

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

TESE

**Detecção de *Pentatrichomonas hominis* (Trichomonadida:
Trichomonadidae) em Bovinos da Raça Nelore Naturalmente Infectados**

Otávia Reis e Silva

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**DETECÇÃO DE *Pentatrichomonas hominis* (TRICHOMONADIDA:
TRICHOMONADIDAE) EM BOVINOS DA RAÇA NELORE
NATURALMENTE INFECTADOS**

OTÁVIA REIS E SILVA

Sob Orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

Sob Co-orientação da Professora
Vera Lúcia Teixeira de Jesus

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências clínicas), área de concentração Patologia.

Seropédica, RJ
Julho de 2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

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

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

S586d Silva, Otávia Reis e, 1991-
Detecção De Pentatrichomonas hominis
(Trichomonadida: Trichomonadidae) Em Bovinos Da Raça
Nelore Naturalmente Infectados / Otávia Reis e Silva.
- Nova Friburgo, 2022.
54 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.
Coorientadora: Vera Lucia Teixeira de Jesus.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS), 2022.

1. Zebuínos. 2. Doenças reprodutivas. 3.
Protozoários flagelados. I. Mello, Marco Roberto
Bourg de, 1971-, orient. II. Jesus, Vera Lucia
Teixeira de, 1959-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA (PATOLOGIA E
CIÊNCIAS CLÍNICAS). IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA (PATOLOGIA
E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

OTÁVIA REIS E SILVA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM 24/06/2022

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO (Dr) UFRRJ
(Orientador / Presidente da Banca)

MARILENE DE FARIAS BRITO QUEIROZ (Dra) UFRRJ

DOUGLAS MCINSTOSH (Dr) UFRRJ

CLAUDIA DEL FAVA (Dra) IBSP

MARCIA CRISTINA MENDES (Dra) IBSP

ISABELLA DE MOURA FOLHADELLA PIRES (Dra) ICTB-FIOCRUZ



Emitido em 28/07/2022

ATA Nº 3175/2022 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 29/07/2022 14:59)

DOUGLAS MCINTOSH
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 1354903

(Assinado digitalmente em 29/07/2022 08:19)

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matrícula: 1548043

(Assinado digitalmente em 29/07/2022 11:10)

MARILENE DE FARIAS BRITO QUEIROZ
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 6387102

(Assinado digitalmente em 28/07/2022 21:32)

OTÁVIA REIS E SILVA
DISCENTE
Matrícula: 2016131102

(Assinado digitalmente em 01/08/2022 09:33)

ISABELLA DE MOURA FOLHADELLA PIRES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 083.290.987-45

(Assinado digitalmente em 29/07/2022 08:53)

CLAUDIA DEL FAVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 057.410.458-55

(Assinado digitalmente em 29/07/2022 09:23)

MÁRCIA CRISTINA MENDES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 048.203.058-59

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: **3175**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **28/07/2022** e o código de verificação: **6e01da3f5e**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a cada pessoa que fez parte dessa longa caminhada que é a pós-graduação. Em especial minha avó Judith que sempre se fez presente, ainda que em outro plano. Sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, criador de tudo que é, por, generosamente, ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho, por me conceder força quando me senti fraca e por me mostrar sempre um caminho que me levasse a lugares melhores.

À minha família, minha fonte infinita de amor e apoio. Obrigada por entender minha ausência, carregar minhas energias quando chegava em casa desanimada, obrigada pelas longas e divertidas conversas assim que chegava de viagem. Obrigada aos meus avós por serem ainda uma fonte de energia que me move para frente. Obrigada às minhas tias Cibele, Eneida, Fátima e Rose por sempre me incentivarem a ir em frente e me apoiarem incondicionalmente. Obrigada aos meus tios Marcão, Marcus Vinícius e Caio, que sempre estiveram dispostos a me ouvir e ajudar. Obrigada às minhas irmãs, melhores companheiras dessa viagem que é a vida, e obrigada às minhas primas (Tais, Claudia, Teresa e Anna), por serem incentivadoras dos meus projetos, obrigada também por carregar a vida dos dois primeiros príncipes dessa família (Tom e Be). Obrigada ao meu pai que se fez presente. E uma gratidão especial pela minha mãe, Maria Glauce, que SEMPRE fez absolutamente tudo para que eu chegasse até aqui, que não mediu esforços, noites de sono e infinitos empregos para que o meu sonho seja realizado, obrigada por ser de fato a melhor mãe do mundo. Obrigada a todas essas mulheres que me ensinaram que lugar de mulher é onde ela quiser. Amo vocês.

À minha orientadora e amiga, Professora Vera Lucia, por ter me dado apoio incondicional e acreditado nesse trabalho, mesmo quando eu mesma não acreditei. Obrigada por sempre ser generosa e cuidadosa, por respeitar meus limites, meu tempo e meus desejos, e prover todo o material necessário para que o projeto fosse realizado. Obrigada também por sempre me incentivar a não ficar parada.

Ao meu eterno orientador e amigo, Professor Marco Mello, por me acompanhar há tantos anos, acreditando no meu potencial e sempre me ajudando e me apoiando de todas as formas possíveis. Obrigada por ser um bom exemplo de profissional e de ser humano. Obrigada por me dar a mão novamente durante o doutorado e caminhar comigo até o fim.

Não poderia deixar de agradecer às minhas, ainda, amigas, após tantos anos de ausência. Obrigada Lali, Betinha, So, Carol, Dea e Tay por entender minha total ausência nos últimos anos, mas ainda me receberem com tanto carinho quando podemos nos encontrar.

À Magna-Lux, Thayse, Paloma, Leticia, Paula e Marina por terem se tornado uma família durante a graduação e por ainda sermos essa família mesmo após esses anos. Não poderia deixar de agradecer em especial à Paula e família por terem me 'adotado' durante esse período e a Marina, que acompanhou mais de perto essa caminhada, e que por muitas vezes chorou o meu choro, sorriu meu sorriso e me apoio de todas as formas materiais e imateriais existentes.

A Joaquim Esquerdo Ferreira que foi meu professor, orientador, colega de trabalho e que hoje ocupa o cargo que é o mais importante, amigo. Obrigada pelo apoio neste projeto, por ter viabilizado a entrada na propriedade e acompanhado cada passo dessa caminhada. Me faltam palavras para agradecer o que você fez por mim ao longo desses anos. Gratidão por sempre ter estado ao meu lado, por aturar minhas chatices, maluquices, meu mau humor e ainda assim escolher caminhar ao meu lado. Obrigada por tanto.

A todos os funcionários da Fazenda Reunidas Ingaíba principalmente, Luiz, Sebastião (Tião) e Fabiano por me ajudarem e tornarem possível a execução deste trabalho.

Obrigada às minhas companheiras de pós-graduação Laura Ribeiro, Lara Silenciato, Mariana Okada, Camila Ferreira e Carol Carreiro, sem o apoio de vocês esse trabalho nunca seria concluído.

Aos dois funcionários mais generosos do Setor de Reprodução e Avaliação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Sr. Zico e Zezinho. Vocês fizeram desse espaço um ambiente familiar, acolhedor e amigável. Vocês e nossas manhãs de trabalho e risadas, regadas a café nunca serão esquecidas.

Às minhas muitas companheiras de moradia ao longo desses cinco anos em que morei no Alojamento da Pós-graduação da UFRRJ. Viver com vocês foi uma experiência de vida e sou muito grata por ter tido a oportunidade de conhecer cada uma de vocês.

Não poderia deixar de agradecer a alguns presentes que me foram dados durante essa caminhada que foi o doutorado.

Obrigada a Uiara Souza por ter acompanhado o início dessa caminhada e por ter sido a melhor companheira de quarto que poderia ter. Ainda consigo ouvir nossas risadas e lembrar das nossas noites regadas a cuscuz.

Obrigada a Cláudia Del Fava que ao longo de pouco tempo se tornou um dos grandes presentes que a vida me deu. Obrigada por ter olhado para mim de forma tão bondosa e por ter me ensinado tantas coisas, obrigada por abrir portas no campo do diagnóstico laboratorial, ter pegado minha mão e me mostrado como viver grandes aventuras profissionais e pessoais. Você sempre terá um espaço especial no meu coração.

Obrigada também ao Instituto Biológico de São Paulo por ter sido minha casa temporária e por ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas incrivelmente inteligentes e generosas. Ao Laboratório de Vírus em Bovídeos e a cada uma das pessoas que faz parte dessa equipe sensacional. Em especial à Dra. Líria que abriu a porta para que eu pudesse ter essa experiência.

Agradeço também aos sempre sorridentes Lucas e Naiane, aos colegas da triagem animal, Melissa, Ricardo e Cintia e às minhas companhias mais divertidas, Thais, Mari e Bianca. Sempre lembrarei de vocês.

Ao Professor Douglas McIntosh por ter me apresentado o mundo da biologia molecular durante a disciplina e por ser apoiador ativo desse projeto. Esse trabalho não poderia ter sido concluído sem a sua ajuda.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, em especial a professora Rita Botteon que através de suas opiniões fez com que esse trabalho fosse melhor e ao Professor Paulo Botteon que me ajudou prontamente quando eu precisei.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ser minha casa há 11 anos e por ter me proporcionado a maior experiência de vida que um estudante poderia ter.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO GERAL

SILVA, Otávia Reis. **Detecção de *Pentatrichomonas hominis* (Trichomonadida: Trichomonadidae) em bovinos da raça Nelore naturalmente infectados.** 2022. 54p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Pentatrichomonas hominis ou *Trichomonas hominis* como era chamado, é uma espécie de protozoário flagelado, anaeróbico, unicelular, amitocondrial pertencente aos Trichomonadidae, reconhecida morfológicamente pela presença de cinco flagelos anteriores e um único flagelo recorrente, inicialmente considerado comensal. Habita principalmente o intestino grosso de vários animais, incluindo gatos, cães e primatas não humanos. No entanto, alguns estudos têm documentado uma associação entre diarreia e a presença de *P. hominis* em cães e gatos, doença gastrointestinal e até associado a doenças respiratórias em humanos, o que aumenta a possibilidade de que *P. hominis* possa representar uma fonte de infecção com potencial zoonótico, ao invés de ser um organismo comensal. O isolamento de *P. hominis* em novos hospedeiros, como coruja, cabras, búfalos e porcos indica que este flagelado pode ter se adaptado a novos hospedeiros. No Brasil, poucos estudos foram conduzidos com o propósito de identificar as espécies que podem parasitar animais domésticos e suas interações com o hospedeiro. O objetivo do presente estudo foi relatar, pela primeira vez no Brasil, a presença do protozoário flagelado *Pentatrichomonas hominis* parasitando naturalmente o trato reprodutivo da espécie bovina. Adicionalmente, a eficiência de duas técnicas de coleta de muco vaginal para diagnóstico de tricomonose bovina foi comparada. Para tanto, a tese foi dividida em dois capítulos, sendo que o primeiro teve como objetivo principal relatar a presença do *P. hominis* em lavado prepucial de três touros da raça Nelore. Assim, para o diagnóstico, amostras de muco vaginal e lavado prepucial foram coletadas em meio Lactopep e posteriormente cultivadas *in vitro* em meio Hanks, e repicadas a cada 72 horas. As amostras do cultivo que apresentaram presença de organismos móveis foram submetidas a análises moleculares pela técnica da reação em cadeia de polimerase e, para confirmação final do diagnóstico, foi utilizada a técnica do polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição e sequenciamento. O segundo capítulo comparou duas técnicas de coleta de muco vaginal, uma comumente utilizada e recomendada pela maioria dos guias atuais de coleta de material biológico e outra utilizando a escova citológica, amplamente utilizada na medicina humana e ainda, em citologias da espécie equina. Trinta fêmeas da raça Nelore em idade reprodutiva foram selecionadas de forma aleatória e submetidas às duas técnicas de coleta de muco vaginal: *swab* estéril descartável (Técnica 1) e a escova ginecológica estéril descartável (Técnica 2). Após avaliações qualitativas e do cultivo celular, foi possível concluir que seis amostras coletadas apresentavam estruturas móveis no cultivo, logo o uso da escova citológica trouxe o benefício de conseguir coletar quantidade maior de material biológico, o que pode facilitar e aumentar as chances de diagnóstico de parabasalídeos.

Palavras-chave: Zebuínos. Doenças reprodutivas. Protozoários flagelados.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Otávia Reis. **Detection of *Pentatrichomonas hominis* (Trichomonadida: Trichomonadidae) in naturally infected Nelore cattle.** 2022. 54p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Pentatrichomonas hominis or *Trichomonas hominis* as it was called, is a species of flagellated, anaerobic, unicellular, amitochondrial protozoan belonging to the Trichomonadidae, morphologically recognized by the presence of five anterior flagella and a single recurrent flagellum, initially considered commensal. It mainly inhabits the large intestine of various animals, including cats, dogs, and non-human primates. However, some studies have documented an association between diarrhea and the presence of *P. hominis* in dogs and cats, gastrointestinal disease and even associated with respiratory diseases in humans, which increases the possibility that *P. hominis* may represent a source of infection with zoonotic potential, rather than being a commensal organism. The isolation of *P. hominis* in new hosts, such as owls, goats, buffaloes and pigs indicates that this flagellate may have adapted to new hosts. In Brazil, few studies have been conducted with the purpose of identifying the species that can parasitize domestic animals and their interactions with the host. The aim of the present study was to report, for the first time in Brazil, the presence of the flagellated protozoan *Pentatrichomonas hominis* naturally parasitizing the reproductive tract of bovine species. Additionally, the efficiency of two vaginal mucus collection techniques for the diagnosis of bovine trichomonosis was compared. Therefore, the thesis was divided into two chapters, the first of which aimed to report the presence of *P. hominis* in preputial lavage of three Nelore bulls. Thus, for diagnosis, samples of vaginal mucus and preputial lavage were collected in Lactopep medium and later cultured in vitro in Hanks medium, and subcultured every 72 hours. The culture samples that showed the presence of mobile organisms were subjected to molecular analysis by the polymerase chain reaction technique and, for final confirmation of the diagnosis, the technique of polymorphism in the length of the restriction fragment and sequencing was used. The second chapter compared two techniques for collecting vaginal mucus, one commonly used and recommended by most current guides for collecting biological material and the other using the cytological brush, widely used in human medicine and also in equine cytology. Thirty Nelore females of reproductive age were randomly selected and submitted to two techniques of vaginal mucus collection: sterile disposable swab (Technique 1) and sterile disposable gynecological brush (Technique 2). After qualitative and cell culture evaluations, it was possible to conclude that six samples collected had mobile structures in the culture, so the use of the cytological brush brought the benefit of being able to collect a greater amount of biological material, which can facilitate and increase the chances of diagnosis of Parabasalids.

Keywords: Zebu Cattle. Reproductive diseases. Flagellated protozoa.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Sequência dos iniciadores (primers) utilizados para a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos parabasalídeos isolados.....	25
Tabela 2: Análise individual da quantidade de material biológico coletado em cada amostra em função da técnica utilizada para coleta (Swab citológico versus Escova ginecológica).	34
Tabela 3: Análise individual da viscosidade do material biológico coletado em cada amostra em função da técnica utilizada para coleta (Swab citológico versus Escova ginecológica). ...	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Trofozoíta de <i>Pentatrichomonas hominis</i> SEM x 550: A- flagelo anterior, B- flagelo posterior, C- membrana ondulante, D- axóstilo, E- flagelo independente.	7
Figura 2: Trofozoíta de <i>Pentatrichomonas hominis</i> isolado de lavado prepucial de touro Nelore com presença de núcleo bem corado. Panótico Rápido®	26
Figura 3: Trofozoíta de <i>Pentatrichomonas hominis</i> isolado de lavado prepucial de touro Nelore com presença de flagelos bem corados. Panótico Rápido®	27

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Impacto Econômico da Bovinocultura	3
2.2	Importância do Manejo/Controle Sanitário em Rebanhos Bovinos	3
2.3	Diagnóstico de Doenças Reprodutivas em Bovinos por Meio de Amostras de Muco Vaginal e Lavado Prepucial	4
2.4	Características Morfológicas do Protozoário <i>Pentatrichomonas hominis</i>	6
2.5	Aspectos Moleculares do Protozoário <i>Pentatrichomonas hominis</i>	7
2.6	Potencial Patogênico do Protozoário <i>Pentatrichomonas hominis</i>	8
2.7	Potencial Zoonótico do Protozoário <i>Pentatrichomonas hominis</i>	9
3.	CAPÍTULO I- IDENTIFICAÇÃO DE <i>Pentatrichomonas hominis</i> EM LAVADO PREPUCIAL DE TOUROS DA RAÇA NELORE NATURALMENTE INFECTADOS	21
3.1	Resumo	21
3.2	Abstract	21
3.3	Introdução	22
3.4	Metodologia	22
3.4.1	Local e período	23
3.4.2	Animais e amostras	23
3.4.3	Coleta de lavado prepucial.....	23
3.4.4	Coleta de muco vaginal.....	23
3.4.5	Detecção de <i>Pentatrichomonas hominis</i> pela técnica de cultivo	23
3.4.6	Detecção de <i>Pentatrichomonas hominis</i> pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR).....	24
3.5	Resultados	26
3.6	Discussão	28
3.7	Conclusão	29
4.	CAPÍTULO II: COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE COLETA DE MUCO VAGINAL PARA DIAGNÓSTICO DE TRICOMONOSE BOVINA	30
4.1	Resumo	30
4.2	Abstract	30
4.3	Introdução	31
4.4	Metodologia	31
4.4.1	Animais e amostras	31

4.4.2	Coleta de muco vaginal.....	32
4.4.3	Avaliação do muco vaginal.....	32
4.4.4	Detecção de <i>Pentatrichomonas hominis</i> pela microscopia ótica.....	32
4.4.5	Coleta de sangue para sorologia	32
4.4.6	Análise estatística.....	33
4.5	Resultados.....	33
4.6	Discussão.....	35
4.7	Conclusão.....	37
5.	CONCLUSÕES GERAIS.....	37
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	37
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
8.	ANEXOS.....	45

1 INTRODUÇÃO GERAL

A tricomoníase humana é a doença sexualmente transmissível não viral mais prevalente no mundo. Com base em dados de prevalência de 2009 a 2016, em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou um total de 156 milhões de novos casos de tricomoníase, sendo a maior prevalência de tricomoníase em humanos registrada. Embora essa espécie seja ainda considerada espécie-específica, parasitando somente humanos, a recíproca não é verdadeira quando se refere a outras espécies de protozoários flagelados. Como exemplo, os trichomonádídeos são protozoários que possuem flagelo e podem ser encontrados nos tratos genitourinário e gastrointestinal de diferentes hospedeiros. Algumas espécies são reconhecidamente importantes na Medicina Humana e Veterinária, entre elas destacam-se o protozoário *Trichomonas vaginalis* que infecta o trato urogenital de humanos, e causa a tricomoníase, *Tritrichomonas fetus* que parasita o trato urogenital de bovinos, e é o responsável pela tricomoníase genital bovina e o trato gastrointestinal de cães e gatos e leva a quadros diarreicos, *Trichomonas tenax* que é encontrado na cavidade bucal de primatas, *Dientamoeba fragilis* e *Pentatrichomonas hominis* que podem ser encontradas no trato intestinal de humanos, mas já foram descritos parasitando vários outros hospedeiros (MARITZ et al., 2014; HAJIHOSSEIN et al., 2020).

