	16
3.3 Manejo dos animais.....	16
3.4 Sinais clínicos.....	16
3.5 Coleta do material.....	17
3.6 Meios de enriquecimento para o isolamento.....	19
3.7 Diagnóstico e manutenção das amostras (repique).....	19
3.7.1 Exame microscópico direto.....	19

3.7.2 Análise morfológica.....	19
3.7.3 Biologia Molecular através da Reação em Cadeia de Polimerase – PCR..	20
3.7.3.1 Extração de DNA Total.....	20
3.7.3.2 Oligonucleotídeos iniciadores.....	20
3.7.3.3 Reação em Cadeia de Polimerase.....	21
3.8 Análises estatística.....	21
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	22
4.1 Frequência de parabasalídeos.....	22
4.2 Cultivo <i>in vitro</i>.....	24
4.3 Morfologia.....	25
4.4 Análise de DNA.....	27
5 CONCLUSÃO.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A Tricomonose ou tricomoníase é causada por protozoários pertencentes ao filo Parabasalia, encontrados parasitando o trato digestivo 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, tem sido observada a presença de um mesmo protozoário com uma grande diversidade de hospedeiros, sendo atribuído a diferentes distúrbios clínicos, o que indica que esses organismos são oportunistas e se multiplicam em condições favoráveis. Atualmente as infecções por esses microorganismos estão cada vez mais reconhecidas como comuns, sobretudo no trato digestivo (MARITZ et al., 2014).

Contudo, os parabasalídeos estão influenciando na saúde humana e animal tanto por causar patologias de forma direta, quanto indireta, através de disbiose intestinal, gerando inflamação local, facilitando infecção por outros patógenos (MARITZ et al., 2014). Além disso, a patologia pode ser intensificada quando ocorre o sinergismo desses protozoários com outras espécies de parasitas. Exemplos foram demonstrados em infecções experimentais quando um gato teve seu quadro clínico agravado ao ser coinfestado com *Cryptosporidium* sp e *Tritrichomonas foetus* (GOOKIN et al., 2001). Bem como o parasitismo associado entre *Pentatrichomonas hominis* e *Escherichia coli* agravaram o episódio de diarreia, sendo capaz de levar o leitão à morte (LI, W et al., 2014).

Em suínos, esses parasitos são descritos 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 outros distúrbios respiratórios, dentre eles bronquite e pneumonia. As enterites descritas na suinocultura, não respondem a 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. Portanto, o objetivo no trabalho foi investigar a frequência desses protozoários em animais com disenterias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica das disenterias na suinocultura

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 2010 com 5,8% do Produto Interno Bruto (PIB) do País, movimentou cerca de R\$ 180,831 bilhões, representando um crescimento de 6,5% sobre o volume registrado em 2009. Esse crescimento só não se perpetuou em 2011 em função da crise econômica das mais importantes economias mundiais, sobretudo da União Européia, apresentando uma queda de 0,6% comparados a 2010 (IBGE, 2010, 2011).

Dentre as diferentes cadeias produtivas integrantes do sistema agroindustrial brasileiro, a de suínos vem se destacando, com 40 mil suinocultores e 600 mil empregos gerados, reflexo do crescimento global da produção de suínos. Os últimos dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) em 2007, relata que a carne suína é a mais produzida no mundo, com uma participação de 40,41% da produção total de carnes, em 2007, seguida pela produção de carne de aves (30,37%) e a de bovino (21,66%).

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína e o quarto maior exportador mundial, segundo o relatório da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, 2012/2013 (ABIPECS), com um rebanho de 39.306.718 cabeças (IBGE, 2011). A produção nacional em 2012 chegou a 3.49 mil toneladas, crescendo mais de 2,65% comparado a 2011. O consumo aumentou de 13,4 Kg, em 2010, para valores superiores a 15,0 Kg *per capita* por ano, em 2012. Nesse mesmo ano exportou-se 581 mil toneladas para 60 países, gerando 1,49 bilhões de dólares em receita cambial. Esses números poderiam ser maiores se não fossem os entraves da exportação devido a problemas diversos, entre eles os de origem sanitária (Doença de Aujeszky, Encefalopatia Espongiforme Bovina, Gripe aviária e Febre aftosa) levando a imposição de barreiras comerciais às exportações de carne suína (RODRIGUES et al., 2009).

A alta taxa de mortalidade dos leitões é quase que exclusiva pela ocorrência de diarreia após a primeira semana de vida, as quais persistem por cerca de quatro a oito dias, mesmo com o uso de antidiarreicos convencionais. Sua etiologia é complexa, com um ou mais agentes infecciosos (bactéria, vírus e protozoário) estão presentes em várias combinações. Estes microrganismos exacerbam seu efeito patogênico quando os leitões são criados na presença de fatores de risco, geralmente ligados ao manejo e ao meio-ambiente. Sua importância econômica se deve não só pelo índice de mortalidade dos leitões, mas também pelas consequências negativas sobre o desenvolvimento, decréscimo na taxa de ganho de peso e conversão alimentar, e excessivos gastos com medicamentos para seu controle (MORES et al., 1991).

2.2 Complexo gastroenterites

Diarreia é a principal manifestação clínica das infecções entéricas, que representam um problema importante na suinocultura tecnificada, devido às grandes perdas econômicas, em

função dos gastos com antibióticos, aumento da mortalidade, necessidade de manejo, cuidados com os animais doentes e conversão alimentar inadequada (HOLLAND, 1990).

Nesse distúrbio há perda de solutos e água, que leva à depleção de eletrólitos, desequilíbrio ácido-básico e desidratação, que pode ser fatal se não tratada adequadamente. A função principal do intestino delgado (ID) é absorção de nutrientes e, para isso, a mucosa intestinal possui estruturas que aumentam a superfície total de absorção tornando esse processo mais eficaz. O intestino grosso (IG), principalmente, o cólon espiral, tem a função de diminuir a perda fecal de eletrólitos e água (KIERSZENBAUM, 2004). O aumento da quantidade de água presente nas fezes pode ocorrer quando há lesão ou aumento da passagem de fluidos no ID ou redução na capacidade do cólon de absorver solutos e fluidos provenientes do ID (VAN BEERS-SCHREURS et al., 1998). Os mecanismos fisiopatológicos estão associados às características particulares de cada patógeno.

Em rebanhos afetados, a taxa de mortalidade pode ser até cinco vezes maior, podendo chegar a 8%, e os leitões levam em média 2,3 dias a mais para atingir 25 Kg de peso. Sua etiologia é complexa, onde um ou mais agentes infecciosos (bactérias, vírus ou protozoários) estão presentes em várias combinações. Porém, estes micro-organismos exacerbam seu efeito patogênico quando os leitões são criados na presença de fatores de risco, geralmente ligados ao manejo e meio-ambiente, uma vez que os agentes infecciosos estão presentes, tanto em rebanhos com problemas, como em rebanhos sem problemas. (MORÉS; AMARAL, 2001).

Calderaro et al. (2001) por exemplo, atribuíram como principais agentes causadores de diarreia *Escherichia coli* e *Cystoisospora suis* (= *Isoospora suis*), ao observar em fezes diarreicas, a frequência de: 40,2% de *E. coli*, 31,6% de *C. suis*, 10,6% de Rotavírus e 1,2% de *Clostridium perfringens*, no entanto 32,8% dos leitões que tiveram diarreia não foram diagnosticados para nenhum dos agentes investigados (além desses *Salmonella* sp. e *Yersinia* sp. também foram pesquisados). Zlotowski et al. (2008) fizeram uma correlação da idade dos leitões com os principais agentes causadores de diarreia (Quadro 1), e discriminam como gastroenterites transmissíveis (TGE), os agentes não determinados. No entanto, o conhecimento da patogenia das diarreias em suínos e os patógenos responsáveis é uma importante ferramenta para o diagnóstico da doença. Desta forma, tratamento e medidas de controle podem ser tomados, para minimizar as perdas financeiras.

Quadro 1; Principais agentes etiológicos responsáveis pela prevalência das diarreias por idade (Maternidade a Terminação), adaptado de ZLOTOWSKI et al., 2008.

Idade (dias)		Patógeno
Maternidade	0-5	<i>Escherichia coli</i> , TGE, <i>Clostridium</i> sp., diarreia nutricional (Rotavírus, <i>Cystoisospora</i>)
Maternidade	6-21	<i>Cystoisospora</i> , Rotavírus, <i>E. coli</i> , (<i>Strongyloides</i> , <i>Cryptosporidium</i>)
Creche	21-60	<i>E. coli</i> , Rotavírus, <i>Cryptosporidium</i> , PCV2 (Coronavírus)
Recria	60-100	<i>Brachyspira</i> , <i>Lawsonia</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , PCV2
Terminação	100-Abate	<i>Brachyspira</i> , <i>Lawsonia</i> , <i>Salmonella</i> , PCV2

Legenda: () = pouca importância ou pouco prevalente na idade, PCV2= circovírus suíno tipo 2, TGE= gastroenterite transmissível

2.3 Parabasalídeos

Tricomonoses são causadas por protozoários flagelados que pertencem ao filo Parabasalia. Estudos ultraestruturais e filogenéticos realizados a 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 apresentados no Quadro 2.

