

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Perfil Epidemiológico de Gatos Naturalmente
Infectados por Parabasalídeos na Região
Metropolitana do Rio de Janeiro

Juliana de Moraes Intrieri

2025



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

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE GATOS
NATURALMENTE INFECTADOS POR
PARABASALÍDEOS NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

JULIANA DE MORAES INTRIERI

Sob a orientação do Professor
Fabio Barbour Scott

e Coorientação do Doutor
Diefrey Ribeiro Campos

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre
em Ciências Veterinárias**, no Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2025

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

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

I61p Intrieri, Juliana, 1998-
 Perfil Epidemiológico de Gatos Naturalmente
 Infectados por Parabasalídeos na Região Metropolitana
 do Rio de Janeiro / Juliana Intrieri. - Seropédica,
 2025.
 82 f.

 Orientador: Fabio Barbour Scott Scott.
 Coorientador: Diefrey Ribeiro Campos.
 Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
 Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
 Ciências Veterinárias, 2025.

 1. felinos. 2. tricomoniase. 3. parabasalídeos. 4.
 diarreia. 5. prevalência. I. Scott, Fabio Barbour
 Scott, 1966-, orient. II. Ribeiro Campos, Diefrey ,
 1988-, coorient. III Universidade Federal Rural do
 Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 538/2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.010101/2025-88

Seropédica-RJ, 28 de fevereiro de 2025.

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

JULIANA DE MORAES INTRIERI

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2025

(Assinado digitalmente em 28/02/2025 15:17)

FABIO BARBOUR SCOTT
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)
Matrícula: ###736#0

(Assinado digitalmente em 06/03/2025 06:38)

MELISSA CARVALHO MACHADO DO COUTO
CHAMBARELLI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ##218#0

(Assinado digitalmente em 18/03/2025 10:13)

ALINE SANTANA DA HORA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.468-##

(Assinado digitalmente em 06/03/2025 13:46)

DIEFREY RIBEIRO CAMPOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.737-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 538, ano: 2025,
tipo: ATA, data de emissão: 28/02/2025 e o código de verificação: e02998d3a7

*“Não há nada que faça um homem suspeitar
tanto como o fato de saber pouco.”*

- Francis Bacon

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio inesgotável mesmo geograficamente distantes.

Aos meus amigos, que estão sempre dispostos a ouvir minhas animações e lamentações.

À todos os gatos que me construíram como Médica Veterinária e que me fazem querer estar em constante evolução para melhor atendê-los - principalmente aos do LQEPV, que me tornaram apaixonada desde a graduação pelo que estudo e trabalho.

Ao meu orientador Professor Dr. Fabio Scott pelo suporte e confiança.

Ao meu co-orientador Dr. Diefrey Ribeiro Campos, por ter mergulhado neste tema tão complexo junto comigo, por toda instrução ao longo de todos esses anos e me inspirar como profissional e cientista.

Aos professores Dr. Douglas McIntosh e Dra Vera Lúcia Teixeira de Jesus pelo fornecimento de tanto conhecimento acerca do mundo dos parabasalídeos. Sem as suas instruções e apoio seria impossível executar todas as etapas deste projeto com tanta excelência. Agradeço por toda a paciência em me ensinarem e por acreditarem neste projeto junto comigo.

A toda equipe do LQEPV: aos residentes que me auxiliaram nos exames coproparasitológicos - Bruno, Lais, Alyne e Manoella e estagiários - em especial Ester, Maria Vitória, Dandara e Yanka, que me auxiliaram com as coletas e processamento das amostras.

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

RESUMO

INTRIERI, Juliana de Moraes. **Perfil epidemiológico de gatos naturalmente infectados por Parabasalídeos em gatos na Região Metropolitana do Rio de Janeiro**. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Os parabasalídeos são protozoários flagelados unicelulares anaeróbicos que, em sua maioria, são simbióticos intestinais não-patogênicos. Porém, podem se apresentar como parasitos, causando prejuízos. Dentro deste grupo, temos *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis*, espécies relatadas como causas de diarreias crônicas em gatos domésticos. O estudo objetivou determinar o perfil epidemiológico de gatos naturalmente infectados por *T. foetus* e *P. hominis* na região metropolitana do Rio de Janeiro. Foram coletadas 241 amostras fecais de gatos de diferentes localidades da região metropolitana do Rio de Janeiro. Para o diagnóstico, as fezes foram coletadas e, no momento da coleta, aproximadamente 0,5g inoculadas em meios Lactopep, incubados a 33°C para verificar o crescimento de *T. foetus* e *P. hominis*. Além da cultura, 1g foi separada para extração do material genético e acondicionado à -20°C. A extração do DNA foi realizada utilizando um kit comercial (ZR Fecal DNA MiniPrep™, Zymo Research) seguindo as recomendações do fabricante. A análise de biologia molecular foi realizada pela técnica Nested PCR, no qual a primeira reação utilizou primers denominados “Penta ITS Ex e Foetus ITS Ex” e, após, submetido o produto aos primers TRF1 e TRF2. Em seguida, foi submetido à digestão com a enzima *Hha I*, gerando fragmentos de 221 e 149pb para *T. foetus* e 205 e 133pb para *P. hominis*. Estas amostras foram sequenciadas, detectando 14 gatos considerados positivos para *T. foetus*, 5 para *P. hominis* e dois coinfectados por ambos. Dados referentes aos animais e ao manejo realizado pelos tutores foram registrados no momento da coleta das fezes para realizar o cálculo de associação estatística. Com base nos resultados da PCR e técnicas coproparasitológicas, foi determinada a prevalência geral e por parasito identificado. A associação estatística entre as variáveis analisadas e o parasitismo por *T. foetus* e *P. hominis* foi realizada a partir do teste de G. Não houve crescimento de parabasalídeos no meio de cultura utilizado. A prevalência de monoinfecção para parasitos gastroentérico foi de 24,9% (n = 60). Já para os parabasalídeos foi 5,8% (n = 14) para *T. foetus* e 2,1% (n = 5) para *P. hominis*. Foi identificado um gato positivo com um parabasalídeo com 95% de similaridade genética para *Simplicimonas* spp. Dentre as variáveis, foi encontrada significância estatística para animais que vivem em abrigos para *T. foetus* ($p = 0.0462$) e *P. hominis* ($p = 0.0395$), para a coinfecção com outros parasitos gastroentéricos para *P. hominis* ($p = 0,0487$) e todos os gatos positivos para *T. foetus* e *P. hominis* apresentaram diarreia. Todos os animais identificados apresentaram fezes pastosas para *T. foetus* ($p < 0,0001$), fezes pastosas ou líquidas para *P. hominis* ($p = 0,0109$), sendo a diarreia crônica identificada nos 14 positivos para *T. foetus*. Com base nestes resultados, é possível concluir que *T. foetus* e *P. hominis* ocorrem na população de gatos da região metropolitana do Rio de Janeiro e a diarreia parece ser um sinal clínico associado ao parasitismo.

Palavras-chave: felinos, tricomoníase, parabasalídeos, diarreia, prevalência

ABSTRACT

INTRIERI, Juliana de Moraes. **Epidemiological profile of cats naturally infected by Parabasalids in cats in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro.** 82p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Parabasalids are anaerobic, unicellular flagellated protozoa that are mostly non-pathogenic intestinal symbionts. However, they can present themselves as parasites, causing damage. Within this group, we have *Pentatrichomonas foetus* and *Tritrichomonas foetus*, species reported as causes of chronic diarrhea in domestic cats. The study aimed to determine the epidemiological profile of cats naturally infected by *T. foetus* and *P. hominis* in the metropolitan region of Rio de Janeiro. A total of 241 fecal samples were collected from cats from different locations in the metropolitan region of Rio de Janeiro. For diagnosis, feces were collected and, at the time of collection, approximately 0.5 g were inoculated in Lactopep media, incubated at 33°C to verify the growth of *T. foetus* and *P. hominis*. In addition to the culture, 1g was separated for extraction of genetic material and stored at -20°C. DNA extraction was performed using a commercial kit (ZR Fecal DNA MiniPrep™, Zymo Research) following the manufacturer's recommendations. Molecular biology analysis was performed using the nested PCR technique, in which the first reaction used primers called "Penta ITS Ex and Foetus ITS Ex" and, afterwards, the product was subjected to primers TRF1 and TRF2. It was then subjected to digestion with the enzyme *Hha I*, generating fragments of 221 and 149 bp for *T. foetus* and 205 and 133 bp for *P. hominis*. These samples were sequenced, detecting 14 cats considered positive for *T. foetus*, 5 for *P. hominis* and two co-infected by both. Data related to the animals and the management performed by the owners were recorded at the time of feces collection to perform the calculation of statistical association. Based on the results of PCR and coproparasitological techniques, the general prevalence and prevalence of each identified parasite were determined. The statistical association between the variables analyzed and parasitism by *T. foetus* and *P. hominis* was performed using the G test. There was no growth of parabasalids in the culture medium used. The prevalence of monoinfection for gastroenteric parasites was 24.9% (n = 60). For parabasalids, it was 5.8% (n = 14) for *T. foetus* and 2.1% (n = 5) for *P. hominis*. One positive cat was identified with a parabasalid with 95% genetic similarity to *Simplicimonas* spp. Among the variables, statistical significance was found for animals living in shelters for *T. foetus* (p = 0.0462) and *P. hominis* (p = 0.0395), for coinfection with other gastrointestinal parasites for *P. hominis* (p = 0.0487) and all cats positive for *T. foetus* and *P. hominis* presented diarrhea. All identified animals presented pasty feces for *T. foetus* (p < 0.0001), pasty or liquid feces for *P. hominis* (p = 0.0109), with chronic diarrhea identified in the 14 positive for *T. foetus*. Based on these results, it is possible to conclude that *T. foetus* and *P. hominis* occur in the cat population of the metropolitan region of Rio de Janeiro and diarrhea appears to be a clinical sign associated with parasitism.

Keywords: felines, trichomoniasis, parabasalids, diarrhea, prevalence

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras positivas para *Tritrichomonas foetus* com base na análise de PCR-RFLP

Tabela 2. Tabela de ocorrência de parasitos do trato digestório de amostras fecais de gatos da região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Tabela 3. Relação dos parasitos e suas associações em diagnóstico coproparasitológico e pela reação em cadeia da polimerase das amostras fecais dos gatos da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Tabela 4. Relação dos parasitos e suas associações em diagnóstico coproparasitológico e pela reação em cadeia da polimerase das amostras fecais dos gatos que participaram do estudo.

Tabela 5: Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis sexo, raça e idade dos gatos.

Tabela 6: Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis condições de moradias e acesso à rua.

Tabela 7. Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis contactantes, tipo de alimentação e fornecimento de água.

Tabela 8: Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis uso da caixa sanitária e frequência de limpeza.

Tabela 9: Análise estatística levando em consideração a coloração, volume e frequência de eliminação das fezes.

Tabela 10: Análise estatística levando em consideração consistências das fezes e formas de apresentação clínica em casos de diarreia.

Tabela 11: Características clínicas e epidemiológica do gato positivo para *Simplicimonas*-like.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação taxonômica do filo Parabasalia

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

Quadro 3. Formulário para controle individual e coleta das informações para avaliação dos fatores de risco de cada animal incluído no estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema com a visão completa de *Tritrichomonas foetus* sendo (a) detalhes da região anterior (b) principais estruturas celulares e visão próxima do sistema mastigonte. AF flagelos anteriores, Ax Axóstilo, BB corpo parabasal, C costa, Co Pente, ER retículo endoplasmático, F filamentos conectados a costa à membrana plasmática, próximo ao flagelo recorrente; G Golgi; GL grânulos de glicogênio; H hidrogenossomos; IK filamento infra-cinetossômico; L lisossomo; N núcleo; Nu nucléolo; P pelta; PF filamento parabasal; PF1 filamento parabasal número 1; PF2 filamento parabasal número 2; RF flagelo recorrente; S filamentos sigmóides; SK corpo supra-cinetossômico; UM membrana ondulante; V vacúolo.

Figura 2. Observação morfológica de *Pentatrichomonas hominis*, sendo AF os 4 flagelos anteriores, IF flagelo independente, UM membrana ondulatoria, RF flagelo recorrente, P pelta, AX axóstilo.

Figura 3: Amplificação de DNA de *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* utilizando três conjuntos de primers: TRF-1/TRF-2, TRF-3/TRF-4 e Penta ITS Ex/*Foetus* ITS Ex (Duplex PCR). Poços 1 a 4: controles positivos de *T. foetus* contendo, respectivamente, 2000, 200, 20 e 2 células. Poços 5 a 7: controles positivos de *P. hominis* contendo 1000, 100 e 1 célula, respectivamente. Poço 8: controle negativo (“água fora”). Poço 9: controle negativo (“água dentro”).

Figura 4: Produto de PCR utilizando os primers TFR1/TFR2. Poços 1 a 24: amostras testadas. F1: controle positivo contendo DNA de *Tritrichomonas foetus* equivalente a 2×10^3 células; F2: controle positivo com DNA equivalente a 2×10^2 células; F3: controle positivo com DNA equivalente a 20 células. D: controle negativo (água dentro); F: controle negativo (água fora); L: marcador de peso molecular (100 pb).

Figura 5: Nested PCR com amostras 1 a 18 consideradas positivas para *Tritrichomonas foetus* e/ou *Pentatrichomonas hominis*. Poços 19 e 20: controles positivos da etapa de extração, com fezes adulteradas contendo, respectivamente, 3×10^5 e 3×10^3 células de *T. foetus*. Poços 21 e 22: controles negativos da etapa de extração. Poço 23: amplicon positivo de *T. foetus* (2000 células), utilizado como marcador interno para distinção entre *T. foetus* e *P. hominis*. Poço 24: amplicon positivo de *P. hominis* (1000 células), também utilizado como marcador interno. Poço 25: controle positivo da amplificação (2000 células de *T. foetus*). Poços 26 e 27: controles negativos (“água dentro” e “água fora” da primeira PCR). Poços 28 e 29:

controles negativos (“água dentro” e “água fora” da segunda PCR). L: marcador de peso molecular (100 pb)

Figura 6: Produtos de PCR submetidos à digestão com a enzima de restrição *Hha* I. Amostras compatíveis com *Tritrichomonas foetus*: 1 a 5, 8 a 10, 13, 14, 17 e 18; compatíveis com *Pentatrichomonas hominis*: 6, 11 e 16; compatíveis com coinfeção por *T. foetus* e *P. hominis*: 7 e 15. A amostra 12 apresentou fragmento não digerido. Poços 19 e 20: controles positivos para *T. foetus*; Poço 21: controle positivo para *P. hominis*; poços 22 e 23: controles negativos..

Figura 7: Casos positivos para *Tritrichomonas foetus* na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Figura 8: Casos positivos para *Pentatrichomonas hominis* na região metropolitana do Rio de Janeiro

Figura 9. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo nas variáveis sexo, raça e idade.

Figura 10. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo nas variáveis tipo de moradia e acesso à rua.

Figura 11. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo na variável contactantes.

Figura 12. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo nas variáveis tipo de alimentação e fornecimento de água.

Figura 13. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo na variável uso da caixa sanitária.

Figura 14: Gráficos com a prevalência do volume, coloração das fezes e frequência de defecação dos animais incluídos no estudo

Figura 15: Gráficos com a prevalência dos tipos de consistência de fezes coletadas e distinção entre animais sem diarreia, com diarreia de caráter agudo ou crônico

Figura 16: Casos positivos para *Simplicimonas-like* na região metropolitana do Rio de Janeiro.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Protocolo Comissão de Ética (CEUA) - IV/UFRRJ

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Parabasalídeos	3
2.1.1 - Taxonomia e características gerais.....	3
2.2 Infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em gatos.....	5
2.3. Infecção por <i>Pentatrichomonas hominis</i> em gatos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Localização da Experimentação	13
3.2. Aprovação na Comissão de Ética.....	13
3.3. Obtenção das amostras	13
3.4 Cultura dos protozoários <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Pentatrichomonas hominis</i>	14
3.5 Preparo das Amostras para Realização das Análises Moleculares	14
3.6. Preparo dos controles da extração	14
3.7 Extração do Ácido Desoxirribonucleico	15
3.7 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase para <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Pentatrichomonas hominis</i>	16
3.7.1 Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP).....	19
3.7.2 Sequenciamento dos Produtos da PCR	20
3.7.3 Confirmação pela PCR para <i>Cyniclomyces</i> spp.	20
3.7.4 Confirmação pela PCR para <i>Toxocara</i> spp	21
3.8 Perfil Epidemiológico	21
3.8.1 Coleta de dados para fatores de risco.....	21
3.8.2. Técnicas Coproparasitológicas Utilizadas	24
3.9 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Cultura para <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Pentatrichomonas hominis</i>	26
4.2 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase para <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Pentatrichomonas hominis</i>	27
4.3 Perfil epidemiológico	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Os parabasalídeos são um grupo de protozoários flagelados pertencente ao Filo Parabasalia que é composto por diversas classes, ordens e famílias. São organismos anaeróbios que estão adaptados a viver em diferentes sistemas orgânicos de vertebrados, como trato reprodutivo, trato respiratório, trato digestório. Alguns desses microrganismos são simbioses para seus hospedeiros, não causando nenhum tipo efeito deletério ou, até mesmo, auxiliando em processos fisiológicos.

Dentro deste vasto grupo, duas espécies têm demonstrado possuir importância na medicina veterinária: *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis*. A primeira, *T. foetus*, durante muitos anos foi conhecida por causar problemas reprodutivos em bovinos e doença do trato respiratório em suínos e, nas últimas décadas foi comprovado seu envolvimento em quadros de diarreia crônica em gatos domésticos. Alguns relatos apontam que este protozoário também já foi identificado do útero de uma gata com piometra e, também, no trato respiratório superior de gatos.

Já a espécie *P. hominis* é considerada como comensal que habita o trato digestivo de primatas humanos e não humanos e cães. No entanto, nas últimas décadas começaram a identificar esse protozoário como causador de diarreia, sobretudo na espécie felina.

Esses dois protozoários apresentam o ciclo de vida direto, e a forma de transmissão, entre gatos, parece ser pela via feco-oral. Uma característica do ciclo biológico destes protozoários é não possuir uma forma infectante resistente no ambiente, por exemplo a formação de cistos, que favorecem a infecção como acontece com outros flagelados, como *Giardia intestinalis*. Apesar de descrita a forma de pseudocisto, pouco se sabe como esses protozoários sobrevivem no ambiente para infectar novos hospedeiros.

Apesar de existirem estudos que demonstram a prevalência desses protozoários a nível global, ainda são escassos os trabalhos que mostrem a epidemiologia destes parasitos no Brasil, assim como os fatores de risco associados à infecção neste país. A maioria dos trabalhos brasileiros publicados tratam-se de relatos de casos ou levantamentos epidemiológicos em gatos que apresentam diarreia não demonstrando de uma forma ampla qual é a real distribuição destes protozoários dentro de uma população de gatos domésticos.

O diagnóstico da infecção pode ser realizado pelo exame parasitológico direto realizado a partir de lavados do reto e cólon de gatos com suspeita clínica. Contudo, devido a semelhança

com outros protozoários flagelados e a baixa sensibilidade do teste dificultam uma identificação precisa desses parasitos por este método. O exame de cultura fecal apresenta maior sensibilidade, quando comparado com o exame direto, no entanto, as fezes precisam ser recém coletadas para ocorrer o crescimento dos parasitos. Atualmente, o exame mais preciso para o diagnóstico descrito na literatura é a reação em cadeia da polimerase, que pode detectar organismos tanto vivos quanto mortos, é capaz de identificar o protozoário em gatos com baixa carga parasitária, além, de permitir diferenciar *T. foetus* de *P. hominis*.