Pentatrichomonas hominis ou *Trichomonas hominis* como era chamado, é uma espécie de protozoário flagelado, anaeróbico, unicelular, amitocondrial pertencente aos Trichomonadidae, reconhecida morfológicamente pela presença de cinco flagelos anteriores e um único flagelo recorrente, inicialmente considerado comensal. Habita principalmente o intestino grosso de vários animais, incluindo gatos, cães e primatas não humanos. No entanto, alguns estudos têm documentado uma associação entre diarreia e a presença de *P. hominis* em cães e gatos (GOOKIN et al. 2007; KIM et al., 2010), doença gastrointestinal (MELONI et al., 2011) e até associado a doenças respiratórias em humanos (JONGWUTIWES et al., 2000), o que aumenta a possibilidade de que *P. hominis* possa representar uma fonte de infecção com potencial zoonótico, ao invés de ser um organismo comensal. O isolamento de *P. hominis* em novos hospedeiros, como coruja, cabras, búfalos e porcos indica que este flagelado pode ter se adaptado a novos hospedeiros. Apesar de ter sido isolado em diversas espécies de hospedeiros, ao realizar a análise molecular, todos os isolados se mostraram 100% compatíveis com os isolados da espécie humana, o que sugere que todos, de alguma forma, foram infectados pela mesma espécie que parasita os humanos.

No Brasil, poucos estudos foram conduzidos com o propósito de identificar as espécies que podem parasitar animais domésticos e suas interações com o hospedeiro. O presente estudo tem importância ímpar, pois se trata de um estudo inédito no país cujo objetivo foi identificar a presença do parasita *P. hominis* em lavado prepucial e muco vaginal de bovinos Nelore.

Diante do exposto, a presente tese foi estruturada em três partes, sendo a primeira uma revisão de literatura com objetivo de embasar a metodologia utilizada nos experimentos, abordar a importância do assunto e fomentar a discussão dos resultados dos dois capítulos seguintes. A segunda parte (Capítulo I), teve como foco a identificação da presença do *P. hominis* em lavados prepuciais e muco vaginal de bovinos por meio da técnica de cultivo e reação em cadeia de polimerase. A terceira e última parte (Capítulo II) é um experimento cujo objetivo principal foi comparar duas técnicas de coleta de material em trato reprodutivo da fêmea bovina e avaliar se a técnica de coleta influenciou o diagnóstico laboratorial, sendo utilizadas duas formas de coleta de muco vaginal e comparadas sua eficácia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Impacto Econômico da Bovinocultura

A pecuária nacional no ano de 2020 foi responsável pela geração de R\$ 7,4 trilhões do Produto Interno Bruto (PIB). Apesar da queda de 4,1% em relação ao ano anterior, sua representatividade em relação ao PIB total aumentou, passando de 8,4% para 10%, o que evidencia a força do setor na economia brasileira. Mesmo diante da crise sanitária que acometeu o mundo em 2020, o Covid- 19 evidenciou que o agronegócio brasileiro é resiliente. Com um rebanho de 187,55 milhões de animais, a pecuária brasileira registrou em 2020 um abate de 41,5 milhões de bovinos, queda de 4,2% em relação aos 43,3 milhões abatidos em 2019 (ABIEC, 2021).

O movimento do agronegócio da pecuária de corte em 2020 foi de R\$ 747,05 bilhões, 20,8% acima dos R\$ 618,50 bilhões registrados em 2019. É um setor que não reduziu as atividades no contexto pandêmico, mas sim ampliou-as. Desta forma, mostra-se um dos setores mais fortes da economia brasileira. O ano de 2020 superou as expectativas em relação à exportação de carne, e registrou um aumento de 8% nas exportações. Do total de carne produzida, 73,93% tiveram como destino o mercado interno, enquanto 26,07% foram destinadas às exportações. Se tornou líder mundial de exportações em 2020, com 2690,9 mil TEC (Tonelada de Equivalente Carcaça), quase o dobro do segundo lugar, Austrália, que teve 1391,7 mil TEC (ABIEC, 2021).

O aumento no número de países de destino (de 154 para 157 países) pode explicar esse aumento das exportações, destacando-se também que o aumento de volume de carne destinada à China foi grande fator responsável por esses números (volume exportado aumentou 127% entre 2019 e 2020). Segundo a ABIEC no seu relatório de 2021, o maior importador de carne do mundo é a China, com 2223,4 mil TEC importados em 2020. Desses, 50,80% foram de carne brasileira, tornando-a um dos principais parceiros comerciais do Brasil, juntamente com Hong Kong, Uruguai, Singapura, Jordânia, Turquia e Chile.

O setor agropecuário industrial da carne bovina é de suma importância para a economia brasileira, movimentando trilhões de reais, gerando grande número de empregos e fornecendo um produto essencial para a mesa não só dos brasileiros (ABIEC, 2021).

2.2 Importância do Manejo/Controle Sanitário em Rebanhos Bovinos

O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking de exportadores de carne bovina e de aves e o quarto lugar nas exportações mundiais de carne suína, fato esse que expressa o papel importante e estratégico do país no mercado internacional (ABIEC, 2021). Porém, a cadeia pecuária brasileira é constantemente submetida a desafios e exigências impostas pelos mercados internacionais, em especial restrições relacionadas a barreiras sanitárias, o que dificultam e até mesmo impedem a entrada dos produtos brasileiros a diversos mercados. Após um ano pandêmico, essas exigências intensificaram-se ainda mais pois gerou um aumento da preocupação do mercado mundial com a qualidade e biossegurança dos alimentos.

Neste contexto, por exemplo, destacam-se os dois últimos casos atípicos de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) – conhecida como o “mal da vaca louca” – no Brasil, no ano de 2021. Apesar da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) declarar que o *status* sanitário do Brasil em relação à doença não seria alterado. Ainda assim, o anúncio dos casos levou à suspensão dos envios da carne à China (principal destino internacional da proteína brasileira) e em fechamentos temporários de alguns mercados como o Egito e a Arábia Saudita, que fecharam seus mercados durante 10 dias para as importações de carne brasileira.

Considerando a importância da bovinocultura para o cenário econômico e produtivo do país, deve-se atentar para fatores que vão interferir diretamente na eficiência, produtividade e rentabilidade da produção entre eles o controle sanitário do rebanho. Um dos maiores entraves na produção animal são os problemas de ordem sanitária, pois os sistemas de criação mais modernos no país envolvem o confinamento, o que aumenta o contato entre os animais, a exposição aos seus dejetos, e incidência de doenças, sobretudo as parasitárias (BAPTISTA et al., 2017).

Destaca-se também o fato de o sistema de acasalamento mais utilizado nos rebanhos bovinos no Brasil ser ainda a monta natural a campo, devendo ser considerada a possibilidade de doenças sexualmente transmissíveis (DST). Ao serem infectadas, as vacas podem sofrer perdas embrionárias precoces, abortamentos, piometra e maceração fetal (ONDRAK, 2016), dentre outras importantes enfermidades da esfera reprodutiva, o que compromete diretamente a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, a cadeia produtiva.

De forma geral, a ausência de manejo sanitário, ou ainda, um manejo sanitário insatisfatório pode diminuir drasticamente os índices de reprodução e produção animal, e gera conseqüências negativas, não só reprodutivas, mas também em relação ao desenvolvimento dos animais, como o decréscimo da taxa de ganho de peso e conversão alimentar e, o mais importante, queda na produção de bezerros pela demora no estabelecimento da prenhez (DE CASTRO; FERNANDES; LEAL, 2018)

As perdas econômicas também podem ser relacionadas aos custos com tratamento, eutanásia e reposição de animais infectados além dos excessivos gastos com medicamentos para prevenção e controle (UNIGWE et al., 2017). Conhecer as principais espécies de agentes que acometem os bovinos e interferem em sua produtividade, bem como a prevalência destas nas populações animais é fundamental para que haja um sucesso nas medidas de controle e profilaxia.

2.3 Diagnóstico de Doenças Reprodutivas em Bovinos por Meio de Amostras de Muco Vaginal e Lavado Prepucial

A coleta de amostras é um aspecto primordial para o correto diagnóstico da presença de protozoários flagelados. Em relação às amostras frescas coletadas em bovinos, é fundamental o cuidado com as condições de coleta, a agilidade no envio para o laboratório e com os meios e métodos de cultura utilizados com a finalidade de garantir a sobrevivência do parasito no transporte do campo para o laboratório (PELLEGRIN e LEITE, 2003). As amostras de esmegma podem ser coletadas mediante a lavagem prepucial, aspiração do esmegma com pipeta e raspagem da mucosa prepucial (SHONMANN et al., 1994). Na raspagem, a quantidade do material é superior e os níveis de contaminação são menores por microrganismos inespecíficos (IRONS; HENTON e BERTSCHINGER, 2002). Nas fêmeas, o lavado, a aspiração com pipeta e a utilização de *swab* são as técnicas mais utilizadas, e obtém-se uma quantidade adequada de material com menores níveis de contaminação na aspiração. O período recomendado para a coleta de material é uma semana antes a até uma semana depois do estro, pois nessa fase a quantidade de muco vaginal produzido é maior devido a influência do estrógeno (PELLEGRIN e LEITE, 2003). O exame direto tem uma sensibilidade de 30%, inferior ao cultivo, que apresenta uma sensibilidade entre 87 e 97% com o emprego do meio de Diamond (MUKHUFHI et al., 2003). Um único teste pode ser adequado para o diagnóstico de rebanho quando um ou mais touros estão infectados, mas para exame individual de um touro, três exames negativos são necessários para assegurar que o animal não esteja infectado.

Para a coleta de amostras em touros são descritos na literatura três metodologias que podem diferir quanto ao material utilizado, são elas: *swab* prepucial, lavado prepucial e escarificação/aspiração com pipeta. Essas técnicas são usadas de acordo com a preferência de

cada grupo de pesquisa. Segundo Rae e Crews (2006), os métodos de coleta por lavado prepucial são mais utilizados na Europa, enquanto nos Estados Unidos, assim como na Argentina, as técnicas de coleta a seco (escarificação/aspiração) são as mais utilizadas (PEREZ et al., 2006). Para a realização das coletas, os touros devem ser contidos de maneira adequada, os pelos prepuciais aparados e a região externa da ponta do prepúcio lavada com água (MORGAN, 1944; SAGER et al., 2007). Além disso, o repouso sexual por um período de 5 a 15 dias antes da coleta permite o aumento do número de microorganismos no ambiente prepucial e a realização de duas a três coletas em intervalos de 7 a 15 dias permitem o aumento da sensibilidade do diagnóstico (PELLEGRIN et al., 2003; NOAKES et al., 2018; OIE, 2018). A técnica do *swab* foi descrita por Morgan (1944), no entanto é mais efetiva para o diagnóstico de *Leptospira* sp., raramente usada em coleta de amostras para diagnóstico de protozoários flagelados (RAE e CREWS, 2006). Para coleta por escarificação/aspiração é necessária a utilização de uma pipeta de IA bovina, acoplada a uma seringa ou a um bulbo (pera) de borracha. Fernandes et al. (1975 apud SOUSA et al., 1991) utilizaram um bulbo para enema conectado à pipeta por um tubo de borracha flexível. A pipeta é inserida no óstio prepucial até o final no prepúcio, na região do fórnix (bainha), então são realizados movimentos vigorosos com a pipeta alternando com aspirações (RAE e CREWS, 2006). Parker et al., (2003) relataram a introdução da pipeta até a metade do prepúcio, então uma seringa de 20 ml é acoplada e são feitos movimentos anteroposteriores enquanto 15 ml de sucção são aplicados com a seringa. O material coletado na pipeta deve ser suspenso em tubos contendo Lactato de Ringer, PBS (pH 7,4), solução salina (pH 7,4) ou em meio seletivo escolhido para o isolamento (PELLEGRIN e LEITE, 2003). As pipetas podem ainda ser seladas por calor e enviadas, sob refrigeração, o mais rápido possível ao laboratório (PELLEGRIN et al., 2003). Felleisen et al., (1998) realizaram a lavagem por meio de enxáguos seriados com 50 ml de solução fisiológica estéril pré-aquecida (30 – 37 °C), e o líquido é introduzido com o auxílio de um cateter de 20 cm, acoplado à um bulbo de borracha. Leite et al. (1995) desenvolveram uma técnica modificada para coleta de lavado prepucial, em que a coleta é realizada por um sistema composto de um equipo introduzido no prepúcio, ligado por uma agulha à um frasco tipo penicilina contendo solução salina ou PBS (pH 7,4). O frasco é elevado acima da linha do prepúcio e, após massagens vigorosas, é colocado abaixo da linha do prepúcio e o lavado é recolhido. O material recolhido no lavado pode ser adicionado ao meio de cultivo com ou sem centrifugação prévia (FELLEISEN et al. 1998; MUKHUFHI et al., 2003). A coleta por escarificação/aspiração é o mais traumático dos métodos, sendo que as amostras frequentemente contêm sangue e outros produtos oriundos do dano ao tecido epitelial, além do esmegma recolhido ser mais espesso, mucoide (MUKHUFHI et al., 2003). De acordo com Rae e Crews (2006), a coleta é considerada adequada quando a amostra se apresenta levemente tingida de sangue e a pipeta é preenchida com esmegma em pelo menos um terço de seu comprimento, sendo que essa orientação demonstra o quanto esse procedimento pode ser traumático. Schönmann e colaboradores (1994) não encontraram diferenças quanto à sensibilidade de detecção no cultivo de amostras coletadas por escarificação/aspiração ou por lavado prepucial e Mukhufhi e colaboradores (2003) também não encontraram diferenças entre os métodos de coleta no diagnóstico da tricomoníase por PCR. A escolha do método de coleta deve levar em consideração a experiência do técnico que irá coletar as amostras e do laboratório que irá processar o material, além da disponibilidade de material necessário para cada método (DEL FAVA et al., 2021).

A realização de coleta de material de muco cervical teve início na década de 40; segundo Morgan (1944), as primeiras coletas de amostras em fêmeas foram feitas com pipetas de vidro acopladas em bulbos de borracha. Outro método descrito pelo autor é o uso do *swab* conectado a aplicadores ou pinças. Mancebo e colaboradores (1995) utilizaram uma “haste com cabeça de parafuso” para promover escarificação da mucosa, utilizada previamente, segundo o autor, por Ostrowski e colaboradores (1974) em touros. A coleta com pipeta de IA acoplada à seringa ou

pera de borracha é bem utilizada para coleta de muco cérvico-vaginal (MANCEBO et al. 1995; BONDURANT et al., 1997; FELLEISEN et al 1998; PELLEGRIN et al., 2003; STOCKDALE et al., 2007). Poucos autores citaram que a conexão entre a pipeta e a seringa pode ser feita por meio de um adaptador flexível (tubo de borracha), que, além de facilitar a conexão, permite melhor manuseio durante a aspiração (STOCKDALE et al., 2007). Fernandes e colaboradores (1975 apud SOUSA et al., 1991) desenvolveram uma técnica de coleta de amostras em fêmeas com a utilização de um absorvente interno (o.b.® - Jonhson e Jonhson©). O absorvente, fixo a um barbante de 40 a 50 cm de comprimento, é colocado na vagina com o auxílio de um espéculo esterilizado, semelhante à colocação de pessários vaginais com progesterona. Durante a colocação do absorvente, 10 a 20 cm do barbante é deixado livre e externamente aos lábios vulvares, após 20 minutos de contato o absorvente impregnado com muco cérvico-vaginal é retirado, o barbante é cortado e um fragmento do absorvente é colocado em meio de cultivo e outros fragmentos podem ser utilizados para o isolamento e identificação de outros agentes. Em fetos abortados o parasito pode ser observado e cultivado a partir dos líquidos placentários, conteúdo abomasal, *swab* do muco na base da língua e no palato (MORGAN, 1944).

Em cortes histológicos com colorações específicas, o agente pode ser encontrado no pulmão na forma livre ou fagocitado, e, no estroma placentário (MORGAN, 1944; RHYAN, SACKHOUSE e QUINN, 1988). Alguns resultados da pesquisa conduzida por Van Bergen e colaboradores (2005) mostraram que 96% dos países correspondentes coletam amostras de prepúcio por meio do lavado e 92% coletam órgãos internos e conteúdo estomacal de fetos abortados, além disso, 73% dos países utilizam algum meio de transporte ou enriquecimento. Apesar dos resultados relatados serem referentes a apenas 26 países, ou seja, 16% dos países membros da OIE, eles foram importantes para detectar a falta de padronização nas metodologias utilizadas, o que pode resultar em altas variações na sensibilidade. Dessa forma a padronização de uma técnica para coleta e a sensibilidade da mesma é um fator primordial para a realização de um diagnóstico correto e confiável.