Quadro 2; 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 1Trichomonadidae

Gênero *Trichomonas*, *Pentatrichomonas*, *Tetratrichomonas*

Classe 2 Tritrichomonadea

Ordem 1Tritrichomonadida

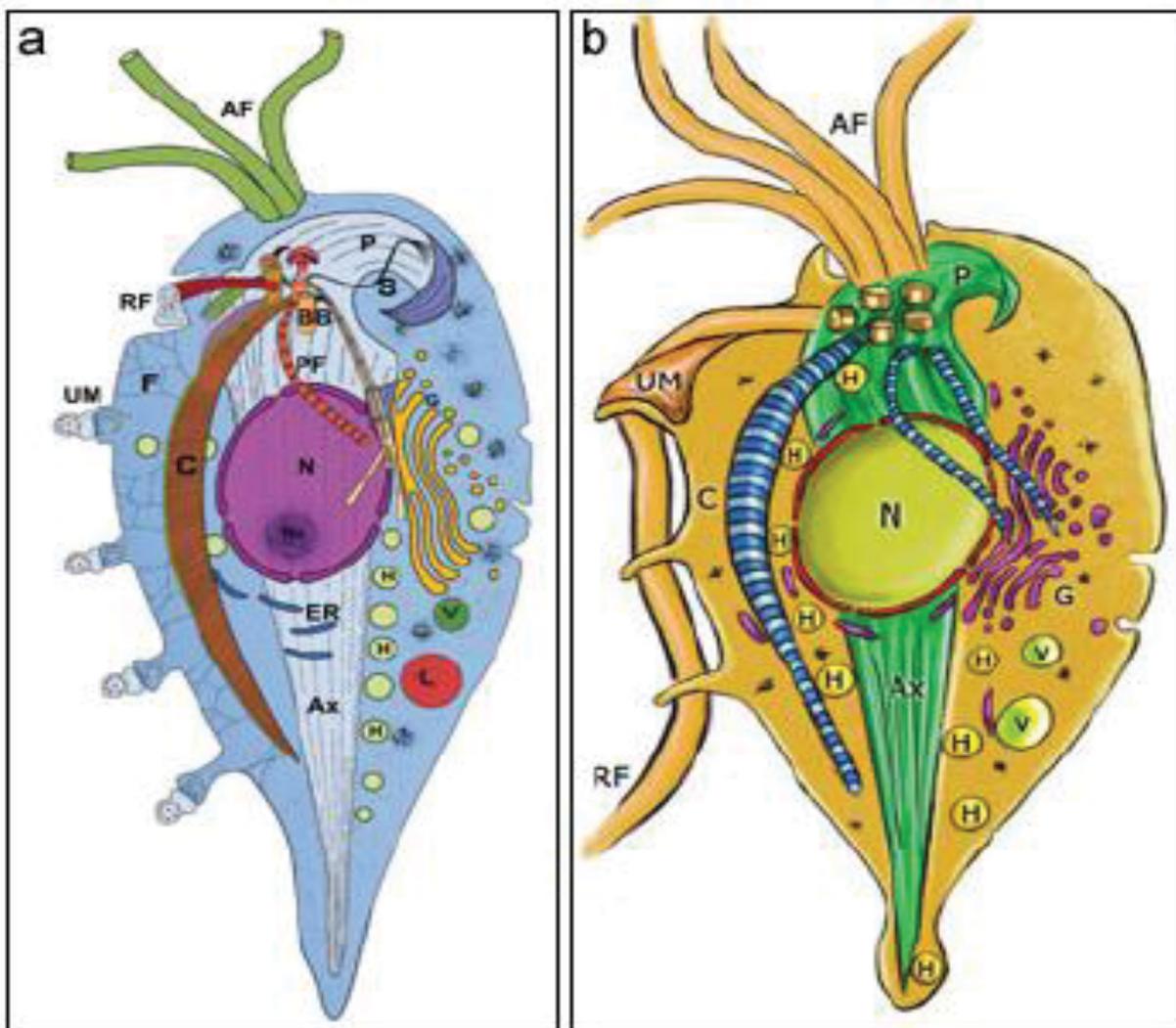
Família 1Tritrichomonadidae

Gênero *Tritrichomonas*,

Família 2 Dientamoebidae

Gênero *Dientamoeba*

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.



Fonte: MIFLEJ, 2010.

Figura 1. Esquema geral das famílias Tritrichomonadidae e Trichomonadidae, representadas por *Tritrichomonas foetus* (a) e *Trichomonas vaginalis* (b), respectivamente, destacando as principais organelas e estruturas celulares. AF, flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente; UM, membrana ondulante; P, pelta; Ax, axóstilo; C, costa; H, hidrogenossomos; V, vacúolos; G, complexo de Golgi; N, núcleo; Nu, nucleolo; ER, retículo endoplasmático; S, filamento sigmoide; BB, corpúsculos basais; PF, filamento parabasal.

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 *Tritrichomonas 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.

2.4 Morfologia

2.4.1 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 tratam-se de 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 mosaico 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).

2.4.2 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 contração 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), semelhante ao que ocorre com microtúbulos e mitocôndrias (BENCHIMOL et al., 2000).

A costa é uma larga fibra estriada, presente em todos os trichomonádídeos 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; BRUGEROLLE, 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; BRUGEROLLE, 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 videomicroscopia, 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 *Trichomonas 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 *Pentatrichomonas 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).

2.4.3 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 hemácias (DE CARLI et al., 2004) e espermatozoides (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).

2.4.4 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. 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 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).

2.4.5 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).

2.4.6 Complexo de Golgi

Nesses protozoários os filamentos parabasais encontram-se associados ao complexo de golgi formando o aparelho parabasal, que estão localizados dorsalmente e a 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 Golgi (HONINGBERG; BRUGEROLLE, 1990; BENCHIMOL et al., 2001). Diferente dos outros parasitas protistas, esses parabasilídeos têm um complexo de Golgi bastante 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 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).

2.4.7 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 nucléolo, única estrutura proeminente e esferoidal do núcleo, mantém-se durante a mitose (BENCHIMOL et al., 2000; RIBEIRO et al., 2002).

2.5 Patologia

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 formam 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 a sua importância.

Os sinais clínicos da tricomonose genital são mais evidentes no sexo feminino, podendo variar desde o quadro assintomático à vaginite e baixa de fertilidade. A grande variação de sinais e sintomas ocorrem 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 e prurido, irritação, inflamação e descamação do epitélio vaginal (REIN, 1990). Em casos graves, a vulva se torna congesta, aumenta a vascularização e ocorre hiperplasia do epitélio cervical e podem aparecer até complicações nas glândulas de Bartholin. A vagina torna-se avermelhada, conhecida como *Colpitis macularis* ou *cérvice 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 considerada 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 gastrointestinais, 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) em seus estudos destacaram o potencial patogênico de *D. fragilis*; 89% dos pacientes infectados apresentaram sintomas gastrointestinais, 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* (CROTTI et al., 2005; SCHUSTER; JACKSON, 2008; STARK et al., 2010)

Pentatrichomonas hominis é encontrada 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 (YANG et al., 1990; 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 (MANCILLA-RAMIREZ; 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 Reinthaler et al. (1988) e Chung et al. (1992).

Inicialmente se acreditava que estas quatro espécies encontradas em humanos eram específicas dessas determinadas regiões. Porém, 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; BRUGEROLLE, 1990) e em amostras vaginais (CRUCITTI et al., 2004). Um caso fatal de derrame pleural exsudativo 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 isolada 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* e *P. hominis* (JONGWUTIWES et al., 2000; DUBOUCHER et al., 2003; CARTER; WHITHAUS, 2008) também foram isoladas no trato respiratório. Esses achados sugerem que estas espécies são capazes de se adaptar e proliferar fora de seus locais usuais do corpo.

Dentre as espécies de Parabasalídeos de importância veterinária, *Tritrichomonas foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) é a mais conhecida por causar a tricomonose genital bovina, que provoca graves prejuízos financeiros e econômicos nos EUA, Canadá e América do Sul, bem como em outras regiões do mundo onde o controle sanitário é deficiente ou o sistema de produção é extensivo, com a prática de monta natural (ALSTAD et al., 1984; BONDURANT, 1985).

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 exibindo claramente a infecção, nem adquire naturalmente imunidade contra a mesma (ANDERSON et al., 1994), e assim passa a infectar várias vacas. Com a idade, há aumento da profundidade das criptas prepúciais, 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 (SINGH et al., 1999). 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.

Essa espécie, *T. foetus*, já foi isolada 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 em 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 causador da tricomoníase entérica felina (LEVY et al., 2003). Clinicamente, a infecção manifesta-se como doença do intestino grosso com sinais 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 seriedade da diarreia, assim como uma maior eliminação dos trofozoítas nas fezes, quando os gatos estavam com coinfeção com *Cryptosporidium* spp.

Tritrichomonas foetus e *Tritrichomonas suis* são espécies muito semelhantes fisiologicamente e compartilham muitos antígenos comuns, o que vem causando discussão quanto à identificação específica entre as espécies, sendo consideradas a 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.

2.5.1 Tricomonose suína

Em 1938, foi evidenciado por Hegner e Alicata, que suínos jovens com histórico de disenteria, apresentavam sinais visíveis de problemas respiratórios como espirros, epistaxe, dispneia, tosse, além de deformação da maxila. Esse quadro, mais tarde foi relatado com evolução agressiva, onde os animais apresentavam bronquite, pneumonia, encefalite, hemoptise uni ou bilateral, com índice de mortalidade entre 20% a 30% (SWITZER, 1951; SPLINDER et al., 1953; RUTTER, 1985), 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: *Tritrichomonas suis*, que anteriormente já havia sido descrito na cavidade nasal; *Tetratrichomonas buttrei*, 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 bovinos fêmeas, e produzir um quadro clássico de tricomoníase. Touros podem transmitir venereamente *T. suis*, e também 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, sugere que esses protozoários têm baixa especificidade por hospedeiro, podendo ocorrer ocasionalmente, sob condições naturais infecções em hospedeiro e órgãos não habituais. E associado ao fato de *T. foetus* e *T. suis* serem muito semelhantes morfolologicamente 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 *Dientamoeba 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 *Pentatrichomonas 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 conseguiu provar que o agente tem capacidade de se multiplicar no ceco dos leitões, causando 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 o episódio de diarreia, sendo capaz de levar o animal à morte.