Devido ao exposto acima, a infecção por esses dois flagelados se torna um desafio diagnóstico para clínicos veterinários o que pode prejudicar o tratamento dos casos de diarreia causados por estes parasitos em gatos. Na tentativa de preencher algumas dessas lacunas existentes na epidemiologia destes protozoários dentro de uma população de gatos domésticos, este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e os fatores associados ao parasitismo por *T. foetus* e *P. hominis* em gatos naturalmente infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Parabasalídeos

2.1.1 - Taxonomia e características gerais

Os parabasalídeos são um grupo de protozoários flagelados unicelulares anaeróbios. Segundo Boscaro *et al.*, (2024) são organismos pertencentes aos Domínio Eukaryota, Reino Protista, Filo Parabasalia, com cerca de 11 classes, 16 ordens e 31 famílias, conforme demonstrado no Quadro 1 abaixo:

Quadro 1: Classificação taxonômica do filo Parabasalia

Filo	Classe	Ordem	Família
Parabasalia	Hypotrichomonadea	Hypotrichomonadida	Hypotrichomonadidae
	Pimpavickeia	Pimpavickida	Pimpavickidae
	Trichomonadea	Honigbergiellida	Hexamastigidae
			Honigbergiellidae
			Cthulhuidae
			Tetratrichomastigidae
		Trichomonadida	Lacusteriidae
			Trichomonadidae
	Lophomonadea	Lophomonadida	Lophomonadidae
	Trichonymphea	Trichonumphida	Barbulanymphidae
			Hoplonumphidae
			Retractinymphidae
			Spirotruchosomidae
			Staurojoeninidae
			Teranymphidae
			Trichonymphidae
	Cristamonadea	Calonymohida	Calonymphidae
			Deltotrichonymphidae
		Devesconivida	Devezconividae
		Gigantomonadida	Gigantomonadidae
	Dientamoebae	Dientamoebida	Dientamoebidae
	Monocercomonadea	Monocercomonadida	Monocercomonadidae
	Simplicimonadea	Simplicimonadida	Simplicimonadidae
	Tritrichomonadea	Tritrichomonadida	Tritrichomonadidae
	Spirotrichonumphea	Cononymphida	Cononymphidae
		Holomastigotoidida	Holomastigotoididae
		Spirotrichonymphida	Brugerollinidae
			Fraterculidae
			Holomastigotidae
			Spirotrichonymphidae

Fonte: Adaptado de Boscaro *et al.*, 2024.

A maioria dos indivíduos deste grupo são simbióticos intestinais não-patogênicos ou até mesmo benéficos para alguns animais, porém em outros podem se comportar como parasitos, causando prejuízos. Raramente sendo encontrados em forma de vida livre (Cepicka *et al.*, 2006).

Possuem uma organela chamada hidrogenossomo que funciona como uma mitocôndria modificada, responsável pelo fornecimento de energia celular através da produção de adenosina trifosfato (ATP) de forma anaeróbica através da oxidação parcial do piruvato em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio (Tachezy, 2019).

A maioria dos parabasalídeos se reproduzem somente na forma assexuada por um processo mitótico denominado de “criptopleuromitose”, caracterizado pela persistência do envelope nuclear e a presença de um fuso mitótico extracelular (Noda *et al.*, 2012).

Possuem somente um núcleo, porém células multinucleadas já foram relatadas em algumas linhagens. São caracterizados por um arranjo particular do sistema mastigonte, responsável pela estrutura esquelética dos protistas: sistema pelta-axóstilo, sendo o axóstilo responsável por suportar o eixo da célula e participar da cariocinese, e o pelta como uma estrutura microtubular que suporta o canal flagelar e a presença de um corpo parabasal, um complexo de golgi compactado associado a fibras estriadas (Benchimol, 2010; Cepik *et al.*, 2017) (Figura 1).

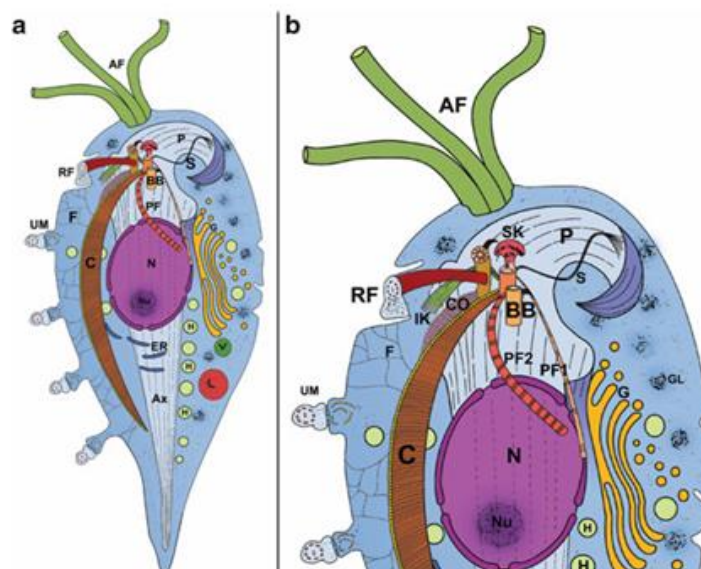


Figura 1: Esquema com a visão completa de *Tritrichomonas foetus* sendo (a) detalhes da região anterior (b) principais estruturas celulares e visão próxima do sistema mastigonte. AF flagelos anteriores, Ax Axóstilo, BB corpo parabasal, C costa, Co Pente, ER retículo endoplasmático, F filamentos conectados a costa à membrana plasmática, próximo ao flagelo recorrente; G Golgi; GL grânulos de glicogênio; H hidrogenossomos; IK filamento infra-cinetossômico; L

lisossomo; N núcleo; Nu nucléolo; P pelta; PF filamento parabasal; PF1 filamento parabasal número 1; PF2 filamento parabasal número 2; RF flagelo recorrente; S filamentos sigmóides; SK corpo supra-cinetossômico; UM membrana ondulante; V vacúolo.

Fonte: Benchimol (2010)

2.2 Infecção por *Tritrichomonas foetus* em gatos

Pertencem ao filo Parabasalia, classe Tritrichomonadea, ordem Tritrichomonadida, família Tritrichomonadidae e gênero *Tritrichomonas*, sendo a espécie *Tritrichomonas foetus* a responsável por causar diarreia em gatos domésticos (Boscaro *et al.*, 2024).

Assim como todo parabasalideo, *T. foetus* é um protozoário flagelado anaeróbio. Suas primeiras descrições foram como um patógeno venéreo bovino, colonizando vagina, útero e ovidutos. Existe também a espécie *T. suis*, sendo encontrado em cavidade nasal e trato digestivo de suínos (Felleisen, 1999). Em 1928, houve o primeiro relato de *T. foetus* em gatos, causando quadros de diarreia (Kessel, 1928). Sua primeira descrição no Brasil foi em 1922 (Da Cunha *et al.*, 1922).

Na espécie felina sua patogenicidade se dá através da infiltração de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos na lâmina própria de segmentos como íleo, ceco e cólon do trato gastrointestinal, causando colites do tipo linfoplasmocitária (Yaeger *et al.*, 2005). Outra possibilidade é que gera um prejuízo através de uma disbiose por competição (Bierlein *et al.*, 2021). Em um estudo por Sui *et al.* (2024), foi constatado que a infecção leva a alterações na composição da microbiota intestinal de gatos, causando disfunções. Em ambos os casos, a tricomoníase felina torna-se uma causa importante e emergente de quadros crônicos de diarreia em gatos em todo o mundo (Xenoulis *et al.*, 2013). Co-infecções também podem ser identificadas com outros enteropatógenos como o Coronavírus Felino, *Clostridium perfringens* e *Giardia intestinalis*, aumentando a gravidade da infecção e dificultando o manejo e cura clínica (Paris *et al.*, 2014)

Apesar de atualmente serem consideradas a mesma espécie acometendo bovinos e felinos, parecem exibir diferenças quando a especificidade do hospedeiro e sua patogenicidade, sugerindo, então, a ocorrência de dois genótipos distintos com adaptação ao hospedeiro alvo (Slapeta *et al.*, 2012). De acordo com Walden *et al.* (2013), quando regiões do gene ITS-1 de ambos os isolados são comparados, há uma diferença no sequenciamento. Com isso, há discussões que sugerem que o agente causador da tricomoníase felina não é *T. foetus*, e sim um organismo distinto denominado *T. blagburni*. Já de acordo com Morin-Adeline *et al.* (2014), ela enquadra ambos os genótipos com a mesma espécie, porém adaptada distintamente aos

diferentes hospedeiros. Foi notado trata-se de um caso único no qual o protozoário expande seu alvo parasitológico em diferentes hospedeiros mamíferos e, sob condições ambientais distintas - um em sistema urogenital, outro em sistema gastrointestinal, ambos os genótipos apresentam genes com divergência somente em nível molecular. Assim, sugerem-se que as estratégias de adaptação para as espécies estão focadas na regulação pós-transcrição, reguladas pelas condições dentro de cada nicho, variando, assim, os genes de virulência entre si.

Apresentam-se somente no estágio de trofozoíta, no qual são pequenos flagelados (10 a 25 µm comprimento e 3 a 15 µm de largura) (Yao *et al.*, 2015). Apresenta o corpo em formato de pêra, um núcleo, 3 flagelos anteriores e 1 posterior que percorre o corpo e forma uma membrana ondulante. Contém uma organela rígida que se estende ao longo do comprimento corporal e se projeta na extremidade posterior, chamada axóstilo (Wartona *et al.*, 1979). Apresentam um estágio transitório de invaginação dos flagelos, denominado pseudocistos, que possuem um papel importante em seu ciclo de transmissão, permitindo a sobrevivência do parasita em condições de estresse ambiental (Granger *et al.*, 2000). Neste estágio, não há envolvimento de parede cística nas células e ocorre uma forma atípica de mitose, no qual a célula continua replicando as estruturas citoesqueléticas e mastigontes, formando células multinucleadas. Quando o ambiente se torna favorável novamente, os flagelos são externalizados e novos trofozoítos surgem da célula multinucleada (Pereira-Neves *et al.*, 2009).

Seu ciclo biológico é do tipo monoxeno ou direto, sua reprodução assexuada, ou seja, se reproduzem através da fissão binária (Gookin *et al.*, 2017). A infecção ocorre via feco-oral através do contato direto entre os animais (Arranz-solís *et al.*, 2016).

Estudos indicam que o protozoário pode sobreviver durante períodos prolongados no ambiente em substratos orgânicos, mantendo seu potencial infeccioso e aumentando as chances de transmissão. Foi observada uma sobrevivência por 30 minutos quando expostos à água e ração seca, 120-180 minutos em comidas enlatadas para gatos, 180 minutos em urina. (Rosypal *et al.*, 2012). Já de acordo com Gookin *et al.* (2017), sua sobrevivência no ambiente pode ser reduzida 6 horas após sua eliminação. Em outro estudo, foi encontrado uma sobrevivência do trofozoíta em fezes úmidas por até 7 dias em temperatura ambiente de 23-24°C (Bastos *et al.*, 2019).

Não há indícios de predileções por sexo ou raça, porém parece ser uma infecção comumente encontrada em gatos mais jovens, não-vermifugados, não-imunizados e em ambientes de alta densidade populacional (Lavalle, 2018; Sui *et al.*, 2024).

É considerada uma enfermidade subdiagnosticada com uma prevalência que varia de 2 - 59% mundialmente (Gookin *et al.*, 2017). A distribuição da tricomoniase felina é ampla,

cobrindo os quatro continentes geográficos. Houveram relatos de casos na Europa - Áustria (Mostegl *et al.*, 2012; Steiner *et al.*, 2007), Finlândia (Castrén *et al.*, 2011), França (Profizi *et al.*, 2013), Alemanha (Kuehner *et al.*, 2011; Schrey *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2007), Grécia (Xenoulis *et al.*, 2010), Itália (Holliday *et al.*, 2009; Mancianti *et al.*, 2015; Mugnaini *et al.*, 2012), Holanda (Van Doorn DC *et al.*, 2009), Noruega (Dahlgreen *et al.*, 2007; Tysnes *et al.*, 2011), Polônia (Hensinger, 2009), Espanha (Miro *et al.*, 2011), Suécia (Forshell *et al.*, 2010), Suíça (Burgener *et al.*, 2010; Frey *et al.*, 2009) e Reino Unido (Gunn-Moore *et al.*, 2007; Gunn-Moore *et al.*, 2007; Mardell *et al.*, 2006; Paris *et al.*, 2014), América do Norte - Canadá (Hosein *et al.*, 2013; Pham, 2009) e Estados Unidos (Foster *et al.*, 2004; Gookin *et al.*, 1999; Gookin *et al.*, 2006; Gookin *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2010; Kather *et al.*, 2007; Polak *et al.*, 2014; Queen *et al.*, 2012; Rosado *et al.*, 2007; Stockdale *et al.*, 2009; Xenoulis *et al.*, 2013; Yaeger *et al.*, 2005), Oceania - Austrália (Bell *et al.*, 2010; Bisset *et al.*, 2008; Bisset *et al.*, 2009) e Nova Zelândia (Kingsbury *et al.*, 2010) e Ásia - Japão (Doi *et al.*, 2012) e Coreia do Sul (Lim *et al.*, 2010).

No Brasil existem poucos relatos e estudos acerca do parasito. O relato de caso clínico pioneiro em um gato sintomático publicado no país foi em 2017, no estado de São Paulo, como pioneiro na América do Sul (Hora *et al.*, 2017). No Rio de Janeiro, de acordo com Carrasco (2016), de 100 gatos avaliados com diarreia, em 10% foi encontrado o protozoário. Também no mesmo estado foi relatado um caso de uma co-infecção de *T. foetus* e *Pentatrichomonas hominis* em fezes de um gato assintomático (Santos *et al.*, 2015).

Como sinais clínicos temos principalmente a diarreia, observada em 98% dos gatos em um estudo retrospectivo de 104 casos, que teve uma duração média de 135 dias. Destes, 59% dos gatos apresentavam diarreia desde o momento da adoção. Quanto a consistência, havia uma variação entre moles (42%), aquosas (34%) e variando entre as duas formas (24%). Também foi constatado presença de hematoquezia (46%), tenesmo (43%) e presença de muco (59%). Outros sinais apresentados incluem a anorexia (22%), apatia (24%), perda ou dificuldade de ganho de peso (20%), vômitos (19%), dor abdominal (9%) e aumento do apetite (3%) (Xenoulis *et al.*, 2013). Porém, *T. foetus* já foi identificado em amostras fecais de gatos clinicamente saudáveis, demonstrando estar presente em cerca de 21,2% de 52 amostras obtidas na Noruega (Tysnes *et al.*, 2011).

Tritrichomonas foetus não consegue ser detectado em análises fecais de rotina como flotação por centrifugação devido às soluções supersaturadas poderem lisar o parasito. As

amostras precisam ter sido recém eliminadas para diagnóstico e não sobrevivem a refrigeração (Gookin *et al.*, 2017; Gunn-Moore *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2015).

Existem três principais métodos diagnósticos: exame parasitológico direto, cultura do protozoário ou teste de reação em cadeia de polimerase (PCR).

O exame direto é considerado o menos sensível, com taxas de diagnóstico entre 2,6 a 14%. Ele é feito com amostras úmidas de fezes em solução salina, observando a presença ou não de trofozoítas móveis de *T. foetus* em um microscópio óptico (Gookin *et al.*, 2004; Holiday *et al.*, 2009; Tysnes *et al.*, 2011). Além disso, outro fator que contribui para a dificuldade de diagnóstico por meio deste método é devido às similaridades das manifestações clínicas e aparência na microscopia óptica com os protozoários *G. intestinalis* e *T. foetus*. Ambas as doenças se tratam de protozoários com a sua forma infectante como trofozoítas flagelados. Porém, quando corados por métodos de coloração rápida, podem demonstrar diferenças: *T. foetus* apresenta apenas um núcleo, uma membrana ondulatória ao longo do organismo, três flagelos anteriores e um posterior. Já a *G. intestinalis* apresenta dois núcleos e quatro pares de flagelos (Lavalle, 2018).

Quando existe suspeita da infecção por estes protozoários a inoculação de amostras fecais frescas em meio de cultura pode ser uma alternativa. Atualmente existem alternativas para o cultivo de *T. foetus*, sendo eles:

- Um kit comercial (“InPouch™ TF-Feline Biomed Diagnostics”) no qual são fornecidas bolsas com meio de cultura para testes individuais que permitem, após o crescimento do protozoário, a visualização dos trofozoítos através da microscopia óptica. É necessário a inoculação de somente 0,05 g de amostra fecal, selando a bolsa e mantendo-a em posição vertical a cerca de 37 °C. A sensibilidade deste método está entre 55 - 58,8% (Gookin *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2015).
- O meio diamond se mostrou tão eficiente quanto ao meio “InPouch™ TF-Feline Biomed Diagnostics” quando exposto à condições climáticas e de transporte adequadas (Bryan *et al.*, 1999). Amostras para o diagnóstico devem ser diluídas na solução Hanks. Após, devem ser incubadas a 28 - 33°C, examinadas com intervalos de 48 horas e inoculadas ao meio específico Diamond, incubadas a 35 - 37°C e cultivadas em intervalos de 72 horas (Hanks *et al.*, 1949; Santos *et al.*, 2015)
- O meio lactopep pode ser utilizado como meio de transporte e cultivo para *T. foetus* e se mostrou eficaz na replicação do protozoário frente a outros meios. Desta fórmula, porções de 10 mL devem ser acondicionadas em tubos de ensaios previamente

esterilizados, inoculando a amostra e adicionando 0,5 mL de vaselina líquida estéril na superfície para garantir a anaerobiose. Os tubos devem ser mantidos em estufa com temperatura controlada de 36 °C. Após 24h, as amostras devem ser analisadas e inoculadas em meios específicos para *T. foetus*. A fase de declínio do crescimento do protozoário foi observada após 72 horas e a média de crescimento satisfatória durante sete dias. Como vantagem, é um meio que pode ser manuseado com segurança, podendo ser recomendado mesmo com chances de contaminações de outros produtos orgânicos como fezes, sangue e urina (Lopes *et al.*, 1996).

Por último, temos a PCR, que é considerado o método mais sensível para diagnóstico deste protozoário (Hedgspeth *et al.*, 2020). Possui uma sensibilidade analítica de 10 organismos de *Trichostrongylus axei* por 100 g de amostra fecal, além de também conseguir identificar tanto organismos vivos quanto mortos, sendo o mais indicado para um diagnóstico mais preciso (Gookin *et al.*, 2017; Stauffer *et al.*, 2008).

Dentro da técnica, existem três tipos: o PCR convencional, PCR em tempo real e Nested PCR. A PCR em tempo real é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA de *T. foetus* e demonstrou melhorias na sensibilidade e especificidade da técnica frente ao método convencional, além da vantagem da possibilidade de uma análise quantitativa, determinando cargas parasitárias (McMillen *et al.*, 2006; Hafez *et al.*, 2005). Em um estudo inoculando o protozoário em meio salino ou após incubação de microrganismos em meios de cultura, entretanto, foram demonstrados resultados desfavoráveis quando utilizadas amostras com contaminações bacterianas, prejudicando a integridade do DNA necessário para a metodologia (Clothier *et al.*, 2015).

Ensaio em formas de painéis também são comumente utilizados na prática clínica. Em um estudo que avaliou o PCR em tempo real “tandem multiplex” demonstrou uma sensibilidade de 41,9% e especificidade de 100% para o DNA de *T. foetus*, sendo um ensaio adequado para detecção da infecção em cargas moderadas a altas do parasita (Meggiolaro *et al.*, 2019).

Existem estudos que descrevem uma maior sensibilidade do PCR convencional frente ao método em tempo real. Para otimizar a sensibilidade, sugere-se a realização do “Nested PCR”, que aumenta o limite de detecção do DNA após uma primeira amplificação de produtos. Utilizando somente o PCR convencional, foi observado um limite de detecção de 10 organismos por 200 mg de fezes, enquanto no Nested PCR o limite de detecção foi de um organismo para a mesma quantidade. Como desvantagem, o método está mais disposto a erros devido às múltiplas etapas, além de exigir mais tempo. (Gookin *et al.*, 2002; Hafez *et al.*, 2005)

Como primers para o PCR convencional, os mais utilizados tanto *T. foetus* quanto *P. hominis* são o primers TRF1 (5'-TGCTTCAGTT-CAGCGGGTCTTCC-3') e TRF2 (5'-CGGTAGGT-GAACCTGCCGTTGG-3'), que demonstraram uma boa conservação do material genético em todos os isolados. Foi descrito como um primer para a ordem Trichomonadida. Desta forma, são amplificadas sequências específicas de genes da porção 5.8S rRNA e regiões internas laterais, ITS1 e ITS2 (Riegler, 2016).

Em estudos de sequenciamento de *T. foetus* bovino, o gene 5.8S rRNA para os primers TRF1 (5'-TGCTTCAGTT-CAGCGGGTCTTCC-3') e TRF2 (5'-CGGTAGGT-GAACCTGCCGTTGG-3') foram bem conservados em todos os isolados. O produto da PCR gerado pode ser utilizado para diferenciar os parabasalídeos, tendo como diferencial entre as espécies o número de pares de bases (pb). Para *T. foetus* são amplificados 372 pares de base (Felleisen *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 2003). Como limitações, destacam-se muitas vezes amplificações inespecíficas de outras espécies do gênero, sendo necessário utilizar iniciadores gênero-específicos através de um Nested-PCR para otimização da técnica (Fernandes *et al.*, 2008).

Para um melhor diagnóstico de *T. foetus*, foram desenvolvidos os primers TRF3 (5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACA-GAACC-3') e TRF4 (5'-CCTGCCGTTGGAT-CAGTTTCGTAA-3'), que amplificam segmentos específicos para a espécie entre as regiões conservadas na extremidade 3' do gene 18S rRNA e na extremidade 5' do gene 28S rRNA (Hayes *et al.*, 2003).

De acordo com Stauffer (2008), uma extração de DNA de boa qualidade pode ser um desafio devido a extração simultânea de inibidores de PCR, que são influenciados pela dieta, flora intestinal e doenças concomitantes do animal.

Para a extração do DNA de amostras fecais de gatos, o kit ZR Fecal DNA MiniPrep™, Zymo Research se mostrou o mais eficaz e rápido frente a outras técnicas de acordo com Dabrowska (2022) e Stauffer (2008), conseguindo amplificar a partir de 10 organismos de *T. foetus* para cada 100 mg de fezes em todas as reações de PCR analisadas.

2.3. Infecção por *Pentatrichomonas hominis* em gatos

Pertencem ao filo Parabasalia, classe Trichomonadea, ordem Trichomonadida, família Trichomonadidae e gênero *Pentatrichomonas* (Boscaro *et al.*, 2024). São protozoários flagelados que possuem como características morfológicas o formato piriforme, quatro flagelos anteriores, um flagelo independente, um flagelo recorrente e uma membrana ondulatória. O

flagelo independente dá origem a outros quatro flagelos anteriores, que são separados pelo pelta. O axóstilo percorre todo o comprimento do corpo celular. Realizam a reprodução por fissão binária e possuem hidrogenossomos como fornecedores de energia celular de forma anaeróbica (Li *et al.*, 2014), conforme ilustrado na Figura 2. Existem somente na forma de trofozoíta e não produzem cistos, não sobrevivendo longos períodos no ambiente. Sua transmissão ocorre via feco-oral. O risco de transmissão zoonótica ainda permanece indefinido, mas parece ser baixo. (Romatowski, 2000)

Abriga o sistema gastrointestinal de diversos animais vertebrados como humanos, cães e gatos. (Wenrich *et al.*, 1944). Inicialmente entendida como um protozoário comensal, atualmente passou a ser descrita como um parasita com potencial risco zoonótico e causador de quadros de diarreia. (Dogan *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2010). Em humanos, foi detectado *P. hominis* em aproximadamente 1% dos casos de diarreia crônica, porém, nestes casos, normalmente o protozoário estava associado com outros parasitas intestinais. A importância de *P. hominis* como um patógeno primário em gatos é questionável e ainda pouco relatado, mas geralmente é identificado em quadros de diarreia crônica. (Romatowski, 1996; Romatowski, 2000; Bastos *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2015; Levy *et al.*, 2003). Porém, existem relatos da infecção associada a *T. foetus* em animais assintomáticos (Santos *et al.*, 2015).

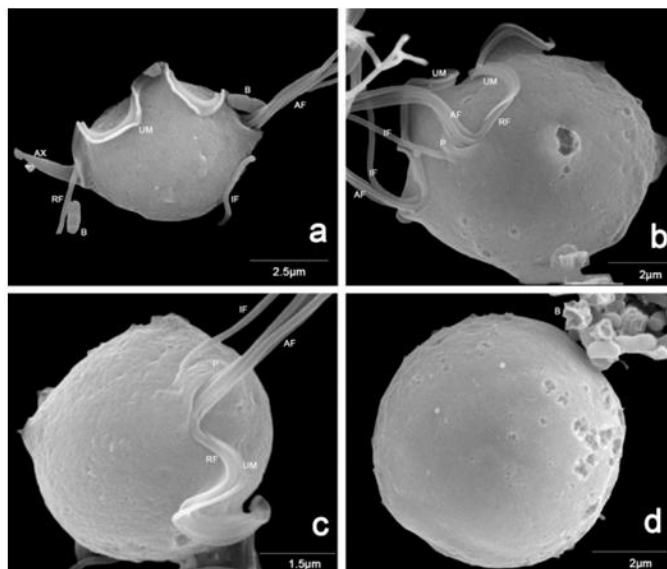


Figura 2. Observação morfológica de *Pentatrichomonas hominis*, sendo AF os 4 flagelos anteriores, IF flagelo independente, UM membrana ondulatoria, RF flagelo recorrente, P pelta, AX axóstilo.

Fonte: Li *et al.*, 2014

Para o diagnóstico, as metodologias mais utilizadas são o exame parasitológico direto e cultura fecal. Porém, em ambos os métodos, a distinção entre *T. foetus* e *P. hominis* é

difícil, já que ambas as espécies apresentam morfologias e tipo de motilidade semelhantes, além de crescerem nos mesmos meios de cultura. (Bastos *et al.*, 2018). Devido a isso, como um método diagnóstico mais preciso, a realização da PCR é mais adequada através de primers específicos (Th3 e Th5), desenhados para amplificar uma sequência de 339 pares de base do gene 18S rRNA. (Crucitti *et al.*, 2004; Gookin *et al.*, 2017).

Outros pares de primers que podem ser utilizados são os TRF1 e TRF2, que amplificam sequências específicas de genes da porção 5.8S rRNA e regiões internas laterais, ITS1 e ITS2 (Riegler, 2016). O produto da PCR gerado pode ser utilizado tanto para *T. fetus* quanto *P. hominis*, tendo como diferencial entre as espécies o número de pares de bases (pb). Para *P. hominis* são amplificados 338 pb (Felleisen, 1997; Hayes *et al.*, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização da Experimentação

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), Laboratório Multiusuário e Biologia Molecular (Biomol), pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no Convênio EMBRAPA, Sanidade Animal/UFRRJ e no Laboratório de Fisiopatologia e da Reprodução, no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DeptRAA) no Instituto de Zootecnia (IZ) da UFRRJ.

3.2. Aprovação na Comissão de Ética

Todo o estudo foi conduzido seguindo as diretrizes e recomendações de boas práticas clínicas descritas nos guias da Associação Americana de Profissionais de Felinos e Sociedade Internacional de Medicina Felina (Rodan *et al.*, 2022) e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IV/UFRRJ sob número de protocolo de 1214220224. Além disso, todos os tutores que participaram do estudo assinaram um termo de livre consentimento antes de qualquer procedimento ser realizado nos animais.

3.3. Obtenção das amostras

As amostras de fezes foram obtidas de gatos domésticos (*Felis catus*) de residências de tutores que se localizam na região metropolitana do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro, Região Sudestes, Brasil, oriundas de residências ou em clínicas veterinárias que prestam atendimentos especializados para gatos.

As fezes foram coletadas pelos tutores ou médico veterinário responsável, diretamente de caixas sanitárias utilizadas pelos animais. A coleta foi realizada em no máximo seis horas após a eliminação. Para a coleta, não foi necessário a manipulação do animal e estas amostras foram acondicionadas em um frasco coletor de fezes, sem conservantes, e mantidas em temperatura ambiente (27 a 33°C).

3.4 Cultura dos protozoários *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis*

As amostras coletadas foram mantidas em temperatura ambiente e não foram refrigeradas até a inoculação no meio de cultura. Para o meio de transporte, foi utilizado 10 mL de meio Lactopep, composto por leite em pó (40 g), peptona bacteriológica (8 g), pentabiótico veterinário (1 g), NaCl (8,5 g), soro bovino (100 mL) e água destilada (900 mL) em tubos de polipropileno de 15mL. Foram adicionadas 0,5 g de fezes, homogeneizadas e, após, mantidas em uma estufa em temperatura 33°C. Foi feita a leitura deste meio em 24, 48 e 72 horas, a fim de verificar a presença ou ausência de trofozoítas de *T. foetus* ou *P. hominis*. Após, uma porção da solução seria inoculada no meio Diamond (Diamond, 1957). Todos os tubos foram identificados com o código de identificação respectivo de cada animal.

3.5 Preparo das Amostras para Realização das Análises Moleculares

Foram confeccionados tubos de polipropileno de 15 mL com 10 mL de Tampão de Fosfato Salino (PBS), composto por uma mistura de 0,24 g de fosfato de sódio bibásico, 0,33 g de fosfato de monobásico e 8,5 g de cloreto de sódio junto com 1 litro de água destilada em um pH entre 7,2 e 7,4, em sequência encaminhado para autoclavagem. Em sequência, foi adicionado 1 grama de fezes frescas. A mistura foi agitada com o agitador de tubos tipo vortex (Fisatom, modelo 772) até homogeneização completa e separado de 2 em 2 mL, em 4 microtubos de 2 mL e submetido, em uma velocidade de 15.300 rotações por minuto (rpm) em 5 minutos, a centrifugação. Após, foi descartado o sobrenadante e congelado o precipitado em um volume de 200 mg.

3.6. Preparo dos controles da extração

Foram confeccionadas amostras controles para serem utilizadas durante a extração, a fim de detectar a eficiência da extração e detectar possíveis contaminações durante o processamento. Para isso, foi selecionada uma amostra de fezes de um gato comprovadamente negativo para *T. foetus* e *P. hominis*. Desta amostra, foi separada a alíquota de 1 grama e passado pelo mesmo procedimento descrito acima (item 3.5) para preparo de amostras para realização de análises moleculares. Parte destas amostras foram congeladas para serem utilizadas como controle negativo dos testes.

A outra parte dessas amostras foi utilizada para confeccionar os controles positivos do testes, esses constituíam da amostra comprovadamente negativa, contaminada com diferentes concentrações de células de *T. foetus*.

Para isso, a partir de uma cultura celular de *T. foetus* mantida no Laboratório de Fisiopatologia e da Reprodução, no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DeptRAA) no Instituto de Zootecnia (IZ) da UFRRJ, foi preparada uma diluição em PBS até que a concentração final fosse a de 3×10^6 células de *T. foetus*. Em seguida, foi submetido a centrifugação a 10.000g durante 2 minutos, descartado o sobrenadante, adicionando 10 mL de PBS e gerando uma concentração de 3×10^5 células por mL. Desta solução, foram confeccionadas amostras controles em duas concentrações distintas. Primeiro foi acrescentado 1 mL da solução de 3×10^5 células/mL nos 200 mg de fezes, homogeneizado com vórtex (Fisatom, modelo 772), centrifugado por 2 minutos na velocidade de 10.000g e descartado o sobrenadante (controle positivo com 3×10^5 células de *T. foetus*). Em outros tubos, foram acrescentados 10 µL da solução de 3×10^5 células/mL junto com 990 µL de PBS em temperatura ambiente (37°C) nos 200mg de fezes, homogeneizado com vortex (Fisatom, modelo 772), centrifugado por 2 minutos na velocidade de 10.000g e descartado o sobrenadante (controle positivo com 3×10^3 células de *T. foetus*).

3.7 Extração do Ácido Desoxirribonucleico

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras foi realizada por meio do kit “Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit” da Zymo Research. Ele foi projetado para isolamento livre de inibidores de DNA de fezes de uma ampla variedade de espécies e amostras de solo.

Foi utilizada uma quantidade de 150 mg de fezes e adicionado diretamente a um tubo de lise “ZR BashingBead”. Foi acrescentado 750 µL da solução “BashingBead Buffer”, levando a um homogeneizador (Biospec, mini BeadBeater-16), sendo realizada a primeira etapa de lise celular em cinco ciclos de um minuto com cinco minutos de descanso em banho de gelo entre elas. Após, as amostras foram centrifugadas em uma microcentrífuga (TOMOS, modelo Multistar 21) na velocidade de 10.000 g durante um minuto.

Em seguida, uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi depositada em um filtro denominado “Zymo-Spin III-F” dentro de um tubo coletor e centrifugado na velocidade de 8.000 g durante um minuto. Após a centrifugação, o conteúdo foi depositado no tubo de coleta

abaixo do filtro. Em seguida foi acrescentado 1.200 µL de um “Tampão de Lise Genômica” neste tubo de coleta e homogeneizado junto com o filtrado.

Foi transferido em duas etapas 800 µL do conteúdo homogeneizado para uma coluna denominada “Zymo-Spin IICR” junto com um novo tubo de coleta, centrifugado entre as etapas na velocidade de 10.000 g durante um minuto. Após, foi acrescentado 200 µL de um tampão de pré-lavagem do DNA no “Zymo-Spin IICR” junto com um novo tubo de coleta. Em sequência foi feita mais uma centrifugação na velocidade de 10.000 g durante 1 minuto, acrescentado 500 µL do tampão de lavagem do DNA e centrifugando novamente a 10.000 g durante 1 minuto. A coluna “Zymo-Spin IICR” foi depositada em um microtubo limpo de 1,5 mL e adicionado 100 µL do tampão de eluição do DNA diretamente na matriz da coluna, centrifugado a 10.000 g durante um minuto. Desta forma, o DNA eluído foi encontrado no microtubo de 1,5mL.

Em uma etapa adicional, foi colocado um filtro “Zymo-Spin III-HRC” em um novo tubo de coleta e adicionado 600 µL de uma solução de preparação e centrifugado a 8.000 g durante três minutos. Esse filtro foi depositado em um microtubo limpo de 1,5 mL e o DNA eluído transferido para o mesmo, centrifugado a 16.000 g durante três minutos. Após, o DNA filtrado se tornou adequado para ser submetido ao exame de PCR em um volume total de 100 µL, sendo congelado a uma temperatura de -20 a -18°C.

3.7 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase para *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis*

Os experimentos iniciais utilizaram o par de primers TFR1 e TFR2 (Felleisen, 1997), que foram projetados para amplificar especificamente uma região dentro do cistron de RNA ribossomal (18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA) de parabasalídeos da ordem Trichomonadida. No caso de *T. foetus*, esses primers geram um amplicon de 372 pb, enquanto para *P. hominis*, produzem um amplicon de 338 pb. (Quadro 2) No entanto, uma análise inicial de 40 amostras fecais revelou que o ensaio empregando estes primers resultava na produção de múltiplos amplicons inespecíficos de tamanhos variados, tornando impossível a identificação precisa das sequências dos possíveis parabasalídeos.

Para resolver esse problema, dois novos pares de primers foram projetados: “Foetus ExtF/ExtR” (específico para *T. foetus*) e “Penta ExtF/ExtR” (específico para *P. hominis*). Esses primers também foram desenhados para se anelarem a regiões dos cistrons de RNA ribossomal de parabasalídeos da ordem Trichomonadida, porém em regiões localizadas externas aos sítios

de ligação dos primers TFR1/TFR2. Essa modificação resultou em dois ensaios com a produção de amplicons específicos de 516 pb para *T. foetus* e 489 pb para *P. hominis*.

As temperaturas de anelamento e as concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂) para os novos ensaios foram otimizadas, e as especificidades e sensibilidades analíticas dos ensaios foram determinadas utilizando DNA controle derivado de culturas de *T. foetus* (cepa K) *foetus* cepa K isolada por Dr. H. Guida, (Embrapa, Rio de Janeiro, Brasil) do trato urogenital de um touro e de uma cepa de *P. hominis* também isolado de um bovino (Silva *et al*, 2022).

A possibilidade de combinar os dois pares de primers em um ensaio duplex foi investigada e considerada bem-sucedida. Além disso, a possibilidade de utilizar os produtos do ensaio duplex como moldes em um ensaio de PCR nested foi avaliado. No ensaio nested, os primers originais TFR1 e TFR2 foram usados como primers internos, e essa abordagem também se mostrou viável, gerando produtos de 372 pb para *T. foetus*, 338 pb para *P. hominis* e ambos os produtos em casos de coinfeção. Posteriormente, todas as amostras fecais foram analisadas utilizando o método de PCR duplex/nested.

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

Nome	Sequência	Tamanho do Produto
TFR1	5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3'	<i>T. foetus</i> 372 pb
TRF2	5'-CGG TAG GTC AAC CTG CCG TGG G- 3'	<i>P. hominis</i> 338 pb
Foetus ITS ExF	5'GGTGAAATTATCGG ACCTTGCG-3'	516 pb
Foetus ITS ExR	5' CTCTACTCTCTTCGGT CGCAC-3'	

Penta ITS ExF	5'TGAATACGACCCTG CCCTTT-3',	489 pb
Penta ITS ExR	5'TCCTCCGCTTATTGA GATGCT	

As condições foram otimizadas para cada par de *primers*. Para os iniciadores TFR1/ TFR2 utilizou-se as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, a 94°C por 30 segundos; anelamento a 66,5°C por 15 segundos; extensão a 72°C por 15 segundos, acompanhando 30 ciclos com extensão final a 72°C por 5 minutos. Para o ensaio duplo com os primers Foetus ExtF/ExtR junto com e Penta ExtF/ExtR, as condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, a 95°C por 20 segundos; anelamento a 67 °C por 15 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos, acompanhando 40 ciclos com extensão final a 72°C por 5 minutos.

As reações foram preparadas utilizando-se 2µL de DNA como molde; 1X tampão de reação; 200µM de cada dNTP, 1,5mM ou 2,0 mM de MgCl₂ (com os primers TFR1/TRF2 e Foetus ExtF/ExtR junto com e Penta ExtF/ExtR respectivamente), 10pmol de cada primer e 0,5 unidades de Platinum Taq polimerase (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 12,5 µL.

Em todas as reações de PCR realizadas foram incorporados dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA teste foi substituído pela mesma quantidade de água, sendo adicionada ao tubo no ambiente no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reações individuais. Este controle, denominado água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais e foi sempre o último a ser preparado. Deste modo, o controle, que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação.

Para análise da amplificação resultante, um total de 5 µl do produto final de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5%), utilizando o tampão de corrida Tris-Acetato EDTA (TAE) (0,5x = 20 mM Tris base; 10 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA – pH8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 40 min. A determinação dos tamanhos do produto foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Scientific). Os géis foram corados por submersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observados e digitalmente registrados em transiluminador. O volume sobressalente de cada reação foi estocado a -20 °C para análises moleculares posteriores conforme descrito a seguir.

3.7.1 Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP)

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos do tamanho esperada foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Primeiro foi feita uma análise de digestão *in silico* empregando o programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA) utilizando-se sequências previamente depositadas no Genbank de *T. foetus* e *P. hominis*. Após análise pelo programa, foi escolhida uma enzima (*HhaI*) que produziria perfis de digestão distintos, para os amplicons derivados de *T. foetus* e *P. hominis*. Os produtos de PCR gerados com os iniciadores TFR1 e TRF2, foram digeridos utilizando 2 unidades de enzimas de restrição *HhaI* (Thermo Fisher Scientific) a 37°C por 2 horas.

Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) (44,5mM Tris base; 44,5 mM borato; 1 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 120 minutos. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR. Objetivando melhor predição do tamanho dos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Fisher Scientific).

3.7.2 Sequenciamento dos Produtos da PCR

O sequenciamento dos amplicons foi executado da seguinte forma: 10µl dos produtos da PCR foram tratados com ExoSap-IT (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante e sequenciados em ambas direções empregando os iniciadores de amplificação (=TFR1/TFR2) pelo uso de Big Dye Ready Reaction mix V3.1 (ABI Corp, EUA). Os produtos das reações foram analisados através do Analisador genético automatizado modelo 3500 (ABI Corp). O alinhamento das sequências foi feito usando o programa *Sequencer* (Version 5.4.6, 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”.

3.7.3 Confirmação pela PCR para *Cyniclomyces* spp.

Foi realizada a detecção molecular da levedura *Cyniclomyces* spp. nas amostras positivas em microscopia a fim de confirmação do diagnóstico usando dois ensaios de PCR. Todas estas amostras foram consideradas com uma alta carga parasitária de *Cyniclomyces* spp.

O primeiro ensaio teve como alvo um fragmento de 650 pb da região D1/D2 do gene que codifica a grande subunidade 26S rRNA. A PCR empregou 2µL de DNA; 1X tampão de reação; 200µM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 20 pmol de cada primer (NL1 - 5'-TGCTGGAGCCATGGATC-3' e NL4 -5'-AACGGCTTCGACAACAGC-3') e 0,5U de Go Taq G2 Flexi DNA polimerase (Promega) em um volume final de 25 µL. O programa de ciclagem foi composto das seguintes etapas; uma fase de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos (94°C por 35 segundos, 52°C por 20 segundos, 72°C por 20 segundos), e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A determinação dos tamanhos dos produtos foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific).

A segunda PCR foi projetada para amplificar um fragmento de 631 pb do gene que codifica a subunidade 1 da enzima RNA polimerase II (RPB1), de *C. guttulatus* usando os primers RPB-F1 (5'-GGT TGG GAT TCG ATG AAG AG -3') e RPB-R1 (5'-

TTC CAA CCG TAC TGC AAC TG -3'). A PCR empregou 2µL de DNA como molde, 1X tampão de amostra; 200µM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 20 pmol de cada primer e 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase em um volume final de 12,5µL. As condições de ciclagem foram: uma fase de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos 94°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.7.4 Confirmação pela PCR para *Toxocara* spp

Foi realizada a detecção molecular do nematoide *Toxocara* spp. nas amostras positivas em microscopia a fim de confirmação do diagnóstico usando um ensaio de PCR, que teve como alvo um fragmento de 426 pb do gene *cox1* com base nas sequências AJ920057, AM411108 e NC010527 do Genbank. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20µL usando 1 µL de DNA molde, 4 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer (ToxCoIF 5'-GATTTTACCTGCTTTTGGTATTATTAG-3' e ToxCoIR 5'-CCAAAGACAGCACCCAAACT-3'), 2,5 mM de MgCl₂ e 1U de polimerase Taq Hot Start. As condições de ciclagem foram: 95 °C por 15 minutos, 95 °C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram corados com GelRed® e visualizados após eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Todas as 5 amostras foram amplificadas e identificadas como *Toxocara* spp. por sequenciamento. Outras 3 amostras, negativas por microscopia, mas positivas para a presença de *T. foetus*, foram identificadas como *Toxocara* spp. através do mesmo ensaio de PCR totalizando, assim, 8 amostras positivas.

3.8 Perfil Epidemiológico

3.8.1 Coleta de dados para fatores de risco.

Durante as coletas foi preenchido um formulário para controle individual de cada animal, que recebiam um código de identificação seguindo a ordem numérica crescente de inclusão ao estudo. Foram coletados dados referentes aos animais, como: sexo, raça, idade, doenças pré-existentes, tratamentos concomitantes, tipo de água oferecida aos animais, tipo de

alimentação fornecida, histórico de vacinação e vermifugação, se os animais possuíam acesso a rua, existência e qual tipo de contactantes (Quadro 3).

Para a idade os animais foram classificados de acordo com o “AFP–AAHA Feline Life Stage Guidelines” (Quimby *et al.*, 2021) onde os animais foram classificados em: filhotes (0 - 1 ano); adulto jovem (1 - 6 anos); gato maduro (7 - 10 anos); sênior (> 10 anos).

Foram perguntadas informações como consistência, coloração (amarelada, marrom ou avermelhada) e volume de fezes (pequeno volume ou grande volume), evolução do quadro clínico em casos de diarreia, frequência de defecação. As fezes foram classificadas quanto a sua consistência em líquidas, pastosas, normais e ressecadas de acordo com a metodologia adaptada por da Silva *et al.* (2023) do trabalho de German *et al.*, (2017). Os quadros de diarreia foram classificados em agudos (duração menor que 15 dias) e crônico (duração maior do que 15 dias) de acordo com a classificação adotada por Suchodolski *et al.* (2015).

Quadro 3. Formulário para controle individual e coleta das informações para avaliação dos fatores de risco de cada animal incluído no estudo

Código da Amostra:	Nome do Gato:	Idade:	Sexo: () M () F	Raça:
Nome do tutor:_____ Endereço:_____ Histórico:_____				
Consistência das fezes: ☐ Líquidas ☐ Pastosas ☐ Macias e com formato ☐ Secas	Coloração: ☐ Amarelada ☐ Marrom ☐ Pretas ☐ Avermelhada	Em caso de diarreia, há quanto tempo apresenta quadro clínico? ☐ Aguda (Menos de 2 semanas) ☐ Crônica (Mais de 2 semanas) ☐ Contínua (3 semanas ou mais)	Volume de fezes: ☐ Pequeno ☐ Grande	
Frequência de defecação ☐ Menos de 1 vez ao dia ☐ 1 a 2 vezes ao dia ☐ Mais de 2 vezes ao dia	Tipo de alimentação: ☐ Somente ração seca ☐ Ração Seca e rações úmidas ☐ Somente rações úmidas ☐ Alimentação natural Quais marcas? _____	Tipo de água ofertada: ☐ Mineral ☐ Filtrada ☐ Torneira comum ☐ Fervida	Tem alguma doença diagnosticada? ☐ Sim. Qual/Quais?_____ ☐ Não	
Faz uso diário de algum medicamento? ☐ Sim. Qual/Quais?_____ ☐ Não	Já foi vermifugado (a) anteriormente? ☐ Sim. Última dose: _____ Qual medicamento? _____ ☐ Não	Já foi vacinado(a)? ☐ Sim. Qual/Quais? _____ Última dose: _____ ☐ Não	Tipo de moradia: ☐ Casa ☐ Apartamento ☐ Vida livre	
Tem acesso a rua? ☐ Sim ☐ Não	Usa areia sanitária? ☐ Sim ☐ Não	Frequência de limpeza da caixa de areia: ☐ Mais de uma vez ao dia ☐ Uma vez ao dia ☐ Menos que uma vez ao dia ☐ Uma vez na semana ☐ Menos que uma vez na semana	Possui outros animais? ☐ Sim Quais espécies? _____ ☐ Não	

Fonte: Adaptação de Carrasco (2016).

3.8.2. Técnicas Coproparasitológicas Utilizadas

Para avaliar a presença outros parasitos nas fezes dos gatos incluídos neste estudo, foram utilizadas três técnicas coproparasitológicas: centrífugo flutuação em sacarose, centrífugo flutuação em sulfato de zinco e esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Nielsen modificada. Todos os exames foram realizados no setor de Diagnóstico em Parasitologia Animal do LQEPV pertencente ao DPA/ IV/UFRRJ.

- A técnica de Centrífugo-flutuação simples (CFS) (Sloss *et al.*, 1999) teve como objetivo pesquisar ovos leves de helmintos, oocistos e cistos de protozoários. Para isto, foram dissolvidas 2 gramas de fezes em 15mL de água em um recipiente de polipropileno com volume de 250mL. Após, foi separado um recipiente com uma peneira depositada acima junto com uma gaze, sendo peneirada a solução preparada previamente. A suspensão foi colocada em um tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Sobrenadante foi descartado e completado o volume total até os 15 mL com uma solução saturada de açúcar, sendo novamente homogeneizada e centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. Após, completou-se com uma solução saturada de açúcar até formar um menisco convexo no tubo, depositando uma lamínula acima do mesmo. Após deixar em repouso por 10 minutos, foi colocada a lamínula em uma lâmina e examinado em um microscópio óptico em objetiva de 10x ou 40x.

- A técnica de centrifugação em solução saturada de zinco a 33% (técnica de Faust) (Faust *et al.*, 1939) teve como objetivo a pesquisa de cistos de *G. intestinalis*. Para isto, foram dissolvidas 3 gramas de fezes em 15 mL de água em um recipiente de polipropileno de 250mL. Após, foi separado um novo recipiente com uma peneira depositada acima junto com uma gaze, sendo peneirada a solução preparada previamente. A suspensão foi colocada em um tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugadas a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 1 minuto. Foi desprezado o sobrenadante, adicionado água até completar novamente o volume de 15 mL, homogeneizado amostra em um agitador tipo vortex (Fisatom, modelo 772) e centrifugado novamente a 2500rpm durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se a solução de sulfato de zinco a 33%, homogeneizando e centrifugado a 2500 rpm durante 1 minuto. Após, completou-se o tubo com a mesma solução de sulfato de zinco a 33% até formar um menisco convexo e depositado lamínula acima do mesmo. Após deixar em repouso por 3 minutos, foi acrescentado uma gota de lugol e, após, colocada a lamínula em uma lâmina e examinado em um microscópio óptico em objetiva de 10 x ou 40 x.

- A técnica de esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Nielsen modificada (Henriksen *et al.*, 1981) foi realizada com o objetivo de pesquisar a presença de *Cryptosporidium* spp. Para isto, foi preparado um esfregaço fino com a ponta de um alfinete sobre uma lâmina de vidro. Após, foi depositada a lâmina em uma estante e coberto o esfregaço com uma solução de carbol-fucsina durante 25 minutos e enxaguado com água corrente. Após, foi depositado um descolorante com álcool ácido 3% durante 10 a 15 segundos e enxaguado com água corrente. Por último, foi utilizado o corante azul de metileno por 30 segundos e enxaguado com água corrente, deixando secar a lâmina naturalmente, examinando-a em um microscópio óptico em objetiva de 40x em busca dos oocistos sobre o fundo azulado. Caso encontrado, foi pingado óleo de imersão para visualização em objetiva de 100x.

3.9 Análise Estatística

O cálculo de prevalência foi realizado conforme a fórmula: $\text{prevalência (\%)} = 100 \times (\text{número de amostras positivas} / \text{total de amostras analisadas})$ conforme descrita por Pereira (1995). A associação estatística entre as variáveis coletadas no questionário aplicado no estudo epidemiológico e os resultados dos exames coproparasitológicos e moleculares foi realizada pelo teste do Qui-quadrado ou Teste de G. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa BioEstat versão 5.3 o intervalo de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultura para *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis*

Após a inoculação no meio de cultura e incubação nas câmaras climatizadas não foi observado crescimento de nenhum parabasalídeo. De acordo com Lopes (1996), houve sucesso no crescimento do protozoário no meio de transporte e cultivo Lactopep com amostras de lavado prepucial e de muco vaginal de bovinos, recomendado em casos nos quais haja contaminação por fezes, urina, sangue ou outros produtos orgânicos. Para a espécie felina, as amostras de fezes utilizadas para cultivo destes protozoários são recém coletadas após defecação ou amostras obtidas de lavados de reto e cólon com solução salina (Gookin *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2009).

Porém, neste estudo, apesar de terem sido utilizadas fezes com menos de 6 horas de defecação, o material foi coletado diretamente de caixas sanitárias em maior parte com areia sanitária. Apesar de todo cuidado para a rápida inoculação, não foi obtido o crescimento de nenhum protozoário nas amostras avaliadas neste estudo, o insucesso do método pode ser relacionado à demora na inoculação e no ressecamento das fezes devido ao granulado sanitário utilizado nas caixas sanitárias.

O tempo levado até o momento da coleta e inoculação ao meio também pode ter sido o fator crucial para o não diagnóstico destes protozoários pelo meio de cultura. Apesar de já ter descrito a sobrevivência de *T. foetus* em urina, ração seca, úmida e caixa de areia, esse tempo é muito curto, não ultrapassando seis horas (Rosypal *et al.*, 2012). Por outro lado, Hale *et al.* (2009) demonstraram em seu estudo que a sobrevivência de *T. foetus* pode ficar viável para crescimento em meios de cultura por um período superior a 24 horas. Contudo, trata-se de um estudo onde as amostras são contaminadas artificialmente e mantidas em temperatura ambiente em laboratório. Entretanto, é importante ressaltar que a temperatura ambiente dentro de uma sala de laboratório não pode ser comparada às condições que as amostras foram desafiadas neste estudo.

Mediante aos resultados expostos, a inoculação de fezes em meio de cultura não é o melhor método para a realização de um estudo epidemiológico com o delineamento semelhante

ao deste estudo. Porém, ressalta-se que é considerada uma ferramenta com boa sensibilidade e com menor custo quando realizados com fezes recém coletadas (Gookin *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2009).

4.2 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase para *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis*

Para a PCR, primeiro foram realizados testes com três conjuntos de primers para avaliar como seriam realizadas as amplificações do DNA das amostras, objetivando a amplificação tanto de *T. foetus* quanto *P. hominis*.

Em uma primeira reação, foram utilizados os primers TRF-1 + TRF-2, amplificando *T. foetus* e *P. hominis* e não amplificados os controles negativos (água), mostrando que não ocorreram contaminações durante o processamento das amostras. Na segunda reação, foram utilizados os primers TRF-3 + TRF4 amplificando somente as três amostras mais concentradas de *T. foetus* já que é um primer específico para a espécie.

Na terceira reação, foram utilizados os primers Penta ITS ExF/R e Foetus ITS ExF/R. Houve amplificação de ambas as espécies, porém, somente nas maiores concentrações, gerando bandas fracas nas amostras menos concentradas (Figura 3).

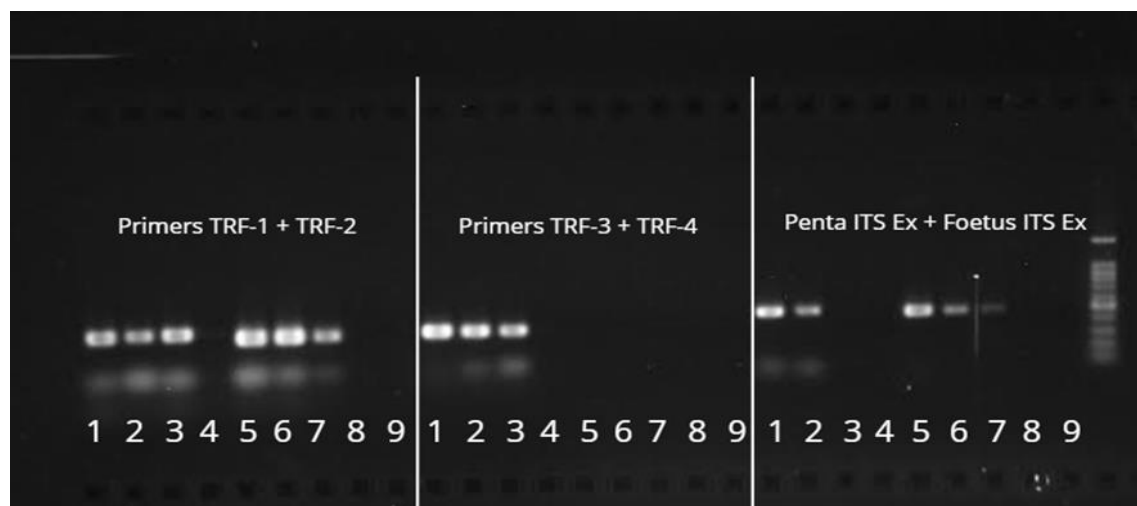


Figura 3. Amplificação de DNA de *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* utilizando três conjuntos de primers: TRF-1/TRF-2, TRF-3/TRF-4 e Penta ITS Ex/Foetus ITS Ex (Duplex PCR). Poços 1 a 4: controles positivos de *T. foetus* contendo, respectivamente, 2000, 200, 20 e 2 células. Poços 5 a 7: controles positivos de *P. hominis* contendo 1000, 100 e 1 célula, respectivamente. Poço 8: controle negativo (“água fora”). Poço 9: controle negativo (“água dentro”).

No ensaio inicial, 24 amostras foram analisadas utilizando os primers TRF1 e TRF2. A reação de PCR gerou múltiplas bandas inespecíficas, com tamanhos distintos daquele esperado para *Tritrichomonas foetus*, o que dificultou a interpretação dos resultados, conforme ilustrado na Figura 4. Bandas inespecíficas de maior peso molecular foram indicadas por setas amarelas, enquanto bandas de menor peso molecular foram destacadas por um retângulo branco. O amplicon obtido na amostra 6 foi submetido à digestão enzimática e sequenciamento, sendo posteriormente identificado como *T. foetus*. Esta amostra também foi confirmada por meio de Duplex Nested PCR. Por sua vez, a amostra 16 apresentou uma banda inespecífica de menor peso molecular, cujo sequenciamento resultou em cromatogramas de baixa qualidade. Apesar disso, essa amostra foi indicada como positiva para *T. foetus* com o uso do Duplex Nested PCR

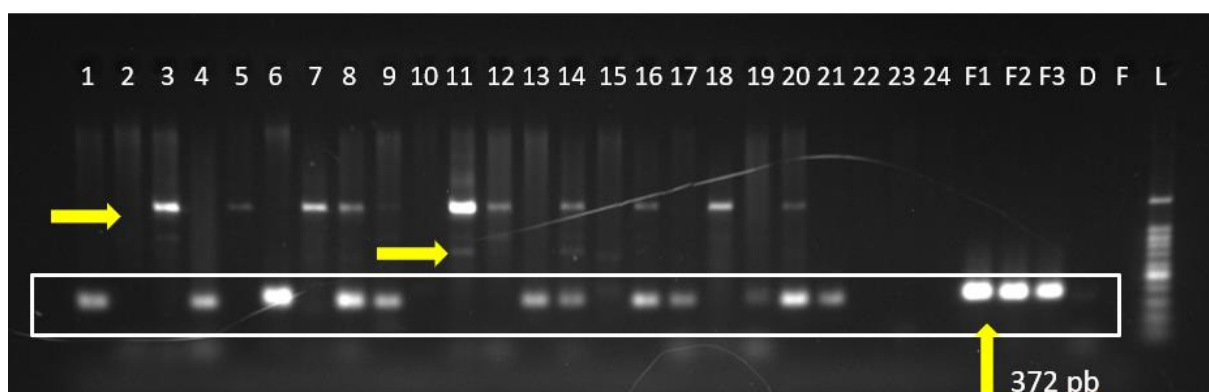


Figura 4: Produto de PCR utilizando os primers TFR1/TFR2. Poços 1 a 24: amostras testadas. F1: controle positivo contendo DNA de *Tritrichomonas foetus* equivalente a 2×10^3 células; F2: controle positivo com DNA equivalente a 2×10^2 células; F3: controle positivo com DNA equivalente a 20 células. D: controle negativo (água dentro); F: controle negativo (água fora); L: marcador de peso molecular (100 pb).

Devido a formação destas bandas inespecíficas, foi optado pela realização do “Nested PCR” para as mesmas amostras. Na primeira reação, foram utilizados os primers Penta ITS Ex e Foetus ITS Ex, processadas no termociclador por 40 ciclos e, a partir do produto desta reação, diluídas em uma proporção de 1:10 com um tampão AE. Após, utilizou-se 2µL do DNA diluído junto com mais 10,5µL de Mastermix com os primers TRF-1+TRF2 e processadas no termociclador por 30 ciclos. Desta forma, foram geradas bandas mais específicas (Figura 5).

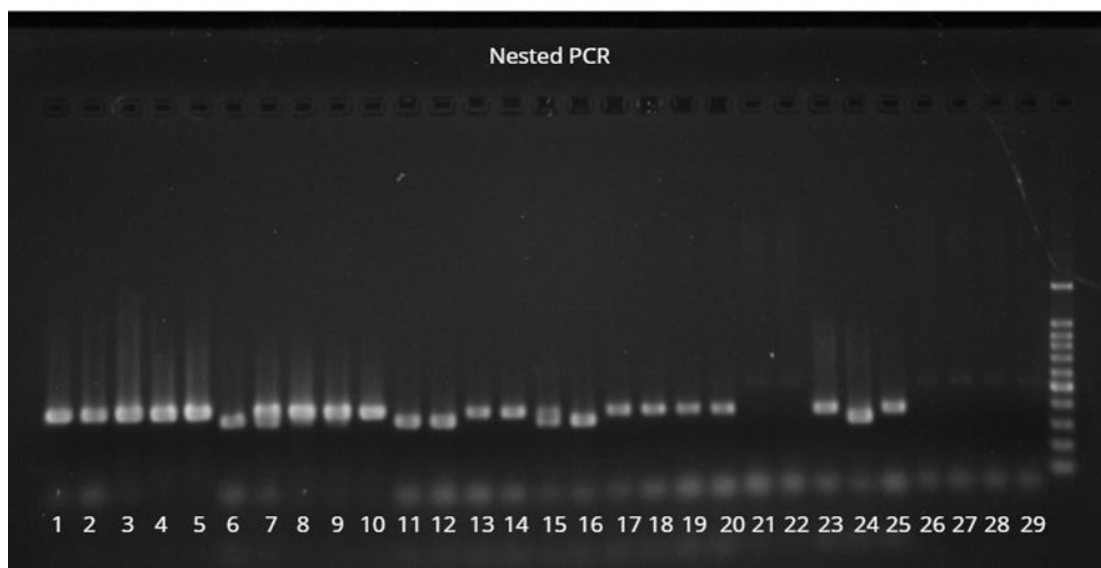


Figura 5: Nested PCR com amostras 1 a 18 consideradas positivas para *Tritrichomonas foetus* e/ou *Pentatrichomonas hominis*. Poços 19 e 20: controles positivos da etapa de extração, com fezes adulteradas contendo, respectivamente, 3×10^5 e 3×10^3 células de *T. foetus*. Poços 21 e 22: controles negativos da etapa de extração. Poço 23: amplicon positivo de *T. foetus* (2000 células), utilizado como marcador interno para distinção entre *T. foetus* e *P. hominis*. Poço 24: amplicon positivo de *P. hominis* (1000 células), também utilizado como marcador interno. Poço 25: controle positivo da amplificação (2000 células de *T. foetus*). Poços 26 e 27: controles negativos (“água dentro” e “água fora” da primeira PCR). Poços 28 e 29: controles negativos (“água dentro” e “água fora” da segunda PCR). L: marcador de peso molecular (100 pb)

Em seguida, os produtos do PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Hha* I, que fragmentou os amplicons. Os produtos da digestão foram separados usando eletroforese em géis de agarose 1,5%, seguida da coloração com brometo de etídio. No caso de *T. foetus* foram gerados dois fragmentos com 221 e 149 pares de base, enquanto para *P. hominis* foram gerados dois fragmentos de 205 e 133 pares de base (Figura 6). Foram observados resultados compatíveis com *T. foetus* nas amostras de 1 a 5, 8 a 10, 13, 14, 17 e 18 e com *P. hominis* nas amostras 6, 11 e 16. Nas amostras 7 e 15 observamos a presença da digestão de ambas as espécies, ou seja, uma co-infecção por *T. foetus* e *P. hominis*. Desta forma, foram diagnosticados pela PCR 14 gatos considerados positivos para *T. foetus* e 5 gatos considerados positivos *P. hominis*, sendo que dois desses animais apresentavam coinfeção entre os dois protozoários. A amostra 12 não foi digerida pela enzima *Hha*I e foi encaminhada para

[illegible]

O sequenciamento das 12 amostras identificadas como positivas para *Tritrichomonas foetus* com base na análise por PCR-RFLP revelou a presença de dois genótipos distintos. O genótipo 1 foi identificado em nove das doze amostras, enquanto o genótipo 2 foi detectado nas três amostras restantes (Tabela 1). Esses dois genótipos diferiram entre si por uma única substituição nucleotídica, apresentando 99,7% de similaridade em um fragmento de 327 pares de bases. O genótipo 1 demonstrou 99,7% de similaridade com diversas sequências de *T. foetus* isoladas de bovinos, incluindo MK770839 (Espanha) (Genbank, 2019), JN106455 (China) (Genbank, 2012), GU170219 (Índia) (Genbank, 2010) e ON464699 (Áustria) (Genbank, 2022). Já o genótipo 2 apresentou 100% de identidade com a sequência HM856630, correspondente a um isolado felino de *T. foetus* proveniente da Noruega (Genbank, 2011)

30

O sequenciamento das amostras co-infectadas não foi realizado. Trabalhos futuros usarão ensaios de PCR específicos da espécie em uma tentativa de produzir amplicons para as espécies individuais.

Uma única amostra (12) que não foi digerida por *HhaI* foi classificada como um parabasalídeo, semelhante aos membros do gênero *Simplicimonas*. Essa seria a primeira descrição do gênero em gatos domésticos. A sequência obtida mostrou o maior nível de similaridade (95,4%) com a sequência KY410341 (Genbank, 2017) depositada como gene 18S do RNA ribossômico, sequência parcial; espaçador transcrito interno 1, gene 5.8S do RNA ribossômico e espaçador transcrito interno 2, sequência completa; e gene 28S do RNA ribossômico, sequência parcial; de *Simplicimonas* spp. derivado de um esfregaço vaginal bovino, coletado na Suíça. Um nível menor (91%) de similaridade foi registrado com a sequência HQ334182 depositada como derivada de *Simplicimonas* sp. GABC1, isolada de uma galinha nos Estados Unidos (Genbank, 2010)

Tabela 1: Amostras positivas para *Tritrichomonas foetus* com base na análise de PCR-RFLP

	Código da Amostra/ Data de Extração do DNA	PCR-RFLP	SEQUENCING
1	F6 9/9/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
2	F16 9/9/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
3	F9 10/9/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
4	F12 10/9/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
5	F2 13/9/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
6	F14 13/9/2024	<i>P. hominis</i>	A
7	F15 13/9/2024	<i>T. foetus/P. hominis</i>	Não realizado
8	F11 9/10/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
9	F5 30/10/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 2
10	F6 30/10/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 2
11	F15 30/10/2024	<i>P. hominis</i>	Genótipo 2
12	F7 13/11/2024	<i>Simplicimonas</i> -like	A

13	F9 13/11/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
14	F16 13/11/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
15	F17 13/11/2024	<i>T. foetus/P. hominis</i>	Não realizado
16	F9 19/11/2024	<i>P. hominis</i>	A
17	F20 19/11/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1
18	F2 4/12/2024	<i>T. foetus</i>	Genótipo 1

O diagnóstico de *T. foetus* é na maior parte das vezes desafiador devido a necessidade de fezes frescas, preferencialmente diarreicas, sendo necessário serem processadas rapidamente. Além disso, a distinção de *T. foetus* de outros parabasalídeos pelo exame direto é dificultosa e muitas vezes não-confiável devido às grandes similaridades morfológicas. Com isso, temos muitos resultados falso-negativos (Gookin *et al*, 2002). Já com a PCR, temos a vantagem da detecção de organismos mortos e realizar a distinção entre as espécies do filo Parabasalia, conseguindo detectar aqueles organismos que não puderam ser identificados nas outras metodologias.

No caso deste estudo, quando utilizamos os primers TRF1 e TRF2 sozinhos, além de serem detectados uma menor quantidade de amostras positivas, foram geradas bandas inespecíficas no gel de agarose. Essa ocorrência se deve provavelmente à quantidade de material genético nas amostras de fezes. De acordo com Stauffer (2008), uma extração de DNA de boa qualidade pode ser um desafio devido a coextração de inibidores da PCR, que são influenciados pela dieta, microbiota intestinal e doenças concomitantes do animal. A Nested PCR é usada para aumentar o limite de detecção de DNA. De acordo com Gookin (2002), ao utilizar uma técnica semelhante para os mesmos organismos (*T. foetus* e *P. hominis*), o limite de detecção absoluto da PCR foi de um organismo, enquanto o limite de detecção com os primers de forma isolada foi de 10 organismos por 200 mg de fezes.

Como desvantagem da técnica de PCR frente às demais metodologias é custo financeiro. Para realização do PCR é necessário a extração do DNA fecal que, neste caso, foi feita por meio do kit “Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit” da Zymo Research, tendo em vista que, de acordo com Dabrowska (2022) e Stauffer (2008), é o método mais rápido e eficaz no mercado. Porém, aqui no Brasil, para utilizarmos este kit o custo por amostra sai em torno de 65 reais, sendo muitas vezes inviável financeiramente. Além disso, para a obtenção de primers, enzimas de restrições e demais produtos para a PCR, também é necessário um alto investimento

financeiro. Enquanto para a realização de técnicas coproparasitológicas e preparação de meios de cultura os custos são menores.

A detecção molecular de *Cyniclomyces* spp. foi realizada em cinco amostras previamente identificadas como positivas para a levedura por microscopia, com o objetivo de confirmar o diagnóstico por meio de dois ensaios de PCR. Todas essas amostras apresentaram alta carga parasitária de *Cyniclomyces* spp. No primeiro ensaio, utilizando os primers NL1 e NL4, foi possível amplificar e identificar *Cyniclomyces* spp. em todas as amostras, com confirmação por sequenciamento. As sequências obtidas apresentaram 99,5% de similaridade nucleotídica (588/591 bases) com sequências previamente depositadas no GenBank, derivadas de isolados de *C. guttulatus* recuperados de um cão (MW357595) (Genbank, 2021) e de um coelho (MW358144) (Genbank, 2021), ambos do Brasil. Além disso, outras três amostras, negativas por microscopia, mas previamente identificadas como positivas para *T. foetus*, também foram classificadas como positivas para *Cyniclomyces* spp. por meio de um segundo ensaio de PCR, utilizando os primers RPB-F1 e RPB-R1. Dessa forma, um total de oito amostras foram consideradas positivas. Os amplicons gerados estão previstos para serem analisados por sequenciamento no início de março.

A detecção molecular de *Toxocara* spp. foi realizada em cinco amostras previamente classificadas como positivas para o nematoide por microscopia, com o objetivo de confirmar o diagnóstico por meio de um ensaio de PCR. Todas essas amostras foram amplificadas com sucesso e identificadas como *Toxocara* spp. Além disso, outras três amostras, negativas por microscopia mas anteriormente diagnosticadas como positivas para *T. foetus*, também foram identificadas como *Toxocara* spp. utilizando o mesmo ensaio de PCR. Assim, um total de oito amostras foram consideradas positivas para *Toxocara* spp.

4.3 Perfil epidemiológico

Das 241 amostras fecais analisadas, 60 (24,9%) foram consideradas positivas, com base na detecção de estruturas parasitárias por meio de técnicas coproparasitológicas e/ou PCR. As amostras positivas foram classificadas de acordo com os organismos identificados, conforme apresentado na Tabela 2. A espécie mais frequentemente detectada foi *Giardia intestinalis*, com uma ocorrência de 8,3% (n = 20), seguida por *Ancylostoma* spp. com 6,6% (n = 16), *Trichostrongylus axei* com 5,8% (n = 14), *Cystoisospora* spp. com 4,1% (n = 10), *Cyniclomyces* spp. e *Toxocara* spp., ambas com 3,3% (n = 8), e *Pentatrichomonas hominis* com 2,1% (n = 5). Os parasitas *Dipylidium caninum* e *Platynosomum illiciens* apresentaram frequência de 1,2% (n = 3), enquanto *Cryptosporidium* spp. foi identificado em 0,8% (n = 2) das amostras. Por fim,

estruturas compatíveis com ovos da família Trichuridae e um isolado semelhante a *Simplicimonas* foram encontrados em 0,4% (n = 1) das amostras.

Tabela 2. Tabela de ocorrência de parasitos do trato digestório de amostras fecais de gatos da região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Grupo	n	%
Protozoários	52	21,6%
Nematoides	25	10,4%
Cestoides	3	1,2%
Trematódeos	3	1,2%
Fungi: Saccharomycetaceae	23	9,5%
Ocorrência total	60	24,9%
Parasito	n	%
Protozoários		
<i>Tritrichomonas foetus</i>	14	5,8%
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	5	2,1%
<i>Simplicimonas</i> -like	1	0,4%
<i>Giardia intestinalis</i>	20	8,3%
<i>Cystoisospora</i> spp.	10	4,1%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	0,8%
Nematoide		
<i>Ancylostoma</i> spp.	16	6,6%
<i>Toxocara</i> spp.	8	3,3%
Trichuridae	1	0,4%
Cestoide		
<i>Dipylidium caninum</i>	3	1,2%
Trematódeos		
<i>Platynosomum illiciens</i>	3	1,2%
Fungi: Saccharomycetaceae		
<i>Cyniclomyces</i> spp.	8	3,3%

Dentre os animais avaliados, foram observados gatos que se apresentavam parasitados por apenas um gênero/espécie de parasito, enquanto outros apresentavam multiparasitismo. Dentre os gatos que apresentavam monoinfecção, podemos destacar as causadas por *Ancylostoma* spp. e *G. intestinalis* ambos correspondendo a 16,7% (n = 10) e *T. foetus* com 11,7% (n = 7) gatos infectados. As coinfeções encontradas para *T. foetus*, *P. hominis* e demais parasitos estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Relação dos parasitos e suas associações em diagnóstico coproparasitológico e pela reação em cadeia da polimerase das amostras fecais dos gatos da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Parasito / Associação	n	%
<i>Tritrichomonas foetus</i>	7	11.7%
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	1	1.7%
<i>Simplicimonas</i> -like	1	1.7%
<i>Giardia intestinalis</i>	10	16.7%
<i>Cystoisospora</i> spp.	3	5.0%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	1.7%
<i>Ancylostoma</i> spp.	10	16.7%
<i>Toxocara</i> spp.	3	5.0%
<i>Dipylidium caninum</i>	1	1.7%
<i>Platynosomum illiciens</i>	2	3.3%
<i>Cyniclomyces</i> spp.	1	1.7%
<i>Pentatrichomonas hominis</i> + <i>Tritrichomonas foetus</i>	1	1.7%
<i>Pentatrichomonas hominis</i> + <i>Tritrichomonas foetus</i> + <i>Ancylostoma</i> spp.	1	1.7%
<i>Pentatrichomonas</i> + <i>Cystoisospora</i> spp.	1	1.7%
<i>Pentatrichomonas hominis</i> + <i>Ancylostoma</i> spp. + <i>Toxocara</i> spp.	1	1.7%
<i>Tritrichomonas foetus</i> + <i>Cyniclomyces</i> spp.	2	3.3%
<i>Tritrichomonas foetus</i> + <i>Giardia intestinalis</i>	2	3.3%
<i>Ancylostoma</i> spp. + <i>Giardia intestinalis</i>	1	1.7%
<i>Ancylostoma</i> spp. + <i>Cystoisospora</i> spp.	1	1.7%
<i>Ancylostoma</i> spp. + <i>Toxocara</i> spp.	2	3.3%
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Giardia intestinalis</i> + <i>Cystoisospora</i> spp.	1	1.7%
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Dipylidium caninum</i>	1	1.7%
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>Dipylidium caninum</i>	1	1.7%
<i>Cystoisospora</i> + <i>Platynosomum illiciens</i>	1	1.7%
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Cyniclomyces</i> spp.	4	6.7%
Número total de animais positivos	60	

Dez dos animais positivos para *T. foetus* estavam negativos nos exames coproparasitológico e na PCR para outros parasitos do trato digestório, por esse motivo, não foi detectada diferença estatística significativa entre a associação com outros parasitos. No entanto, três animais positivos para *P. hominis* apresentavam positivos com outros parasitos do trato digestório. Para este protozoário, foi detectada uma diferença estatística significativa ($p = 0,0487$). Quando analisada com *Ancylostoma* spp. e *G. intestinalis* os dois parasitos com maior ocorrência, não foi detectada associação estatística significativa. Os dados da análise da associação entre o parasitismo podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Relação dos parasitos e suas associações em diagnóstico coproparasitológico e pela reação em cadeia da polimerase das amostras fecais dos gatos que participaram do estudo.

Associação com outros parasitos do trato digestório							
<i>Tritrichomonas</i>			%				%
	Positivo	Negativo			Positivo	Negativo	
Com associação com outros parasitos	4	43	8.5%	Com associação com outros parasitos	3	43	6.5%
Sem associação com outros parasitos	10	180	5.3%	Sem associação com outros parasitos	2	180	1.1%
<i>p-value</i>		0.4183		<i>p-value</i>		0.0487	
Associação com <i>Ancylostoma</i> spp.							
<i>Tritrichomonas</i>			%				%
	Positivo	Negativo			Positivo	Negativo	
Com associação	1	14	6.7%	Com associação	1	14	6.7%
Sem associação	13	209	5.9%	Sem associação	4	209	1.9%
<i>p-value</i>		0.8992		<i>p-value</i>		0.3134	
Associação com <i>Giardia intestinalis</i>							
<i>Tritrichomonas</i>			%				%
	Positivo	Negativo			Positivo	Negativo	
Com associação	2	18	10.0%	Com associação	0	18	0.0%
Sem associação	12	205	5.5%	Sem associação	5	205	2.4%
<i>p-value</i>		0.4537		<i>p-value</i>		0.8319	

As coinfeções parasitárias com *T. foetus* são frequentemente relatadas (Bissett *et al.*, 2008; Gookin *et al.*, 1999; Gookin *et al.*, 2001; Zanzani *et al.*, 2016). Neste estudo foi observado uma prevalência maior de animais infectados somente com *T. foetus* e a coinfeção com outros parasitos não apresentou ser um fator relevante. Resultados semelhantes já foram observados por Kuehner *et al.* (2011), que também não encontrou uma associação da infecção pelo protozoário com outros parasitos gastrointestinais. Contudo, outros trabalhos mostram uma tendência a coinfeção de *T. foetus* em associação com outros protozoários entéricos como *G. intestinalis* (Gookin *et al.*, 2004), *Cryptosporidium* spp. (Gookin *et al.*, 2001). No entanto, neste trabalho a maior parte dos animais positivos para *T. foetus* apresentavam monoinfecção.

Já os gatos positivos para *P. hominis* um gato encontrava-se na zona oeste (bairro Vargem Grande), dois na zona norte (um no bairro Jardim Guanabara e um no bairro Tijuca) e dois na zona sul da cidade do Rio de Janeiro (ambos do bairro Botafogo). (Figura 8)



Figura 8: Casos positivos para *Pentatrichomonas hominis* na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Dentre os 241 animais, 52,3% eram machos e 47,7% eram fêmeas. Com relação à idade, 53,5% eram adultos jovens (1 a 6 anos), 24,9% maduros (7 a 10 anos), 12,4% filhotes (0 a 1 ano) e 3,1% senior (acima de 10 anos). Com relação a raça, 95,4% eram animais sem raça definida, enquanto 4,6% eram de raça definida. Dentre os 4,6% das raças definidas, 2,5% eram da raça Persa, 0,8% Exótico, 0,4% Norueguês da Floresta, 0,4% Himalaio e 0,4% Hagdoll. (Figura 9)

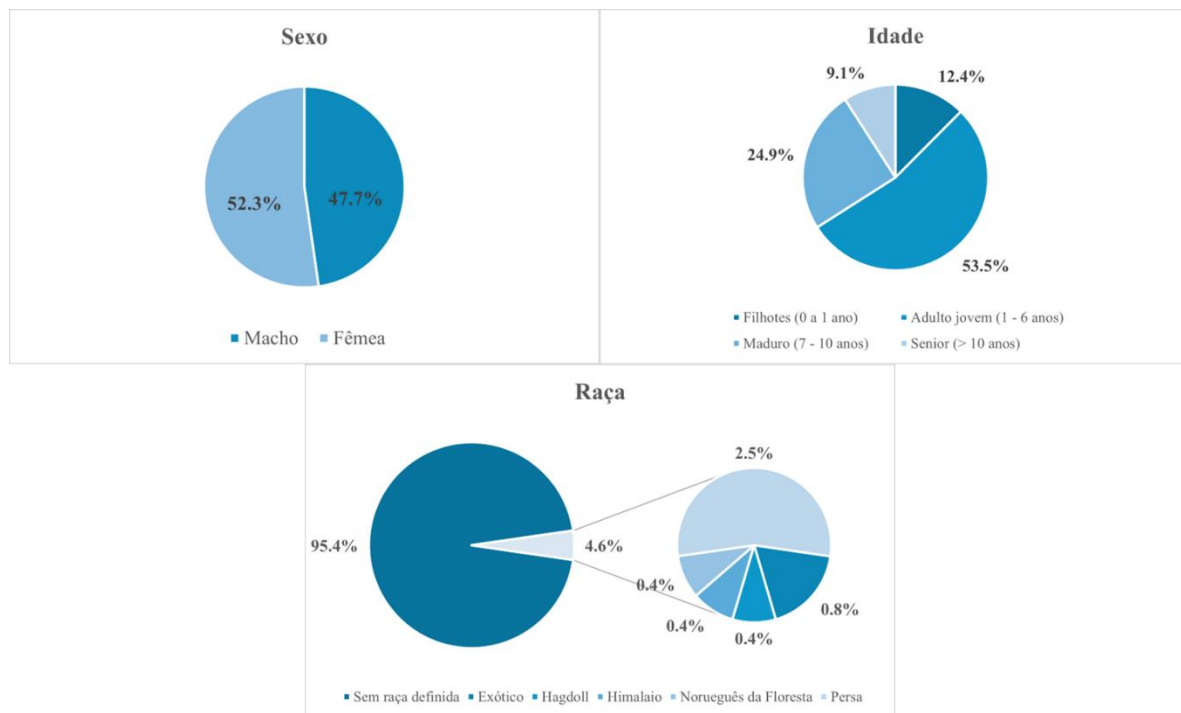


Figura 9. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo nas variáveis sexo, raça e idade.

Comparando estas variáveis de sexo, idade e raça com a infecção por *T. foetus* e *P. hominis*, em nenhuma delas foi constatado uma significância estatística (Tabela 5) Conclui-se que ambas as infecções não houve predileção por sexo, idade ou raça.

Tabela 5: Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis sexo, raça e idade dos gatos.

Sexo							
	<i>Tritrichomonas</i>		% Positivos		<i>Pentatrichomonas</i>		% Positivos
	Positivos	Negativos			Positivos	Negativos	
Macho	7	106	6.2%	Macho	5	104	4.6%
Fêmea	7	119	5.6%	Fêmea	1	118	0.8%
<i>p-value</i>		0.9475		<i>p-value</i>		0.1766	
Raça							
	<i>Tritrichomonas</i>		% Positivos		<i>Pentatrichomonas</i>		% Positivos
	Positivos	Negativos			Positivos	Negativos	
Sem raça definida	12	213	5.3%	Sem raça definida	5	230	2.1%
Com raça definida	2	9	18.2%	Com raça definida	0	11	0.0%
<i>p-value</i>		0.9216		<i>p-value</i>		0.9999	
Idade							
	<i>Tritrichomonas</i>		% Positivos		<i>Pentatrichomonas</i>		% Positivos
	Positivos	Negativos			Positivos	Negativos	
Filhotes (0 a 1 ano)	1	29	3.3%	Filhotes (0 a 1 ano)	1	29	3.3%
Adulto jovem (1 - 6 anos)	10	115	4.4%	Adulto jovem (1 - 6 anos)	3	115	2.5%
Maduro (7 - 10 anos)	2	57	3.4%	Maduro (7 - 10 anos)	1	57	1.7%
Senior (> 10 anos)	1	21	4.5%	Senior (> 10 anos)	0	21	0.0%
<i>p-value</i>		0.8835		<i>p-value</i>		0.8093	

Análise realizada pelo teste de G com intervalo de confiança de 95%.

Destaca-se que, em relação a variável “raça”, a maior parte dos animais incluídos foram sem raça definida (95,4%). Isso reflete diretamente no cenário de gatos de estimação do Brasil, onde a grande maioria dos tutores tem animais sem raça definida (Da Silva, 2007; Trapp *et al.*, 2015; Albuquerque, 2020). Nenhum estudo foi encontrado que avalia a ocorrência no estado do Rio de Janeiro, contudo, conforme observado neste estudo, a grande maioria dos tutores de gatos possuem animais sem raça definida. Essa discussão se torna importante, uma vez que animais de raça pura já foram descritos como mais suscetíveis a infecção por *T. foetus* (Gunn-Moore *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2010), contudo, tal relação pode estar muito mais relacionada com animais mantidos em gatis de reprodução em grupos do que estar de fato envolvido com um fator racial. Alguns trabalhos publicados também mostram que gatos sem raça definida também são mais suscetíveis a infecção (Gookin *et al.*, 1999; Holliday *et al.*, 2009). No entanto, ambos os trabalhos avaliaram animais mantidos em abrigos (colônias).

Já em relação a variável idade, obtivemos um dado que discorda de outros trabalhos que destacam gatos jovens como mais predispostos à infecção por *T. foetus* (Lavalle, 2018; Sui *et al.*, 2024; Hora *et al.*, 2017). Dados de *P. hominis* são escassos, porém existem relatos que

destacam a infecção em filhotes (Romatwski, 2000). Questiona-se essa variável como predisponente às parasitoses tendo em vista o estado de maturação imunológica dos animais, que pode se estender até os 12 meses de idade. (Evermann *et al.*, 2010). Neste caso, não foi observada uma predisposição às infecções em relação à faixa etária dos animais. Porém, a maior parte dos positivos compunha-se de animais até seis anos de idade.

Em relação ao tipo de moradia dos animais, a maioria não obtinha acesso à rua (92,5%) e viviam em abrigos (68%), enquanto 32% estavam em condições de domicílio (Figura 10)

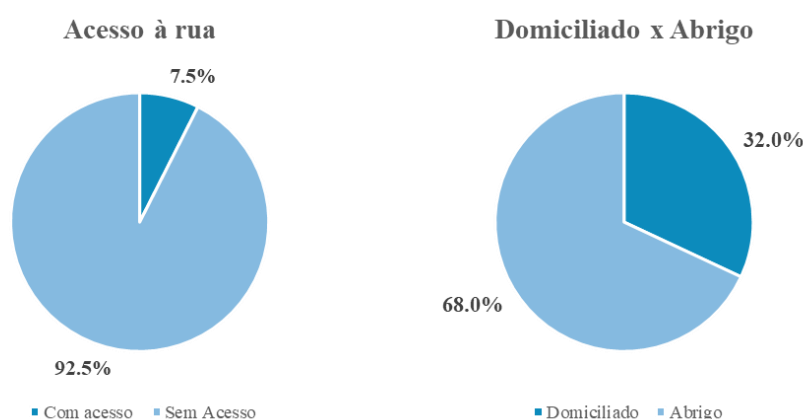


Figura 10. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo nas variáveis tipo de moradia e acesso à rua.

Comparando estas variáveis de condições de moradias, foi possível notar que dos gatos que habitavam abrigos, 10 gatos foram positivos para a infecção por *T. foetus* (total = 14) e quatro foram positivos para *P. hominis* (total = 5). Quando comparada essa associação, foi observada uma significância estatística em relação aos animais que viviam em situação de abrigo ($p = 0,04622$ para *T. foetus* e $p = 0,0395$ para *P. hominis*). Em relação ao acesso à rua, foi insignificante estatisticamente (Tabela 6).

Tabela 6: Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis condições de moradias e acesso à rua.

Domiciliado							
	<i>Tritrichomonas</i>				<i>Pentatrichomonas</i>		
	Positivo	Negativo	% Positivos		Positivo	Negativo	% Positivos
Domiciliado	4	72	5,3%	Domiciliado	1	72	1,4%
Abrigo	10	150	6,3%	Abrigo	4	150	2,6%
<i>p-value</i>		0,04622		<i>p-value</i>		0,0395	

Acesso à rua							
	<i>Tritrichomonas</i>				<i>Pentatrichomonas</i>		
	Positivo	Negativo	% Positivos		Positivo	Negativo	% Positivos
Com Acesso	0	18	0,0%	Com Acesso	0	18	0,0%
Sem acesso	14	205	6,4%	Sem acesso	5	205	2,4%
<i>p-value</i>		0,1308		<i>p-value</i>		0,8319	

Este dado coincide com o que é descrito na literatura, que ambientes de alta densidade populacional são um fator de risco importante para as infecções (Arranz-Solís *et al.*, 2016; Lavalle, 2018; Sui *et al.*, 2024). Devido aos protozoários se apresentarem somente na forma de trofozoíta (Yao *et al.*, 2015), não possuindo um estágio cístico (apenas pseudocisto no caso de *T. foetus*), sua sobrevivência no ambiente é reduzida, o que limitaria a transmissão entre gatos (Granger *et al.*, 2000). No entanto, estudos demonstram que o trofozoíta de *T. foetus* pode sobreviver por até 30 minutos em água, 180 minutos em urina, 30 minutos em ração seca e 180 minutos em ração úmida (Rosypal *et al.*, 2012), e, conforme Bastos *et al.* (2019), pode permanecer viável por até 7 dias, dependendo das condições ambientais. No caso de gatos mantidos em abrigos, onde há compartilhamento de recursos como caixas sanitárias, potes de água e comida entre diversos animais, a chance de infecção torna-se maior, considerando a quantidade de possíveis portadores e a concentração de animais expostos em um curto intervalo de tempo. Em ambientes com um ou poucos animais, essa probabilidade é reduzida, uma vez que o protozoário não se mantém viável por longos períodos.

Em relação ao acesso à rua, ressalta-se o fato de que os animais incluídos no estudo em sua grande maioria não obtinham (92,5%), o que vai de acordo com o resultado obtido por Machado *et al.* (2023), a prática mais relatada pelos tutores brasileiros foi a de manter os gatos sem acesso à rua. Sugere-se assim que, se houvessem sido incluídos mais animais semi-domiciliados ou de vida livre, o resultado poderia ter sido diferente. Conforme descrito por Chalkowski *et al.* (2019), gatos com acesso à rua possuem 2,77 vezes mais chances de serem infectados por parasitas do que os mantidos somente dentro de casa. Entretanto, é pouco

provável que esta variável se aplique à transmissão de *T. foetus* e *P. hominis*, uma vez que não existem formas infectantes viáveis no ambiente por longo período de tempo (Hale *et al.*, 2009).

No que se refere ao contato com outros animais, 90,5% (n = 218) dos gatos possuíam contactantes. Sendo que destes, 73,4% (n = 177) possuíam apenas gatos, 15,8% (n = 38) cães e gatos e 1,2% (n = 3) apenas cães, conforme ilustrado na Figura 11.

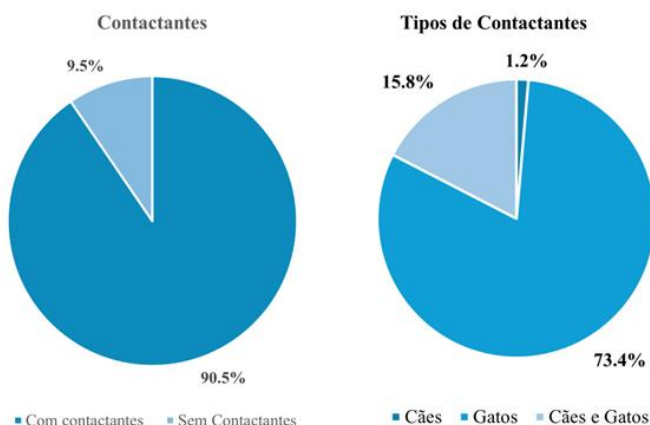


Figura 11. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo na variável contactantes.

Em relação a alimentação, 62,2% (n = 150) ingeriram rações do tipo úmida e seca, enquanto 37,8% (n = 91) só ingeriram ração seca. Quanto ao fornecimento de água, 61,8% (n = 149) dos gatos consumiam água da torneira, 36,1% (n = 87) água filtrada e 2,1% (n = 5) mineral conforme demonstrado na Figura 12.

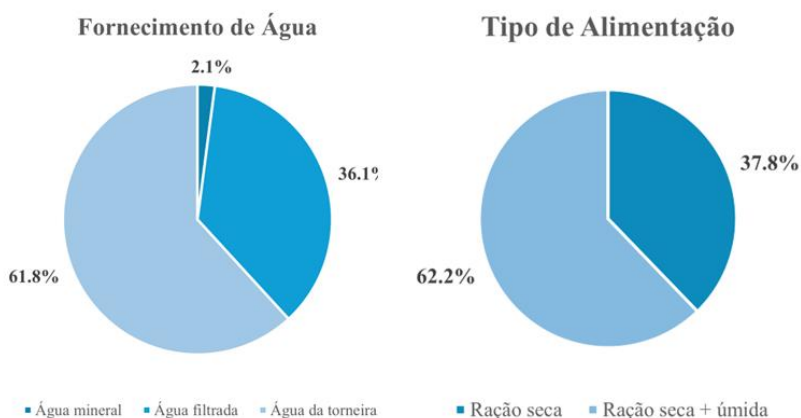


Figura 12. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo nas variáveis tipo de alimentação e fornecimento de água.

Quando comparada essa associação, foi observado valores próximos a significância estatística para animais que obtinham contactantes ($p = 0,0933$ para *T. foetus* e $p = 0,0504$ para *P. hominis*). Já o tipo de contactante demonstrou ser insignificante estatisticamente. (Tabela 7).

Tabela 7. Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis contactantes, tipo de alimentação e fornecimento de água.

Contactantes							
Tritrichomonas			% Positivos	Pentatrichomonas			% Positivos
Positivo	Negativo			Positivo	Negativo		
Com contactantes	14	201	6.5%	Com contactantes	4	201	2.0%
Sem Contactantes	0	22	0.0%	Sem Contactantes	1	22	4.3%
p-value		0.0933		p-value		0.504	
Tipos de contactantes							
Tritrichomonas			% Positivos	Pentatrichomonas			% Positivos
Positivo	Negativo			Positivo	Negativo		
Cães	0	3	0.0%	Cães	0	3	0.0%
Gatos	11	163	6.3%	Gatos	4	163	2.4%
Cães e Gatos	3	35	7.9%	Cães e Gatos	0	35	0.0%
p-value		0.7685		p-value		0.4365	
Tipo de alimentação							
Tritrichomonas			% Positivos	Pentatrichomonas			% Positivos
Positivo	Negativo			Positivo	Negativo		
Ração seca + úmida	7	143	4.7%	Ração seca + úmida	2	143	1.4%
p-value		0.2988		p-value		0.2793	
Fornecimento de água							
Tritrichomonas			% Positivos	Pentatrichomonas			% Positivos
Positivo	Negativo			Positivo	Negativo		
Água mineral	0	5	0.0%	Mineral	0	5	0.0%
Água filtrada	6	81	6.9%	Filtrada	2	81	2.4%
Água da torneira	8	137	5.5%	Torneira	3	137	2.1%
p-value		0.7958		p-value		0.241	

Animais que vivem em situação de grupo, principalmente em alta densidade populacional são grupos de risco para a infecção por *T. foetus* (Arranz-Solís *et al.*, 2016; Lavalle, 2018; Sui *et al.*, 2024) e provavelmente, para *P. hominis*. Apesar de não ter sido encontrada significância estatística significativa para a variável contactantes é possível perceber que 14 dos gatos positivos para *T. foetus* e quatro dos gatos positivos para *P. hominis* apresentavam contactantes. Provavelmente a não associação estatística se deve ao fato do baixo número de animais sem contactantes incluídos neste estudo. Todavia, apesar de não terem sido

encontrados trabalhos publicados na literatura pesquisada, é notável dentro da rotina clínica que tutores de gatos tendem a ter mais de um gato.

A maioria dos gatos utilizava caixa sanitária (77,6%; n = 187) e os tutores relataram realizar a limpeza da mesma de forma regular, pelo menos uma vez ao dia (96,3%; n = 232). Os dados de uso e limpeza regular da caixa sanitária estão descritos na Figura 13.

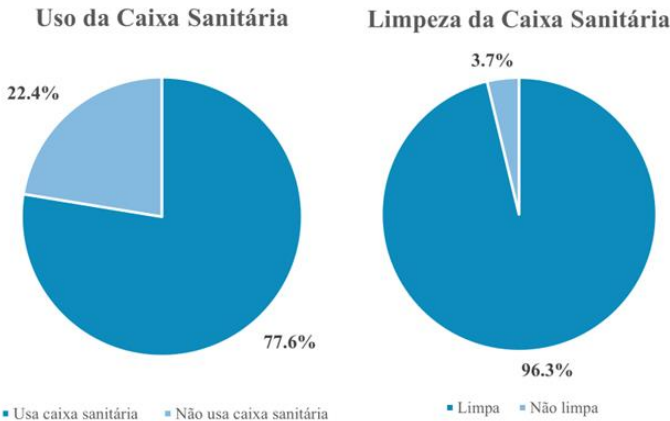


Figura 13. Dados referente a frequência dos gatos que participaram do estudo na variável uso da caixa sanitária.

Em relação a estas variáveis, a não utilização de caixa sanitária apresentou valores muito próximos a significância estatística ($p = 0,0505$ para *T. foetus* e $p = 0,0591$ para *P. hominis*), enquanto a limpeza regular se distanciou desse valor, não sendo detectada associação estatística significativa. (Tabela 8)

Tabela 8: Associação entre o parasitismo por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* com as variáveis uso da caixa sanitária e frequência de limpeza.

Tritrichomonas	Uso da caixa sanitária			Pentatrichomonas			
	Positivo	Negativo	% Positivos		Positivo	Negativo	% Positivos
Usa caixa sanitária	8	177	4,3%	Usa caixa sanitária	2	177	1,1%
Não usa caixa sanitária	6	46	11,5%	Não usa caixa sanitária	3	46	6,1%
p-value		0,0505		p-value		0,0591	

Tritrichomonas	Limpeza da caixa sanitária			Pentatrichomonas			
	Positivo	Negativo	% Positivos		Positivo	Negativo	% Positivos
Limpa	13	215	5,7%	Limpa	5	215	2,3%
Não limpa	1	8	11,1%	Não limpa	0	8	0,0%
p-value		0,3707		p-value		0,3612	

Não foi possível observar associação estatística entre o uso e a limpeza da caixa sanitária neste estudo. Tal resultado já foi demonstrado por Gookin *et al.*, (2004) que também não encontrou essa associação. É importante destacar que estudo realizado por Rosypal *et al.*, (2012) não foi possível observar a sobrevivência de *T. foetus* em caixas sanitárias, provavelmente devido a dessecação causada pela areia higiênica utilizada, tal achado parece fortalecer a hipótese que gatos muito provavelmente se infectam pelo protozoário pelo contato direto com outros gatos infectados do que com a caixa sanitária.

Durante a análise das amostras fecais, foi observado que 72,2% (n = 174) dos gatos eliminaram um grande volume enquanto 27,8% (n = 67) eliminaram um pequeno volume. A coloração era 92,1% (n = 222) da cor marrom, 6,2% (n = 15) amarelada e 1,7% (n = 4) avermelhadas, ou seja, com presença de sangue (hematoquezia). A maior parte dos gatos defecavam de uma a duas vezes ao dia (84,6%; n = 204), seguido de mais de duas vezes ao dia (11,6%; n = 28) e menos de uma vez ao dia (3,7%; n = 9). (Figura 14)

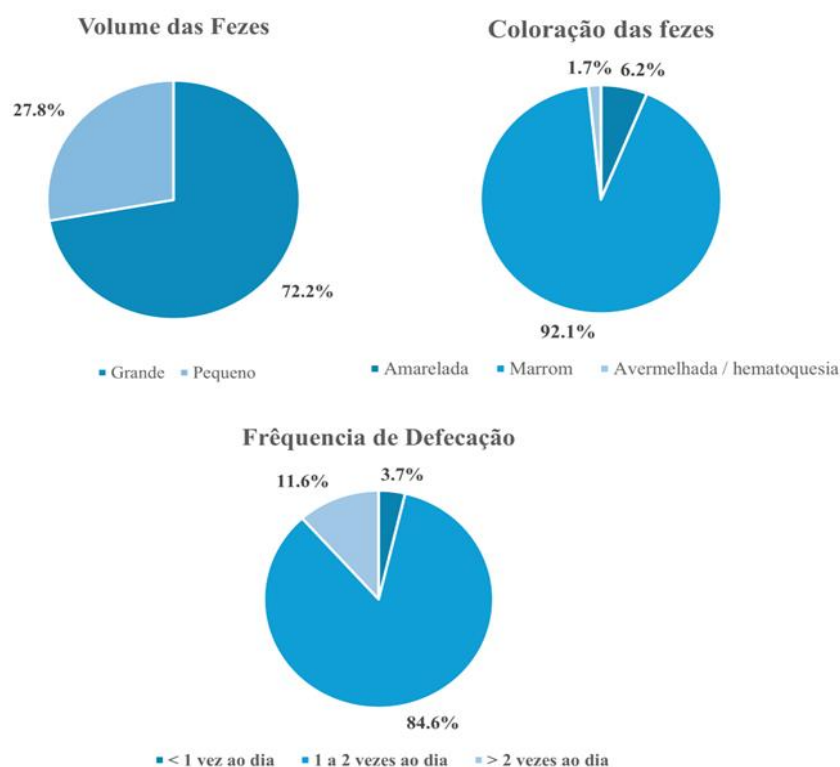


Figura 14: Gráficos com a prevalência do volume, coloração das fezes e frequência de defecação dos animais incluídos no estudo

Em relação a estas variáveis, não foi possível verificar a significância estatística para as variáveis coloração e volume das fezes, no entanto, a maior frequência de defecação obteve

valores estatísticos significativos para ambos protozoários ($p < 0.0001$ para *T. foetus* e $p = 0,0002$ para *P. hominis*) (Tabela 9).

Tabela 9: Análise estatística levando em consideração a coloração, volume e frequência de eliminação das fezes.

Coloração das fezes							
<i>Trtrichomonas foetus</i>				<i>Pentatrichomonas hominis</i>			
	Positivo	Negativo			Positivo	Negativo	
Amarelada	1	14	6.7%	Amarelada	0	15	0.0%
Marrom	13	205	6.0%	Marrom	5	205	2.4%
Avermelhada / hematoquesia	0	4	0.0%	Avermelhada / hematoquesia	0	4	0.0%
p-value		0.8406		p-value		0.8215	
Volume das fezes							
<i>Trtrichomonas foetus</i>				<i>Pentatrichomonas hominis</i>			
	Positivo	Negativo			Positivo	Negativo	
Grande	13	157	7.6%	Grande	5	157	3.1%
Pequeno	1	66	1.5%	Pequeno	0	66	0.0%
p-value		0.0732		p-value		0.0628	
Frequência de defecação							
<i>Trtrichomonas foetus</i>				<i>Pentatrichomonas hominis</i>			
Positivo				Positivo			
< 1 vez ao dia	0	9	0.0%	< 1 vez ao dia	0	9	0.0%
1 a 2 vezes ao dia	0	204	0.0%	1 a 2 vezes ao dia	0	204	0.0%
> 2 vezes ao dia	14	10	58.3%	> 2 vezes ao dia	5	10	33.3%
p-value		<0.0001		p-value		0.0002	

Com relação a consistência fecal, 52,7% estavam normais, 34,4% pastosas, 7,1% ressecadas e 5,8% líquidas. Ou seja, 59,8% dos gatos não apresentaram manifestação clínica (fezes normais ou ressecadas) e 40,2% apresentaram casos de diarreia (fezes pastosas ou líquidas). Dos quadros de diarreia, 22,4% eram com caráter agudo (menos de duas semanas de evolução clínica) enquanto 18,7% eram de caráter crônico (mais de duas semanas de evolução clínica). (Figura 15)

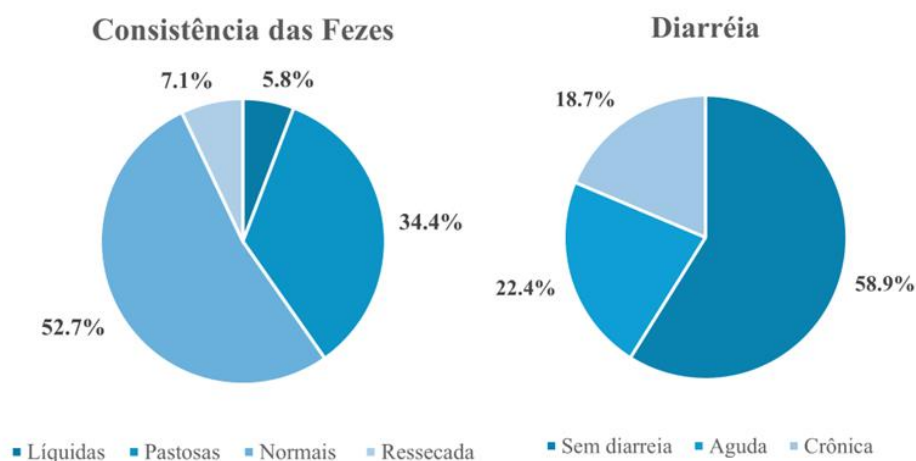


Figura 15: Gráficos com a prevalência dos tipos de consistência de fezes coletadas e distinção entre animais sem diarréia, com diarréia de caráter agudo ou crônico.

Comparando essas variáveis, foi obtido uma associação estatística significativa em ambas as parasitoses para animais com consistência de fezes mais amolecidas ($p < 0,0001$ para *T. foetus* e $p = 0,0109$ para *P. hominis*). Nos animais com diarréia e infectados pelos protozoários, foi observado uma associação significativa para aqueles que apresentam quadros crônicos ($p < 0,0001$ para *T. foetus* e $p = 0,0015$ para *P. hominis*) (Tabela 10)

Tabela 10: Análise estatística levando em consideração consistências das fezes e formas de apresentação clínica em casos de diarréia.

Consistência das fezes							
<i>Tritrichomonas foetus</i>				<i>Pentatrichomonas hominis</i>			
	Positivo	Negativo	% Positivos		Positivo	Negativo	% Positivos
Líquidas	0	12	0.0%	Líquidas	3	11	21.4%
Pastosas	14	68	17.1%	Pastosas	2	68	2.9%
Normais	0	126	0.0%	Normais	0	126	0.0%
Ressecadas	0	17	0.0%	Ressecadas	0	17	0.0%
<i>p-value</i>		<0.0001		<i>p-value</i>		0.0109	
Diarréia							
<i>Tritrichomonas foetus</i>				<i>Pentatrichomonas hominis</i>			
	Positivo	Negativo	% Positivos		Positivo	Negativo	% Positivos
Sem diarréia	0	142	0.0%	Sem diarréia	0	142	0.0%
Aguda	0	12	0.0%	Aguda	2	48	4.0%
Crônica	14	68	17.1%	Crônica	3	33	8.3%
<i>p-value</i>		<0.0001		<i>p-value</i>		0.0015	

Alguns trabalhos demonstram que a infecção por *T. foetus* e *P. hominis* pode ser assintomática em muitos animais (Gookin *et al.*, 2001; Foester *et al.*, 2004; Bastos *et al.*, 2019), entretanto, os resultados deste estudo mostram que todos os gatos positivos, para ambos os protozoários, apresentaram o sinal clínico de diarreia. Todos os gatos positivos, para *T. foetus* e *P. hominis*, apresentavam frequência de defecação superior a duas vezes ao dia. Para *T. foetus* todos os gatos positivos apresentam fezes pastosas e diarreia crônica (com duração superior a 14 dias). Já para *P. hominis*, os gatos variam com fezes de consistência líquidas (n = 3) e pastosas (n = 2) e evoluções agudas (n = 2) e crônicas (n = 3).

A diarreia causada por estes parasitos, segundo estudo de Sui *et al.* (2024), leva a alterações na composição da microbioma intestinal de gatos, causando disfunções. Esta disbiose pode ser a causa deste aumento da frequência de defecação, tendo em vista que o desequilíbrio na microbioma intestinal em animais com afecções gastrointestinais pode elevar a quantidade de vezes que os felinos evacuam (Bugrov *et al.*, 2022).

Estes resultados confirmam a associação da infecção de *T. foetus* e *P. hominis* com quadros de diarreias crônicas em gatos domésticos (Arranz-Solís *et al.*, 2016; Bastos *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2015; Levy *et al.*, 2003; Romatowski, 1996; Romatowski, 2000; Yao *et al.*, 2015; Zanini *et al.*, 2016). A causa desta diarreia por *T. foetus* pode ser analisada por uma possível disbiose intestinal e competição com as bactérias encontradas no microbioma fecal, conforme sugerido por Bierlein *et al.* (2021) ou pelos quadros de colite do tipo linfoplasmocitária conforme sugerido por Yaeger *et al.* (2005). Já em relação a *P. hominis* a infecção é normalmente associada a quadros de diarreias crônicas em gatos (Romatowski, 1996; Romatowski, 2000; Bastos *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2015; Levy *et al.*, 2003), porém ainda não é bem esclarecido sobre seus mecanismos de patogenicidade.

Neste trabalho foi encontrado um gato infectado por uma espécie de parabasalideo nunca descritos em gatos, o qual chamamos de *Simplicimonas*-like, devido a sua similaridade genética com o gênero. Esse animal apresentava diarreia crônica, com fezes pastosas e frequência de defecação superior a duas vezes ao dia. A descrição detalhada do animal positivo pode ser observada na Tabela 11. Esse animal apresentava residência na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, no bairro de Vargem Grande (Figura 16) em uma residência onde outros gatos apresentavam-se parasitados por *T. foetus* e *P. hominis*. Não foi realizada nenhuma análise estatística para esse protozoário por ter sido encontrado apenas um animal positivo.

Tabela 11: Características clínicas clínica e epidemiológica do gato positivo para *Simplicimonas-like*.

Variável	Caso de infecção
Sexo	Macho
Idade	2 anos
Raça	Sem raça definida
Tipo de residência	Abrigo
Acesso à rua	Não
Tipo de alimentação	Ração seca
Fornecimento de água	Torneira
Contactantes	Sim
Quais contactantes	Gatos
Usa caixa sanitária	Sim
Limpeza da caixa sanitária	1 vez ao dia
Consistência das fezes	Pastosa
Diarreia	Crônica
Coloração das fezes	Marrom
Volume das fezes	Grande
Frequência de defecação	Mais de 2 vezes ao dia
Doença prévia	Nenhuma relatada
Presença de outros parasitos	Ausente



Figura 16: Casos positivos para *Simplicimonas-like* na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Este é um gênero descrito há pouco tempo na classe Tritrichomonadea por Cepicka *et al.* (2010) como um flagelado do trato gastrointestinal a princípio sem características de patogenicidade. Não existem relatos de seu acometimento na espécie felina, porém já foram identificadas espécies para répteis, coelhos, cupins, peixe-lua, porquinhos-da-índia e primatas (Cepicka *et al.*, 2010). Em um estudo com aves por Lollis *et al.* (2011), foi amplificado DNA de outros parabasalídeos quando processadas amostras com primers que amplificam as regiões 5.8S, ITS-1 e ITS-2 rRNA, dentre eles 1 amostra obteve 93% de similaridade com *Simplicimonas hominis*. Já Frey *et al.* (2017) obteve resultados ainda mais interessantes ao realizar uma PCR em tempo real específica para *T. fetus* com swabs vaginais de vacas, obtendo amplificação de um DNA que, após sequenciamento, obteve 91% de similaridade com *Simplicimonas* sp. A observação de um novo parabasalídeo em associação com o trato gastrointestinal felino foi extremamente interessante e seria valioso tentar projetar um ensaio de PCR capaz de permitir a detecção específica desta espécie. Além disso, devem ser feitas tentativas para obter culturas deste parabasalídeo para permitir uma análise genética mais detalhada.

Comparando estes dados com o resultado obtido neste estudo podemos concluir que as técnicas de PCR utilizadas para diagnóstico de *T. fetus* podem gerar falso-positivos, tendo em vista que amplificam segmentos que podem ser comuns a outros parabasalídeos. Para distinguir a tricomoniase felina destes outros protozoários, é necessário a realização do sequenciamento do DNA, etapa essa que não é rotineiramente realizada, por exemplo, em laboratórios comerciais, seja por custos, tornando a técnica ainda mais cara por requerer produtos adicionais, quanto pelo fato de tornar o processamento mais demorado. Assim, identificamos um problema latente dentro do diagnóstico molecular de *T. fetus*, danificando um real conhecimento sobre sua prevalência e não detectando possíveis outros parasitas, que podem ser ter papéis comensais ou patogênicos, gerando ou não prejuízos à saúde dos animais.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo é possível concluir que:

- Os protozoários *T. foetus* e *P. hominis* ocorrem na região metropolitana do Rio de Janeiro;
- Animais de abrigos parecem ser mais acometidos pela infecção por estes dois protozoários;
- Todos os animais positivos para *T. foetus* e *P. hominis* apresentavam como sinal clínico a diarreia.
- Foi encontrado um gato parasitado com um terceiro parabasalídeo com 95% de similaridade com o gênero *Simplicimonas*;

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é um estudo que avaliou, além da prevalência de *T. foetus* e *P. hominis* na região metropolitana do Rio de Janeiro, detalhes de formas de apresentação clínica, e o perfil epidemiológico associado, possíveis relações com co-infecções e métodos diagnósticos detalhados.

A infecção por *T. foetus* em gatos domésticos se tornou, principalmente nos últimos anos, um tema em ascensão ao falarmos de quadros de diarreia crônica em gatos. Muito disso se deve a diversos relatos de insucessos e dificuldades no tratamento do quadro clínico em questão, frequentemente relacionado com doenças inflamatórias intestinais sem uma causa base esclarecida. Desta forma, buscamos causas destas disfunções que possam estar induzindo aos quadros inflamatórios, seja de forma direta ou através de um disbiose na microbiota intestinal. A tricomoníase felina demonstrou ter um papel tanto nesta indução inflamatória quanto na alteração da composição do microbioma intestinal tornando, assim, seu estudo tão importante. Contudo, desafios no seu diagnóstico tornam esse estudo dificultoso, seja por suas características de similaridades morfológicas com outros protozoários que apresentam o estágio de trofozoíta, crescimento em meios que também podem cultivar outras espécies ou curta sobrevivência no ambiente, diminuindo o tempo viável para sua detecção em métodos como exame direto ou cultura. Assim, são necessários métodos diagnósticos mais sensíveis, como o PCR, que notamos que podem levar a falsos-positivos. Assim, estudos de prevalência podem tornar-se subdiagnosticados ou superestimados.

Animais que sofrem um maior desafio ambiental pelo contato direto com outros animais, como aqueles que vivem em abrigos, gatis ou casas “multicat”, são relatados como predispostos. É necessária uma melhor conscientização em ambientes como esse que, na maior parte das vezes, utilizam medicamentos genéricos para tratar parasitoses de forma empírica, não conseguindo extinguir a tricomoníase devido seu metabolismo anaeróbico e particularidades terapêuticas, ou então dispõe de exames coproparasitológicos de rotina que podem dar falso-negativos. Observamos, durante este estudo, uma dificuldade em todos os abrigos visitados em conseguir controlar estes quadros de diarreias crônicas, com os gerenciadores e médicos veterinários responsáveis, durante a anamnese, relatando casos de diversos animais com diarreias há muitos meses - com diversos tratamentos ineficazes.

Este estudo, entretanto, visou uma abordagem diferente, buscando associação com outras parasitoses e outros parabasalídeos que podem gerar reações cruzadas durante sua detecção através de primers já bem estabelecidos e descritos em estudos anteriores, como TRF1 e TRF2. Foram desenvolvidos primers para se anelarem em regiões externas aos sítios de ligação dos mesmos e, assim, aumentando o limite de detecção para *T. foetus* e amplificando outros parabasalídeos como *P. hominis* e um DNA com aproximadamente 95% de semelhança com o gênero *Simplicimonas*. Este é um dado inédito para a espécie felina. Neste contexto, conclui-se que muitos diagnósticos feitos rotineiramente para *T. foetus* podem estar “errados” e que precisamos explorar mais dos parabasalídeos, entendendo melhor se existem outras espécies relevantes para a espécie felina. Sugere-se, assim, novos estudos acerca do tema.

Já o *P. hominis* é um protozoário ainda negligenciado e pouco compreendido. Há alguns anos era compreendido na mesma família de *T. foetus* e acreditava-se que não causava grandes prejuízos, tendo um papel comensal no trato gastrointestinal. Porém, os relatos estão crescendo em quadros de diarreia crônica, principalmente em co-infecções. Este estudo reforçou isso, encontrando uma relação significativa com animais portadores de diarreia há mais de 14 dias e com outras infecções, inclusive por *T. foetus*.

Entender melhor acerca destes parabasalídeos é de suma importância, são poucas informações encontradas na literatura e, destas, com descrições de populações pequenas para avaliar sintomas clínicos, fatores de risco e prevalência de forma relevante. Este estudo contribui para este entendimento, utilizando uma população de 241 gatos com características epidemiológicas diversificadas, além de estimular que novos sejam desenvolvidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, R. V. T. Perfil dos guardiões e características da população de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFBA em Salvador-Bahia, 2020.

ARRANZ-SOLÍS, D. *et al.* *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhea from densely housed origins. *Veterinary Parasitology*, v. 221, p. 118-122, 2016.

BASTOS, B. F. *et al.* *Pentatrichomonas hominis* infection in two domestic cats with chronic diarrhea. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, v. 4, n. 1, p. 2055116918774959, 2018.

BASTOS, B. F. *et al.* What is known about *Tritrichomonas foetus* infection in cats?. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2019.

BELL, E.T. *et al.* Naturally occurring *Tritrichomonas foetus* infections in Australian cats: 38 cases. *J Feline Med Surg* 12:889–898, 2010.

BENCHIMOL, M. The mastigont system in trichomonads. *Structures and Organelles in Pathogenic Protists*, p. 1-26, 2010.

BIERLEIN, M. *et al.* Dysbiosis of fecal microbiota in cats with naturally occurring and experimentally induced *Tritrichomonas foetus* infection. *Plos one*, v. 16, n. 2, p. e0246957, 2021.

BISSETT, S.A. *et al.* Feline diarrhoea associated with *Tritrichomonas cf. foetus* and *Giardia* co-infection in an Australian cattery. *Aust Vet J* 86:440–443, 2008.

BISSETT, S. A. *et al.* Observed occurrence of *Tritrichomonas foetus* and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats. *J Feline Med Surg* 11:803–807, 2009.

BOSCARO, V. *et al.* Updated classification of the phylum Parabasalia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 71, n. 4, p. e13035, 2024.

BRYAN, L. A. *et al.* Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch TF media. *Veterinary Record*, v. 144, n. 9, p. 227-232, 1999.

BUGROV, Nikolay et al. Fecal microbiota analysis in cats with intestinal dysbiosis of varying severity. *Pathogens*, v. 11, n. 2, p. 234, 2022.

BURGENER, I. A. et al. *Tritrichomonas foetus*: a new intestinal parasite in Swiss cats. *Schweiz Arch Tierheilkd* 151:383–389, 2010.

CARRASCO, L. P. S. Diagnóstico e tratamento de *Tritrichomonas foetus* em gatos com diarreia crônica. 44 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, p. 50, 2016.

CASTRÉN, L. et al. *Tritrichomonas foetus* as a cause of feline chronic large bowel diarrhoea. *Suomen Eläinlääkärilehti* 117:371–378, 2011.

CEPICKA, I. et al. Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist*, v. 161, n. 3, p. 400-433, 2010.

CEPICKA, I. et al. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 39, n. 2, p. 542-551, 2006.

CEPICKA, I. et al. Parabasalia. In: *Handbook of the Protists: Second Edition*. Springer International Publishing, p. 1175-1218, 2017.

CHALKOWSKI, Kayleigh et al. Who let the cats out? A global meta-analysis on risk of parasitic infection in indoor versus outdoor domestic cats (*Felis catus*). *Biology letters*, v. 15, n. 4, p. 20180840, 2019.

CLOTHIER, Kristin A. et al. Effects of bacterial contamination of media on the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* by culture and real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, v. 208, n. 3-4, p. 143-149, 2015.

CRUCITTI, T. et al. Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 510–516, 2004.

DĄBROWSKA, Joanna et al. Comparison study of four extraction methods combined with PCR and LAMP for feline *Tritrichomonas foetus* detection in fecal samples. *Pathogens*, v. 11, n. 5, p. 604, 2022.

DACUNHA, A. M.; MUNIZ, J. Sobre um flagelado parasito do gato. Trab Inst Oswaldo Cruz, v. 36, p. 285-286, 1922.

DAHLGREN, S. S. *et al.* First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus. J Small Anim Pract 48:654–657, 2007.

DA SILVA, Marcio Heitor Stelmo. Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados: Barbacena, Minas Gerais-2006. 2007.

DIAMOND, Louis S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. The Journal of parasitology, v. 43, n. 4, p. 488-490, 1957.

DOĞAN, N.; TÜZEMEN, N. Ü.. Three *Pentatrichomonas hominis* cases presenting with gastrointestinal symptoms. Türkiye Parazitoloji Dergisi, v. 42, n. 2, p. 168, 2018.

DOI, J. *et al.* Intestinal *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) infection in Japanese cats. J Vet Med Sci 74:413–417, 2012

DOS SANTOS, Caroline S. *et al.* Diagnosis of *Pentatrichomonas hominis* from domestic cats in Southeastern Brazil. Braz J Vet Med, v. 37, p. 25-31, 2015.

EVERMANN, James F.; WILLS, Tamara B. Immunologic development and immunization. Small animal pediatrics, p. 104, 2010.

FAUST, E. C. *et al.* Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. The Journal of Parasitology, v. 25, n. 3, p. 241-262, 1939.

FELLEISEN, R. S. J. Comparative sequence analysis of 5· 8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology, v. 115, n. 2, p. 111-119, 1997.

FELLEISEN, R. S. J. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. Microbes and Infection, v. 1, n. 10, p. 807-816, 1999.

FERNANDES, P. R. *et al.* Construção de iniciadores e otimização de ensaios de PCR e de nested-PCR para a detecção específica de *Tritrichomonas foetus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 133-138, 2008.

FORSHELL, U., OSTERMAN-LIND, E. Chronic diarrhoea caused by *Tritrichomonas foetus* in the cat. Svensk Veterinärtidning 62:19–21, 2010.

FOSTER, D. M. *et al.* Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. J Am Vet Med Assoc 225:888–892, 2004.

FREY, C. F. *et al.* Simplicimonas-like DNA in vaginal swabs of cows and heifers cross-reacting in the real-time PCR for *T. foetus*. **Veterinary parasitology**, v. 237, p. 30-36, 2017.

FREY, C.F. *et al.* Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR. Parasitol Res 104:783–788 97, 2009.

GALIÁN, M. *et al.* *Tritrichomonas foetus* as a cause of diarrhoea in cats. Tierärztliche Umschau Parasiten-Spezial 1:5-8, 2011.

GALIÁN, M. *et al.* *Tritrichomonas foetus* in cats. Argos- Informativo Veterinario 134:44-45, 2011.

GENBANK. *Cyniclomycetes guttulatus* (accession number MW357595), sequence derived from a Brazilian dog. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2021).

GENBANK. *Cyniclomycetes guttulatus* (accession number MW358144), sequence derived from a Brazilian rabbit. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2021).

GENBANK. *Pentatrichomonas hominis* (accession number KC594038), sequence derived from a cat in the Czech Republic. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2013).

GENBANK. *Pentatrichomonas hominis* (accession number OR414663), sequence derived from a dog in China. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2023).

GENBANK. *Pentatrichomonas hominis* (accession number PQ276130), sequence derived from an antelope in China. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2024).

GENBANK. *Simplicimonas* sp. (accession number HQ334182), sequence derived from isolate GABC1 recovered from a chicken in the United States. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2010).

GENBANK. *Simplicimonas* spp. (accession number KY410341), sequence derived from a bovine vaginal smear in Switzerland. Includes 18S rRNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1), 5.8S rRNA gene, internal transcribed spacer 2 (ITS2), and 28S rRNA gene (partial and complete sequences). National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2017)

GENBANK. *Tritrichomonas foetus* (accession number GU170219), sequence derived from a bovine isolate in India. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2010).

GENBANK. *Tritrichomonas foetus* (accession number HM856630), sequence derived from a feline isolate in Norway. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2011).

GENBANK. *Tritrichomonas foetus* (accession number JN106455), sequence derived from a bovine isolate in China. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2012)

GENBANK. *Tritrichomonas foetus* (accession number MK770839), sequence derived from a bovine isolate in Spain. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2019).

GENBANK. *Tritrichomonas foetus* (accession number ON464699), sequence derived from a bovine isolate in Austria. National Center for Biotechnology Information (NCBI), (2022)

GERMAN, A. C. *et al.* Faecal consistency and risk factors for diarrhoea and constipation in cats in UK rehoming shelters. *J Feline Med Surg.* 19(1): 57-65, 2017.

GOOKIN, J. L. *et al.* Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 215:1450–1454, 1999.

GOOKIN, J. L. *et al.* Efficacy of ronidazole for treatment of feline *Tritrichomonas foetus* infection. *J Vet Intern Med* 20:536–543, 2006.

GOOKIN, J. L. *et al.* Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *American journal of veterinary research*, v. 62, n. 11, p. 1690-1697, 2001.

GOOKIN, J. L. *et al.* Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. *Veterinary parasitology*, v. 145, n. 1-2, p. 11-15, 2007.

GOOKIN, J. L. *et al.* Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 6, p. 2707-2710, 2004.

GOOKIN, J. L. *et al.* Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 11, p. 4126-4130, 2002.

GOOKIN, J. L. *et al.* The conundrum of feline trichomonosis: The more we learn the 'trickier' it gets. *Journal of feline medicine and surgery*, v. 19, n. 3, p. 261-274, 2017.

GOOKIN, J. L. *et al.* Use of a commercially available culture system for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 222, n. 10, p. 1376-1379, 2003.

GRANGER, B. L. *et al.* Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus* *Parasitol. Res.* 86:699-709, 2000.

GRAY, S.G. *et al.* Assessment of reproductive tract disease in cats at risk for *Tritrichomonas foetus* infection. *Am J Vet Res* 71:76–81, 2010.

GUNN-MOORE, D. A. *et al.* Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in the UK. *J Feline Med Surg* 9:214–218, 2007.

GUUN-MOORE, D. A., TENNANT, B. *Tritrichomonas foetus* diarrhoea in cats. *Vet Rec* 160:850–851, 2007

HAFEZ, H. M. *et al.* Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. *Avian diseases*, v. 49, n. 3, p. 366-370, 2005.

HALE, Sophie; NORRIS, Jacqueline M.; ŠLAPETA, Jan. Prolonged resilience of *Tritrichomonas foetus* in cat faeces at ambient temperature. *Veterinary parasitology*, v. 166, n. 1-2, p. 60-65, 2009.

HANKS, John H.; WALLACE, Roslyn E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 71, n. 2, p. 196-200, 1949.

HAYES, D. C.; ANDERSON, R. R.; WALKER, R. L. Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction

fragment length polymorphism typing. Journal of veterinary diagnostic investigation, v. 15, n. 4, p. 390-394, 2003.

HEDGESPEETH, B. A. et al. Association of fecal sample collection technique and treatment history with *Tritrichomonas foetus* polymerase chain reaction test results in 1717 cats. Journal of veterinary internal medicine, v. 34, n. 2, p. 734-741, 2020.

HENRIKSEN, S.A. et al. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet Scand. 22(3-4):594-6, 1981

HENSINGER, T. *Trichomonas foetus*. A pathogen responsible for diarrhoea in cats. Weterynaria w Praktyce 6:80–81, 2009.

HOLLIDAY, M.; DENI, D.; GUNN-MOORE, D. A. *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in a rescue colony in Italy. Journal of Feline Medicine & Surgery, v. 11, n. 2, p. 131-134, 2009.

HORA, A. S. et al. Report of the first clinical case of intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in a cat with chronic diarrhoea in Brazil. BMC Veterinary Research, v. 13, p. 1-4, 2017.

HOSEIN, A. et al. Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario. J Feline Med Surg 15:706–711, 2013.

KATHER, E. J. et al. Determination of the in vitro susceptibility of feline *Tritrichomonas foetus* to 5 antimicrobial agents. J Vet Intern Med 21:966–970, 2007.

KESSEL, J. Trichomoniasis in kittens. Trans R Soc Trop Med Hyg 1928; 22: 61-80.

KIM, Y et al. PCR detection and molecular characterization of *Pentatrichomonas hominis* from feces of dogs with diarrhea in the Republic of Korea. Korean J Parasitol. 48: 9–13, 2010.

KINGSBURY, D. D. et al. Identification of *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* spp. infection in pedigree show cats in New Zealand. N Z Vet J 58:6–10, 2010.

Klein B, Langbein-Detsch I, Muller E, Heusinger A. Prävalenz von *Tritrichomonas foetus* in Kotproben von Katzen mit Durchfall aus Deutschland. Kleintiermedizin. 7/8: 243-247, 2010.

KUEHNER, K. A. *et al.* *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. J Feline Med Surg 13:251–258, 2011.

LAVALLEE, J. Tritrichomoniasis. In: NORSWORTHY, G. D. The feline patient. John Wiley & Sons, p. 645-647, 2018.

LEVY, Michael G. *et al.* *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. Journal of Parasitology, v. 89, n. 1, p. 99-104, 2003.

LIM, S *et al.* First report of feline intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in Korea. Korean J Parasitol 48:247–251, 2010.

LI, W. *et al.* Molecular and morphologic identification of *Pentatrichomonas hominis* in swine. Veterinary Parasitology, v. 202, n. 3-4, p. 241-247, 2014.

LOLLIS, L. *et al.* Molecular characterization of *Histomonas meleagridis* and other parabasalids in the United States using the 5.8 S, ITS-1, and ITS-2 rRNA regions. Journal of Parasitology, v. 97, n. 4, p. 610-615, 2011.

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, v. 3, n. 1, 1996.

MANCIANTI, F. *et al.* A retrospective molecular study of select intestinal protozoa in healthy pet cats from Italy. J Feline Med Surg 17:163–167, 2015

MARDELL, E. J., SPARKED, A. H. Chronic diarrhoea associated with *Tritrichomonas foetus* infection in a British cat. Vet Rec 158:765–766, 2006.

MCMILLEN, Lyle; LEW, Ala E. Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. Veterinary parasitology, v. 141, n. 3-4, p. 204-215, 2006.

- MEGGIOLARO, Maira N. et al. Comparison of multiplexed-tandem real-time PCR panel with reference real-time PCR molecular diagnostic assays for detection of *Giardia intestinalis* and *Tritrichomonas foetus* in cats. *Veterinary parasitology*, v. 266, p. 12-17, 2019.
- MIRO, G *et al.* First description of naturally acquired *Tritrichomonas foetus* infection in a Persian cattery in Spain. *Parasitol Res* 109:1151–1154, 2011.
- MORIN-ADELINE, V. *et al.* Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline isolates of *Tritrichomonas foetus*: consequences for in silico drug-target identification. *BMC genomics*, v. 15, p. 1-18, 2014.
- MOSTEGL, M. M. *et al.* Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. *Vet Parasitol* 183:209–214, 2012
- MUGNAINI, L *et al.* Pattern and predictive factors of endoparasitism in cats in Central Italy. *Rev Med Vet* 163:89–94, 2012.
- NODA, S. *et al.* Molecular phylogeny and evolution of parabasalia with improved taxon sampling and new protein markers of actin and elongation factor-1 α . *PloS one*, v. 7, n. 1, p. e29938, 2012.
- PHAM, D. Chronic intermittent diarrhea in a 14-month-old Abyssinian cat. *Can Vet J* 50:85–87, 2009
- PARIS, J. K. *et al.* Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. *BMC Veterinary Research*, v. 10, p. 1-11, 2014.
- PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. *Tritrichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. *Protist*, v. 160, n. 4, p. 536-551, 2009.
- POLAK, K. C. *et al.* Infectious diseases in large-scale cat hoarding investigations. *Vet J* 201:189–19, 2014.
- PROFIZI, C. *et al.* Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. *Vet Parasitol* 196:50–55, 2013

- QUEEN, E.V. *et al.* Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from Northern California. *J Vet Intern Med* 26:54–60, 2012.
- RIEGLER, L. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico diferencial de *Tritrichomonas foetus* en cultivos positivos de parásitos de la familia Trichomonadidos. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de La Plata, 2016.
- ROMATWOSKI, J. An uncommon protozoan parasite (*Pentatrichomonas hominis*) associated with colitis in three cats. 1996.
- ROMATWSKI, J. *Pentatrichomonas hominis* infection in four kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 216, n. 8, p. 1270-1272, 2000.
- ROSADO, T.W. *et al.* Neurotoxicosis in 4 cats receiving ronidazole. *J Vet Intern Med* 21:328–331, 2007.
- ROSYPAL, A. C. *et al.* Survival of a feline isolate of *Tritrichomonas foetus* in water, cat urine, cat food and cat litter. *Veterinary parasitology*, v. 185, n. 2-4, p. 279-281, 2012.
- SANTOS, C. S. dos *et al.* Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 12, p. 980-988, 2015.
- SCHREY, C. *et al.* *Tritrichomonas foetus* as a cause of diarrhoea in three cats. *Kleintierpraxis* 54:93–96, 2009.
- SILVA, O. R. *et al.* Identification of *Pentatrichomonas hominis* in preputial washes of bulls in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Jul 4;31(2):e005322, 2022
- SILVA, Y. H. da *et al.* Prevalence of gastrointestinal parasites in domestic cats (*Felis catus*) diagnosed by different coproparasitological techniques in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 32, p. e006223, 2023.
- ŠLAPETA, J. *et al.* Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *International journal for parasitology*, v. 42, n. 13-14, p. 1143-1149, 2012.

SLOSS, M. W. *et al.* Parasitologia clínica veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

STAUFFER, S. H. *et al.* Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 20, n. 5, p. 639-641, 2008.

STEINER, J. M. *et al.* Identification of *Tritrichomonas foetus* DNA in feces from cats with diarrhea from Germany and Austria. J Vet Intern Med 21:649, 2007.

STOCKDALE, H. D. *et al.* *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. Vet Parasitol 160:13–17, 2009.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The fecal microbiome in cats with diarrhea. PloS one, v. 10, n. 5, p. e0127378, 2015.

SUI, Yuzhen *et al.* Gut microbiota and *Tritrichomonas foetus* infection: A study of prevalence and risk factors based on pet cats. Preventive Veterinary Medicine, v. 226, p. 106162, 2024.

TACHEZY, J. (Ed.). Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes. Springer, 2019.

TRAPP, Sílvia Manduca *et al.* Population demographic survey and ownership of pet dogs and cats from a small city of southern Brazil. Semina: Ciências Agrárias, v. 36, n. 5, p. 3211-3225, 2015.

TYSNES, K. *et al.* A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. Acta Veterinaria Scandinavica, v. 53, p. 1-6, 2011.

VAN DOORN DC, de B. M. J. *et al.* Prevalence of *Tritrichomonas foetus* among Dutch cats. Tijdschr Diergeneeskde 134:698–700, 2009.

WALDEN, Heather Stockdale *et al.* A new species of *Tritrichomonas* (Sarcomastigophora: Trichomonida) from the domestic cat (*Felis catus*). Parasitology research, v. 112, p. 2227-2235, 2013.

WARTONÁ, A.; HONIGBERG, B. M. Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. The Journal of protozoology, v. 26, n. 1, p. 56-62, 1979.

WENRICH, D. H. Morphology of the Intestinal Trichomonad Flagellates in Man and of Similar Forms in Monkeys, Cats, Dogs and Rats. 1944.

XENOULIS, P. G *et al.* Detection of *Tritrichomonas foetus* in cats in Greece. J Feline Med Surg 12:831–833, 2010.

XENOULIS, P. G. *et al.* Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. Journal of feline medicine and surgery, v. 15, n. 12, p. 1098-1103, 2013.

YAEGER, M. J., GOOKIN, J. L. Histologic features associated with *tritrichomonas foetus*-induced colitis in domestic cats. Vet Pathol 42:797–804, 2005.

YAO, C., KÖSTER, L.S. *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. Vet Res 46, 35, 2015.

ZANZANI, S. A. *et al.* Coinfection with *Tritrichomonas foetus* and *Giardia duodenalis* in two cats with chronic diarrhea. **Case Reports in Veterinary Medicine**, v. 2016, n. 1, p. 5705168, 2016

1. Anexo

Anexo 1 Protocolo Comissão de Ética-PRPPG/UFRRJ



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Prevalência, fatores de risco e avaliação de alternativas de tratamento para *Tritrichomonas foetus* em gatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 1214220224 (ID 002727), sob a responsabilidade de **Fabio Barbour Scott e equipe; Ester Oliozi Marré; Dandara Quelho Rosa ; Gabriela Pereira Salça de Almeida; Diefrey Ribeiro Campos; Juliana de Moraes Intriéri; Larissa de Oliveira Santos; Anna Carolina Teixeira de Jesus; Maria Vitoria dos Santos Pascoal** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 01/04/2024.

We certify that the proposal "Prevalence, risk factors and evaluation of treatment alternatives for *Tritrichomonas foetus* in cats in the state of Rio de Janeiro, Brazil.", utilizing 458 Cats (males and females), protocol number CEUA 1214220224 (ID 002727), under the responsibility of **Fabio Barbour Scott and team; Ester Oliozi Marré; Dandara Quelho Rosa ; Gabriela Pereira Salça de Almeida; Diefrey Ribeiro Campos; Juliana de Moraes Intriéri; Larissa de Oliveira Santos; Anna Carolina Teixeira de Jesus; Maria Vitoria dos Santos Pascoal** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 04/01/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2024 a 04/2025 Área: Parasitologia Animal

Origem: Acolhimento e Monitoramento Animal da UFRRJ - AMA

Espécie: Gatos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 20 anos	Quantidade: 50
Linhagem: SRD		Peso: 1 a 12 kg	

Origem: Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da UFRRJ

Espécie: Gatos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 20 anos	Quantidade: 100
Linhagem: SRD		Peso: 1 a 12 kg	

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Gatos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 20 anos	Quantidade: 308
Linhagem: SRD		Peso: 1 a 12 kg	

Seropédica, 10 de abril de 2024

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Viviane de Souza Magalhães
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