2.4 Características Morfológicas do Protozoário *Pentatrichomonas hominis*

Pentatrichomonas hominis, anteriormente conhecido como *Trichomonas hominis*, foi incluído no gênero *Pentatrichomonas* de acordo com estudos morfológicos (WENRICH, 1931). A classificação deste protozoário atualmente segue dados filogenéticos com base em marcadores moleculares e foi revisada por Cepicka et al. (2010).

Pentatrichomonas hominis possui formato que varia de fusiforme a arredondado, o núcleo é oval e está localizado na porção anterior (LI et al., 2014a). Seu tamanho varia entre 6 a 15µm de comprimento (KESSEL, 1928; WENRICH, 1944; WENRICH, 1947) quando observado à microscopia ótica.

O parasito normalmente possui de 5 a 6 flagelos sendo 4 a 5 flagelos anteriores de tamanho desigual e 1 flagelo recorrente (WENRICH, 1944). À microscopia eletrônica de transmissão (TEM), os flagelos anteriores apresentam uma organização de 4 + 1, ou seja, quatro flagelos agrupados e provenientes de 4 corpúsculos parabasais e um flagelo independente que se origina a parte dos outros. O flagelo independente e os quatro flagelos são separados pela pelta (LI et al., 2014a), formada por microtúbulos. Esta estrutura parece desempenhar o papel de sustentação da parede do canal periflagelar, do qual os flagelos emergem (BENCHIMOL, 2004).

O número variável de flagelos anteriores (FLICK, 1954) inicialmente confundiu o diagnóstico desta espécie quando encontrada em outros hospedeiros, surgindo assim a descrição de novas espécies, quando na verdade se tratava de uma única espécie presente no intestino humano (GOOKIN et al., 2001). A não definição da espécie pode ocorrer devido a falhas de

observação na microscopia ótica, tipo de coloração empregada e até mesmo ao tempo de cultivo e tipos de bactérias que crescem associadas no meio de cultura (FLICK, 1954).

Outra estrutura presente nos trichomonádídeos é a membrana ondulante, que em *P. hominis* percorre todo comprimento celular e exibe de três a cinco ondulações; essa estrutura é sustentada por um citoesqueleto chamado de costa. A costa em *P. hominis* é do tipo B (CEPICKA; HAMPL; KULDA, 2010) e 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). O flagelo recorrente está incorporado na margem livre da membrana ondulante e se projeta ao longo do corpo e termina como um flagelo posterior livre (KAMARUDDIN et al., 2014; LI et al., 2014a). Por vídeo microscopia, Monteiro-Leal et al., (1996) demonstraram que todos os flagelos participam do movimento da célula, e que a batida dos flagelos anteriores é um tipo ciliar, que exibe 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 axóstilo é uma das estruturas do citoesqueleto dos parabasalídeos e forma o chamado complexo pelta-axóstilo que dá sustentação ao corpo celular. Essa estrutura percorre todo o comprimento do corpo celular, e a parte anterior mais ampla forma o *capitulum*. Após o núcleo, a estrutura do axóstilo parece reduzir de largura até seu segmento terminal, onde se projeta a partir da extremidade posterior da célula como uma ponta fina ou semelhante a uma cauda (WENRICH, 1944; BENCHIMOL, 2004) conforme Fig.1.

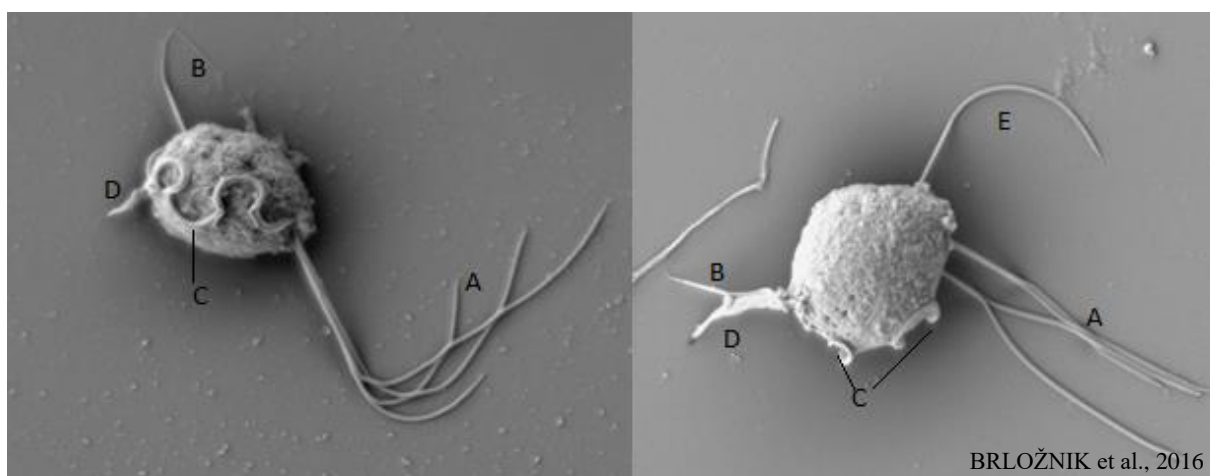


Figura 1: Trofozoíta de *Pentatrichomonas hominis* SEM x 550: A- flagelo anterior, B- flagelo posterior, C- membrana ondulante, D- axóstilo, E- flagelo independente.

2.5 Aspectos Moleculares do Protozoário *Pentatrichomonas hominis*

Em 1997, Felleisen utilizou, pela primeira vez, a biologia molecular como ferramenta na identificação de espécies de trichomonádídeos e tritrichomonádídeos ao desenvolver marcadores moleculares, chamados de TFR1 e TFR2, que amplificavam sequências conservadas do gene 5.8S rRNA e as regiões interespadoras internas (ITS1 e ITS2). O estudo realizado por Felleisen (1997) foi importante porque forneceu dados moleculares de diversas espécies de trichomonádídeos e foi o primeiro estudo a apresentar a análise de sequência do RNA ribossomal (rRNA) de *P. hominis*. Segundo esse autor, as similaridades das sequências da região ITS1 e do gene ribossomal 5.8S desse parasito indicaram um grau relativamente alto

de conservação, quando comparado a outras de outros trichomonádídeos, que apresentam apenas 74% de identidade quando comparada às sequências do mesmo segmento do gênero *Tritrichomonas* e 80% quando comparada às sequências do gênero *Trichomonas*. Baseado nas similaridades observadas do gene 5.8S ribossomal e da região ITS1, *P. hominis* está mais próximo ao gênero *Trichomonas* do que ao gênero *Tritrichomonas*. O desenvolvimento dos iniciadores TFR1 e TFR2 feita por Felleisen (1997) deu origem a diversos estudos moleculares para desenvolvimento de técnicas que permitissem o diagnóstico de trichomonádídeos em nível de espécie.

Após estudos iniciais, Crucitti et al. (2004) desenvolveram iniciadores espécie-específicos para determinação de *P. hominis*. Estes foram desenhados para amplificar uma sequência de 339 bp do gene SSU rRNA de *P. hominis*, mais especificamente a região do gene 18S rRNA. Esta região foi escolhida para o estudo por ser altamente conservada e presente em múltiplas cópias na célula. Os pares de iniciadores denominados Th3 e Th5, apresentaram-se altamente específicos para *P. hominis* e não houve qualquer outro tipo de amplificação para as demais espécies de trichomonádídeos, bactérias, fungos ou leucócitos humanos utilizados no referido estudo. Além disso, esse par de iniciadores foi considerado altamente sensível, porque foi capaz de amplificar o DNA de uma única célula de *P. hominis*.

Outra técnica conhecida como polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição ou a sigla em inglês RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), tem por objetivo diferenciar espécies pelo corte de um fragmento de DNA amplificado com enzimas de restrição que cortam o DNA em regiões específicas que geram um padrão de bandas com tamanhos diferentes entre as espécies. A técnica permite diferenciar espécies, sem necessariamente utilizar o sequenciamento que pode não estar disponível em muitos laboratórios (HAYES et al., 2003). O RFLP foi empregado para diferenciação de trichomonádídeos recuperados de lavado prepucial de touros e que não tinham morfologia característica de *T. fetus*. Utilizando-se o RFLP com a enzima *Hpy* CH4IV foi possível diferenciar *P. hominis* de outras espécies (HAYES et al., 2003).

Outros genes também foram aplicados no estudo da espécie *P. hominis*, como os que codificam proteínas como fator de alongamento 1 α , conhecido pela sigla EF-1 α (REINMANN et al., 2012). Os fragmentos gerados eram de aproximadamente 782 bp e apresentaram alto grau de similaridade com cepas de origem humana (LI et al., 2014b).

Em todos os métodos utilizados ou mesmo com diferentes marcadores para detecção de *P. hominis*, foi possível evidenciar uma alta similaridade (99,4 - 100%), quando comparadas às cepas de origem humana (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2019; LI et al., 2020). Os vários hospedeiros, nos quais *P. hominis* já foi identificado e o alto grau de similaridade (98,5–100%) entre amostras de diferentes hospedeiros incluindo humanos, bovinos, suínos, cães e gatos indica, possivelmente que sejam a mesma espécie. Esses achados reforçam a hipótese de que a mesma espécie de *P. hominis* poderia ser capaz de colonizar o trato digestório e reprodutivo de diversos hospedeiros mamíferos, e até mesmo de outras classes como aves e répteis (MELONI et al., 2011; DIMASUAY; RIVERA, 2013).

2.6 Potencial Patogênico do Protozoário *Pentatrichomonas hominis*

Trichomonas hominis é encontrado na porção distal do intestino delgado e no intestino grosso de humanos e de outros primatas não-humanos, 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 em fezes diarreicas (CHUNGE et al., 1992; LEVY et al., 2003; LI et al., 2014b). Sua prevalência em seres humanos é 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. Em virtude de a 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 ao parasito *P. hominis* foram relatados em crianças de até cinco anos de idade (YANG et al., 1990; CHUNGE et al., 1992). Em recém-nascidos a infecção prolongada deste *Trichomonas* é um sério problema de saúde, em função da diarreia aquosa (MANCILLARAMIREZ; GONZALEZ-YUNES, 1989). *Pentatrichomonas hominis* também pode causar doença severa em pessoas com resposta imunológica diminuída. Além disso, casos de infecções mistas com *P. hominis* e outros protozoários, tais como *Entamoeba histolytica* e *Giardia intestinalis*, ou com bactérias, tais como *Campylobacter* spp. e *Shigella* spp. também foram descritos por Reinthaler et al. (1988) e Chungue et al. (1992).

As publicações envolvendo o diagnóstico de *P. hominis* em bovinos e seu grau de patogenicidade são escassas. A primeira descrição de *P. hominis* no trato genital em bovinos foi feita por Hayes et al., em 2003, e não houve relato de sinais clínicos nos animais positivos. Mais tarde, outro estudo (CORBEIL et al., 2008) demonstrou a presença de *P. hominis* na maioria dos touros reprodutores avaliados e ainda em duas vacas. Li et al. (2018) identificaram *P. hominis* em duas (0,3%) das 781 cabras avaliadas, e ambos eram originados da mesma localidade em uma região da China. Em ovelhas, nenhuma infecção por *P. hominis* foi relatada.

Em estudo mais recente em oito fazendas, incluindo fazendas de leite, corte e de búfalos, foram relatadas taxas de infecção para *P. hominis* variando de 1,7 a 19,4%. Infecções duplas com *Tetratrichomonas buttreyi* e *P. hominis* foram detectados em 15 (1,6%) amostras de quatro fazendas na China, incluindo três fazendas leiteiras e uma fazenda de gado de corte com taxas de infecção dupla variando de 1,8 a 14,5% (LI et al., 2020).

Em estudo histopatológico utilizando marcadores moleculares para *T. fetus* e *P. hominis*, técnica conhecida como hibridização cromogênica *in situ* (CISH), demonstrou-se que *P. hominis* foi diagnosticado em pequeno número e apenas dentro do lúmen das criptas intestinais, enquanto *T. fetus* foi encontrado no lúmen em pequeno número, porém quando em grande número, observou-se que os protozoários foram encontrados invadindo a lâmina própria. Os achados neste estudo indicaram que diferenças na localização tecidual desses organismos e, o número desses podem influenciar nos diversos graus de lesões observadas (MOSTEGL et al., 2012). Apesar das divergências sobre a real patogenicidade de *P. hominis*, em outras espécies animais, o diagnóstico deste protozoário esteve sempre associado ao quadro clínico de diarreia acentuada. Em suínos infectados experimentalmente com *P. hominis*, as lesões histológicas estavam associadas a alterações na camada epitelial, incluindo congestão, descamação da mucosa intestinal e aumento acentuado de células inflamatórias. Outros achados foram ruptura de vasos e diminuição do comprimento das vilosidades intestinais (LI et al., 2014a). *P. hominis* também foi diagnosticado em filhotes de cães com diarreia líquida, perda de peso e fraqueza. Apesar de receberem tratamento com fembendazol para eliminar esse agente etiológico, a diarreia persistiu e os animais morreram (GOOKIN et al., 2005).

Embora vários parabasalídeos tenham sido descritos no trato genital de bovinos, como é o caso de espécies dos gêneros *Pentatrichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pseudotrachomonas*, *Simplicimonas* (HAYES et al., 2003; HUBYCHILTON et al., 2009; FREY et al., 2017), microrganismos presumidamente de origem intestinal e comumente encontrados em fezes (CASTELLA et al., 1997; MELONI et al., 2011; LI et al., 2014b), o potencial patogênico dessas espécies no trato reprodutivo de bovinos ainda não está totalmente elucidado.

2.7 Potencial Zoonótico do Protozoário *Pentatrichomonas hominis*

No Japão, em 1998, foi relatado pela primeira vez um caso de tricomonose por *T. fetus* 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. fetus* 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). Mais tarde, foi isolado do líquido peritoneal de um homem imunocomprometido com peritonite (ZALONIS et al., 2011). Destes flagelados, pelo menos cinco espécies (*P. hominis*, *T. tenax*, *T. vaginalis*, *T. fetus* e *T. gallinarum*) já foram identificadas no trato respiratório humano. Essas espécies têm sido encontradas em até 60% dos pacientes com pneumonia pneumocística (PCP) e em até 30% de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (DUBOUCHER et al., 2003; 2005; 2006; MARITZ et al., 2014). Outro relato foi feito no Japão, onde foi isolado *Tetratrichomonas* de uma mulher de 66 anos, com empiema, apresentando febre, dispneia e retenção de líquido amarronzado e fétido na pleura). Após drenagem torácica, o líquido purulento foi observado por microscopia ótica, onde foi possível detectar a presença de inúmeros *Tetratrichomonas* (ARASE et al., 2014). De acordo com Duboucher et al. (2005), esses parabasalídeos são microaerófilos, logo, é improvável que iniciem a doença pulmonar, mas são oportunistas que podem causar infecções secundárias e agravar os sinais clínicos, prolongando a doença. A frequência das infecções pulmonares por tricomonose pode ser maior do que o relatado, em função da difícil diferenciação dos flagelados por microscopia ótica, em amostras clínicas.

Historicamente esses parabasalídeos não eram considerados responsáveis por infecções emergentes por estarem envolvidos, não só em regiões específicas de infecção, como também em hospedeiro-específico. No entanto, a presença de agentes etiológicos associados a uma vasta série de distúrbios clínicos indica que os mesmos podem apresentar uma forma oportunista e podem se multiplicar quando as condições do meio forem favoráveis. Infecções do trato digestório por parabasalídeos também estão cada vez mais reconhecidas como comuns a várias espécies de vertebrados (MARITZ et al., 2014). Devido à intensa relação do homem com o animal, estes últimos podem agir como reservatórios de tricomoníase humana, por serem hospedeiros, não só de *P. hominis* como também de *T. fetus*, *Tetratrichomonas* sp. e *Dientamoeba*.

De fato, a capacidade desses protozoários em se adaptar à mucosa de uma variedade de tecidos pode ser a chave para a sua variedade de hospedeiros e a capacidade de desenvolver infecções em diferentes locais do corpo; bem como, contribuir direta ou indiretamente para diversas patologias. Uma vez que a capacidade para crescer na superfície das mucosas em vertebrados pode facilitar a transmissão de uma espécie para outra. Como exemplo tem-se *T. fetus*, cuja transmissão é por via sexual e pode ser encontrado no trato digestivo com a capacidade desse agente etiológico se desenvolver no intestino em diferentes espécies como em suínos, gatos e cães (MARITZ et al., 2014).

P. hominis, uma espécie conhecida por ser um protozoário gastrointestinal supostamente comensal em humanos (HONINBERG, 1990), foi identificado em dois casos de diarreia, um em adultos e outro em uma criança, onde foram descartados quaisquer outros agentes etiológicos (MELONI et al., 2011). Em outro caso, *P. hominis* foi identificado em um paciente com artrite que apresentava diarreia, após tratamento com Adalimumab; um inibidor de TNF- α (COMPAORE et al., 2013). Até onde se sabe, *P. hominis* é encontrado no trato digestório, porém amostras de *swab* vaginal de mulheres com quadro de vaginite e submetidas ao diagnóstico de tricomoníase por PCR indicou a presença desta espécie na mucosa vaginal ao invés de *T. vaginalis* (CRUCITTI et al., 2004). Casos de diarreia envolvendo *P. hominis* são cada vez mais frequentes em animais de companhia como cães e gatos (GOOKIN et al., 2007; TOLBERT et al., 2012) ou mesmo em animais de produção como em suínos e bovinos (HAYES et al., 2003; LI et al., 2014a).