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 *Trichomonas gallinarum*) foram identificados no trato respiratório humano. Elas 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). De acordo com Duboucher et al. (2005) esses parabasalídeos são microaerófilos, logo, é improvável que iniciam a causa da doença pulmonar, mas são oportunistas que podem causar infecções secundárias e agravar os sintomas e prolongando a doença. A frequência de 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 apresentar-se envolvidos não só regiões específicas de infecção, como também 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 oportunistas e se multiplicam em condições favoráveis. Infecções do trato digestivo por parabasalídeos também estão cada vez mais reconhecido como comuns (MARITZ et al., 2014).

Devido à intensa relação do homem com o animal, os animais podem agir como reservatórios de tricomoniase humana, por serem os hospedeiros não só de *P. hominis* como também do *T. foetus* 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 (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). Que 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 desenvolvido 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. Trata-se de um método menos sensível que o cultivo, pois a quantidade de parasita 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).

Para a detecção do protozoário, o material coletado deve ser inoculado e transportado em meio de transporte e enriquecimento Diamond modificado, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e mescla de antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina B). Esse meio deve ser transportado à temperatura ambiente, protegido da luz e o mais rápido possível ao laboratório, pois o diagnóstico depende da viabilidade do microrganismo. Então são incubados 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 devem ser confirmados pela 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.

2.7.2 Métodos Moleculares: PCR e Hibridização *in situ*

A biologia molecular tem tornado possível o emprego de técnicas de diagnóstico por meio de sondas moleculares e a amplificação específica de fragmentos de DNA por PCR,

incrementando a rapidez, a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico laboratorial (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A reação de PCR é uma técnica de amplificação enzimática de sequências específicas de DNA. Para a amplificação, requer-se um conhecimento prévio da sequência alvo ou, pelo menos, parte dela, pois dois oligonucleotídeos (*primers*) são utilizados para definir de forma específica o fragmento a ser amplificado, em uma reação com repetitivos ciclos de temperatura previamente definidos, na presença de bases nitrogenadas e da enzima *Taq* DNA polimerase. A região do DNA genômico a ser amplificada é definida pelos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, se anelando especificamente às suas sequências. Entre as vantagens da técnica de PCR sobre outros métodos convencionais destacam-se a rapidez, a simplicidade da técnica, as elevadas taxas de especificidade e sensibilidade, permitindo a detecção de uma única molécula de DNA na amostra. Pois consegue-se a replicação de milhões de cópias de um fragmento alvo, baseando-se na capacidade de duplicação do ácido nucléico (SILVA-PEREIRA, 2003; CAMPERO et al., 2003).

A reação de PCR oferece ainda, como vantagem, a rapidez na execução e a possibilidade da automação do método. Este método pode ser utilizado com eficácia para o diagnóstico complementar à cultura do protozoário ou até mesmo como diagnóstico primário e único da infecção (RILEY et al., 1995). Além disso, com o advento da PCR em tempo real, PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência, os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA passaram a ser realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação da amostra, sendo portanto ainda mais sensível e preciso.

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 biotiniladas (semelhante à técnica de imuno-histoquímica). A hibridização pode ser aplicada em material rotineiramente fixado em formol e em parafina, em alguns casos pode-se até utilizar material obtido de necropsias (MCNICOL; FARQUHARSON, 1997).

Esta técnica é menos sensível que à reação da polimerase em cadeia (PCR), pois além da identificação do DNA/RNA desejado, as tecnologias de amplificação são capazes de, simultaneamente, identificar um patógeno e fornecer réplicas da sequência alvo (SILVA-PEREIRA, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução

Os animais utilizados no presente estudo pertencem à suinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, Microrregião de Itaguaí - RJ (22°46'43.7''S 43°39'54.7''W). Submetida a CEUA/IV/UFRRJ; N°096/2014 (Anexo E).

3.2 Animais

Neste estudo foram utilizados 106 leitões desmamados com frequentes episódios de diarreia, dentre eles 58 leitões da fase de creche, entre 28 e 50 dias de idade, e 48 leitões da fase de engorda, entre 60 e 100 dias de idade, com um total de 52 fêmeas e 54 machos. Todos os animais eram mestiços das raças Large White, Pietrain, Landrace e Duroc, criados em regime de semiconfinamento.

3.3 Manejo dos animais

Os animais ao serem desmamados com 28 dias de idade, aproximadamente, foram transferidos para creches suspensas, com piso ripado de polipropileno (também conhecido como fazendão), em lotes de três animais por baia. A higienização é feita a seco com vassoura duas vezes ao dia e limpeza úmida duas vezes por semana. A alimentação na creche é fornecida à vontade em cochos semiautomáticos, com ração à base de milho e soja, com três composições diferentes de acordo com a idade, com livre acesso a água limpa e de qualidade. As matrizes são vermifugadas 15 dias antes do parto, evitando infecção dos leitões, e vacinadas contra *Clostridium perfringens* cepas C e D e cepas de *Escherichia coli* (Litterguard) e contra erisipela, leptospirose e parvovirose suína (FarroWsure). Os leitões são vacinados contra circovirose (PCV tipo 2, CIRCOVAC) e micoplasmose (SPRINTVAC). Os animais permanecem na creche até completar 60 dias de idade, quando atingem aproximadamente 25 kg, em seguida são encaminhados às baias coletivas com cerca de 10 animais por baia, a alimentação passa a ser fornecida duas vezes ao dia, com limpeza diária do recinto. Além da higienização e desinfecção é realizado ainda o vazio sanitário.

3.4 Sinais clínicos

Apesar de todo o manejo sanitário do rebanho em questão, os leitões apresentavam episódios frequentes de diarreia, 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 (Figura 2).



Figura 2; Fotografias (A-F) que ilustram os sinais clínicos dos leitões do rebanho da suinocultura da UFRRJ, Campus Seropédica, RJ. Animais com disenteria (A), prostração (A, B, C e D), desidratação, magreza (D) e tenesmo (E e F).

3.5 Coleta material

Foram coletadas amostras fecais de todos os leitões com até 100 dias, (amostragem

populacional), totalizando 106 animais, estes foram contidos individualmente em estação. As fezes foram coletadas após estímulo das ampolas retais (dactiloestimulação), após a evacuação, recolhidas com as mãos calçadas com luvas cirúrgicas, sem que estas entrem em contato com o piso. As fezes dos mais jovens foram coletadas com auxílio de tubo plástico estéril (equipo utilizado para hidratação parenteral), que foi introduzido na ampola retal, sendo então realizados movimentos circulares e de fricção (Figura 3).



Figura 3: Fotografias (A-F) que ilustram a coleta de amostras fecais diretamente da ampola retal (C,D,E e F), após a dactiloestimulação anal (A e B) dos leitões. Suinocultura da UFRRJ, Campus Seropédica, RJ.

As amostras de cada animal foram 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.

3.6 Meios de enriquecimento para o isolamento

Para o isolamento dos protozoários, os meios de cultura Hanks (HANKS; WALLACE, 1949), Diamond (DIAMOND, 1957), Caldo Peptonado e 199, que já havia sido utilizado por Amin et al. (2010) foram previamente preparados assepticamente 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, três novos meios foram utilizados: CHD, que consiste na homogeneização dos meios Caldo Peptonado, Hanks e Diamond; CH, composto por Caldo Peptonado e Hanks; e Coquetel, constituído 199, Caldo Peptonado e Hanks. Composição dos meios descritos se encontram nos anexos A a G. A todos os meios foram acrescentados os antibióticos: Penicilina (2.000.000 UI/L), Estreptomicina (1,5 mg/L), Anfotericina (2 mg/L) e Gentamicina (400 mg/L).

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.

3.7 Diagnóstico e manutenção das amostras (repique)

3.7.1 Exame microscópico direto

No laboratório, as fezes coletadas foram pesadas, e 10 gramas foram homogeneizados em 50 ml de PBS; foi feito o primeiro exame por microscopia óptica direta a fresco, colocando-se uma gota do meio 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. Em seguida as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente (25 a 28 °C) sendo reexaminadas a cada 24 horas. 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 1 mL transferida para novos frascos (1° repique) contendo 5mL dos meios de manutenção Diamond, Caldo Peptonado, 199, CH, CHD e Coquetel (Figura 4). 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 48 horas, após serem avaliadas em microscopia óptica, em objetiva de 10 para detecção de trofozoítas móveis. 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.

3.7.2 Análise morfológica

O exame morfológico foi realizado com 1 mL de cultura positiva centrifugada a 3000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado, onde foi retirado uma alíquota de 10 μL e colocada em lâmina para a preparação de esfregaços que foram secos ao ar. Após a secagem as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 30 minutos e coradas pelo método do Panótico rápido® (Primo star iLEDZeiss®). A identificação morfológica foi realizada em microscopia óptica em objetiva de 40 e 100.

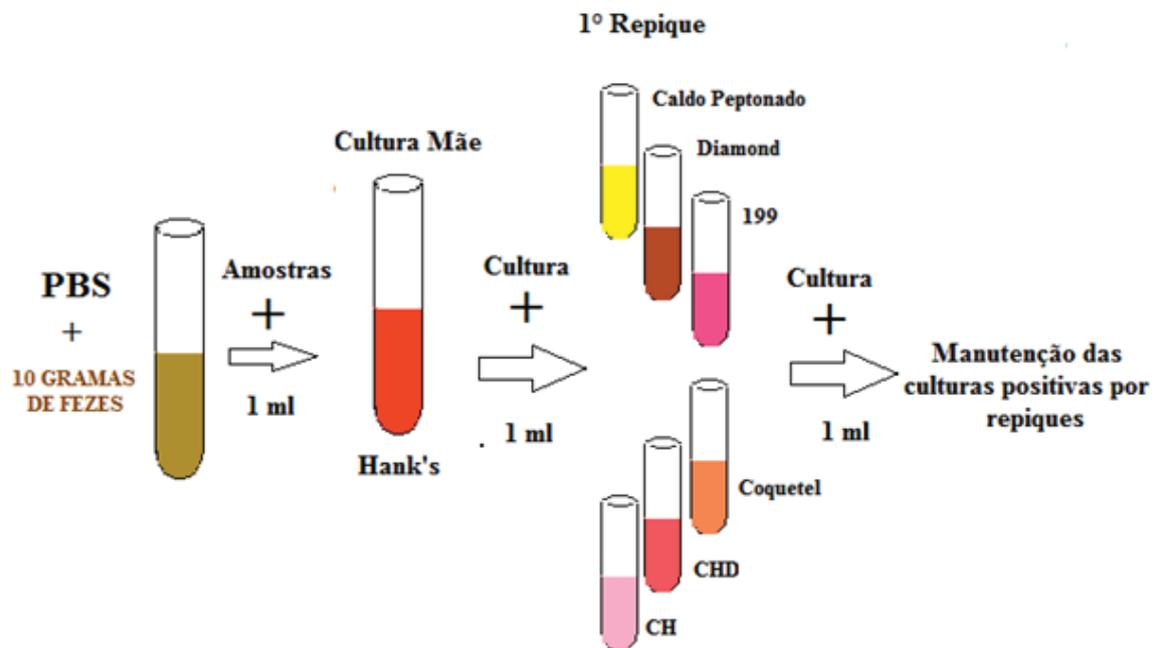


Figura 4; Ilustração do processamento das fezes, manejo das amostras e manutenção das culturas através de repiques.

3.7.3 Biologia molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

3.7.3.1 Extração de DNA total

Para as análises moleculares, cultura de *T. foetus* (cepa K) e de *P. hominis*, cepa isolada de felino em 2014, foram utilizadas como controle positivo das reações de PCR. Culturas de protozoários dos suínos foram submetidas a processamento para extração de DNA. As culturas em fase logarítmica foram centrifugadas (Microcentrifuga Eppendorf 5417R) a 16.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* utilizado para a extração de DNA genômico. O DNA foi extraído com auxílio da resina Instagene Matrix® (BioRad) conforme instruções do fabricante.

A concentração do DNA extraído e a razão da absorbância 260/280 foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific®). As amostras foram mantidas em *freezer* a -20°C, até o momento da análise no localizado Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular. Anexo II do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

3.7.3.2 Oligonucleotídeos iniciadores

Para a execução da PCR foram utilizados iniciadores (*primers*) que amplificam as regiões ITS 1 e 2 e gene ribossomal 5.8S, para identificação de duas famílias: Trichomonadidae e Tritrichomonadidae, TFR1 (5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3') e TFR2 (5'-CGG TAG GTG AAC CTG CCG TTG G-3) desenvolvidos por Felleissen et al. (1998) cujo produto final apresenta 372 pares de bases. Além deste, foi utilizado um segundo par de primers espécie-específico para *T. foetus*, TFR3 (5'- CGG GTC TTC CTA TAT GAG ACA GAA CC- 3') e TFR4 (5'-CCTGCC GTT GGA TCA GTT TCG TTA A-3') com produto final de 347 pares de bases (FELLEISEN et al., 1998) e um terceiro par de *primers* espécie-específico para *P. hominis*, Th3(5'- TGT AAA CGA TGC CGA CAG AG -3') e Th5 (5'-CAA CAC TGA AGC CAA TGC

GAG C-3') com um produto final de 339 pares de base (CRUCITTI et al., 2004).

3.7.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR foi conduzida com um volume total de reação de 20 µl usando aproximadamente 20 ng do DNA genômico, 0,2 mM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 3,0 mM MgC₁₂ e 0,5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador (TProfessional 96 modelo 070-901) seguindo as condições: desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 66 °C, 30 segundos; extensão a 72°C, 90 segundos, acompanhando 40 ciclos com extensão final por 15 minutos a 72 °C. Alíquotas das reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2%. Os géis foram corados em brometo de etídio e a visualização dos ácidos nucleicos foi feita em transiluminador (BIO RAD® HOODII).

3.8 Análises estatística

Os dados obtidos foram inseridos em planilhas de Excel, para serem analisados pelo teste qui-quadrado e de Fischer exato quando recomendado, a nível de 5% de significância, segundo Sampaio (2000).

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Frequência de parabasalídeos

No primeiro exame de microscopia óptica, realizado cerca de duas horas após a coleta do material, em nenhuma das 106 amostras de fezes de suíno (diluídas em PBS) com desenterias, foi possível a visualização do protozoário na forma trofozoíta, ou seja, com movimento progressivo e característico de parabasalídeos. 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.

Das 106 amostras analisadas foi possível a visualização do flagelado em 75 amostras ao exame de microscopia óptica, ou seja, 70,75% dos animais foram positivos. Nas outras 31 amostras (29,25%), não houve a visualização do mesmo. Trinta e nove das 75 amostras positivas corresponderam às fêmeas (52%), enquanto 36 aos machos (48%). Do total de amostras onde não foi visualizado o protozoário, 58,07% (18 amostras) foram dos machos e 41,93% (13 amostras) das fêmeas. Dentre as fêmeas, 75% foram positivas e 25% negativas, enquanto 70,37% dos machos foram positivos e 29,63% negativos. Contudo, após análise do teste qui-quadrado, foi possível verificar que não houve diferença significativa na relação da presença do protozoário nas fezes com o sexo do animal, ($p \geq 0,05$). Dados representados na Tabela 1.

Tabela 1; Resultado do exame direto das amostras dos leitões com disenteria, segundo sexo, para a presença de parabasalídeos, na suinocultura.

SEXO	NÚMERO DE ANIMAIS					
	Positivos	%	Negativos	%	Total	%
Macho	36	48	18	58,07	54	50,94
Fêmea	39	52	13	41,93	52	49,06
Total	75	70,75	31	29,25	106	100

* Teste Exato de Fisher $p=0,4658$

Com relação à faixa etária, 58 das 106 amostras fecais, foram referentes a leitões na fase de creche (28 e 50 dias de idade), representando 54,71% do total das amostras. As outras 48 amostras foram de leitões que estavam na fase de engorda, e apresentavam entre 60 e 100 dias de

idade, aproximadamente 45,26% do total das amostras.

Dentre as 75 amostras dos leitões positivos, 38 foram de animais da fase de creche (50,66%) e 37 de animais da fase de engorda (49,34%). Das 31 amostras negativas, 20 foram de animais da creche (64,51%) e 11 de animais da engorda (35,49%). Dentre as amostras dos leitões da creche, 65,52% foram positivos, enquanto 34,48% foram negativos. Nos animais de engorda, a porcentagem de positivos foi de 77,08% e de negativos foi de 22,92%. Apesar de distinto o percentual de positividade entre os leitões da creche e leitões de engorda, não houve diferença estatística em relação à presença do protozoário com os leitões de diferentes categorias. ($p \geq 0,05$). Dados representados na Tabela 2.

Tabela 2; Resultado do exame direto das amostras dos leitões com disenteria, segundo faixa etária, para a presença de Parabasalídeos, na suinocultura.

IDADE	NÚMERO DE ANIMAIS					
	Positivos	%	Negativos	%	Total	%
Creche < 50 dias	38	50,66	20	64,51	58	55
Engorda > 60 dias	37	49,34	11	35,49	48	45
Total	75	70,75	31	29,25	106	100

* Teste Exato de Fisher $p=0,2069$

A alta prevalência de Parabasalídeos encontrada no estudo, 70,75%, é muito semelhante à descrita por Cacciò et al. (2012) onde 52 dos 74 leitões examinados encontravam-se positivos, cerca de 70,27% e a Pakandl em 1994, no qual foram examinadas 842 matrizes, sendo 77% positivas. Mostegl et al. (2011) relataram uma prevalência relativamente menor, aproximadamente 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).

A diversidade parasitária em suínos permanece negligenciada em vários aspectos, apesar da alta mortalidade de leitões causada por episódios de diarreia, não responsiva a antibioticoterapia; poucos estudos sobre os possíveis agentes etiológicos são relatados, sendo a grande maioria dos casos atribuída a *E. coli* e *C. suis* (= *I. suis*) (ZLOTOWSKI et al., 2008; CALDERARO et al., 2001). Diante da alta frequência de Parabasalídeos relatada e a alta

correlação desses com distúrbio digestivos em diferentes espécies, estes devem ser incluídos como diagnóstico diferencial de diarreia não só em suínos como nas demais hospedeiras.