O crescente interesse no estudo dos trichomonídeos é justificado pela 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). Considerando estes recentes achados, parabasalídeos deveriam ser cuidadosamente monitorados como uma questão de saúde pública em humanos e em animais domésticos.

3. CAPÍTULO I- IDENTIFICAÇÃO DE *Pentatrichomonas hominis* EM LAVADO PREPUCIAL DE TOUROS DA RAÇA NELORE NATURALMENTE INFECTADOS

Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Animal
Qualis A2 – Medicina Veterinária (Anexo 2).

3.1 Resumo

O parabasalídeo *Pentatrichomonas hominis* é geralmente considerado um componente simbiótico da microbiota gastrointestinal em uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo humanos. No entanto, um número limitado de estudos levantou a possibilidade de que possa atuar como patógeno de humanos, cães e suínos e de que algumas infecções humanas possam ter origem zoonótica. Dados da América do Norte revelaram uma associação entre *P. hominis* e o trato urogenital bovino, principalmente em touros e raramente em vacas. A importância desta observação está ligada a uma possível interferência no diagnóstico preciso do patógeno venéreo *Tritrichomonas foetus*, de importância econômica. O presente estudo empregou métodos baseados em cultura e a combinação com técnicas moleculares para examinar as cavidades prepuciais de quinze touros Nelore, criados em pastagem aberta no Sudeste do Brasil, quanto à presença de tricomonas. Protozoários móveis foram isolados de quatro touros e foram definitivamente identificados como *P. hominis* com base no sequenciamento de nucleotídeos de amplicons geradas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando a região RNA ribossômico (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) do parasita como alvo. As potenciais implicações desses achados para a saúde bovina e humana são discutidas.

Palavras-chave: Zebuínos, Trichomonadida, *Pentatrichomonas hominis*, PCR

3.2 Abstract

The parabasalid *Pentatrichomonas hominis* is generally considered to represent a symbiotic component of the gastrointestinal microbiota in a wide variety of vertebrate hosts including humans. Nevertheless, a limited number of studies have raised the possibility that it may act as a pathogen of humans, dogs, and pigs and that some human infections may have a zoonotic origin. Data from North America revealed an association between *P. hominis* and the bovine urogenital tract, principally in bulls and rarely in cows. The importance of this observation is linked to possible interference in the accurate diagnosis of the economically important venereal pathogen *Tritrichomonas foetus*. The current study employed culture-based and molecular methods to examine the preputial cavities of fifteen breeding bulls, raised in open pasture in southeastern Brazil, for the presence of trichomonads. Motile protozoa were isolated from four of the bulls and were definitively identified as *P. hominis* based on nucleotide sequencing of polymerase chain reaction (PCR) amplicons derived from the ribosomal RNA operon (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) of the parasite. The potential implications of these findings for bovine and human health are discussed.

Keywords: Zebu bulls, Trichomonads, *Pentatrichomonas hominis*, PCR

3.3 Introdução

Pentatrichomonas hominis, anteriormente conhecido como *Trichomonas hominis*, é um protozoário flagelado que habita o trato intestinal de humanos e animais e foi originalmente considerado um protozoário comensal. No entanto, estudos indicaram *P. hominis* como agente causal de diarreia em mamíferos e doenças gastrointestinais ou pulmonares em crianças e idosos. Portanto, o potencial patogênico desse protozoário não pode ser descartado.

Pouco se sabe sobre as rotas de transmissão, biologia, ciclo de vida, hospedeiro primário e reservatórios animais deste protozoário. Os métodos de diagnóstico para a detecção de *P. hominis* são baseados em exames microscópicos, que devem ser conduzidos imediatamente e, alternativamente, o material coletado deve ser conservado para preservar as características morfológicas do protozoário. No entanto, trofozoítos de *P. hominis* podem ser difíceis de diferenciar de *Tritrichomonas fetus* devido às semelhanças em sua motilidade e forma. Portanto, vários ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) que são considerados mais sensíveis e específicos, foram descritos na literatura e agora são reconhecidos como definitivos para a detecção de *P. hominis*. O desenvolvimento de ferramentas de detecção molecular e o aumento da conscientização do potencial zoonótico e adaptação deste parasita para um novo hospedeiro resultaram em um número crescente de estudos sobre *P. hominis*.

Apesar do seu potencial patogênico em mamíferos, existem poucos estudos epidemiológicos em humanos e animais no Brasil. Até onde se sabe, nenhum estudo sobre a identificação de *P. hominis* em trato reprodutivo de bovinos no Brasil foi publicado.

Em 2003, Hayes e colaboradores encontraram protozoários flagelados em cultura de lavado prepucial de touros, e constataram que os protozoários presentes em algumas das culturas estudadas não apresentam características morfológicas e genótípicas consistentes com *T. fetus* e o identificaram como *P. hominis*. Atualmente, o diagnóstico da infecção por *T. fetus* é baseado em exame microscópico de lavagens ou raspagens prepuciais e muco vaginal e cultura subsequente. As amostras são inicialmente selecionadas para organismos móveis, em forma de fuso ou pera e coradas de modo que a morfologia e o número de flagelos possam ser determinados. *T. fetus* tem 10-25 µm de comprimento e 3-15 µm de largura, e tem um único flagelo posterior e três flagelos anteriores. Embora outros tricomonas encontrados na cavidade prepucial possam aparecer maiores e mais arredondados do que *T. fetus*, essas diferenças podem não ser facilmente observadas com microscopia padrão. Isso torna a identificação precisa do protozoário ainda mais difícil. A biologia molecular tem possibilitado a obtenção de informações precisas sobre a presença de microorganismos, em especial protozoários cuja identificação morfológica pode ser confusa e de baixa sensibilidade. A divulgação de novos genomas abriu uma nova era de conhecimento na Medicina Veterinária. A velocidade com que esse conhecimento vem sendo disseminado evidencia um potencial para modificar gradativamente a compreensão e os conceitos atuais sobre os mecanismos de infecção e patogênia, além de ajudar a esclarecer a origem desses protozoários.

Dessa forma, esse capítulo tem como objetivo relatar a presença de *P. hominis* em lavado prepucial de touros e muco vaginal de vacas Nelore em propriedades de gado de corte no município de Mangaratiba, RJ, Brasil.

3.4 Metodologia

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) sob o processo nº 0130-10-2021 (Anexo 1).

3.4.1 Local e período

As coletas de muco vaginal e lavado prepucial foram realizadas em uma propriedade de gado de corte localizada no município de Mangaratiba, RJ (22° 57' 35" S e 44° 02' 26" W). O cultivo do material foi realizado no Laboratório de Patologias da Reprodução (LPR) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e as análises de biologia molecular foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular da UFRRJ. As coletas foram realizadas nos meses de novembro de 2019 (estação de monta 2019/2020) e de novembro de 2021 (estação de monta 2021/2022).

3.4.2 Animais e amostras

Todos os animais utilizados no experimento pertenciam à mesma propriedade, eram mantidos em regime extensivo de produção, criados a pasto de *Urochloa (Brachiaria) decumbens* com água e sal mineral à vontade. Foram coletadas um total de 15 amostras de lavado prepucial de touros da raça Nelore, com idade média de 6,3 anos e 68 amostras de muco vaginal de vacas Nelore em idade reprodutiva.

Foram excluídos do experimento todos os animais (machos e fêmeas) que tivessem sido submetidos a tratamento com antibióticos nos 15 dias que antecederam as coletas de amostras. Todos os touros utilizados para estação de monta foram avaliados e uma amostragem de fêmeas de cada lote foram selecionadas de forma aleatória para serem avaliadas.

3.4.3 Coleta de lavado prepucial

As amostras de lavado prepucial foram coletadas após a higienização prévia da região prepucial com toalha de papel e corte dos pelos mais longos e sujos, conforme técnica descrita por Gregory et al., (1990 apud OIE, 2018).

Uma pipeta plástica descartável utilizada para infusão uterina em vacas foi acoplada a uma seringa com 50 ml de solução salina tamponada estéril (PBS) e introduzida no orifício prepucial que foi fechado com uma das mãos e com a outra o prepúcio foi massageado, de modo que o PBS fosse espalhado por toda a região. Depois da massagem, um tubo Falcon estéril de 50 ml dentro de um béquer foi colocado em um nível abaixo do orifício prepucial e o lavado recolhido por gravidade. O lavado coletado foi adicionado ao meio de cultivo Lactopep para transporte até o laboratório (LOPES et al., 1996). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até a chegada ao laboratório (± 8 horas após a coleta).

3.4.4 Coleta de muco vaginal

Amostras de muco vaginal foram coletadas após a higienização prévia da região genital com toalha de papel, com auxílio de vaginoscópio tubular. Uma escova citológica estéril descartável foi introduzida no fundo do saco vaginal da fêmea. O muco vaginal foi conservado em meio de cultivo Lactopep para transporte até o laboratório (LOPES et al., 1996). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até a chegada ao laboratório (± 6 horas após a coleta).

3.4.5 Detecção de *Pentatrichomonas hominis* pela técnica de cultivo

As amostras de lavado prepucial e muco vaginal foram avaliadas em microscopia ótica, em objetiva de 10, para detecção de trofozoítos móveis assim que chegaram ao laboratório. Após essa avaliação, todas as amostras foram enriquecidas com 10% de soro fetal bovino

inativado e incubadas por 24 horas. Após 24 horas de cultivo, as amostras foram inoculadas em solução balanceada de Hanks® (Vitrocell- Embriolife, Campinas/SP, Brasil) com adição de 10% de soro fetal bovino inativado e estreptomicina (200 mg/L), e examinadas por até sete dias. A solução balanceada de Hanks® com adição de 10 % de soro fetal bovino inativado e estreptomicina (200 mg/L) foi mantida em geladeira a $\pm 5^{\circ}$ C até o momento do repique. quando foi retirada da geladeira (30 minutos antes) e mantida em banho-maria a 37° C até a realização do repique. Nas culturas onde houve a multiplicação dos protozoários, foi retirada uma alíquota de 200 μ L após centrifugação a 400xg por 10 minutos e ressuspensas para novos frascos (1^o repique) contendo 3 mL da solução balanceada de Hanks® com adição de soro fetal bovino inativado e estreptomicina (200 mg/L). As culturas foram mantidas em estufa a 37° C e repicadas para meio novo, a cada 72 horas, após serem avaliadas em microscopia ótica, em objetiva de 10, para detecção de trofozoítos móveis. Culturas negativas foram mantidas sem repique e avaliadas diariamente até o sétimo dia, quando foram classificadas definitivamente como negativas. As amostras consideradas positivas no cultivo foram centrifugadas e armazenadas em freezer a -20° C até o momento da análise molecular. Todo o material utilizado para a preparação dos meios, cultivo e armazenamento de alíquotas foi previamente esterilizado por autoclavagem a 121° C, por 30 minutos, e posteriormente mantido em condições assépticas.

3.4.6 Detecção de *Pentatrichomonas hominis* pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR)

A) Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído de aproximadamente 1×10^6 trofozoítos (enumerados microscopicamente com auxílio de Câmara de Neubauer), como segue: as culturas foram sedimentadas por centrifugação (16.000xg por 5 min) e os sobrenadantes foram descartados. Os sedimentos (*pellets*) celulares foram lavados uma vez com 1mL de PBS (pH 7,2) e as células lavadas foram ressuspensas em 100 μ L de matriz de Chelex (InstageneTMmatrix BIO RAD) com incubação a 56° C por 30 minutos e, em seguida, fervidas por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados (16.000xg por 5 min) para sedimentar os restos celulares junto com a matriz de Chelex, e 60 μ L de cada sobrenadante foram transferidos para novos tubos, com armazenamento a -20° C.

B) Iniciadores (*Primers*)

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

Tabela 1: Sequência dos iniciadores (*primers*) utilizados para a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos parabasalídeos isolados.

Primers	Sequência	Pares de base
TFR1	5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3'	372
TFR2	5' - CGG TAG GTG AAC CTG CCG TTG G-3'	
TFR3	5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGA-ACC-3'	347
TFR4	5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGT-TAA-3'	
Th3	5'-TGT AAA CGA TGC CGA CAG AG -3 '	339
Th5	5'-CAA CAC TGA AGC CAA TGC GAG C-3'	

C) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi conduzida com um volume total de reação de 20 µL usando aproximadamente 20 ng DNA genômico, 0,2 mM de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl₂ e 0,5U Taq DNA polymerase (Invitrogen, EUA). A reação foi realizada em termociclador (TProfessional 96, modelo 070-901 Biometra, EUA). Como controle positivo das reações foram utilizados os *primers* TFR1 e 2 e o DNA de *T. fetus* cepa K isolada por Dr. H. Guida, (Embrapa, Rio de Janeiro, Brasil) do trato urogenital de um touro, e já previamente identificado (GENBANK AY485677.1) (BENCHIMOL et al., 2017). Para os iniciadores TFR1/TFR2 e TFR3 e TFR4 foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, a 94°C por 30 segundos; anelamento a 66,5°C por 15 segundos; extensão a 72°C por 15 segundos, acompanhando 33 ciclos com extensão final a 72°C por 5 minutos. Para os iniciadores Th3 e Th5, as condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, a 95°C por 20 segundos; anelamento a 64°C por 20 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos, acompanhando 40 ciclos com extensão final a 72°C por 5 minutos. Alíquotas de cada uma das reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2%. Para confirmar a presença dos produtos de peso molecular esperado, os géis foram corados em brometo de etídeo e a visualização dos ácidos nucleicos foi feita em transiluminador (Bio Rad® Hoodii, EUA).

D) Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP)

Após a confirmação da amplificação do fragmento do tamanho esperado, foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Primeiro foi realizada uma análise de digestão *in silico* empregando o programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA) utilizando-se sequências previamente depositadas no Genbank de *P. hominis*. Após análise pelo programa, foram escolhidas duas enzimas que produziriam dois tipos de cortes diferentes, *Hae III*, gerando dois fragmentos e *Hinf I* que geraria três padrões de corte. Os produtos de PCR gerados com os iniciadores Th3 e 5, específicos para *P. hominis* (339 pares de bases), foram digeridos utilizando 10 unidades de enzimas de restrição *HaeIII* (Promega, EUA) e *HinfI* (Invitrogen, EUA) a 37°C por 2 horas. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 8% e corados com brometo de etídeo, visualizados e foto documentados. Os fragmentos gerados foram analisados com o auxílio do programa Quantity-One (BioRad, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, gerados pelos cortes com as enzimas e, estes foram comparados com os padrões gerados nas análises *in silico*.

E) Sequenciamento dos Produtos da PCR

O sequenciamento do gene 18S rDNA de *P. hominis* e das regiões ITS1 e 2, gene 5.8S de *T. fetus* amplificados foi feito da seguinte forma: 10µL dos produtos da PCR foram tratados com ExoSap-IT (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante e sequenciados em ambas as direções empregando os iniciadores de amplificação pelo uso de *Big Dye Ready Reaction mix* (ABI Corp, EUA). Os produtos das reações foram analisados por meio do Analisador genético automatizado (ABI Corp). O alinhamento das sequências foi feito usando o programa *Sequencer* (Version 5.1, Genecodes Corporation, EUA). Todas as sequências foram inseridas no algoritmo de busca BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) e no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para determinar a identidade genética. Todas as sequências obtidas nesta pesquisa foram depositadas e comparadas com as disponíveis no “GenBank”

3.5 Resultados

Cultivo

Um total de 15 amostras de lavado prepucial e de 68 amostras de muco vaginal foram submetidas ao cultivo. As amostras coletadas na primeira avaliação ao microscópio (chegada ao laboratório) apresentaram positividade para protozoários móveis em 45 das 68 amostras de muco vaginal (66,2%) e em 7 das 15 amostras de lavado da cavidade prepucial (46,7%). As culturas positivas dos lavados prepuciais foram mantidas, em média, ao longo de seis passagens em série, momento em que se observou o declínio da viabilidade celular. Já as culturas positivas dos mucos vaginais foram mantidas somente ao longo de três passagens em série.

As amostras positivas de lavado prepucial foram as que melhor se adaptaram ao cultivo em laboratório, dessa forma essas sete amostras foram encaminhadas para análise molecular. As amostras de lavado prepucial tiveram melhor adaptação ao meio de cultivo, sendo possível estabelecer cultivo em meio Hanks por até seis passagens, permitindo dessa forma que as amostras encaminhadas para biologia molecular estivessem mais concentradas.

As amostras de muco vaginal não tiveram boa adaptação em meio que cultivo e ao realizar o repique para o meio Hanks observou-se marcado declínio de viabilidade celular. Das 45 amostras iniciais somente 18 amostras foram encaminhadas para análises moleculares, uma vez que foram selecionadas as amostras que continham mais evidências de protozoários.

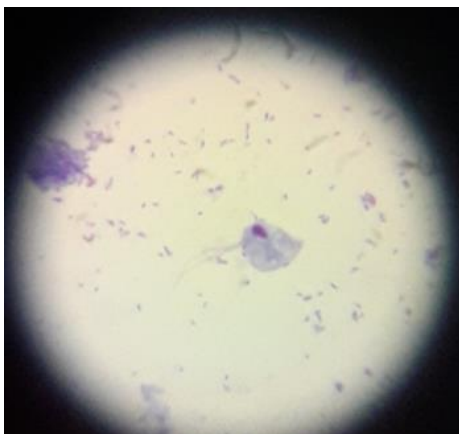


Figura 2: Trofozoíta de *Pentatrichomonas hominis* isolado de lavado prepucial de touro Nelore com presença de núcleo bem corado. Panótico Rápido®



Figura 3: Trofozoíta de *Pentatrichomonas hominis* isolado de lavado prepucial de touro Nelore com presença de flagelos bem corados. Panótico Rápido®

Análise molecular

Todas as amostras positivas em que houve a visualização do flagelado foram repicadas para meio de cultura Hanks. A maioria das amostras de muco vaginal não resistiu à essa passagem para meio Hanks, dessa forma não foi possível repicá-las para meios novos (limpos) após a terceira passagem. E por isso a grande maioria não foi analisada morfológicamente e nem identificadas por PCR.

O DNA extraído das amostras de muco vaginal não produziu amplicons nas análises moleculares e três das sete amostras de lavado prepucial, produziram amplicons nos ensaios de PCR ao se empregar os *primers* “TFR1/TFR2” e “Th3/Th5”, e foram negativos no ensaio com os *primers* “TFR3/TRF4”. Em todos os casos os amplicons produzidos eram do mesmo tamanho que as bandas produzidas pelo DNA de controle positivo de *P. hominis*. Esses dados foram interpretados como sugestivos da presença de *P. hominis* nas culturas. A confirmação da colonização da cavidade prepucial por *P. hominis* foi obtida por dois meios. Primeiramente, amplicons de 339 pb (incluindo o controle positivo) produzidos no ensaio “Th3/Th5” foram digeridos com as enzimas de restrição resultando na geração de fragmentos de 245 pares de bases (pb) e 94 pb com a enzima *HaeIII*, e o produção de três bandas de 155 pb, 126 pb e 53 pb com a enzima *HinfI*. Os padrões de bandas observados para as amostras foram idênticos aos observados para o amplicon de controle positivo.

Em segundo lugar, os amplicons (338 pb) derivados das amostras de teste usando o ensaio “TFR1/TFR2” foram sequenciados. Eletroferogramas de alta qualidade foram observados para todas as amostras, indicando a presença de uma única fonte de DNA e as sequências obtidas para as três culturas mostraram-se idênticas. A região interna aos sítios de ligação do *primer* (295 pb) da sequência determinada para a amostra denominada T1, foi depositada no banco de dados GenBank com o número de acesso (ON311004). A nova sequência mostrou 100% de semelhança (295/295 nucleotídeos) com sequências depositadas como originárias de *P. hominis* detectadas em exsudato pleural humano na Tailândia (número de acesso GenBank; AF156964) e amostras fecais caninas na França (KC623939) e nos EUA (AY758392). Um nível de 99,7%

de similaridade de sequência (294/295 pb) foi registrado com a sequência MN189982 (detectada em fezes humanas de um paciente chinês com câncer gastrointestinal) e a sequência MK770862 (depositada por pesquisadores espanhóis sem detalhes da fonte). Um menor nível de similaridade (99,3%; 293/295 pb) foi registrado com a sequência MN173995, detectada em fezes humanas coletadas de um paciente chinês com câncer gastrointestinal. Com base nos dados moleculares, concluiu-se que os tricomonas cultivados da cavidade prepucial dos touros eram *P. hominis*.

Com base nos três ensaios de PCR realizados foi possível constatar que nas amostras encaminhadas para análise molecular em três amostras de lavado prepucial existem células de *P. hominis*. A confirmação dessa hipótese foi realizada por dois meios. Primeiramente, os amplicons (incluindo o controle positivo), produzidos pelo ensaio Th3 / Th5 foram digeridos com as enzimas de restrição (conforme descrito acima), resultando na geração de fragmentos de DNA de 251 pares de bases (pb) e 99 pb com a enzima *Hae III*, e a geração de três bandas de 163 bp, 133 bp e 62 bp com a enzima *Hinf I*. Os padrões de bandas observados para as amostras T1-T3 foram idênticos aos observados para o amplicon de controle positivo.

3.6 Discussão

O desenvolvimento do cultivo celular pode não ter sido tão eficiente uma vez que pelo *P. hominis* ser originalmente isolado de fezes, a ausência de ambiente propício e presença de material fecal pode ter influenciado no seu desenvolvimento. Apesar dos cuidados durante a coleta, o material biológico utilizado é considerado contaminado, sendo assim, algumas espécies de bactérias podem ter sido favorecidas pelo meio de cultura e ao se desenvolverem prejudicaram os protozoários, consumindo os nutrientes ou mesmo mudando características físico-químicas que impediram o desenvolvimento do protozoário *P. hominis*.

As amostras de lavado prepucial tiveram melhor adaptação ao meio de cultivo, sendo possível estabelecer cultivo em meio Hanks por até seis passagens, permitindo dessa forma que as amostras encaminhadas para biologia molecular estivessem mais concentradas.

Pentatrichomonas hominis pode ser encontrado na porção distal do intestino delgado e no intestino grosso de humanos e 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 em fezes diarreicas (LEVY et al., 2003; LI et al., 2014a). Sua prevalência em seres humanos pode ser elevada, podendo chegar a 60% em pacientes com câncer (ZHANG et al., 2019). Geralmente, o aumento da prevalência do protozoário está diretamente associado a condições socioeconômicas precárias. E, em virtude de a 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.

As publicações envolvendo o diagnóstico de *P. hominis* em bovinos e seu grau de patogenicidade são escassas. A descoberta de *P. hominis* colonizando o trato urogenital de touros não virgens no Brasil reforça as observações feitas por pesquisadores norte-americanos (HAYES et al., 2003; WALKER et al., 2003; DUFERNEZ et al., 2007; CORBEIL et al., 2008), e estende a abrangência geográfica desse fenômeno para o continente sul-americano, o que reforça a hipótese de que esse trichomonídeo seja capaz de persistir fora de seu local primário. As implicações práticas deste achado estão ligadas à possível distorção do diagnóstico (baseado exclusivamente na cultura) de *T. foetus*, e considera-se importante que os veterinários e outros profissionais de saúde bovina no Brasil estejam cientes dessa associação. Claramente, o diagnóstico errado através da morfologia pode ser resolvido usando-se o ensaio de PCR baseado nos primers “TFR3/TRF4” (FELLEISEN et al., 1998) para confirmar a presença de *T. foetus*. No entanto, recomenda-se que o ensaio “Th3/Th5” seja rotineiramente incorporado em protocolos de testes moleculares com base no fato de que a identificação de *P. hominis* pode

ser executada de forma rápida e econômica usando-se o protocolo PCR-RFLP aqui empregado (SANTOS et al., 2015). Uma justificativa adicional para a realização de testes moleculares complementares para *P. hominis* são os achados de que coinfeções com *T. foetus* e *P. hominis* podem ocorrer no trato gastrointestinal felino (SANTOS et al., 2015), e que infecções duplas com *T. buttreyi* e *P. hominis* foram observados em 15 (1,6%) amostras de fezes bovinas de quatro fazendas na China, incluindo três fazendas leiteiras e uma fazenda de carne bovina (LI et al., 2020). Evidentemente, a existência do mesmo fenômeno em material cultivado do trato urogenital passaria despercebida na ausência de testes específicos para esse protozoário.

Embora envolva uma questão de debate, a extensa plasticidade do hospedeiro de *P. hominis* tem sido proposta como evidência para que ele seja considerado um patógeno zoonótico (DIMASUAY e RIVERA, 2013; MARITZ et al., 2014; MAHITTIKORN et al., 2021). Assim, profissionais de saúde e trabalhadores rurais que tenham contato com o trato urogenital bovino, sêmen e até mesmo urina devem ser orientados quanto ao potencial de infecção pelo parasita *P. hominis* e à necessidade de adoção de procedimentos de biossegurança adequados. A(s) via(s) pela(s) qual(is) o protozoário se estabeleceu na cavidade prepucial não foram determinadas, mas como sugerido por outros estudos (CAMPERO et al., 2003; HAYES et al., 2003; MICHI et al., 2016), a transmissão foi mais provavelmente por contato com fezes contaminadas presentes no ambiente ou no trato gastrointestinal de bovinos. Em apoio a esta hipótese, a presença de *P. hominis* no trato gastrointestinal bovino foi demonstrada por pesquisadores asiáticos (LI et al., 2020; MAHITTIKORN et al., 2021), mas, até onde sabemos, não foi relatada no Ocidente.

Embora vários parabasalídeos tenham sido descritos parasitando o trato genital de bovinos, como é o caso de espécies dos gêneros *Pentatrichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pseudotrichomonas*, *Simplicimonas* (HAYES et al., 2003; HUBYCHILTON et al., 2009; FREY et al., 2017), o potencial patogênico dessas espécies no trato reprodutivo de bovinos ainda não é totalmente elucidado.

Tendo em vista o número limitado de animais examinados, os achados do presente estudo devem ser considerados preliminares e recomenda-se que futuros estudos sobre este tema ampliem a gama de amostras testadas para incluir o trato urogenital de vacas, fezes de gado presentes no ambiente de criação e fezes coletadas do trato gastrointestinal de bovinos e outros animais presentes em fazendas (por exemplo, cães e gatos) que são hospedeiros conhecidos de *P. hominis* e que podem contribuir para a circulação do protozoário no ambiente de produção.

3.7 Conclusão

A biologia molecular tem possibilitado a obtenção de informações precisas sobre a presença de microrganismos, em especial protozoários cuja identificação morfológica pode ser confusa e de baixa sensibilidade. A velocidade com que esse conhecimento vem sendo disseminado evidencia um potencial para modificar gradativamente a compreensão e os conceitos atuais sobre os mecanismos de infecção e patogenia, além de ajudar a esclarecer a origem desses protozoários.

4. CAPÍTULO II: COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE COLETA DE MUCO VAGINAL PARA DIAGNÓSTICO DE TRICOMONOSE BOVINA

4.1 Resumo

Atualmente, a maioria dos manuais ou guias de procedimentos de coleta de materiais biológicos disponíveis online para auxiliar o Médico Veterinário na coleta de material a campo recomenda o uso de *swab* vaginal para obtenção de muco vaginal. Desde a década de 1980 diversos estudos compararam a utilização de escova ginecológica e *swab*, principalmente com mulheres, esses estudos em sua maioria concluíram que a utilização da escova ginecológica melhorou a qualidade de esfregaços vaginais e por consequência o diagnóstico foi realizado de forma mais eficiente e precoce. O objetivo do presente estudo foi comparar duas técnicas de coleta de muco vaginal em fêmeas bovinas para o diagnóstico da Tricomonose bovina. Trinta fêmeas da raça Nelore em idade reprodutiva foram selecionadas de forma aleatória e tiveram a região genital previamente higienizada com papel toalha. A coleta do muco vaginal foi realizada de duas formas: empregando-se *swab* estéril descartável com auxílio de vaginoscópio tubular (Técnica 1) ou escova ginecológica estéril descartável (Técnica 2). Para cada animal amostrado foram coletadas duas amostras de muco vaginal, uma para cada técnica. O muco vaginal foi avaliado quanto à quantidade de material e à viscosidade, foi conservado em meio de cultivo Lactopep, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente até a chegada ao laboratório (± 6 horas após a coleta), foram avaliadas e colocadas em cultivo. Amostras de sangue foram coletadas para realização de diagnóstico sorológico de leptospirose, diarreia viral bovina, rinotraqueite infecciosa bovina e Neosporose. Para análise estatística foi utilizado o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas com nível de significância de 5%. Conclui-se que o uso da Técnica 2 para coleta de muco vaginal se provou melhor, uma vez que pelo uso de escova ginecológica foi possível coletar maior quantidade de muco vaginal e ainda, identificar protozoários flagelados em 20% das amostras coletadas.

Palavras-chave: Diagnóstico reprodutivo; Muco cervicovaginal; Tricomoníase genital bovina.

4.2 Abstract

Currently, most manuals or guides for the collection of biological materials available online to assist the Veterinarian in collecting material in the field recommend the use of a vaginal swab to obtain vaginal mucus. Since the 1980s, several studies have compared the use of gynecological brush and swab, mainly with women, these studies mostly concluded that the use of gynecological brush improved the quality of vaginal smears and, consequently, the diagnosis was performed more efficiently and precocious. The aim of the present study was to compare two techniques of vaginal mucus collection in bovine females for the diagnosis of bovine trichomoniasis. Thirty Nelore females of reproductive age were randomly selected and had their genital region previously cleaned with a paper towel. Vaginal mucus collection was performed in two ways: using a sterile disposable swab with the aid of a tubular vaginoscope (technique 1) or a sterile disposable gynecological brush (technique 2). For each sampled animal, two samples of vaginal mucus were collected, one with each technique. Vaginal mucus was evaluated for the amount of material and viscosity and subsequently preserved in Lactopep culture medium for transport to the laboratory. The samples were kept at room temperature until arrival at the laboratory (± 6 hours after collection). Upon arrival at the laboratory, the samples were evaluated and placed in culture. For statistical analysis, the Wilcoxon test was used for paired samples with a significance level of 5%. It is concluded that the use of technique 2 for collection of vaginal mucus proved to be better, since by using a gynecological brush it was

possible to collect a greater amount of vaginal mucus and also identify flagellated protozoa in 20% of the samples collected.

Keywords: Reproductive diagnosis; Cervicovaginal mucus; Bovine genital trichomoniasis.

4.3 Introdução

O correto diagnóstico da tricomonose genital bovina, assim como de outras doenças sexualmente transmissíveis em bovinos só é possível por um conjunto de ações padronizadas com o objetivo de garantir segurança, confiabilidade e qualidade dos resultados das análises. Apesar deste artigo tratar especificamente sobre a coleta de muco vaginal, é imprescindível que o Médico Veterinário esteja apto a coletar qualquer tipo de material biológico de forma adequada. O conhecimento sobre a patogenia da doença suspeita é muito importante para orientar quais materiais serão obtidos (DEL FAVA et al., 2021). Nesse contexto, a coleta do muco vaginal de fêmeas bovinas é o material de eleição na pesquisa de agentes sexualmente transmissíveis, uma vez que esses agentes têm a capacidade de se adaptar ao ambiente vaginal.

A cultura é o método mais comumente utilizado para a identificação dos tricomonídeos. Apesar de ser considerada uma técnica simples, tem como limitação a baixa sensibilidade e especificidade além de requerer tempo. O diagnóstico por cultivo pode ser laborioso em especial quando às amostras a serem analisadas estiverem muito contaminadas ou ainda, quando a quantidade de parasitos da amostra for pequena. Por conta dessas limitações a escolha da técnica de coleta de muco cervicovaginal é fator primordial para garantir quantidade e qualidade de material para diagnóstico.

Atualmente, a maioria dos manuais ou guias de procedimentos de coleta de materiais biológicos disponíveis *online* para auxiliar o Médico Veterinário na coleta de material a campo recomenda o uso de *swab* vaginal para obtenção de muco vaginal. Desde a década de 1980 diversos estudos compararam a utilização de escova ginecológica e *swab*, principalmente com mulheres, esses estudos em sua maioria concluíram que a utilização da escova ginecológica melhorou a qualidade de esfregaços vaginais e por consequência o diagnóstico foi realizado de forma mais eficiente e precoce, uma vez que a utilização da escova ginecológica permite que mais células epiteliais sejam coletadas (DOTTERS et al., 1988; HARRISON et al., 1993; ALTERMATT et al., 1997).

Com base na bem-sucedida experiência humana com o uso da escova ginecológica, o presente capítulo descreveu a utilização da técnica de coleta com escova ginecológica na rotina de coleta de material biológico em bovinos, em especial do muco vaginal. Diante desse panorama esse capítulo tem o objetivo de descrever e comparar a utilização da escova ginecológica versus o *swab* na coleta de muco vaginal de fêmeas bovinas para o diagnóstico da Tricomonose, assim como descrever o perfil sanitário de uma fazenda comercial de gado de corte.

4.4 Metodologia

O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) sob o processo nº 0130-10-2021 (Anexo I).

4.4.1 Animais e amostras

Todos os animais utilizados no experimento pertenciam à mesma propriedade, eram mantidos em regime extensivo de produção, criados em pasto de *Urochloa* (*Brachiaria*)

decumbens com água e sal mineral à vontade. Foram utilizadas 30 fêmeas bovinas de corte, da raça Nelore em idade reprodutiva, e coletadas 60 amostras pareadas de muco vaginal. Foram excluídos do experimento todos os animais que tivessem sido submetidos a tratamento com antibióticos nos 15 dias que antecederam as coletas de amostras.

4.4.2 Coleta de muco vaginal

Todos os animais tiveram a região genital previamente higienizada com papel toalha. A coleta do muco vaginal foi realizada com auxílio de vaginoscópio tubular, dessa forma o *swab* estéril descartável (Técnica 1) e a escova ginecológica estéril descartável (Técnica 2) foram acopladas à pipeta de inseminação e introduzida no fundo do saco vaginal da fêmea. Ao atingir o fundo do saco vaginal, foram realizados movimentos circulares a fim de se coletar maior quantidade de material. Para cada animal, foram coletadas duas amostras de muco vaginal, uma com cada técnica. Os primeiros 15 animais tiveram as amostras coletadas primeiro pela Técnica 1 em seguida pela Técnica 2, os últimos 15 animais tiveram as amostras coletadas primeiro pela Técnica 2 e seguida pela Técnica 1. O muco vaginal foi conservado em meio de cultivo Lactopep para transporte até o laboratório (LOPES et al., 1996). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente até a chegada ao laboratório (± 6 horas após a coleta).

4.4.3 Avaliação do muco vaginal

O material coletado foi avaliado em relação à quantidade e à viscosidade. Por se tratar de uma análise qualitativa, as avaliações foram realizadas pelo uso de escore de cruzes e sempre por um mesmo técnico, sendo uma cruz (+) pouca ou nenhuma quantidade de material biológico ou muco vaginal com baixa viscosidade; duas cruzes (++) quantidade média de material biológico e muco vaginal com viscosidade maior e três cruzes (+++) grande quantidade de material coletado ou presença de marcada viscosidade apresentando grande aderência a escova e/ou *swab*.

4.4.4 Detecção de *Pentatrichomonas hominis* pela microscopia ótica

As amostras de muco vaginal foram avaliadas em microscopia ótica, em objetiva de 10, para detecção de trofozoítos móveis assim que chegaram ao laboratório. O material coletado foi centrifugado a 400xg por 10 minutos e uma amostra do *pellet* foi utilizada para avaliação microscópica.

4.4.5 Coleta de sangue para sorologia

Amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular/coccígea/mamária em tubos de coleta à vácuo sem coagulante, capacidade 10 ml (BD Vacutainer®). Após a coleta, o sangue foi mantido inclinado em temperatura ambiente até a completa coagulação e retração do coágulo. Após esse procedimento, o mesmo foi mantido sob refrigeração com auxílio de gelo seco até a chegada ao laboratório. Ao chegar ao laboratório, o mesmo foi centrifugado a 3.000 rpm, por um período de 10 minutos (para uma centrífuga com 18 cm de raio). Alíquotas de 1,5 ml de soro foram separadas em frascos criogênicos tipo eppendorf de 2 ml e armazenadas a -20°C até o momento das análises. As alíquotas foram congeladas em recipientes isotérmicos contendo gelo seco para conservação, e enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo para diagnóstico sorológico de leptospirose, diarreia viral bovina, rinotraqueite infecciosa bovina e Neosporose. Exames de brucelose e tuberculose já tinham sido realizados na propriedade conforme calendário sanitário já instituído.

4.4.6 Análise estatística

Os dados referentes à avaliação qualitativa do muco vaginal foram analisados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas com nível de significância de 5%. Foi utilizado o teste de McNemar com nível de significância de 5% para avaliar se existe diferença significativa entre as técnicas utilizadas na coleta de muco vaginal em relação a avaliação microscópica.

4.5 Resultados

Os resultados encontrados no presente estudo referentes a análise qualitativa do material biológico estão apresentados na Tabela 2. Foi observada diferença estatística entre as técnicas de coleta em relação à quantidade de material biológico recuperado. A quantidade de material coletado na Técnica 2 (escova ginecológica) foi maior ($p < 0.0003$) do que a obtida na Técnica 1 (*swab*).

Tabela 2: Análise individual da quantidade de material biológico coletado em cada amostra em função da técnica utilizada para coleta (*Swab* citológico *versus* Escova ginecológica).

Amostras	Quantidade	
	<i>Swab</i> citológico ^a	Escova ginecológica ^b
1	+	++
2	+	++
3	+	+
4	+	++
5	+	++
6	+	++
7	++	+
8	+	+
9	+	+++
10	+	+++
11	+	+
12	++	++
13	+	++
14	+	+++
15	+	+
16	+	+
17	++	++
18	+	++
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	++
23	+	++
24	+	++
25	+	++
26	+++	+++
27	+	++
28	+	++
29	+	+++
30	++	+++
Valor de p	< 0.0003	

^{ab}letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que a análise é diferente entre si ($p < 0,05$). *Os dados estão apresentados em forma de escore (+; ++ ou +++).

Os resultados referentes à viscosidade do material em função da técnica de coleta estão apresentados na Tabela 3. Não foi observada diferença estatística entre as técnicas.

Tabela 3: Análise individual da viscosidade do material biológico coletado em cada amostra em função da técnica utilizada para coleta (Swab citológico versus Escova ginecológica).

Amostras	Viscosidade	
	Swab citológico ^a	Escova ginecológica ^a
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	++
5	++	+++
6	+	+
7	++	++
8	+	+
9	++	++
10	++	++
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	++	+
16	+	+
17	++	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	++
22	+	++
23	+	+
24	+	++
25	+	++
26	++	++
27	+	++
28	+	+
29	+	++
30	+	+++
Valor de p	0,15	

^aletras minúsculas iguais na mesma linha indicam que a análise não é diferente entre si ($p > 0,05$).

*Os dados estão apresentados em forma de escore (+; ++ ou +++).

Nenhuma amostra coletada (0/30) pela Técnica 1 (*swab* citológico) apresentou estruturas móveis durante a análise. Nas amostras coletadas com a Técnica 2 (escova ginecológica), foi possível observar estruturas móveis em 6 das 30 amostras coletadas (20%), sendo estatisticamente diferente ($p = 0.03$) em relação a Técnica 1.

4.6 Discussão

O sucesso e confiabilidade das análises laboratoriais dependem da eficácia na obtenção das amostras coletadas, independente se após a coleta elas serão submetidas à citologia, cultura

e/ou avaliação histopatológica. O uso da escova ginecológica para avaliações citológicas já está bem consolidado e amplamente discutido em literatura. Diversos autores, desde a década de 80, já apontavam que a coleta de células endometriais se fazendo uso da escova ginecológica para avaliação da presença de neutrófilos dentro do epitélio uterino melhora o desempenho diagnóstico (BROOK, 1985; LEBLANC et al., 2007; KOZDROWSKI et al., 2015), em especial, devido à quantidade de material coletado.

Cocchia et al. (2012) realizaram um estudo em éguas com histórico de infertilidade crônica e compararam os resultados de citologia endometrial com escova ginecológica, *swab* uterino e lavado uterino de baixo volume. Os resultados revelaram que as lâminas com maior celularidade foram as obtidas pela técnica da escova ginecológica. Em bovinos, Kasimanickam et al. (2005) enfatizaram que a citologia endometrial por meio da escova ginecológica também pode ser utilizada, mostrando-se superior à técnica de lavado uterino de baixo volume, em relação à praticidade, integridade celular e detecção de polimorfonucleares (PMNs), em especial os neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores.

Em estudos realizados em mulheres, também foi possível constatar que a escova ginecológica foi capaz de coletar maior quantidade de material (50mg- *swab* vs 1560mg-escova) o que possibilitou realizar mais análises com uma única coleta, e não se fez necessário o retorno da paciente (MITRA et al., 2017).

A obtenção de maior quantidade de muco vaginal é particularmente importante no diagnóstico de tricomoníase genital bovina, uma vez que esses protozoários apresentam motilidade e podem estar em baixa concentração, o que dificulta sua visualização e diagnóstico.

A identificação microscópica do parasito deve ser realizada assim que as amostras chegarem ao laboratório, mesmo diante da baixa sensibilidade, uma vez que essa primeira constatação da presença de organismos móveis será base para avaliações posteriores durante o cultivo. Embora essa primeira análise tenha baixa sensibilidade ela é um parâmetro para dar sequência ao cultivo.

O cultivo é uma das formas diagnósticas que pode ser utilizada para se obter maior sensibilidade. Assim como outras técnicas, ele apresenta limitações ou desvantagens uma vez que nem sempre os protozoários se adaptam adequadamente ao meio de cultivo. A contaminação das amostras muitas vezes pode comprometer a viabilidade celular, ou mesmo a concentração baixa na amostra pode gerar animais falso negativos.

A contaminação das amostras por materiais biológicos compromete também análises moleculares como pode ser observado no estudo de Clothier et al., (2019), que observaram que a presença de urina nas amostras pode afetar o limiar de detecção do organismo em análises moleculares.

O diagnóstico de doenças que acometem a reprodução animal é multifatorial e nem sempre simples. Muitas vezes não conseguimos chegar ao diagnóstico final por diversos fatores, entre eles fatores ambientais e de manejo. A avaliação dos parâmetros sanitários, reprodutivos, nutricionais fazem parte do processo até que o diagnóstico definitivo seja encontrado. Apesar de multifatorial o denominador comum da melhoria no diagnóstico de doenças infecciosas passa invariavelmente pela necessidade de um maior número de informações mais precisas e rápidas, baseadas em evidências científicas e possibilitam o emprego da melhor técnica para determinada suspeita, para que o técnico possa realizar as coletas e envio de material de forma adequada, maximizando a possibilidade de diagnóstico corretamente.

4.7 Conclusão

A coleta de muco vaginal pela técnica de escova ginecológica permite coletar mais quantidade de material biológico e se mostrou mais eficiente no diagnóstico direto de *Pentatrichomonas hominis*.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Pentatrichomonas hominis pode ser encontrado parasitando a região prepucial de touros da raça Nelore.

A coleta de muco vaginal pela técnica de escova ginecológica permite coletar mais material biológico e se mostrou mais eficiente no diagnóstico direto de *Pentatrichomonas hominis*.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista o número limitado de animais e regiões examinadas, os achados do presente estudo, apesar de inéditos no Brasil, podem não evidenciar a real situação em relação à presença do protozoário em rebanhos brasileiros. Dessa forma recomenda-se que futuros estudos incluam temas como por exemplo: (a) ampliação da gama de amostras testadas para incluir o trato urogenital de vacas, fezes de gado presentes no ambiente de criação e fezes coletadas do trato gastrointestinal de bovinos e de outros animais presentes em fazendas (por exemplo, cães e gatos) que são hospedeiros conhecidos de *P. hominis* e que podem contribuir para a circulação do protozoário no ambiente de produção; (b) estudos que visem o diagnóstico de *Tritrichomonas foetus* passem a incluir a identificação de *Pentatrichomonas hominis* como possível diagnóstico diferencial; (c) estudos que visem a identificação de parabasalídeos associem técnicas de cultivo e análises moleculares para diagnóstico mais assertivo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERMATT, H.J. et al. Zervix-Zytologie: Cervex-Brush versus konventioneller Watteträger [Cervix cytology: Cervex Brush versus conventional cotton swab. **Praxis**. 11;86(24):1029-33, 1997.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**. 215 (3):403-410, 1990.
- ARASE, M et al. A first case report of empyema caused by *Tetratrichomonas* species in Japan. **The Jap Jour of Clin Path.**, 62 (2), 1197-1202, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Beef Report. Perfil da Pecuária no Brasil 2021**, Apex Brasil, 2021. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1-BE8JXs-FQ9CW9FfiEoqoryU77uvwXCS/view>. Acesso: 21/08/2021.
- BAPTISTA, A.L. et al. Doenças em bovinos confinados-desafios sanitários em um confinamento de grande porte. **Rev Acad Ciên Anim**, 15 (2): 3-7, 2017.
- BARRETO, J.V.P. et al. Congenital Neurological Disease Associated With HoBi-like Pestivirus Infection in a Newborn Dairy Calf From Brazil. **Front Vet Sci**. 24(9):852965, 2022.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. **Microsc and Microanal**, 10 (5), 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M. et al. Draft Genome Sequence of *Tritrichomonas foetus* K Strain. **Gen Announc**, 5 (16):10.1128-10.1128, 2017.
- BONDURANT, R. H. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. Veterinary Clinics of North America: **Food Anim Pract**. 13(2):345-361, 1997.
- BRLOŽNIK, M. et al. *Pentatrichomonas hominis* coinfection in a puppy from a Slovenian animal shelter. **Slo Vet Res**. 53: 229-235, 2016.
- BROOK, D. Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. **J Equine Vet Sci**, 5 (1): 16-22, 1985.
- CAMPERO, C.M. et al. Aetiology of bovine abortion in Argentina. **Vet Res Commun**. 27(5):359-69, 2003.
- CASTELLA, J. et al. Isolation of the trichomonad *Tetratrichomonas buttrei* (Hibler et al., 1960) Honigberg, 1963 in bovine diarrhoeic faeces. **Vet Parasitol**, 70 (1-3): 41-45, 1997.
- CEPICKA, I.; HAMPL, V. e KULDA, J.; Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one New Genus and three New Species. **Protista**, 161(3):400-433, 2010.
- CHAOQUN YAO, M. D. Opportunistic Human Infections Caused by *Tritrichomonas* species. A Mini-Review. **Clin Microbiol Newslet**, 34(16):128-131, 2012.

- CHUNGE, R. N. et al. Comparative aetiology of childhood diarrhoea in Kakamega and Kiambu Districts, Kenya. **East Afri Med J**, 69(8): 437-441, 1992.
- CLOTHIER, K. et al. Effects of Biological Materials and Collection Media on PCR Detection of *Tritrichomonas foetus*. **Open J Anim Sci**, 9(1): 121-128, 2019.
- COCCHIA, N. et al. Comparison of the cytobrush, cotton *swab*, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenol**, 77 (1): 89–98, 2012.
- COMPAORE, C. et al. *Pentatrichomonas hominis* infection in rheumatoid arthritis treated with adalimumab. **Rheumatol**, 52 (8): 1534-1535, 2013.
- CORBEIL, L.B. et al. Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. **Vet Parasitol**, 154 (3-4), 226–232, 2008.
- CRUCITTI, T. et al. Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. **Let in Appl Microbiol**, 38 (6): 510–516, 2004.
- DE CASTRO, F.C.; FERNANDES, H.; LEAL, C.L.V. Sistemas de manejo para maximização da eficiência reprodutiva em bovinos de corte nos trópicos. **Vet e Zootec**, 25(1): 41-61, 2018.
- DEL FAVA, et al. Colheita e envio de amostras para diagnóstico laboratorial de doenças de ruminantes. **Rev Bras Buiat**. 4(2), 2021.
- DIMASUAY K.G.B. e RIVERA, W.L. Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. **Vet Parasitol**, 196(3-4):289-295, 2013.
- DOTTERS, D.J.; CARNEY, C.N. e DROEGEMUELLER, W. Nylon brush improves collection of cervical cytologic specimens. **Am J Obstet Gynecol**.159(4):814-9, 1988.
- DUBOUCHER, C. et al. Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. **Hum Pathol**, 34 (5): 508-511, 2003.
- DUBOUCHER, C. et al. Frequency of trichomonads as coinfecting agents in *Pneumocystis* pneumonia. **Acta Cytolog**, 49 (3):273-277, 2005.
- DUBOUCHER, C. et al. Molecular identification of *Tritrichomonas fetus* like organisms as coinfecting agents of human *Pneumocystis* pneumonia. **J Clin Microbiol**, 44 (3):165-1168, 2006.
- DUFERNEZ, F. et al. Morphological and molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. **J Eukaryot Microbiol**, 54(2), 161-168, 2007.
- FELLEISEN, R.S.J. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. **Parasitol**,115, 111-119, 1997.

FELLEISEN, R.S.J. et al. Detection of *Tritrichomonas fetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. **J of Clin Microbiol**, 36, 513-519, 1998.

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. **Exper Parasitol**, 3, 105-21, 1954.

FREY, C.F. et al. Intestinal *Tritrichomonas fetus* infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR. **Parasitol Res**, 104, 783-788, 2009.

GOOKIN, J.L. et al. Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. **American J Vet Res**, 62:1690-1697, 2001.

GOOKIN, J. L. et al. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. **J Parasitol**, 91:939-943, 2005.

GOOKIN, J.L. et al. Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. **Ame J Vet Res**, 68: 783-787, 2007.

HAJIHOSEIN, R. et al. A Brief Overview of the Results of the Studies on the Prevalence of *Trichomonas tenax* in Iran. **Yafteh**, 22(1), 2020.

HARRISON, D.D.; HERNANDEZ, E. e DUNTON, C.J. Endocervical brush versus cotton swab for obtaining cervical smears at a clinic. A cost comparison. **J Reprod Med**. 38(4):285-8, 1993.

HAYES, D. C.; ANDERSON, R. R. e 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**, Columbia, 15, 390-394, 2003.

HONIGBERG, B.M. Trichomonad found outside the urogenital tract of humans. In: HONIGBERG, B.M. **Trichomonads Parasitic in Humans**. New York: SpringerVerlag., p. 342-393, 1990.

HUBY-CHILTON, F. et al. Detection and identification of *Tetratrichomonas* in a preputial wash from a bull by PCR and SSCP. **Vet Parasitol**, 166, 199-204, 2009.

IRONS, P.C.; HENTON, M.M. e BERTSCHINGER, H.J. Collection of preputial material by scraping and aspiration for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls. **J S Afr Vet Assoc** 73(2):66-9, 2022.

JONGWUTIWES, S.; SILACHAMROON, U. e PUTAPORNTIP, C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, 94, 185-186, 2000.

KAMARUDDIN, M. et al. E. Molecular Characterization of Various Trichomonad Species Isolated from Humans and Related Mammals in Indonesia. **Korean Journal of Parasitology**, 52, 471-478, 2014.

KASIMANICKAM, R. et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Can Vet J**, 46: 255-259, 2005.

KESSEL, J.F.; Trichomoniasis in kittens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 22, 1, 1928.

KIM, Y. et al. PCR Detection and Molecular Characterization of *Pentatrichomonas hominis* from Feces of Dogs with Diarrhea in the Republic of Korea. **The Korean Journal Of Parasitology**, 48, 9-13, 2010.

KOZDROWSKI, R. et al. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. **Anim Reprod Sci**, 154:56– 62, 2015.

LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J. e STROMBERG, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenol**, 68:403–12, 2007.

LEITE, R.C et al. Técnica modificada para coleta de lavado prepucial de touros, para exame de tricomonose e ou campilobacteriose. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 19: 434, 1995.

LEVY, M. G. et al. *Tritrichomonas fetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. **Journal of Parasitology**, 89, 99-104, 2003.

LI, W. et al. Molecular and morphologic identification of *Pentatrichomonas hominis* in swine. **Vet Parasitol**, 202, 241–247, 2014a.

LI, W. et al. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in China. **Parasitology research**, 113,1795-1801, 2014b.

LI, W. et al. *Pentatrichomonas hominis*: prevalence and molecular characterization in humans, dogs, and monkeys in Northern China. **Parasitology research**, 115, 569-574, 2016.

LI, W. C. et al. Occurrence of *Blastocystis* sp. and *Pentatrichomonas hominis* in sheep and goats in China. **Parasites e vectors**,11, 1-7, 2018.

LI, W. et al. Prevalence of *Tetratrichomonas buttreyi* and *Pentatrichomonas hominis* in yellow cattle, dairy cattle, and water buffalo in China. **Parasitology research**, 119, 637-647, 2020.

LOPES, L. M. S. et al. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). V. Lactopep como meio de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 3(1), 1996.

MAHITTIKORN, A. et al. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in animals in central and western Thailand. **BMC Veterinary Research** 17(1):203, 2021.

MANCEBO, A.O et al. Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. **Vet Parasitol.**59(1):7-11, 1995.

MANCILLA-RAMIREZ, J. e GONZALEZ-YUNES, R. Diarrhea associated with *Trichomonas hominis* in a newborn infant. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, 46, 623-625, 1989.

MARITZ, J. M. et al. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? **Trends in Parasitol**, 30, 333-341, 2014.

MELONI, D. et al. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in two patients with gastrointestinal symptoms. **J Clin Pathol**, 64, 933-935, 2011.

MICHI, A.N. et al. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. **Theriogenol** 85(5):781-791, 2016.

MITRA, A. et al. Comparison of vaginal microbiota sampling techniques: cytobrush versus swab . **Sci Rep**, 7(1), 1-10, 2017.

MONTEIRO-LEAL, L. H.; FARINA, M. e DE SOUZA, W. Free movement of *Tritrichomonas foetus* in a liquid medium: A video-microscopy study. **Cell Mot and the Cytoskel**, 34, 206-214, 1996.

MORGAN, B.B. Studies on the trichomonad carrier cow problems. **J Anim Sci**. 3:437, 1944.

MOSTEGL, M. M. et al. Detection of *Tritrichomonas fetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. **Vet Parasitol**, 183, 209-214, 2012.

MUKHUFHI, N. et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. **Theriogenol**. 15;60(7):1269-78, 2003.

NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J. e ENGLAND, G.C.W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2018.

OIE. Trichomoniasis. In: OIE. Terrestrial Manual 2018. Paris, 2018. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.16_TRICHOMONOSIS.pdf. Acesso em: 20/08/2021.

OKAMOTO, S. et al. *Trichomonas fetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 21, 89-91, 1998.

ONDRAK, J. D. *Tritrichomonas fetus* prevention and control in cattle. **Vet Clin: Food Anim Pract**, 32, 411-423, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE et al. **Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016-2021: Toward ending STIs**. World Health Organization, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246296/WHO-RHR-16.09>

[eng.pdf;jsessionid=342E3A1C62780625D7963C1F0A65FC00?sequence=1.](#)
20/08/2021.

Acesso:

PARKER, S. et al. A. Sample collection factors affect the sensitivity of the diagnostic test for *Tritrichomonas foetus* in bulls. **Can J Vet Res.**67(2):138-141, 2003.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. C. Atualização sobre tricomonose genital bovina. **Embrapa Pantanal-Documentos** (INFOTECA-E), 2003.

PELLEGRIN, A. O. et al. Coleta de material para diagnóstico das doenças infecciosas que interferem com a reprodução de bovinos. **Embrapa Pantanal-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2003.

PEREZ, A et al. Bayesian estimation of *Tritrichomonas foetus* diagnostic test sensitivity and specificity in range beef bulls. **Vet Parasitol**, 142(1): 159-162, 2006.

RAE, D. O. e CREWS, J.E. *Tritrichomonas foetus*. **Vet Clin: Food Anim Pract**, 22(3):595-611, 2006.

REINMANN, K. et al. *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1. **Vet Parasitol**, 185, 138– 144, 2012.

REINTHALTER, F. F. et al. A survey of gastrointestinal parasites in Ogun State, southwest Nigeria. **Annals of Trop Med and Parasitol**, 82, 181-184, 1988.

RHYAN, J.C.; STACKHOUSE, L.L. e QUINN, W.J. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. **Vet Pathol**. 25(5):350-5, 1988.

SAGER, H. Tritrichomonosis In: Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. **CAB International**. 232-263, 2007.

SAKSIRISAMPANT, W. et al. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. **J Med Assoc of Thai**, 86, 263- 270, 2003.

SANTOS, C.S.D. et al. Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. **Pesq Vet Bras**35: 980-988, 2015.

SCHÖNMANN, M.J. et al. Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas fetus* infection in bull. **The Vet Rec**, 134, 620-622, 1994.

SOUSA, S.T.B. et al. Métodos para colheita de *Tritrichomonas foetus* em fêmeas e machos bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFGRS**, 19:125-132, 1991.

STOCKDALE, H.; RODNING, S.; GIVENS, M. et al. Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. **J Parasitol**, 93(6): 1429-1434, 2007.

TOLBERT, M. K. et al. Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. **Vet Parasitol**, 187, 319-322, 2012.

UNIGWE, C. R. et al. Gastrointestinal helminths of West African Dwarf (WAD) goats in Ido Local Government Area, Ibadan, Oyo State, Nigeria. **J Anim Sci and Vet Med**, 2, 133-138, 2017.

VAN BERGEN, M.A.P. et al. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, 24 (3): 1017-1026, 2005.

WALKER, R. L. et al. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. **J Vet Diag Invest**, 15 (1):14-20, Jan. 2003.

WENRICH, D.H. Morphological studies on the trichomonad flagellates of man. **Archivos de la Sociedad de Biologia de Montevideo Suppl. Actas Congreso Internacionale de Biologia**. Montevideo, 5, 1185-1199, 1931.

WENRICH, D.H. Morphology of the intestinal trichomonad flagellates in man and similar forms in monkeys, cats, dogs, and rats. **J Morphol**, 74, 189-211, 1944.

WENRICH, D.H. The species of *Trichomonas* in man. **J Parasitol**, 33, 177-188, 1947.

YANG, C. R. et al. Diarrhoea surveillance in children aged under 5 years in a rural area of Hebei Province, China. **J Diarr Dis Res**, 8, 155-159, 1990.

ZALONIS, C. A. et al. Rare case of trichomonal peritonitis. **Emerg Infect Diss**, 17, 1312-1313, 2011.

ZHANG, N. et al. High prevalence of *Pentatrichomonas hominis* infection in gastrointestinal cancer patients. **Parasit e Vect**, 12,1-9, 2019.

8. ANEXOS

Anexo 1



INSTITUTO DE ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Identificação de *Pentatrichomonas hominis* em zebuínos naturalmente infectados.” – processo nº 0130-10-2021 – coordenada pela Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Teixeira de Jesus e equipe, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) na L reunião de 20/10/2021.

Finalidade da Proposta: pesquisa
Vigência da Proposta: outubro de 2023
Área: Ciências Agrárias; Patologia Animal; Reprodução Animal
Origem: Fazenda Reunidas Ingaíba
Espécie: *Bos taurus indicus*
Quantidade: 30 machos e 120 fêmeas

“**Resumo:** Parabasalídeos são protozoários flagelados anaeróbico que parasitam/colonizam principalmente o intestino grosso e trato genitourinário de vários mamíferos, incluindo gatos, cães, primatas não humanos e humanos. A ampla gama de hospedeiros deste organismo é alarmante e sugere um potencial agente causador de doença zoonótica. No entanto, o conhecimento em biologia aprofundada desses protistas ainda é limitado. A maioria dos relatos envolvendo essa espécie de parabasalídeo estão relacionadas com quadros diarreicos e sintomas intestinais em humanos e animais. O projeto se trata do primeiro relato de *Pentatrichomonas hominis* parasitando trato reprodutivo de bovinos. Dessa forma o projeto tem como objetivo, identifica-lo corretamente além de correlacionar a sua presença a desordens reprodutivas e comorbidades. Para tanto será coletado material (muco vaginal e lavado prepucial) o mesmo será colocado em cultivo e posteriormente avaliado através de técnicas de biologia molecular. Amostras de sangue serão coletadas para realizar diagnóstico diferencial de outras doenças que afetam a reprodução e um questionário será aplicado. O projeto visa investigar possíveis influências desse parasitismo (inédito) para a saúde dos animais.”

Seropédica, 21 de outubro de 2021

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ

Identification of *Pentatrichomonas hominis* in preputial washes of bulls in Brazil

Identificação de *Pentatrichomonas hominis* em lavado prepucial de touros no Brasil

Otávia Reis e Silva^{1*}; Laura Ribeiro¹; Vera Lucia Teixeira de Jesus¹; Douglas McIntosh²; Lara Nogueira Silenciato³; Joaquim Esquerdo Ferreira⁴; Marco Roberto Bourg de Mello³

¹Laboratório de Doenças da Reprodução, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

²Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, Departamento de Parasitologia Animal – DPA, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

³Departamento de Reprodução e Avaliação Animal – DRAA, Instituto de Zootecnia – IZ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

⁴Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Valença – UNIFAA, Valença, RJ, Brasil

How to cite: Silva OR, Ribeiro L, Jesus VLT, McIntosh D, Silenciato LN, Ferreira JE, et al. Identification of *Pentatrichomonas hominis* in preputial washes of bulls in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2022; 31(2): e005322. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022034>

Abstract

The parabasalid *Pentatrichomonas hominis* is generally considered to represent a symbiotic component of the gastrointestinal microbiota in a wide variety of vertebrate hosts including humans. Nevertheless, a limited number of studies have raised the possibility that it may act as a pathogen of humans, dogs, and pigs and that some human infections may have a zoonotic origin. Data from North America revealed an association between *P. hominis* and the bovine urogenital tract, principally in bulls and rarely in cows. The importance of this observation is linked to possible interference in the accurate diagnosis of the economically important venereal pathogen *Trichomonas foetus*. The current study employed culture-based and molecular methods to examine the preputial cavities of four breeding bulls, raised in open pasture in southeastern Brazil, for the presence of trichomonads. Motile protozoa were isolated from three of the bulls and were definitively identified as *P. hominis* based on nucleotide sequencing of polymerase chain reaction (PCR) amplicons derived from the ribosomal RNA operon (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) of the parasite. The potential implications of these findings for bovine and human health are discussed.

Keywords: Nelore bulls, Trichomonads, *Pentatrichomonas hominis*, PCR.

Resumo

O parabasalídeo *Pentatrichomonas hominis* é geralmente considerado um componente simbiótico da microbiota gastrointestinal em uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo os humanos. No entanto, um número limitado de estudos levantou a possibilidade de que possa atuar como patógeno de humanos, cães e suínos, e que algumas infecções humanas possam ter origem zoonótica. Dados da América do Norte revelaram uma associação entre *P. hominis* e o trato urogenital bovino, principalmente, em touros e raramente em vacas. A importância dessa observação está ligada a uma possível interferência no diagnóstico preciso do patógeno venéreo de importância econômica *Trichomonas foetus*. O presente estudo empregou métodos baseados em cultura em combinação com técnicas moleculares, para examinar as cavidades prepuciais de quatro touros, criados em pastagem aberta no sudeste do Brasil, quanto à presença de tricomonas. Protozoários móveis foram isolados de três dos touros e foram definitivamente identificados como *P. hominis* com base no sequenciamento de

nucleotídeos de amplicons geradas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando a região RNA ribossômico (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) do parasita como alvo. Os potenciais implicações desses achados para a saúde bovina e humana são discutidas.

Palavras-chave: Touros Nelore, Trichomonadida, *Pentatrichomonas hominis*, PCR.

Received March: 29, 2022. Accepted June 7, 2022.

*Corresponding author: Otávia Reis e Silva. E-mail: otaviareis@hotmail.com



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Braz J Vet Parasitol 2022; 31(2): e005322 | <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022034>

Pentatrichomonas hominis is a flagellated, anaerobic, unicellular, non-mitochondrial protozoan belonging to the *Trichomonadidae* family. It is distinguished morphologically by the presence of five anterior flagella and a single recurrent flagellum. The parasite demonstrates extensive host plasticity, having been reported as an inhabitant of the gastrointestinal tract of numerous species of vertebrate including humans, cats, cattle, dogs, goats, nonhuman primates, swine, owls and even reptiles, wherein it was generally considered to represent a commensal component of the gut microbiota (Li et al., 2014a, 2018, 2020; Santos et al., 2015; Mahittikorn et al., 2021). However, a limited number of studies and case reports have suggested a potential role for *P. hominis* as the causative agent of gastrointestinal disease in humans (Meloni et al., 2011) and naturally infected animals (Kim et al., 2010; Li et al., 2014b, 2020). In addition, experimental infection of pigs with *P. hominis* resulted in histological lesions associated with changes in the epithelial layer, including congestion, intestinal mucosa desquamation, severely increased numbers of inflammatory cells, vessel rupture and decreased intestinal villus length (Li et al., 2014a). In contrast, natural *P. hominis* infections in puppies presenting liquid diarrhea, weight loss, and weakness were resolved via treatment with the antiparasitic agent fenbendazole, but diarrhea persisted and the animals died, indicating that *P. hominis* was not the etiological agent of the observed gastrointestinal disturbance (Gookin et al., 2005).

An association between human gastrointestinal cancers and a significantly elevated prevalence of *P. hominis* in fecal samples in China was reported by researchers (Zhang et al., 2019), who employed a species-specific PCR assay to examine DNA isolated from feces, with no attempt made to culture the protozoa. The level of detection in cancer patients was 45%, in comparison to a level of 9% in the control population of non-cancer patients. The authors considered it probable that tumor-induced changes in the gut microflora created conditions that were favorable to colonization of the gastrointestinal tract of cancer patients with *P. hominis*, but no experimental data were provided to support this hypothesis. Moreover, they found no evidence for a pathological function for *P. hominis* in either cancer induction or progression.

In addition to gastrointestinal illness, the possible involvement of *P. hominis* in a single case of human pulmonary trichomoniasis, a rare condition normally associated with the oral parasite *Trichomonas tenax*, was reported in Thailand. *Pentatrichomonas* was detected by PCR in pleural exudates and was isolated from fecal samples, albeit no evidence of the protozoa was found in the oral cavity. Nucleotide sequencing revealed 100% sequence similarity between the amplicons generated from the pleural exudate and cultured protozoa from feces. The authors interpreted their findings as evidence for the ability of *P. hominis* to colonize body sites other than the gastrointestinal tract (Jongwutiwes et al., 2000).

Taken as a whole, the evidence to support a role for *P. hominis* as a pathogen could be viewed as controversial (Maritz et al., 2014). In contrast, there exists robust evidence demonstrating the ability of *P. hominis* to colonize the preputial cavity of bulls in North America (Hayes et al., 2003; Walker et al., 2003; Dufernez et al., 2007). In addition to confirming the ability of the protozoan to inhabit non-gastrointestinal body sites, the presence of *P. hominis* in the bovine urogenital tract, represents a

problem for the accurate diagnosis of *Tritrichomonas foetus*, an economically important venereal trichomonad parasite of cattle that causes reproductive issues, including spontaneous abortion, pyometra and infertility (Bailey et al., 2021). In a subsequent study (Corbeil et al., 2008), the isolation of two non-*T. foetus* trichomonads, (identified as *P. hominis* based on the results of PCR and immunofluorescence assays) was recorded from the vaginas of breeding cows in the United States of America (USA). The same study identified the presence of *P. hominis* in the urogenital tract of breeding (non-virgin) bulls, and the authors raised the possibility that *P. hominis* may be sexually transmitted in a manner similar to *T. foetus*.

To our knowledge, no studies have been published relating the identification or isolation of *P. hominis* from the urogenital system of cattle in South America. However, colonization of the genitalia and smegma by other, non-*T. foetus*, trichomonads was reported as an infrequent phenomenon in virgin bulls reared in Argentina (Campero et al., 2003; Cobo et al., 2003). In addition, the isolation of a non-*T. foetus* trichomonad in cattle that grouped phylogenetically with the trichomonads identified in the study of Walker et al. (2003) was reported, but not discussed in detail, by Brazilian researchers (Kleina et al., 2004). The current work was conducted as part of a larger study examining the health status/presence of infectious agents, including trichomonads, in beef cattle reared in southeastern Brazil and it reports the isolation by culture and the subsequent molecular characterization of *P. hominis* from the preputial cavity of non-virgin Nelore bulls.

All procedures involving animals were conducted in strict accordance with the recommendations approved by the Ethics Commission for Research Employing Animals (CEUA/UFRRJ; Protocol nº 0130-10-2021). A total of four samples of preputial lavage were collected from individual Nelore bulls (with ages between 3.5 to 10 years old; mean age 6.3 years), raised in the municipality of Mangaratiba, Rio de Janeiro State, Brazil. The property raises beef cattle exclusively of the Nelore breed, that are farmed extensively in open pasture with mineral salts and water provided *ad libitum*. At the time of sampling in 2019, the property had a population of 909 female cattle, of which 588 were of reproductive age, and a population of eight bulls. Reproductive management was conducted through artificial insemination; however, all animals were raised in the same pasture and as such, the bulls had access to the females for natural service. All animals were certified free of brucellosis and tuberculosis and the vaccination schedule included vaccines against brucellosis, foot-and-mouth disease, rabies and clostridial diseases. In addition, all animals received routine anthelmintic treatment.

Samples were collected after cleaning the preputial region with a moist paper towel and cutting the longest and dirtiest hairs. A disposable plastic pipette coupled to a syringe with 50 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) was introduced into the preputial orifice, which was closed with one hand, and with the other hand, the region was massaged so that the PBS was distributed over the entire preputial mucosa. Following the massage, a 50 mL sterile Falcon® tube was placed at a level below the orifice and the wash was collected by gravity. Washes were stored at ambient temperature (25°C ± 3°C) following collection and during transport to the laboratory (within 6 hours of collection).

Individual washes were centrifuged at 400 x *g*, for 10 min at room temperature (22°C) and the supernatant was carefully removed by aspiration to leave the pellet in approximately 1 mL of PBS. Pellets were resuspended by gently tapping the base of the tube on the benchtop and the entire material was transferred to a cell culture flask containing 6 mL of pre-warmed (37°C) Hank's™ balanced salts solution (Vitrocell- Embriolife, Brazil) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum and streptomycin at a final concentration of 200 µg/mL, with incubation at 37°C and daily microscopic examination over seven days, commencing 24 hours post collection. Cultures identified as containing motile protozoa, via light microscopy with a 10x objective, were passaged (first subculture) using a

volume of 200 μL as inoculum for a new flask containing 3 mL of pre-warmed culture solution as specified above, with incubation at 37°C and subculture performed every 72 h. Cultures showing morphologies and movement characteristic of parabasalids were subcultured over 6 passages. Aliquots (1 mL) of the third and fourth subcultures containing approximately 1×10^6 trophozoites (enumerated microscopically), were collected and stored frozen (-20°C) in screw-capped microcentrifuge tubes (1.5 mL capacity) for molecular characterization.

Molecular analyses followed standardized protocols (Santos et al., 2015). Briefly, samples were defrosted, the trophozoites were sedimented by centrifugation (16,000 $\times g$) and the cell pellets were washed once with 1mL of PBS (pH 7.2). Thereafter, washed cells were resuspended in 100 μL of Instagene™ matrix (BIORAD) with incubation at 56°C for 30 min followed by boiling for 10 min and centrifugation (16,000 $\times g$ for 5 min) to sediment the cell debris and the chelex resin present in the Instagene™ matrix. A total of 60 μL of each supernatant was transferred to 1.5 ml screw-capped microcentrifuge tubes with storage at -20 °C.

DNA extracted from the cultures suspected to contain trichomonads were examined using three distinct PCR assays. The first assay employed the primer pair “TFR1/TFR2”, and the cycling conditions reported by Felleisen (1997), in order to amplify a fragment of the ribosomal rRNA operon containing the gene encoding 5.8S ribosomal RNA and the internal transcribed spacer regions (ITS 1 and 2) of all known trichomonads. The second assay, also targeting the rRNA operon, was used to provide specific identification of *T. foetus* and employed the primer pair “TFR3/TFR4” and the cycling conditions reported by Felleisen et al. (1998). The third assay utilized the primer pair “Th3/Th5” and the cycling conditions described by Crucitti et al. (2004), being used for the specific detection of a fragment of the gene encoding the small (18S) subunit of ribosomal RNA of *P. hominis*. The positive control used in the first and second assays was DNA extracted from the *T. foetus* strain K (originally isolated from the urogenital tract of a bull, by H. Guida, Embrapa, Seropédica, Brazil). In addition, DNA extracted from a Brazilian *P. hominis* isolate recovered from a cat (Santos et al., 2015) was employed as a positive control in the first and third assays. Aliquots (5 μL) of each amplification reaction were analyzed by agarose gel electrophoresis, using 2% gels prepared in Tris-Acetic acid-EDTA (TAE) buffer. Gels were stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The sizes of the amplification products were estimated via comparison to the positive control samples and a DNA molecular weight marker (GeneRuler, 100 bp DNA Ladder).

Post amplification analysis of amplicons was performed in two stages. Initial analysis employed a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique (Santos et al., 2015) to examine the amplicons of 339 bp generated using the “Th3/Th5” assay. Amplicons generated from the *P. hominis* positive control DNA and from the test samples were digested with 1 unit of the restriction enzymes *HaeIII* (Promega) and *Hinfl* (Invitrogen) in individual reactions, with incubation at 37°C for 2 h. Digestion products were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels stained with ethidium bromide, visualized, and photo documented. Banding patterns were compared between samples and via comparison to a DNA molecular weight marker (GeneRuler, 50 bp DNA Ladder). The resulting images were analyzed using the free software Gel-Analyzer available at GelAnalyzer.com (2022), to accurately determine the size of individual restriction fragments.

Nucleotide sequencing of amplicons generated from the test samples using the “TFR1/TFR2” assay was performed as follows. Aliquots (10 μL) of PCR products were treated with 2 μL of ExoSap-IT (GE Healthcare) according to the manufacturer’s protocol and sequenced in both directions using the amplification primers and the BigDye Ready Reaction mix V3.1 (ABI Corp). Reaction products were analyzed using a model 3500 Automated Genetic Analyzer (ABI Corp). Sequence alignments were

performed using the Sequencer™ software (Version 5.6, Genecodes Corporation, USA). All sequences were entered into the BLAST search algorithm and the NCBI nucleotide database (www.ncbi.nlm.nih.gov) to determine genetic identity. A representative sequence obtained in this research was deposited in and compared with those available in the GenBank database.

The nucleotide sequence ON311004, derived from the bovine sample T1, together with 18 reference sequences representing the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 loci of different parabasalids (including *Histomonas meleagridis* as an outgroup) were manually edited using the Sequencer™ software. A phylogenetic analysis was conducted using the MEGA version11 software (Tamura et al., 2021). The evolutionary history was inferred by constructing a phylogenetic tree, tested with 1000 bootstrap replicates, using the maximum likelihood method and Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980).

Cultures containing motile protozoa were established from three of the four preputial cavity washes. The positive cultures were denominated T1, T2 and T3. All cultures were maintained over six serial passages at which point cell viability was observed to decline. DNA was extracted from cells harvested from the third and fourth passages of each individual culture and examined by PCR. All samples produced amplicons in the assays employing the primers “TFR1/TFR2” and “Th3/Th5” but were universally negative in the assay using the primers “TFR3/TRF4”. The amplicons produced were of the same size as the bands generated by the *P. hominis* positive control DNA. These data were interpreted as suggestive of the presence of *P. hominis* in the cultures. Confirmation of colonization of the preputial cavity by *P. hominis* was obtained by two means. Firstly, amplicons of 339 bp (including the positive control) produced in the “Th3/Th5” assay were digested with the restriction enzymes resulting in the generation of fragments of 245 base pairs (bp) and 94 bp with the *Hae* III enzyme, and the production of three bands of 155 bp, 126 bp, and 53 bp with the *Hinf*I enzyme. The banding patterns observed for the T1–T3 samples were identical to those observed for the positive control amplicon. Secondly, amplicons (338 bp) derived from the test samples using the “TFR1/TFR2” assay were sequenced. High quality electropherograms were observed for all samples, indicating the presence of a single source of DNA and the sequences obtained for the three cultures were shown to be identical. The region internal to the primer binding sites (295 bp) of the sequence determined for the sample T1 was deposited in the GenBank database with the accession number (ON311004). The novel sequence showed 100% similarity (295/295 nucleotides) to sequences deposited as originating from *P. hominis* detected in human pleural exudate in Thailand (GenBank Accession number; AF156964) and canine fecal samples in France (KC623939) and the USA (AY758392).

A level of 99.7% sequence similarity (294/295 bp) was recorded with the sequence MK770862 (deposited by Spanish researchers) derived from a bovine isolate of *P. hominis* (ATCC 30098), recovered from cattle in the USA. Lower levels of similarity (99.3% to 98.9%) were recorded with the sequences MN173995 (293/295 bp) and MN173978 (292/295 nucleotides) detected in human feces collected from Chinese patients with gastrointestinal cancer. Details of the specific nucleotide differences observed between the sequences are provided in Table 1. Based upon the molecular analyses it was concluded that the trichomonads cultured from the preputial cavity of the bulls were *P. hominis*. Phylogenetic analysis based on the Maximum Likelihood method and using the Kimura 2-parameter evolutionary model demonstrated that the Brazilian bull-associated trichomonad sequence ON311004 clustered in the same branch as sequences derived from canine, bovine, and human isolates of *P. hominis* (Figure 1). The topology of the ML tree (Figure 1), in relation to the other species of parabasalids, was consistent with those described in previous phylogenetic studies using the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 loci (Li et al., 2014a) or the small subunit (18S) ribosomal RNA (Mahittikorn et al., 2021).

The finding of *P. hominis* colonizing the urogenital tract of non-virgin bulls in Brazil enhances the observations previously reported by North American researchers (Hayes et al., 2003; Walker et al., 2003; Dufernez et al., 2007; Corbeil et al., 2008), extending the geographical range of this phenomenon to the South American continent and adds weight to the hypothesis that this trichomonad is able to persist out with of its preferred body site. The practical implications of this finding are linked to the possible distortion of the diagnosis (based solely on culture) of *T. foetus*,

Table 1. Nucleotide variance between the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 loci of the eight *P. hominis* sequences used for phylogenetic analysis.

GenBank Accession Number				
ON311004	MK770862	MN173995	MN173978	HM853983
AF156964 ^a				
AY758392 ^a				
KC623939 ^a				
17/T ^b	C	C	C	C
27/T ^b				Gap
29/T ^b				
99/T ^b		C		C
165/T ^b			A	
251/A ^b			G	

^aSequences with 100% nucleotide similarity (295/295 nt) to the sequence ON311004 derived from bovine isolate T1; ^bNucleotide position with reference to ON311004/base identified at that position

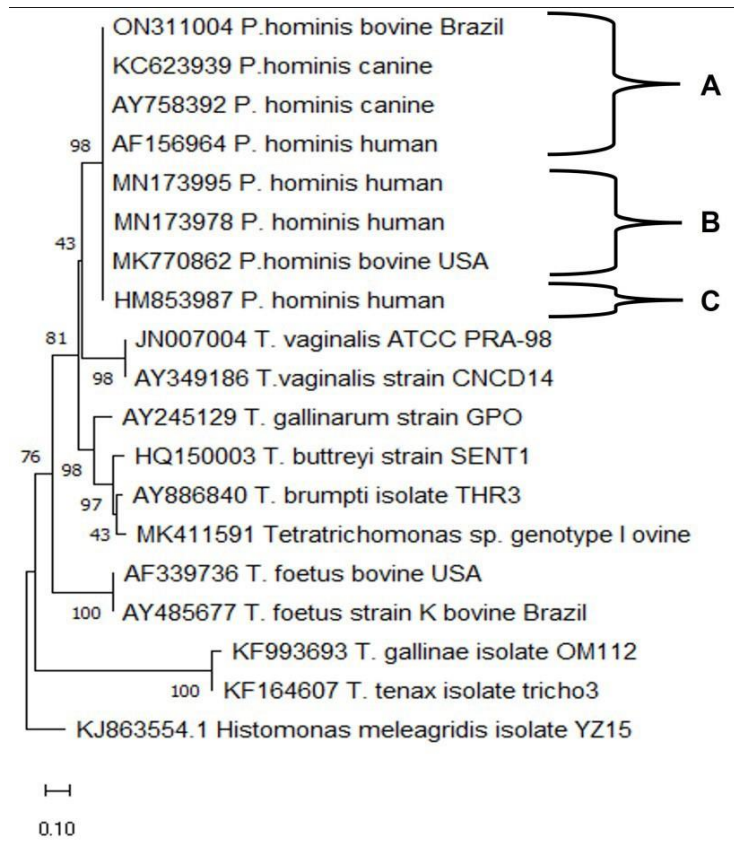


Figure 1. Phylogenetic tree of *P. hominis* isolates and reference parabasalid sequences of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 loci from GenBank (375 positions in the final dataset). The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Kimura 2-parameter model. The tree with the highest log likelihood (-2547.98) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Scale bars represent 0.10 nucleotide substitution per site. This analysis involved 19 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11. **A** = Sequences with 100% nucleotide similarity with the novel Brazilian sequence ON311004; **B** = Sequences with 99.7% or 99.3% nucleotide similarity with the sequence ON311004; **C** = Sequence with 98.9% nucleotide similarity with the sequence ON311004

and it is considered important that veterinarians and other bovine health professionals in Brazil be made aware of this association. Clearly, misdiagnosis based on morphology could be resolved using the PCR assay based on the “TFR3/TRF4” primers (Felleisen et al., 1998) to confirm the presence of *T. foetus*. Nonetheless, we recommend that the “Th3/Th5” assay should be routinely incorporated into molecular testing protocols based on the fact that the identification of *P. hominis* can be readily and cost effectively executed using the PCR-RFLP protocol employed herein (Santos et al., 2015). An additional justification for conducting complimentary molecular testing for *P. hominis* are the findings that co-infections with *T. foetus* and *P. hominis* can occur in the feline gastrointestinal tract (Santos et al., 2015), and that dual infections with *Tetratrichomonas buttreyi* and *P. hominis* were observed in 15 (1.6%) of bovine fecal samples from four farms in China, including three dairy farms and one beef farm (Li et al., 2020). Evidently, the existence of the same phenomenon in material cultured from the urogenital tract would be overlooked in the absence of specific testing for this trichomonad.

Although a matter of debate, the extensive host plasticity of *P. hominis* has been proposed as evidence for it to be considered as a zoonotic pathogen (Maritz et al, 2014; Mahittikorn et al., 2021). Thus, health professionals and farm workers having contact with the bovine urogenital tract, semen and even urine should be advised as to the potential for infection with *P. hominis* and the need to adopt appropriate

biosafety procedures. The route(s) by which the protozoa became established in the preputial cavity was not determined, but as suggested by other workers (Campero et al., 2003; Hayes et al., 2003; Michi et al., 2016) transmission was most likely via contact with contaminated feces present in either the environment or in the gastrointestinal tract of cattle (including other males) which may have been mounted by the bulls. In support of this hypothesis, the presence of *P. hominis* in the bovine gastrointestinal tract has been demonstrated in Asia (Li et al., 2020; Mahittikorn et al., 2021), but to our knowledge has not been reported in the Western hemisphere.

In light of the limited number of animals examined, the findings of the current study should be considered preliminary and it is recommended that future studies on this topic should extend the range of samples tested to include the urogenital tract of cows, cattle feces present in the rearing environment and feces collected from the gastrointestinal tracts of cattle and other animals present on farms (e.g. cats and dogs) that are known hosts for *P. hominis* and that may contribute to the circulation of the protozoa within the production environment.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

References

- Bailey NP, Velo-Rego E, Hirt RP. Sporadic isolation of *Tetratrichomonas* species from the cattle urogenital tract. *Parasitology* 2021; 148(11): 1339-1344. <http://dx.doi.org/10.1017/S003118202100086X>. PMID:34078489.
- Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun* 2003; 27(5): 359-369. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1024754003432>. PMID:14509450.
- Cobo ER, Campero CM, Mariante RM, Benchimol M. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from preputial smegma of virgin bulls. *Vet Parasitol* 2003; 117(3): 195-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.026>. PMID:14630428.
- Corbeil LB, Campero CM, Van Hoosear K, Bondurant RH. Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. *Vet Parasitol* 2008; 154(3-4): 226-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.014>. PMID:18450382.
- Crucitti T, Abdellati S, Ross DA, Chagalucha J, Dyck E, Buve A. Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38(6): 510-516. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01528.x>. PMID:15130148.
- Dufernez F, Walker RL, Noël C, Caby S, Mantini C, Delgado-Viscogliosi P, et al. Morphological and molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. *J Eukaryot Microbiol* 2007; 54(2): 161-168. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2007.00247.x>. PMID:17403157.
- Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 513-519. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.36.2.513-519.1998>. PMID:9466768.
- Felleisen RSJ. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* 1997; 115(Pt 2): 111-119. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182097001212>. PMID:10190167.
- GelAnalyzer.com. [online]. [cited 2022 Mar 29]. 2022. Available from: <http://www.gelalyzer.com>
- Gookin JL, Birkenheuer AJ, St. John V, Spector M, Levy MG. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *J Parasitol* 2005; 91(4): 939-943. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-474R.1>. PMID:17089769.
- Hayes DC, Anderson RR, Walker RL. Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(4): 390-394. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870301500417>. PMID:12918825.
- Jongwutiwes S, Silachamroon U, Putaporntip C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(2): 185-186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90270-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90270-0). PMID:10897364.

- Kim YA, Kim HY, Cho SH, Cheun HI, Yu JR, Lee SE. PCR detection and molecular characterization of *Pentatrichomonas hominis* from feces of dogs with diarrhea in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 2010; 48(1): 9-13. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2010.48.1.9>. PMID:20333280.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16(2): 111-120. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01731581>. PMID:7463489.
- Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, Benchimol M, Bogo MR. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol* 2004; 34(8): 963-970. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.004>. PMID:15217735.
- Li W, Li W, Gong P, Meng Y, Li W, Zhang C, et al. Molecular and morphologic identification of *Pentatrichomonas hominis* in swine. *Vet Parasitol* 2014a; 202(3-4): 241-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.028>. PMID:24636786.
- Li WC, Gong PT, Ying M, Li JH, Yang J, Li H, et al. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in China. *Parasitol Res* 2014b; 113(5): 1795-1801. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3825-9>. PMID:24623347.
- Li WC, Huang JM, Fang Z, Ren Q, Tang L, Kan ZZ, et al. Prevalence of *Tetratrichomonas buttrei* and *Pentatrichomonas hominis* in yellow cattle, dairy cattle, and water buffalo in China. *Parasitol Res* 2020; 119(2): 637-647. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-01906550-0>. PMID:31823007.
- Li WC, Wang K, Gu Y. Occurrence of *Blastocystis* sp. and *Pentatrichomonas hominis* in sheep and goats in China. *Parasit Vectors* 2018; 11(1): 93. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2671-5>. PMID:29454366.
- Mahittikorn A, Udonsom R, Koompapong K, Chiabchalard R, Sutthikornchai C, Sreepian PM, et al. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in animals in central and western Thailand. *BMC Vet Res* 2021; 17(1): 203. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-021-02904-y>. PMID:34078384.
- Maritz JM, Land KM, Carlton JM, Hirt RP. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? *Trends Parasitol* 2014; 30(7): 333-341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.005>. PMID:24951156.
- Meloni D, Mantini C, Goustille J, Desoubreaux G, Maakaroun-Vermeesse Z, Chandener J, et al. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in two patients with gastrointestinal symptoms. *J Clin Pathol* 2011; 64(10): 933-935. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2011.089326>. PMID:21551465.
- Michi AN, Favetto PH, Kastelic J, Cobo ER. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* 2016; 85(5): 781-791. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.037>. PMID:26679515.
- Santos CS, Jesus VLT, McIntosh D, Berto BP, Lopes CWG. Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. *Pesq Vet Bras* 2015; 35(12): 980-988. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015001200007>.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 2021; 38(7): 30223027. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>. PMID:33892491.
- Walker RL, Hayes DC, Sawyer SJ, Nordhausen RW, Van Hoosear KA, BonDurant RH. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(1): 14-20. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870301500104>. PMID:12580289.
- Zhang N, Zhang H, Yu Y, Gong P, Li J, Li Z, et al. High prevalence of *Pentatrichomonas hominis* infection in gastrointestinal cancer patients. *Parasit Vectors* 2019; 12(1): 423. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3684-4>. PMID:31462294.