4.2 Cultivo *in vitro*

Todas as amostras de fezes positivas em que houve a visualização do flagelado se mantiveram positivas em meio de cultura Hanks (cultura mãe). Porém algumas cepas isoladas nesse primeiro meio de cultura não resistiram à limpeza do meio, ou seja, não foi possível repicá-las para meios novos (limpos). Essas culturas não se adaptaram a nenhum dos meios usados (Hanks, Caldo Peptonado, Diamond e 199, CHD, CH e Coquetel) se a concentração de fezes no meio não fosse alta. E por isso não foram analisadas morfológicamente e nem identificadas por PCR.

Hiber et al. (1960) afirmaram que *Tritrichomonas rotunda* se desenvolve em meios de cultivo por pouco tempo se não houver extrato cecal no meio, e que *Trichomonas buttrey* não pode nem ser repicado sem este extrato. O que justificaria o fato de algumas culturas só se desenvolverem nos meios usados se a concentração de fezes no meio fosse alta. Outra possibilidade é que nessas culturas poderiam ter outros protozoários que são próximos filogeneticamente, mas possivelmente não pertencem às Ordens Trichomonadida e Tritrichomonadida, e por isso os meios de cultura não permitiram seu desenvolvimento em baixa concentração de fezes.

Dos meios usados, Diamond, referência para o isolamento desses flagelados (APPEL et al. 1993), foi o único que não permitiu o desenvolvimento do protozoário em nenhuma das amostras avaliadas; as culturas ficaram contaminadas com bactérias e dificilmente foi possível visualizar os trofozoítas, e quando visualizados, sua multiplicação era lenta, a cultura não foi capaz de se manter, e em menos de 48 horas não havia mais motilidade do protozoário. Certamente, algumas espécies de bactérias favorecidas pelo meio de cultura, ao se desenvolverem prejudicaram os protozoários, consumindo os nutrientes ou mesmo mudando características físico-químicas que impediram o desenvolvimento dos parabasalídeos. Cobo et al. (2003) também não obtiveram sucesso no cultivo de *Tetratrichomonas* sp. neste mesmo meio.

O Caldo Peptonado permitiu o desenvolvimento dos protozoários em algumas amostras, porém não foi capaz de mantê-las viáveis por muito tempo; as culturas rapidamente saturavam e em determinado momento não foi possível repicá-las, a não ser fossem introduzidas em outros meios (CHD, CH e/ou Coquetel).

No meio 199, usado anteriormente por Amin et al. (2009) no isolamento de *Tetratrichomonas gallinarum* e *Trichomonas gallinae*, algumas cepas não foram capazes de se desenvolver, enquanto a maioria delas se adaptaram e se multiplicaram, o que divergiu da baixa taxa de crescimento dos trofozoítas relatado por eles. Todavia, a combinação dos meios entre si (CHD, CH e coquetel), foi a melhor maneira de se isolar os flagelados, além do melhor crescimento, as culturas nestes meios foram capazes de se manter por mais tempo. Contudo, novas pesquisas quantitativas necessitam ser feitas com um número experimental que permita uma padronização e consequente análise estatística, com o intuito de se identificar os meios mais indicados para cada espécie, comparando as taxa de crescimento, mortalidade e tempo de manutenção nas culturas nos diferentes meios.

Em cultura, os trofozoítas apresentavam movimentação progressiva e irregular, característica desses parasitas. Apresentando-se como uma estrutura ovoide ou piriforme, sendo a maioria deles de formato arredondado. A multiplicação celular variou entre cepas, enquanto algumas se multiplicavam rapidamente, necessitando de repiques a cada 48 horas, outras foram

muito lentas, sendo necessário aguardar mais de 72 horas para haver sucesso no repique. Considera-se que essas diferenças, quando ao desenvolvimento sejam relativas ao metabolismo energético, que varia de espécie para espécie, e também sejam inerente a composição físico-química de cada amostra.

As culturas se desenvolveram bem à temperatura de 34°C, e ficaram ainda melhores quando colocadas em microaerofilia, através da utilização de vaselina líquida, apresentaram crescimento maior e com menor contaminação bacteriana e fúngica quando comparado às mesmas cepas isoladas em meios de cultura sem a vaselina. Entretanto, todas as culturas mantiveram contaminação por bactérias, que foram resistentes a vários antibióticos. Não foi possível a axenização de nenhuma cultura analisada. Sempre que se eliminavam as bactérias do meio, as culturas não resistiam. A dependência desses parabasalídeos por bactérias foi nitidamente observada, e segundo Cobo et al (2003), a digestão de bactérias é provavelmente a fonte mais importante de compostos nitrogenados para o seu crescimento. Contudo, é necessário um grande número de bactérias (vivas ou mortas) na cultura, visto que a capacidade biossintética desses flagelados é muito limitada.

As culturas com maciça contaminação bacteriana, não tiveram sua morfologia analisada e não foram identificadas por PCR, em função da grande quantidade de bactérias e da baixa concentração de trofozoítos, contudo há uma necessidade de se investir em mais pesquisas não só com meios de cultura que reduzam a contaminação, como em novas técnicas de extração de DNA ou métodos de PCR mais sensíveis e precisos como PCR em Tempo Real.

A maioria das cepas resistiram em um mesmo meio, sem repiques, por cerca de 10 dias enquanto outras resistiram por semanas e até meses.

4.3 Morfologia

O método de coloração priorizado por esse estudo, Panótico rápido®, para a identificação morfológica por microscopia óptica, não permitiu a visualização de estruturas importantes para a identificação de gênero e espécie, como o número exato de flagelos, o número de ondas da membrana ondulante e o formato do axóstilo. Adicionalmente, a presença e as características das várias organelas tais como os hidrogenossomas, também não foram observadas.

Todavia, organismos de tamanho variados em uma mesma cultura foram claramente visíveis (Figura 5 F) possivelmente por estarem em fases distintas do seu metabolismo, sendo frequente a observação de células em processo mitótico, com dois núcleos (Figura 5 J,L). As células dos protozoários apresentaram formato que variava de arredondada (Figura 5 B;C) a piriformes (Figura 5 D,F), flagelo posterior livre, flagelos anteriores, uma membrana ondulante, axóstilo de tamanho variado de uma amostra para outra (Figura 5 A,B,C), um núcleo sempre na porção anterior da célula e o corpo parabasal visualizado acima do núcleo (Figura 5 B,F). Além disso, vacúolos foram vistos por todo o citoplasma. As bactérias foram frequentemente encontradas dentro das vesículas e próximas à superfície das células da maioria dos protozoários examinados (Figura 5 G,M).

O grande número de vesículas foi semelhante aos encontrados em *T. foetus* (BENCHIMOL et al., 1986), *Tetratrichomonas didelphidis* (ANDERSEN; REILLY, 1965), *Pentatrichomonas* (JENSEN; HAMMOND, 1964) e *Tetratrichomonas* sp (COBO et al., 2003). De acordo com Cobo et al. (2003), estes tipos de vesículas podem ser vacúolos endocíticos, como resultado de fagocitose de bactérias, assim como outras partículas sólidas. Portanto, esses parabasalídeos são capazes de realizar atividade fagocitária, internalizar e posteriormente

degradar bactérias. Em vivo essa relação com bactérias é relatada como fator agravante nos distúrbios intestinais (LI, W et al., 2014).

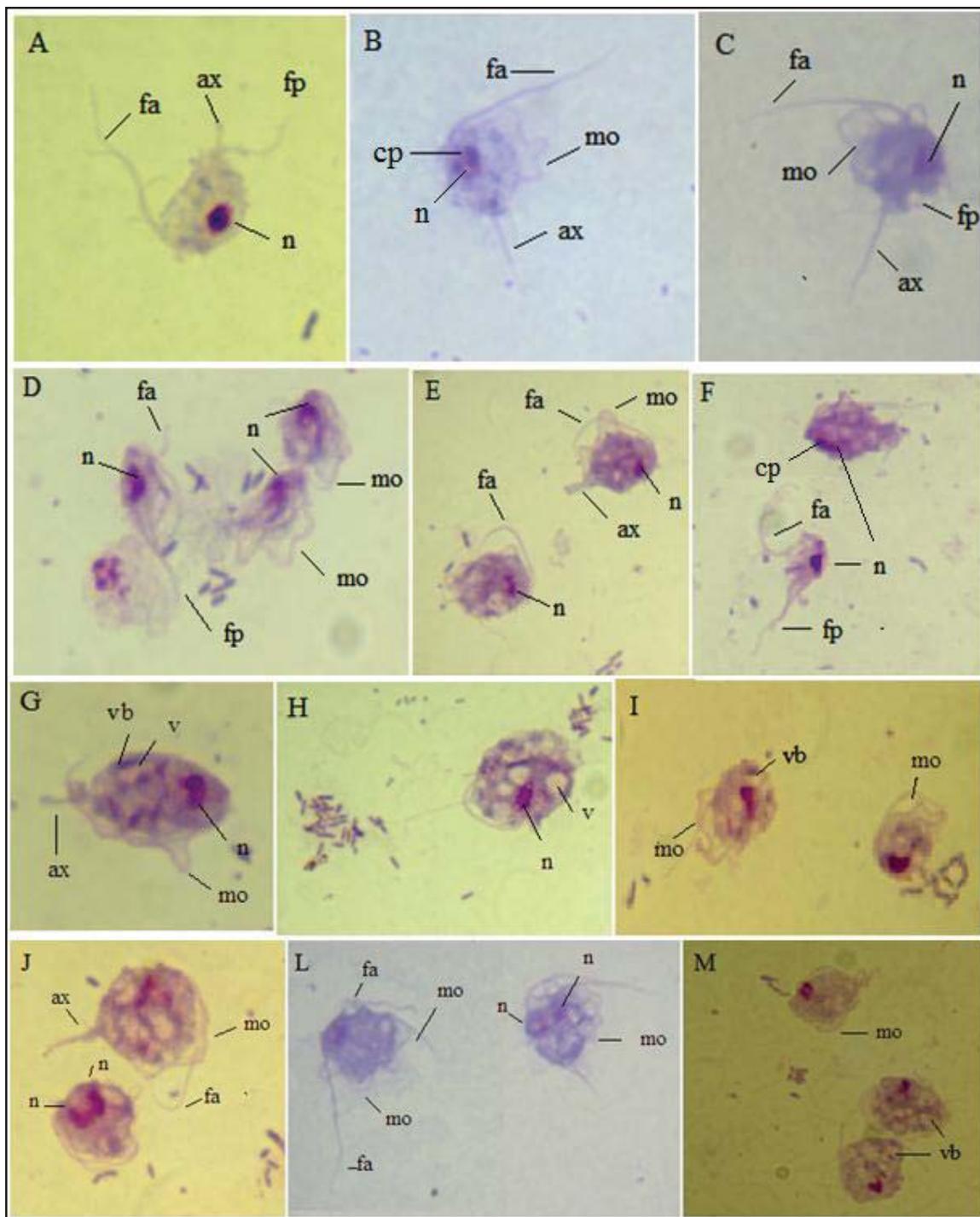


Figura 5; Morfologia dos parabasalídeos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M), coradas pelo método Panótico rápido®, observados por microscopia óptica em objetiva de 100. ax: axóstilo; cp: corpo parabasal; fa: flagelo anterior; fp: flagelo posterior; mo: membrana ondulante; n: núcleo; v: vacúolos; vb: vacúolos com bactérias.

A microscopia óptica é um excelente método para a descrição da morfologia desses flagelados, porém, diante da complexibilidade morfológica e do grau de semelhança entre as espécies, não deve ser o único método de diagnóstico, pois não fornece parâmetros suficientes para se fazer a diferenciação das espécies, o que justifica o fato da análise molecular ser priorizada por muitos autores (HAYES et al., 2003; TACHEZY et al., 2002; LI, W et al 2014; LI, W-C et al., 2014).

4.4 Análise de DNA

Trinta e cinco amostras de culturas diagnosticadas como positivas para o protozoário flagelado, por microscopia óptica, apresentaram uma menor contaminação bacteriana com maior concentração de trofozoítas e foram submetidas à análise molecular. Trinta amostras analisadas produziram a amplificação das regiões ITS 1 e 2, e 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. Portanto, 30 das 35 amostras analisadas, 85,71% pertencem a estas famílias (Figuras 6 e 7).

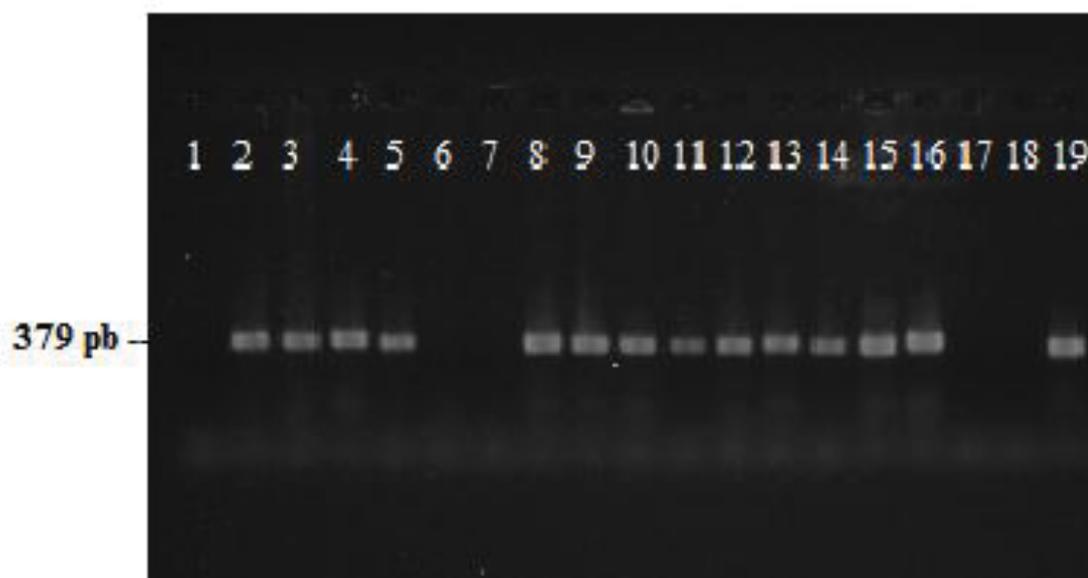


Figura 6; Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo do mix (coluna 1); amostras de suínos TP1-TP15 (coluna 2-16); controle negativo da extração (coluna 17); controle negativo do ambiente (coluna 18); controle positivo de reação (coluna 19) correspondente a aproximadamente 379pb.

Quando foi utilizado os *primers* espécie-específico para *P. hominis* 10/30 amostras foram consideradas positivas (33,33%) com base na amplificação de 339 pares de base, Th3 e Th5 (Figura 8). Não foram observados produtos de amplificação utilizando-se os de *primers* espécie-específico para *T. foetus*, TFR3 e TFR4. No entanto, no controle positivo (DNA equivalente a 100 trofozoítos *T. foetus* cepa K) foi possível observar uma forte amplificação de uma banda de aproximadamente 347 pb (Tabela 3).

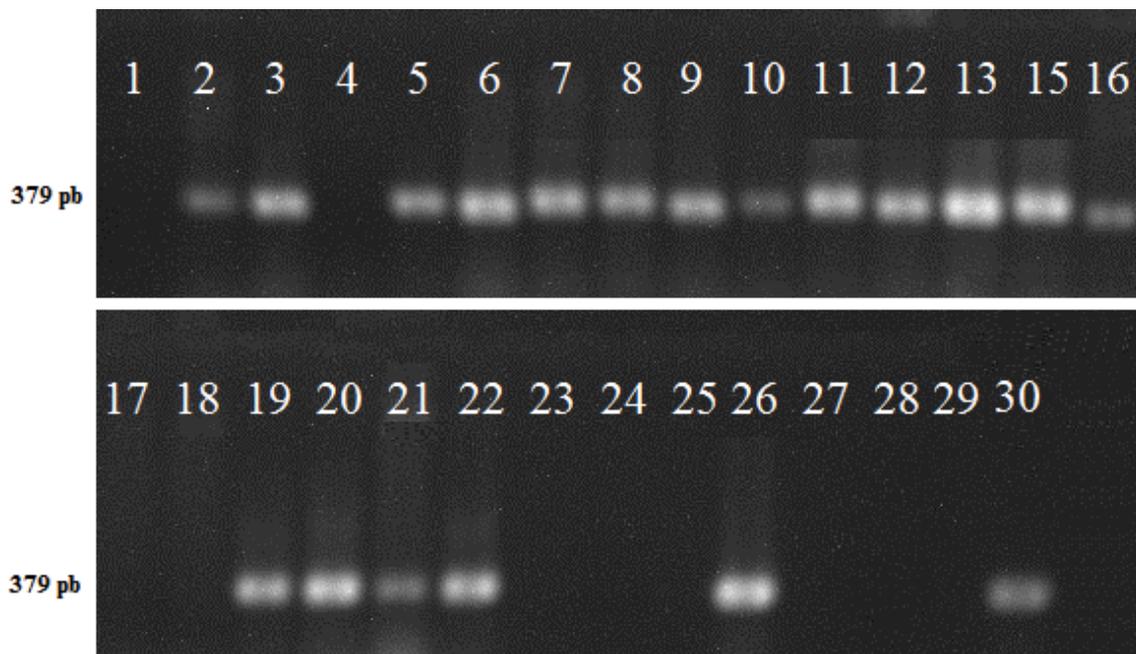


Figura 7; Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo do mix (coluna 1); amostras de suínos TP16-TP35 (linha 2-22); vazio (coluna 23, 27,28 e 29); controle negativo da extração (linha 24); controle negativo do ambiente (coluna 25); e controle positivo (coluna 26 e 30) correspondente a aproximadamente 379pb.



Figura 8; 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 TP2-TP4 e TP7-TP14 (coluna 2-14); controle negativo de extração (coluna 18 e 19) e controle positivo (linha 15-17 e 20) correspondente a aproximadamente 339pb.

Tabela 3; Resultados das culturas positivas em microscopia óptica, em relação aos resultados com análise genotípica (PCR) para as famílias Tritrichomonadidae e Trichomonadidae, e para espécie-específica (*Pentatrichomonas hominis*) de 35 amostras oriundas de leitões com episódio de diarreia, de uma suinocultura localizada no município de Seropédica/RJ.

AMOSTRA	RESULTADOS		
	Cultura	Família	PCR <i>P. hominis</i>
TP1	Positivo	Positivo	Negativo
TP2	Positivo	Positivo	Positivo
TP3	Positivo	Positivo	Negativo
TP4	Positivo	Positivo	Positivo
TP5	Positivo	Negativo	---
TP6	Positivo	Negativo	---
TP7	Positivo	Positivo	Negativo
TP8	Positivo	Positivo	Positivo
TP9	Positivo	Positivo	Negativo
TP10	Positivo	Positivo	Negativo
TP11	Positivo	Positivo	Positivo
TP12	Positivo	Positivo	Positivo
TP13	Positivo	Positivo	Negativo
TP14	Positivo	Positivo	Negativo
TP15	Positivo	Positivo	Negativo
TP16	Positivo	Positivo	Negativo
TP17	Positivo	Positivo	Negativo
TP18	Positivo	Negativo	---
TP19	Positivo	Positivo	Positivo
TP20	Positivo	Positivo	Positivo
TP21	Positivo	Positivo	Negativo
TP22	Positivo	Positivo	Negativo
TP23	Positivo	Positivo	Negativo
TP24	Positivo	Positivo	Negativo
TP25	Positivo	Positivo	Positivo
TP26	Positivo	Positivo	Positivo
TP27	Positivo	Positivo	Negativo
TP28	Positivo	Positivo	Negativo
TP29	Positivo	Positivo	Negativo
TP30	Positivo	Negativo	---
TP31	Positivo	Positivo	Negativo
TP32	Positivo	Negativo	---
TP33	Positivo	Positivo	Positivo
TP34	Positivo	Positivo	Negativo
TP35	Positivo	Positivo	Negativo
Total de Positivas	100%	85,71%	33.33%

Legenda: TP: Codificação utilizada no laboratório para a identificação das espécies; ---: amostras que não foram analisadas por PCR para a espécie *P. hominis*.

Em função da ausência de *primers* espécie-específico para as demais espécies das famílias Tritrichomonadidae e Trichomonadidae não foi possível a determinação das outras espécies presentes. Sendo portanto necessário o sequenciamento de todas as amostras onde não houve a

identificação do protozoário (Dados ilustrados na figura 9). Cinco amostras que se apresentaram positivas na cultura e que não pertence às famílias Trichomonadidae e Tritrichomonadidae deverão ser cautelosamente analisadas para futura identificação do flagelado, pois podem se tratar de espécies importantes como *Dientamoeba fragilis*, já descrita anteriormente em suínos, com uma alta prevalência, 63,16% (CACCIÒ et al., 2012) e que também é atribuída a disenterias em humanos e outros animais (LANKESTER et al., 2010; STARK et al., 2010). Ou mesmo ser referentes a outras espécies não relatadas anteriormente que também podem estar relacionadas aos episódios de diarreia, ou simplesmente ser patógenos oportunistas.

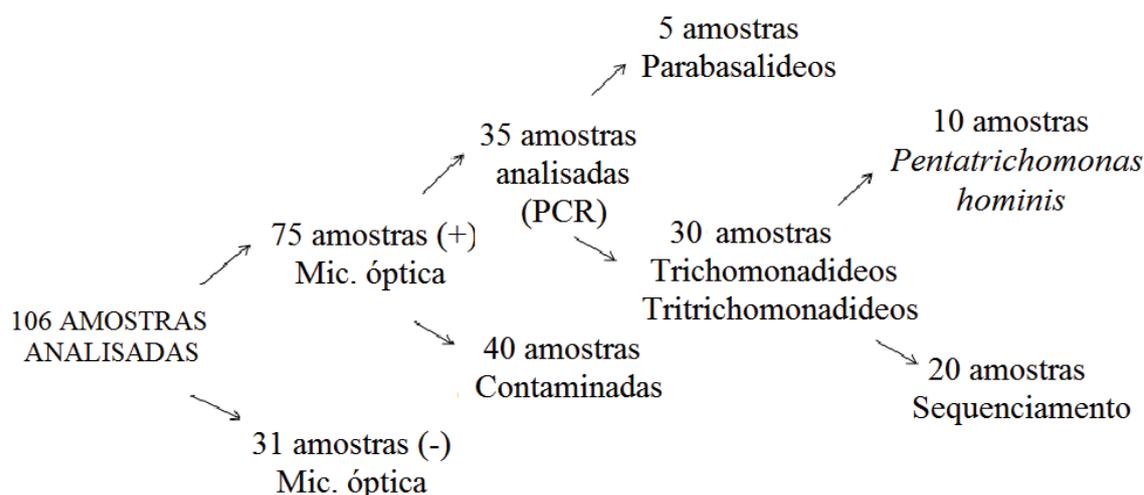


Figura 9: Esquematização das 106 amostras de leitões analisadas e diagnosticadas por microscopia óptica e PCR.

Doi et al. (2013) encontraram uma prevalência de parabasalídeos de aproximadamente 64,0% (41 das 64 amostras positivas) no exame direto sob microscopia óptica, e afirmaram que infecção por *T. foetus* é comum em suínos no Japão, ao diagnosticar por análise molecular, que 36 dos 64 suínos (56,3% de positividade), encontravam-se parasitados por *T. foetus*. Entretanto, no presente estudo não foi identificado *T. foetus* em nenhuma das amostras analisadas.

Este é o primeiro relato da ocorrência de *P. hominis* em leitões com disenterias no Brasil, e o segundo no mundo. Foi investigado parabasalídeos em um rebanho acometido por diarreia e isolado *P. hominis* do trato intestinal de 10 leitões naturalmente infectados. 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 outros mamíferos, incluindo os cães e gatos. Portanto a capacidade da espécie de causar perturbação gastrointestinal nesses hospedeiros é indicada por muitos autores (GOOKIN et al., 2001; LEVY et al., 2003; WANG et al., 2006; COMPAORE et al., 2013; LI, W-C et al., 2014).

A habilidade desses protozoários de se desenvolver em uma ampla gama de hospedeiros causando infecções em diferentes tecidos, é legitimado pelo crescente isolamento do protozoário, em hospedeiros que não foram descritos anteriormente, como *P. hominis* em felinos e suínos, e os isolamentos em locais atípicos, *P. hominis* isolado do pulmão e da articulação de humanos. Essa casuística aumenta a preocupação frente aos riscos desses agentes para a saúde humana e animal, sobretudo pelo possível potencial zoonótico (OKAMOTO et al.,1998; DUBOUCHER et al., 2005, 2006; ZALONIS et al. 2011; CHAOQUN YAO, 2012; DIMASUAY, RIVERA, 2013; MARITZ et al., 2014).

Diante da grande população de suínos no Brasil, mais de 39 milhões, o papel destes como reservatórios de *P. hominis* devem ser cautelosamente considerados, não só pela existência de um contato próximo com seres humanos, mas também pela notória dificuldade na destinação dos resíduos orgânicos (fezes) desses animais.

5 CONCLUSÕES

- Conclui-se que parabasalídeos são frequentes em leitões com disenterias;
- Parabasalídeos devem ser incluídos como diagnóstico diferencial de disenterias não só em suínos como nas demais espécies;
- Os meios CHD, CH e Coquetel foram à melhor maneira de se isolar parabasalídeos, com menor contaminação bacteriana e maior multiplicação dos trofozoítas;
- A vaselina líquida é um excelente aliado no isolamento desses flagelados;
- O método de Panótico Rápido auxilia na identificação desses flagelados, porém novas técnicas de coloração devem ser aprimoradas para permitir a diferenciação das espécies;
- A infecção por *P. hominis* pode ser uma causa comum de tricomonose em leitões com disenterias;
- O sequenciamento gênico das demais espécies encontradas necessita ser realizado para determinar as outras espécies envolvidas no parasitismo e possivelmente na ocorrência de diarreias, o que possibilitará não só o desenvolvimento de *primers* espécie-específico, como também a compreensão da diversidade desses protozoários em suínos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- 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.; REILLY, J. The anatomy of *Tetratrichomonas didelphidis* (Hegner and Ratcliffe, 1927) comb. N. from the opossum. *Journal of Parasitology*, v. 51, p. 913–921, 1965.
- 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.
- 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.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – Abipecs. Relatório 2012/2013. Disponível em: <<http://www.abcs.com.br>>. Acesso em: 28 Abr. 2014.
- 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.; 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.; CUNHA E SILVA, N.; ELIAS, C.; DE SOUZA, W.; *Tritrichomonas foetus*: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis. *Experimental Parasitology*, v. 62, p. 405–415, 1986.
- 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.; 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.; 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.; 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.; 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.
- 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. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v.10, p.528–550, 2004.
- 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.
- BONDURANT, R. H. Diagnosis, treatment and control of bovine trichomoniasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.7, p.179-188, 1985.
- 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.
- CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 68, p. 29-34, 2001.

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.

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 buttreyi* (Hibler et al., 1960) Honigberg, 1963 in bovine diarrhoeic faeces. *Veterinary Parasitology*, v. 70, p. 41-45, 1997.

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.

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 prepuceal 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, 145-150, 2004.

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.

- CROTTI, D.; SENSI, M.; CROTTI, S.; GRELLONI, V.; MANUALI, E. *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Veterinary Parasitology*, v.14, p.349-351, 2007.
- 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.
- DAHLGREN, S. S.; GJERDE, B.; PETTERSEN, H. Y. First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus. *Journal of Small Animal Practice*. v. 48, p.654-657, 2007.
- 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. Antigenic comparison between *Tritrichomonas suis* and *T. foetus*. II. Gelimmunodiffusion. *Reviews Microbiology*. v. 18, p. 167-171, 1976.
- 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, 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.339-405, 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.

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.

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. 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.; CABY, S.; DUFRERNEZ, F.; CHABÉ, 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.

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.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

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 trichomonads from swine or with *Trichomonas 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 variation 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.

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.

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.; 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.; 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.

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.

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.

HAMPL, V.; VRLI' IK, M.; CEPICKA, I.; PECKA, Z.; KULDA, J.; TACHEZY, J. Affiliation of Cochlosoma to trichomonads confirmed by phylogenetic analysis of the small-subunit rRNA gene and a new family concept of the order Trichomonadida. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 56, p. 305-312, 2006.

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.
- 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 buttreyi* sp. *Journal of Protozoology*, v. 7, p.159–171, 1960.
- HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p. 345-375, 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. Trichomonad found outside the urogenital tract of humans. In: *Trichomonads Parasitic in Humans*. Springer New York, 1990, 342-393.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (IBGE). Produção da agropecuária municipal (2010). Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 22 Abr. 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (IBGE). Produção da agropecuária municipal (2011). Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/>> .Acesso em: 22 Abr. 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (IBGE). Produção da agropecuária municipal (2012). Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/>> .Acesso em: 22 Abr. 2014.
- 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.
- JENSEN, E.; HAMMOND, D.; A morphological study of Trichomonads and related flagellates from the bovine digestive tract. *Journal of Protozoology*, v. 11, p. 386–394, 1964.
- JONGWUTIWES, S.; SILACHAMROON, U.; PUTAPORNTIP, C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine*, v.94, p.185-186, 2000.

- 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.
- 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.
- KIERSZENBAUM, A. L. Sistema digestório inferior. In: *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia*. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2004. p.449-474.
- KITANO, Y.; MAKINODA, K.; FURUKAWA, M.; TOYOMITSU, Y.; FUKUYAMA, T.; HIGASHIMA KAWA, 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.
- LANKESTER, F.; KIYANG, J. A.; BAILEY, W.; UNWIN, S. *Dientamoeba fragilis*: initial evidence of pathogenicity in the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 41, p. 350–352, 2010.
- 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.
- 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.
- 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*. p.1-7, 2014.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- MCNICOL, A. M.; FARQUHARSON, M. A. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *Journal of Pathology*, v. 182, p. 250-261, 1997.
- MELONI, D.; MANTINI, C.; GOUSTILLE, J.; DESOUBEUX, G.; MAAKAROUN-VERMESSE, Z.; CHANDENIER, J.; GANTOIS, N.; DUBOCHER, C.; FIORI, P. L.; DEI-CAS E.; DUONG, T. H.; VISCOGLIOSI E. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in two patients with gastrointestinal symptoms. *Journal of Clinical Pathology*, v.64, p.933-935, 2011
- MIDDLEJ, 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.
- 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. Interrelationships among human immunodeficiency virus type I infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis and the prevalence of yeasts. *Journal of Infectious Diseases*, v. 185, p. 69-73, 2002.
- MORÉS, N.; AMARAL, A. D. Patologias associadas ao desmame. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 10, 2001, Concórdia. *Resumos...* Concórdia: Embrapa CNPSA, 2001. p. 215-224.
- MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; CIACCI, J.R.; AMARAL, A.L.; BARIONI, W. JR. Comunicado técnico. EMBRAPA. CT / 178 / EMBRAPA–CNPSA, p. 1–4. Junho/1991.
- MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Molecular detection of parasitic protozoa. *Parasitology*, v. 117, p. S73-S85, 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.; 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.

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.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). Publicação sobre consumo mundial de carne. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acessado em: 20 Mai. 2014.

PAKANDL, M. The prevalence of intestinal protozoa in wild and domestic pigs. *Veterinary Medicine*. v. 39, p.377-380, 1994.

PELLEGRIN, A. O. Tricomonose bovina (Bovine trichomoniasis). In: ANAIS DO II SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1997, Caxambu. Anais... Caxambu, 1997. p. 60-65.

PEREIRA-NEVES, A.; RIBEIRO, K.C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. *Protist*. v. 154, p. 313-329, 2003.

PINK, A. N.; YAROSEVICH, G. A. Outbreak of porcine rhinitis caused by trichomonads. *Veterinary*. v. 34, p. 27-29, 1957.

REIN, M. F. Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: *trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. 1990, 225-234.

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.

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, Canadá. *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, 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.

RUTTER, J. M. Atrophicrhinitis 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*, 86, 263–270, 2003.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2000, 221p.

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*. South Dakota Academy of Sciences, v.37, 1959.

SILVA FILHO, F. C.; DE SOUZA, W. The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. *Cell Struct Funct*, 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, 2003. p. 99-10.

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.

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.

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.

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.

- VAN BEERS-SCHREURS, H. M. G.; NABUURS, M. J. A.; VELLENGA, L.; WENSING, T.; BREUKINK, H. J. Role of the large intestine in the pathogenesis of diarrhea in weaned pigs. *American Journal of Veterinary Research*. v.59, p.696-703, 1998.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS D. E. S. N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, p.81-86, 2008.

ANEXOS

Anexo A: Tabela de 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 B: Tabela de 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 C: Tabela de 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 D: Composição do meio de cultura 199.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L	COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Acetato de retinol	0,14	L-fenilalanina	25
Ácido fólico	0,01	L-glutamina	100
Ácido nicotínico	0,025	L-histidina. HCL.H ₂ O	21,88
Ácido p-aminobenzóico	0,05	L-isoleucina	20
Adenina sulfato	10	L-leucina	60
Bicarbonato de sódio	50	L-lisina. HCL	70
Calciferol	0,1	L-metionina	15
Cloreto de colina	0,5	L-prolina	40
Cloreto de potássio	400	L-serina	25
Cloreto de sódio	6800	L-tirosina	57,7
Colesterol	0,2	L-treonina	30
Deoxiribose	0,5	L-triptofano	10
Fosfato de sódio monobásico	125	L-valina	20
Fosfato de tocoferol Na	0,01	Menadione	0,01
Glicina	50	Niacinamida	0,025
Glicose	1000	Nitrato de ferro	0,72
Glutationa	0,05	Pantotenato de cálcio	0,01
Guanina. HCL	0,3	Piridoxal. HCL	0,025
Hidroxi prolina	10	Piridoxina. HCL	0,025
Hipoxantina	0,3	Riboflavina	0,01
Inositol	0,05	Ribose	0,5
L-ácido aspártico	30	Sulfato de magnésio	200
L-ácido glutâmico	75	Tiamina. HCl	0,01
L-alanina	25	Timina	0,3
L-arginina. HCL	70	Tween 80	20
L-cisteína. HCL. H ₂ O	0,11	Vermelho de fenol	20
L-cistina	26	Xantina Na	0,344

ANEXO E: Tabela de composição do meio de cultura Coquetel

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L	COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Acetato de retinol	0,035	L-cistina	6,5
Ácido fólico	0,0025	L-fenilalanina	6,25
Ácido nicotínico	0,00625	L-glutamina	25
Ácido p-aminobenzóico	0,0125	L-histidina. HCL.H ₂ O	5,47
Adenina sulfato	2,5	L-isoleucina	5
Bicarbonato de sódio	187,5	L-leucina	15
Calciferol	0,025	L-lisina. HCL	17,5
Cloreto de cálcio dihidratado	70	L-metionina	3,75
Cloreto de colina	0,125	L-prolina	10
Cloreto de potássio	300	L-serina	6,25
Cloreto de sódio	2450	L-tirosina	14,425
Colesterol	0,05	L-treonina	7,5
Dextrose	506,25	L-triptofano	2,5
Deoxirribose	0,125	L-valina	5
Extrato de carne	750	Menadione	0,0025
Extrato de levedura	50	Niacinamida	0,00625
Fosfato de sódio monobásico	91,25	Nitrato de ferro	0,18
Fosfato dibásico de potássio	30	Pantotenato de cálcio	0,0025
Fosfato dibásico de sódio 12xhidratado	500	Peptona bacteriológica	2500
Fosfato de tocoferol Na	0,0025	Piridoxal. HCL	0,00625
Glicina	12,5	Piridoxina. HCL	0,00625
Glicose	250	Riboflavina	0,0025
Glutationa	0,0125	Ribose	0,125
Guanina. HCL	0,075	Sulfato de magnésio	50
Hidrolisado de lactoalbumina	2500	Sulfato de magnésio 7.H ₂ O	100
Hidroxiprolina	2,5	Tiamina. HCL	0,0025
Hipoxantina	0,075	Timina	0,075
Inositol	0,0125	Tween 80	5
L-ácido aspártico	7,5	Vermelho de fenol	17
L-ácido glutâmico	18,75	Vitamina C	125
L-alanina	6,25	Xantina Na	0,086
L-arginina. HCL	17,5	Soro bovino inativado	0,1 L
L-cisteína. HCL. H ₂ O	0,0275	Água destilada q.s.p	1 L

ANEXO F: Tabela de 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 G: Tabela de 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 H; Declaração de submissão CEUA/IV/UFRRJ.



Seropédica 22 de agosto de 2014

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO

Declaramos ter recebido o formulário para solicitação de permissão de uso de animais para fins científicos e ou ensino e que este será submetido a avaliação na próxima reunião de CEUA/IV/UFRRJ. Segue abaixo dados pertinentes ao formulário:

Número do Protocolo: 096/2014

Responsável principal pela condução do protocolo: Vera Lucia Teixeira de Jesus

Título do Protocolo: "TRICOMONOSE INTESTINAL EM LEITÕES COM EPISÓDIO DE DIARREIA EM UMA CRIAÇÃO DE SUINOS LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DE SEROPEDICA, RJ."

Data de recebimento: 21/08/2014

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV