

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

PARABASALÍDEOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS:
MORFOLOGIA, DIAGNÓSTICO E ALGUMAS
CONSIDERAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

TESE

CAROLINE SPITZ DOS SANTOS

2016



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

**PARABASALÍDEOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS: MORFOLOGIA,
DIAGNÓSTICO E ALGUMAS CONSIDERAÇÕES
EPIDEMIOLÓGICAS**

CAROLINE SPITZ DOS SANTOS

Sob a orientação do Professor

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

Coorientação da Professora

Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus

Tese submetida como requisito para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Área de concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

636.089696

S237p

T

Santos, Caroline Spitz dos, 1984-
Parabasalídeos de animais domésticos:
morfologia, diagnóstico e algumas considerações
epidemiológicas / Caroline Spitz dos Santos. -
2016.

158 f.: il.

Orientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 108-124.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. Gato -
Parasito - Teses. 3. Trichomonadidae - Teses. 4.
Diagnóstico parasitológico veterinário - Teses. I.
Lopes, Carlos Wilson Gomes, 1947- II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

CAROLINE SPITZ DOS SANTOS

Tese submetida como pré-requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

Aprovada em: 25/02/2016



Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes PhD, LD - UFRRJ



Dr. Bruno Pereira Berto DSc - UFRRJ



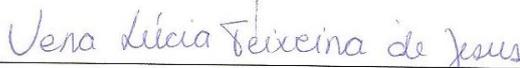
Dr. Sergian Vianna Cardozo DSc - UNIGRANRIO



Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida DSc - UFF



Dr. Paulo Daniel Sant'Ana Leal DSc - CTIVet



Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus DSc - UFRRJ

BIOGRAFIA

CAROLINE SPITZ DOS SANTOS, filha de Og dos Santos e Maria de Lourdes Spitz dos Santos. Nasceu em 13 de maio de 1984, no município de Nova Friburgo, RJ. Estudou na Escola Estadual Carlos Maria Marchon em Lumiar 5º Distrito de Nova Friburgo até completar o ensino básico. Em 1998, ingressou no Instituto de Educação de Nova Friburgo (IENF) no curso de formação de professores onde se formou em 2001. Em novembro de 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde teve a oportunidade de fazer vários estágios nas áreas de Patologia Clínica, Nutrição de equinos, Clínica de pequenos animais e Reprodução equina. Foi bolsista de Iniciação Científica em 2008 na área de nutrição equina. Em 2009, foi monitora das disciplinas Histopatologia geral e Histopatologia especial. Formou-se no final do mesmo ano em Medicina Veterinária. Em março de 2010, ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária na área de concentração em Patologia Animal desta IFES, em nível de mestrado, desenvolvendo como tema de Dissertação com o projeto intitulado “**Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento**” sob a orientação da Prof. Dr. Júlio César Ferraz Jacob. Recebeu o título de Mestre em Ciências em Medicina Veterinária em fevereiro de 2012. Em março deste mesmo ano ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal em nível de doutorado desta IFES.

Dedicatória

Aos meus pais Og dos Santos e Maria de Lourdes S. dos Santos, que dedicaram suas vidas a realizar meus sonhos, por terem paciência e compreenderem minhas ausências. Ao meu irmão Marcus Vinícius por seu amor, carinho e apoio.

Ao meu namorado Daniel Guedes Jr., por sua dedicação em me fazer feliz, ser meu companheiro e amigo sempre. Aos pais dele (Daniel e Janete Guedes) por me tornarem parte de sua família.

Sou grata a Deus por colocar todos em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao meu orientador **Professor Dr. Carlos Wilson Gomes** por seus ensinamentos e conversas informais, de onde tirávamos diversas conclusões de vida e de pesquisa. Por sua paciência e dedicação em me apoiar, e por me mostrar o verdadeiro papel de um orientador e de professor sempre com muita humildade e grande conhecimento. Agradeço por todo o seu empenho durante os anos que passei no Laboratório de Coccídios e Coccidioses.

Agradeço a minha coorientadora **Professora Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus**, por me apoiar e incentivar todos esses anos, desde a graduação até o presente momento. Foram muitas as dificuldades, mas em todas elas esteve presente com sua calma e bom senso me dando suporte e incentivo para continuar. Agradeço a Deus por ter posto em meu caminho uma pessoa tão generosa e amiga. Deixo aqui meu registro de quanto a admiro e respeito como profissional e como pessoa. Aprendi muito com seus ensinamentos!

Agradeço ao Professor **José E. Três** por todos os ensinamentos, por acompanhar o meu progresso, mesmo que de longe. Agradeço por seu carinho e preocupação comigo e com o meu trabalho.

Agradeço aos Professores **Dr. Bruno Pereira Berto** e **Dr. Douglas McIntosh** por me ajudarem, cada um em sua área, com seus conhecimentos e também na execução do conteúdo dessa tese.

Aos Técnicos do LCC, **Walter Flausino** que me ajudou a iniciar o doutorado e me acompanhou em vários momentos e **Walter Teixeira Filho** que esteve presente em várias etapas do processo me aconselhando e passando seus conhecimentos científicos.

Aos amigos que fiz durante esse período: **Gideão Galvão**, **Gilberto Flausino**, **Lianna Balthazar**, **Gisele Meireles** e **Bruno Lopes**.

Em especial, aos amigos do clubinho do café: **Tássia Furtado** e **João Varela**, que sempre estiveram dispostos a me ajudar no LabMol. À **Caroline Cunha Carreiro**, que hoje tenho por amiga, e que me ajudou durante esse período e por quem tenho um carinho enorme. Conte comigo sempre! À **Cleide Domingues Coelho** que me ajudou em muitos momentos com seus conselhos, incentivos e risadas. Obrigada por sua ajuda e amizade!

LISTA DE TABELAS

	Págs.
Tabela 1. Morfologia comparativa de trofozoítos de <i>Pentatrichomonas hominis</i> isolados de gatos e humanos	37
Tabela 2. Morfologia comparativa de trofozoítos de <i>Tritrichomonas foetus</i> isolados de gatos domésticos e de vários hospedeiros animais	72
Tabela 3. Presença de <i>Pentatrichomonas hominis</i> em gatos do Laboratório de Química Experimental para Produtos Veterinários, IV/UFRRJ	100
Tabela 4. Presença de Parabasalídeos em gatos atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ	115

LISTA DE QUADROS

	Págs.
Quadro 1. Sequência dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos parabasalídeos isolados de gatos	27
Quadro 2. Relatos da ocorrência de <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Pentatrichomonas hominis</i> em gatos no mundo	93

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Esquema geral de microscopia eletrônica de <i>Trichomonas vaginalis</i> (BENCHIMOL, 2004) (A); fotomicrografia de trofozoíto de <i>Tritrichomonas foetus</i> (B) (CDC, 2015)	7
Figura 2. Esquema geral de microscopia eletrônica de <i>Tritrichomonas foetus</i> (A) (BENCHIMOL, 2004); fotomicrografia de trofozoíto de <i>T. foetus</i> (B) (RIBEIRO et al., 2000)	8
Figura 3. Desenho esquemático de <i>Pentatrichomonas hominis</i> isolados de vários hospedeiros. A-C: Humano; D: Macaco <i>Rhesus</i> ; E: Gato; F: Cão; G: Rato (WENRICH, 1944)	17
Figura 4. Desenho esquemático de <i>Pentatrichomonas hominis</i> isolado de humanos, exibindo forma de divisão múltipla (WENRICH, 1944).	20
Figura 5. Trofozoítos: FA (flagelos) e AX (axóstilo). <i>Pentatrichomonas hominis</i> exibindo cinco flagelos anteriores (A) e <i>Tritrichomonas foetus</i> com três flagelos anteriores (B) (SÁNCHEZ; BOERO, 2013) .	23
Figura 6. Trofozoítos de <i>Pentatrichomonas hominis</i> em processo de divisão binária, apresentando dois núcleos (NU), dois grupos distintos de flagelos anteriores (FA) (A, B e D). Hematoxilina Férrica. Obj. 100X	30
Figura 7. Trofozoítos de <i>Pentatrichomas hominis</i> em divisão múltipla. (A) Forma globosa apresentando três núcleos (NU) (setas); (B) Trofozoítos em processo de citocinese (setas); (C e D) Citocinese de quatro trofozoítos, apresentando grupos de flagelos anteriores externalizados (FA) (setas). Hematoxilina Férrica. Obj. 100X	31
Figura 8. Forma multinucleada e multiflagelada de <i>Pentrichomonas hominis</i> isolado de gato. (NU) núcleos, (FA) flagelos. Eosina (2%). Obj. 100X	32
Figura 9. Formas variadas de <i>Pentatrichomonas hominis</i> isolados de gatos. A e B: formato arredondado apresentando vesículas de endocitose (setas) (A: hematoxilina férrica; B: preparação úmida com eosina); C e D: formato piriforme (hematoxilina férrica). Obj. 100X	34

- Figura 10.** **A:** Trofozoíto de *Pentatrichomonas hominis* em formato típico apresentando cinco flagelos anteriores (FA), Eosina 2%; **B:** Trofozoíto com apenas quatro flagelos anteriores (Hematoxilina Férrica); **C:** Flagelo posterior (FP) de *P. hominis* (seta). Eosina 2%. Obj. 100X 35
- Figura 11.** *Pentatrichomonas hominis*: **A** - Trofozoíto apresentando núcleo redondo (NU), membrana ondulante (MO), e o pelta (PE) na porção anterior do corpo por onde emergem os flagelos; **B** - Estruturas do citoesqueleto, costa delgado (CO), pelta (PE), visualização do corpo parabasal (CP) (setas); **C** - trofozoíto com costa visível (seta); **D** - trofozoíto apresentando as três estruturas que compõem o citoesqueleto, Costa (CO), Pelta (PE), Axóstilo (AX). A e C: Hematoxilina Férrica; B e D eosina. Obj. 100X 38
- Figura 12.** Desenho esquemático trofozoíto de *Pentatrichomonas hominis* isolado de gatos domésticos *Felis catus*. Ax – axóstilo; Co – costa; Nu – núcleo; Cp – corpo parabasal; Pe – pelta; MO – Membrana ondulante; FA - flagelos anteriores; FP - flagelo posterior; Ve – Vesícula de endocitose. Barra de escala = 5 µm 40
- Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TFR1 e TFR2. Marcador de peso molecular de 100pb (linha 1), controle negativo (linha 2), amostras de cultura de parabasalídeos isolados de gatos (linhas 3-12), controle negativo (linha 14), controle positivo *Tritrichomonas foetus* cepa K (linha 15) 41
- Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TH3 e TH5. Controle negativo (linha 1); amostras de cultura de isolados de gatos (linhas 2-12); controle negativo (linha 13); Controle da extração (linha 14); *Tritrichomonas foetus* cepa K (linha 15); Controle positivo *Pentatrichomonas hominis* (linha 15); Marcador de peso molecular de 100pb (linha 17) 42
- Figura 15.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% das amostras amplificadas com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos a digestão com a enzima de restrição Hae III de *Pentatrichomonas hominis*. 44
- Figura 16.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% das amostras de *Pentatrichomonas hominis* amplificadas com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos a digestão com a enzima de restrição Hinf I 45

	Págs.
Figura 17. Desenho esquemático sobre a morfologia de <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Tritrichomonas suis</i> . A: <i>T. foetus</i> isolado de bovino por Wenrich e Emmerson (1933); B: <i>T. foetus</i> isolado bovino (KIRBY, 1951); <i>T. suis</i> (= <i>T. foetus</i>) isolado de suíno (HIBLER, 1960)	48
Figura 18. Desenho esquemático de <i>Tritrichomonas foetus</i> isolado de bovino, indicando a parte protusa do axóstilo (seta) (KIRBY, 1951)	49
Figura 19. Desenho esquemático de <i>Tritrichomonas foetus</i> e <i>Pentatrichomonas hominis</i> demonstrando as diferenças no número de flagelos e formato da parte protusa do axóstilo. A: <i>T. foetus</i> (WENRICH; EMMERSON, 1933). B: <i>P. hominis</i> (WENRICH, 1944)	60
Figura 20. Processo de divisão binária por <i>T. foetus</i> isolados de gatos. A: Duplicação do núcleo (NU); B: Duplicação de outras estruturas como pelta, axóstilo e membrana ondulante (MO); C: Início da citocinese pela parte anterior do trofozoíto; D: Separação pela parte posterior, através dos axóstilos. Panótico rápido, Obj. 100X	65
Figura 21. <i>Tritrichomonas foetus</i> apresentando formas multinucleadas. A: Células em processo de citocinese; B e C: formas arredondadas multinucleadas e multiflageladas; D: Divisão binária. Panótico rápido. Obj. 100X	66
Figura 22. Formatos dos trofozoítos de <i>Tritrichomonas foetus</i> isolados de gatos. A: formato piriforme característico. B: aspecto alongado; C: Visualização de estruturas como axóstilo (Ax), membrana ondulante (MO) e flagelo posterior (FP); D: Trofozoíto com três flagelos anteriores (FA). Panótico rápido. Obj. 100X	68
Figura 23. Fotomicrografia de estruturas celulares presentes em <i>Tritrichomonas foetus</i> isolados de gatos. A: Presença nítida do Pelta (PE) em formato de vírgula na parte anterior do corpo do parasito e <i>Capitulum</i> do axóstilo (CA). B: Trofozoíto com a costa nitidamente visível logo abaixo a membrana ondulante e acompanhando toda a sua extensão. C: três flagelos anteriores (FA), núcleo (NU) de formato oval alongado e corpo parabasal (CP) visível localizado dorsalmente ao núcleo. D: formato típico de axóstilo (AX), flagelo posterior (FP) demarcando o final da membrana ondulante. Panótico rápido. Obj. 100X	69

Figura 24. Desenho esquemático trofozoíto de <i>Tritrichomonas foetus</i> isolado de gatos domesticados <i>Felis catus</i> . Ax – axóstilo; Co – costa; Nu – núcleo; Cp – corpo parabasal; Pe – pelta; MO – Membrana ondulante; FA - flagelos anteriores; FP - flagelo posterior	74
Figura 25. <i>Tritrichomonas foetus</i> isolado de gato. Em destaque, estruturas como axóstilo (AX) (Observar a ponta do axóstilo na seta), membrana ondulante (MO), flagelo posterior (FP) e um dos flagelos anteriores (FA). MEV	75
Figura 26. Trofozoíto de <i>Tritrichomonas foetus</i> onde se observam três flagelos anteriores (FA) e axóstilo (AX). MEV	76
Figura 27. Trofozoíto de <i>Tritrichomonas foetus</i> apresentando, pelta visível (PE), canal flagelar por onde saem os flagelos anteriores (FA). A membrana ondulante com o flagelo posterior ligado ao corpo do parasito por uma fina camada. MEV.....	77
Figura 28. <i>Tritrichomonas foetus</i> isolado de gatos. Estruturas observadas: axóstilo (AX), hidrogenossomo (H), lisossoma (L). Também é possível ver grânulos de glicogênio no axóstilo (pontos mais escuros). MET	79
Figura 29. <i>Tritrichomonas foetus</i> demonstrando detalhes ultraestruturais do axóstilo (tronco do axóstilo) (AX), Núcleo de formato oval (NU); Costa (CO), membrana ondulante (MO) e flagelo posterior; Grânulos de glicogênio próximo ao axóstilo; vários hidrogenossomas de tamanho variado. MET	80
Figura 30. Trofozoíto de <i>Tritrichomonas foetus</i> . Costa (CO) evidente no centro, com bandas claras e escuras; flagelo anterior (FA) em corte longitudinal; membrana ondulante (MO) e flagelo posterior (FP) em corte transversal; hidrogenossomos (H) associados ao Costa. MET ...	82
Figura 31. Trofozoíto de <i>Tritrichomonas foetus</i> onde se nota a presença o grupo de três flagelos anteriores (FA). Costa (CO) e hidrogenossomos (H). MET	83

- Figura 32.** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TFR1 e TFR2. Controle negativo (linha 1), poçovazio (linha 2); amostras de *Tritrichomonas foetus* isolados de felinos (linhas 3-6); controle negativo (linha 8); Controle da extração (linha 9); poço vazio (linha 10); controle positivo de *T. foetus* cepa K (linha 11); marcador de peso molecular 100bp (linha 12) 85
- Figura 33.** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TFR3 e TFR4. Controle negativo (linha 1); amostras de *Tritrichomonas foetus* de gatos (linhas 2-5), controle da extração (linha 6); controle negativo (linha 7); Controle positivo de *T. foetus* cepa K (linha 8); marcador de peso molecular 100bp (linha 9) 86
- Figura 34.** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TH3 e TH5. Controle negativo (linha 1); amostras de *P. hominis* de gatos (linhas 2-4), controle da extração (linha 5); controle negativo (linha 7); Controle positivo de *Pentatrichomonas. hominis* (linha 8); marcador de peso molecular 100bp (M) 89
- Figura 35.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% das digestões dos produtos de DNA de *Pentatrichomonas hominis* amplificados com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos a digestão com a enzima de restrição Hinf I (linhas 1-3) e HAE III (linhas 5-7) marcador de peso molecular de 50pb (M) 90

LISTA DE ANEXOS

	Págs.
Anexo 1. Protocolo Comissão de Ética-PRPPG/UFRRJ	126
Anexo 2. Meios de cultura	127
Anexo 3. Questionário epidemiológico	128
Anexo 4. DOS SANTOS C.S., DE JESUS V.L.T., MCINTOSH D., BERTO B.P. & LOPES C.W.G. 2015. Co-infection by <i>Tritrichomonas foetus</i> and <i>Pentatrichomonas hominis</i> in asymptomatic cats. Pesquisa Veterinária Brasileira , v. 35, n. 12: 980-988, 2015.....	131
Anexo 5. DOS SANTOS, C.S., BERTO, B. P., LOPES, B. do B., CORDEIRO, M.D., DA FONSECA, A.H., TEIXEIRA FILHO, W.L, LOPES, C.W.G. Coccidial dispersion across New World marsupials: <i>Klossiella tejeraei</i> Scorza, Torrealba & Dagert, 1957(Apicomplexa: Adeleorina) from the Brazilian common opossum <i>Didelphis aurita</i> (Wied-Neuwied) (Mammalia: Didelphimorphia). Systematic Parasitology , v. 89, p. 83–89, 2014.....	133
Anexo 6. CARRASCO, L.P.S.; DOS SANTOS, C.S.; SOUZA, H.J.M.; de JESUS, V.L.T.; GIZZI, A.B.R. <i>Tritrichomonas foetus</i> como agente etiológico de diarreia em gatos- relato de dois casos. Clínica Veterinária , v. 113, p. 34-41, 2014	135
Anexo 7. DOS SANTOS, C.S.; BERTO, B.P.; DE JESUS, V.L.T.; LOPES, C.W.G. <i>Eimeria leuckarti</i> Flesch, 1883 (Apicomplexa: Eimeriidae) from horse foals in Rio de Janeiro. Coccidia , v. 2, p. 40-44, 2014	137
Anexo 8. BALTHAZAR, L.M.C.; LOPES, B. do B. ; BERTO, B.P.; SANTOS, C.S.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; NEVES, D.M.; LOPES, C.W.G. Coccidiosis in A Blue-Fronted Amazon parrot (<i>Amazona aestiva</i>) under quarantine - Case report. Revista Brasileira de Medicina Veterinária , v. 34, p. 392-399, 2013.....	139
Anexo 9. DOS SANTOS, C.S.; JESUS, V.L.T.; PEREIRA, R.C.G.; GUEDES JR, D.S.; SANTOS, M.A.A.J.; JACOB, J.C.F. Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento. Revista Brasileira de Medicina Veterinária , v. 35, p. 155-162, 2013	141

	Págs.
Anexo 10. LOPES, B. do B.; dos SANTOS, C.S.; LUZ, H.R.; BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. <i>Adelina</i> sp. (Apicomplexa: Adeleidae), a pseudoparasite of <i>Thoropa miliaris</i> Spix (Amphibia: Cycloramphidae) in Southeastern Brazil. Coccidia , v. 1, p. 26-31, 2013	143
Anexo 11. DOS SANTOS, C.S.; McINTOSH, D.; BERTO, B.L.; DE JESUS, V.L.T.; DA ROCHA, C.N.C.; FERNANDES, J.I.; SCOTT, F.B.; LOPES, C.W.G.; <i>Pentatrichomonas hominis</i> in symptomatic cats of Southeastern Brazil. 145 Revista Brasileira de Medicina Veterinária. [No prelo]	145

LISTA DE ABREVIACÕES

μL	-	Microlitro
AX	-	Axóstilo
C	-	Costa
CDC	-	Centers for Disease Control and Prevention
DPA	-	Departamento de Parasitologia Animal
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético.
FA	-	Flagelos anteriores
FP	-	Flagelo posterior
g	-	Gramma
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana
IV	-	Instituto de Veterinária
Kg	-	Kilograma
LabMol	-	Laboratório de Biologia Molecular
LCC		Laboratório de Coccidios e Coccidioses
LPR		Laboratório de Patologias da Reprodução
LQEPV	-	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
MET	-	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	-	Miligrama
MO	-	Membrana ondulante
NU -	-	Núcleo
OMS	-	Organização mundial de saúde
PBS	-	Solução fisiológica fosfatada tamponada
PCR	-	Reação de cadeia por polimerase
PE	-	Pelta
pH	-	Potencial de hidrogênio
RFLP	-	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição.
RNA	-	Ácido ribonucleico
UFRRJ	-	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
HVPA	-	Hospital Veterinário de Pequenos Animais

RESUMO

DOS SANTOS, Caroline Spitz. **Parabasalídeos de animais domésticos: morfologia, diagnóstico e algumas considerações epidemiológicas.** 2016. 182p. Tese (Ciências Veterinárias, Sanidade Animal), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O estudo sobre parabasalídeos em animais de companhia vem ganhando cada vez mais atenção por sua associação a quadros de diarreia. O flagelado *Pentatrichomonas hominis* foi relatado em associação com gatos domésticos desde o início do século 20. Por ser um parasito eurixênico, já foi descrito em diversos hospedeiros, incluindo os seres humanos, cães, bovinos, ratos e uma variedade de animais selvagens. Assim também outra espécie de parabasalídeo com grande importância na pecuária, *Tritrichomonas foetus* já foi descrito em gatos, suínos, e em humanos também. Tais observações levantam dúvidas sobre o potencial zoonótico de ambas as espécies e sua inespecificidade hospedeira. Este estudo teve por objetivos diagnosticar espécies de parabasalídeos encontrados em gatos utilizando de análise morfológica e molecular. Para tanto, este estudo foi dividido em duas partes para avaliar duas populações felinas distintas. Na primeira parte, 41 animais de um gatil de experimentação foram avaliados. Vinte e seis por cento dos animais (11) foram positivos para *P. hominis*, tanto no exame a fresco quanto na cultura. O DNA foi extraído das amostras em cultura e os genes de rRNA foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores universais (TFR1 e 2) e outros dois espécies específicos para *T. foetus* (TFR3 e 4) e *P. hominis* (TH3 e 5). A análise morfológica dos trofozoítos revelou a presença de cinco flagelos anteriores, núcleo redondo e axóstilo afunilando de maneira uniforme, característico de *P. hominis*. Os resultados da morfologia foram confirmados pelo estudo molecular. O sequenciamento dos isolados revelou 100% de similaridade de sequência com *P. hominis* isolado de gato e de cão depositados no Genbank. Este é o primeiro estudo realizado no Brasil sobre a presença de parabasalídeos em gatos utilizando dados morfológicos e moleculares e o único na literatura onde somente *P. hominis* foi isolado. Na segunda parte deste estudo, 77 amostras de fezes de gatos provenientes do atendimento clínico do HVPA-UFRRJ foram examinadas. Somente quatro amostras apresentaram positivas. A análise morfológica demonstrou protozoários predominantemente piriformes com tres flagelos anteriores, núcleo alongado e axóstilo terminando bruscamente em filete característico de *T. foetus*. Na microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, foram visualizados caracteres de

identificação semelhantes aos descritos na literatura para *T. foetus*. À análise molecular, confirmou o diagnóstico morfológico nas quatro amostras, e no sequenciamento apresentaram 99,7-100% de similaridade com sequências de *T. foetus* depositadas no Genbank. Apesar da análise morfológica ter reconhecido somente *T. foetus* nas quatro amostras, três delas foram positivas também para *P. hominis* na análise molecular utilizada como diagnóstico diferencial utilizando iniciadores espécie-específica (TH3 e TH5). O estudo molecular foi utilizado como ferramenta confirmatória da presença de somente uma espécie presente nas fezes avaliadas. Isso demonstra que não só *T. foetus* foi identificado pelo presente estudo, como também a coinfeção por *P. hominis* em felinos. Estas informações só foram confirmadas quando se utilizou as técnicas de diagnóstico em conjunto como análise morfológica simples e biologia molecular.

Palavras-chave: *Pentatrichomonas hominis*, *Tritrichomonas foetus*, diagnóstico, fezes, gatos.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Caroline Spitz. **Parabasalids of domestic animals: morphology, diagnosis and some epidemiological considerations. 2016.** 182p. Thesis (Veterinary Science, Animal Health), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The study on parabasalids in companion animals is gaining more attention for its association with diarrhea. The flagellate *Pentatrichomonas hominis* has been reported in association with domestic cats since the early 20th century. As a eurixenic parasite has been described in several hosts, including humans, dogs, bovines, rats, and a variety of wild animals. Another parabasalid with great importance in livestock, *Tritrichomonas foetus* has been also described in cats, pigs, and humans. These observations raise questions about the zoonotic potential of both species and their host specificity. This study aimed to diagnose parabasalid species found in cats using morphological and molecular analysis. Therefore, this study was divided into two parts to assess two different cat populations. In the first part, 41 animals in a trial cattery were evaluated. Twenty-six percent of the animals (11) were positive for *P. hominis*, at both techniques as fresh examination and culture. The DNA was extracted from the samples in culture and rRNA genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal primers (TFR1 and 2) and other two specific species for *T. foetus* (TFR3 and 4) and *P. hominis* (TH3 and 5). Morphological analysis of trophozoites revealed the presence of five previous plagues core round and axostyle tapering uniform, characteristic way of *P. hominis*. The results of morphology were confirmed by molecular study. The sequencing of the isolates revealed a sequence with 100% similarity to *P. hominis* isolated from cats and dogs deposited in Genbank. This is the first study in Brazil with pointed out the presence of Parabasalids in cats by using morphological and molecular data and it is the one in the literature where *P. hominis* was isolated. In the second part of this study, 77 samples of feces from cats from the clinical care of HVPA-UFRRJ were examined. Only four of 77 samples tested were positive. Morphological analysis showed predominantly pear-shaped protozoa with three previous scourges, elongated nucleus and axóstilo abruptly ending in characteristic fillet in *T. fetus*. In scanning electron microscopy and transmission, were visualized the identifying characters were similar to those previously reported for *T. foetus*. Molecular analysis confirmed the morphological diagnosis in the organism from four samples showed a sequence with 99.7 to 100% of similarity. It was deposited in Genbank as *T. foetus*.

Despite the morphological analysis have recognized only *T. foetus* in the four samples examined, three of them were also positive for *P. hominis* in molecular analysis used as a differential diagnosis using species-specific primers (TH3 and TH5). The molecular analysis was used as a confirmatory tool for the presence of only one species present in evaluated feces. This demonstrated that not only *T. foetus* was identified in this study, but a co-infection by *P. hominis* cats could be considered. This indication was only confirmed as a diagnostic techniques when the morphological analysis and molecular biology were used to confirm both species.

Keywords: *Pentatrichomonas hominis*, *Tritrichomonas foetus*, diagnosis, feces, cats.

SUMÁRIO

	Págs
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 OS PARABASALÍDEOS	3
2.1.1 Um breve histórico	3
2.1.2 Classificação	4
2.1.2.1 Trichomonadidae (Chalmers & Pekkola, 1918 <i>sensu</i> HampL, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006)	4
2.1.2.2 Tritrichomonadidae (Honigberg, 1963) Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006.....	5
2.1.3 Morfologia	6
2.1.3.1 Trichomonadidae	6
2.1.3.2 Tritrichomonadidae	7
2.1.4 Biologia	9
2.1.4.1 Transmissão feco-oral	9
2.1.4.2 Transmissão sexual	11
2.1.5 Importância econômica e de Saúde Pública	13
3. PARTE 1. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE <i>Pentatrichomonas hominis</i> (DAVAINE, 1866) WENRICH, 1931 DE INFEÇÃO NATURAL DE GATOS (<i>Felis catus</i> L.)	16
3.1 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1.1 Morfofisiologia	16
3.1.2 Genotipagem	18
3.1.3 Aspectos biológicos	20
3.1.4 Patogenicidade	22
3.1.5 Diagnóstico Diferencial	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.2.1 Animais	26

	Págs.
3.2.2 Coleta de amostras de fezes	26
3.2.3 Diagnóstico morfológico	26
3.2.3.1 Esfregaço úmido	26
3.2.3.2 Esfregaço de Cultura	26
3.2.3.3 Análise Morfológica	26
3.2.3.3.1 Esfregaço Úmido	27
3.2.3.3.2 Esfregaço Corado	27
3.2.4 Fotomicrografias, mensuração e desenhos dos trofozoítos	28
3.2.5 Diagnóstico e identificação molecular	28
3.2.5.1 Extração de DNA Genômico	28
3.2.5.2 Iniciadores (<i>primers</i>)	28
3.2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
3.2.5.4 Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP)	30
3.2.5.5 Sequenciamento dos produtos da PCR	30
3.2.6 Análise estatística	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.3.1 <i>Pentatrichomonas hominis</i>	31
3.3.1.1 Visualização dos trofozoítos	31
3.3.2 Identificação fenotípica dos trofozoítos	35
3.3.2.1. Morfologia	35
3.3.3 Identificação genotípica dos trofozoítos	41
3.3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	41
3.3.3.2 PCR-RFLP (Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) e sequenciamento do DNA	46
 4 PARTE 2: DIAGNÓSTICO DE <i>Tritrichomonas foetus</i> (RIEDMÜLLER, 1928) WENRICH & EMMERSON 1933 EM FEZES DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS	 50

	Págs.
4.1 REVISÃO DE LITERATURA	50
4.1.1 Classificação	50
4.1.2 Morfofisiologia	53
4.1.3 Genotipagem	56
4.1.4 Aspectos biológicos	58
4.1.5 Patogenicidade	59
4.1.6 Métodos de diagnóstico	62
4.1.7 Diagnóstico Diferencial	62
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.2.1 Origem dos Animais	65
4.2.2 Coleta de amostras de fezes	65
4.2.3 Diagnóstico morfológico	65
4.2.3.1 Exame a fresco	65
4.2.3.2 Cultura	65
4.2.3.3 Análise Morfológica	66
4.2.3.3.2 Coloração de esfregaços	66
4.2.4 Fotomicrografias, Mensuração e Desenhos dos trofozoítos	66
4.2.5 Microscopia Eletrônica	66
4.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Trasmissoão (TEM)	67
4.2.6 Diagnóstico e identificação molecular	68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.3.1 <i>Tritrichomonas foetus</i>	68
4.3.1.1 Visualização dos trofozoítos	68
4.3.2 Identificação fenotípica dos trofozoítos	71
4.3.2.1 Morfologia	71
4.3.2.1.1 Esfregaços Corados	71
4.3.3 Microscopia Eletrônica de varredura de <i>Tritrichomonas foetus</i> .	77
4.3.4 Microscopia Eletrônica de transmissão de <i>Tritrichomonas foetus</i>	82

4.3.5	Identificação genotípica dos trofozoítos	88
4.3.5.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.	88
5	PARTE 3: ALGUNS COMENTÁRIOS SOBRE A TRICHOMONOSE EM GATOS DOMÉSTICOS	96
5.1	REVISÃO DE LITERATURA	96
5.1.1	Epidemiologia	96
5.1.1.1	Especificidade hospedeira.....	96
5.1.1.2	Distribuição geográfica e frequência	96
5.1.1.3	Fatores de risco	98
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	101
5.2.1	Questionário epidemiológico	101
5.2.2	Análise estatística	101
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.3.1	<i>Pentatrichomonas hominis</i> em gatil de experimentação	101
5.3.2	<i>Tritrichomonas foetus</i> em gatos atendidos pelo HVPA- UFRRJ	105
6	CONCLUSÕES	109
7	CONSIDERAÇÕES GERAIS	111
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
9	ANEXOS	126

1 INTRODUÇÃO

Membros do filo Parabasalia são protozoários flagelados e amitocôndriais, possuem uma organela caracterizada por um corpo parabasal, três a cinco flagelos anteriores, uma membrana ondulante, a qual forma um flagelo posterior, e axóstilo (Honigberg 1973).

Embora vários membros deste Filo possuam baixa patogenicidade, muitos considerados apenas como habitantes comensais no intestino, cavidades, nasal e oral; algumas espécies podem ser responsáveis por doenças de importância médica e veterinária. *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836), por exemplo, é responsável pela doença sexualmente transmissível de origem não viral mais importante que acomete a espécie humana. *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) Wenrich & Emmerson 1933 é considerada a espécie de maior importância em Medicina Veterinária por causar abortamento em bovinos, gerando com isso, grandes perdas para a pecuária. Também tem sido implicado como agente causador da diarreia de intestino grosso em gatos domesticados. Outra espécie patogênica, *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878), afeta aves de diferentes ordens e pode causar doença severa ou mesmo fatal às aves acometidas (LAWSON et. al, 2011).

Tradicionalmente, espécies desses protozoários foram identificados e diferenciados, com base em características morfológicas, como número de flagelos anteriores nos gêneros *Tritrichomonas*, *Tetratrichomonas* ou *Trichomonas*, e *Pentatrichomonas*, onde a procedência determina a espécie hospedeira, sendo considerado a *priori* específico daquele hospedeiro. Entretanto, com o uso da biologia molecular é cada vez maior os questionamentos a respeito da real especificidade apresentada por algumas espécies de parabasalídeos, como por exemplo: *Pentatrichomonas hominis* que já foi diagnosticado não só em diversos mamíferos, mas também em aves e répteis. Outro exemplo, *T. foetus*, que foi primeiramente diagnosticado em bovinos e hoje também tem sido assinalado no intestino de gatos. Desta forma as ferramentas moleculares aliadas a morfofisiologia permitem uma correta identificação das mais variadas espécies de parabasalídeos. No Brasil, poucos estudos foram conduzidos com o propósito de diagnosticar corretamente as espécies que podem parasitar animais domésticos. Como há muito a ser pesquisado sobre as espécies das famílias Trichomonadidae (Chalmers & Pekkola, 1918) *sensu* Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006) e Tritrichomonadidae (Honigberg, 1963) Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006) que podem ser identificadas em animais domésticos e na espécie humana.

O presente estudo tem como objetivo identificar as espécies de parabasalídeos presentes nas fezes de gatos com base na análise morfológica e molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS PARABASALÍDEOS

2.1.1 Um breve histórico

O Filo Parabasalia (Honingberg 1973) é formado por organismos flagelados amitocondriais anaeróbicos, sendo que uma grande parte das espécies vivem endobioticamente como organismos comensais no intestino de vários hospedeiros animais, e em raras exceções como espécies de vida livre (CEPICKA et al., 2010). Representantes reconhecidamente patogênicos de importância médica e veterinária incluem as espécies *T. vaginalis*, *T. foetus* e *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895) (HAMPL et al., 2004).

Parabasalídeos (Parabasalia) representam um grupo relativamente grande de flagelados, com 450 espécies descritas (ADL et al., 2007) as quais tem como características a presença de hidrogenossomos (mitocôndrias modificadas), um arranjo mastigonte atípico (definido de cinetossomos e seus apêndices, um corpúsculo parabasal (complexo de Golgi ligado a fibras estriadas). A divisão nuclear ocorre por pleuromitose fechada com fuso extranuclear. Com algumas exceções parabasalídeos não formam cistos (BRUGEROLLE, 1973; FARMER, 1993; DOLAN et al., 2004; HAMPL et al., 2007),

Atualmente, o Filo Parabasalia é dividido em cinco classes (Hypotrichomonadea, Cristamonadea, Trichoniphea, Spirotrichonyphea, Trichomonadea e Tritrichomonadea) (HAMPL et al., 2006; CEPICKA et al., 2010). As principais espécies de parabasalídeos de importância médica e veterinária encontram-se nas classes Trichomonadea (KIRBY, 1947 *sensu* MARGULIS, 1974) e Tritrichomonadea (CEPICKA et al., 2010).

A classe Trichomonadea é constituída por duas ordens, Honigbergiellida e Trichomonadida. A ordem Trichomonadida é formada por uma única família, a Trichomonadidae (Chalmers & Pekkola, 1918 *sensu* HampL, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006), que abriga oito gêneros, *Trichomonas* (Donné, 1836), *Tetratrichomonas* (Parisi, 1910), *Pentatrichomonas* (Mesnil, 1914), *Pseudotrypanosoma* (Grassi, 1917), *Trichomitopsis* (Kofoid & Swezy, 1919), *Cochlosoma* (Kotlán, 1923), *Pentatrichomonoides* (Kirby, 1931), *Trichomonoides* (Brugerolle & Bordereau, 2004). Dentre os representantes desta família encontram-se os patógenos, *T. vaginalis*, parasito do trato urogenital de humanos, *T. gallinae*, parasito da cavidade bucal e do ceco de aves, (HAMPL et al., 2006).

A classe Tritrichomonadea, no entanto, abriga a ordem Tritrichomonadida constituída por quatro famílias, Simplicimonadidae (Cepicka, Hampl, Kulda, 2010) Monocercomonadidae (Kirby, 1944), Dientamoebidae (Grassé, 1953) e Tritrichomonadidae (Honigberg, 1963 *sensu* Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006), que é constituída por um único gênero denominado *Tritrichomonas* que, por sua vez, possui como representante principal, a espécie *T. foetus*, parasito do trato urogenital de bovinos, trato intestinal de felinos, cavidade nasal e intestino de suínos (CEPICKA et al., 2010).

2.1.2 Classificação

2.1.2.1 Trichomonadidae (Chalmers & Pekkola, 1918 *sensu* Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006)

Essa família possui sete gêneros, sendo *Trichomonas* (Donné, 1836) gênero tipo. A família também possui diversas espécies de importância médica e veterinária. Em humanos, *T. vaginalis* é responsável por doença sexualmente transmissível, não viral, e de maior importância no mundo, causando diversos distúrbios reprodutivos como vaginite, salpingite, e uma das causas de câncer do colo do útero (ZANG et al., 1995). Além disso, a possibilidade do protozoário poder carrear o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) já foram assinaladas por Sorvillo et al. (2001) e Benchimol et al. (2002).

Trichomonas gallinae é outra espécie patogênica conhecida por parasitar o trato digestório de aves de várias ordens, causando lesões caseosas na orofaringe que impedem o animal de se alimentar e a morte ocorre principalmente por inanição (LAWSON et al., 2011). Tanto *T. vaginalis* quanto *T. gallinae* são considerados espécie-específico, parasitando uma espécie de hospedeiro. Outro membro desta família, *Pentatrichomonas hominis*, que foi inicialmente descrito em humanos, habitando o intestino e considerado comensal (WENRICH, 1931, KIRBY 1947), porém foi diagnosticado em diversos casos de infecção em humanos e também em outras espécies animais (MARITZ et al., 2014).

A classificação atual foi baseada em diversos estudos filogenéticos a nível morfológico e molecular e proposta por Cepicka et al. (2010).

Domínio: Eucariota Corliss, 1994.

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818.

Filo: Parabasalia (Honingberg 1973)

Classe: Trichomonadea (Kirby, 1947) Margulis, 1974

Ordem: Trichomonadida (Kirby, 1947)

Família: Trichomonadidae (Chalmers & Pekkola, 1918) *sensu* Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006

Gênero: *Trichomonas* (Donné, 1836).

Espécie- tipo: *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836)

Espécie: *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878)

Gênero: *Tetratrichomonas* (Parisi, 1910)

Espécie: *Tetratrichomonas gallinarum* (Martin & Robertson, 1911)

Gênero: *Pentatrichomonas* (Mesnil, 1914)

Espécie: *Pentatrichomonas hominis* (Davaine, 1866) *sensu* Wenrich, 1931

2.1.2.2 Tritrichomonadidae (Honigberg, 1963) Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006

A família Tritrichomonadidae possui um único gênero *Tritrichomonas* (Kofoid 1920). *Tritrichomonas foetus* é a espécie mais estudada dentro do gênero. Este protozoário parasita o trato urogenital de bovinos e à semelhança de *T. vaginalis* é transmitido sexualmente. O macho não apresenta sinais da infecção, entretanto as fêmeas apresentam vaginite, salpingite e abortamento, o qual ocasiona grandes perdas financeiras na pecuária. Recentemente, *T. foetus* foi diagnosticado em gatos e considerado como causador da diarreia de intestino grosso, demonstrando assim a plasticidade do parasito (LEVY et al., 2003)

A classificação atual também foi descrita por Cepicka et al. (2010).

Domínio: Eucariota Corliss, 1994.

Reino: Protozoa (Goldfuss, 1818.)

Filo: Parabasalia

Classe Tritrichomonadea (Cepicka, Hampl & Kulda., 2010)

Ordem: Tritrichomonadida (Cepicka, Hampl & Kulda, 2010)

Família: Tritrichomonadidae (Honigberg, 1963) Hampl, Vrlík, Cepicka, Pecka, Kulda & Tachezy, 2006

Gênero: *Tritrichomonas* (Kofoid, 1920)

Espécie-tipo: *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) Wenrich & Emmerson, 1933

2.1.3. Morfologia

2.1.3.1. Trichomonadidae

Os tricomonadídeos são organismos que se caracterizam pela presença de cinco a seis flagelos, de um aparato parabasal - Complexo de Golgi com filamentos parabasais associados (HONIGBERG; BRUGEROLLE, 1990) e do complexo pelta-axóstilo, que é formado por um sistema de microtúbulos (BENCHIMOL et al., 1993). São organismos amitocondriais, parte do metabolismo energético provém de organelas chamadas hidrogenossomos (LINDMARK; MÜLLER, 1973), não apresentam peroxissomos e possuem ribossomos 70S (CHAMPNEY et al., 1992).

A costa percorre o sentido ântero-posterior da região dorsal do parasito, estando sempre associada à membrana ondulante e ao flagelo recorrente, por meio de filamentos (BENCHIMOL et al., 1993). Sua origem se dá entre os corpúsculos basais #2 e #3 (HONIGBERG et al., 1971). O fato de haver filamentos que se projetam da costa, principalmente na região voltada para membrana ondulante, reforçou a idéia de que a costa funcione como uma estrutura de ancoramento para o flagelo posterior (BENCHIMOL et al., 1993). Existem duas classificações distintas de costa, denominadas tipos A e B, dada por diferenças no padrão periódico de sua estrutura e no formato da região onde ela se origina. Os membros da família Trichomonadidae possuem o padrão de costa do tipo B apresenta estriações semelhantes à espinha de peixe, com periodicidade de aproximadamente 42 nm (HONIGBERG et al., 1971). É caracterizado morfológicamente por apresentarem de quatro a cinco flagelos anteriores, membrana ondulante que forma o flagelo posterior, um axóstilo (Figura 1).

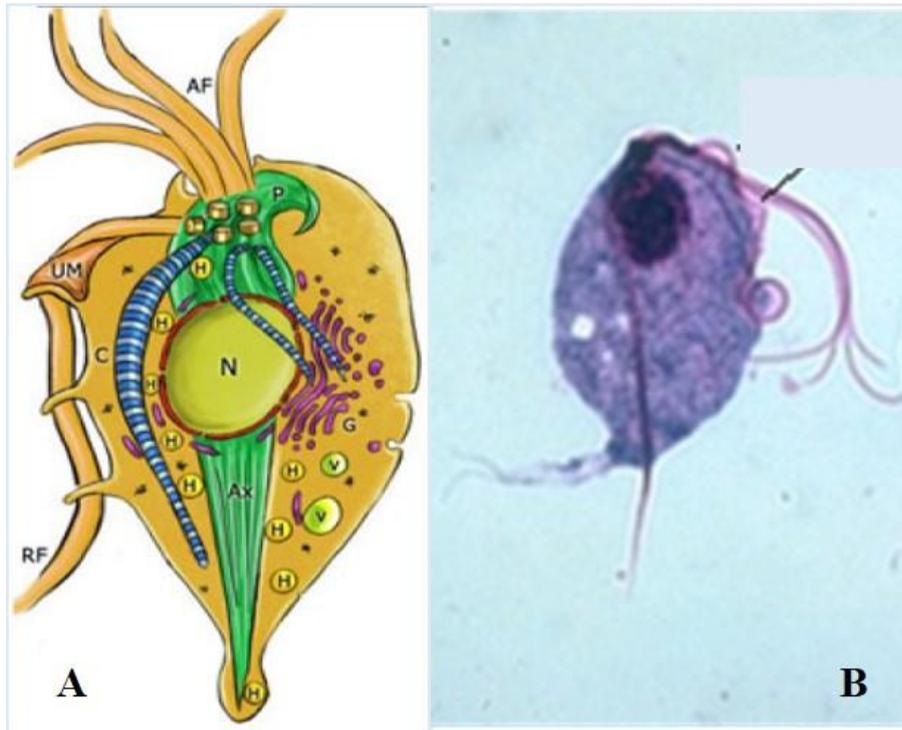


Figura 1. Esquema geral de microscopia eletrônica de *Trichomonas vaginalis*; *AF*: anterior flagela, *UM*: undulating membrane, *RF*: recurrent flagellum (BENCHIMOL, 2004) (A); fotomicrografia de trofozoíta de *Trichomonas vaginalis* (B) (CDC, 2015).

Tradicionalmente, os membros desta família têm sido identificados e diferenciados com base nas características morfológicas e especificidade hospedeira (WENRICH, 1944; JENSEN; HAMMOND, 1964).

2.1.3.2. Tritrichomonadidae

Estes parasitos são eucariontes, unicelulares e reproduzem-se por divisão binária. Quando cultivados em meio axênico apresentam formato fusiforme, medindo em torno de 16 por 6 μm no eixo maior (KIRBY 1951; MATTOS et al., 1997). A família possui apenas um gênero *Tritrichomonas*, cuja espécie mais estudada, *T. foetus* (CEPICKA et al., 2010).

A morfologia desses protozoários caracteriza-se por terem apenas um núcleo (Figura 1A) localizado na porção anterior do corpo, 4 flagelos, sendo 3 anteriores de tamanho aproximadamente iguais e outro recorrente que possui uma parte ligada a membrana plasmática percorrendo todo o corpo celular formando a membrana ondulante em forma de

trilho, com três a cinco ondulações. O complexo pelta-axostilar de tritrichomonádídeos é uma estrutura axial, formada por microtúbulos, com função de sustentação e participação na cariocinese, sendo composta pela pelta e pelo axóstilo (Figura 2). Este se apresenta como uma folha de microtúbulos, arranjados lado a lado, percorrendo o eixo longitudinal da célula, desde a sua porção anterior até o extremo posterior da célula, onde termina como uma forma afilada (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2004).



Figura 2. Esquema geral de microscopia eletrônica de *Tritrichomonas foetus* (A) N: núcleo, Nu: nucléolo, FR: flagelo recorrente, P: pelta, MO: membrana ondulante, A: axóstilo, L: lisossoma, V: vesícula, RE: retículo endoplasmático, G: Golgi, CB: corpo parabasal (BENCHIMOL, 2004); fotomicrografia de trofozoíto de *T. foetus* (B) N: núcleo, A: axóstilo (RIBEIRO et al., 2000).

A pelta se encontra numa posição mais anterior e contígua ao axóstilo, sustentando as paredes do canal periflagelar formando uma espécie de “colarinho” na região de emergência dos flagelos. Outra estrutura do citoesqueleto, a costa, possui padrão de estriação do tipo A (presente em *T. foetus*) que são bandas paralelas, alternando bandas eletrondensas (com cerca de 37 nm de largura) com bandas mais claras (com largura de 49 nm) (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2004).

Os representantes desta família possuem como principais características morfológicas de diferenciação com outros parabasalídeos, os corpúsculos supracinetossomal e a costa do tipo A que os diferencia dos representantes da família Trichomonadidae (BRUGEROLE, 1975; BENCHIMOL, 2004).

2.1.4 Biologia

2.1.4.1 Transmissão feco-oral

A maioria das espécies de parabasalídeos é simbiote e comumente habitam o trato gastrointestinal de diversos hospedeiros vertebrados (COBO et al., 2003), com exceção das espécies que habitam o trato reprodutivo ou, ainda, as consideradas de vida livre (FARMER, 1993, CEPICKA et al., 2010). Nesse contexto, a via de transmissão feco-oral ganha destaque na perpetuação do ciclo de vida de espécies patogênicas e comensais de parabasalídeos (GOOKIN et al., 2004).

A forma de transmissão é do tipo direto e acontece quando da ingestão de água e alimentos, água e solo contaminado com as fezes contendo os protozoários. Após a ingestão o protozoário coloniza partes do trato digestório, como intestino grosso (YAEGER et al., 2005), podendo ou não causar patogenia. Na maioria das vezes, são espécies comensais que ajudam na digestão da celulose, outras se aderem as células do intestino gerando efeitos citotóxicos (MIDDLEJ et al., 2009) o que leva diarreia com descamação do epitélio intestinal e caracterizada como inflamação do tipo linfoplasmocitária (YAEGER; GOOKIN, 2005).

O isolamento de *P. hominis* em répteis e aves demonstra um possível modo de adaptação do parasito à clássica via feco-oral, onde estes animais poderiam ter se infectado através do solo contaminado com o agente ou em uma rota alternativa, se alimentando de um animal contaminado através de carnivorismo. Outra possibilidade está relacionada ao padrão alimentar, quando a mãe precisa alimentar seus filhotes por forrageamento. A comida poderia ser uma das possíveis fontes de contaminação com *P. hominis*, ou mesmo com outras espécies de parabasalídeos (DIMASUAY; RIVERA, 2013).

Os parabasalídeos são tipicamente descritos como células que apresentam as formas de trofozoíto, que é forma móvel, e o pseudocisto. A formação de pseudocistos se refere à transformação da forma de trofozoíta, que possui flagelos e é móvel, em uma estrutura compacta, sem motilidade e sem a formação de uma parede cística verdadeira (BRUGEROLLE, 1973; FARMER, 1993)..

O pseudocisto é descrito em espécies patogênicas como *T. foetus* (PEREIRA NEVES et al., 2010), *T. muris* e outras espécies que residem no trato gastrointestinal (WANTLAND, 1956; HONINBERG, 1963; LIPMAN et al., 1999), e provavelmente se formam em resposta ao estresse ambiental (HALE et al., 2009). Por não haver a formação de um cisto verdadeiro, estes protozoários são considerados de baixa resistência fora do hospedeiro e, para que a transmissão ocorra, deve haver contato mais próximo entre indivíduos contaminados e não contaminados (GOOKIN et al., 2004), outros ainda consideravam como formas degenerativas (WENRICH, 1939). Entretanto, estudos recentes indicaram que pseudocistos também ocorrem de forma natural dentro do hospedeiro (PEREIRA-NEVES et al., 2010) e sua infectividade nas fezes foi descrita em roedores e galinhas por Lipman et al. (1999) e Friedhoff et al. (1991).

O pseudocisto é uma estrutura importante no ciclo de transmissão feco-oral do protozoário porque o processo de transformação da forma de trofozoíta em pseudocisto é um processo reversível (GRANGER et al., 2000) e que, mesmo nesta fase o protozoário é capaz de se dividir e manter as estruturas internas com morfologia normal; portanto, também é considerada como uma forma infectante para o hospedeiro (PEREIRA-NEVES et al., 2003).

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

2.1.4.2 Transmissão sexual

Duas são as espécies do filo Parabasalia que reconhecidamente possuem transmissão por via sexual, *T. vaginalis* que acomete humanos e *T. foetus* responsável pela tricomonose bovina. A doença causada por *T. foetus* foi originalmente observada por Kunstler (1888), mais tarde, Mazzanti (1900) observou flagelados no trato reprodutivo de vacas estéries. O nome *T. foetus* foi dado por Riedmüller em 1928 ao avaliar fetos bovinos abortados contendo esse agente etiológico. Wenrich e Emmerson (1933) transferiram a espécie para um novo

gênero estabelecido, *Tritrichomonas*, o qual permanece até a presente data (BONDURANT; HONIGBERG, 1994).

A infecção por *T. foetus* resulta em doença venérea em bovinos. Os protozoários são encontrados no trato reprodutivo das fêmeas e na cavidade prepucial dos machos (BONDURANT, 1997; FELLEISEN, 1999). No macho, os efeitos da doença são limitados à transmissão assintomática, enquanto que os efeitos clínicos negativos da infecção ocorrem na fêmea (RAE; CREWS, 2006).

Nos machos, os parasitos localizam-se na mucosa do pênis, cavidade prepucial e, em alguns casos, na abertura do canal uretral. Uma grande concentração de protozoários pode ser observada na mucosa peniana e em áreas adjacentes a essa; os quais não são invasivos, mas situam-se sobre a superfície mucosa, nas secreções e na luz glandular (HAMOND; BARTLETT, 1943). O macho adquire o protozoário através da monta natural com fêmeas portadoras. Na medida em que ficam mais velhos, a infecção torna-se crônica, possivelmente devido ao aprofundamento das criptas epiteliais do pênis e prepúcio que contribuiria com um meio de microaerofilia, adequado para permanência da infecção crônica. De uma maneira geral, machos não exibem sinais clínicos de infecção por *T. foetus* e podem ser transmissores da infecção por toda vida (RAE; CREWS, 2006). Raros são os casos em que se pode observar balanite e acrobustite (BONDURANT, 1997).

A fêmea bovina infecta-se com *T. foetus* através da monta com um touro portador ou através da inseminação artificial, quando se utiliza sêmen contaminado com fluido seminal de touros positivos. O agente etiológico em questão coloniza o interior do trato reprodutivo entre uma a duas semanas (RAE; CREWS, 2006). Após a transmissão, o parasito se encontra no epitélio vaginal ao qual se adere e inicia seu processo infeccioso. Com decorrência desse fato, surge à vaginite e, subsequentemente, esses flagelados migram para o útero e possivelmente para o oviduto, ficando assim confinados às células epiteliais do endométrio e da placenta, quando a vaca está prenhe. No decorrer da gestação, se a vaca estiver contaminada, o parasito pode comprometer o desenvolvimento fetal e crescer nas membranas fetais, produzindo placentite, que causa a morte prematura do embrião ou feto pela ação direta do agente etiológico ou pelos efeitos da reação inflamatória local (ANDERSON et al., 1996; BONDURANT, 1997; FELLEISEN, 1999). O abortamento por *T. foetus* normalmente ocorre entre o primeiro e o quarto mês de gestação, excepcionalmente pode ocorrer após o quinto ou sexto mês. Após o aborto, ocorre um período gradual de recuperação uterina que varia de dois a seis meses após a expulsão do parasito, o que ocorre espontaneamente. Se o corpo lúteo ou o feto macerado permanecer no útero, a fêmea pode desenvolver piometra, a qual

pode causar esterilidade permanente (BONDURANT, 1985). A infecção por *T. foetus* possui caráter autolimitante, portanto a eliminação do parasito e recuperação do trato reprodutivo da fêmea pode variar de 13 a 28 semanas (SKIRROW; BONDURANT, 1990). Contudo, a exposição a *T. foetus* não induz a uma imunidade duradoura e o animal pode vir adquirir uma nova infecção (CLARK et al., 1983).

Tritrichomonas foetus de origem felina, apesar de ser descrito parasitando os intestinos de gatos domésticos também já foi identificado em um único caso onde uma fêmea felina apresentava piometra. O exame do conteúdo uterino identificou centenas de protozoários que foram posteriormente confirmados através de análise genética como *T. foetus* (DAHLGREN et al., 2007). Esse foi o primeiro e único relato do envolvimento desse protozoário com o sistema reprodutor nessa espécie de mamífero. Um levantamento clínico sobre o possível envolvimento de *T. foetus* com infecções do trato reprodutivo em gatas não encontrou evidências de infecção pelo protozoário em 15 fêmeas avaliadas e que eram positivas para tricomonose intestinal. O que leva a supor que o caso relatado possivelmente está ligado ao aspecto oportunista do parasito (GRAY et al., 2010).

2.1.5 Importância econômica e de Saúde Pública

A infecção por parabasalídeos possui uma grande importância econômica quando se avalia-se as espécies ligadas a humanos (*T. vaginalis*) e animais (*T. foetus*).

A tricomoníase humana, cujo agente etiológico é *T. vaginalis*, atualmente é considerada a doença, não viral, sexualmente transmissível mais comum do mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, em 2008 a doença apresentou até 276 milhões de novos casos (WHO, 2012). Um dos fatores preocupantes é que a tricomoníase pode aumentar a susceptibilidade ou transmissibilidade do Vírus da Imunodeficiência humana (HIV) (LAGA et al., 1994, BENCHIMOL et al., 2002). Os custos com diagnóstico e tratamento podem chegar a 645 dólares americanos por mulher tratada (LAZENBY et al., 2014).

Já, a tricomonose bovina é considerada como uma doença cosmopolita de grande importância em países que possuem um grande rebanho bovino. As perdas econômicas, devido aos problemas reprodutivos e as dificuldades envolvendo a erradicação da doença nos rebanhos, é um dos principais aspectos que torna a doença preocupante, principalmente onde a pecuária não possui manejo sanitário eficiente ou o sistema de produção é de caráter extensivo, onde a monta natural é a principal prática para reprodução no rebanho

(HONIGBERG, 1978; ALSTAD et al., 1984; BONDURANT, 1997). As perdas econômicas podem ser relacionadas aos custos com tratamento, eutanásia e reposição de animais infectados e, o mais importante, queda na produção de bezerros pela demora no estabelecimento da prenhez (ANDERSON et al., 1996; BONDURANT, 1997; FELLEISEN, 1999).

Enfatizando, o até aqui discutido, parabasalídeos são protozoários encontrados em diversas espécies vertebradas e invertebradas, com quatro espécies classicamente identificadas como protozoários de humanos: *Dientamoeba fragilis*, *P. hominis*, *T. vaginalis*, e *Trichomonas tenax*. As duas últimas espécies são consideradas específicas de humanos, em contraste *D. fragilis* e *P. hominis* que já foram isoladas de animais de companhia e de produção, demonstrando a variedade de hospedeiros e o potencial zoonótico das mesmas espécies. Diversos estudos têm destacado a dimensão zoonótica dos tricomonádídeos. Espécies tipicamente conhecidas por infectar aves e animais domésticos foram identificadas clinicamente em amostras de humanos (MARITZ et al., 2014).

Historicamente, trichomonádídeos e tritrichomonádídeos não são considerados como infecções humanas emergentes devido à ocorrência de especificidade local e ao hospedeiro. No entanto, a presença de agentes etiológicos associados a uma vasta série de distúrbios clínicos indica que os mesmos podem apresentar uma forma oportunista e além de se multiplicar quando as condições do meio forem favoráveis. Como exemplo, esses protozoários podem ser encontrados como agentes co-infectantes em infecções respiratórias como fibrose cística e a Síndrome do desconforto respiratório agudo (SARS) de humanos (DUBOUCHER et al., 2006a). *Tritrichomonas foetus* foi identificado em lavado bronco-alveolar em paciente, portador HIV, com quadro de pneumonia por *Pneumocystis* (DUBOUCHER et al., 2006b). *Pentatrichomonas hominis* foi identificado nas fezes e efusão pleural de uma mulher com lúpus eritematoso que veio a óbito (JONGWUTIWES et al., 2000). Pelo menos três espécies de parabasalídeos, incluindo aqui *P. hominis*, *T. foetus*, e *T. gallinarum* foram identificados no trato respiratório humano e como agentes causadores de tricomoníase pulmonar (JONGWUTIWES et al., 2000; KUTISOVA et al., 2005; DUBOUCHER et al., 2006b; MANTINI et al., 2009).

De fato, a capacidade desses protozoários em se adaptar a mucosa de uma variedade de tecidos pode ser a chave para a sua variedade de hospedeiros e a capacidade de desenvolver infecções em diferentes locais do corpo; bem como, contribuir direta ou indiretamente para diversas patologias. Uma vez que a capacidade para crescer na superfície das mucosas em vertebrados, pode facilitar a transmissão de uma espécie para outra. Como

exemplo tem-se *T. foetus*, esta espécie transmitida sexualmente pode representar uma recente transferência do trato digestivo para o trato urogenital, com a capacidade desse agente etiológico de desenvolver no intestino em diferentes espécies como em suínos, gatos e cães (MARITZ et al., 2014). *Tritrichomonas foetus* também foi identificado em um caso de peritonite em um homem de meia-idade que vivia em uma fazenda, onde criava suínos e cavalos. Diversos protozoários foram encontrados no líquido peritonal e identificados por biologia molecular como *T. foetus*. O paciente veio a óbito e na autópsia foi observado peritonite com exsudato intrabdominal com abscessos perigástricos e peripancreáticos (ZALONIS et al., 2011).

Pentatrichomonas hominis, uma espécie conhecida por ser um protozoário gastrointestinal supostamente comensal em humanos (HONINBERG, 1990), foi identificado em dois casos de diarreia, um em adulto e outro em uma criança, onde foram descartados quaisquer outros agentes etiológicos (MELONI et al., 2011). Em outro caso, *P. hominis* foi identificado em um paciente com artrite que apresentava diarreia, após tratamento com adalimumab, este um inibidor de TNF- α (COMPAORE et al., 2013). Até onde se sabe *P. hominis* é encontrado no trato digestório, porém amostras de swab vaginal de mulheres com quadro de vaginite e submetidas ao diagnóstico de tricomoníase por PCR indicou a presença desta espécie na mucosa vaginal ao invés de *T. vaginalis* (CRUCITTI et al., 2004).

Casos de diarreia envolvendo *P. hominis* são cada vez mais frequentes em animais de companhia como cães e gatos (GOOKIN et al., 2007; TOLBERT et al., 2012) ou mesmo em animais de produção como em suínos e bovinos (HAYES et al., 2003; LI et al., 2014).

Considerando estes recentes achados, parabasalídeos deveriam ser cuidadosamente monitorados como uma questão de saúde pública em humanos e em animais domésticos relacionados do ponto de vista do potencial de transmissão zoonótica e da mal estudada patogenicidade, em contraste com a prévia imagem de considerá-los supostamente como comensais. Seja influenciando a saúde humana, através de quadros clínicos ou patológicos, ou indiretamente, através da disbiose da microbiota de mucosa e inflamação local, facilitando assim a transmissão desses patógenos (FASTRING et al., 2014).

3 PARTE 1. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Pentatrichomonas hominis* (DAVAINE, 1866) WENRICH, 1931 DE INFECÇÕES NATURAIS EM GATOS (*Felis catus* L.)

3.1 REVISÃO DE LITERATURA

Pentatrichomonas hominis por muito tempo foi considerado membro do gênero *Trichomonas*, tendo como sinonímia *Trichomonas hominis* (syn. *Trichomonas enteris*). Foi através de estudos morfológicos que se chegou à inclusão de *T. hominis* no gênero *Pentatrichomonas*. (WENRICH, 1931). A classificação atual da espécie segue dados filogenéticos baseados em marcadores moleculares e foi revisada por Cepicka et al. (2010).

3.1.1 Morfofisiologia

Pentatrichomonas hominis possui formato fusiforme ou arredondado típico dos trichomonádídeos. A morfometria varia entre os estudos, entre 6-13,5µm de comprimento (WENRICH, 1944; WENRICH, 1947), 8-15µm x 5-8µm (KESSEL, 1928) quando observado a microscopia optica ou na microscopia eletrônica apresenta 5-10µm x 4-8µm. O núcleo é de formato oval e está localizado na porção anterior do corpo celular (LI et al., 2014).

O parasito normalmente varia de 5-6 flagelos no total, de 4 a 5 flagelos anteriores de tamanho desigual e 1 flagelo recorrente (WENRICH, 1944). Na microscopia eletrônica de transmissão (TEM), os flagelos anteriores apresentam arranjo 4 +1, ou seja, quatro flagelos agrupados e provenientes de 4 corpúsculos parabasais e um flagelo independente que se origina a parte dos outros. O flagelo independente e os quatro flagelos são separados pela pelta (LI et al., 2014). A pelta é uma estrutura microtubular que dá sustentação ao canal flagelar (BENCHIMOL, 2004). Wenrich (1944) já havia descrito esse arranjo utilizando apenas a microscopia óptica, e descreveu claramente a presença dos cinco flagelos, sendo

quatro provenientes de um blefaroblasto, enquanto outro se originava de um segundo blefaroplasto menor, onde era visível a separação entre eles.

O número variável de flagelos anteriores foi objeto de questionamento ao descrever *P. hominis* com número variável de três a cinco flagelos anteriores (FLICK, 1954). O que inicialmente confundiu o diagnóstico desta espécie quando encontrada em outros hospedeiros, surgindo assim descrição de novas espécies, quando na verdade se tratava de uma única presente no intestino humano (DA CUNHA; MUNIZ, 1922; HEGNER, 1925; GOOKIN et al., 2001). Os estudos morfológicos de *P. hominis* sempre relataram que, a maioria dos trofozoítos, pelo menos 80%, tinham 5 flagelos anteriores (WENRICH, 1931; 1947). Essa variação no número de flagelos pode ocorrer devido a falhas de observação na microscopia óptica, tipo de coloração empregada e até mesmo ao tempo de cultivo e tipos de bactérias que crescem associadas no meio de cultura (FLICK, 1954).

Outra estrutura presente nos trichomonadídeos é a membrana ondulante, que em *P. hominis* percorre todo comprimento celular exibindo de 3 a 5 ondulações e é sustentada por uma estrutura do citoesqueleto chamada de costa. A costa em *P. hominis* é do tipo B (CEPICKA et al., 2010) e está localizado logo abaixo da membrana ondulante. É mais espessa do que um flagelo e mais grossa na sua região média a partir da qual se afunila em direção a outra extremidade (WENRICH, 1944). O flagelo recorrente, está incorporado na margem livre da membrana ondulante e se projeta ao longo do corpo e termina como um flagelo posterior livre (KAMARUDDIN et al., 2014; LI et al., 2014).

O axóstilo é uma das estruturas que fazem parte do citoesqueleto dos parabasalídeos e forma o chamado complexo pelta-axóstilo que dá sustentação ao corpo celular. Essa estrutura percorre todo o comprimento do corpo celular, sendo a parte anterior mais ampla formando o *capitulum*. Após o núcleo, estrutura do axóstilo parece reduzir de largura até seu segmento terminal, onde se projeta a partir da extremidade posterior da célula como uma ponta fina ou semelhante a uma cauda (WENRICH, 1944; BENCHIMOL, 2004) (Figura 3).

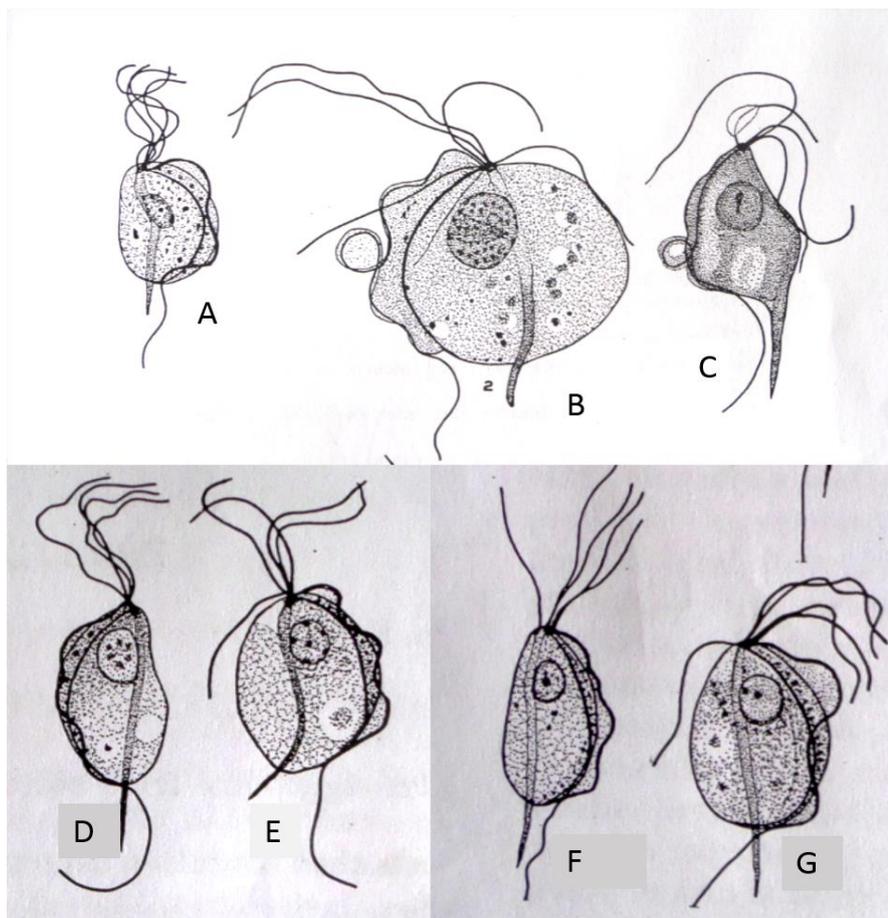


Figura 3. Desenho esquemático de *Pentatrichomonas hominis* isolados de vários hospedeiros. **A-C:** Humano; **D:** Macaco *Rhesus*; **E:** Gato; **F:** Cão; **G:** Rato (WENRICH, 1944).

3.1.2 Genotipagem

A utilização da biologia molecular na identificação de espécies de trichomonádídeos e tritrichomonádídeos foi implementada pela primeira vez por Felleisen (1997) ao desenvolver marcadores moleculares, chamados de TFR1 e TFR2, que amplificavam sequências conservadas do gene 5.8S rRNA e as regiões interespadoras internas (ITS1 e ITS2). As regiões ITS1 e ITS2 são conhecidas por serem menos conservadas entre espécies e assim mais adequadas para caracterização filogenética de organismos estreitamente relacionados como espécies diferentes do mesmo gênero (HILLIS; DIXON, 1991).

O estudo realizado por Felleisen (1997) foi importante porque forneceu dados moleculares de diversas espécies de trichomonádídeos e foi o primeiro estudo a apresentar a análise de sequência do RNA ribossomal (rRNA) de *P. hominis*. Segundo ele, as similaridades das sequências da região ITS1 e do gene ribossomal 5.8S desse parasito indicaram um grau relativamente alto de conservação, quando comparado a outras de outros

trichomonádídeos, apresentando apenas 74% de identidade quando comparada as sequências do mesmo segmento do gênero *Tritrichomonas* e 80% quando comparada às sequências do gênero *Trichomonas*. Baseado nas similaridades observadas do gene 5.8S ribossomal e da região ITS1, *P. hominis* está mais próximo ao gênero *Trichomonas* do que ao gênero *Tritrichomonas*.

O desenvolvimento dos iniciadores TFR1 e TFR2 feita por Felleisen (1997) deu origem a diversos estudos moleculares para desenvolvimento de técnicas que permitissem o diagnóstico de trichomonádídeos em nível de espécie. Uma dessas técnicas é conhecida como Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição ou a sigla em inglês RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*). O objetivo da técnica é diferenciar espécies através do corte de um fragmento de DNA amplificado com enzimas de restrição que cortam o DNA em regiões específicas e geram um padrão de bandas com tamanhos diferentes entre as espécies. A técnica pode permitir a diferenciação de espécies, sem muitas vezes, ser necessário à utilização do sequenciamento que pode não estar disponível em muitos laboratórios (HAYES et al., 2003). O RFLP foi empregado para diferenciação de trichomonádídeos recuperados de lavado prepucial de touros e que não tinham morfologia característica de *T. foetus*. Utilizando o RFLP com a enzima *HpyCH4IV* foi possível diferenciar *P. hominis*, de outras espécies. De *T. foetus* produziu-se dois fragmentos com 220 e 151 bp (pares de base), de *P. hominis* se produziu três fragmentos com 161, 135, 42 bp (HAYES et al., 2003)

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

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

Outro método recentemente descrito para diagnosticar *P. hominis* e *T. foetus* diretamente de cortes de tecido fixado em formol e incluído em parafina é hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando probes específicas para uma parte do rRNA 18S. Com esta técnica, a correlação da presença do protozoário com lesões do tecido pode ser facilmente avaliada. No entanto, a auto-fluorescência de células sanguíneas, que possuem o mesmo tamanho dos protozoários é a principal desvantagem da técnica FISH (GOOKIN et al., 2010). Sendo assim, outra técnica, a hibridização *in situ* Cromogenica(CISH) foi desenvolvida porque ela não exhibe esta desvantagem e foi demonstrado ser um método confiável para a detecção e diferenciação de tricomonádídeos (MOSTEGL et al., 2010), utilizando marcadores moleculares específicos para *T. foetus* e *P. hominis* (MOSTEGL et al., 2012).

Independente do método ou marcadores utilizados para identificação de *P. hominis*, o grau de similariedade varia de 99,4 - 100%, quando comparadas às cepas de origem humana (LEVY et al., 2003; GOOKIN et al., 2005; LI et al., 2014). As variadas espécies, onde *P. hominis* já foi identificado e o alto grau de similariedade (98,5–100%) entre amostras de diferentes hospedeiros incluindo humanos, bovinos, suínos, cães e gatos indica, possivelmente que sejam a mesma espécie (KIM et al., 2010; GRELLET 2013). Esses achados corroboram a hipótese de que a mesma espécie de *P. hominis* poderia ser capaz de colonizar o trato digestivo de diversos hospedeiros mamíferos e até mesmo de outras classes como aves e répteis (MELONI et al., 2011; DIMASUAY; RIVERA, 2013).

3.1.3 Aspectos biológicos

Pentatrichomonas hominis apresenta motilidade rápida quando em meios líquidos, porém com características irregulares e de trajetória errática. Esse tipo de motilidade é conhecido como axial, ou seja, movimento de rotação no próprio eixo, características comuns aos trichomonádídeos (WENRICH, 1944).

O citoplasma é altamente plástico tornando possível várias mudanças de forma, especialmente quando em contato com superfícies sólidas. Sob certas condições pode recolher os flagelos para dentro do citoplasma tomando um formato arredondado semelhante a um cisto, porém sem formar uma parede cística verdadeira, chamada de pseudocisto (WENRICH, 1944; LI et al., 2014). O pseudocisto também apresenta divisão, um tipo de mitose diferente da que é feita pelos trofozoítos (PEREIRA-NEVES et al., 2009).

A multiplicação é do tipo assexuado por divisão binária, mas também são observadas formas de multiplicação múltipla (Figura 4) (DA CUNHA; MUNIZ, 1922; WENRICH et al., 1944).

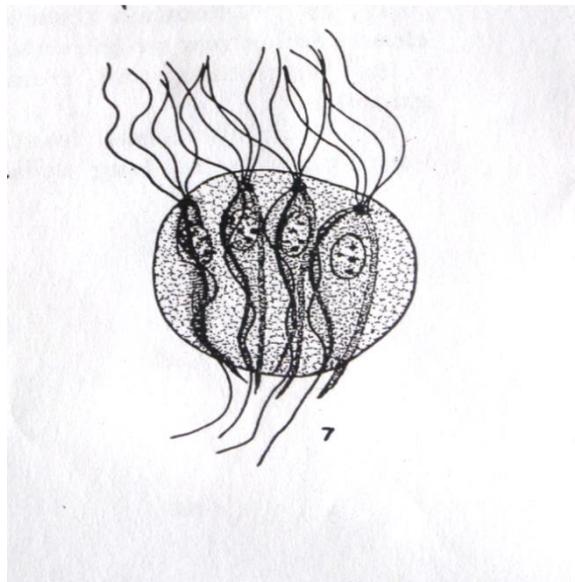


Figura 4. Desenho esquemático de *Pentatrichomonas hominis* isolado de humanos, exibindo forma de divisão múltipla (WENRICH, 1944).

A forma de transmissão de *P. hominis* ocorre por via feco-oral. Tanto os trofozoítos quanto os pseudocistos são formas infectantes que, podem contaminar a água, solo e plantas e se tornarem fontes de infecção tanto para humanos quanto para animais (KESSEL, 1928; DIMASUYA; RIVERA, 2010).

3.1.4 Patogenicidade

A literatura envolvendo o diagnóstico de *P. hominis* em gatos e seu grau de patogenicidade é limitada a alguns estudos relatando sua associação com sinais clínicos de diarreia (KESSEL, 1928; ROMATOWSKI, 2000).

A primeira descrição de *P. hominis* em gatos foi feito no Brasil por Da Cunha e Muniz (1922), o animal apresentava diarreia crônica e veio a óbito. O conteúdo fecal continha grande quantidade de protozoários, identificados como do gênero *Trichomonas*, e numerosos leucócitos, tendo alguns desses, protozoários fagocitados em seu interior, contudo o exame histopatológico não indicou nenhuma anormalidade.

Mais tarde, outro estudo (KESSEL, 1928) demonstrou que filhotes de gatos naturalmente infectados por *P. hominis* tinham diarreia ou disenteria, vindo a óbito em poucos dias. Na necropsia apresentavam cólon com considerável adelgaçamento da parede. Ao exame histopatológico observou áreas com inflamação catarral, hipersecreção pela membrana mucóide, necrose e ulceração da camada superficial do epitélio. *Pentatrichomonas hominis* foi encontrado na camada necrótica do tecido e também entre as células da mucosa intestinal.

Hegner e Eskridge (1935) ao infectar gatos com cepas de origem felina e humana não encontraram sinais clínicos de diarreia ou qualquer outro indicativo de infecção, contudo, os animais apresentavam o protozoário nas fezes, questionando a patogenicidade entre as cepas encontradas. Porém, esse estudo foi o primeiro a relatar a transmissão de *P. hominis* entre gatos, infectados e não infectados, quando esses felinos eram colocados no mesmo ambiente. Da mesma maneira Guilford & Strombeck (1996) questionaram a patogenicidade de *P. hominis* em gatos, e mencionaram que na maioria das vezes, essas infecções estejam associadas a um crescimento exacerbado do agente etiológico gerando infecções oportunistas.

Diversos autores (GOOKIN et al., 1999; ROMATOWSKI, 2000; GOOKIN et al., 2001) diagnosticaram uma outra espécie de parabasalídeo diferente de *P. hominis* pois neste haviam apenas três flagelos anteriores ao invés de cinco. Por isso alguns estudos classificaram erroneamente o agente etiológico como *P. hominis*. Com aumento do número de casos de diarreia os estudos passaram a se concentrar em diagnosticar o protozoário, e com auxílio da biologia molecular chegou-se ao diagnóstico de *T. foetus*, agente etiológico esse responsável pela infecção e não *P. hominis* como se imaginava (LEVY et al., 2003). Com isso, estudos sobre frequência e patogenicidade com *P. hominis* em gatos foram cada vez mais escassos.

Um estudo histopatológico utilizando marcadores de DNA para *T. foetus* e *P. hominis*, técnica conhecida como Hibridização cromogênica *in situ* (CISH), demonstrou que *P. hominis* foi diagnosticado em pequeno número e apenas dentro do lúmen das criptas intestinais, enquanto que *T. foetus* foi encontrado no lúmen em pequeno número, porém quando em grande número, observou-se que os protozoários foram encontrados invadindo a lâmina própria. Os achados neste estudo indicaram que diferenças na localização tecidual desses organismos e, o número desses puderam influenciar nos diversos graus de lesões colonicas observadas (MOSTEGL et al., 2012).

Apesar das divergências sobre a real patogenia de *P. hominis*, em outras espécies animais, o diagnóstico deste protozoário esteve sempre associado ao quadro clínico de diarreia acentuada. Em suínos infectados experimentalmente com *P. hominis*, as lesões histológicas estavam associadas a alterações na camada epitelial, incluindo aqui congestão,

descamação da mucosa intestinal e aumento acentuado de células inflamatórias. Outros achados foram angiorrexia e diminuição do comprimento das vilosidades intestinais (LI et al., 2014). *Pentatrichomonas hominis*, também foi diagnosticado em filhotes de cães com os sinais clínicos de diarreia líquida, perda de peso e fraqueza. Apesar de receberem tratamento com fenbendazole para eliminar esse agente etiológico, a diarreia persistiu e, os animais vieram a óbito (GOOKIN et al., 2005).

3.1.5 Diagnóstico Diferencial

Gatos podem ser acometidos por duas espécies de parabasalídeos tanto por *P. hominis* quanto por *T. foetus*. Apesar de ser considerado comensal, *P. hominis* já foi descrito em gatos com diarreia (ROMATOWSKI, 1999). *Tritrichomonas foetus* foi reconhecido como o agente etiológico da diarreia de intestino grosso de felinos (LEVY et al., 2003) com relatos de casos em todo os continentes (CEPLECHA et al., 2013)

O diagnóstico diferencial entre estas espécies é difícil de ser feito com base apenas em suas características de motilidade e forma. Em meio líquido, as características de motilidade de *P. hominis* e *T. foetus* são muito semelhantes, isso porque a motilidade é do mesmo tipo para todas as espécies de trichomonadídeos e tritrichomonadídeos. Contudo, avaliar o tipo de motilidade é suficiente para diferenciação destes protozoários de outro flagelado muito comum nas fezes de gatos, as espécies do gênero *Giardia*. Quando começaram a surgir os primeiros casos de diarreia imaginava-se tratar-se de giardíase, pois faltava conhecimento sobre *T. foetus* infectando gatos e, os dois organismos possuíam flagelos do mesmo tamanho. Entretanto, passou-se a observar que espécies do gênero *Giardia* apresentava motilidade que se assemelhava a uma folha caindo, enquanto *T. foetus* e *P. hominis* possuem movimento axial e errático (GOOKIN et al., 2004). Desta forma, com o exame a fresco não é possível visualizar as estruturas que diferenciam entre as espécies.

Os meios de cultivo seletivos, também seriam outra forma de diagnóstico diferencial. Porém, o cultivo em meios específicos, como o mais popular deles, que foi desenvolvido por Diamond (1957) não tem possibilitado a diferenciação entre as espécies de parabasalídeos, mais impedem o crescimento de outros flagelados, como os do gênero *Giardia* como exemplo.

Recentemente, foi desenvolvido um sistema comercial de cultivo para o diagnóstico específico de *T. foetus*, chamado de *InPouch TF medium* (Bio-MedDiagnostics, White City, Oregon, EUA). Esse foi considerado por muito tempo o “padrão ouro” para o diagnóstico da

infecção por *T. foetus* em gatos (GOOKIN et al., 2003; QUEEN, 2012). O fato de estar disponível comercialmente, ser relativamente barato e fácil de usar o tornou famoso entre os clínicos veterinários. O meio destina-se a ser altamente específico para *T. foetus* isso porque *P. hominis* e *Giardia intestinalis*, que são morfologicamente semelhantes, não sobrevivem por mais do que 24 horas (GOOKIN et al., 2003). Entretanto, Cepplecha et al. (2013) cultivaram com sucesso uma cepa de *P. hominis* proveniente da inoculação de fezes de gato no *InPouch TF medium*. Através de análise molecular somente *P. hominis* foi diagnosticado nesse cultivo, confirmando assim, que *P. hominis* pode também sobreviver nesse método de cultivo e que estudos que somente utilizam essa metodologia para o diagnóstico da trichomonose em gatos seria temerário por estar diagnosticando errado, além de submeter desnecessariamente os animais ao tratamento com uma droga potencialmente neurotóxica como ronidazole.

A análise morfológica utilizada como ferramenta de diagnóstico, presuntivamente identificou erroneamente *P. hominis* como o agente etiológico da diarreia felina (GOOKING et al., 2001). Apesar de serem bastante semelhantes, *P. hominis* e *T. foetus* possuem características morfológicas que podem diferenciá-los. A primeira característica marcante de diferenciação entre esses dois flagelados seria o número de flagelos anteriores. *Tritrichomonas foetus* tem invariavelmente três flagelos anteriores (BENCHIMOL, 2004); enquanto que *P. hominis* apresenta cinco flagelos anteriores (WENRICH, 1947; FLICK, 1954; Li et al., 2010,) (Figuras 5 A e B).

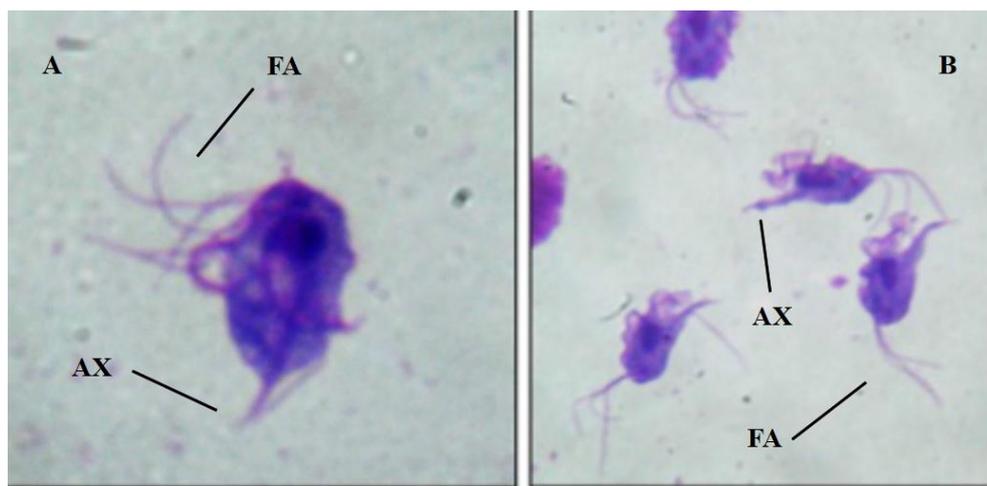


Figura 5. Trofozoítos: FA (flagelos) e AX (axóstico). *Pentatrichomonas hominis* exibindo cinco flagelos anteriores (A) e *Tritrichomonas foetus* com três flagelos anteriores (B) (SÁNCHEZ; BOERO, 2013).

Outra característica marcante de diferenciação morfológica seria o formato da parte protusa do axóstilo, que em *P. hominis* se afina gradativamente (WENRICH, 1944) e em *T.*

foetus a protusão do axóstilo é mais espessa logo na emergência para fora do citoplasma e se afunila bruscamente (WENRICH; EMMERSON, 1931).

O emprego de técnicas moleculares para o diagnóstico de espécies de parabasalídeos em animais domésticos começou quando Felleisen (1997) publicou um estudo utilizando um par de iniciadores capazes de amplificar rRNA de diversos membros da família Trichomonadidae. Porém, a diferenciação de espécies só era realizada através do sequenciamento. Um ano mais tarde, foi publicado um novo par de iniciadores capazes de amplificar espécies do gênero *Tritrichomonas*, mais especificamente a *T. foetus*, sendo utilizado para diagnósticos de trichomonose bovina de amostras de lavado e cultura, onde foi muito específico para a espécie (FELLEISEN et al., 1998). Esses iniciadores começaram a ser utilizados também no diagnóstico de *T. foetus* em gatos com sinais clínicos de diarreia onde se observava protozoários semelhantes a *T. foetus* encontrados nas fezes (GOOKIN et al., 2002; LEVY et al, 2003). Entretanto, se não houvesse amplificação o animal era considerado negativo para tricomonose, mesmo sendo positivo no exame a fresco. Foi a partir do desenvolvimento de marcadores moleculares para o gene 18S rRNA de *P. hominis* por Crucitti et al. (2004) é que se passou a utilizar o mesmo para diagnóstico e diferenciação entre *T. foetus* e *P. hominis* em gatos com diarreia quando se utilizaram amostras de fezes e não mais só o cultivo dos trofozoítos (GOOKIN et al., 2007).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Para este estudo um total de 41 amostras de fezes de gatos foi avaliado. Todas eram procedentes do LQEPV, DPA, Anexo 1 do IV da UFRRJ, *Campus* Seropédica, RJ. Este estudo foi conduzido após ter sido aprovado em 24 de junho de 2014 pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/IV/UFRRJ # 006/2014).

3.2.2 Coleta de Amostras de Fezes

Amostras de fezes gatos, foram coletadas diretamente da caixa de areia. Estas amostras foram acondicionadas em potes plásticos próprios para coleta, identificadas e encaminhadas ao LPR, Anexo 1 do IV, UFRRJ. Parte destas amostras foram colocadas em tubos com fundo cônico de 15-50 ml e diluídas em meio de Hank's (Anexo 2), e aproximadamente 0,2 g de

fezes foram colocadas em caldo peptonado ou meio de Diamond (Anexo 2) e incubados em estufa bacteriológica a 35°C por até 10 dias. Todas as amostras e fezes foram colocadas em meio de cultura. Duzentos miligramas de fezes foram colocadas em tubos tipo eppendorf de tampa rosca e armazenadas em freezer a -20°C para análise molecular posterior.

3.2.3 Diagnóstico Morfológico

3.2.3.1 Esfregaço úmido

A presença de protozoários nas fezes de cada animal foi avaliada logo após a coleta por meio de exame direto, onde se colocava 10 µl da amostra diluída em meio de Hank's com 10 µl de eosina amarela 2% em uma lâmina e, a seguir, realizava-se a leitura em microscópio binocular (Primo Star Zeiss®, RFA) com objetiva de 100X. As amostras foram consideradas positivas quando constatada a presença de protozoários com formato e motilidade semelhantes aos dos trichomonádídeos.

3.2.3.2 Esfregaço de Cultura

Parte das amostras de fezes foram inoculadas em tubos contendo meio de Diamond (1957) ou caldo peptonado e incubadas a 35°C. A avaliação do crescimento em cada uma foi realizada a cada 24 horas, através de exame direto de uma gota do meio de cultura em lâmina e observadas em microscopia óptica. Repiques da cultura para um meio novo foram realizados a cada 72 horas. As amostras eram consideradas negativas nas culturas após 10 dias de incubação.

3.2.3.3 Análise morfológica

3.2.3.3.1 Esfregaços Úmidos

As amostras de cultura foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi fixado com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (pH 7,2) e deixado em repouso a temperatura ambiente. Após um período de duas horas, cada amostra foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado com solução tampão de fosfato e armazenado em geladeira. Foram

preparados esfregaços úmidos ao se colocar 10 µl de cada amostra em uma lâmina e cinco µl de eosina amarelada 2% , recobrimo esta com uma lamínula de tamanho 24 x 24 mm e selada com verniz vitral ou esmalte transparente. As amostras foram observadas em microscopia óptica com objetiva de 1000X.

3.2.3.3.2 Esfregaço Corado

As amostras de cultura na quantidade de 3 ml foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o respectivo sedimento foi ressuspendido em 100 µl de caldo peptonado novo e homogeneizado. Dez microlitros da suspensão dos protozoários foram colocados em lâminas limpas e o esfregaço delgado realizado com movimentos circulares com uma alça de platina e deixado secar ao ar. Os esfregaços foram fixados em metanol por um minuto e corados pelo método da hematoxilina férrica, segundo Heidenhain (BARRET, 1932).

3.2.4 Fotomicrografias, mensuração e desenhos dos trofozoítos

Todas as análises morfológicas foram realizadas em microscopia óptica (microscópio triocular Zeiss, RFA). As fotomicrografias foram feitas com auxílio de câmara digital AxioCamERc 5s acoplada ao referido microscópio. A análise morfométrica dos trofozoítos foram feitas utilizando programa AxionVision Release 4.8.2 (2010). Os desenhos foram editados com auxílio de dois programas CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), especificamente Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT.

3.2.5 Diagnóstico e identificação molecular

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

3.2.5.1 Extração de DNA Genômico

Amostras de culturas contendo de $2-6 \times 10^6$ /ml de flagelados foram colocadas em tubos de micro-centrifuga de 1,5 ml e centrifugadas a $16.000 \times g$ por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com um ml de solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,2). As células foram ressuspensas em 100 μ l de InstaGene Matrix [®] (BIO RAD, EUA) e incubadas a 56°C por 30 minutos e, a seguir, fervidas a 100°C por 8 minutos. As amostras em tubos foram centrifugadas ($16.000 \times g$ por 5 minutos) para sedimentar os resíduos celulares junto com matriz de resina (chelexmatrix). Uma alíquota de 60 μ l de cada sobrenadante foi transferida para um novo tubo e estocada a -20°C .

3.2.5.2 Iniciadores (*primers*)

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

3.2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi conduzida com um volume total de reação de 20 μ l usando aproximadamente 20 ng DNA genômico, 0,2 mM de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl_2 e 0,5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, EUA). A reação foi realizada em termociclador (TProfessional 96 modelo 070-901 Biometra, EUA). Como controle positivo das reações utilizou-se os iniciadores TFR3 e 4 e DNA de *T. foetus* cepa K isolada por Dr. H. Guida, (Embrapa, Rio de Janeiro, Brasil) do trato urogenital de um touro e já previamente identificado (GENBANK AY485677.1 – www.ncbi.nlm.nih.gov).

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

TFR1	5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3')	372 bp
TFR2	5' - CGG TAG GTG AAC CTG CCG TTG G-3')	

TFR3	5'- CGG GTC TTC CTA TAT GAG ACA GAA CC- 3'	347 pb
TFR4	5'- CCTGCC GTT GGA TCA GTT TCG TTA A-3'	
TH3	5'- TGT AAA CGA TGC CGA CAG AG -3'	339 pb
TH5	5'- CAA CAC TGA AGC CAA TGC GAG C-3'	

As condições foram otimizadas para cada par de *primers*. Para os iniciadores TFR1/TFR2 e TFR3/TFR4 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 33 ciclos com extensão final a 72°C por 5 minutos. Para os iniciadores Th3 e Th5, as condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, a 95°C por 20 segundos; anelamento a 64 °C por 20 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos, acompanhando 40 ciclos com extensão final a 72°C por 5 minutos. Alíquotas de cada uma das reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. Para confirmar a presença dos produtos de peso molecular esperado, os géis foram corados em brometo de etídeo e a visualização dos ácidos nucleicos foi feita em transiluminador (BIO RAD[®] HOODII, EUA).

3.2.5.4 Polimorfismo no comprimento em fragmentos de restrição (RFLP)

Após a confirmação da amplificação do fragmento do tamanho esperada foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Primeiro foi feita uma análise de digestão *in silico* empregando o programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA) utilizando-se sequências previamente depositadas no Genbank de *P. hominis*. Após análise pelo programa, foram escolhidas duas enzimas que produziram dois tipos de cortes diferentes, *Hae* III, gerando dois fragmentos e *Hinf* I que, geraria três padrões de corte. Os produtos de PCR gerados com os iniciadores TH3 e 4, específicos para *P. hominis* (339 pares de bases), foram digeridos utilizando 10 unidades de enzimas de restrição *Hae*III (Promega, EUA) e *Hinf*I (Invitrogen, EUA) a 37°C por 2 horas. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 8% e corados com brometo de etídeo, visualizados e fotodocumentados. Os fragmentos gerados foram analisados com o auxílio do programa Quantity-One (BioRad, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, gerados pelos cortes com as enzimas e, estes foram comparados com os padrões gerados nas análises *in silico*.

3.2.5.5 Sequenciamento dos Produtos da PCR

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

3.3.4 Análise estatística

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

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 *Pentatrichomonas hominis*

3.4.1.1 Visualização dos trofozoítos

De um total de 41 amostras, 11 (26 %) foram consideradas positivas para a presença de trichomonadídeos com base na análise microscópica das fezes pelo exame a fresco e cultura. Os trofozoítos observados eram de formato piriforme, com movimentos rápidos, e motilidade característica de trichomonadídeos, ou seja, progressiva, errática e com movimento rotacionado (axial), o mesmo tipo de movimento descrito previamente por Diamond (1957). O acompanhamento dos protozoários nas fezes foi feito pelo período de um mês e depois eram descartadas. Foi possível visualizar os trofozoítos por duas semanas ou mais. Resultados semelhantes foram descritos para cepas de *P. hominis* isoladas de cães, onde os organismos geralmente sobreviviam nas fezes por um período de até sete dias, com alguns organismos sobrevivendo por mais de três semanas (LI et al., 2014).

Todas as amostras positivas no exame a fresco foram também positivas em cultura, apenas uma das amostras foi positiva somente após o cultivo. No cultivo em meio líquido, os trofozoítos apresentavam, em sua grande parte, formato oval. Mesmo contendo alguns antibióticos no meio de cultura, não foi possível eliminar a contaminação bacteriana presente.

A multiplicação observada na grande maioria das amostras foi de divisão binária, iniciada pela parte anterior do corpo (Figura 6), mas também foram observadas formas de divisão múltipla com trofozoítos apresentando formato globoso contendo mais de três núcleos (Figura 7A) e outros em processo de separação (citocinese) (Figura 7 B, C e D). O tipo de multiplicação normalmente apresentado pelos parabasalídeos é do tipo binária, onde um indivíduo dá origem a dois (BENCHIMOL, 2004). Formas de divisão múltipla foram raramente descritas na literatura. Da Cunha e Muniz (1922) foram os primeiros a relatarem a presença de *P. hominis* em gatos descrevendo sua morfologia e a presença de formas de protozoário em divisão múltipla, observados em alguns cultivos. Mais tarde, estudo conduzido por Wenrich (1944) quando comparou cepas de *P. hominis* de diversos hospedeiros apresentou em desenho esquemático um trofozoíto em divisão múltipla, semelhante ao encontrado no presente estudo (Figura 7 B). A divisão múltipla parece ocorrer também quando o protozoário está na forma de pseudocisto. Quando as condições ambientais permanecem desfavoráveis, os pseudocistos realizam sucessivas divisões mitóticas sem a ocorrência da citocinese, formando assim células multinucleadas. Quando estas células são colocadas em condições favoráveis, seus flagelos são externalizados e, conforme o observado para outros tricomonadídeos, cada indivíduo piriforme possui força propulsora suficiente para se individualizar e se desprender por completo do organismo multinucleado (PEREIRA-NEVES et al., 2003).

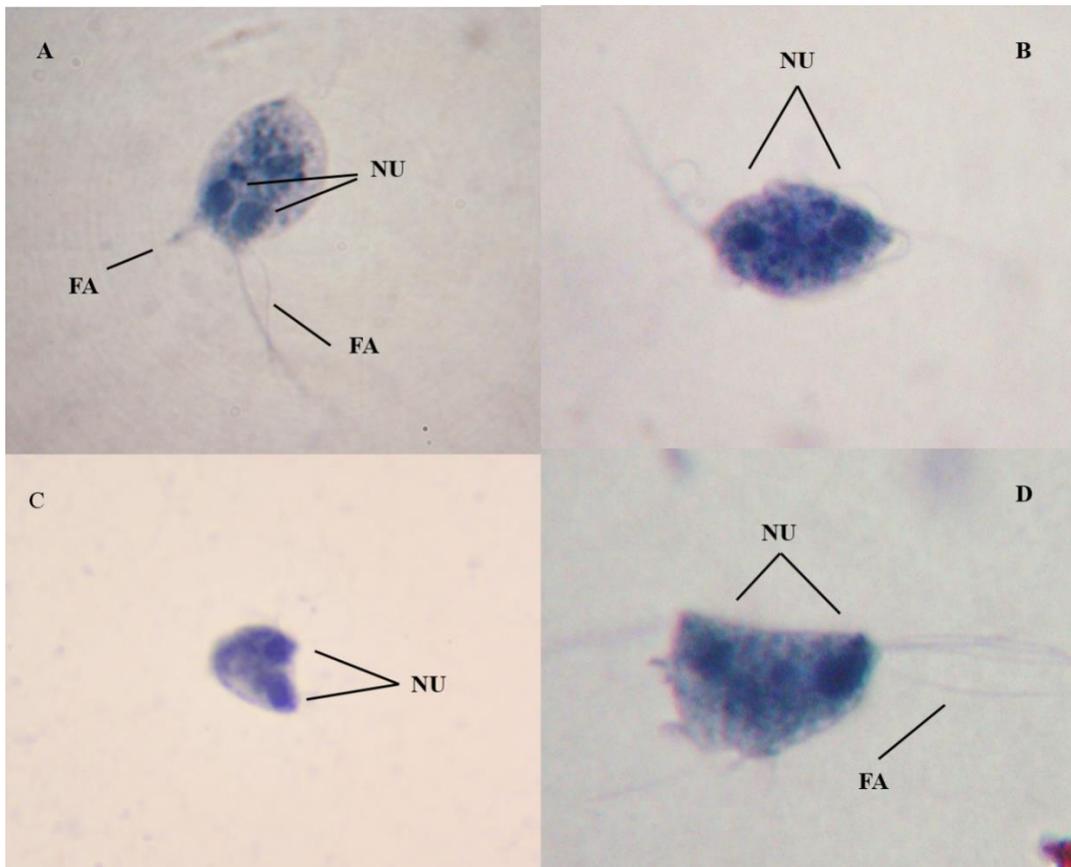


Figura 6. Trofozoítos de *Pentatrichomonas hominis* em processo de divisão binária, apresentando dois núcleos (NU), dois grupos distintos de flagelos anteriores (FA) (A, B e D). Hematoxilina Férrica. Obj. 100X.

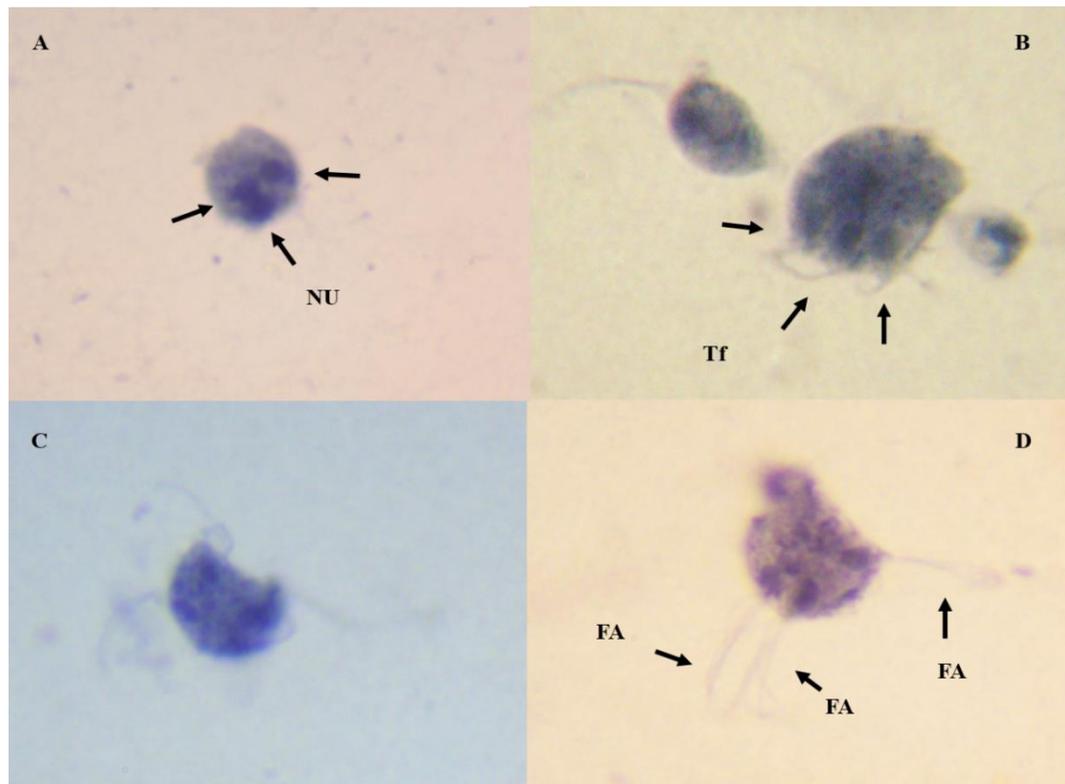


Figura 7. Trofozoítos de *Pentatrichomas hominis* em divisão múltipla. **(A)** Forma globosa apresentando três núcleos (NU) (setas); **(B)** Trofozoítos em processo de citocinese (setas); **(C e D)** Citocinese de quatro trofozoítos, apresentando grupos de flagelos anteriores externalizados (FA) (setas). Hematoxilina Férrica. Obj. 100X.

Formas multiflageladas e multinucleadas também foram visualizadas. Alguns com mais de oito núcleos e com movimento não mais progressivo, e sim rotacionado (Figura 8). Não foram encontradas formas de pseudocisto nas culturas avaliadas. Segundo Honigberg e Brugerolle (1990), as formas multinucleadas e multiflageladas de trichomonádídeos representariam uma forma degenerativa dos protozoários. Entretanto, há evidências indicando que os organismos multinucleados possam representar uma forma naturalmente presente no ciclo biológico dos tricomonadídeos. As descrições de formas multinucleadas de *P. hominis* são controversas. Kirby (1946) afirmou que estes organismos seriam estágios de desenvolvimento que precederiam à formação de flagelados mononucleados. Contudo, a ocorrência de formas multinucleadas e multiflageladas podem estar relacionadas ao tempo em meio de cultivo, pois quanto maior o tempo, maior o número deste tipo de formação.

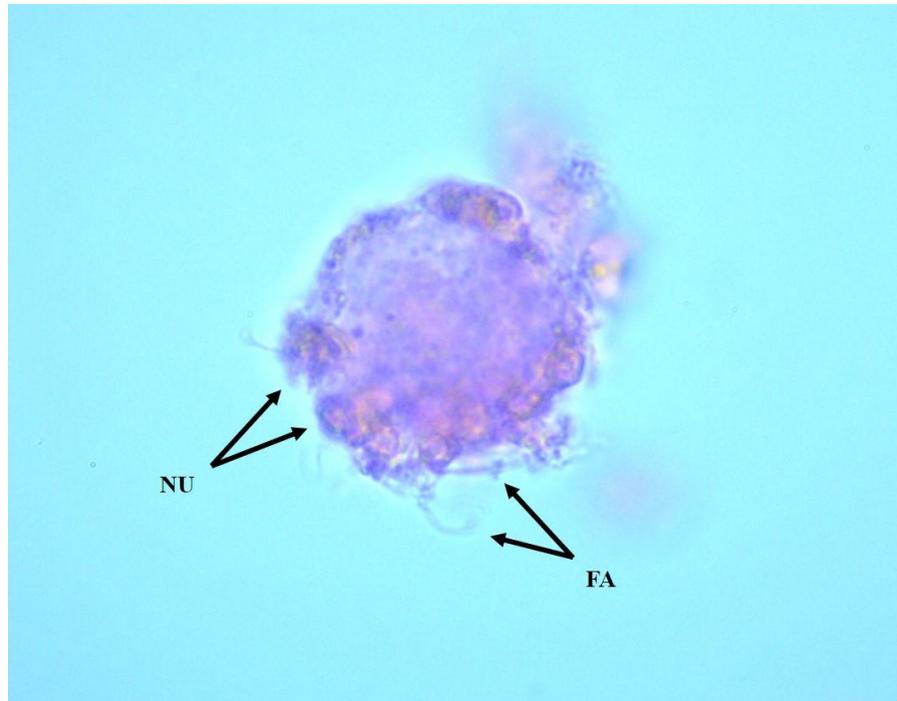


Figura 8. Forma multinucleada e multiflagelada de *Pentrichomonas hominis* isolado de gato. (NU) núcleos, (FA) flagelos. Eosina (2%). Obj. 100X.

O íon ferro é importante para o ciclo celular e está presente nos meios utilizados para o cultivo de parabasalídeos. Seu metabolismo com respectiva depleção no meio pode interferir no ciclo celular. Estudo realizado por Melo-Braga et al. (2003) demonstrou que a depleção de ferro no meio de cultura e sua posterior reposição ocasionou o aumento das formas multinucleadas e multiflageladas no meio de cultura. Esses autores sugeriram que alguns destes protozoários tiveram comprometimento irreversível da divisão celular, especificamente da citocinese, portanto não se separavam.

A observação das fezes ou da cultura contendo trofozoítos não permitiu a diferenciação entre as duas espécies que podem ser encontradas nas fezes dos gatos, *P. hominis* e *T. foetus*. A baixa sensibilidade do exame a fresco e de cultura já foi relatada em gatos por Romatowski, (1996) e Gookin et al. (1999), por poder haver mais de uma espécie de parabasalídeo infectando o mesmo hospedeiro, sendo assim não é possível distinguir *P. hominis* de *T. foetus* com base apenas no exame a fresco ou de cultura.

Por muito tempo, a cultura foi o método padrão “ouro” para diagnóstico de *T. foetus* em bovinos, porém outros parabasalídeos de origem fecal foram diagnosticados no sistema reprodutor, tornando o método questionável em relação a sua especificidade, podendo

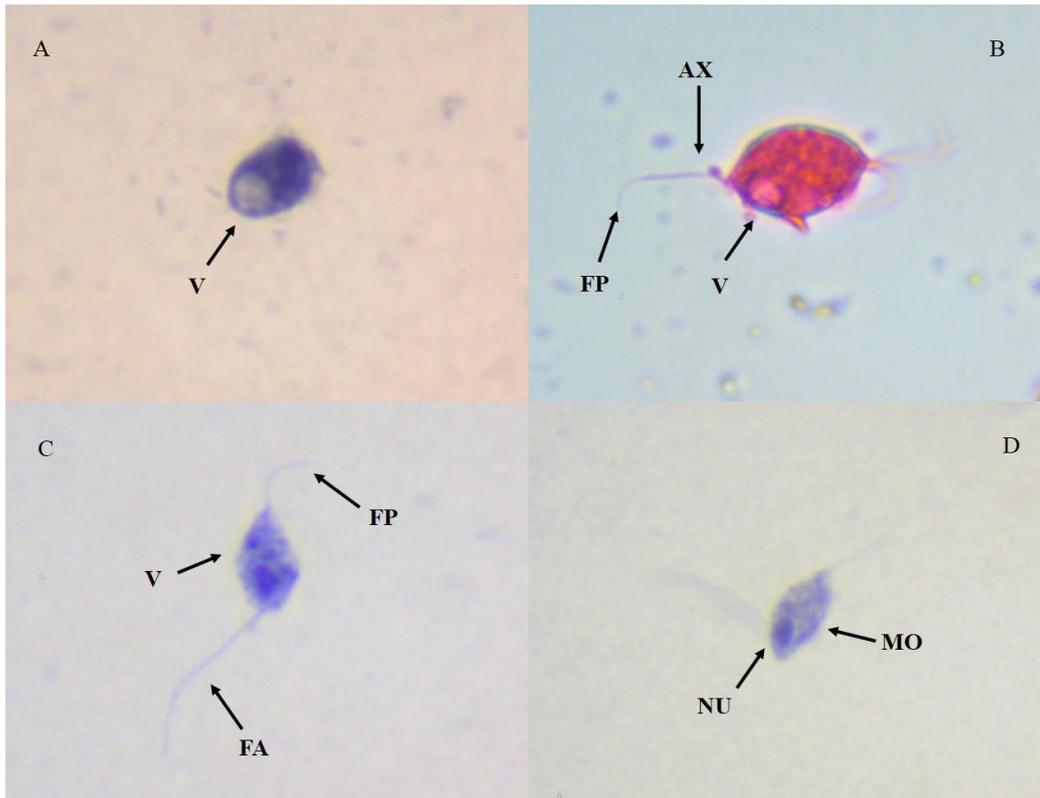
confundir o diagnóstico da tricomonose bovina (DUFERNEZ et al., 2007). O mesmo foi observado para o diagnóstico da tricomonose felina. Com o aumento do número de casos em gatos com diarreia por *T. foetus*, foi desenvolvido um método de cultura comercial (In Pouches™) que segundo Gookin et al. (2001) era específico para a espécie. Contudo, foi possível cultivar *P. hominis* utilizando o mesmo método (CEPLECHA et al., 2013). Em estudo conduzidos com bovinos, *T. foetus* foi identificado baseado apenas na morfologia e motilidade dos trofozoítos. Isto resultou em um diagnóstico inicial da infecção por *T. foetus*, embora os touros fossem virgens, onde mais tarde demonstrou-se tratar de outras espécies de parabasalídeos (CORBEIL et al., 2008), demonstrando a inespecificidade dos métodos de cultura para diagnóstico a nível de espécie tornando necessário a utilização de outros métodos para diagnóstico correto.

Apesar da baixa especificidade, o exame a fresco e a cultura são excelentes métodos de triagem para avaliar se um animal é positivo ou não. Em um estudo conduzido em cães por Tolbert et al. (2012), 38 amostras fecais de animais com diarreia foram analisadas, onde 88% deles foram positivos para parabasalídeos no exame a fresco das amostras de fezes. Quando as amostras foram submetidas ao exame molecular, apenas 52% (20 amostras) destas foram positivas para parabasalídeos (*P. hominis* e ou *T. foetus*). Os mesmos autores não encontraram justificativa para o teste ter dado falso-negativo; contudo, esses resultados indicaram que exames mais simples podem e devem ser utilizados para o diagnóstico de tricomonose em gatos, mesmo sem ser específico.

3.4.2 Identificação fenotípica dos trofozoítos

3.4.2.1 Morfologia

Os parabasalídeos em cultura xênicas foram visíveis na microscopia óptica em preparações não coradas, coradas com eosina ou em coradas pela hematoxilina férrica, mas a visualização e a enumeração de flagelos foram realçadas nas preparações de esfregaço úmido corado pela eosina. Por ser uma preparação úmida, foi possível com leves toques na lamínula mudar a posição do trofozoíto e assim fazer melhor observação e contagem correta dos flagelos.



Os trofozoítos de *P. hominis* isolados tiveram formato que variou de piriforme a arredondado; em alguns era possível visualizar a presença de vacuolizações no citoplasma (Figura 9 A-D).

Figura 9. Formas variadas de *Pentatrichomonas hominis* isolados de gatos. **A e B:** formato arredondado apresentando vesículas (V) de endocitose (setas) (**A:** hematoxilina férrica; **B:** preparação úmida com eosina); **C e D:** formato piriforme (hematoxilina férrica) núcleo (NU), membrana ondulante (MO), flagelo posterior (FP), flagelos anteriores (FA). Obj. 100X.

Semelhante aos achados neste estudo, LI et al. (2014) descreveram que *P. hominis* foi claramente visível em preparações não coradas ou coradas com corantes derivados de Romanowsky (Giemsa, Wright-Giemsa). Os protozoários apresentavam formato variando de

fusiforme a piriforme com um longo axóstilo. Porém, os mesmos autores relataram a dificuldade de enumeração dos flagelos.

À semelhança do presente estudo, *P. hominis* isolado de suínos também apresentou formas com capacidade endocítica semelhante a outras espécies de parabasalídeos, contendo diversas vesículas em seu citoplasma (LI et al., 2014).

Segundo Benchimol et al. (1990), essas vesículas possuem tamanhos distintos e compõem o sistema endocítico da célula. Podem ser observadas, em sua grande parte, constituindo o processo inicial da endocitose e, por este motivo, localizam-se logo abaixo da superfície celular ou, mais profundamente, no citoplasma da célula (AFFONSO et al., 1997). Estudos mostraram que *T. foetus* é capaz de ingerir macromoléculas, como BSA e o corante fluorescente Luciferyellow, partículas de poliestireno (BENCHIMOL et al., 1990; AFFONSO et al., 1997), bactérias (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1985) e fragmentos de espermatozoides (BENCHIMOL et al., 2008). A capacidade endocítica também foi descrita para outras espécies de parabasalídeos como *Tetratrichomonas didelphis*, e *T. vaginalis* (BENCHIMOL et al., 1990; TASCA et al., 2001).

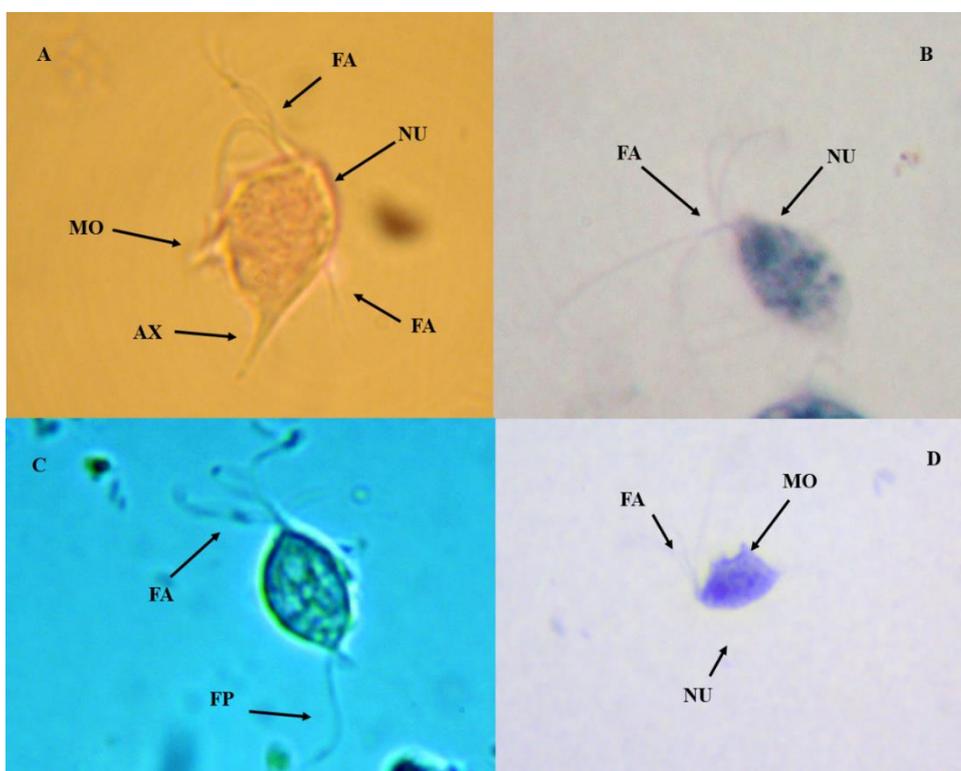
O tamanho dos trofozoítos de *P. hominis* (n =100), excluindo a parte protusa do axóstilo, foi de 10,7 (7–15) µm de comprimento e 8,2 (6-13) µm de largura. Cinco flagelos anteriores de tamanhos desiguais foram observados na grande maioria das amostras, sendo um quase sempre orientado em direção ventral (Figura 10).

Figura 10. **A:** Trofozoíto de *Pentatrichomonas hominis* em formato típico apresentando cinco flagelos anteriores (FA), Eosina 2%; **B:** Trofozoíto com apenas quatro flagelos anteriores (Hematoxilina Férrica); **C:** Flagelo posterior (FP) de *P. hominis* (seta). Eosina 2%. Obj. 100X.

Os flagelos tiveram comprimento maior ou igual ao comprimento do corpo. Trofozoítos com quatro flagelos foram observados, porém em menor número. A membrana ondulante foi claramente visível, e apresentava de 3 a 4 ondulações que se estendia por todo o corpo terminando em uma porção livre (flagelo posterior). O comprimento do flagelo posterior foi de 8,7 μm .

No presente estudo, a análise morfológica relativamente simples forneceu dados suficientes para a diferenciação entre *P. hominis* e *T. foetus*. Características específicas como: número de flagelos, tamanho e formato do axóstilo demonstraram ser úteis no propósito de diferenciação.

A enumeração de flagelos é a base de diferenciação entre essas duas espécies



encontradas em gatos domésticos (*P. hominis* e *T. foetus*). No entanto, a validade desta abordagem tem sido questionada, uma vez que *P. hominis* pode apresentar número variável (3-5) dos flagelos anteriores (LEVINE, 1973; DUFERNEZ et al., 2007). Kirby (1943) definiu cinco flagelos anteriores como uma característica estável e definitiva para *P. hominis*.

Contudo, no estudo conduzido por Flick (1954), 80% dos trofozoítos de *P. hominis* provenientes de amostras de fezes humanas e de primatas apresentaram cinco flagelos anteriores, 15% quatro flagelos e 5% três flagelos anteriores. Esta variação foi atribuída a fatores incluindo idade da cultura e a presença de bactérias específicas que poderiam ocasionar a perda do flagelo cuja emergência se dá separadamente.

A maioria dos isolados examinados apresentaram cinco flagelos anteriores, concordando com estudos morfológicos anteriores que utilizaram cepas de *P. hominis* de vários hospedeiros (WENRICH, 1944; WENRICH 1947). Desta forma o número de flagelos anteriores poderia ser utilizado como uma das características para a diferenciação entre *P. hominis* e *T. foetus* em gatos com sinais clínicos de diarreia ou de disenteria. Porém, outras características também devem ser utilizadas para diferenciação como, por exemplo, o formato do axóstilo que diferentemente de *T. foetus* se afunila de forma gradual e não bruscamente como se observa em *P. hominis*.

Os dados morfológicos fornecidos pelo presente estudo estão de acordo com os descritos para morfologia de *P. hominis* na literatura (WENRICH, 1944; KIRBY 1945), porém nas descrições anteriores os dados morfométricos estão quase sempre ausentes ou incompletos (Tabela 1).

Tabela 1. Morfologia comparativa de trofozoítas de *Pentatrichomonas hominis* isolados de gatos e humanos.

Autores	Wenrich (1944)	Kirby (1945)	Da Cunha & Muniz (1922)	Kessel (1928)	Presente estudo (n=100)
Hospedeiro	Humanos	Humanos	Gato	Gato	Gato
Média e limites (µm)					
Estrutura					
Formato do corpo	fusiforme /piriforme /arredondado	piriforme	piriforme a globuloso	arredondado	fusiforme/ piriforme
Comprimento do corpo	8,3 (6 -13,5)	8-20	7,5	8-15	10,7 (5,0-7,0)
Largura do corpo	-	3-14	6	5-8	8,2 (3,0-6,0)
Formato do núcleo	redondo/oval	-	elíptico	-	redondo
Comprimento do núcleo	-	-	-	-	3,51 (3,0-5,0)

Largura do núcleo	-	-	-	-	3,3 (3,0-5,0)
Formato do Corpo parabasal	-	elipsóide	-	-	redondo
Comprimento do Corpo Parabasal	-	pequeno	-	-	1,4
Largura do Corpo Parabasal	-	-	-	-	1,1
Nº de Flagelos anteriores	Maioria 5 (4 - 3)	Maioria 5 (4)	4	4	5
Tamanho					
Número 1	igual ou maior que o comprimento do corpo	igual ou maior que o comprimento do corpo	igual ou maior que o comprimento do corpo	-	13,5
Número 2	-	-	-	-	13,5
Número 3	-	-	-	-	13,3
Número 4	-	-	-	-	13,0
Número 5	-	-	-	-	13,0
Flagelo posterior	-	5	-	2-4	8,7 (2,0-5,0)
Protusão do Axóstilo	-	-	-	-	4,1 (3,0-5,0)
Número de ondas da Membrana Ondulante	3-5	-	-	-	3-5

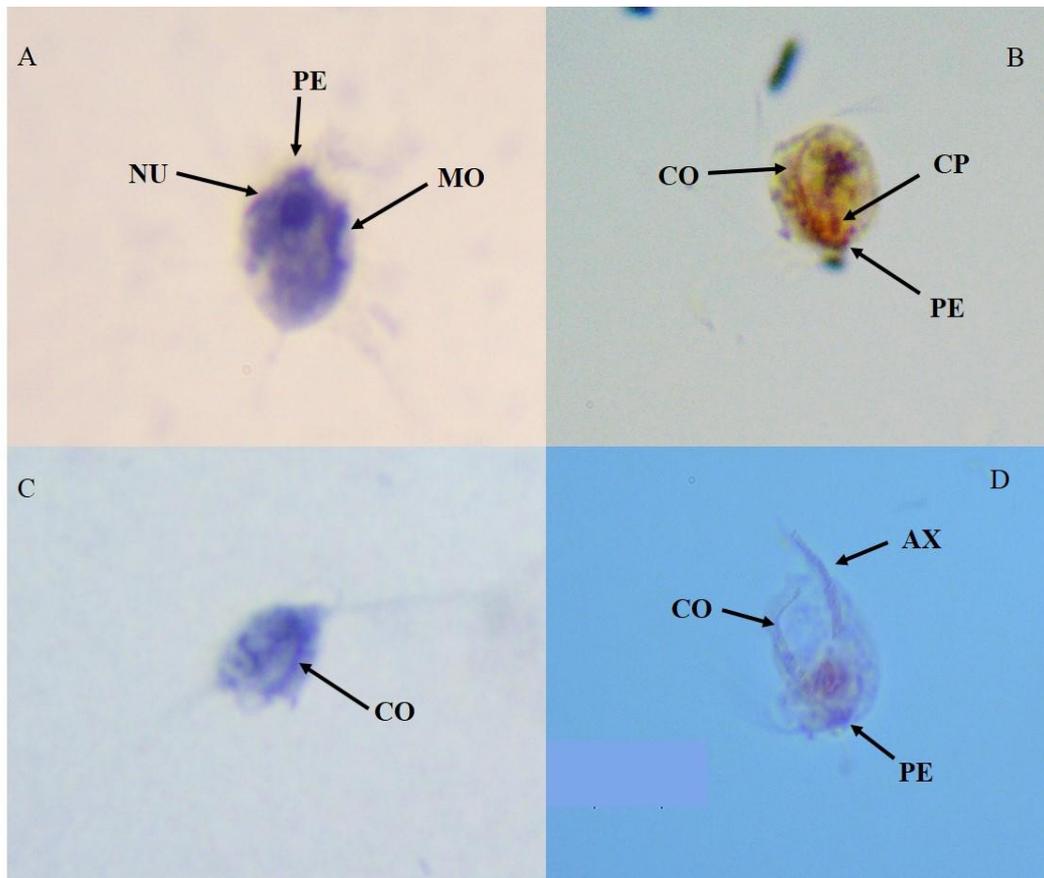
No presente estudo, um dos cinco flagelos anterior foi muitas vezes, visualizado voltado para a porção ventral do trofozoíta. Wenrich (1944) e Kirby (1945) também observaram esta mesma característica e atribuíram-na à presença de dois blefaroplastos: um maior, que dá origem ao grupo de quatro flagelos; e outro menor, que origina um único flagelo ventral. Este blefaroplasto menor poderia degenerar permitindo a observação de apenas quatro flagelos no trofozoíta. As divergências entre os resultados do presente estudo e outro anterior (KIRBY, 1945) sobre o tamanho do corpo foram, provavelmente, um reflexo das diferenças metodológicas associadas a meios de cultura/condições, fixadores e as técnicas de coloração utilizadas.

Estruturas do citoesqueleto também puderam ser observadas em alguns trofozoítas corados tanto pela hematoxilina férrica quanto pela eosina (Figura 11).

Figura 11. *Pentatrichomonas hominis*: **A** - Trofozoíto apresentando núcleo redondo (NU), membrana ondulante (MO), e o pelta (PE) na porção anterior do corpo por onde emergem os flagelos; **B** - Estruturas do citoesqueleto, costa delgada (CO), pelta (PE), visualização do corpo parabasal (CP) (setas); **C** - trofozoíto com costa visível (seta); **D** - trofozoíto apresentando as três estruturas que compõem o citoesqueleto, Costa (CO), Pelta (PE), Axóstilo (AX). A e C: Hematoxilina Férrica; B e D eosina. Obj. 100X.

A costa apresentou-se delgada, com diâmetro similar ao de um flagelo, e se estendeu por todo o corpo seguindo o comprimento da membrana ondulante.

O axóstilo é relativamente estreito e à medida que percorre o corpo celular se atenua gradualmente até o seu término visto como uma projeção para fora do citoplasma medindo 4,2 µm de comprimento do corpo celular. O pelta é delgado, pequeno e pouco discernível. O



núcle
o se
posic
iona
na
porçã
o
anteri
or do
trofo
zoíta,
possu
i
form
ato
arred
onda

do com tamanho médio de 3,5 (2,7-5,2) por 3,3 (3,0 -5,0) µm. O corpo parabasal é redondo e situado próximo ao núcleo. Essas estruturas apresentaram o mesmo tipo de forma descrita por outros autores (KIRBY, 1945; WENRICH, 1944).

A maioria dos estudos recentes que relatam a presença de parabasalídeos em gatos domésticos têm mostrado uma tendência ao diagnóstico molecular com dados morfológicos limitados ou ausentes (GOOKIN et al., 2007; CEPICKA et al., 2010; MOSTEGL et al., 2012;

CEPLECHA et al., 2013). No entanto, a produção de dados morfológicos abrangente é necessária para assegurar um diagnóstico confiável em laboratórios clínicos, que muitas vezes não têm acesso a tecnologias moleculares especializadas, ou mesmo a fotografias ou desenhos dos parasitos que muitas vezes foram produzidos na década de 40. Sendo assim, um desenho esquemático foi produzido contendo todas as estruturas básicas de identificação de *P. hominis* que foram observadas nas amostras analisadas com o objetivo de ajudar na identificação de *P. hominis* e diferenciação de *T. foetus* (Figura 12).

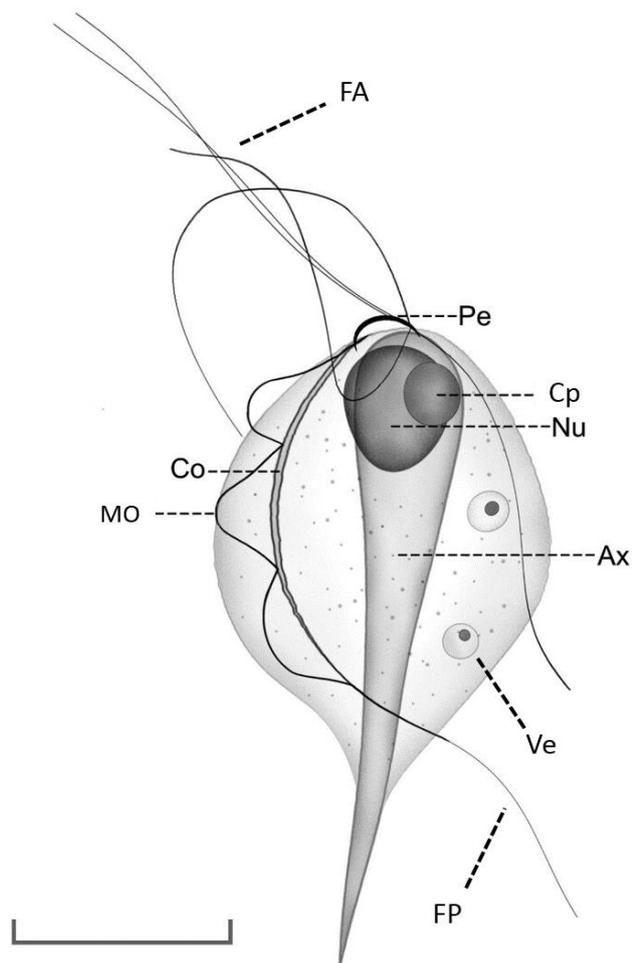
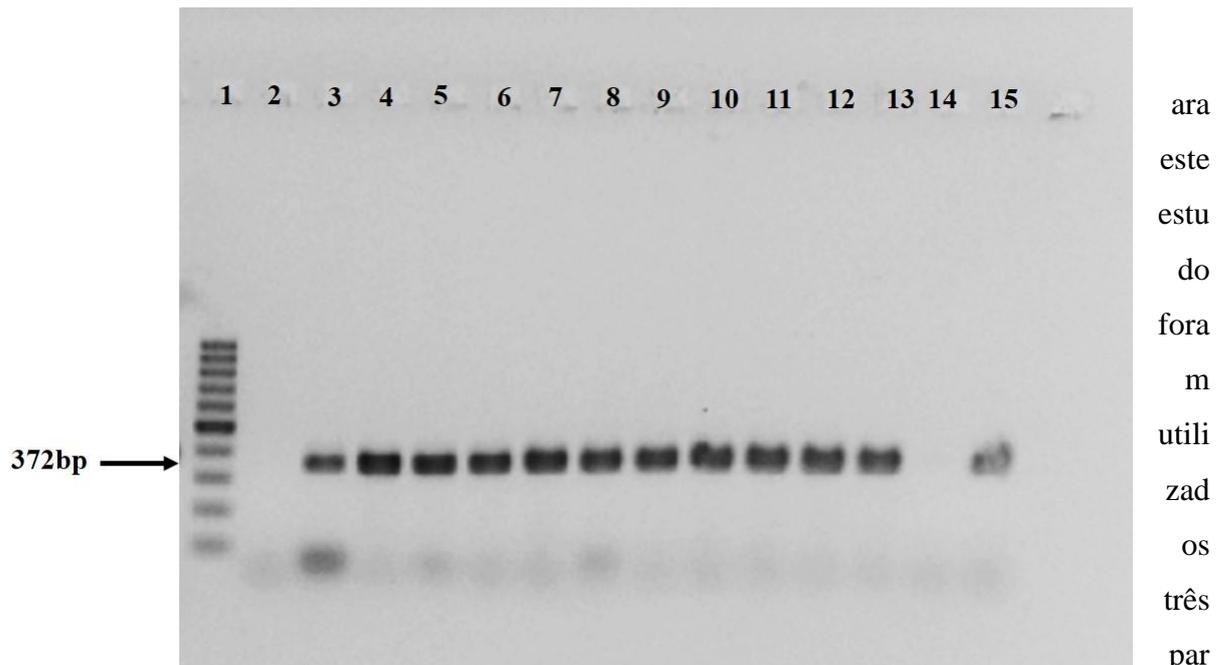


Figura 12. Desenho esquemático trofozoíto de *Pentatrichomonas hominis* isolado de gatos domésticos *Felis catus*. Ax – axóstilo; Co – costa; Nu – núcleo; Cp – corpo parabasal; Pe – pelta; MO – Membrana ondulante; FA - flagelos

anteriores; FP - flagelo posterior; Ve – Vesícula de endocitose. Barra de escala = 5 µm. (BERTO, B.P.)

3.3.3 Identificação genotípica dos trofozoítos em cultura

3.3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)



es de iniciadores diferentes. Um deles chamado de universal amplifica DNA de qualquer membro das famílias Trichomonadidae e Tririchomonadae (TFR1 e TFR2). Os outros dois são considerados espécie específicos, TFR3 e TFR4 para diagnóstico de *T. foetus* e TH3 e TH5 para diagnóstico de *P. hominis*. Tanto TFR 1 e 2 quanto TFR 3 e 4 são específicos par o gene 5.8s rRNA e as regiões interespaçadoras internas transcritas ITS-1 e ITS-2 de trichomonadídeos.

Utilizando os iniciadores TFR1 e TRF2, todas as amostras produziram amplicons de proximadamente 339 bp indicando a presença de DNA de trichomonadídeos (Figura 13).

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TFR1 e TFR2. Marcador de peso molecular de 100pb (linha 1), controle negativo (linha 2), amostras de cultura de

parabasalídeos isolados de gatos (linhas 3-12), controle negativo (linha 14), controle positivo *Tritrichomonas foetus* cepa K (linha 15).

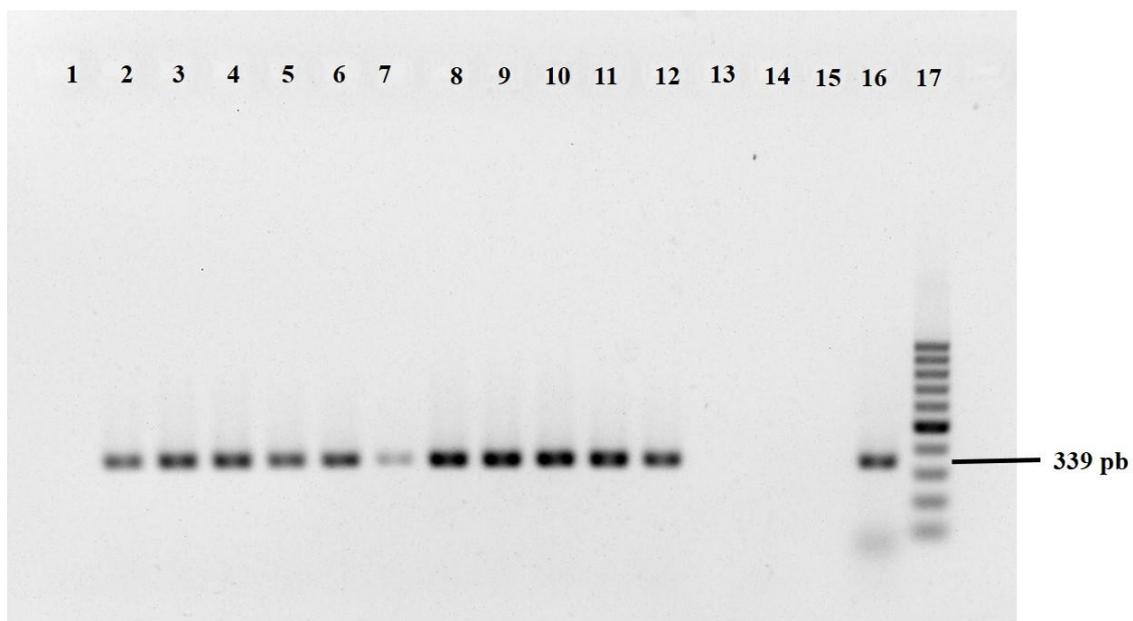
O tamanho do produto de PCR gerado com os iniciadores TFR1 e 2 sozinhos poderiam diferenciar entre os grupos de parabasalídeos mais comumente encontrados em bovinos (*T. foetus*, *P. hominis*, *Tetratrichomonas* spp.). Entretanto, a diferença entre o tamanho dos fragmentos gerados entre três grupos varia em distância de apenas 50 bp. *Tritrichomonas foetus* produzindo 370 bp, *P. hominis* com 339bp, e o grupo do *Tetratrichomonas* spp. apresentando produtos variando de 388–391 bp (HAYES et al., 2003).

Quando se utilizou os iniciadores específicos para DNA de *T. foetus* (TFR3 e TFR4) nenhuma das amostras foi amplificada. Entretanto, o controle positivo utilizado (DNA equivalente a 100 trofozoítas da cepa K de *T. foetus*) mostrou forte amplificação com uma banda de aproximadamente 347 bp estando em conformidade com os resultados de Felleisen, et al., (1998). Desta forma DNA de *T. foetus* não foi encontrado em nenhuma das amostras testadas no presente estudo.

O desenvolvimento do par de iniciadores específico para *T. foetus* levou em consideração a utilização de diversas cepas de diferentes espécies de parabasalídeos, incluindo *P. hominis*, *T. vaginalis*, *T. gallinae* e *T. tenax* e não houve a amplificação de nenhum produto demonstrando uma alta sensibilidade dos iniciadores ao DNA de *T. foetus*. Contudo esses iniciadores foram capazes de amplificar DNA de outros tritrichomonadídeos como *Tritrichomonas suis* cuja diferenciação de *T. foetus*, até o momento, não foi possível levando os pesquisadores a crerem que é a mesma espécie (SLAPETA et al., 2012).

A utilização de iniciadores específicos para rRNA de *P. hominis* (TH3/TH5) resultou em amplificação de todas as amostras de cultura, e como esperado a amostra de *T. foetus* cepa K utilizada como controle não produziu nenhum amplicon. Todas as amostras foram diagnosticadas como *P. hominis* baseado na presença de produtos com 339 pb (Figura 14).

A amplificação somente de *P. hominis* utilizando os iniciadores TH3 e TH5 comprova o que foi descrito por outros autores sobre a especificidade do ensaio de PCR. Crucitti et al., (2004) desenvolveram um ensaio sobre a sensibilidade e especificidade dos iniciadores utilizados no presente estudo. O limite absoluto de detecção para o par de iniciadores TH3 e TH5 foi equivalente a um trofozoíta de *P. hominis* em 10 µl de solução tampão. Contudo, quando o material biológico testado foram as fezes puras, o limite de detecção absoluto da PCR foi de 100 trofozoítas em 180 mg de fezes (GOOKING et al., 2007b).



Diversos microrganismos foram utilizados para o teste de especificidade desse par de iniciadores dentre eles algumas bactérias, fungos, outros protozoários como *Giardia intestinalis* e espécies correlacionadas de parabasalídeos pertencentes a mesma família (*T. vaginalis*, *T. gallinae*, *T. gallinarum*) e organismos de classe diferente, como *T. foetus* e *Dientamoeba fragilis* (Classe: Tritrichomonadea). Nenhuma das amostras dos microrganismos testados houve amplificação de produtos da PCR utilizando esse par de iniciadores. Somente DNA de *P. hominis* resultou em amplificação, sendo considerado altamente específico (CRUCITTI et al., 2004; GOOKING et al., 2007b).

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TH3 e TH5. Controle negativo (linha 1); amostras de cultura de isolados de gatos (linhas 2-12); controle negativo (linha 13); Controle da extração (linha 14); *Tritrichomonas foetus* cepa K (linha 15); Controle positivo *Pentatrichomonas hominis* (linha 16); Marcador de peso molecular de 100pb (linha 17).

A literatura sobre a presença de somente *P. hominis* em fezes de gatos está restrita a um pequeno número de casos. Poucos estudos tiveram por objetivo investigar a prevalência de *P. hominis* na população felina. Alguns relatos foram compatíveis com os resultados do corrente estudo, como por exemplo, Mostegl et al. (2012), identificou *P. hominis* em cortes histológicos de intestino de gatos, e relatou a ausência de *T. foetus* por PCR. Em outro estudo,

somente *P. hominis* foi isolado de um gato apresentando diarreia utilizando meio de cultura comercial até então tido como específico para *T. foetus* (In Pouch TMTF-Feline®) (CEPLECHA et al., 2013). Contrariando esses achados, a detecção de *P. hominis* através de PCR de amostras fecais, constatou que o protozoário estava presente em um número pequeno de gatos examinados para tricomonose felina e que seu diagnóstico esteve sempre condicionado a presença de *T. foetus* (GOOKIN et al., 2007a). Atualmente o estudo mais consistente sobre a detecção desta espécie em pequenos animais está relacionado a casos de diarreia em cães (GRELLET et al., 2013).

3.3.3.2 PCR-RFLP (Reação em cadeia da polymerase - Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) e sequenciamento

No presente estudo a utilização da técnica de PCR-RFLP teve como objetivo avaliar se todas as amostras obtidas em cultura tratavam-se da mesma cepa de *P. hominis*, ou seja se todas apresentaram o mesmo perfil de bandas quando submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%.

Todos os isolados de *P. hominis* produziram amplicons de 339 bp, esse produto foi submetido a digestão com as enzimas de restrição *HaeIII* resultando em um corte do DNA e geração de duas bandas no gel com tamanho aproximado 251 bp e 99 bp (Figura 15), e na geração de três bandas de 163bp, 133bp e 62 bp com a enzima *Hinf I* (Figura 16). Os padrões de bandas observadas foram correspondentes ao previsto na digestão em sílica. Sendo assim todos os isolados foram considerados idênticos.

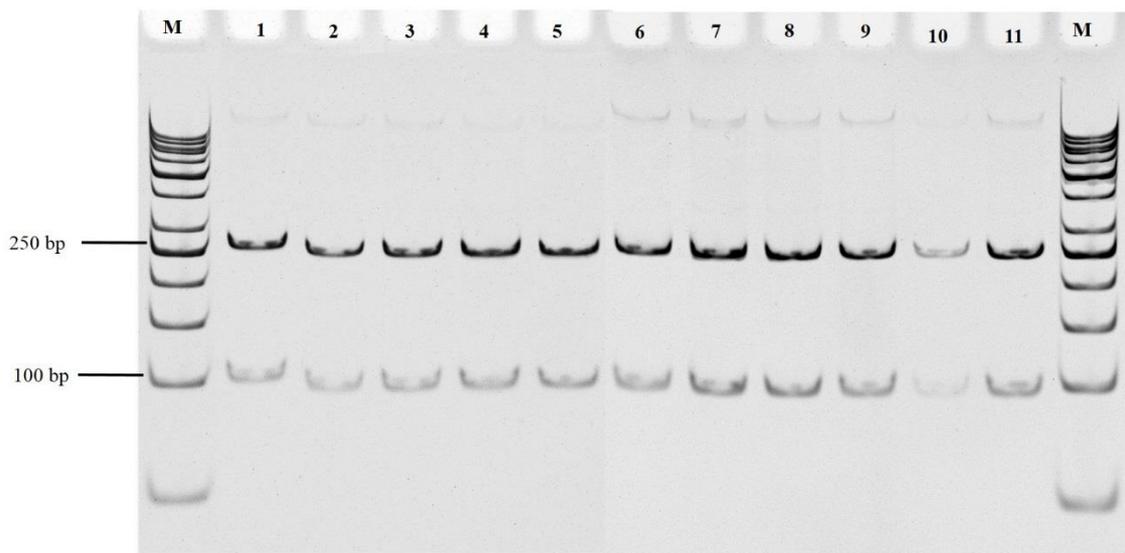


Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% das amostras amplificadas com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos a digestão com a enzima de restrição *Hae* III de *Pentatrichomonas hominis*.



Figura 16. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% das amostras de *Pentatrichomonas hominis* amplificadas com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos a digestão com a enzima de restrição *Hinf* I.

A técnica de PCR-RFLP também já foi empregada para diferenciar as espécies de parabasalídeos mais comuns encontrados em lavado prepucial ou muco vaginal de bovinos (*T. foetus*, *P. hominis*, *Tetratrichomonas* spp.) utilizando como base o par de iniciadores universal TFR1 e 2 e a enzima de restrição HpyCH4 IV. Os resultados demonstraram que a

diferenciação foi possível através da técnica, pois *T. foetus*, produziu dois fragmentos com 220 bp e 151 bp, *P. hominis* produziu três fragmentos com 161 bp, 135 bp e 42 bp e *Tetratrichomonas* spp. produz 180–181 bp, 162–168 bp e 43–45 bp fragmentos (HAYES et al. 2003; CORBEIL et al., 2008).

Por se tratarem da mesma cepa, quatro das 11 amostras foram sequenciadas e cada apresentou 100% de similaridade (297 bases = fragmento amplificado depois da remoção das sequências de iniciadores), com sequências depositadas no GenBank de isolados de *P. hominis* provenientes de felino (número de acesso KC594038.1) ou canino (número de acesso KC953860.1) A sequência de um isolado representativo deste estudo foi depositado no GenBank com o número de acesso KF953914.

A análise molecular de *P. hominis* realizado em outros estudos também encontraram um alto grau de similaridades entre cepas distintas de *P. hominis* isolados de vários hospedeiros. Gookin et al. (2005) ao analisar cepas de *P. hominis* isoladas de cães com diarreia encontrou um alto grau de similaridade de 99,4%-99,8% com sequencias depositadas no Genbank para a mesma espécie identificada em humano. Em outro estudo, 17 amostras de *P. hominis* apresentaram grau de similaridade maior que 98% quando comparado a sequencia depositada no GenBank correspondente a isolado humano (TOLBERT et al., 2012)

Pentatrichomonas hominis já foi diagnosticado em uma ampla gama de hospedeiros incluindo humanos, cães, gatos, bufalo, primatas, roedores (GOOKIN et al., 2005; KARAMUDDIN et al., 2015), serpentes, cabras, e corujas (DIMASUAY et al., 2013). O potencial de transmissão zoonótica de *P. hominis* foi sugerido desde a década de 40 em um estudo morfológico e experimental de infecção em mamíferos (WENRICH, 1947). Estudos mais recentes utilizando de ferramentas moleculares também aventam essa possibilidade, visto que todas as cepas encontradas em uma variedade de hospedeiros possuem 100% de similaridade (DIMASUAY et al., 2013; KARAMUDDIN et al., 2015). Todas as cepas de *P. hominis* isoladas de gatos neste estudo foram geneticamente idênticas (100% similaridade), indicando que os animais estreitamente relacionados ao convívio humanos são potenciais fontes de infecção e sendo assim *P. hominis* deveria ser monitorado como um patógeno em potencial.

4. PARTE 2: DIAGNÓSTICO DE *Tritrichomonas foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) WENRICH & EMMERSON 1933 EM FEZES DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS.

4.1 REVISÃO DE LITERATURA

4.1.1 Classificação

Tritrichomonas foetus foi observado parasitando bovinos desde 1800. A primeira descrição na literatura foi realizada em 1888 por Kunstler, na região da França em vacas com problemas reprodutivos. Em seu estudo ele descreve o protozoário como sendo o mesmo do intestino de suíno. Manzanti em 1900 nomeou-o *Trichomonas uterovaginalis vitulae*, porém o nome trinomial não foi aceito por infringir as regras internacionais de nomenclatura zoológica. Foi em 1928 que Riedmüller publicou a descrição do parasito encontrado em fetos abortados e propôs o nome *T. foetus* (MORGAN 1944). Wenrich & Emmerson (1933) ao estudar diversos isolados do parasito, propuseram a mudança desse gênero para *Tritrichomonas*, porque os trofozoítos apresentaram como característica-chave a presença constante de três flagelos anteriores, portanto a espécie foi renomeada como *Tritrichomonas foetus*.

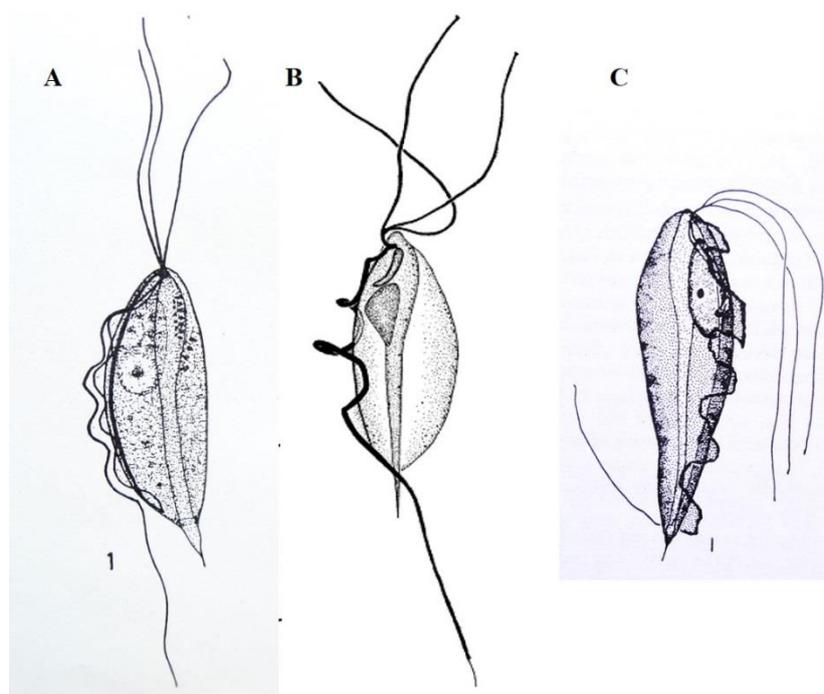
No início do século XXI, *T. foetus* foi identificado pela primeira vez em gatos com diarreia crônica com envolvimento do intestino grosso. As características morfológicas e o uso da biologia molecular comprovaram que se tratava da mesma espécie encontrada no trato reprodutivo de bovinos e, portanto, considerada como a mesma espécie (LEVY et al., 2003).

4.1.2 Morfofisiologia

Trichomonas foetus foi primeiramente descrito em bovinos, parasitando o trato reprodutivo e causando diversos distúrbios como abortamento, reabsorção fetal, associados a perdas econômicas na pecuária.

Trichomonas suis é o nome dado ao trichomonadídeo encontrado na cavidade nasal, estômago, e intestino de suínos. A primeira descrição em suínos foi feita por Gruby e Delafond (1843), porém o nome de *T. suis*, foi dado por Davaine (1877). Apesar do fato de *T. foetus* e *T. suis* ter sido originalmente descritos como espécies separadas, habitando locais específicos em dois diferentes hospedeiros, controvérsias sobre sua relação taxonômica persistem até hoje. Detalhes morfológicos de *T. suis* feitos por Hibler et al. (1960) e de *T. foetus* (WENRICH; EMMERSON, 1933) revelaram uma grande similaridade entre estes dois organismos. Mais recentemente, com o emprego da biologia molecular não foi possível diferenciar como duas espécies, sugerindo assim, se tratar de uma única espécie (SLAPETA et al., 2012). Apesar de todos os estudos indicarem se tratar de uma única espécie, o *status* taxonômico permanece ainda o mesmo. Mais recentemente, foi descoberto que esta mesma espécie também parasita o intestino grosso de gatos (GOOKING et al., 1999; LEVY et al., 2003) (Figura 17).

Figura 17. Desenho esquemático sobre a morfologia de *Tritrichomonas foetus* e *Tritrichomonas suis*. **A:** *T. foetus* isolado de bovino por Wenrich e Emmerson (1933); **B:** *T. foetus* isolado bovino por Kirby (1951); *T. suis* (= *T. foetus*) isolado de suíno por Hibler (1960).



Tritrichomonas suis é o nome dado ao trichomonadídeo encontrado na cavidade nasal, estômago, e intestino de suínos. A primeira descrição em suínos foi feita por Gruby e Delafond (1843), porém o nome de *T. suis*, foi dado por Davaine (1877). Apesar do fato de *T. foetus* e *T. suis* ter sido originalmente descritos como espécies separadas, habitando locais específicos em dois diferentes hospedeiros, controvérsias sobre sua relação taxonômica persistem até hoje. Detalhes morfológicos de *T. suis* feitos por Hibler et al. (1960) e de *T. foetus* (WENRICH; EMMERSON, 1933) revelaram uma grande similaridade entre estes dois organismos. Mais recentemente, com o emprego da biologia molecular não foi possível diferenciar como duas espécies, sugerindo assim, se tratar de uma única espécie (SLAPETA et al., 2012). Apesar de todos os estudos indicarem se tratar de uma única espécie, o *status* taxonômico permanece ainda o mesmo. Mais recentemente, foi descoberto que esta mesma espécie também parasita o intestino grosso de gatos (GOOKING et al., 1999; LEVY et al., 2003).

A morfologia descrita por Wenrich e Emmerson (1933) e Kirby 1951, de isolados bovinos, os trofozoítos apresentaram 10-18µm de comprimento e a largura seria de um terço a 2/5 do comprimento do corpo. Apresentam três flagelos anteriores que usualmente são iguais ou maiores que o corpo celular. O flagelo posterior constitui o filamento marginal da membrana ondulante e se estende posteriormente como um flagelo livre que possui o mesmo tamanho dos flagelos anteriores. Paralelamente ao filamento marginal do flagelo posterior está localizada a costa, uma estrutura do citoesqueleto que se estende ao longo da base da membrana ondulante até próximo do final do corpo celular. A membrana ondulante pode apresentar de quatro a cinco ondulações. A costa e a membrana ondulante normalmente formam um curso em espiral ao longo da superfície dorsal do trofozoíto, o que provavelmente preserva a convexidade da parte dorsal do corpo.

O axóstilo é uma estrutura cilíndrica que se estende do corpo parabasal até o final do corpo. Na parte mais anterior o axóstilo se apresenta como um filamento mais largo, essa expansão é chamada de *Capitulum* do axóstilo e logo após vai se afinando, porém permanece espesso até o anel cromático, no final do ponto de emergência. Quando o axóstilo se projeta para fora do corpo se afinila rapidamente até um ponto onde só se observa um filete delgado (KIRBY, 1951) (Figura 18).

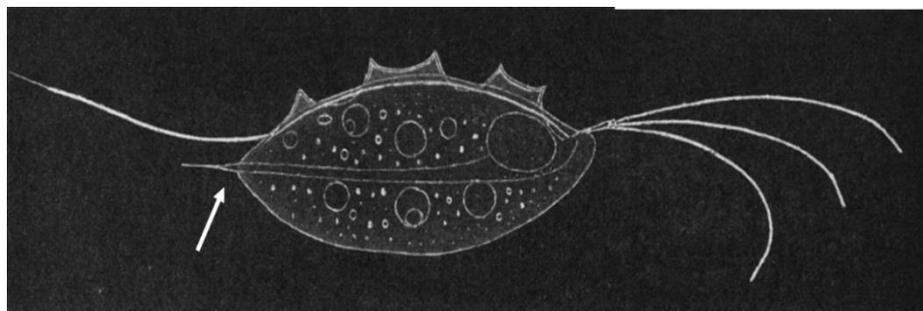


Figura 18. Desenho esquemático de *Tritrichomonas foetus* isolado de bovino, indicando a parte protusa do axóstilo (seta) (KIRBY, 1951).

O axóstilo e o pelta, partes do citoesqueleto, em conjunto com a costa e flagelos estão envolvidos em funções motoras e de divisão celular do parasita (RAE; CREWS, 2006).

O corpo parabasal é visualizado como uma estrutura cilíndrica, com localização sobre o núcleo e abaixo da costa. O núcleo possui formato oval, medindo de 3,5 a 5 µm de comprimento e cerca de metade do comprimento em largura. Normalmente está localizado na porção anterior do corpo e dorsal ao axóstilo. O citoplasma pode conter vacúolos de endocitose.

4.1.3 Genotipagem

Tritrichomonas foetus é um protozoário que originalmente foi descrito em bovinos causando distúrbios reprodutivos e abortamento, também é descrito como um flagelado comensal na cavidade nasal e ceco de suínos (BONDURANT, 1997). Foi reconhecido como um agente primário causando diarreia do intestino grosso em gatos a partir do ano 2000 (LEVY et al., 2003).

Estudos de transmissão cruzada entre bovinos e suínos com *T. foetus* ou *T. suis* demonstraram não haver especificidade hospedeira (KERR, 1958; FITZGERALD et al., 1958). Estes organismos são considerados idênticos com base em sua morfologia, análise ultraestrutural, e sequência genética (HIBLER et al., 1960; FELLEISEN, 1997).

A origem da infecção de gatos por *T. foetus* e qualquer relação com a tricomonose bovina ou suína não é esclarecida. Estudos recentes indicaram que *T. foetus* de origem felina pode infectar bovinos, porém a doença resultante da infecção é diferente em intensidade daquela produzida pelo protozoário de origem bovina (STOCKDALE et al., 2007). Já a infecção cruzada de gatos com cepas de origem bovina resultou em infecção intestinal em alguns gatos, porém de menor intensidade, que seria o esperado para organismos considerados idênticos morfolologicamente (GOOKIN et al., 2001; STOCKDALE et al., 2008). Estes resultados sugerem algumas diferenças fenotípicas na patologia entre isolados de gatos e bovinos (STOCKDALE et al., 2007; 2008)

Tritrichomonas foetus representa um intrigante modelo de estudo das interações parasita-hospedeiro. Muitos são os questionamentos a respeito da origem da espécie em bovinos e felinos, em particular se são parasitas diferentes ou possuem genótipos relacionados. Por serem capazes de infectar ambas as espécies, historicamente, são conhecidas como sendo a mesma espécie. A adaptação dos parasitas a diferentes hospedeiros não é algo novo, no entanto, o tropismo de órgãos extremos de cepas isoladas de bovinos (vagina) e isoladas de felinos (trato gastrintestinal) indica que possuem genótipos diferentes, que ao longo de suas respectivas evoluções preferencialmente adaptaram-se ao seu respectivo hospedeiro vertebrado e o local de infecção (SLAPETA et al., 2010; 2012).

Os primeiros estudos moleculares sobre *T. foetus* visavam a análise do gene ribossomal 5.8S e as regiões interespaçadoras 1 e 2. Uma combinação de iniciadores foi desenvolvida para identificar essas regiões no DNA de membros da família Trichomonadidae (TFR1/TFR2) e membros do gênero *Tritrichomonas* spp. (TFR3/TFR4). Utilizando esses

iniciadores para o diagnóstico de *T. foetus* de origem bovina, suína ou felina, todas as cepas tiveram 100% de similaridade (FELLEISEN, 1997; FELLEISEN et al., 1998; LEVY et al. 2003). Entretanto, mais recentemente, a se comparar as sequências de isolados de *T. foetus* de felinos e bovinos com os mesmos pares de iniciadores, revelou um polimorfismo em um único nucleotídeo (T>C) na região ITS2 de isolados bovinos. A análise comparativa das sequências disponíveis no GenBank confirmaram esse polimorfismo na região ITS2 entre todos os isolados bovinos e *T. suis* (= *T. foetus*) de suínos disponíveis (SLAPETA et al., 2010). O polimorfismo na região ITS2 foi avaliado em outros estudos e foi considerado como marcador válido para a identificação da origem do parasita e identidade genética de *T. foetus* (ZALONIS et al., 2011; REINMANN et al., 2012).

A avaliação genética para elucidar as diferenças entre *T. foetus*, isolado de bovinos e felinos, levou a pesquisa de novos genes. Dez regiões genéticas diferentes foram analisadas, genes que codificam para cisteína proteinases 1, 2 e 4-9 (CP1 e CP2, CP4-CP9) foram utilizados na investigação sobre diferenças no código genético de *T. foetus* isolados de bovinos e felinos. Esses genes codificam proteínas envolvidas na patogênese da doença causada pelo parasito. Outra proteína investigada foi a malato desidrogenase citossólica 1 (MDH1) e a ITS2. As sequências obtidas dos 10 genes foram comparadas e evidenciaram que, as cepas de origem felina tiveram 100% de identidade entre elas, e que as cepas de origem bovina também apresentaram 100% de identidade. Já, a comparação das sequências de DNA de *T. foetus* isolados de gatos e de bovinos tiveram 1,03% de diferença. Os dois genótipos diferiram em 1,19% na sequência de nucleotídeos de oito cisteino-proteinases (CP) e em 0,36% na sequência de nucleotídeos da MDH1. As diferenças entre *T. foetus* de felinos e bovinos sugerem que esses genes podem ter papel importante na adaptação ao seu hospedeiro de referência ou a localização dentro do hospedeiro. Essas mudanças nos nucleotídeos codificam mudanças num total de 18 aminoácidos. Baseado nestes resultados em que as mudanças nas cisteino proteinases podem estar diretamente ligadas às diferenças em patogenicidade encontradas; visto que, esses genes estão diretamente ligados à interação parasito hospedeiro (SLAPETA et al., 2012).

Um novo marcador foi utilizado por Sun et al. (2011), baseado no gene que codifica para cisteína proteinase 8 (CP8), o qual está envolvido na interação parasito-hospedeiro, virulência, nutrição e inflamação, sendo assim selecionada para elucidar a identidade genética de *T. foetus* em bovinos e felinos. Esse estudo indicou dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs—*single nucleotide polymorphism*) conservados, que distinguem isolados felinos de bovinos. Uma das SNPs modifica a sequência de aminoácidos, substituindo a

serina do CP8 encontrado em isolados bovinos por uma arginina em isolados felinos. Contudo a substituição não ocorre em uma região funcional conhecida e sua importância para a patogenicidade do parasita é desconhecida.

Até o momento têm indicado que isolados de *T. foetus* de felinos e bovinos constituem grupos geneticamente distintos e uniformes, porém com genótipos muito próximos. As características genéticas observadas podem estar ligadas a origem do hospedeiro dos isolados, mas sem nenhum efeito associado à origem geográfica. A relação genética muito próxima entre os dois grupos sugere a possibilidade de ambos os genótipos exibirem propriedades biológicas semelhantes, as quais permitiram ao parasita se adaptar a diferentes ambientes dentro de diferentes hospedeiros.

Apesar das condições ambientais extremas encontradas entre o trato urogenital de bovinos e trato digestório de felinos, eles possuem uma categoria funcional semelhante de expressão de genes expressos com nenhuma indicação de divergência ao nível molecular. Isto reforça o fato de que taxonomicamente *T. foetus* de bovinos e felinos representam dois genótipos demonstrando variação intraespecífica. Estratégias de adaptação específicas parecem estar relacionadas sobre a regulação pós-transcricional influenciada pelo ambiente dentro dos locais de infecção dos hospedeiros. Desta forma, a expressão de genes de virulência pode diferir de acordo com seu hospedeiro (ADELINE et al., 2014).

4.1.4. Aspectos biológicos

Tritrichomonas foetus pode viver em ambientes em anaerobiose ou com pouco oxigênio sendo considerado aerotolerantes, como trato urogenital de bovinos, trato gastrintestinal de suínos e felinos (BONDURANT et al., 1997; LEVY et al., 2003; MOSTEGL et al., 2011). É considerado monogênico e monoaxênico. A reprodução se dá por divisão binária e sua principal forma é a de trofozoíto que possui tamanho variando de 10-25 µm de comprimento por 3-15 µm de largura. Quando em cultura, o parasito possui formato variável de piriforme a fusiforme ou mesmo oval.

No hospedeiro, *T. foetus* está fisicamente associado ao epitélio do trato urogenital ou gastrintestinal (ERA; CREWS, 2006). O consumo de nutrientes pode ocorrer por difusão bem como por fagocitose e pinocitose resultando na formação de vacúolos no citoplasma com diferentes tamanhos. *In vitro* em culturas acelulares e axênicas, *T. foetus* utiliza a glicose presente no meio de cultura como principal fonte de energia. *In vivo*, onde o suporte de glicose é quase inexistente nos locais de infecção, o parasita usa de precursores na síntese de poliaminas, como a arginina, para produzir energia necessária à sua sobrevivência no

hospedeiro (YARLETT, 1988; REIS et al., 1999). Quando em contato com a célula do hospedeiro, *T. foetus* pode exibir citotoxicidade através do contato físico, resultando na secreção de proteases e glicosidases extracelulares (BONILHA et al., 1995;). Essas enzimas podem induzir a citólise, ou mesmo, a ruptura das junções epiteliais e também o remodelamento em volta da matriz extracelular (PETRÓPOLIS et al., 2008). Desta forma, o monitoramento mecânico-químico do ambiente extracelular feito pela superfície do parasito poderia cooptar a capacidade do hospedeiro para constituir um nicho e, portanto, se tornar capaz de sobreviver em diversos locais anatômicos (DA SILVA et al., 2011).

A infecção em gatos por *T. foetus* ocorre por transmissão direta, através do contato do animal com as fezes contaminadas, contendo o parasito. Hale et al. (2009) demonstraram que *T. foetus* pode sobreviver nas fezes por até 24h quando em temperatura ambiente, indicando que a transmissão seria feita por outras vias mais do que pelo contato direto entre animais. A viabilidade dos trofozoítos, quando expostos a vários tipos de ambientes, demonstrou que permanecem viáveis por períodos variados de tempo. O protozoário pode sobreviver na água por 30 minutos e até 180 minutos na urina de gatos. Quando colocado na ração seca sobrevive por 30 minutos e quando em ração úmida pode sobreviver por até 3 horas. Os resultados deste estudo indicaram que a transmissão de *T. foetus* ocorre via água e comida contaminada e que a exposição à caixa de areia contaminada com fezes de animais infectados seria menor (ROSYPAL et al., 2012). Mais recentemente, trofozoítos de *T. foetus* sobreviveram por até cinco dias na ração de gatos. Neste mesmo estudo, moluscos comuns na Austrália foram expostos as fezes de um gato infectado e os mesmo foram capazes de eliminar em suas fezes trofozoítos de *T. foetus* viáveis. Numa visão geral esses moluscos poderiam contaminar com suas fezes, água, comida e brinquedos que estivessem no ambiente (VAN DER SAAG et al., 2011).

A transmissão feco-oral possivelmente conta com outro fator que aumenta as chances de transmissão do protozoário, a formação de pseudocisto. Nos primeiros relatos de infecção de gatos por *T. foetus* suspeita-se que a viabilidade do parasito fora do hospedeiro é considerada menor (GOOKIN et al., 2003); entretanto, a formação de pseudocistos é um processo natural no ciclo biológico para a grande maioria dos parabasalídeos, incluindo *T. foetus*. A formação do pseudocisto consiste na transformação dos trofozoítos móveis em formas compactas, não móveis e sem a formação de parede cística que pode ocorrer de forma natural como ocorre em touros (PEREIRA-NEVES et al., 2011) ou quando as condições ambientais não são favoráveis, tais como diminuição da disponibilidade de nutrientes, presença de drogas como antibióticos e mudanças bruscas de temperatura.

Atualmente já se sabe que a formação de pseudocisto é um processo reversível (GRANGER et al., 2000) e também uma forma de multiplicação do protozoário. Foi verificado que ocorre o processo de mitose dentro do pseudocisto (PEREIRA-NEVES et al. 2003). Estudo in vitro, demonstrou que pseudocistos de culturas antigas de *T. foetus* foram capazes de gerarem células multinucleadas que depois liberavam/separavam-se em trofozoítos únicos. Essa formação do parasito seria benéfica na promoção da colonização de novos hospedeiros (PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2009). O pseudocisto também possui propriedades que o fazem aderir mais fortemente às células hospedeiras do que as formas piriformes (MARIANTE et al., 2004). Todas essas características juntas contribuiriam para a perpetuação do ciclo de infecção parasita-hospedeiro.

4.1.5 Patogenicidade

Em gatos, quadros de diarreia do intestino grosso pode ser resultado de uma variedade de causas infecciosas e não infecciosas. Recentemente, vários pesquisadores reconheceram uma associação entre diarreia do intestino grosso em felinos e infecção por trichomonádídeos (ROMATOWSKI, 1996; 2000; GOOKIN et al., 1999).

Historicamente, a detecção de parabasalídeos nas fezes de gatos com diarreia possuía baixa importância e era atribuída a um supercrescimento da microbiota do intestino que facilitava a proliferação dos protozoários (DIMSKI, 1989; BARR, 1998). Entretanto, o aumento no número de casos de gatos com diarreia por protozoários e não responsiva a tratamento fez com que os pesquisadores se atentassem para a possibilidade de *T. foetus* poder ser o agente etiológico.

Os sinais clínicos da doença em gatos infectados incluem diarreia com muco, letargia, anorexia e perda de peso. Sinais adicionais podem incluir diarreia com sangue, tenesmo, flatulência e fezes malcheirosas (GOOKIN et al., 1999)

Gookin et al (2001) conduziram o primeiro estudo experimental sobre a infecção de gatos com *T. foetus* e sua implicação no quadro de diarreia. Através da inoculação de *T. foetus* em gatos SPF (*specific pathogen free*), esses autores observaram que os animais se tornaram positivos com dois a sete dias pós-inoculação e que a infecção persistia por até 203 dias. A infecção por *T. foetus* induziu diarreia em todos os animais inoculados que variava em consistência de semiformada à pastosa e infrequentemente havia a presença de sangue. A inoculação do protozoário induziu a infecção de íleo e cólon resultando em diarreia por pelo menos sete semanas. A infecção por *T. foetus* ficou restrita a superfície epitelial, ao muco

cecal e a mucosa do cólon. Evidências da invasão de mucosa não foram observadas. Com base nessas observações, foi sugerido pelos autores que a microflora colônica possui papel importante na patogênese da diarreia associada a *T. foetus*, porque o organismo pode persistir em gatos com e sem diarreia pode tornar-se exacerbada, sem um aparente aumento no número de organismos presentes no trato intestinal.

Em outro estudo, o exame histopatológico do intestino de gatos naturalmente infectados por *T. foetus* revelou alterações patológicas no cólon, como dilatação leve a moderada da lâmina própria com infiltrado plasmocitário e linfocitário. Um número moderado de neutrófilos e eosinófilos, também foram observados. Hipertrofia das células epiteliais das criptas, hiperplasia e aumento da atividade mitótica, perda de células caliciformes, microabscessos nas criptas, e atenuação do epitélio superficial colônico. *Tritrichomonas foetus* foi mais consistentemente observado em estreita proximidade com a superfície da mucosa do cólon (83%) e menos frequentemente no lúmen das criptas colônicas. Apenas um animal apresentava os protozoários infiltrados na lamina própria das criptas. Este achado foi associado mudanças severas e difusas nas criptas do cólon, que apresentava ulcerações multifocais, inflamação piogranulomatosa supurativa com inúmeros protozoários na camada submucosa e subserosa do cólon (YAEGGER; GOOKIN, 2005). Em outro estudo, achados histopatológicos de gatos com diarreia e positivos para *T. foetus*, o parasito foi encontrado no lúmen das criptas e poucas lesões foram encontradas sugerindo que outras causas podem ser responsáveis pelos sinais clínicos de diarreia. Em outros dois casos grandes quantidades do protozoário foram encontrados no lúmen e invadindo a lâmina própria da mucosa (MOSTEGL et al., 2012).

A interação entre *T. foetus* e o epitélio intestinal desempenha um papel chave no início e na gênese da diarreia. Essa interação se dá de forma ativa, através de processo metabólico ativo que não necessariamente é dependente de um rearranjo no citoesqueleto do parasita. Estes achados sugerem que a aderência de protozoários em grandes quantidades pode estar relacionada à citopatogenicidade observada em casos de diarreia mais graves (TOLBERT et al., 2012).

Apesar destes achados, a compreensão dos fatores que mediam a patogenicidade de *T. foetus* em gatos é limitada. Os mecanismos identificados até o presente estão relacionados a mudanças na flora bacteriana intestinal do hospedeiro, fatores de aderência do protozoário e a produção de citotoxinas e enzimas (KENNET; HOOK, 2002). Atualmente já se sabe que a tricomonose intestinal é uma infecção crônica em gatos sintomáticos que são afligidos por diarreia (GOOKIN et al., 2001). Apesar de períodos de remissão clínica da diarreia, muitos

animais permanecem infectados por toda a vida tornando-se portadores, muitas vezes assintomáticos e infectando outros animais (FOSTER et al., 2004).

4.1.6 Métodos de diagnóstico

Os métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da tricomonose felina incluem técnicas antigas e novas, derivadas e adaptadas das utilizadas no diagnóstico de tricomonose bovina. A utilização de cada uma delas irá depender do custo/benefício, aliado ao grau de sensibilidade e especificidade desejado.

O exame a fresco é o teste mais fácil e rápido empregado na rotina laboratorial para o diagnóstico de tricomonose. Visa a detecção de trofozoítos móveis nas fezes frescas diluídas em solução salina ou tampão fosfatado (PBS- *phosphate buffer solution*). Normalmente, uma gota é colocada sobre uma lâmina de vidro e examinada em microscopia óptica à procura de organismos com formato e motilidade característica de trichomonádídeos, cujo movimento é progressivo, errático e rotacionado em seu próprio eixo. Devido ao diagnóstico ser dependente da visualização de organismos vivos, as amostras de fezes devem ser frescas, preferencialmente diarreicas e processadas rapidamente. Organismos mortos devido à refrigeração da amostra ou falhas no processamento, muitas vezes resultam na ocorrência de resultados falsos negativos (GOOKIN et al., 2003). A desvantagem da técnica é sua baixa sensibilidade devido à dependência de um número grande de protozoários nas amostras fecais. Em um estudo, animais cronicamente infectados com *T. foetus*, revelou que somente 2% (4/192) das amostras de fezes foram positivas no exame a fresco. Além disso, a especificidade do método é um ponto problemático, pois não é possível distinguir outros protozoários que podem estar presentes e se assemelharem a *T. foetus*, como é o caso de *P. hominis*. (GOOKIN et al., 2001; HALE et al., 2009).

Seguindo a mesma rotina empregada no diagnóstico da tricomonose bovina, a cultura é o segundo passo para avaliar amostras de fezes de gatos que podem ou não conter trofozoítos de parabasalídeos. A cultura permite a multiplicação dos protozoários até o ponto em que se possa observá-los no microscópio. Possui um grau de sensibilidade maior do que o exame a fresco.

O meio de cultura mais frequentemente utilizado na rotina dos laboratórios foi desenvolvido por Diamond (1957) e é chamado pelo mesmo nome. A praticidade dos métodos de cultivo para diagnosticar *T. foetus* foi potencializado nos últimos tempos com a disponibilidade comercial de um sistema de cultura em formato de bolsa que poderia servir

como meio de transporte e crescimento (InPouch TF Biomed Diagnostics Inc). O sistema foi desenvolvido para dar maior praticidade na coleta e transporte de material até o laboratório e evitar amostras falso-negativas. O método foi primeiramente empregado em amostras de bovinos (BORCHARDT et al., 1992) e mais tarde, testado para fezes de gatos (GOOKIN et al., 2003). Segundo os autores as vantagens deste tipo de sistema incluem a disponibilidade comercial, não precisa diluir e nem enviar as fezes. A visualização do conteúdo dentro da bolsa selada diretamente no microscópio reduz a exposição do manipulador aos protozoários e outros patógenos presentes nas fezes. O limite de detecção alcançado utilizando este método foi de 1 até 1000 trofozoítos de *T. foetus* utilizando 0,1g de fezes de gato. A inoculação de *P. hominis* e *Giardia* spp. resultou na não sobrevivência por mais de 24 horas destes organismos. Porém, é possível o cultivo de outras espécies como *T. gallinae* (COVER et al., 1994).

Os métodos de cultura apresentam uma sensibilidade maior, porém a sua especificidade é considerada baixa porque várias espécies de parabasalídeos podem crescer nos meios e não é possível fazer a sua identificação, mas apesar disso, o crescimento dos protozoários em meios de cultura permite a confecção de esfregaços dos trofozoítos para identificação morfológica (LUN; GHAJADHAR, 1999).

Apesar dos exames a fresco e cultura serem duas técnicas de diagnóstico, relativamente baratas e que podem ser realizadas em qualquer laboratório, o avanço na área de biologia molecular para o diagnóstico de parasitos vem crescendo. Os métodos de biologia molecular já estão disponíveis para o diagnóstico da infecção por *T. foetus* em bovinos e gatos e tanto sua sensibilidade quanto especificidade é considerada alta (FELLEISEN et al, 1998; GOOKIN et al., 2002).

O desenvolvimento de iniciadores específicos para detecção de rDNA de *T. foetus* foi um dos primeiros estudos que deram início ao diagnóstico de tricomonose através de biologia molecular (FELLEISEN et al. 1998). O diagnóstico de tricomonose felina ganhou maior impulso após estudo feito por Gookin et al. (2002) que desenvolveram um teste de PCR sensível e específico para *T. foetus* diretamente das fezes de gatos. A técnica empregada foi uma variação da PCR-NESTED desenvolvido em um único tubo (*single tube nested PCR*), utilizando quatro pares de iniciadores, os dois primeiros, TFR3 e TFR4, desenvolvidos por Felleisen et al. (1998) que amplificam um produto com 347 pb e outros dois pares internos que complementam a reação (TFITS-F e TFITS-R) e geram um produto com 208 pb. A PCR é baseada na amplificação de um fragmento da porção conservada do gene ribossomal 5.8S e nas regiões interespaciaadoras internas (ITS) 1 e 2. Para otimização da técnica além dos iniciadores específicos, a extração de DNA é feita através de *kits* comerciais específicos para

as fezes que visam diminuir os inibidores da PCR. Desta forma, utilizando a PCR-NESTED, o limite de detecção absoluto encontrado foi de um microrganismo, enquanto o limite prático foi de 10 trofozoítos em 0,2 g de fezes de felino. A especificidade da técnica foi avaliada utilizando como controle DNA de *P. hominis*, *Giardia lamblia* (= *Giardia intestinalis*) e DNA felino. Segundo os autores a técnica pode ser empregada em amostras de fezes que foram negativas nos exames, a fresco e de cultura, ou quando a identificação da espécie microscopicamente não é possível.

Apesar de ser altamente específica, a utilização de biologia molecular no diagnóstico de *T. foetus* de amostras de fezes ainda esbarra no custo da técnica e mão de obra qualificada para a sua realização. Além disso, estudos tem demonstrado que a técnica de PCR não substitui por completo a técnica de cultura. Gookin et al. (2002) demonstraram que uma técnica não exclui a outra. A PCR-Nested sozinha não foi superior a cultura das fezes feito ao mesmo tempo da coleta de amostras. A cultura das fezes resultou em 55 % de amostras positivas, enquanto que a PCR obteve 39% de positividade. O desempenho combinado da cultura das fezes e da PCR-nested em um único tubo foi de 75% de resultados positivos, consideravelmente maior do que as técnicas sozinhas. A PCR-nested foi capaz de detectar *T. foetus* em 20% de amostras que foram negativas na cultura. Em outro estudo, a sensibilidade entre cultura e PCR para o diagnóstico de tricomonose bovina revelou taxas quase iguais entre as técnicas, 67.8% para a cultura e 65.9% para a PCR (COBO et al., 2007). Gookin et al. (2004) relataram a ocorrência de tricomonose em 31% dos gatos avaliados (36/117), dos quais cinco foram diagnosticados pelo exames a fresco das fezes, nove foram diagnosticados com base na cultura em meio de Diamond, 20 foram identificados utilizando o sistema *In Pouch TF medium*, e 34 das 36 amostras foram positivas através de PCR das fezes.

Embora seja altamente desejável o emprego de uma única técnica que possa diagnosticar de maneira precisa e rápida um agente etiológico, o emprego da biologia molecular ainda é limitado na rotina de laboratórios para o diagnóstico de tricomonose. Devido à presença de uma gama de inibidores de PCR nas fezes o método de extração é um dos pontos chave para a utilização da técnica (STAUFFER et al., 2008). Um estudo recente revelou que de 17 culturas positivas para *T. foetus* nas fezes, resultou na extração com sucesso de DNA fecal em apenas 12 amostras. (STOCKDALE et al., 2009). Sendo assim, para melhorar a sensibilidade do diagnóstico mais de uma técnica deve ser empregada (HALE et al., 2009).

4.1.7 Diagnóstico Diferencial

Parabasalídeos são descritos infectando gatos infreqüentemente desde 1900 (DA CUNHA; MUNIZ, 1922; KESSEL, 1928). Após um período de quase 50 anos sem relatos, *P. hominis* foi diagnosticado como organismo naturalmente presente nas fezes de gatos e considerado comensal, e por conta disso os relatos na literatura freqüentemente diagnosticavam os flagelados em fezes diarreicas de gatos como *P. hominis* (GOOKIN et al., 1999; ROMATOSWSKI, 2000). Baseado nestes estudos a parabasalídeos em gatos foram por muito tempo considerado parte da microbiota intestinal somente coexistindo com outras doenças entéricas. Com o aumento da incidência de gatos jovens com diarreia do intestino grosso onde as fezes continham um grande número de flagelados, pesquisas foram realizadas com intuito de saber a identidade do protozoário. A princípio, os gatos infectados pertenciam a gatis ou abrigos com uma alta densidade populacional e foram freqüentemente diagnosticados como tendo *Giardia* spp.; porém, o quadro de diarreia crônica era arresponsiva ao tratamento com giardicida e foram aparentemente livres de doenças intestinais concomitantes ou infecção. O diagnóstico diferencial entre trichomonadídeos e trofozoítos de *Giardia* spp. pode ser feito com um simples exame a fresco onde os flagelados são diferenciados com base na motilidade.

Duas espécies de parabasalídeos podem ser encontradas em gatos, *T. foetus* e *P. hominis*. A diferenciação entre os dois requer um grau mais apurado por parte do clínico por se assemelharem em muitas características como motilidade e tamanho. Sua diferenciação não é possível através do exame a fresco e nem através de meios de cultura porque ambos são igualmente capazes de crescer nos meios próprios para parabasalídeos (CEPLECHA et al., 2013). Um dos exames mais simples que podem servir para diferenciação entre espécies é através de esfregaços de cultura ou fezes coradas pelos métodos de Romanowsky, como Giemsa e Whrite-Giemsa. As principais características que diferenciam uma espécie da outra estão relacionadas ao número de flagelos, três em *T. foetus* e cinco em *P. hominis* (LUN; GAJADHAR, 1999). Outros caracteres a serem observados são o formato do axóstilo que se afunila gradualmente em *P. hominis* e em *T. foetus* esse afunilamento após o anel cromático se dá de forma contínua até que se afunila abruptamente formando um pequeno filete (WENRICH; EMMERSON, 1933; WENRICH, 1944) (Figura 19).

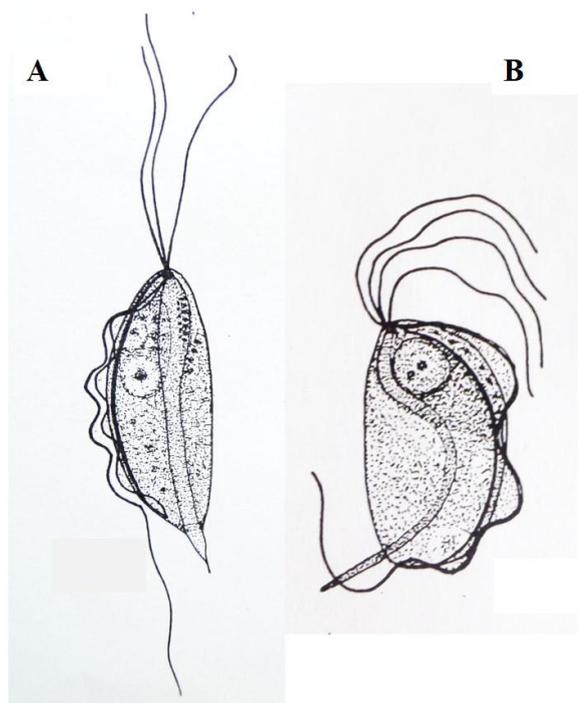


Figura 19. Desenho esquemático de *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* demonstrando as diferenças no número de flagelos e formato da parte protusa do axóstilo. **A:** *T. foetus* (WENRICH; EMMERSON, 1933). **B:** *P. hominis* (WENRICH, 1944).

Os métodos moleculares deram um grande salto em relação ao diagnóstico diferencial entre espécies de parabasalídeos. Felleisen et al. (1998) foram os primeiros a desenvolver um par de iniciadores específico para *T. foetus* chamados de TFR3 e TFR4 que tem por alvo a sequência do gene ribossomal 5.8S e as regiões interespaciaadoras internas 1 e 2 (ITS1 e 2), porém o intuito era o diagnóstico do protozoário em bovinos. Mais tarde, a detecção de DNA de *T. foetus* diretamente das fezes foi testado por Gookin et al. (2002), com a utilização da técnica de PCR-Nested com os iniciadores TFR3 e 4 e outro par de iniciadores internos denominados ITSF e ITSr, com os iniciadores internos o diagnóstico torna-se mais sensível e mais específico. Entretanto a técnica foi utilizada apenas para o diagnóstico de *T. foetus*, em alguns casos os animais possuíam parabasalídeos visíveis na microscopia óptica, mas o resultado era negativo. Desta forma, era necessário o desenvolvimento de um par de iniciadores específico para *P. hominis*. Atualmente, já é possível diferenciar através das técnicas de PCR *P. hominis* de *T. foetus* porque já existem iniciadores específicos para *P. hominis* que amplificam parte do gene 18S ribossomal chamados de TH3 e TH5 (CRUCITTI

et al., 2004). O diagnóstico diferencial entre as espécies parasitando felinos foi testado pela primeira vez por Gookin et al. (2007b) utilizando esses pares de iniciadores. Utilizando ambos os iniciadores para *T. foetus* e *P. hominis* foi possível diagnosticar amostras de fezes onde havia a presença dos dois protozoários, ou seja, infecção mista.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Origem dos animais

Para este estudo, um total de 80 amostras de fezes de gatos foi avaliado. Todas as amostras foram provenientes do atendimento clínico da Sala de gatos do HVPA, IV, UFRRJ, localizados no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

4.2.2. Coleta de amostras de fezes

Amostras de fezes dos gatos avaliados foram coletadas por defecação natural ou lavado retal, seguindo a conduta médica veterinária do atendimento clínico. As fezes acondicionadas em potes plásticos e identificadas foram encaminhadas ao LPR, para análise. Parte das fezes foi colocada em tubos com fundo cônico de 15-50 ml e diluídas em meio de Hanks, e parte, aproximadamente 0,2 g, de fezes foi colocada em caldo peptona e incubada em estufa bacteriológica a 35°C.

4.2.3 Diagnóstico morfológico

4.2.3.1 Exame a fresco

A presença de protozoários foi avaliada logo após a coleta por meio de exame direto colocando-se uma gota da amostra homogeneizada em uma lâmina e realizando a leitura em microscopia óptica (Primo Star Zeiss®) aumento de 100X. As amostras foram consideradas positivas quando constatada a presença de protozoários com formato e motilidade características de trichomonadídeos. As fezes foram manidas no laboratório por até 15 dias e depois eram descartadas.

4.2.3.2 Cultura

Todas as amostras de fezes foram inoculadas em tubos contendo meio de Diamond (1957) ou caldo peptonado e incubadas a 35°C. A avaliação do crescimento foi realizada a cada 24 horas através de exame direto de uma gota do meio de cultura em lâmina e observadas em microscopia óptica para ver se houve crescimento. Repiques da cultura para meio novo foram realizados a cada 72 horas. As culturas foram descartadas quando consideradas negativas após 10 dias de incubação.

4.2.3.3 Análise Morfológica

4.2.3.3.2 Coloração de esfregaços

As amostras de cultura (3 ml) foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 100 µl de caldo peptonado novo e homogeneizado. Dez microlitros da suspensão dos protozoários foram colocados em lâminas limpas e o esfregaço delgado realizado com movimentos circulares com uma alça de platina e deixado secar ao ar. Os esfregaços foram fixados ao ar e desidratados em metanol por um minuto e corados pelo método do Panótico rápido segundo Lun & Gajadhar (1999).

4.2.4 Fotomicrografias, Mensuração e Desenhos dos trofozoítos

Todas as análises morfológicas foram realizadas em microscópio triocular Zeiss (RFA). Fotomicrografias foram tiradas com câmera digital AxioCamERc 5s acoplada ao microscópio. A análise morfométrica dos trofozoítos foi feita, utilizando programa Axio Vision Release 4.8.2 (2010). Os desenhos foram elaborados utilizando programa Corel Draw X6.

4.2.5 Microscopia Eletrônica

As análises de microscopia eletrônica foram realizadas pelo Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Minas Gerais (CEM-UFMG), Pampulha, Belo Horizonte, MG.

4.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de cultura em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas (740 x g /10 minutos) e fixadas com glutaraldeído 2,5% em 0,1M de tampão fosfato de sódio (pH 7.2)

por cerca de duas horas em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram lavadas 2 vezes em PBS (pH 7,2) e, então, colocadas para aderir por cerca de 15 minutos em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina. Após este período, as lamínulas foram lavadas novamente em PBS para retirar as células que não aderiram. Em seguida, os parasitos foram pós-fixados por 15 minutos no escuro com uma solução de tetróxido de ósmio a 1% em 0,1M de tampão fosfato de sódio (pH 7,2). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas (3X) em PBS e, logo em seguida, as células foram desidratadas em uma bateria de concentrações crescentes de etanol: 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por duas vezes. As lamínulas ficaram imersas por aproximadamente por 15 minutos em cada uma destas concentrações de etanol. Finalmente, as lamínulas foram secas pelo método do ponto crítico do CO₂ e posteriormente foram revestidas por uma fina camada (25nm) de ouro. As amostras foram, então, montadas em suportes metálicos apropriados, e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol 5800.

4.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Trasmissão (TEM)

As células foram coletadas por centrifugação e fixadas por cerca de duas horas a temperatura ambiente com 2.5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,2). Depois deste período, as células foram lavadas (3X) em PBS (pH 7,2) e pós-fixadas por 30 minutos no escuro em uma solução de tetróxido de ósmio a 1%, com 0.8% de ferricianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio em 0.1M de tampão cacodilato. Em seguida, as células foram lavadas por três vezes em água destilada e colocadas por duas horas no escuro em uma solução de acetato de uranila a 2% em água destilada. As células foram então, novamente lavadas (3X) em água destilada e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 15.000 x g para que se obtivesse um sedimento compacto. Este sedimento foi então, transferido para uma placa de Petri contendo acetona 70% e cortado em pequenos fragmentos. A desidratação das células foi feita em concentrações crescentes de acetona: 70%, 90% e 100% (2X) (15 minutos em cada concentração). As células foram infiltradas por período de 48 horas em resina epoxy Poly Bed 812 (Epon) (Polysciences, Inc) e polimerizadas em estufa a 60°C por 72 horas. Após a polimerização, os blocos de Epon foram trimados e fatiados com faca de diamante (Diatome) no ultramicrotomo (Leica –UC6). Os cortes ultrafinos de cor prateada (que medem aproximadamente 70nm) foram coletados em grades de cobre, de 300 mesh e, posteriormente, contrastados no escuro com 5% de acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. Finalmente, as grades foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1210.

4.2.6 Diagnóstico e identificação molecular

As amostras de cultura foram encaminhadas para processamento e análise molecular no LabMol, DPA, Anexo 1, IV, UFRRJ. As amostras foram processadas conforme descrito na Parte 1.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 *Tritrichomonas foetus*

4.3.1.1 Visualização dos trofozoítos

Setenta e sete amostras de fezes provenientes do HVPA (UFRRJ) foram encaminhadas ao LPR para pesquisa de parabasalídeos. Destas, apenas quatro amostras (5%) foram positivas no exame a fresco. Os trofozoítos observados apresentaram formato piriforme, movimentos rápidos, e motilidade progressiva, errática e com movimento rotacionado (axial), o mesmo tipo de movimento descrito por Diamond (1957). A frequência de animais infectados varia entre os estudos, os relatos na literatura apresentam valores de 2% (MANCIANTI et al., 2014) a 31% (GOOKIN et al., 2004).

Todas as amostras positivas no exame a fresco foram positivas também em cultura. No cultivo em meio de Diamond ou caldo peptona os trofozoítos apresentavam em sua grande parte formato piriforme, motilidade rápida. Das quatro amostras positivas, apenas três sobreviveram ao subcultivo, sendo que estas, após algumas passagens em meio novo tornaram-se completamente axênicas, ou seja sem contaminação por outros microrganismos.

O tipo de multiplicação observado foi de divisão binária. Os trofozoítos em divisão apresentavam aumento do volume celular, a presença de dois núcleos, e duplicação do axóstilo (Figura 20A). Como parte do processo, os trofozoítos em divisão apresentavam formato maior e triangular, chamado de forma de coração (BENCHIMOL, 2004), seguido estruturação de duas células-filhas caracterizando a pré-mitose, fase I e II da mitose onde era observado o início da separação das células (Figura 20 B e C). As células duplicadas migravam gradualmente para direções opostas e ficavam unidas pela parte final do axóstilo (Figura 20 D).

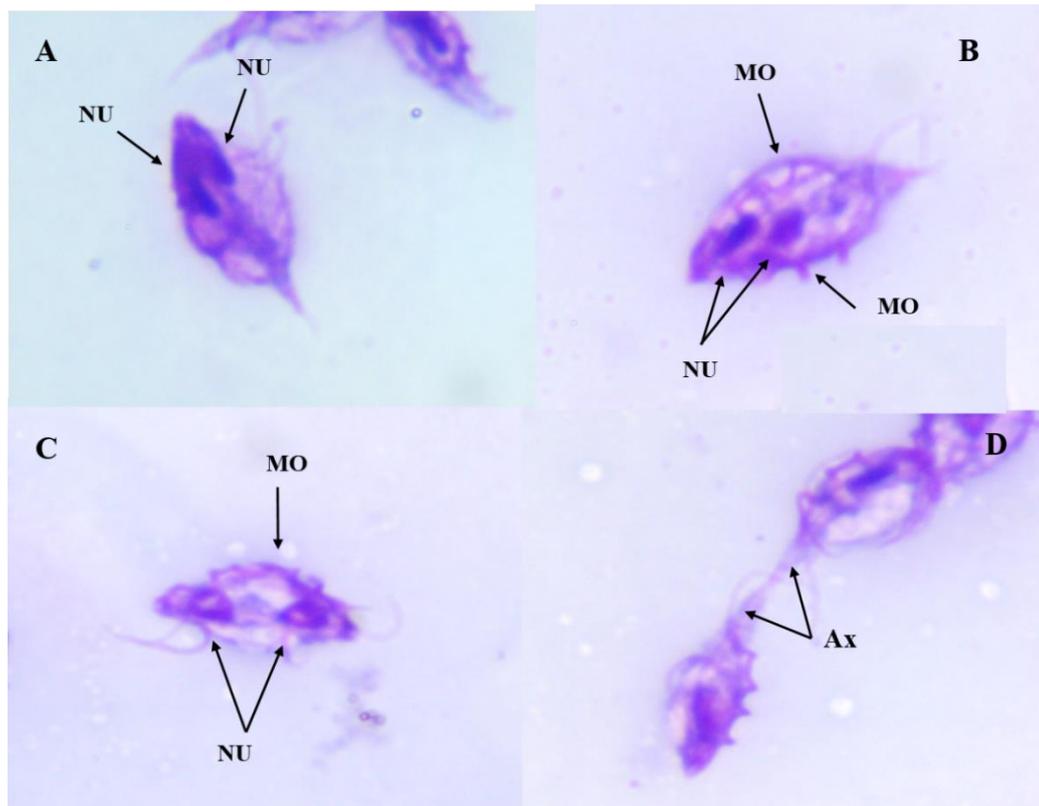


Figura 20. Processo de divisão binária por *Tritrichomonas foetus* isolados de gatos. **A:** Duplicação do núcleo (NU); **B:** Duplicação de outras estruturas como pelta, axóstilo e membrana ondulante (MO); **C:** Início da citocinese pela parte anterior do trofozoíto; **D:** Separação pela parte posterior, através dos axóstilos. Panótico rápido, Obj. 100X.

O processo de divisão celular já foi bem caracterizado por alguns autores. Foi demonstrado que não somente o fuso, mas estruturas microtubulares, como flagelos e axóstilo participam ativamente do processo de mitose (RIBEIRO et al., 2000). Na fase pré-mitótica, todas as estruturas do citoesqueleto já estão duplicadas (sistema pelta-axóstilo, corpos parabasais). O axóstilo não desaparece durante a mitose e possui papel importante nessa fase, porque participa das mudanças celulares, contorção da parte anterior da célula e cariocinese. Durante a mitose, os flagelos já estão completamente formados e ajudam na citocinese pelos movimentos de locomoção (ZUO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2000)

Devido à grande atividade mitótica presente nas culturas e ao tempo entre cada repique (no máximo 72 horas), não foram observados pseudocistos. Porém alguns organismos apresentavam-se com formato arredondado com vários núcleos e aparentemente em processo de separação (Figura 21).

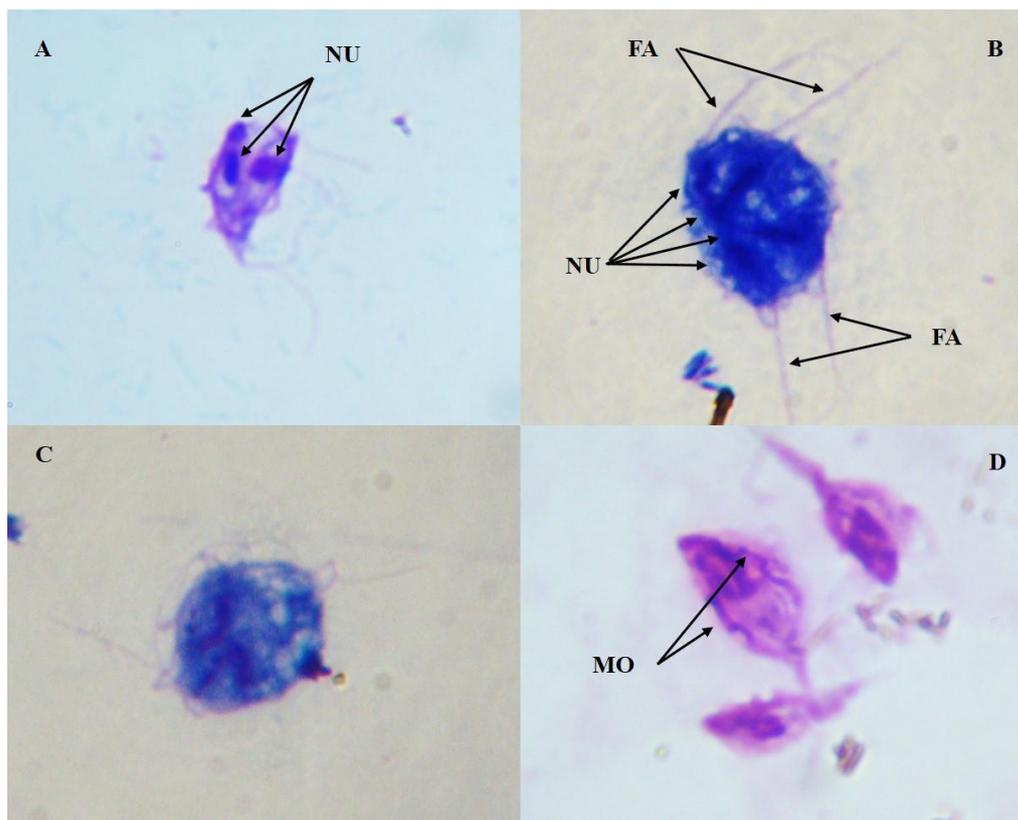


Figura 21. *Tritrichomonas foetus* apresentando formas multinucleadas. **A:** Células em processo de citocinese; **B e C:** formas arredondadas multinucleadas e multiflageladas; **D:** Divisão binária. Panótico rápido. Obj. 100X.

As formações multinucleadas observadas no presente estudo poderiam ser consideradas como sendo pseudocistos voltando a sua forma de trofozoíto ou forma de divisão múltipla que também ocorre em parabasalídeos, porém em uma proporção menor do que a divisão binária. Esse tipo de divisão múltipla já vem sendo descrita desde os primeiros estudos com *T. foetus*. Kirby (1946) descreveu formas multimastigontes (multiflageladas) que apresentavam três ou quatro mastigontes, que poderiam se originar de uma divisão multipolar. Pereira-Neves et al. (2003), demonstraram que 55% dos parasitas encontrados no lavado prepucial de touros eram de pseudocistos, bi ou multinucleados. Os pseudocistos multinucleados poderiam ser uma estratégia de propagação do parasita quando um pseudocisto multinucleado pode originar vários trofozoítos individuais e colonizar mais rapidamente o hospedeiro. Durante o processo de brotamento, os pseudocistos externalizam os flagelos e então cada parasito com um núcleo e seu respectivo sistema mastigonte é gradualmente individualizado e retomando seu formato piriforme (PEREIRA-NEVES et al.,

2011). Por vários anos, acreditou-se que o pseudocisto era uma forma degenerativa e irreversível dos trichomonádídeos. Contudo, estudos têm demonstrado que o pseudocisto é reversível e que esta formação pode ocorrer de forma natural ou como um mecanismo de defesa contra condições ambientais desfavoráveis (PEREIRA-NEVES et al., 2003; PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2009).

4.3.2 Identificação fenotípica dos trofozoítos

4.3.2.1 Morfologia

4.3.2.1.1 Esfregaços Corados

Os trofozoítos de *T. foetus* apresentavam-se quase sempre com formato piriforme (Figura 22 A), algumas vezes mais alongado (Figura 22 B), porém em culturas mais antigas, se tornavam mais arredondados. A membrana ondulante se estendia por todo o corpo do protozoário e terminava com a porção livre do flagelo posterior (Figura 22 C). O número de flagelos foi constante em todas as quatro amostras positivas, sendo visualizados três flagelos anteriores e um posterior. (Figura 22D).

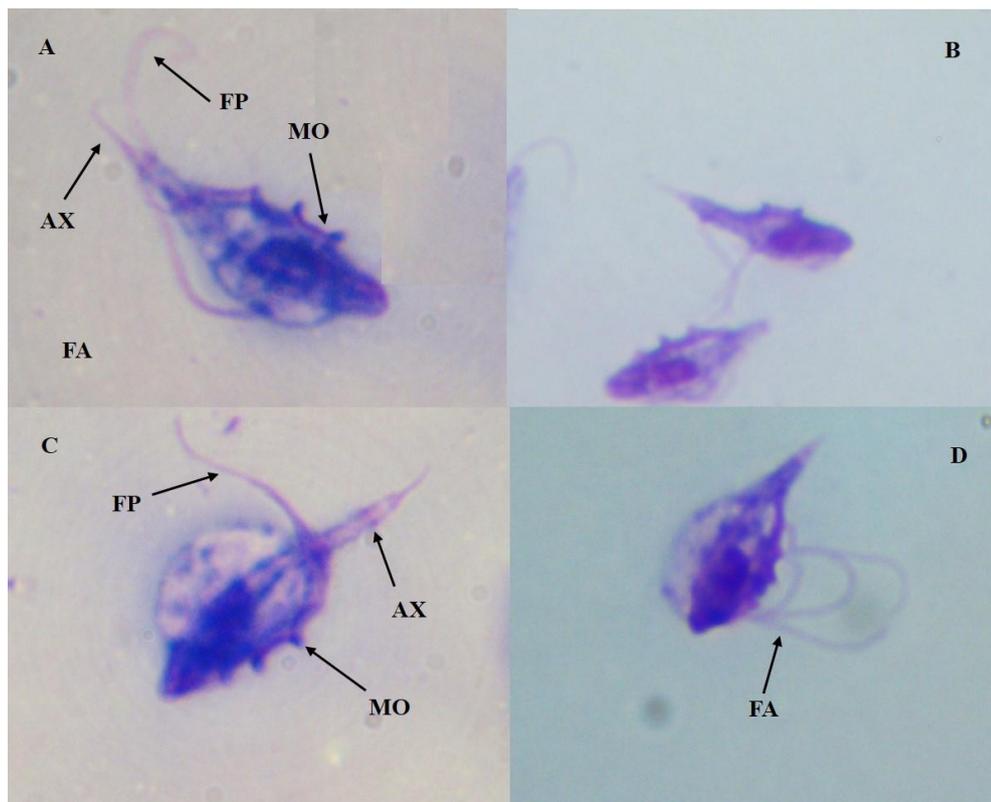


Figura 22. Formatos dos trofozoítos de *Tritrichomonas foetus* isolados de gatos. **A:** formato piriforme característico. **B:** aspecto alongado; **C:** Visualização de estruturas como axóstilo (Ax), membrana ondulante (MO) e flagelo posterior (FP); **D:** Trofozoíto com três flagelos anteriores (FA). Panótico rápido®. Obj 100X.

O tamanho médio dos trofozoítos de *T. foetus* isolados de gatos (n =100), excluindo a parte protusa do axóstilo, foi de 10,4 (8,5-13) μm de comprimento e 6,1 (4,2-8,0) μm de largura. Três flagelos anteriores de tamanhos iguais foram observados, cada um deles medindo comprimento maior ou igual ao comprimento do corpo. O primeiro flagelo media 14,0 (11-17), o segundo flagelo 14,0 (10,0 – 16,0) μm e o terceiro flagelo apresentavam 13,0 (12,0 – 16,0) μm de comprimento. O pelta foi visualizado como uma estrutura de formato em vírgula, posicionado na parte anterior do trofozoíto, na emergência dos flagelos anteriores (Figura 23 A).

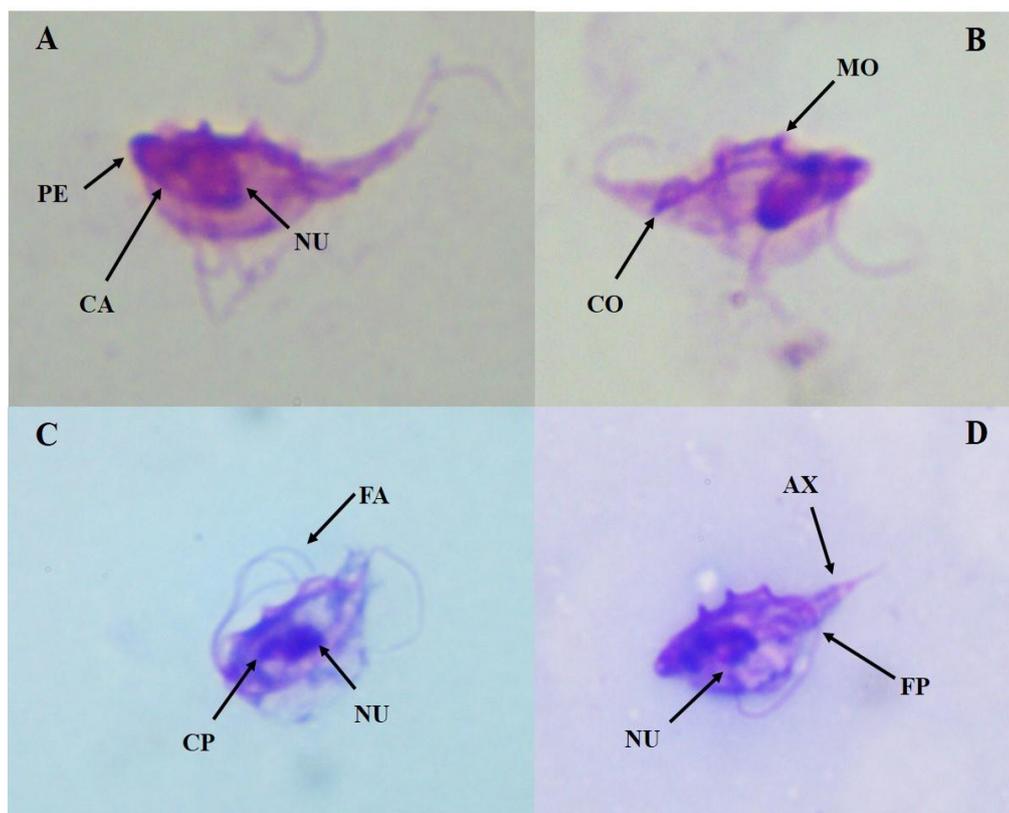


Figura 23. Fotomicrografia de estruturas celulares presentes em *Tritrichomonas foetus* isolados de gatos. **A:** Presença nítida do Pelta (PE) em formato de vírgula na parte anterior do corpo do parasito e *Capitulum* do axóstilo (CA). **B:** Trofozoíto com a costa nitidamente visível logo abaixo a membrana ondulante e acompanhando toda a sua extensão. **C:** três flagelos anteriores (FA), núcleo (NU) de formato oval alongado e corpo parabasal (CP) visível localizado dorsalmente ao núcleo. **D:** formato típico de axóstilo (AX), flagelo posterior (FP) demarcando o final da membrana ondulante. Panótico rápido. Obj. 100X,

Pequenas divergências, quanto ao tamanho e formato dos trofozoítos de *T. foetus* analisados, já haviam sido colocadas. A variação de tamanho entre os estudos pode estar relacionada ao meio utilizado, tempo de cultivo ou métodos de fixação (KIRBY, 1951; TAQUEZY et al., 2002).

Kirby (1951), ao analisar amostras de cultura de *T. foetus*, à semelhança do presente estudo, também encontrou como característica básica e constante de diagnóstico a presença de três flagelos anteriores de mesmo tamanho. Em diversos estudos com as mais variadas cepas de *T. foetus*, os trofozoítos apresentam três flagelos anteriores, mesmo entre hospedeiros diferentes, como bovinos, suínos e felinos, o que torna isso uma característica diagnóstica (WENRICH; EMMERSON, 1933; HIBLER et al., 1960; LEVY et al., 2003).

No local de emergência dos flagelos anteriores foi possível visualizar o pelta, que é uma

estrutura que dá sustentação ao canal flagelar por onde saem os flagelos. Nas amostras analisadas a estrutura do pelta apresentava-se com formato de uma vírgula. Tachezy et al. (2002) da mesma forma, descreveram o pelta de *T. foetus* como uma estrutura pequena, em formato de vírgula localizada na porção anterior do corpo do protozoário.

A membrana ondulante foi claramente visível, e apresentava de quatro a cinco ondulações que se entendia por todo o corpo terminando em uma porção livre (flagelo posterior). A membrana ondulante de *T. foetus* pode variar no número de ondas que apresenta, porém é notável entre outros estudos morfológicos que ela se estende até o final do corpo celular onde e dá início ao flagelo posterior livre (HIBLER et al., 1960; WALDEN et al., 2013). Logo abaixo da membrana ondulante está localizada a costa, que foi visualizada com a coloração utilizada como um filete delgado se estendendo por todo o corpo acompanhando a membrana ondulante (Figura 23B). O comprimento do flagelo posterior foi de 11,0 (6,0-18,0) μm .

O núcleo se posicionava no primeiro terço da parte anterior do corpo e dorsalmente ao axóstilo, às vezes cobrindo parcialmente o *Capitulum* do axóstilo. Possui formato variando de oval a cilíndrico, medindo 3,5 (2,0 -7,0) μm de comprimento por 2,5 (2,0-6,0) μm de largura. O corpo parabasal foi visível em alguns espécimes (Figura 23 C). Seu formato é alongado ou cilíndrico, posicionado sobre o núcleo, com tamanho de 2,5 (3,0 – 1,0) μm de comprimento por 1,3 (1,5-1,0) μm de largura. Hibler et al. (1960) descreveram o corpo parabasal como uma estrutura única, de formato alongado e localizado sobre o núcleo ou a direita dele. Ocasionalmente, o formato se assemelhava a letra J. Em outro estudo, o corpo parabasal foi descrito como sendo único e de formato alongado (TACHEZY et al., 2002). Ambos os estudos utilizaram cepas de origem suína, *T. suis* (syn. *T. foetus*) e bovina. Wenrich e Emmerson (1933) descreveram o corpo parabasal como uma estrutura cilíndrica pequena ou claviforme, ligado ao blefaroplasto situado dorsalmente ao núcleo e entre a costa. Segundo os autores este tipo de corpo parabasal está diretamente associado com o tipo de axóstilo encontrado em *T. foetus*, *T. muris* e *T. augusta*.

O axóstilo apresentou-se claro em toda a sua extensão, com formato cilíndrico, maior em diâmetro no logo no início do corpo, na parte conhecida por *Capitulum* do axóstilo e ia se afunilando até parte protusa (Figura 23 C). A parte protusa do axóstilo apresentava-se, após a sua emergência com um diâmetro maior e afunilava bruscamente em um pequeno filete (Figura 23 D). Seu comprimento médio foi de 5,0 (2,0 -8,0).

Os resultados de morfologia apresentados foram comparados a outros autores em estudos realizados que avaliaram cepas de *T. foetus* em bovinos, suínos e felinos se encontram

sumarizadas na Tabela 2.

Na maioria das estruturas comparadas não houve diferenças entre as cepas. Porém, nas cepas isoladas de bovinos a relação de tamanho foi maior quando comparadas as cepas de gatos e suíno, o que não é algo incomum, pois os tempos de cultura, meios utilizados podem causar este tipo de variação (FLICK, 1954).

O tipo de axóstilo visualizado no presente estudo já havia sido descrito em outros estudos, porém é uma característica de diagnóstico sem uso atualmente. Wenrich e Emmerson (1933) afirmaram que o tipo de axóstilo de *T. foetus* é uma característica de diagnóstico do gênero *Tritrichomonas* (também está presente em *T. muris* e *T. augusta*). Isto pelo fato do axóstilo deste gênero ser mais espesso e apresentar um anel cromático no ponto de emergência, que só é observado em amostras coradas. Além disso, os autores corroboram a descrição feita por Riedmüller (1928) na qual o axóstilo após a emergência se reduz a uma ponta afiada que pode ser prolongada em um filete delgado, da mesma forma que foi observada pelo presente estudo. Sendo assim esse formato típico de axóstilo pode ser utilizado como caractere de diferenciação entre *T. foetus* e outras espécies de parabasalídeos, como *P. hominis* que também infectar gatos.

Os resultados encontrados no exame morfológico revelaram que a espécie de parabasalídeo encontrada nas fezes de gatos atendidos pelo HVPA – UFRRJ trata-se de *T. foetus*. Com base no número de flagelos, formato e localização do núcleo e formato de axóstilo, foi possível fazer a diferenciação entre *T. foetus* e *P. hominis*. Contrariando esses resultados, Levy et al. (2003) em seu estudo, afirmaram que *Tritrichomonas* sp. e *Pentatrichomonas* sp. não são facilmente diferenciados um do outro, através do exame dos organismos corados por corantes histológicos usuais. Pois, os flagelos anteriores são difíceis de enumerar e a morfologia do axóstilo, que é um importante critério para distinguir *T. foetus* de *P. hominis* requer técnicas de coloração específicas e caras como a impregnação pela prata, para sua identificação correta. Entretanto, a utilização de corantes derivados do Romanowsky, como Giemsa ou Panótico Rápido, é perfeitamente capaz de corar todas as estruturas importantes para diagnóstico, como foi indicado no presente estudo e em outros com o Wenrich e Emmerson (1933) que utilizaram a coloração de Giemsa para redescrever morfolologicamente *T. foetus* de origem bovina.

Tabela 2. Morfologia comparativa de trofozoítos de *Tritrichomonas foetus* isolados gatos domésticos e de vários hospedeiros animais.

Autores	Wenrich & Emmerson (1933)	Kirby (1951)	Hibler et al. 1960	Walden et al (2013)	Presente estudo
Hospedeiro	Bovino	Bovino	Suíno	Gato	Gato
Estrutura	Média e limites (µm)				
Formato do corpo	piriforme	-	alongado/ piriforme	-	alongado/ piriforme
Comprimento do corpo (µm)	16,2 (12,6 - 18)	17,1 (14,8 – 22,8)	11,42 (8,55 – 15,42)	10 (5,7-13)	10 (8,0-13,0)
Largura do corpo (µm)	1/3 a 2/5 do comprimento do corpo	7 (4,7 – 10,1)	3,34 (2,4- 4,67)	4,4 (3,9- 5,5)	6,1 (4,0-8,0)
Formato do núcleo	-	-	Oval / alongado	-	oval
Comprimento do núcleo (µm)	-	-	3 (2,35 – 4)	-	3,5 (2,0-7,0)
Largura do núcleo em µm	-	-	1.4 (1,14– 2,2)	-	2,6 (2,0-6,0)
Formato do Corpo parabasal	cilíndrico/ claviforme	alongado/ cilindrico	delgado e alongado ou em foma de j	-	cilíndrico/ alongado
Comprimento do Corpo Parabasal em µm	Pequeno	3-4	3.36 (2.34 -5.12)	-	2,5 (1-3,1)
Nº de Flagelos anteriores	3	3	3	3	3
Tamanho (µm)					
Número 1	-	11-17	12,44 (8,61 – 14,86)	15	14,0 (11,0-17,0)
Número 2	-	-	12,93 (7,42 – 16,49)	-	13,8 (10,0-16,0)
Número 3	-	-	12,44 (8,55 – 16,55)	-	13,4 (12,0-16,0)
Flagelo posterior	16,2 (12,6 - 18)	16	7,98 (4,63 – 17,13)	12	11,3 (6,0- 18,0)
Protusão do Axóstilo	-	1.5 - 4	0,73 (0,57-1,72)	2	5,4 (2,0-8,0)
Número de ondas da Membrana Ondulante	4-5 ondas	3-5 ondas	3-5 ondas	-	4-5 ondas

No passado, *T. foetus* em gatos foi erroneamente classificado como *P. hominis*, isso porque alguns autores alegavam que *P. hominis* pode ter número variável de 3 a 5 flagelos anteriores (ROMATOSKY, 1999; 2000; GOOKIN et al., 1999). Entretanto, sabe-se que *T. foetus* possui número de flagelos constante, sendo três anteriores e um posterior, com registros antigos sobre essa constância (RIEDMÜLLER, 1928; WENRICH; EMMERSON, 1933; KIRBY, 1951; BENCHIMOL, 2004; PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2009). A confusão com o número de flagelos anteriores de *P. hominis*, ainda é objeto de questionamento, porém na literatura mais recente a espécie pode apresentar de quatro a cinco flagelos anteriores como foi demonstrado por vários estudos, incluindo de análise ultraestrutural (HONINBERG et al., 1968; LI, W-C et al., 2014). Sendo assim, a confusão no diagnóstico morfológico entre as duas espécies que ocorrem em fezes de gatos é algo que não deve ser levado em consideração, visto que diversos estudos demonstraram a possibilidade de diferenciação das duas espécies.

Devido a escassez de estudos utilizando a morfologia como método diagnóstico foi desenvolvido um desenho esquemático com todos os caracteres de identificação para (Figura 24).

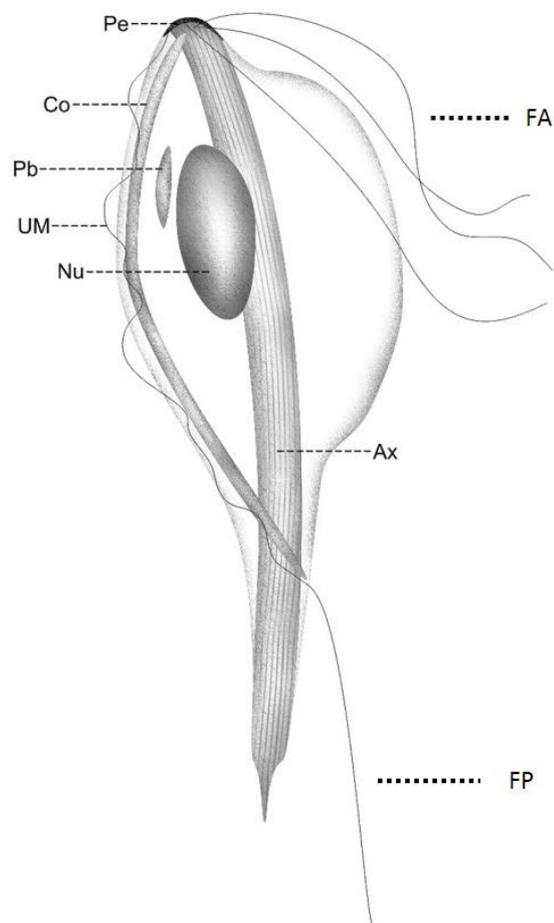


Figura 24. Desenho esquemático trofozoíto de *Tritrichomonas foetus* isolado de gatos domesticados *Felis catus*. Ax – axóstilo; Co – costa; Nu – núcleo; Cp – corpo parabasal; Pe – pelta; MO – Membrana ondulante; FA - flagelos anteriores; FP - flagelo posterior. (BERTO, B.P.)

4.3.3 Microscopia Eletrônica de varredura de *Tritrichomonas foetus*

Tritrichomonas foetus isolados de gatos e cultivados em meio de Diamond (1957) foram analisados através da SEM para caracterizar as principais ultraestruturas presentes neste parasita. Os resultados encontrados corroboraram os dados obtidos na microscopia óptica. Os trofozoítos apresentaram formato piriforme exibindo morfologia típica da família Tritrichomonadidae, com três flagelos anteriores, membrana ondulante percorrendo todo o

corpo do parasita até a porção final e um flagelo recorrente continuando além da membrana ondulante em uma porção livre.

A análise ultraestrutural de *T. foetus* permitiu a observação de algumas estruturas com maior exatidão e detalhamento. Os trofozoítos apresentaram membrana ondulante com 3 a 4 ondulações, a parte protusa do axóstilo apresentava sua projeção mais espessa logo na emergência do corpo e se ia se tornando mais delgada na porção final, semelhante a um filete e de diâmetro semelhante ao flagelo posterior (Figura 25).



Figura 25. *Tritrichomonas foetus* isolado de gato. Em destaque, estruturas como axóstilo (AX) (Observar a ponta do axóstilo na seta), membrana ondulante (MO), flagelo posterior (FP) e um dos flagelos anteriores (FA). MEV.

Foi possível visualizar que a membrana ondulante se apresentou como uma estrutura única formada pelo flagelo posterior ligado ao corpo por uma fina camada de membrana plasmática e a Costa que não é visualizada na MEV.

O axóstilo é conhecido por ser uma estrutura de sustentação do corpo celular. Também participa de diversos processos ligados a divisão celular. Mais recentemente, constatou-se que *T. foetus* se liga às células hospedeiras através da região posterior onde fica o axóstilo. E,

ao contrário do que se pensava, o trofozoíto não se torna ameboide quando em contato com a célula, mas envia digitopódios à célula e mantém seu formato piriforme e seus flagelos externalizados durante o processo de adesão (BENCHIMOL et al., 2007).

Três flagelos anteriores foram visualizados nitidamente pela MEV (Figura 26). Estudos morfológicos ultraestruturais já haviam descrito *T. foetus* tendo três flagelos anteriores e um flagelo recorrente que corre aderido ao corpo da célula em direção a região posterior, formando a membrana ondulante (HONIGBERG; BRUGEROLLE, 1990).

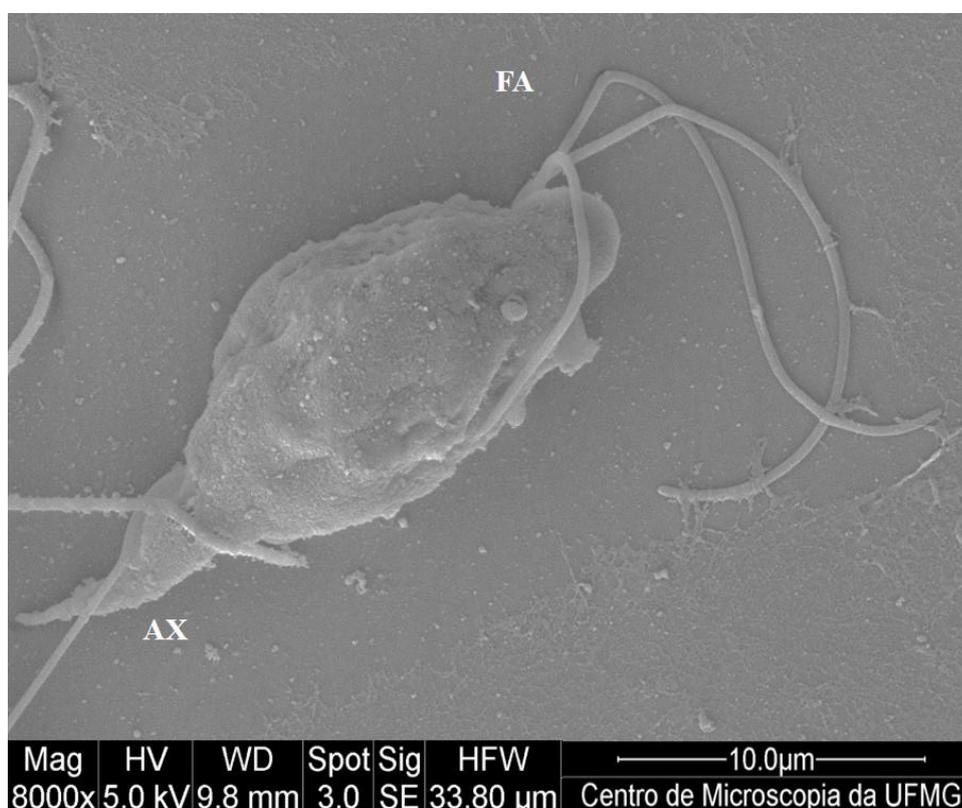
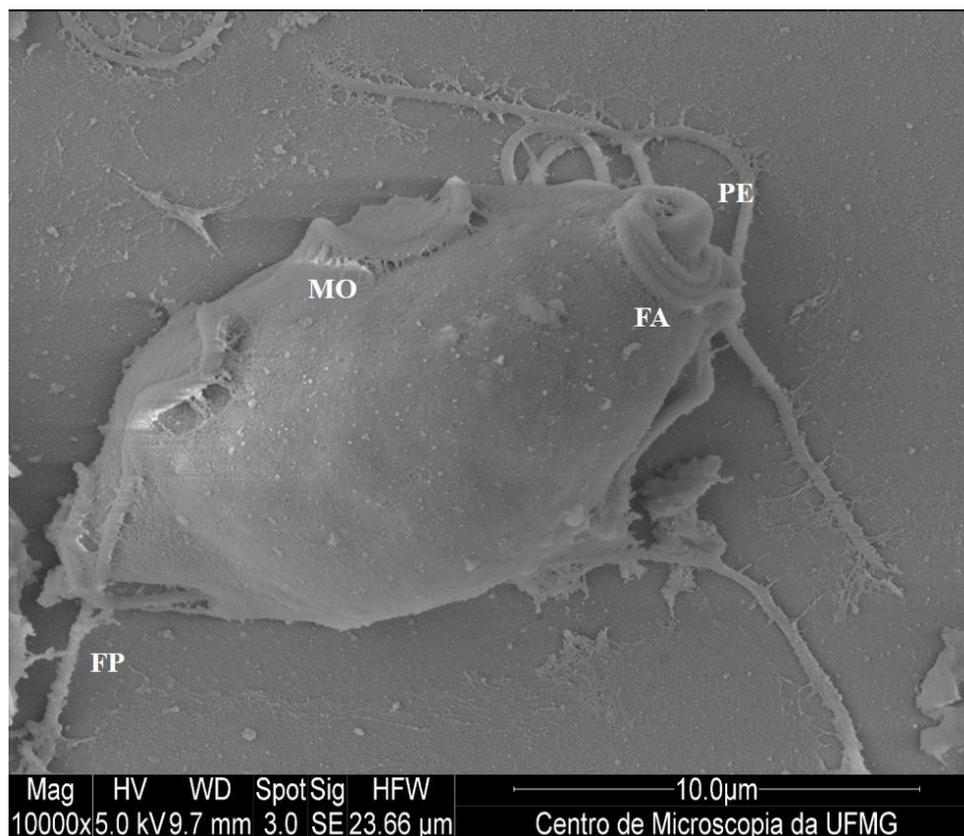


Figura 26. Trofozoíto de *Tritrichomonas foetus* onde se observam três flagelos anteriores (FA) e axóstilo (AX). MEV.

O canal flagelar por onde passam os flagelos tem sua parede sustentada por uma estrutura proteica conhecida como pelta (BENCHIMOL, 2004). Em cepas de origem felina não houve diferenças, em termos de morfologia, das cepas de origem bovina analisadas por outros pesquisadores (PEREIRA-NEVES et al., 2009; MIDDLEJ et al., 2009). Estudo conduzido por Frey et al. (2009) demonstrou também a presença de três flagelos anteriores na

SEM, mas o formato dos trofozoítos isolados de gatos foi mais arredondado e encorpado do que piriforme conforme descrito no presente estudo.

O Pelta foi perfeitamente visível na MEV com uma estrutura que forma uma parede para que os flagelos saiam e de certa forma estejam contidos. Na microscopia óptica ele foi visualizado como uma estrutura pequena em formato de vírgula, porém com uma resolução maior foi possível ver seu formato e o ponto exato por onde emergem os três flagelos



anteriores (Figura 27). Além disso, foi possível observar a rede que conecta o flagelo posterior ao corpo celular formando assim a membrana ondulante.

Figura 27. Trofozoíto de *Tritrichomonas foetus* apresentando, pelta visível (PE), canal flagelar por onde saem os flagelos anteriores (FA). A membrana ondulante com o flagelo posterior ligado ao corpo do parasito por uma fina camada. MEV.

Os parabasalídeos possuem um citoesqueleto pouco conhecido, formado por uma variedade de estruturas proteicas, muitos dos quais ainda não foram caracterizados. As principais estruturas do citoesqueleto são o complexo pelta-axóstilo e a costa. Espécies de parabasalídeos do mesmo gênero podem ser bastante similares como é o caso de *Tritrichomonas mobilensis* e *T. foetus*. Alguns autores chegaram a sugerir que as duas

espécies eram uma só, como acontece com *T. suis* e *T. foetus* (FELLEISEN, 1997; KLEINA et al., 2004). Porém, Midlej et al. (2011) ao comparar cepas de *Tritrichomonas mobilensis* um parabasalídeo encontrado em primatas não humanos, com *T. foetus* observaram que apesar de *T. mobilensis* possuir morfologia bem semelhante a *T. foetus* a projeção do axóstilo os diferencia. Os autores observaram que não havia a formação da ponta fina no final da projeção do axóstilo como ocorre em *T. foetus*.

Os resultados obtidos pelo presente estudo estão de acordo com outros estudos envolvendo cepas de origem felina, contudo não detalharam o suficiente as características morfológicas dos isolados obtidos (LEVY et al., 2003; WALDEN et al., 2013). Em outro estudo, os autores relataram a dificuldade em distinguir a membrana ondulante e o formato dos trofozoítos foi predominantemente oval (FREY et al., 2009). Já no presente estudo a membrana ondulante foi claramente visível e o formato do parasito piriforme.

4.3.4 Microscopia Eletrônica de transmissão de *Tritrichomonas foetus*

Na microscopia eletrônica de transmissão foi possível visualizar detalhes de estruturas que não poderiam ser vistas na microscopia óptica.

Os trofozoítos com formato piriforme apresentavam em seus interiores inúmeros hidrogenossomos e lisossomos. Os hidrogenossomos apresentaram formato arredondado e membrana dupla, de tamanho variado e conteúdo granuloso, sendo que a maioria em grande parte estava associada ao axóstilo. Esses resultados estão de acordo com os achados de outros estudos, que descreveram os hidrogenossomos de *T. foetus* distribuídos por todo o citoplasma, mas principalmente concentrado na região onde o axóstilo e costa estão localizados. Outra característica apresentada pelos hidrogenossomos de *T. foetus* é a presença de vesículas periféricas, em forma de um compartimento observado na periferia dos hidrogenossomos (BENCHIMOL et al., 1996; MIDDLEJ et al., 2011), porém essas vesículas não foram visualizadas pelo presente estudo.

O axóstilo foi observado como uma fita delimitada por dois filamentos, um dorsal e outro ventral com interior contendo diversos grânulos, entre eles grânulos de glicogênio que são pontos em forma de roseta mais escuros e afunilando na porção final (Figura 28).

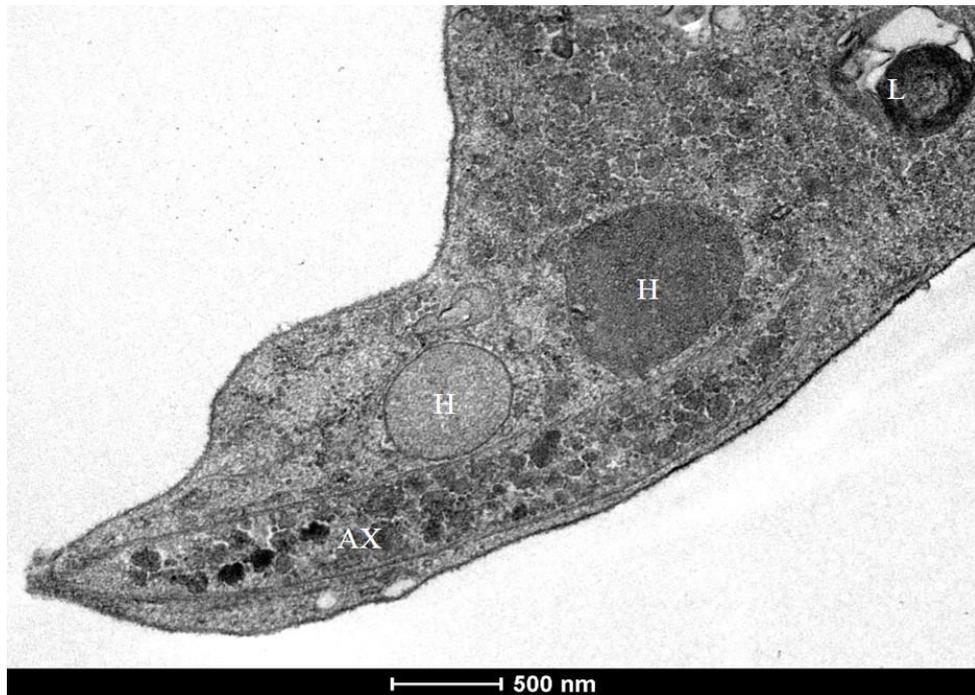


Figura 28. *Tritrichomonas foetus* isolado de gatos. Estruturas observadas: axóstilo (AX), hidrogenossomo (H), lisossoma (L). Também é possível ver grânulos de glicogênio no axóstilo (pontos mais escuros). MET.

Em trichomonádídeos o axóstilo não parece apresentar qualquer contratilidade e sua função principal seria a de suporte, enquanto o pelta reforçaria a parede do canal flagelar (HONIGBERG; BRUGEROLLE, 1990). O axóstilo participa do processo de divisão celular, proporcionando constrição do núcleo durante a cariocinese (RIBEIRO et al., 2000). A associação do hidrogenossoma com o axóstilo poderia ser explicado como sendo uma fonte de ATP para os microtúbulos. Por outro lado, observou-se que durante o processo de divisão, os hidrogenossomos são distribuídos entre as duas células filha em estreita associação com o axóstilo.

Como visualizado na figura acima, a associação entre axóstilo e estruturas tais como hidrogenossomos, retículo endoplasmático, e partículas de glicogênio já foram observadas por outros pesquisadores (BENCHIMOL et al., 2000).

Os parabasalídeos não possuem mitocôndrias, seu metabolismo depende dos hidrogenossomos e da atividade endocítica da célula. O hidrogenossomos são organelas esféricas, de dupla membrana que contêm enzimas que participam no metabolismo do piruvato formado durante a glicólise e são o local de formação de hidrogênio molecular. Este

processo é acompanhado pela síntese de ATP e captação de cálcio (MÜLLER, 1993; BENCHIMOL, 2004). Sua semelhança com a mitocôndria foi amplamente estudada e algumas são importantes para o metabolismo celular, como a produção de ATP pela degradação do piruvato (MÜLLER, 1993); mecanismo de sequestro de íons cálcio (RIBEIRO et al., 2000); as enzimas envolvidas na formação de centros de ferro-enxofre (CALTRON et al., 2007); a cardiolipina, um lipídeo marcador de membrana mitocondrial interna e de bactérias (DE ANDRADE ROSA et al., 2006); a NADH-desidrogenase, uma enzima constituinte da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CARLTON et al., 2007).

Outra estrutura envolvida no metabolismo de *T. foetus* é o lisossoma. Da mesma forma que descrita por outros autores *T. foetus* isolado de gatos apresentou na MET, lisossomos quase sempre próximos ao axóstilo, com formato arredondado e pequenas vesículas em seu interior (Figura 29).

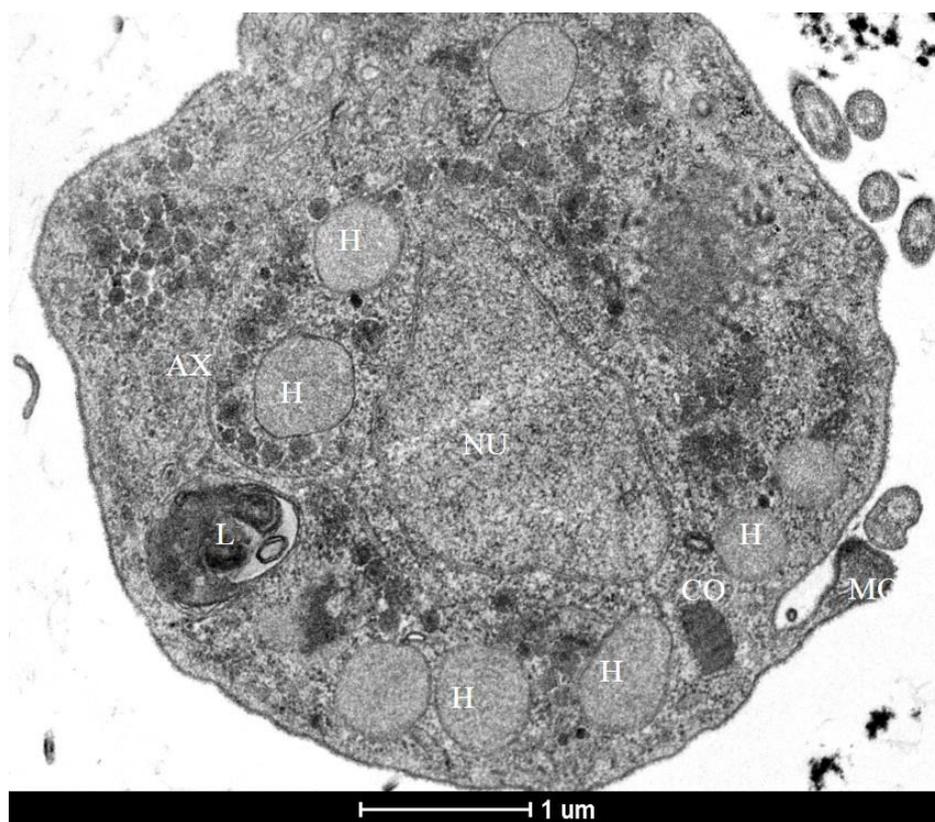


Figura 29. *Tritrichomonas foetus* demonstrando detalhes ultraestruturais do axóstilo (tronco do axóstilo) (AX), Núcleo de formato oval (NU); Costa (CO), membrana ondulante (MO) e flagelo posterior; Grânulos de glicogênio próximo ao axóstilo; vários hidrogenossomas de tamanho variado. MET

Seu papel na atividade endocítica seriam através hidrolases ácidas e neutras (QUEIROZ et al., 1991). Portanto, a acidificação dos lisossomos sugeriria a presença de uma bomba de prótons nas membranas desta organela, tal como observado em eucariotos superiores (BENCHIMOL, 2004).

O citoesqueleto de *T. foetus* é uma estrutura composta pelo complexo pelta-axóstilo e pela Costa. O axóstilo é uma estrutura em formato de fita de microtúbulos, orientado longitudinalmente percorrendo todo o comprimento celular (BENCHIMOL et al., 2000). Em trichomonádídeos o axóstilo pode ter duas funções: ser uma organela de suporte do corpo, e também participar no processo de divisão celular, proporcionando constrição do núcleo durante cariocinese (RIBEIRO et al., 2001).

Na microscopia eletrônica o axóstilo é dividido em três partes, a saber: *Capitulum*, Tronco e Segmento terminal. Tanto na microscopia óptica, quanto na MET, é possível ver o *Capitulum*, que é a parte anterior do axóstilo que possui formato mais largo. Já o chamado tronco do axóstilo só é visualizado na MET, que é quando posteriormente ao núcleo, o axóstilo gira sobre si mesmo, formando um tubo (RIBEIRO et al., 2000). A partir deste ponto o axóstilo parece diminuir progressivamente até que o seu segmento terminal se projete a partir do posterior celular como uma ponta fina coberta pela membrana celular (HONIGBERG; BRUGEROLLE, 1990; BENCHIMOL et al., 2000; RIBEIRO et al., 2000).

O tronco do axóstilo foi visualizado nas amostras avaliadas como se envolvesse parcialmente o núcleo, em formato de vírgula que depois se tornava reto (Figura 28). Grânulos de glicogênio que são observados como pontos mais escuros (formação em roseta) estavam presentes e distribuídas no citoplasma, mas principalmente localizadas ao logo do axóstilo, corroborando os dados descritos por Benchimol (2004). Os microtúbulos do axóstilo são sempre encontrados em associação com rosetas de glicogênio. Foi estabelecido que a principal fonte de energia de *T. vaginalis* é constituída por hidratos de carbono e estas células apresentam um elevado teor de glicogênio. Reservas de glicogênio endógenos apoiam a alta taxa de metabolismo, que ocorre no citosol e hidrogenossomos (HONIGBERG; BRUGEROLLE, 1990).

O núcleo apresentou-se com formato irregular, porém mais ovalado e localizado entre o axóstilo e a costa.

O flagelo posterior foi visto sempre associado ao corpo formando a membrana ondulante (Figura 30).

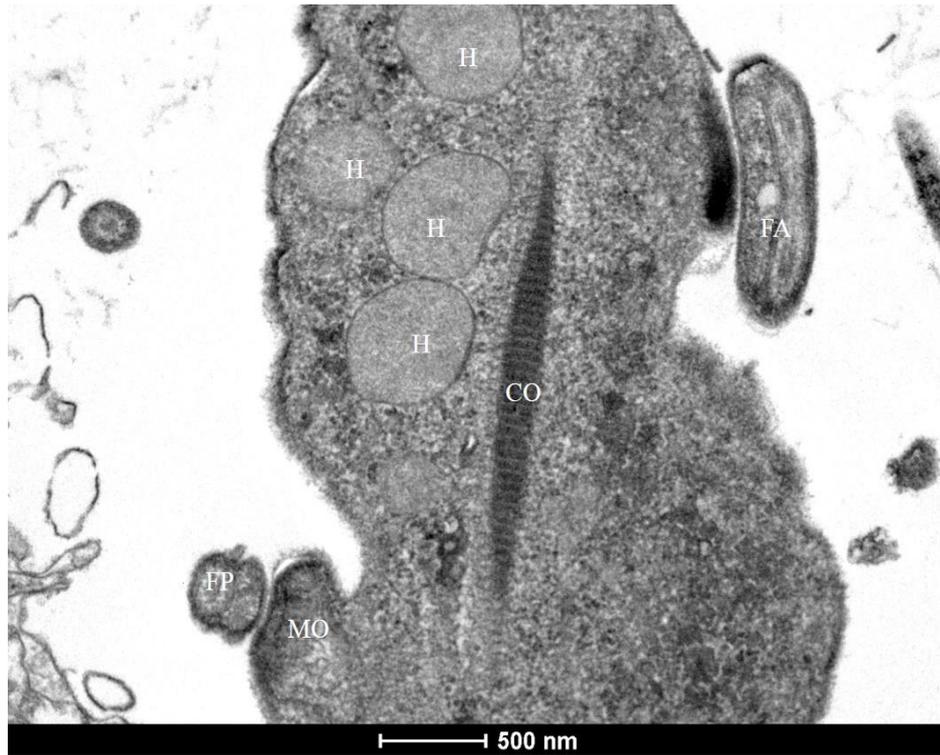


Figura 30. Trofozoíta de *Tritrichomonas foetus*. Costa (CO) evidente no centro, com bandas claras e escuras; flagelo anterior (FA) em corte longitudinal; membrana ondulante (MO) e flagelo posterior (FP) em corte transversal; hidrogenossomos (H) associados ao Costa. MET.

Outra estrutura presente no citoesqueleto que foi visualizado foi a Costa, em forma de fita mais escura apresentando bandas claras e escuras. Dependendo da largura entre essas bandas temos dois tipos de Costa, o tipo A que está presente em *T. foetus* e demais membros do gênero *Tritrichomonas* spp. e, o tipo B presente na Família Trichomonadidae (HONINBERG; BRUGEROLLE, 1990). A costa é uma estrutura do citoesqueleto encontrada apenas em parabasalídeos que possuem membrana ondulante. Presume-se que sua função seja a de proporcionar um suporte mecânico para a membrana. É uma grande rede de fibrilas estriadas que tem seu início na região do corpo parabasal do flagelo posterior se estendendo para a região posterior da célula, estreitamente associada com a membrana ondulante. Os hidrogenossomas também estão associados com a costa, explicando a antiga nomenclatura para essa organela de grânulo paracostal (BENCHIMOL, 2004).

A classificação atual coloca *T. foetus* como membro da família Tritrichomonadidae, cujas características de diagnóstico são: costa do tipo A, grupo de três flagelos anteriores e inúmeras diferenças moleculares que os distinguem da família Trichomonadidae (CEPICKA et al., 2010).

Na MET foi possível visualizar o grupo dos três flagelos corroborando os achados na SEM (Figura 31).

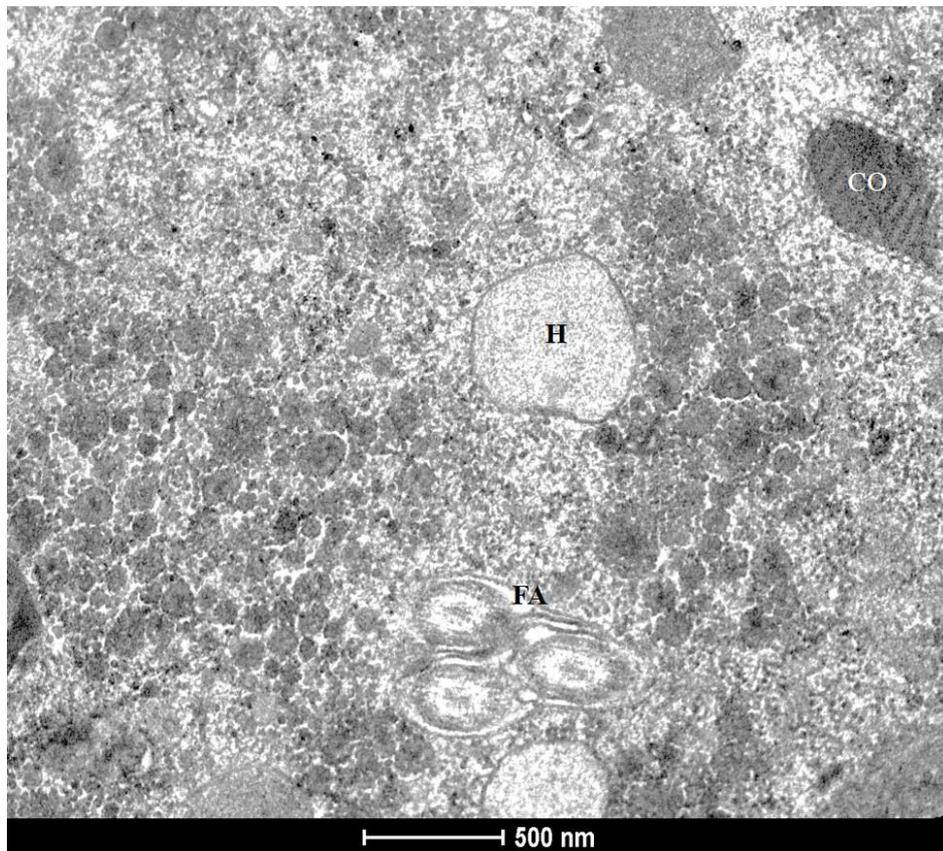


Figura 31. Trofozoíto de *Tritrichomonas foetus* onde se nota a presença o grupo de três flagelos anteriores (FA). Costa (CO) e hidrogenossomos (H). MET.

Segundo Benchimol (2004) os axonemas dos flagelos parecem ser tipicamente eucariotos, com um arranjo 9+2 de microtúbulos, e tem sua origem nos corpos basais localizados na região mais anterior da célula. Eles emergem da célula através do canal flagelar. Já o flagelo posterior também emerge da região anterior, mas a partir de uma abertura diferente. Ele dobra-se e se projeta para a região posterior, fazendo contato o corpo da célula, e formando, assim, a membrana ondulante (Figura 29 e 30).

A análise ultraestrutural é utilizada há muito tempo para se entender melhor as estruturas de diversos microrganismos e possíveis alvos de drogas. Tem sido bem estabelecido que, a ultraestrutura da família Trichomonadidae é específica do gênero (BRUGEROLLE, 1987) e é de pouca ajuda para a diferenciação de espécies. Todos os membros do gênero *Tritrichomonas* (atualmente Família Tritrichomonadidae) possuem Costa do tipo A e seu sistema mastigonte contém um corpo infracinetosomal, corpo supracinetosomal, e o pente (KULDA et al., 1987). Outro estudo aponta que apenas a ultraestrutura da membrana ondulante pode servir para diferenciar *T. muris* de *T. augusta* de outros tritrichomonadídeos (BRUGEROLLE, 1987). Contudo, outros pesquisadores demonstraram ser possível diferenciar *T. mobilensis* de *T. foetus* com base apenas na MEV (MIDDLEJ et al., 2011).

A microscopia eletrônica de transmissão de *T. foetus* isolado de felinos veio corroborar os resultados encontrados na microscopia de varredura acrescentando maiores detalhes ao que foi visto. De acordo com outros estudos feitos com a mesma espécie, porém de origem bovina, não foram notadas diferenças. Walden et al. (2013) relata que a morfologia ultraestrutural entre cepas de felino e bovino não são passíveis de diferenciação. O mesmo foi reportado por Tachezy et al. (2002) ao analisar cepas de *T. suis* e *T. foetus*.

4.3.5 Identificação genotípica dos trofozoítos

4.3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

No presente estudo foram utilizados três pares de iniciadores diferentes. Um deles chamado de universal amplifica DNA de qualquer membro das famílias Trichomonadidae e Tritrichomonadae (TFR1 e TFR2). Os outros dois são considerados espécie específicos, TFR3 e TFR4 para diagnóstico de *T. foetus* e TH3 e TH5 para diagnóstico de *P. hominis*. Tanto TFR 1 e 2 quanto TFR 3 e 4 são específicos para o gene 5.8s rRNA e as regiões interespaciaadoras internas transcritas ITS-1 e ITS-2 de parabasalídeos. Já os iniciadores TH3 e TH5 amplificam parcialmente a região do gene ribossomal 18S.

Utilizando os iniciadores TFR1 e TRF2, todas as quatro amostras produziram amplicons de aproximadamente 372 bp indicando a presença de DNA de trichomonádídeos (Figura 32).

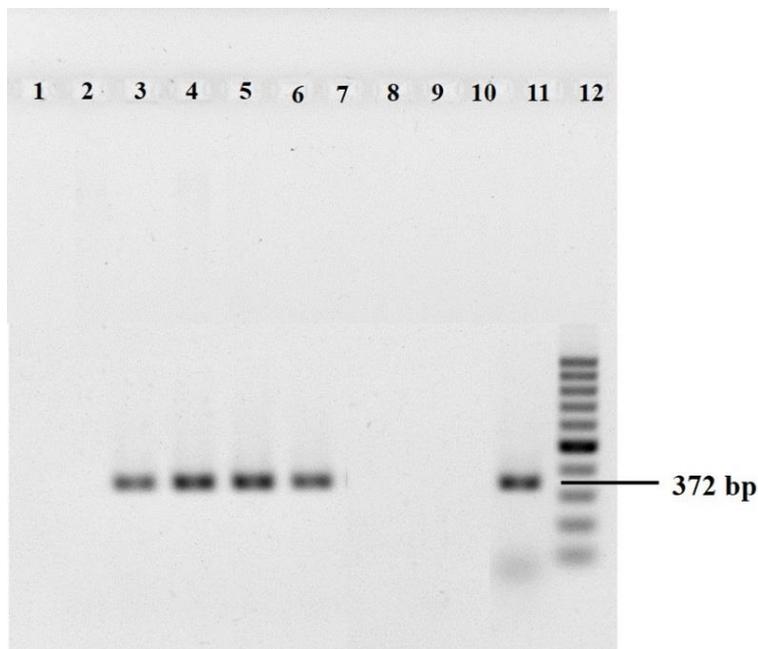


Figura 32. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TFR1 e TRF2. Controle negativo (linha 1), poçovazio (linha 2); amostras de *Tritrichomonas foetus* isolados de felinos (linhas 3-6); controle negativo (linha 8); Controle da extração (linha 9); poço vazio (linha 10); controle positivo de *T. foetus* cepa K (linha 11); marcador de peso molecular 100bp (linha 12).

Esse par de iniciadores foi desenvolvido por Felleisen (1997), com intuito de amplificar DNA de membros da Família Trichomonadidae e Tritrichomonadidae, a análise de sequência comparativa das 5.8S gene rRNA e as regiões interspaçadoras internas (ITS1 e ITS2) a partir de vários isolados diferentes de cepas de trichomonádídeos e tritrichomonádídeos. Por ser um marcador universal seu uso pode identificar diversas espécies dentro das duas famílias, portanto a identidade da espécie só poderia ser verificada através de sequenciamento. Porém as cepas de *T. foetus* utilizadas demonstraram uma conservação interespecies estrita destas sequências e sua distinção das respectivas sequências de outras espécies avaliadas. Esta informação de sequência foi aplicada à delimitação dos iniciadores TFR3 e TFR4 e no desenvolvimento de um sistema de PCR para diagnóstico de

tricomonose bovina. Esse segundo par de iniciadores específico para o gênero *Tritrichomonas* spp. se tornou muito difundido para o diagnóstico de tricomonose bovina. Porém, eles também são capazes de amplificar DNA de *T. suis*, *T. mobilenses* e *T. foetus*, todos como mesmo tamanho de banda no gel de agarose (347pb) (FELLEISEN et al., 1998).

As quatro amostras de *T. foetus* isolados de gatos em cultura foram submetidas a PCR com os iniciadores TFR3 e TFR4 e houve amplificação em todas com produto de tamanho aproximado de 347 bp (Figura 33).

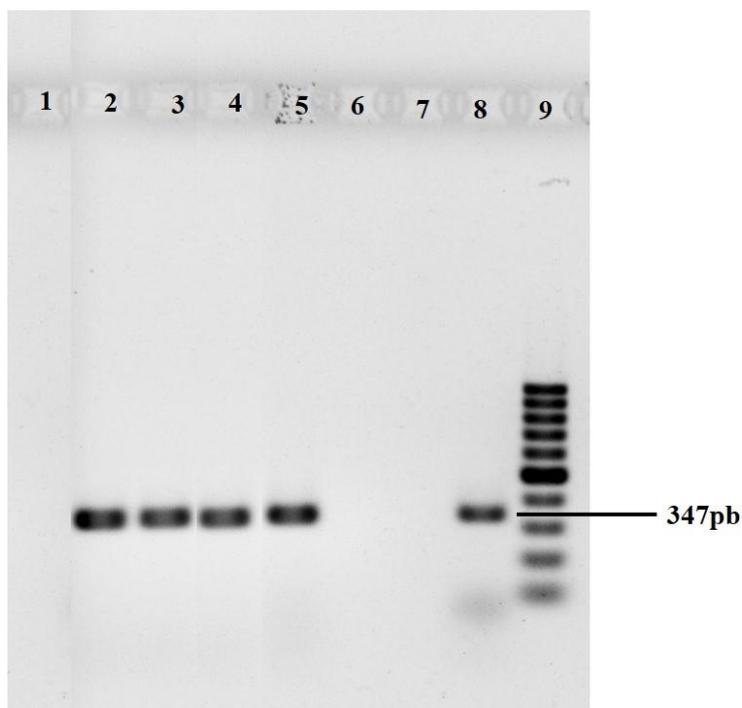


Figura 33. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TFR3 e TFR4. Controle negativo (linha 1); amostras de *Tritrichomonas foetus* de gatos (linhas 2-5), controle da extração (linha 6); controle negativo (linha 7); Controle positivo de *T. foetus* cepa K (linha 8); marcador de peso molecular 100bp (linha 9).

Os produtos da PCR com os iniciadores TFR3 e TFR4 de três amostras foram sequenciados e apresentaram entre 99.7-100% de similaridade com outras sequencias depositadas no Genbank de *T. foetus* isolados de felino (número de acesso JX960422). Esses resultados são corroborados por Frey et al. (2009) que utilizaram dos mesmos métodos: cultura e PCR da cultura de isolados de *T. foetus* de origem felina e encontram também 100% de similaridade como outras sequências de isolados felinos no Genbank. Levy et al. (2003)

também encontraram resultados semelhantes. Os alinhamentos dos produtos de amplificação dos genes 18S, 5.8S e ITS1e ITS2 demonstraram que os isolados felinos possuem sequências quase idênticas (99,5-100%) com *T. foetus* e a comparação com *P. hominis* apresentou um baixo grau de similaridade de sequência (56,6-82,6%) demonstrando um alto grau de separação entre as duas espécies.

O par de iniciadores TFR3- TFR4 permite a amplificação específica do gene e 5.8S e as regiões ITS1 e 2 de *T. foetus* (Felleisen et al., 1998). Sensibilidade da detecção por PCR é semelhante à técnica de cultura e leva menos de 5 h do isolamento de DNA até a análise dos resultados (COBO et al., 2007). No entanto, o aumento na sensibilidade implica um incremento nos custos e habilidades técnicas superiores para o correto diagnóstico.

Desde a descoberta de *T. foetus* como agente causador da diarreia do intestino grosso em gatos, o diagnóstico da trichomonose felina sempre optou pelo diagnóstico molecular em detrimento das técnicas mais simples. Segundo os autores por não ser possível a diferenciação de *T. foetus* de outros protozoários com aparência e tamanho semelhantes como *Giardia* spp. e *P. hominis* na microscopia óptica (GOOKIN et al., 2001; LEVY et al., 2003) ou pelas condições de manejo da amostra, como exposição a baixas temperaturas, que podem levar a um resultado cultura falso-negativo, além do tempo dispensado na cultura e análise morfológica (OYHENART et al., 2013). Técnicas de coloração podem ajudar na diferenciação de *T. foetus* de outros protozoários flagelados, mas tais métodos são propensos a erro do observador (LUN; GAJADHAR 1999).

Atualmente há uma tendência geral de se fazer o diagnóstico de tricomonose felina somente através da análise molecular do DNA extraído das fezes. Apesar de ser uma técnica com uma alta sensibilidade, possui um custo mais alto e pouco acessível aos clínicos veterinários. Estudos conduzidos comparando a sensibilidade entre as três técnicas de diagnóstico são escassos e com resultados variados. Normalmente a sensibilidade do exame a fresco de trofozoítos nas fezes está em torno de 14%, cultura 80% e da PCR-nested de amostras fecais em torno de 94% (GOOKIN et al., 2004), porém em outro estudo, a sensibilidade foi de 100% para exame a fresco e PCR e 84% nas três técnicas (exame a fresco, cultura e PCR) (BELL et al., 2010).

Apesar das fezes serem amostras biológicas práticas para se fazer diagnóstico molecular de parasitose infecções, sua composição é altamente complexa. A extração de DNA de alta qualidade de amostras fecais pode variar muito por causa da presença dos inibidores da PCR. Esses inibidores são coextraídos com o DNA e podem ser polissacarídeos complexos, sais biliares, produtos da degradação da hemoglobina compostos polifenólicos, e metais

pesados. Além disso, o tipo e quantidade de inibidores de PCR presente variam com a composição das fezes, o qual é em grande parte influenciada por espécies, dieta e doenças concomitantes (OYHENART et al., 2013).

Devido à presença de uma gama de inibidores de PCR nas fezes o método de extração é um dos pontos chave para a utilização da técnica (STAUFFER et al., 2008). Um estudo recente revelou que de 17 culturas de fezes positivas para *T. foetus*, resultou na extração com sucesso de DNA fecal em apenas 12 amostras. (STOCKDALE et al., 2009). Em outro estudo, a identificação molecular de parabasalídeos de 215 amostras fecais, 34 foram positivas. DNA extraído destas amostras foi subsequentemente amplificado. Entre aquelas positivas, oito não apresentaram amplificação, devido, provavelmente, à presença de inibidores da PCR em amostras fecais ou o baixo número de parasitos observados nas culturas (GRELLET et al., 2013).

O grande problema de se utilizar uma técnica só em uma única amostra é que pode levar os clínicos a resultados falso-negativos, para isso seria ideal o emprego de uma rotina para o diagnóstico de trichomonose felina semelhante ao que é feito há muito tempo em bovinos, como a realização de mais de uma coleta de material para análise para descartar a infecção (DA SILVA et al., 2011).

Até o presente momento, *T. foetus* de bovino e de felinos são considerados como sendo a mesma espécie. Alguns estudos encontraram pequenas diferenças no DNA entre as cepas na região ITS 2 e no fator de alongamento α 1 (FELLEISEN, 1997; REINMANN et al., 2012). Relatos mais recentes mostram pequenas diferenças genéticas, mas consistentemente detectáveis entre isolados de *T. foetus* de origem bovina e felina sugerindo a presença de dois genótipos de *T. foetus* adaptados aos seus hospedeiros (ŠLAPETA et al., 2010; REINMANN et al., 2012; SUN et al., 2011).

É plausível que *T. foetus* esteja passando por uma diversificação que pode conduzir a uma maior especificidade parasita/hospedeiro. No entanto, a especificidade do hospedeiro ainda não está restrita para qualquer um dos genótipos, assim, ambos se inserem em uma única espécie, *T. foetus*.

Através da utilização de iniciadores específicos para *P. hominis* (TH3 e TH5), três das quatro amostras foram positivas para a espécie (Figura 34).

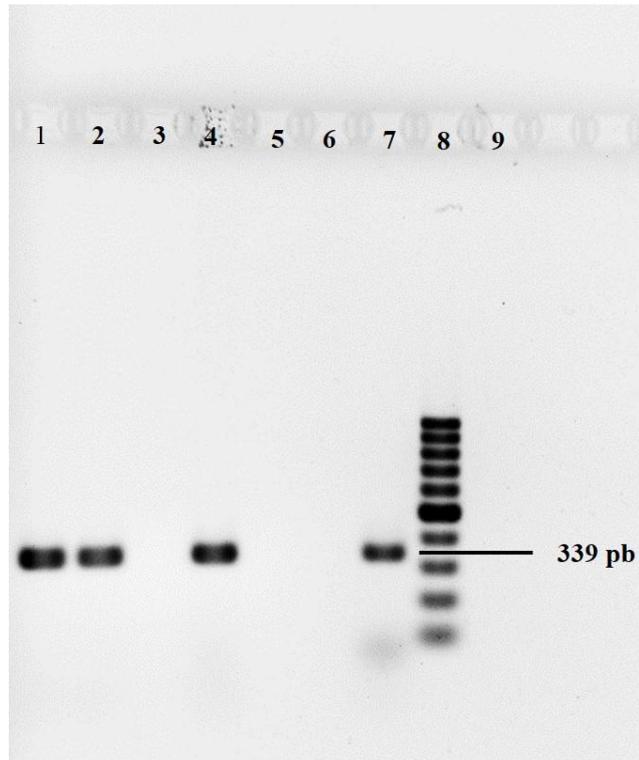


Figura 34. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio de produtos de PCR amplificados com par de iniciadores TH3 e TH5. Controle negativo (linha 1); amostras de *P. hominis* de gatos (linhas 2-4), controle da extração (linha 5); controle negativo (linha 7); Controle positivo de *Pentatrichomonas. hominis* (linha 8); marcador de peso molecular 100bp (M).

Com resultado positivo também para DNA de *P. hominis*, as amostras foram submetidas a PCR-RFLP utilizando as enzimas de restrição *Hae* III e *Hinf* I, e os produtos amplificados com 339 bp, foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição *Hae*III resultando em um corte do DNA e geração de duas bandas no gel com tamanho aproximado 251 bp e 99 bp e na geração de três bandas de 163bp, 133bp e 62 bp com a enzima *Hinf* I (Figura 35). Os padrões de bandas observadas foram correspondentes ao previsto na digestão em sílica. Sendo assim todos os isolados foram considerados idênticos.

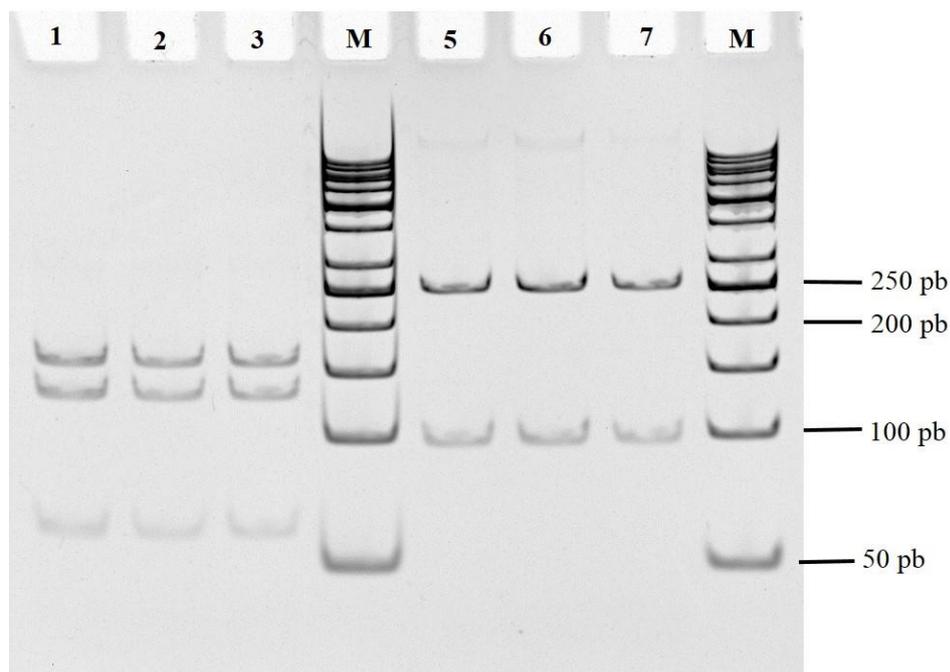


Figura 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% das digestões dos produtos de DNA de *Pentatrichomonas hominis* amplificados com os iniciadores TH3 e 5 e submetidos a digestão com a enzima de restrição *Hinf* I (linhas 1-3) e *Hae* III (linhas 5-7) marcador de peso molecular de 50pb (M).

Os produtos resultantes da amplificação com os iniciadores TH3 e TH5 foram submetidos ao sequenciamento e apresentaram 100% de similaridade entre eles e quando comparadas a outra sequência de *P. hominis* depositada no Genbank (KC623939).

Os resultados da análise molecular apresentado demonstraram haver uma coinfeção por *T. foetus* e *P. hominis* em três dos quatro animais positivos. A análise morfológica não detectou trofozoítos com caracteres que os classificassem como *P. hominis*. Possivelmente, *T. foetus* estava em maior número nas fezes e como consequência cresceu mais rapidamente em número na cultura, se sobressaindo sobre os trofozoítos de *P. hominis*. Desta forma, somente *T. foetus* foi identificado nas amostras. Segundo, Frey et al. (2009) a sobrevivência dos parasitos é extremamente variável entre isolados quando se faz sub-culturas em meio de Diamond, somente alguns isolados foram recuperados como culturas estáveis.

Poucos estudos têm se preocupado em fazer o diagnóstico diferencial entre *P. hominis* e *T. foetus* em gatos com diarreia. A coinfeção por estas duas espécies já foi descrita na literatura, três gatos foram identificados com ambos os protozoários. Apesar da morfologia não ter sido examinada, os autores afirmaram que a detecção de *P. hominis* nas fezes não contribuiria para o diagnóstico errado da infecção por *T. foetus* (GOOKIN et al., 2007).

Em cães, *P. hominis* é considerado patogênico para filhotes, podendo ser até mesmo fatal e por essa razão há um número maior de estudos preocupados em fazer o diagnóstico diferencial. Entre 19 animais com trichomonose, 2 apresentaram *T. foetus* e *P. hominis* nas fezes, o restante estavam infectados apenas com *P. hominis* (TOLBERT et al., 2012).

Esses achados são importantes do ponto de vista clínico porque cada espécie possui um tratamento diferente. A infecção por *T. foetus* é tratado, atualmente, com a ronidazole, uma droga neurotóxica para gatos e potencialmente cancerígena para os humanos que a manipulam (GOOKIN et al., 2006; PAPICH et al., 2013), porém já existem relatos sobre a resistência do protozoário a este medicamento (GOOKIN et al., 2010). Entretanto, o tratamento de *P. hominis* pode variar de uma simples mudança na dieta (CEPLECHA et al., 2013) ao uso de drogas como metronidazole (GOOKIN et al., 2005) e que não possui efeito sobre *T. foetus* isolados de gatos (GOOKIN et al., 2006).

5. PARTE 3: ALGUNS COMENTÁRIOS SOBRE A EPIDEMIOLOGIA DA TRICOMONOSE FELINA

5.1 REVISÃO DE LITERATURA

5.1.1 Epidemiologia

5.1.1.1 Especificidade hospedeira

Tritrichomonas foetus e *Pentatrichomonas hominis* são espécies de parabasalídeos intrigantes no que diz respeito a sua baixa especificidade hospedeira e localização variada. A descrição de espécies deste grupo foi por muito tempo baseada no local de infecção e espécie hospedeira (TACHEZY et al., 2002).

Até o presente momento, *T. foetus* foi descrito em três hospedeiros distintos e em sítios de infecção diferentes e com grau variado de patogenicidade. Originalmente a descrição foi feita em bovinos no trato reprodutivo causando o chamado, aborto contagioso (RIEDMÜLLER, 1928). *Tritrichomonas suis* foi descrito no trato digestório e cavidade nasal de suínos bem antes de *T. foetus*, mas, atualmente as duas espécies são consideradas como sendo uma só, porém habitando hospedeiros e locais diferentes (SLAPETA, et al., 2010). Contudo as questões relacionadas à taxonomia permanecem inalteradas e é motivo de grandes questionamentos (LUN et al., 2005). Gatos também são considerados hospedeiros de *T. foetus* quando a partir do ano de 2003, foi reconhecido como agente da diarreia do intestino grosso (LEVY et al., 2003).

Pentatrichomonas hominis, inicialmente identificado no trato intestinal de humanos, foi identificado e classificado erroneamente em uma ampla gama de hospedeiros. Em gatos, o primeiro relato foi feito por Da Cunha & Muniz (1922) que o descreveram como *Trichomonas felis*. Kessel (1928) passou a espécie para o gênero *Pentatrichomonas*. Atualmente, com o avanço das técnicas de diagnóstico morfológico e molecular sabe-se que suínos, gatos, cães, répteis e aves podem albergar o parasito em seus intestinos e trato reprodutivo de bovinos podendo ou não ser patogênico (CORBEIL et al., 2008; DIMASUAY; RIVERA, 2013; MARITZ et al., 2014).

5.1.1.2 Distribuição geográfica e frequência

Desde a descoberta e comprovação da infecção de gatos por *T. foetus*, vários estudos foram publicados em todo o mundo. Há praticamente um ou mais relatos da ocorrência da trichomonose felina, seja por *T. foetus* ou *P. hominis*, em cinco dos seis continentes.

Contudo, a infecção de gatos por *P. hominis* foi muito menos explorado pelos pesquisadores como pode ser visto no Quadro 2.

Quadro 2. Relatos da ocorrência de *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* em gatos no mundo.

CONTINENTES	PAÍS	REFERÊNCIA	
		<i>Tritrichomonas foetus</i>	<i>Pentatrichomonas hominis</i>
Europa	Itália	Holliday et al. (2009)	---
	Alemanha	Kuehner et al. (2011)	---
	Reino Unido	Gunn-Moore et al. (2007)	---
	Espanha	Miró et al. (2011)	---
	França	Profisi et al. (2013)	---
	Noruega	Tysnes et al. (2011)	---
	Grécia	Xenoulis et al. (2010)	---
	Suíça	Burgener et al. (2009)	---
	Inglaterra	Mardell et al. (2006)	---
	Áustria	Mostegl et al. (2012)	Mostegl et al. (2012)
Holanda	Van Doorn et al. (2009)	---	
Ásia	Coréia	Lim et al. (2010)	---
	Japão	Doi et al. (2012)	---
África	África do Sul	---	Kessel 1928
Américas	EUA	Levy et al. (2003); Gookin et al. (2004)	Romatowski (1999); Gookin et al. (2007b)
	Chile	Lopez et al. (2007)	---
	Brasil	Carrasco et al. (2014)	Da Cunha e Muniz (1922)
Oceania	Austrália	Bissett et al. (2008)	---
	Nova Zelândia	Kingsburry et al. (2010)	----

Em algumas regiões, apenas relatos de casos estavam disponíveis, enquanto em outras, estudos maiores foram gerados. Muitos dos dados da pesquisa foram coletados a partir de gatos com diarreia, exposições de gatos, gatis, ou animais levados às clínicas veterinárias. Conseqüentemente, houve uma tendência nestes estudos resultando em maior taxa positiva do

que se as amostras fossem do tipo transversal onde às informações seriam coletadas a partir de donos de animais sob os mais variados cenários (YAO; KÖSTER, 2015).

A frequência de gatos infectados por *T. foetus* varia entre os estudos, os relatos apresentam valores de 2 (MANCIANTI et al., 2014) a 31% (GOOKIN et al., 2004). Entretanto, a literatura sobre a frequência de *P. hominis* em gatos é escassa e está mais restrita a relatos de casos, em que quase sempre existem associados com infecção por *T. foetus* também. Conforme estudo conduzido por Gookin et al., (2007a), a frequência de gatos positivos para *P. hominis* foi de 2,1% (3/140), sendo que os mesmos estavam co-infectados por *T. foetus*. Em outro estudo, dos 102 gatos avaliados para tricomonose felina, apenas 4 (3,9%) foram positivos, três infectados com *T. foetus* e apenas um com *P. hominis* (MOSTEGL et al., 2012). A ausência de estudos sobre *P. hominis* infectando gatos parte da premissa de que este parabasalídeo seria apenas um microrganismo comensal (LEVY et al., 2003).

5.1.1.3 Fatores de risco

Diversos fatores de risco para a tricomonose felina, como idade, raça, doenças pré-existentes, entre outros, foram pesquisados pela maioria dos estudos. A idade dos animais não parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da infecção ou manifestação dos sinais clínicos. Apesar de impressões clínicas sugerirem que a infecção é mais frequente em animais jovens (GOOKIN, et al., 1999), até o momento gatos de qualquer idade podem adquirir a infecção (GOOKIN, et al., 2004). Miró et al., (2011) relataram a infecção de gatos com idade de quatro meses a 14 anos. O mesmo foi relatado em outro estudo, onde gatos infectados possuíam idade variando de três semanas a sete anos. Cerca de 70 % dos animais positivos possuíam um ano de idade e a prevalência da doença diminuía com o avanço da idade (KUEHNER et al., 2011). Semelhantemente, cerca de 67 % dos gatos infectados em uma colônia de resgate possuíam menos de um ano de idade (HOLLIDAY et al., 2009). Gunn-Moore et al. (2007) relataram que a maioria dos gatos diagnosticados como positivos eram significativamente indivíduos menores de um ano de idade. Aparentemente, gatos mais velhos podem adquirir a infecção e serem assintomáticos e felinos mais jovens podem ser mais vulneráveis a doença devido ao seu sistema imune imaturo (GOOKIN 2001).

A raça não é considerada um fator de risco para tricomonose felina. Animais de raça e sem raça definida (SRD) não apresentaram nenhuma associação com a maior predisposição a ter a infecção por *T. foetus* (HOLLIDAY et al., 2009; PARIS et al., 2014). Contrariando os

outros estudos, Gunn-Moore et al. (2007) relataram que gatos de raça foram significativamente mais prováveis terem a infecção do que gatos mestiços.

Um dos fatores avaliados em alguns estudos é a ocorrência de co-infecção de *T. foetus* com outros enteropatógenos, principalmente *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. A importância se de avaliar como parâmetro a presença de co-infecção está diretamente relacionada os sinais clínicos apresentados por animais positivos para *T. foetus*. A presença de espécies do gênero *Cryptosporidium* foi associada ao aumento das severidades da diarreia nos animais com tricomonose. Os animais com essa co-infecção foram mais propensos a terem episódios de diarreia aguda auto-limitante na fase crônica, ou seja, sete semanas pós-infecção com *T. foetus* (GOOKIN et al., 2001). Gookin et al. (2004), ao diagnosticar espécies do gênero *Giardia* em 12% dos animais positivos para *T. foetus*, não observaram que não havia correlação entre os achados observados. Os resultados destas co-infecção indicam a possibilidade de uma relação simbiótica ou patogênica envolvendo alguns enteropatógenos e *T. foetus* intensificando o quadro clínico de diarreia. Em estudos mais recentes, *T. foetus* teve maior probabilidade de ocorrer em associação com outras etiologias, tais como: *Coronavirus*, *Clostridium perfringens* e *Giardia* spp. em fezes diarreicas de gatos (PARIS et al., 2014).

A consistência das fezes é um dos fatores que mais é abordado entre os relatos na literatura. Cerca 70% dos animais positivos para tricomonose apresentaram diarreia nos últimos seis meses. Existindo uma forte associação entre a infecção por *T. foetus* e o histórico de diarreia (GOOKIN et al., 2004). Kuehner et al (2011) em seu estudo identificaram um número pequeno de animais com tricomonose subclínica. A infecção por *T. foetus* foi fortemente associada com escore anormal das fezes com os animais apresentando quadros de diarreia. Somente 11 % dos animais positivos tinham fezes formadas e firmes no dia da coleta. Por outro lado, 40 % dos animais positivos não tinham histórico de diarreia nos últimos seis meses, possivelmente em gatos assintomáticos, episódios de diarreia podem facilmente ser desencadeados por estresse do meio, tais como, exposições, shows, alta densidade de animais, etc. Flutuações na microbiota intestinal parece ser necessário para produzir as manifestações clínica da infecção por *T. foetus*. O que seria consistente com o fato de que os protozoários são dependentes da microbiota bacteriana endógena e de secreções do hospedeiro para aquisição de nutrientes essenciais.

Alta densidade habitacional de gatos, como comumente é encontrado em gatis e abrigos, é considerado fator de risco para tricomonose felina. Embora o modo exato de transmissão de *T. foetus* ainda não seja inteiramente compreendido, a aglomeração poderia aumentar risco de infecção conduzindo a um aumento do risco de contato feco-oral com o

protozoário (GOOKIN et al 2004). Embora a densidade possa ser um fator de risco para tricomonose felina (GOOKIN et al., 1999; 2004; FOSTER et al., 2004), Kuehner et al. (2011) não identificaram essa associação nos gatos estudados. A alta densidade associada a animais assintomáticos é um importante fator na disseminação dos protozoários. Isso pelo fato de que eles continuariam a eliminar baixas quantidades de organismos em suas fezes, mesmo após a resolução da diarreia, como foi assinalado por Foster et al. (2004) ao observarem que gatos infectados continuavam a eliminar trofozoítos por mais de 39 meses. Assim, esses animais seriam reservatórios do protozoário e fonte de contaminação para outros gatos. Desta forma, cada gato com ou sem diarreia em uma população fechada, com histórico de diarreia deveriam ser avaliados frequentemente para o risco de infecção (BELL et al., 2010). Pensa-se que o estresse gerado por superlotação de animais em uma colônia pode estar relacionado com o quadro de diarreia associado à infecção por *T. foetus* ou *P. hominis* (FOSTER et al., 2004) e, neste caso é provável que o estresse possa ser uma das causas que favoreça a formação de um processo agudo em gatos (MIRÓ et al., 2011).

A infecção por parabasalídeos não foi correlacionado com qualquer fator ambiental, incluindo dieta, fonte de água, contato direto ou indireto com animais de produção ou outras espécies de animais domésticos, como mascotes (*pets*), proximidade com fazendas, razão entre caixas de areia e número de gatos (KUEHNER et al., 2011). Apesar desses resultados é plausível suspeitar que os trofozoítos são transmitidos por via feco-oral a partir de um gato infectado para um não infectado. Ao fazê-lo, os parasitos têm que enfrentar e superar mudanças bruscas de ambiente para sobreviver: 1) o ambiente que encontram durante o período entre ser eliminado, a partir de um hospedeiro e ser ingerido pelo próximo e 2) o ambiente gástrico hostil do novo hospedeiro, após a ingestão e a passagem até os intestinos (YAO; KÖSTER, 2015).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Questionário epidemiológico

Todas as amostras de fezes felinas encaminhadas pelo HVPA/ UFRRJ ao LPR estavam acompanhadas de um questionário epidemiológico (ANEXO 3). Já as pertencentes ao LQEPV/UFRRJ, não passaram por questionário.

5.2.2 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando teste do χ^2 e Fisher (SAMPAIO, 2002) quando necessário.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 *Pentatrichomonas hominis* em gatil de experimentação

A análise de amostras fecais do gatil pertencentes ao Laboratório de Quimioterapia Experimental Veterinária, anexo 1, IV, UFRRJ, indicou que das 41 amostras encaminhadas, 11 (26,8 %) foram positivas para *P. hominis*, frequência relativamente alta considerando que a literatura relata a presença de *P. hominis* em apenas 1,9 e 2,1 % de uma população felina estudada (GOOKIN et al., 2007a). A população avaliada foi constituída por 17 machos e 24 fêmeas e animais maiores de seis meses em número de 39, que apresentavam um quadro de diarreia.

Os animais são mantidos em gatis coletivos separados apenas por sexo, e quando há algum experimento são separados individualmente por determinado período de tempo. Ao correlacionar o número de animais positivos e o contato com outros gatos o resultado é de 100%, porque os animais são alocados em gatis coletivos com o mesmo acesso a água e comida e uma caixa de areia grande que permita a defecação de grande parte deles. A alta densidade, ou o contato muito próximo entre esses animais possivelmente tenha contribuído para um número elevado de animais positivos e possivelmente na disseminação do protozoário para outros animais. Ambientes com alta a densidade de gatos, como comumente é encontrado em gatis, abrigos ou em casas com número elevado de animais é considerado como um dos fatores de risco chave para a tricomonose felina. Sabe-se que a transmissão do protozoário é por via oro-fecal, e que uma alta densidade aumentaria o risco de transmissão (KUEHNER et al., 2011) assim como foi encontrado pelo presente estudo.

Para o diagnóstico foram utilizadas duas técnicas o exame direto das fezes frescas diluídas em solução de Hanks e cultura em meio de Diamond ou caldo peptonado. De imediato, 10 amostras foram positivas ao exame a fresco, e 11 positivas na cultura, sendo que uma apresentou-se positiva somente na cultura, totalizando 11 amostras positivas. A avaliação entre os dois métodos demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,01$). O exame a fresco

permitiu, neste caso, diagnosticar de imediato, 10 animais que tinham parabasalídeos em suas fezes, sem a necessidade da espera do tempo de cultivo para o diagnóstico. Sendo assim, ambas as técnicas foram importantes para o diagnóstico. Embora seja uma técnica simples e rápida, requer experiência do técnico ao analisar as fezes frescas, pois as mesmas podem conter diversos microrganismos móveis que podem mascarar o diagnóstico como *Giardia* spp. e com algumas bactérias móveis. Assim, como no presente estudo, Bell et al. (2010) diagnosticaram no exame a fresco a presença de parabasalídeos em todos os 13 animais positivos (100%); enquanto que, Tolbert et al. (2012) encontraram parabasalídeos pelo exame a fresco em 88% (33/38) das amostras examinadas. Apesar dos valores encontrados, uma baixa eficiência do exame a fresco no diagnóstico de tricomonose, variando de 0 (0/26) a apenas 2% (4/192) das amostras de fezes foram encontrados por Foster et al. (2004) e Gookin et al. (2001).

Quando os animais foram avaliados por sexo e idade, não houve diferença significativa (Tabela 3) para ocorrência da infecção. Animais maiores ou menores de seis meses apresentam o mesmo risco de adquirir o protozoário. Entretanto, há de se considerar que o número de animais menores de seis meses avaliados pelo presente estudo foi muito pequeno, apenas dois. Resultados diferentes foram encontrados por Gunn-Moore et al. (2007) e Bell et al. (2010), onde animais mais jovens, menores que um ano, são mais susceptíveis a infecção. Quanto à variável sexo os resultados são semelhantes aos do presente estudo, não há uma susceptibilidade à infecção ligada ao sexo (FOSTER et al. 2004; GUNN-MOORE et al. 2007).

A frequência de diarreia foi avaliada no momento da coleta de acordo com o escore fecal e através do questionário. Animais positivos apresentando quadro de diarreia nos últimos seis meses foram significativamente maiores do que animais positivos sem diarreia ($p= 0,03$), sendo assim animais apresentando ou com histórico de diarreia possuem maior risco de albergarem parabasalídeos nas fezes (RR= 1,6). Em estudos prévios o histórico de diarreia crônica e irresponsiva a tratamento foi associado com a presença de *T. foetus* (GOOKIN et al., 1999). Kuehner et al., (2011), observaram que fezes de consistência anormal no dia da amostragem ou histórico de diarreia nos meses anteriores foi altamente correlacionado a detecção de parabasalídeos. Gatos positivos com histórico de diarreia crônica possuíam fezes com sangue e muco (STOCKDALE et al., 2009). As fezes dos animais avaliados não apresentava sangue ou muco visível. Em cães, todos animais positivos para parabasalídeos apresentaram quadro de diarreia, e a espécie mais encontrada foi *P. hominis* (TOLBERT et al., 2012). Os casos em que somente *P. hominis* foi identificado nas

fezes esteve sempre associado a diarreia nas espécies felina (DA CUNHA; MUNIZ, 1922; KESSEL, 1928; CEPLECHA et al., 2013), canina (LI, W-C et al., 2014) e suína (LI, W. et al., 2014). Em cães, um estudo recente demonstrou que *P. hominis* foi significativamente associado ao quadro de diarreia (GOOKIN et al., 2005).

A consistência das fezes não demonstrou significância quando comparada a animais positivos e negativos ($p = 0,58$), mesmo quando qualificadas em escores. Contrariando esses achados, Gookin et al. (1999) afirmaram que há uma associação entre o diagnóstico positivo de tricomonose com fezes semiformadas, moles e não formadas e sem sinais da doença, mais do que a fezes líquidas. Em cães a infecção por *P. hominis* foi significativamente associada a fezes anormais (27% (16/60) vs. 12% (18/155); $P = 0.007$) (GRELLET et al., 2013).

Através deste estudo foi possível constatar que o quadro de diarreia em gatos nem sempre está associado unicamente à infecção por *T. foetus*, uma vez que somente *P. hominis* foi diagnosticado. Assim como citado anteriormente a alta densidade e o histórico de diarreia são os principais fatores de risco para a infecção por *P. hominis* na população estudada (Tabela 3).

Tabela 3. Presença de *Pentatrichomonas hominis* em gatos do Laboratório de Química Experimental de Produtos Veterinários, IV/UFRRJ

Variáveis	Parabasalídeo		Valor de <i>p</i>	RR ^a	IC 95% ^b	^a Risco Relativo; ^b Usando aproximação de Taylor; ^c Percentual; ^d Caracterizada por pastosas, mal formadas e líquidas, NA= Não avaliado.
	Positivos	Negativos				
Quanto ao sexo:						
Machos	3 (17)	14 (17)	0,2259	0,8095	0,5657 - 1,1585	
Fêmeas	8 (24)	16 (24)				
	11(41)	30 (41)				
Quanto à idade:						
< 6	02 (02)	0 (2)	0,0670	Não significativo		
≥ 6	9 (39)	30 (39)				
	11 (41)	30 (41)				
Quanto à diarreia:						
Sim	7 (15)	8 (15)	0,03	1,5865	0,9614 - 2,6183	
Não	4 (26)	22 (26)				
	11 (41)	30 (41)				
Quanto a Consistências das fezes:						
Consistente	5 (18)	13 (18)	0,5894	1,0234	0,7030 - 1,4899	
Não consistente ^d	6 (23)	17 (23)				
	11 (41)	30 (41)				
Quanto ao convívio com outros gatos :						
Sim	11 (30)	30 (11)	NA			
Não	0 (11)	0 (30)				
	11 (41)	30 (41)				
Quanto ao Diagnóstico das fezes:						
Exame Direto	10 (11)	30 (40)	≤ 0,000	11,0000	1,6974 - 71,2847	
Exame Cultura	1 (30)	10 (01)				
	11 (41)	30 (41)				

5.3.1

Trichomonas foetus em gatos atendidos pelo HVPA- UFRRJ

O HVPA da UFRRJ conta com um atendimento especializado para a espécie felina. Setenta e sete amostras de fezes coletadas para exame parasitológico de rotina foram cedidas para a pesquisa de parabasalídeos nestes animais. As amostras de fezes foram previamente acompanhadas de um questionário epidemiológico com todas as informações dos pacientes.

Das 77 amostras, apenas quatro (5,2%) foram positivas para parabasalídeos, sendo dois positivos, no exame a fresco e dois somente após cultura das fezes, totalizando quatro. A comparação entre as técnicas empregadas apresentou-se altamente significativo ($p < 0,01$). Ambos os testes foram importantes para o diagnóstico, sendo que um não exclui a utilização do outro, o que muitas vezes é contrário à literatura sobre diagnóstico de tricomonose felina. Ambas as técnicas são questionadas quanto a sensibilidade no diagnóstico de tricomonose por Tysnes et al. (2011), que consideraram a técnica de PCR mais sensível que o exame a fresco e a cultura. De acordo com os resultados destes autores de 11 animais positivos, 10 só foram identificados através de PCR. Apesar da análise molecular possuir uma maior especificidade, ao comparamos os métodos em relação a sua sensibilidade, os relatos da literatura demonstram que a utilização da técnica sozinha, pode ter sua sensibilidade reduzida em relação à utilização de mais de uma técnica em conjunto. Gookin et al. (2002) demonstraram que a técnica de PCR com DNA extraído diretamente da fezes sozinha não foi superior a cultura das fezes feito ao mesmo tempo da coleta de amostras. A cultura das fezes resultou em 55 % de amostras positivas, enquanto que a PCR obteve 39% de positividade. O desempenho combinado das duas técnicas foi de 75% de resultados positivos, consideravelmente maior do que as técnicas sozinhas. Em outro estudo, a sensibilidade entre cultura e PCR para o diagnóstico de tricomonose bovina revelou taxas quase iguais entre as técnicas, 67,8% para a cultura e 65,9% para a PCR (COBO et al., 2007). Sendo assim, a combinação de técnicas de diagnóstico para tricomonose deveria ser considerada pelos clínicos veterinários ao avaliar possíveis infecções por estes protozoários, além disso, a realização de mais de uma amostragem para descartar um animal como positivo ou negativo, como é frequentemente feito em bovinos, onde para se considerar um touro negativo para tricomonose, são necessários três coletas de material com intervalo de 7-15 dias onde o resultado seja negativo (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

No presente estudo foram avaliados 37 machos e 40 fêmeas, a idade média dos animais foi de 3,5 anos (3 meses a 15 anos). A classificação da idade foi feita em animais menores e maiores de 12 meses. Vinte animais tinham menos que 12 meses e 57 maiores que um ano. A análise estatística não revelou diferença significativa ao avaliar sexo ($p = 0,33$) e idade ($p = 0,708$) entre animais positivos e negativos. Dos quatro animais positivos, apenas um era macho e o restante fêmeas, quanto à idade um era menor de um ano e o restante maior de maior ano (Tabela 4). Esses achados contrariam outros estudos que apontam que a tricomonose felina é quase sempre considerada uma doença de animais jovens menores de um ano de idade (GOOKIN et al., 2001; GUNN-MOORE et al., 2007). Profizi et al. (2013)

em seu estudo observou que 85% dos animais positivos tinham menos de um ano de vida. Porém, corroborando os achados do presente estudo, Tysnes et al. (2011) não encontraram correlação entre idade e positividade a tricomonose felina. Xenoulis et al. (2010) também não encontraram diferenças quanto a idade entre gatos infectados, cinco dos seis animais positivos eram maiores que um ano (média de 3,5 anos). Neste mesmo estudo, os autores sugeriram que a tricomonose felina em gatos mais velhos, é quase sempre assintomática, o que está de acordo com os resultados encontrados pelo presente estudo, onde os animais em sua maioria eram maiores que dois anos (média= 3,25 anos) e não tinham histórico de diarreia ($p=0,1569$).

O histórico de diarreia é considerado um dos fatores de risco para um diagnóstico positivo de *T. foetus*, Tysnes et al. (2011) encontraram uma alta significância quando correlacionaram o histórico de diarreia com o diagnóstico de *T. foetus* ($p=0,02$) (Tabela 4). É possível, que o pequeno número de animais positivos contribuiu para a não correlação com o histórico de diarreia, embora o fato dos animais serem adultos, também deveria ser levado em consideração, uma vez que podem ser apenas animais portadores e fontes de infecção para outros animais.

Tabela 4. Presença de Parabasalídeos em gatos atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ.

Variáveis	Parabasalídeo		Valor de p	RR ^a	IC 95% ^b
	Positivos	Negativos			

Quanto ao sexo:						a Risco Relativo; b
Machos	1 (37)	36 (37) ^c	0,337	0,6758	0,3674 -1,2430	
Fêmeas	3 (40)	37 (40)				
	4 (77)	73 (77)				Usando aproximação de Taylor; ^c Percentual; ^d
Quanto à idade (meses):						
≤ 12	1 (20)	19 (20)	0,708	0,9863	0,5512 - 1,7650	
≥ 12	3 (57)	54 (57)				
	4 (77)	73 (77)				Caracterizada por pastos, malformadas e líquidas; ^e NS =
Quanto à diarreia:						
Sim	0 (36)	36 (36)	0,1569	NS ^e		
Não	4 (41)	37 (41)				
	4 (77)	73 (77)				não significativo.
Quanto a Consistências das fezes:						
Consistente	4 (42)	38 (42)	0,0827	NS		
Não consistente ^d	0 (35)	35 (35)				
	4 (77)	73 (77)				
Quanto ao convívio com outros gatos :						
Sim	4 (57)	57 (16)	0,385	NS		
Não	0 (16)	16 (61)				
	4 (73)	73 (77)				
Quanto ao Diagnóstico das fezes:						
Exame Direto	2 (2)	73 (4)	≤ 0,002	2,0000	0,7506 -5,3289	
Exame Cultura	2 (75)	0 (73)				
	4 (77)	73 (77)				

A importância do diagnóstico positivo para tricomonose em animais assintomáticos está relacionada à contaminação do ambiente com fezes contendo os protozoários que podem contaminar outros gatos, principalmente em ambientes onde existe uma alta densidade de gatos ou mesmo animais de outra espécie que podem vir a adquirir a infecção por esse parasito. Foster et al. (2004) observaram que gatos usualmente continuam a eliminar trofozoítos de *T. foetus* por até 39 meses após a resolução da diarreia; desta forma, cada gato, com ou sem diarreia, em uma população fechada deveria ser avaliado.

A análise da consistência das fezes *versus* diagnóstico positivo para tricomonose também não demonstrou diferença significativa entre animais positivos e animais negativos. Os quatro animais positivos possuíam fezes consistentes no momento da coleta e não possuíam histórico de diarreia. Esses resultados destoam dos encontrados por Kuehner et al. (2011) que encontraram uma alta correlação entre fezes com consistência líquida/pastosa e animais positivos para *T. foetus* (64%); enquanto que, somente 11% dos animais positivos possuíam fezes consistentes.

O convívio com outros gatos não foi significativo, embora todos os animais positivos convivessem com outros gatos. Três deles pertenciam ao mesmo proprietário que possui um total 16 gatos em casa. O outro proprietário também convivia com outros 14 gatos. Possivelmente o número reduzido de amostras positivas tenha contribuído com resultados inconsistentes na análise estatística.

É importante ressaltar que este é o primeiro estudo sobre tricomonose felina no Brasil e em duas populações completamente distintas. Diferente do que é descrito por outros autores, os animais que se apresentaram positivos não tiveram nem um tipo de correlação com os fatores de risco que são considerados importantes para a infecção, como histórico de diarreia e alta densidade populacional. Além disso, o único tratamento efetivo para a tricomonose causada por *T. foetus* em gatos, é uma droga neurotóxica para os animais e extremamente cancerígena para humanos (Foster et al., 2004). Muitos gatos infectados podem ter a diarreia resolvida pelo uso de antibióticos por algumas semanas ou meses tornando-se assintomáticos, porém ainda infectados e conseqüentemente eliminando o parasito no ambiente. O que o torna um risco para outros animais que não só os gatos, mas cães e para o próprio homem; uma vez que, já existem relatos da infecção por este protozoário em humanos (DUBOUCHER et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

6.1 DE *Pentatrichomonas hominis*

- A análise morfológica forneceu dados suficientes para caracterizar a espécie *P. hominis* em fezes de gatos.
- As análises moleculares confirmaram a presença de somente uma cepa de *P. hominis* nas amostras estudadas e o sequenciamento apresentou similaridade entre a cepa estudada com outras sequências da mesma espécie depositadas no Genbank de isolados de cão e gato.

6.2 DE *Tritrichomonas fetus*

- A análise morfológica forneceu dados suficientes para caracterização da espécie, como: número constante de três flagelos anteriores, núcleo alongado, protrusão do axóstilo de formato mais espesso anteriormente e afinando bruscamente em forma de filete no seu final.
- Os resultados obtidos com análise genética dos isolados só corroboram os resultados do diagnóstico morfológico feito neste estudo. Sendo assim sua utilização foi feita com caráter de ferramenta complementar no diagnóstico de *T. foetus* nas amostras utilizadas.
- A junção das três técnicas permitiu um diagnóstico mais específico de *T. foetus* isolados de amostras fecais e ainda a detecção de uma coinfeção por *P. hominis* que só foi identificado através de análise molecular e estava presente em três, das quatro amostras positivas para *T. foetus*. Nenhum trofozoíto de *P. hominis* foi identificado no exame morfológico.

6.3 Epidemiologia da Tricomonose Felina

6.3.1 Fatores associados a infecção de gatos por *P. hominis*

- Não houve correlação entre idade e sexo entre animais infectados e não infectados.
- O quadro de diarreia foi significativamente associado a infecção por *P. hominis*, com um risco relativo de 1,5 vezes.
- Não houve correlação entre animais positivos e consistência das fezes.
- O estreito contato entre os animais foi significativo quando relacionado ao número de animais positivos dentro da população estudada.

- Tanto o exame direto quanto a cultura foram igualmente capazes de detectar parabasalídeos nas fezes.

6.3.2 Fatores associados à infecção de gatos por *T. foetus*

- Tanto a idade e o sexo do animal foram fatores associados com o diagnóstico de tricomonose em gatos;
- Não houve correlação entre diarreia e consistência das fezes entre os animais infectados e não infectados.
- O convívio com outros gatos não foi significativo na análise estatística, embora os animais positivos fossem provenientes de proprietários com mais de 10 gatos.
- O exame a fresco em comparação a cultura das fezes foi significante, ambos os testes detectaram o protozoário, porém quando em associação permitiram um diagnóstico mais preciso.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este é o primeiro estudo realizado no Brasil sobre o diagnóstico de parabasalídeos na espécie felina. Ficou claro através desta pesquisa que a tricomonose em gatos pode ocorrer devido a presença tanto de *T. foetus* como de *P. hominis*, ou ambos.

A importância do correto diagnóstico para felinos está relacionada à conduta terapêutica a ser adotada para cada espécie de parabasalídeo. No tratamento de *T. foetus* é utilizado a droga ronidazole, potencialmente tóxica para felinos, e cancerígena para humanos. Já, na infecção por *P. hominis*, o tratamento a ser conduzido consiste na utilização de metronidazole que é menos tóxico e com mudanças na dieta.

Os métodos diagnósticos visam à procura do protozoário vivo nas fezes através do exame a fresco e cultura; porém, a especificidade dos métodos é baixa, visto que em ambas as espécies são muito semelhantes. Sendo assim, há necessidade de um estudo mais detalhado de sua morfologia. Através do exame simples de esfregaços de fezes ou cultura corados, é possível distinguir as formas vegetativas de *P. hominis* e de *T. foetus*, levando em consideração o número de flagelos presentes, e formato do axóstilo de cada espécie. Infelizmente é cada vez maior o número de veterinários que recorrem somente a biologia molecular como forma de diagnóstico e não sabem sequer fazer a leitura de um esfregaço de sangue ou mesmo um simples exame de fezes. Os métodos para o diagnóstico da tricomose felina, não são mais trabalhosos do que um exame bacteriológico, por exemplo. Porém, ainda esbarra na falta de conhecimento sobre o parasito, a doença que ele causa, e em laboratórios que saibam fazer o diagnóstico.

Com o presente estudo, foi possível diagnosticar gatos infectados por *P. hominis* apresentando sinais clínicos de infecção intestinal e gatos infectados por *T. foetus* assintomáticos. Neste contexto, a presença de parabasalídeos com potencial zoonótico em animais como cães e gatos, estreitamente relacionados à convivência com humanos, leva a questionamentos sobre a importância do diagnóstico e, terapêutica adequada em animais de companhia. Não somente pelo ponto de vista clínico veterinário, mas também, pela possibilidade de ser um caso de saúde pública, principalmente quando associados a pessoas imunocompetentes, idosos e principalmente crianças que possuem um relacionamento mais próximo com os animais, e nem sempre têm hábitos de higiene adequados, ou até mesmo em dividir o mesmo espaço como jardins, parques, creches e outros, que pode estar contaminado com as fezes de gatos infectados.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S.M.; LEANDER, B.S., SIMPSON, A.G.B., ARCHIBALD, J.M., ANDERSON, O. R., BASS, D., BOWSER, S. S., BRUGEROLLE, G., FARMER, M.A, KARPOV, S., KOLISKO, M. , LANE, C.E., LODGE, D.J., MANN, D.G., MEISTERFELD, R., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY-STAN-DRIDGE, S.E., SMIRNOV, A.V., SPIEGEL, F.; Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. **Systematic Biology**, v. 56, p. 684–689, 2007.
- AFFONSO, A.L., DE ALMEIDA, J.C., BENCHIMOL, M. Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cellular Biology**, v. 72, p. 247-256, 1997.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J.; Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALSTAD, A.D., KROGH, D., FISCHER, K., GUSTAFSON, S., CASSEL, G., REICHERT, J., BASZLER, T.; Trichomoniasis in a beef herd. **Veterinary Medicine**, v.79, p. 708-709, 1984.
- ANDERSON, M.L., BONDURANT, R.H., CORBEIL, R.R., CORBEIL, L.B.; Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 594-600, 1996.
- BARR, S.C.; Enteric protozoal infections. In: Greene CE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 487, 1998.
- BARRETT, W. C.; **Heidenhain's Hematoxylin Used with the Smear Technic**. Cambridge: Biology Institute, Harvard University, v. 7, p. 63-64, 1932.
- BELL, E.T.; GOWAN, R.A.; LINGARD, A.E.; MCCOY, R.J.; SLAPETA, J.; MALIK, R. Naturally occurring *Tritrichomonas foetus* infections in Australian cats: 38 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p. 889- 898, 2010.
- BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum-Golgi complex and lipids. **Experimental Parasitology**, v. 59, p. 51-58, 1985.
- BENCHIMOL, M. ; KACHAR, B. ; DESOUSA, W. . Surface domains in the pathogenic protozoa *Tritrichomonas foetus*. **Journal Protozoology**, v. 39, n.4, p. 480-484, 1992.

- BENCHIMOL, M.; JONHSON, P.; DE SOUZA, W.; Morphogenesis of the hydrogenosome-an ultrastructural study. **Biology of the Cell**, v. 87, n.3, p. 197-205, 1996.
- BENCHIMOL, M. ; DINIZ, J.P., ; RIBEIRO, C. K.; The fine structure of the axostyle and its association with other organelles in trichomonads. **Tissue And Cell**, v. 32, p. 178-187, 2000.
- BENCHIMOL, M.; CHANGH, T.H.; ALDERETE, J.F.; *Trichomonas vaginalis*: Observation of coexistence of multiple viruses in the same isolate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 215, p. 197-201, 2002.
- BENCHIMOL, M.; Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M. ; BURLA, A. ; FONTES, R.; *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro.. **Veterinary Research**, v. 38, p. 399-408, 2007.
- BENCHIMOL, M., DE ANDRADE ROSA, I., DA SILVA FONTES, R., BURLA DIAS, A.J. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. **Parasitology Research**, v.102, p. 597-604, 2008.
- BISSETT, S.A.; GOWAN, R.A.; O'BRIEN, C.R.; STONE, M.R.; GOOKIN, J.L.; Feline diarrhoea associated with *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* co-infection in an Australian cattery. **Australian Veterinary Journal**, v. 86, p. 440-443, 2008.
- BONDURANT, R.H. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. **Veterinary Clinic of North America: Food and Animal Practice**, v. 13, p. 345-361, 1997.
- BORCHARD, K.A.; HERNANDEZ, V.; MILLER, S.; LOAICIGA, K.; CRUZ, L.; NARANJO, S., MAIDA, N.; A clinical evaluation of trichomoniasis in San Jose, Costa Rica using In Pouch TV test. **Genitourinary Medicine**, v. 68, p. 328-330, 1992.
- BURGENER, I.A.; FREY, C.F.; KOOK, P.H.; GOTTSTEIN, B.; *Tritrichomonas foetus*: A new intestinal parasite in Swiss cats. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 20, p. 113-118, 2009.
- BRUGEROLLE, G.; Sur l'existence de vrais kystes chez les Trichomonadines intestinales. Ultrastructure des kystes de *Trichomitus batrachorum* Perty 1852, *Trichomitus sanguisugae* Alexeieff 1911, et *Monocercomonas tipulae* Mackinnon 1910. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 277, p. 2193-2196, 1973.

BRUGEROLLE, G.; Étude de la cryptopleuromitose et de la morphogenèse de division chez plusieurs Genres de la trichomonadines primitives. **Protistologica**, v. 4, p. 457-468, 1975.

BRUGEROLLE, G.; Structural diversity of trichomonads as the basis for systematic and evolutionary considerations. **Acta Universitatis Carolinae. Medica. Monographia Journal** , v. 30, p. 199–210, 1987.

BRUMPT, E. Recherches morphologiques et expérimentales sur le *Trichomonas felis* Da Cunha et Muniz, 1922, parasite du chat et du chien. **Annals de Parasitologie**. v. 3, p. 239–251, 1925.

CARRASCO, L.P.S.; dos SANTOS, C.S.; SOUZA, H.J.M.; de JESUS, V.L.T.; GIZZI, A.B.R. *Tritrichomonas foetus* como agente etiológico de diarreia em gatos- relato de dois casos. **Clínica Veterinária**, v. 113, p. 34-41, 2014.



CARLTON JM¹, HIRT RP, SILVA JC, DELCHER AL, SCHATZ M, ZHAO Q, WORTMAN JR, BIDWELL SL, ALSMARK UC, BESTEIRO S, SICHERITZ-PONTEN T, NOEL CJ, DACKS JB, FOSTER PG, SIMILLION C, VAN DE PEER Y, MIRANDA-SAAVEDRA D, BARTON GJ, WESTROP GD, MÜLLER S, DESSI D, FIORI PL, REN Q, PAULSEN I, ZHANG H, BASTIDA-CORCUERA FD, SIMOES-BARBOSA A, BROWN MT, HAYES RD, MUKHERJEE M, OKUMURA CY, SCHNEIDER R, SMITH AJ, VANACOVA S, VILLALVAZO M, HAAS BJ, PERTEA M, FELDBLYUM TV, UTTERBACK TR, SHU CL, OSOEGAWA K, DE JONG PJ, HRDY I, HORVATHOVA L, ZUBACOVA Z, DOLEZAL P, MALIK SB, LOGSDON JM JR, HENZE K, GUPTA A, WANG CC, DUNNE RL, UPCROFT JA, UPCROFT P, WHITE O, SALZBERG SL, TANG P, CHIU CH, LEE YS, EMBLEY TM, COOMBS GH, MOTTRAM JC, TACHEZY J, FRASER-LIGGETT CM, JOHNSON PJ.; Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. , v. 315, p. 207-212, 2007.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. **Journal of Water Health**, v. 7 (Suppl. 1), p. S2–S18, 2009.

CDC. Trichomoniasis Epidemiology - Vaginosis Self-Study from Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: < www.cdc.gov >. Acesso em: Fev 2015.

- CEPICKA, I.; HAMPL, V.; KULDA, J.; Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one New Genus and three New Species. **Protist**, v. 161, p. 400–433, 2010.
- CEPLECHA, V., SVOBODA, M., CEPICKA, I., HUSNIKA, R., HORACKOVA, K. SVOBODOVAC, V.; InPouch™ TF-Feline medium is not specific for *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 503–505, 2013.
- CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K., PARFREY, L. W., KNIGHT, R.; The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, p. 1258–1270, 2012.
- COBO, E.R., FAVETTO P.H.; LANE, V. M.; FRIEND, A.; VANHOOSER, K.; MITCHELL, J.; BONDURANT, R.H.; Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. **Theriogenology**, v. 68, p. 853–860, 2007.
- COMPAORE, C., LEKPA, F. K., NEBIE, L., NIAMBA, P.; NIAKARA, A.; *Pentatrichomonas hominis* infection in rheumatoid arthritis treated with adalimumab. **Rheumatology**, v.52, p. 1534- 1535, 2013.
- CORBEIL, L.B.; CAMPERO, C.M.; VAN HOOSEAR, K.; BONDURANT, R.H. Detection of trichomonad species in the reproductive tractsof breeding and virgin bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 226–232, 2008.
- COVER, A.J.; HARMON, W.M.; THOMAS, M.W.; A new method for the diagnosis of *Trichomonas gallinae* infection by culture. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 457–459, 1994.
- CRUCITTI, T., ABDELLATI, S., ROSS, D.A., CHANGALUCHA, J., DYCK E. VAN; BUV, A.; Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 510–516, 2004.
- DA CUNHA, A.M. & MUNIZ, J.; Trabalhos do Instituto Oswaldo Cruz: sobre um flagelado parasito do gato. **Brasil Medico**, v. 1, p. 285-286, 1922.
- DAHLGREN, S.S.; GJERDE, B.; PETTERSEN, H.Y.; First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p. 654–657, 2007.
- DE ANDRADE ROSA, I., EINICKER-LAMAS, M., BERNARDO, R.R., PREVIATTO, L.M., MOHANA- BORGES, R., MORGADO-DIAZ, J., BENCHIMOL, M.,, Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 784–787, 2006.

- DIAMOND L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**, v. 43, p. 488-490, 1957.
- DIMASUAYA, K.G. B.; RIVERA, W.L.; Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.289–295, 2013.
- DIMSKI DS; Helminth and Noncoccidial Protozoan Parasites of Gastrointestinal Tract. In: The Cat: Diseases and Clinical Management (RG Sherding, ed), Churchill Livingstone, New York (USA); pp 459-477, 1989.
- DOI, J.; HIROTA, J.; MORITA, A.; FUKUSHIMA, K.; KAMIJYO, H.; OHTA, H.; YAMASAKI, M.; TAKAHASHI, T.; KATAKURA, K.; OKU, Y.; Intestinal *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) infection in Japanese cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, p. 413–417, 2012.
- DUBOUCHER, C., CABY; S., DUFRERNEZ, F.; CHABE, M.; GANTOIS, N.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P. BILLY, C.; BARRE, E.; TORABI, E.; CAPRON, PIERCE, M. R. J.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI E. Molecular Identification of *Tritrichomonas foetus*-Like Organisms as Coinfecting Agents of Human *Pneumocystis* Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1165–1168, 2006a.
- DUBOUCHER, C.; CABY, S.; PIERCE, R.J., CAPRON, M.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI E.; Trichomonads as superinfecting agents in *Pneumocystis* pneumonia and acute respiratory distress syndrome. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, suppl. 1, s95–S97, 2006b.
- DUBOUCHER, C., PIERCE, R.J.; CAPRON, M.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI, E. Recent advances in pulmonary trichomonosis. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 201–202, 2008.
- DUFRERNEZ, F.; WALKER, R.; NOE, C.L., CABY,S.; MANTINI,C.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; OHKUMA, M.; KUDO, T.; CAPRON, M.; PIERCE, R.J.; VILLANUEVA, M.R.; VISCOGLIOSI, E.; Morphological and Molecular Identification of Non-*Tritrichomonas foetus* Trichomonad Protozoa from the Bovine Preputial Cavity. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.54, n 2, p. 161–168, 2007.

- FARMER, M.A., Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n. g., n. sp. (Parabasalia) and its relationships to amitochondrial protists. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 40, p. 619–626, 1993.
- FASTRING, D.R.; AMEDEE, A.; GATSKI, M.; CLARK, R.A.; MENA, L. A.; LEVISON, J.; SCHMIDT, N.; RICE, J.; GUSTAT, J.; KISSINGER, P. L.; Co-occurrence of *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis and vaginal shedding of HIV-1 RNA. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 41, p. 173–179, 2014.
- FELLEISEN R.S.J. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. **Parasitology**, v. 115, p. 111-119, 1997.
- FELLEISEN, R.S.J.; LAMBELET, N.; BACHMANN, P.; NICOLET, J.; MULLER, N.; GOTTSTEIN, B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA Gene Unit Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 513–519, 1998.
- FELLEISEN, R.S. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. **Microbes Infection**, v.1, p. 807-816, 1999.
- FLICK, E.W., Experimental analysis of some factors influencing variation in the flagellar number of *Trichomonas hominis* from man and other primates and their relationship to nomenclature. **Experimental Parasitology**, v. 3, p. 105-21, 1954.
- FOSTER, D.M., GOOKIN, J.L., POORE M.F., STEBBINS, M.E., LEVY, M.G., Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, p. 888-892, 2004.
- FREY, C.F. ; SCHILD, M.; HEMPHILL, A.; STÜNZI, P.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B.; BURGNER, I. A.; Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR. **Parasitology Research**, v. 104, p. 783-788, 2009.
- FRIEDHOFF, K.T.; KUHNIGK, C.; MÜLLER, I. Experimental infections in chickens with *Chilomastix gallinarum*, *Tetratrichomonas gallinarum*, and *Tritrichomonas eberthi*. **Parasitology Research**, v. 77, p. 329–334, 1991.
- GOOKIN, J.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; LEVY, M.G.; GAGER, R.B.; BENRUD, J.G.; Diarrhea associated with trichomonosis in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 1450–1454, 1999.

- GOOKIN, J.L., LEVY, M.G., MAC LAW, J., PAPICH, M.G., POORE, M.F., BREITSCHWERDT, E.B., Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1690–1697, 2001.
- GOOKIN, J.L., BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERDT, E.B., LEVY, M.G., Single-Tube Nested PCR for Detection of *Tritrichomonas foetus* in Feline Feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4126–4130, 2002.
- GOOKIN, J.L.; FOSTER, D.; POORE, M.; STEBBINS, M.; LEVY, M.G. 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, 2003.
- GOOKIN, J.L.; STEBBINS, M.E.; HUNT, E.; BURLONE, K.; FULTON, M.; HOCHER, R.; TALAAT, M.; POORE, M.; LEVY, M.G. Prevalence of and Risk Factors for Feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2707–2710, 2004.
- GOOKIN, J. L.; BIRKENHEUER, A. J.; ST. JOHN, V.; SPECTOR, M.; LEVY, M. G. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 939–943, 2005.
- GOOKIN, J.L. Trichomoniasis. In. GREENE, C. (ed): **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St Louis: Saunders Elsevier, p. 745-750, 2006
- GOOKIN, J.L.; STAUFFER, S.H.; COCCARO, M.R.; MARCOTTE, M.J.; LEVY, M.G.A. Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 783–787, 2007a.
- GOOKIN, J.L.; STAUFFER, S.H.; LEVY, M.G. Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 11–15, 2007b.
- GOOKIN, J.L.; STONE, M.R.; YAEGER, M.J.; MEYERHOLZ, D.K.; MOISAN, P. Fluorescence *in situ* hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomonosis. **Veterinary Parasitology**. v. 172, p. 139–143, 2010.
- GRANGER, B.L.; WARWOOD, S.J.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 86, p. 699–709, 2000.

- GRAY, S.G.; HUNTER, S.A.; STONE, M.R.; GOOKIN, J.L. Assessment of reproductive tract disease in cats at risk for *Tritrichomonas foetus* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 76–81, 2010.
- GRELLET, A.; POLACK, B.; FEUGIERA, A.; BOUCRAUT-BARALON, C.; GRANDJEAN, D.; VANDEWYNCKELD, L.; CIAND, A.; MELONID, D.; VISCOGLIOSIDA ROYAL, E. Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 418– 426, 2013.
- GUILFORD, W.G.; STROMBECK, D.R. Gastrointestinal tract infections, parasites, and toxicoses. In: STROMBECK, D.R. (ed.) **Strombeck's small animal gastroenterology**, Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1996. 427p.
- GUNN-MOORE, D.; MCCANN, T. M.; REED, N.; SIMPSON, K. E.; TENNANT, B. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in the UK. **Journal of Feline Medicine and Surgery** , v. 9, p. 214- 218, 2007.
- HALE, S., NORRIS, J.M., ŠLAPETA, J.; Prolonged resilience of *Tritrichomonas foetus* in cat faeces at ambient temperature. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 60–65. 2009.
- HAYES, D.C.; ANDERSON, R.R.; WALKER, R.L. Identification of Trichomonadid Protozoa from the Bovine Preputial Cavity by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 390-394, 2003.
- HEGNER, R.; ESKRIDGE, L. Absence Of Pathogenicity In Cats Infected With *Trichomonas felis* From Cats And *Trichomonas hominis* From Man. **American Journal of Epidemiology**, v. 22, p. 322-325, 1935.
- HIBLER, C.H.; HAMMOND, D.M.; CASKEY, F.H.; JOHNSON, A.E.; FITZGERALD, P.R. The morphology and incidence of he trichomonads of swine, *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond), *Tritrichomonas rotunda*, n. sp. and *Trichomonas buttreyi*, n.sp. **Journal of Protozoology**, v.7, p. 159-171, 1960.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, p. 411- 453, 1991.
- 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 and Surgery**, v. 11, p. 131–134, 2009.

- HONIGBERG, B. M.; MATTERN, C.F. T., WENDELL A. D.; Structure of *Pentatrichomonas hominis* (Davaine) as Revealed by Electron Microscopy. **Journal of Protozoology**, v. 15, p. 419-430, 1968.
- HONIGBERG, B.M.; BENNETT, C.J. Light microscopic observations on structure and division of *Histomonas meleagridis* (Smith). **Journal of Protozoology**, v. 18, p. 687-697, 1971.
- HONIGBERG, M.B. Introduction. In: HONIGBERG, B.M. (Org). **Trichomonads of Veterinary Importance in Parasitic Protozoa.**, New York: Academic Press. p.164-273. 1978
- HONIGBERG, B.M. Trichomonad found outside the urogenital tract of humans. In: HONIGBERG, B.M. **Trichomonads Parasitic in Humans**. New York: Springer-Verlag., p. 342-393, 1990.
- HONIGBERG, M.B.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B.M. **Trichomonads parasitic in humans**. New York: Springer-Verlag. 1990. p. 5-35.
- JONGWUTIWES, S.; SILACHAMROON, U.; PUTAPORNTIP, C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 185–186, 2000.
- KAMARUDDIN, M.; TOKORO, M.; RAHMAN, M. M. D.; ARAYAMA, S.; ANGGI, P.N. H.; SYAFRUDDIN, D.; ASIH, P.B.S.; YOSHIKAWA, H., KAWAHARA, E. Molecular Characterization of Various Trichomonad Species Isolated from Humans and Related Mammals in Indonesia. *Korean Journal of Parasitology*, v. 52, p. 471-478, 2014.
- KENNETT, M.J.; HOOK JR. R.R.; *Tritrichomonas foetus*: characterization of isolates and partial purification of a secreted cytotoxin. **Experimental Parasitology**, v. 102, p. 1–8, 2002.
- KESSEL, J.F.; Trichomoniasis in kittens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, n. 1, 1928.
- KLEINA, P.; BETTIM-BANDINELLI, J.; BONATTO, S. L.; BENCHIMOL, M.; BOGO, M. R.; Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 963–970, 2004.
- KIM, Y.-A.; KIM, H.-Y.; CHO, S.-H.; CHEUN, H.-IL.; YU, J.-R.; LEE, S.-E. PCR Detection and Molecular Characterization of *Pentatrichomonas hominis* from Feces of Dogs with Diarrhea in the Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**. v. 48, p. 9-13, 2010.

- KIRBY, H. *Gigantomonas herculean* Dogiel, a polymastigote flagellate with flagellated and amoeboid phases of development. **University of California Publication in Zoology**, v.53, p. 163-226, 1946.
- KIRBY, H; Observations on the trichomonad flagellate of the reproductive organs of cattle. **Journal of Parasitology**, v. 37, p. 445-449, 1951.
- KINGSBURY, D.D., MARKS, S.L., CAVE, N.J., GRAHN, R.A.; Identification of *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* spp. infection in pedigree show cats in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, p. 6–10, 2010.
- KUEHNER, KA, MARKS, SL, KASS, P.H , SAUTER-LOUIS, C., GRAHN, R A, BARUTZKI D., HARTMANN, K. *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: Prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 251-258, 2011.
- KULDA, J., NOHYNKOVA', E., LUDVIK, J.; Basic structure and function of the trichomonad cell. **Acta Universitatis Carolinae. Medica. Monographia Journal** v. 30, p. 181–198, 1987.
- KUTISOVA, K.; KULDA, J.; CEPICKA; FLEGR, J.; KOUDELA, B.; TERAS, J.; TACHEZY, J. Tetratrachomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. **Parasitology**, v. 131, p. 1–11, 2005.
- LAGA, M.; ALARY, M.; NZILA, N. Condom promotion, sexually transmitted disease treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex workers. **Lancet**, n.8, p. 344-246, 1994.
- LAWSON, B.; CUNNINGHAM, A.A.; CHANTREY, J.; HUGHES, L.A.; JOHN, S.K.; BUNBURY, N., BELL, D.J., TYLER, K.M. A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiological agent of an emerging avian epidemic disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11 1638–1645, 2011.
- LAZENBY, G.B.; UNAL, E.R.; ANDREWS, A.L.; SIMPSON, K. Cost-effectiveness analysis of annual *Trichomonas vaginalis* screening and treatment in HIV-positive women to prevent HIV transmission. **Sexually Transmission Diseases**, v. 41, p. 353-8, 2014.

- LEVY, M.G.; GOOKIN, J.L.; POORE, M.; BIRKENHEUER, A.J.; DYKSTRA, M.J.; LITAKER, R.W. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 99–104,
- LI, W.; LI W. GONG, P.; MENGA, Y.; LI W.; ZHANGA, C.; LI, S.; YANGA, J.; LI, H.; ZHANGA, X.; LI, J. Molecular and morphologic identification of *Pentatrichomonas hominis* in swine. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 241–247, 2014.
- LI, W.-C.; GONG, P.-T.; YING, M.; LI, J.-H.; YANG, J.; LI, H.; YANG, Z.-T.; ZHANG, G.-C.; ZHANG, X.-C. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in China. **Parasitology Research**, v. 113, p. 1795–1801, 2014.
- LIM, S.; PARK, S.-I.; AHN, K.-S.; OH, D.-S.; RYU, J.-S.; SHIN, S.-S.; First Report of Feline Intestinal Trichomoniasis Caused by *Tritrichomonas foetus* in Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 48, p. 247-251, 2010.
- LIPMAN, N.S.; LAMPEN, N.; NGUYEN, H.T. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. **Laboratory Animal Science**, v. 49, p. 313–315, 1999.
- LUN, Z.-R., CHEN, X.-G., ZHU, X.-Q., LI, X.-R., XIE, M.-Q. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 122-125, 2005.
- LUN, Z.-R.; GAJADHAR, A.A.; A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 471–474, 1999.
- MANCIANTI , F.; NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; ZAMBERNARDI, L.; GUERRINI, A.; GAZZOLA, V.; PAPINI, R.A.; A retrospective molecular study of select intestinal protozoa in healthy pet cats from Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, p. 163–167, 2015.
- MANTINI, C., SOUPPART, L.; NOËL, C.; DUONG, T.H.; MORNET, M.; CARROGER, G.; DUPONT, P.; MASSERET, E.; GOUSTILLE, J.; CAPRON, M.; DUBOUCHER, C.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI, E. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2336–2339, 2009.
- MARDELL, E. J.; SPARKES, A. H.; Chronic diarrhoea associated with *Tritrichomonas foetus* infection in a British cat. **Veterinary Record**, n. 158, p. 765-766, 2006.

- MARIANTE, R.M. ; COUTINHO, L.L. ; BENCHIMOL, M. . *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. **Parasitology Research** v. 92, p. 303-312, 2004.
- MARITZ, J.M.; LAND, K.M.; CARLTON, J.M.; HIRT, R.P. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health ? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 7, 2014.
- MELONI, D.; MANTINI, C.; GOUSTILLE, J.; DESOUBEAUX, G.; MAAKAROUN-VERMESSE, Z.; CHANDENIER, J.; GANTOIS, N.; DUBOUCHER, C.; FIORI, P.L.; DEI-CAS, E.; DUONG, T.H.; VISCOGLIOSI, E. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in two patients with gastrointestinal symptoms. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, p. 933–935, 2011.
- MIDLEJ, V.; VILELA; DIAS, A.B.; BENCHIMOL, M.; Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 216-230, 2009.
- MIDLEJ, V.; PEREIRA-NEVES, A.; BOGO, M.R.; KIST, L.W BENCHIMOL, M.; Ultrastructural features of *Tritrichomonas mobilensis* and comparison with *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 171–180, 2011.
- MIRÓ, G.; HERNÁNDEZ, L.; MONTOYA, A.; ARRANZ-SOLÍS, D.; DADO, D.; ROJO-MONTEJO, L.; MENDOZA-IBARRA, J.A.; ORTEGA-MORA, L.M.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; First description of naturally acquired *Tritrichomonas foetus* infection in a Persian cattery in Spain. *Parasitology Research*, v. 109, p. 1151–1154, 2011.
- MULLER, M.; The hydrogenosome. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2879–2889, 1993.
- MORGAN, B.B. **Bovine trichomoniasis**. A monograph on *Trichomonas foetus*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1944. Cap. I. p. 4-5,
- MOSTEGL, M.M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; DINHOPL, N.; KULDA, J.; LIEBHART, D.; HESS, M.; WEISSENBOCK, H. Design and validation of an oligonucleotide probe for the detection of protozoa from the order Trichomonadida using chromogenic in situ hybridization. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 1–6, 2010.
- MOSTEGL, M.M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; DINHOPL, N.; MOSTEGL, M.M.; WETSCHER, A.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; DINHOPL, N.; WEISSENBOCK, H. Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 209-214, 2012.

- OKAMOTO, S.; WAKUI, M.; KOBAYASHI, H.; SATO, N.; ISHIDA, A.; TANABE, M.; TAKEUCHI, T.; FUKUSHIMA, S.; YAMADA, T.; IKEDA, Y. *Trichomonas foetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 21, p. 89–91, 1998.
- OYHENART, J, MARTÍNEZ, F., RAMÍREZ, R., FORT, M., BRECCIA, J.D. Loop mediated isothermal amplification of 5.8S rDNA for specific detection of *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 59-65, 2013.
- PAPICH, M.G.; LEVINE, D.N.; GOOKIN, J.L.; DAVIDSON, G.S.; STAGNER, W. C.; HAYES, R. B.; Ronidazole pharmacokinetics in cats following delivery of a delayed release guar gum formulation. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 399-407, 2013.
- PARIS, JK, WILLS, S, BALZER, H-, SHAW, DJ, GUNN-MOORE, DA ; Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 2-11, 2014.
- PELLEGRIN, A.O.; LEITE, R.C; Atualização Sobre Tricomonose Genital Bovina. **Embrapa Pantanal, Documento 51, p. 14, Corumbá: Embrapa Pantanal 18p. , 2003.**
- PEREIRA-NEVES, A.; RIBEIRO, K.C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. **Protist**, v. 154, p. 313–329, 2003.
- PEREIRA- NEVES, A.; BENCHIMOL, M.; *Tritrichomonas foetus*: Budding from Multinucleated Pseudocysts. **Protist**, v. 160, p. 536-551, 2009.
- PEREIRA-NEVES, A.; CAMPERO, C.M.; MARTINEZ, A.; BENCHIMOL, M. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 1–8, 2011.
- PROFIZI. C.; CIAN, A.; MELONI, D.; HUGONNARD, M.; LAMBERT, V.; GROUD, K.; GAGNON, A.C.; VISCOGLIOSI, E.; ZENNER, L. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 50–55, 2013.
- QUEEN, E.V.; MARKSS. L.; FARVER, T.B.J. Prevalence of Selected Bacterial and Parasitic Agents in Feces from Diarrheic and Healthy Control Cats from Northern California. **Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 54–60, 2012.
- QUEIROZ, R.C.B., SILVA SANTOS, L.M., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W., Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 77, p. 561–566, 1991.

- REINMANN, K.; MÜLLER, N.; KUHNERT, P.; CAMPERO, C.M.; LEITSCHD, D.; HESS, M.; HENNING, K.; FORT, M.; MÜLLER, J.; GOTTSTEIN, B.; FREY, C.F. *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 138–144, 2012.
- RIEDMULLER, L.; Ueber die Morphologie, Uebertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rindes vorkommenden Trichomonaden. **Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A**, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie, v. 108, p. 103–118, 1928.
- RIBEIRO, K.C.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; BENCHIMOL, M. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.47, p. 481-492, 2000.
- RIBEIRO, K.C.; MARIANTE, R.M.; COUTINHO, L.L.; BENCHIMOL, M. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. **Biology of the Cell**, v. 94, p. 289-301, 2002.
- ROMATOWSKI J.; An uncommon protozoan parasite (*Pentatrichomonas hominis*) associated with colitis in three cats. *Feline Practice Journal*, v. 24, p. 10–14, 1996.
- ROMATOWSKI, J. *Pentatrichomonas hominis* infection in four kittens. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 216, p. 1270–1272, 2000.
- ROSYPAL, A.C.; RIPLEY, A.; WALDEN, H.D.S.; BLAGBURN, B.L.; GRANTE, D.C.; LINDSAY, D.S. Survival of a feline isolate of *Tritrichomonas foetus* in water, cat urine, cat food and cat litter. **Veterinary Parasitology**, v.185, p. 279–281, 2012.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350–1354, 1985.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- SÁNCHEZ, R.O.; BOERO, C.A. Presencia de trichomonadidos y otros protozoos no patógenos durante 5 años de diagnóstico de trichomoniasis **Veterinaria Argentina**, v. 30, p. 303, 2013.
- ŠLAPETA, J., CRAIG, S., MCDONELL, D., EMERY, D. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 209–213, 2010.
- ŠLAPETA, J.; MÜLLER, NORBERT.; STACK, C. M.; WALKER, G.; LEW-TABOR, A.; TACHEZY, J.; FREY, C. Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller,

- 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 1143-1149, 2012.
- SORVILLO, F. SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 927-32, 2001.
- STAUFFER, S.H.; BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G., MARR, H.; GOOKIN, J. L.; Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 13–17, 2008.
- STOCKDALE, H.D., GIVENS, M.D., DYKSTRA, C.C., BLAGBURN, B.L. *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. **Veterinary Parasitology**. 160, 13–17, 2009.
- SUN, Z.; STACK, C.; SLAPETA, J.; Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Tritrichomonas foetus* parasites of cats and cattle. **Veterinary Parasitology**, v.186, p. 445-449, 2011.
- TACHEZY, J.; TACHEZY, R.; HAMPL, V.; SEDINOVA, M.; VANACOVA, S.; VRLÍK, M.; RANST, M.V.; FLEGR, J.; KULDA, J. Cattle Pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and Pig Commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the Same Species. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 154–163, 2002.
- TASCA, T.; DE CARLI, G.A.; GLOCK, L.; JECKEL-NETO, E.A. Morphologic Aspects of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from opossums *Didelphis marsupialis* and *Lutreolina crassicaudata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 265-271, 2001.
- TOLBERT, M.K.; LEUTENEGGER, C.M.; LOBETTI, R., BIRRELL, J., GOOKIN, J.L. Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 319– 322, 2012.
- TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; Possinger, K.; GÖBEL, U. Identification of Clinically Relevant Yeasts by PCR-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 201-211, 2004.
- TYSNES, K.; GJERDE, B.; NØDTVEDT, A.; SKANCKE, E.; A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.53, p. 39-45, 2011.

- VAN DER SAAG, M.; McDONELL, D.; SLAPETA, J. Cat genotype *Tritrichomonas foetus* survives passage through the alimentary tract of two common slug species **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 262–266, 2011.
- VAN DOORN DC, DE BRUIN MJ, JORRITSMA RA, PLOEGER HW, SCHOORMANS A. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* among Dutch cats. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, v. 134, p. 698–700, 2009.
- VILELA, R.C.; BENCHIMOL, M. Interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with keratin: an important role in parasite infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 701-704, 2011.
- WANTLAND, W.W. Trichomonads in the golden hamster. **Transactions of the Illinois Academic of Science**, v. 48, p. 197–201, 1956.
- WALDEN, H. S.; DYKSTRA, C.; DILLON, A.; RODNING, S.; GIVENS, D.; BIRD, R.; NEWTON, J.; LINDSAY, D.; A new species of *Tritrichomonas* (Sarcomastigophora: Trichomonida) from the domestic cat (*Felis catus*) **Parasitology Research**, v. 112, p. 2227–2235, 2013.
- WEISSENBOCK, H. Investigations on the prevalence and potential pathogenicity of intestinal trichomonads in pigs using in situ hybridization. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 58–63, 2011.
- WEN-CHAO, L.; PENG-TAO, G.; MENG Y.; JIAN-HUA, L.; JU, Y.; HE, LI.; ZHENG-TAO, Y.; GUO-CAI, Z.; XI-CHEN, Z. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in china. **Parasitology Resesarch**, v. 113, p. 1795–1801, 2014.
- WENRICH, D.H. Morphological studies on the trichomonad flagellates of man. *Archivos de la Sociedad de Biologia de Montevideo Suppl. Actas Congresso Internacionale de Biologia. Montevideo, n. 5*, p. 1185-1199, 1931.
- WENRICH, D.H. Morphology of the intestinal trichomonad flagellates in man and similar forms in monkeys, cats, dogs, and rats. **Journal of morphology**, v. 74, p. 189-211, 1944.
- WENRICH, D.H. The species of *Trichomonas* in man. **Journal of parasitology**, v. 33, p. 177-188, 1947.
- WENRICH, D.H.; EMMERSON, M.A. Studies on the morphology of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller) (Protozoa, Fagellata) from American cows. **Journal of Morphology**, v. 55, p. 193-205. 1933.

- WEN-CHAO, L.; PENG-TAO, G.; MENG Y.; JIAN-HUA, L.; JU, Y.; HE, LI.; ZHENG-TAO, Y.; GUO-CAI, Z.; XI-CHEN, Z. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in china. **Parasitology Resesarch**, v. 113, p. 1795–1801, 2014.
- WHO. Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections 2008. Geneva: **World Health Organization**; 2012.
- XENOULIS, P.G.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; READ, S.A.; SUCHODOLSKI, J.S.S.; STEINER, J.M. Detection of *Tritrichomonas foetus* in cats in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p. 831-833, 2010.
- YAEGER, M.J.; GOOKIN, J.L. Histologic Features Associated with *Tritrichomonas foetus*-induced Colitis in Domestic Cats. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 797–804, 2005.
- YAO, C., KÖSTER, L.S. *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. **Veterinary Research**, v. 46, p. 35-50, 2015.
- ZALONIS, C.A.; PILLAY, A.; SECOR, W.; HUMBURG, B.; ABER, R. Rare Case of Trichomonal Peritonitis. **Emerging Infectious Diseases**, CDC letter, v. 17, n. 7, 2011.
- ZHANG, Z.F.; GRAHAM, S.; YU. S.Z.; MARSHALL, J.; ZIELEZNY, M., CHEN, Y.X.; SUN, M.; TANG, S.L., LIAO, C.S., XU, J.L. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. **Annals of Epidemiology**. v.5, p. 325-32, 1995.
- ZUO, Y.; RILEY, D.E.; KRIEGER, J.N.; Flagellar duplication and migration during the *Trichomonas vaginalis* cell cycle. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 203–207, 1999.

9 ANEXOS

Anexo 1 Protocolo Comissão de Ética-PRPPG/UFRRJ



Seropédica 24 de junho de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

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



Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV



Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

Anexo 2 MEIOS DE CULTURA

2.1 Meio de HANK'S

FÓRMULA	1000ml
NaCl	8 g
KCl	0,4g
MgSO ₄	0,2 g
NaH ₂ PO ₄	0,12g
K ₂ HPO ₄	0,06g
dextrose	1g
CaCl ₂	0,14g
Extrato de levedura	0,1g
Hidrolisado de lactoalbumina	5g
NaHCO ₃	0,35g
Vermelho de fenol 1%	2,5 ml
Penicilina	500,000 UI
Estreptomicina	1,2 ml
Fungizon	0,0025g
água destilada	900 ml
Soro bovino inativado	100 ml

2.2 Caldo peptonado

FÓRMULA	1000ml
Peptona de caseína	10g
NaCl	3g
NaH ₂ PO ₄	2g
Extrato de carne	3g
dextrose	2,5g

Ácido ascórbico	0,02g
Água destilada	900 ml
Soro bovino inativado	100ml
Penicilina	500,000 UI
Estreptomicina	1mg

Anexo 3 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO DE PARABASALÍDEOS EM GATOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME DO ANIMAL _____

PROPRIETÁRIO _____

ENDEREÇO _____

IDADE _____

SEXO F () FC () M () MC ()

RAÇA _____

DADOS SOBRE HÁBITOS E AMBIENTE ONDE ANIMAL VIVE

MORA EM CASA OU CASA () APT ()

APARTAMENTO? _____

POSSUI OUTROS GATOS EM CASA ? SIM () NÃO ()

QUANTOS? _____

LOCAL DE DEFECACÃO CAIXA DE AREIA () JARDIM ()

NÚMERO DE CAIXAS DE AREIA EM CASA _____

HAVENDO MAIS DE UM GATO EM CASA, ELAS DEFECAM NO MESMO LOCAL (MESMA CAIXA DE AREIA) ? SIM () NAO ()

POSSUI ANIMAIS DE OUTRAS ESPÉCIES EM CASA SIM () NAO ()

QUAIS E QUANTOS ? _____

O GATO TEM ACESSO À RUA? SIM () NAO ()

O ANIMAL TEM CONTATO COM BOVINOS OU SUÍNOS ? SIM () NAO ()

TIPO DE ALIMENTAÇÃO? RAÇÃO SECA () RAÇÃO ÚMIDA () COMIDA CASEIRA ()

FONTE DE ÁGUA TORNEIRA () MINERAL () VASO SANITÁRIO/CHUVEIRO ()

FILTRADA () OUTRAS ()

HISTÓRICO CLÍNICO

ANIMAL É TESTADO PARA FIV/FELV SIM () NAO ()
FIV POSITIVO () FELV POSITIVO () FIV NEGATIVO () FELV NEGATIVO ()
ANIMAL APRESENTA ALGUMA DOENÇA CRONICA SIM () NAO ()
EM CASO AFIRMATIVO, QUAL _____
(IS)?
FAZ USO DE ALGUMA _____
MEDICAÇÃO?
EM CASO AFIRMATIVO, QUAL (IS)? _____
É VERMIFUGADO? SIM () NAO ()

CONSISTENCIA DAS FEZES NO MOMENTO

1- () FEZES COM FORMATO, DURAS E RESSECADAS



2- () FEZES COM FORMATO, MACIAS E ÚMIDAS



3- () FEZES COM FORMATO E PASTOSAS



4- () FEZES SEM FORMATO E PASTOSAS

5- () FEZES COM CONSISTENCIA LÍQUIDA (DIARREICAS)



PRESENÇA DE SANGUE NAS FEZES ?	SIM ()	NAO ()
ANIMAL APRESENTOU DIARRÉIA NOS ÚLTIMOS 6 MESES ?	SIM ()	NAO ()
EM CASO AFIRMATIVO, QUAL A CONSISTENCIA (ESCORE ACIMA)	_____	
RECEBEU ALGUM TRATAMENTO ?	SIM ()	NAO ()
EM CASO AFIRMATIVO, QUAL MEDICAÇÃO FOI UTILIZADA?	_____	
A DIARREIA DESAPARECEU APÓS O TRATAMENTO ?	SIM ()	NAO ()
O ANIMAL TEVE DIARREIA NOVAMENTE APÓS O TRATAMENTO ?	SIM ()	NAO ()
O ANIMAL TEM CONTATO COM ALGUM OUTRO GATO QUE TEVE DIARREIA NOS ÚLTIMOS 6 MESES	SIM ()	NAO ()
O GATO FEZ EXAME DE FEZES RECENTEMENTE?	SIM ()	NAO ()
QUAL FOI O RESULTADO?	_____	

FEZ USO DE ALGUM ANTIBIÓTICO RECENTEMENTE?	SIM ()	NAO ()
QUAL ANTIBIÓTICO?	_____	

Anexo 4 DOS SANTOS, C.S., DE JESUS, V.L.T., MCINTOSH, D.; BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G; Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 980-988, 2015.

Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats¹

Caroline Spitz dos Santos^{2*}, Vera Lúcia Teixeira de Jesus³, Douglas McIntosh⁴,
Bruno Pereira Berto⁵ and Carlos Wilson Gomes Lopes⁴

ABSTRACT. Dos Santos C.S., De Jesus V.L.T., McIntosh D., Berto B.P. & Lopes C.W.G. 2015. Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(12):980-988. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Anexo 1, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus de Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil. E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

Tritrichomonas foetus, a parasite well known for its significance as a venereally transmitted pathogen in cattle, has been identified as a cause of chronic large bowel diarrhea in domestic cats in many countries of the world. In Brazil, several studies on the diagnosis of bovine trichomoniasis have been performed, but until now, no study was made regarding feline trichomoniasis. Thus, this is the first study to report the occurrence of *T. foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in cats using morphological and molecular analysis. Feces from 77 cats were examined, four of which (5.2%) were positive for the presence of parabasalids. Morphological analysis of stained smears revealed pear-shaped trophozoites showing the three anterior flagella, elongated nucleus and axostyle ending abruptly in fillet, characteristic of *T. foetus*. In scanning and transmission electron microscopy, identification characters similar to those previously reported for *T. foetus* were observed. The cultures containing trophozoites were submitted for molecular analysis, which resulted positive for *T. foetus* DNA using specific primers (TFR3 and TFR4), and all samples were positive and subjected to sequencing in which they showed 99.7-100% similarity with another isolate sequencing of *T. foetus* (JX960422). Although no trophozoite with consistent morphology of *P. hominis* has been visualized in the samples, differential diagnosis was performed using specific primers for *P. hominis* (TH3 and TH5) amplicon. In three of the four samples (3.89%) sequencing revealed 100% similarity when compared with another sequence of *P. hominis* deposited in Genbank (KC623939). Therefore, the present study revealed through the diagnostic techniques employed the simultaneous infection by *T. foetus* and *P. hominis* in the feces of cats. However, it was necessary to use more than one technique for the diagnosis of the co-infection. These results demonstrate the importance of a correct diagnosis to allow an appropriate treatment by the veterinarian.

INDEX TERMS: Co-infection, *Tritrichomonas foetus*, *Pentatrichomonas hominis*, domestic cats.

¹ Received on May 20, 2015.

Accepted for publication on November 5, 2015.

² Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Anexo 1, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil. *Corresponding author: carolinespitz@yahoo.com.br

³ Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: jesus@ufrj.br

⁴ Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: par972@yahoo.co.uk, lopescw@ufrj.br

⁵ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: berto.ufrj@gmail.com

RESUMO. [Co-infecção por *Tritrichomonas foetus* e *Pentatrichomonas hominis* em gatos assintomáticos.] *Tritrichomonas foetus*, um parasito bem conhecido por seu significado como um agente patogênico transmitido venereamente em bovinos, também foi identificado como causa de diarréia crônica do intestino grosso em gatos domésticos em muitos países. No Brasil, vários estudos sobre o diagnóstico de tricomonose bovina foram realizados, mas até agora, não há informação disponível em relação à tricomonose felina. Assim, este é o primeiro estudo a relatar a ocorrência

Anexo 5 DOS SANTOS, C.S., BERTO, B. P., LOPES, B. do B., CORDEIRO, M.D., DA FONSECA, A.H., TEIXEIRA FILHO, W.L, LOPES, C.W.G. Coccidial dispersion across New World marsupials: *Klossiella tejerai* Scorza, Torrealba & Dagert, 1957 (Apicomplexa: Adeleorina) from the Brazilian common opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied) (Mammalia: Didelphimorphia). *Systematic Parasitology*, v. 89, p. 83–89, 2014.

Coccidial dispersion across New World marsupials: *Klossiella tejeraei* Scorza, Torrealba & Dagert, 1957 (Apicomplexa: Adeleorina) from the Brazilian common opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied) (Mammalia: Didelphimorphia)

Caroline Spitz dos Santos · Bruno Pereira Berto · Bruno de Bonfim Lopes ·
Mathias Dias Cordeiro · Adivaldo Henrique da Fonseca · Walter Leira Telesira Filho ·
Carlos Wilson Gomes Lopes

Received: 11 June 2014 / Accepted: 14 July 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract *Klossiella tejeraei* Scorza, Torrealba & Dagert, 1957 is a primitive coccidian parasite reported from the New World marsupials *Didelphis marsupialis* (Linnaeus) and *Marmosa demerarae* (Thomas). The current work describes *K. tejeraei* from the Brazilian common opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied) in Southern Brazil, evidencing the coccidial dispersion across opossums of the same family. The sporocysts

recovered from urine samples were ellipsoidal, $20.4 \times 12.7 \mu\text{m}$, with sporocyst residuum composed of scattered spherules and c.13 sporozoites per sporocyst, with refractile bodies and nucleus. Macrogametes, microgametes, sporozoites, sporoblasts/sporocysts were identified within parasitophorous vacuoles of epithelial cells located near the renal corticomedullary junction. *Didelphis marsupialis* should not have transmitted *K. tejeraei* to *D. aurita* because they are not sympatric; however *M. demerarae* is sympatric with *D. marsupialis* and *D. aurita*. Therefore, *D. aurita* becomes the third host species for *K. tejeraei* in South America.

C. S. dos Santos · M. D. Cordeiro
Curso de Pós-Graduação em Clínica Veterinária,
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ),
BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

B. P. Berto (✉)
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia,
UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil
e-mail: bertobp@ufrrj.br

B. de Bonfim Lopes
Programa de Pós-graduação em Clínica, Tecnologia e
Inovação em Agropecuária, UFRRJ, BR-465 km 7,
23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

A. H. da Fonseca
Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública,
Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7,
23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

W. L. T. Filho · C. W. G. Lopes
Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de
Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7,
23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

Introduction

Opossums in the New World represent 99 different species. The vast majority of these (95 species, 96%) inhabit South America. *Didelphis* spp. are common in South America; however, one of the six species, *Didelphis virginiana* (Kerr) has distribution in North and Central America (IUCN, 2014).

Didelphis spp. became epidemiologically relevant in the New World when they were identified as definitive hosts for some coccidian parasites of the genus *Sarcocystis* Lankester, 1882. Among these *Sarcocystis* spp., *Sarcocystis neurona* Dubey, Davis, Speer, Bowman, Lahunta, Graustrom, Topper, Hamir, Cummings & Suter, 1991 is recognized as the



Anexo 6. CARRASCO, L.P.S.; dos SANTOS, C.S.; SOUZA, H.J.M.; de JESUS, V.L.T.; GIZZI, A.B.R. *Tritrichomonas foetus* como agente etiológico de diarreia em gatos- relato de dois casos. **Clínica Veterinária**, v. 113, p. 34-41, 2014.

***Tritrichomonas foetus* como agente etiológico de diarreia em gatos – relato de dois casos**

Tritrichomonas foetus as a causative agent of diarrhea in cats – report of two cases

Tritrichomonas foetus como agente causal de diarreia em gatos – relato de dos casos

Clínica Veterinária, Ano XIX, n. 113, p. 34-41, 2014

Lara Patrícia Santos Carrasco
MV, aluna de mestrado
CPGMV/UFRRJ
carrasco.lara@gmail.com

Caroline Spitz dos Santos
MV, mestre, aluna de doutorado
CPGCV/UFRRJ
carolinespitz@yahoo.com.br

Helôisa Justen Moreira de Souza
MV, dra., profa.
UFRRJ
justen@centroin.com.br

Vera Lúcia Teixeira de Jesus
MV, dra., profa.
UFRRJ
jesus@ufrj.br

Aline Baumann da Rocha Gizzi
MV, mestre, profa.
FEPAR, Labsan
alinegizzi@labsan.com.br

Resumo: O *Tritrichomonas foetus* é um importante patógeno que causa diarreia crônica do intestino grosso em gatos. Até a realização do presente estudo ainda não havia relatos dessa enfermidade no Brasil detectada pelo uso de técnicas de diagnóstico por meio de biologia molecular (PCR). Os sinais clínicos mais importantes da infecção são fezes pouco volumosas com presença de muco, hematoquezia, tenesmos e aumento da frequência do ato de defecar – sintomas esses característicos de diarreia do intestino grosso. O presente trabalho tem como objetivo relatar a presença do DNA do protozoário *Tritrichomonas foetus* em fezes de gatos com histórico de diarreia crônica atendidos no Setor de Medicina Felina do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR).
Unitermos: felinos, tricomoníase, qPCR

Abstract: *Tritrichomonas foetus* is an important pathogen that causes chronic diarrhea of the large intestine in cats. Until the completion of this study there were no reports of this disease in Brazil employing molecular biology (PCR) as a diagnostic technique. The most important clinical signs of infection are skinny stools with mucus, hematochezia, tenesmus and increased frequency of the act of defecation. These are characteristic symptoms of diarrhea of the large intestine. This paper aims to report the detection by real-time PCR (qPCR) of DNA of the protozoan *Tritrichomonas foetus* in feces of cats with a history of chronic diarrhea, which were seen at the Feline Medicine's Small Animal Veterinary Hospital of the Federal Rural University of Rio de Janeiro.
Keywords: felines, trichomoniasis, qPCR

Resumen: La *Tritrichomonas foetus* es un importante patógeno que causa diarreia crónica originada en el intestino grueso de los gatos. Hasta la finalización del presente trabajo todavía no había relatos del diagnóstico de esta enfermedad en Brasil a través de la utilización de técnicas de diagnóstico donde se utiliza biología molecular (PCR). Los signos clínicos más importantes de esta infección son la presencia de materia fecal de poco volumen, presencia de moco, hematoquezia, tenesmo y aumento de frecuencia en las deposiciones, todos síntomas característicos de las diarreas de intestino grueso. El presente trabajo tuvo como objetivo relatar la presencia de ADN del protozoario *Tritrichomonas foetus* en la materia fecal de gatos con historia de diarreia crónica, que fueron atendidos en el Sector de Medicina Felina del Hospital Veterinario de Pequeños Animales de la Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, a través de la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).
Palabras clave: felinos, tricomoniasis, qPCR

Anexo 7. DOS SANTOS, C.S.; BERTO, B.P.; DE JESUS, V.L.T.; LOPES, C.W.G. *Eimeria leuckarti* Flesch, 1883 (Apicomplexa: Eimeriidae) from horse foals in Rio de Janeiro. *Coccidia*, v. 2, p. 40-44, 2014.

Eimeria leuckarti Flesch, 1883 (Apicomplexa: Eimeriidae) from horse foals in Rio de Janeiro

Caroline Spitz dos Santos | Bruno Pereira Berto | Vera Lúcia Teixeira de Jesus | Carlos Wilson Gomes Lopes

Submitted in 06.02.2014

Accepted in 15.03.2014

Abstract Santos CS, Berto BP, Jesus VLT, Lopes CWG. 2014. *Eimeria leuckarti* Flesch, 1883 (Apicomplexa: Eimeriidae) from horse foals in Rio de Janeiro [*Eimeria leuckarti* Flesch, 1883 (Apicomplexa: Eimeriidae) de potros no Rio de Janeiro] *Coccidia* 2, 40-44. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

Eimeria leuckarti Flesch, 1883 is a cosmopolitan coccidium of equines. It has oocysts quite distinct from other coccidia, due to the larger size, very thick outer wall and considerably longer period of sporulation. The current work reports *E. leuckarti* from horse foals of a farm in Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil and makes some notes on the sporulation process, apart from the unsporulated oocyst morphology. Ten of the 57 fecal samples of the horse foals had unsporulated oocysts of *E. leuckarti*, which were recovered by sedimentation and flotation. Noteworthy in the morphological study the identification of an enlarged region in the inner layer of the oocyst wall, always in the opposite end of the micropyle. Finally, the oocysts do not sporulate, even when kept in Petri dishes or in bottles under aeration. Comments and an assumption was introduced in this sense.

Keywords coccidia, morphology, unsporulated oocysts, oocyst wall, sporogony, equines.

Resumo *Eimeria leuckarti* Flesch, 1883 é um coccídio cosmopolita de eqüinos. Tem oocistos muito distintos dos outros coccídios, devido ao maior tamanho, camada externa da parede do oocisto muito espessa e longo período de esporulação. O presente

trabalho relata *E. leuckarti* de potros de uma fazenda em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil e faz algumas anotações sobre o processo de esporulação, além da morfologia do oocisto esporulado. Dez de 57 amostras fecais de potros, possuíam oocistos não esporulados de *E. leuckarti*, os quais foram recuperados por sedimentação e flutuação. Destaca-se no estudo morfológico a observação de uma região dilatada na camada interna da parede do oocisto, sempre na extremidade oposta da micrópila. Finalmente, os oocistos não esporularam, mesmo quando mantidos em placas de Petri, ou em garrafas sob arejamento. Comentários e uma suposição foi introduzida neste sentido.

Palavras-chave coccidia, morfologia, oocistos esporulados, parede do oocisto, esporogonia,

CS Santos ✉

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

BP Berto

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970, Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: bertobp@ufrj.br

VLT Jesus

Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970, Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: jesus@ufrj.br

CWG Lopes

Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970, Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: lopescwg@ufrj.br

Anexo 8 BALTHAZAR, L.M.C.; LOPES, B. do B.; BERTO, B.P.; **dos SANTOS, C.S.**;
TEIXEIRA FILHO, W.L.; NEVES, D.M.; LOPES, C.W.G. Coccidiosis in a blue-fronted
Amazon parrot (*Amazona aestiva*) under quarantine - Case report. **Revista Brasileira de
Medicina Veterinária**, v. 34, p. 392-399, 2013.

COCCIDIOSIS IN A BLUE-FRONTED AMAZON PARROT (*Amazona aestiva*)
UNDER QUARANTINE - CASE REPORT*

Lianna Maria de Carvalho Balthazar^{1†}, Bruno do Bomfim Lopes², Bruno Pereira Berto³, Caroline Spitz dos Santos¹, Walter Leira Teixeira Filho⁴, Daniel Medeiros Neves⁵ e Carlos Wilson GomesLopes⁶

ABSTRACT. Balthazar L.M. de C., Lopes B. do B., Berto B.P., dos Santos C.S., Teixeira Filho W.L. Neves D.M. & Lopes C.W.G. Coccidiosis in a Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*) under quarantine - Case report. [Coccidiose em um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) mantido em confinamento - Relato de caso]. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(4):392-396, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, BR 465 Km7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: liannavet@yahoo.com.br

An adult male blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*), was kept under quarantine in CETAS/IBAMA Seropédica, RJ, Brazil. Clinical signs consisted of apathy, anorexia, weight loss, ruffled and dull feathers and greenish mucoid diarrhea. Feces were observed stuck to the feathers around the cloacae. Oocysts of the both sample were placed in a 2.5% solution of $K_2Cr_2O_7$ to allow them to sporulate. Upon microscopic examination, unsporulated oocysts were observed in the feces of the first sample. However, oocysts of the second sample, collected three days after the first sample, sporulated and they were recovered for determining the species. The oocysts varied from ovoidal to ellipsoidal with 27.9 x 26.9µm in diameters, with a smooth wall consisting of two layers of 1.4µm thickness. Micropyle and oocyst residuum were absent, but polar granules were present. Sporocysts were elongated and ellipsoidal measuring 19.6 x 11.1µm. The Stieda body presented a knob-like appearance and was slightly pointed in the external surface. The substieda body was undefined. The sporocyst residuum was composed of scattered granules and the sporozoites were vermiform with a refractile body and a nucleus. The characteristics of the oocysts were similar to those described previously as *Eimeria amazonae*. In addition to the case report of a clinical coccidiosis, comments on geographic distribution and interspecific infections are presented herein.

KEY WORDS. *Amazona aestiva*, coccidiosis, CETAS, quarantine.

RESUMO. Um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), adulto, macho, estava mantido em regime de quarentena no CETAS/IBAMA em Seropédica, RJ. Como sinais clínicos foram observados apatia, anorexia, perda de peso, penas, eriçadas e sem brilho, com diarréia mucoide de coloração esverdeada,

* Received on August 5, 2012.

Accepted for publication on September 18, 2013.

¹Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. †Author for correspondence. E-mail:liannavet@yahoo.com.br carolinespitz@yahoo.com.br

²Biólogo Autônomo. Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail:biolopesbb@hotmail.com

³Biólogo, DSc. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970.

E-mail:bertobp@ufrj.br

⁴Biólogo, PhD. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: leira@ufrj.br

⁵Médico-veterinário, MSc. Centro de Triagem de Animais Silvestres, Instituto Brasileiro do Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente e Recursos Renováveis, Seropédica, RJ 23835-400. E-mails: danielmn35@hotmail.com

⁶Médico-veterinário, PhD, LD. DPA, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail:lopescw@ufrj.br - CNPq fellowship.

Anexo 9. DOS SANTOS, C.S.; JESUS, V.L.T.; PEREIRA, R.C.G.; GUEDES JR, D.S.; SANTOS, M.A.A.J.; JACOB, J.C.F. Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p. 155-162, 2013

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN FRESCO E CONGELADO DE JUMENTO*

Caroline Spitz dos Santos¹⁺, Vera Lúcia Teixeira de Jesus², Rita de Cássia Gomes Pereira¹, Daniel da Silva Guedes Júnior³, Marcos Antônio José dos Santos⁴ e Júlio César Ferraz Jacob⁵

ABSTRACT. dos Santos C.S., de Jesus V.L.T., Pereira R. de C.G., Guedes Júnior D. da S., dos Santos M.A.J. & Jacob J.C.F. [Uterine inflammatory response in mares inseminated with fresh and frozen donkey semen]. Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(2):155-162, 2013. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br
This study aimed to characterize the uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh and frozen donkey semen. Seven mares were inseminated with fresh (G1) and frozen (G2) semen for two estrous cycles. The uterine inflammatory response was evaluated by ultrasonography and uterine cytology performed before (T1), four hours (T2) and 24 hours after insemination (T3). The results were analyzed by ANOVA. Ultrasonography in T1 revealed no accumulation of intrauterine fluid, but in T2 and T3 there were accumulation of less than 2 cm in G1 and G2 ($p > 0.05$). Statistical analysis revealed significant differences between T1 in relation to other moments (T2 and T3), demonstrating that after insemination the uterine fluid accumulation observed for both groups was attributed to the inflammatory response to semen. Uterine cytology in T1 revealed mean percentage less than 5%, at T2 was higher than 50% (G1 and G2) and no significant difference ($p > 0.05$) between groups was observed. In G1 T3, there was a reduction in the percentage of neutrophils observed for T2 ($p < 0.001$) for both groups showing that 24 hours after AI started the process of resolution of inflammation. The observed uterine inflammation in mares inseminated with fresh and frozen donkey semen was similar to those reported for equine semen in the same times of collection, and reduction of this response was also according to the literature. Therefore, the donkey's sperm was able to promote uterine response similar to that described for equine sperm which was not related to the type of semen used, if fresh or cryopreserved.

KEY WORDS. Endometritis, asinine semen, uterine cytology, ultrasonography.

RESUMO. Este estudo objetivou caracterizar a resposta inflamatória uterina de éguas após a inseminação com sêmen fresco e congelado de jumento. Sete éguas foram inseminadas com sêmen fresco (G1) e congelado (G2) por dois ciclos estrais. A res-

posta inflamatória uterina foi avaliada por ultrassonografia e citologia uterina, realizadas antes (T1), quatro horas (T2) e 24 horas após as inseminações (T3). Os resultados foram analisados por ANOVA. A ultrassonografia em T1 não revelou acúmulos de

*Recebi em 26 de abril de 2012.

Aceito para publicação em 6 de maio de 2013.

¹Médica-veterinária, *M.Med.Vet.*, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. ⁺Autora para correspondência. E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

²Médica-veterinária, *DSc.* Departamento de Avaliação e Reprodução Animal (DRRA), Instituto de Zootecnia (IZ), UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: jesus@ufrrj.br

³Médico-veterinário, *DSc.* Departamento de Controle de Qualidade, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Av Brasil n° 4365, Manguinhos, RJ 21040-360, Brasil. E-mail: daniel.guedes@bio.fiocruz.br

⁴Médico-veterinário, *DSc.* Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. Email: majsantos@ufrrj.br

⁵Médico-veterinário, *DSc.* DRRA, IZ, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: juliorep@ufrrj.br

Anexo 10 BOMFIM, B. do B.; dos **SANTOS, C.S.**; LUZ, H.R.; BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. *Adelina* sp. (Apicomplexa: Adeleidae), a pseudoparasite of *Thoropa miliaris* Spix (Amphibia: Cycloramphidae) in Southeastern Brazil. **Coccidia**, v. 1, p. 26-31, 2013.

***Adelina* sp. (Apicomplexa: Adeleidae), a pseudoparasite of *Thoropa miliaris* Spix (Amphibia: Cycloramphidae) in Southeastern Brazil**Bruno do Bomfim Lopes | Caroline Spitz dos Santos | Hermes Ribeiro Luz |
Bruno Pereira Berto | Carlos Wilson Gomes Lopes

Submitted in 01.12.2013

Accepted in 11.12.2013

Abstract Lopes B doB, Santos CS, Luz HR, Berto BP, Lopes CWG. 2013. *Adelina* sp. (Apicomplexa: Adeleidae), a pseudoparasite of *Thoropa miliaris* Spix (Amphibia: Cycloramphidae) in Southeastern Brazil. [*Adelina* sp. (Apicomplexa: Adeleidae), um pseudoparasita de *Thoropa miliaris* Spix (Amphibia: Cycloramphidae) no Sudeste do Brasil] *Coccidia* 1, 26-31. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: bertobp@ufrj.br

The insectivorous habit of some vertebrates is essential for the life cycle of some coccidia of invertebrates because they depend of the feeding habits of vertebrates which ingest invertebrate hosts to ensure that the adeleid oocysts will be dispersed. This study reports adeleid polysporocystic oocysts from feces of the frog *Thoropa miliaris* Spix in Marambaia Island, State of Rio de Janeiro, Brazil. This sporulated oocysts belong to the genus *Adelina*, which was parasitizing an invertebrate ingested by *T. miliaris*. The oocysts were ellipsoidal, $37.6 \times 31.4 \mu\text{m}$, with a smooth, bilayered wall. Micropyle, oocyst residuum and polar granule were absent. The number of sporocysts per oocyst varied from 14 to 21. The sporocysts were subspherical, $9.1 \times 8.5 \mu\text{m}$. Stieda and substieda bodies absent. Sporocyst residuum composed of scattered granules. Sporozoites present subspherical refractile bodies at both ends. This is the first report of a pseudoparasite in amphibians. Comparative morphology of 29 *Adelina* spp. is presented in tabulated data.

Keywords pseudoparasite, predation, invertebrate, habit, coccidia, morphology, oocysts,

polysporocystic, Adeleorina.

Resumo O hábito insetívoro de alguns vertebrados é essencial para alguns coccídios de invertebrados, pois estes dependem dos hábitos alimentares de vertebrados que predam invertebrados para garantir que serão dispersos. Este estudo relata a presença de oocistos polisporocísticos de um adelaideo nas fezes de *Thoropa miliaris* Spix na Ilha da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Esta espécie pertence ao gênero *Adelina*, a qual estava parasitando um invertebrado ingerido por *T. miliaris*. Os oocistos foram elipsoidais, $37,6 \times 31,4 \mu\text{m}$, com parede lisa e dupla. Micrópila, resíduo e grânulo polar estavam ausentes. O número de esporocistos por oocisto variou de

BB Lopes

Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: biolopesbb@hotmail.com

CS Santos | HR Luz

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br
hermes@ufrj.br

BP Berto

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: bertobp@ufrj.br

CWG Lopes

Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. CNPq fellowship.
E-mail: lopecswg@ufrj.br

Anexo 11 DOS SANTOS, C.S.; McINTOSH, D.; BERTO, B.P.; DE JESUS, V.L.T.; DA ROCHA, C.N.C.; FERNANDES, J.I.; SCOTT, F.B.; LOPES, C.W.G *Pentatrichomonas hominis* in symptomatic cats of Southeastern Brazil..Revista Brasileira de Medicina Veterinária [No prelo].

***Pentatrichomonas hominis* in symptomatic cats of Southeastern Brazil**

Caroline Spitz dos Santos^{a,*}, Douglas McIntosh^b, Bruno Pereira Berto^c, Vera Lúcia Teixeira de Jesus^d,
Cristiane Nunes Coelho da Rocha^a, Júlio Israel Fernandes^e, Fábio Barbour Scott^b, Carlos Wilson Gomes Lopes^b

^aCurso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

^bDepartamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

^cDepartamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

^dDepartamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

^eDepartamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, IV, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

* Caroline Spitz dos Santos; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, Anexo I, IV, DPA, Laboratório de Coccídios e Coccidioses, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil; E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

Diagnosis of *Pentatrichomonas hominis* from cats in Brazil

Abstract The parabasalid flagellate, *Pentatrichomonas hominis* has been reported in association with domestic cats causing gastrointestinal disturbance since the early 20th century. An additional parabasalid flagellate that may be misidentified morphologically as *P. hominis* is *Tritrichomonas foetus*; which is recognized as an etiological agent of large bowel diarrhea in cats. The current study provides a detailed morphological description, in combination with nucleotide sequencing, of *P. hominis* isolated from domestic cats in Brazil. One hundred trophozoites from each positive sample were subjected to morphometric analysis which revealed that trophozoites varied from pear-shaped to rounded in shape, measuring 10.7 by 8.2 µm, excluding the axostyle protrusion. Trophozoites presented five anterior flagella, typical of the species and an undulating membrane extending along the length of the body and terminating in a free flagellum. The axostyle gradually attenuated toward its end and protruded from the cell body. Nucleotide sequencing of PCR amplicons generated from the Brazilian isolates, using species specific primers, revealed 100% nucleotide similarity with sequences deposited in the GenBank as *P. hominis*. The current morphological study highlighted some characteristic features that may serve to ensure reliable identification of *P. hominis*. Moreover, this study questions the perceived status of *P. hominis*, as a commensal given that there was an association of this parasite and diarrhea.

KEY WORDS

Pentatrichomonas hominis
differential diagnosis

cats

diarrhea

1. Introduction

The parabasalid flagellates are single celled obligate protozoan symbiontes generally encountered in the digestive or genitourinary tract of humans and animals. where they act as either parasites or commensals . In addition, it has been reported that these protozoa can migrate to other sites within their target host, can adapt to new hosts, and that some species are capable of zoonotic transmission ^{16,9}. To date, two species of parabasalids have been reported in domestic cats^{19,32}. The first is *Pentatrichomonas hominis*, which is generally considered to represent a commensal organism ^{7,32}, while the second species, *Tritrichomonas foetus*, is recognized as the agent of large bowel diarrhea ²⁷. *Pentatrichomonas hominis*, was first identified in the intestinal tract of human beings and subsequently, in a wide range of hosts, including felines ¹. Interestingly, the first report of this parasite in cats occurred in Brazil in 1922, however the parasite was incorrectly identified as *Trichomonas felis*⁷. The application of morphological and molecular diagnostics for these parabasalids has demonstrated that pigs, cats, dogs, reptiles and birds may harbor *P. hominis* in their intestines and in the reproductive tract of cattle where it may or may not be pathogenic^{5,9,29}. The detection and identification parabasalids like organisms in feces can be achieved using a variety of methods, with varying degrees of specificity and sensitivity, including , microscopic examination for motile trophozoites in fresh fecal smears diluted in saline ¹⁵, specific culture systems ¹⁴ or by polymerase chain reaction (PCR) for detection of genus and species specific ribosomal DNA sequences ¹⁷, The examination and culture of fresh stools has been reported to lack specificity and may result in the misidentification of *T. foetus* as *P. hominis*^{32,33}. In contrast PCR using *T.foetus*-specific primers ¹⁷ was considered to offer the the highest degree of both specificity and sensitivity¹⁵. Accurate differentiation of these organisms is crucial, since in veterinary practices misdiagnosis would lead to ineffective therapy for *T. foetus* using ronidazole, a potentially neurotoxic compound ³.

In light of the existing difficulties encountered in obtaining a definitive diagnosis, the current study provides a detailed description of the morphology of *P. hominis* isolated from domestic cats in Brazil, and identified using nucleotide sequencing.

2. Material and methods

2.1 Ethical considerations

All aspects of the study involving animals were processed in strict accordance with the recommendations approved by the Ethics committee of The Federal Rural University of Rio de Janeiro. (CEUA/IV/UFRRJ; Process # 006/2014). We declare that the animals were not harmed in any way during the procedure.

2.2. Sample collection and processing

Fecal samples were collected from 41 domestic cats with or without diarrhea, maintained at the Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária at UFRRJ, located in the Municipality of Seropédica, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Some animal data were collected to evaluate possible risk factors associated with the infection. They were age, sex, stool format classified as consistent (normal) and not consistent (pasty, poorly formed, or liquid), history of diarrhea and contact with other cats. Samples were

collected immediately after defecation or directly from the rectum by the infusion of warm saline and were immediately transported to the Laboratório de Patologias da Reprodução located at UFRRJ. Thereafter, the feces were diluted in Hanks solution supplemented with 10% inactivated horse serum, incubated at 28-33°C, and examined by microscopy at 48 hours intervals. Fecal samples considered as positive upon direct examination were inoculated into trypticase yeast extract-maltose medium⁸ supplemented with 10% horse serum, incubated at 35°C, and sub cultured at 72h intervals.

2.3. Observation, measurement and illustration of trophozoites

Microscope slides were prepared using smears of culture fixed using 2.5% gluteraldehyde followed by staining with eosin or Heidenhain's iron hematoxylin. Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using a trinocular microscope^a coupled to a digital camera^b. The morphometric analysis of trophozoites was done using the computer program^c. The drawings were edited with the aid of two programs^d. Size ranges are provided in parentheses following the mean values.

2.4. Molecular analyses

DNA was extracted from approximately 1×10^6 trophozoites (enumerated microscopically), as follows; Cells in were harvested by centrifugation (16,000xg for 5 min), in 1.5mL screw-capped micro-centrifuge tubes. Supernatants were discarded and the cell pellets were washed once with 1mL of phosphate buffered saline (PBS; pH7.2). Washed cells were resuspended in 100µL of chelex matrix^d with incubation at 56°C for 30 minutes, then boiled for 10 minutes. The tubes were centrifuged (16,000 x g for 5 min), to sediment cell debris together with the chelex matrix, and 60µL of each supernatant were transferred to new tubes, with storage at -20°C. A Polymerase chain reaction (PCR) assay design for families Trichomonadidae e Tritrichomonadidaewas performed as described previously¹⁰ using the primers TFR1 and TFR2. In addition, an assay specific for *Tritrichomonas foetus* was performed, using the primers TFR3 and TFR4 according to the authors¹¹. Finally, samples were examined using an assay specific for *P. hominis*, employing the primers Th3 and Th5⁶. The K strain of *T. foetus* isolated by H. Guida (Embrapa, Rio de Janeiro, Brazil) from the urogenital tract of a bull, was used as a positive amplification PCR control in the first two assays. PCR products reaction was examined by electrophoretic separation in 2% agarose gels stained with ethidium bromide to confirm the presence of amplicons with the predicted molecular weight.

PCR products (339 base pairs), from the *P. hominis* specific assay were digested using 10 units of the restriction endonucleases *Hae* III^e and *Hinf* I^f for 2 h at 37°C. Digestion products were separated using 12% polyacrylamide gels electrophoresis followed by staining with ethidium bromide. The resulting banding patterns were compared to those predicted by *in silico* digestion using the computer program^g of the amplified region present in the 18S rDNA of a feline isolate of *P. hominis*¹², GenBank accession number (KC594038.1).

Sequencing of *P. hominis* 18S rDNA amplicons was performed as follows; 10 µl of PCR products were treated with Exo-Sap-IT^h, according to the manufacturer's protocol and sequenced in both directions. All sequences were entered into the BLAST search algorithm and the NCBI nucleotide database to determine gene identity.

2.5. Statistical analyses

Differences were analyzed by the Fisher's exact test³⁵.

3. Results

Wet mounts of stools from 41 cats were observed by light microscopy examination and Parabasalid-like organisms were evident in 11 samples (26.8%) Ten samples were considered positive by fresh examination and 11 as positive by culture. Four of the positive cats were male and seven were females with an average age of 36 months (10-60). Age and sex were not related to infection ($p > 0,05$). Similarly, the consistency of the feces showed no significant difference when compared to positive and negative animals ($p = 0.58$), even when qualified by scores. Diarrhea was the main feature observed among the cats examined (Table 1).

3.1. *In vitro* cultivation

All microscopy positive samples were also culture positive. The trophozoites observed in the feces presented progressive and irregular movement characteristic of parabasalids⁹ presented rounded shapes, and multiplication by binary (Fig 1 A and B) or multiple division (Fig 1 C and D). Organisms generally survived well for at least 10 days in feces, reaching up to 3 weeks for some samples. Cultures grew well at 33 °C and could be continually passaged in peptone broth medium, albeit with the presence of heavy bacterial contamination that could not be eliminated.

3.2. Morphology

Parabasalids were clearly visible by light microscopy in unstained, and in eosin and iron-hematoxin stained preparations, but visualization of and the ability to enumerate flagella was superior in the wet mount method than in stained preparations.

Trophozoite shape (n = 100) piriform to rounded. Body size, without the axostyle protrusion, 10.69 ± 1.7 (6, 97–14, 87) μm long and $8.22 \pm 1, 6$ (5.5–12.45) μm wide. Five unequal anterior flagella demonstrated lengths greater than or equal to that of the body, one flagellum frequently observed to be orientated towards the vent (Fig. 2 A). Trophozoites with four anterior flagella are unusual. Recurrent flagellum extends throughout the body with three to four long waves (undulating membrane) ending in a free posterior flagellum (Fig 2 B and C). Costa slender, with diameter similar to the anterior flagellum and extends throughout the body. Capitulum of the axostyle is relatively narrow and its trunk gradually attenuates toward its terminus and protrudes from the cell body. Pelta is thin, short and barely discernible. The nucleus and parabasal body are round in shape (Fig 2D). All measures of trophozoites are in Table 2 and were compared to other morphological studies done about the species^{37, 26, 8, 25}. Based on the observed morphological characters a schematic drawing was produced with the main characteristics that define the species *P. hominis* (Fig 3)

3.3. DNA analysis

All culture positive samples yielded amplicons of approximately 360 bp using the primers TFR1 and TRF2, indicating the presence of parabasalid DNA. Conversely, no amplicons were observed using the *T. foetus* specific assay. Importantly, the positive control (DNA equivalent to 100 trophozoites of strain K of *T. foetus*)

showed strong amplification of a band of 339 bp in accordance with previous results¹². All culture positive samples were recorded as positive in the PCR assay for *P. hominis*, based on the presence of a 339 bp product that when submitted to digestion with *Hae*III resulted in bands of 245 bp and 94 bp, and in the generation of three bands of 155 bp, 126 bp and 58 bp following digestion with the enzyme *Hinf*I. The observed banding patterns matched those predicted by *in silico* digestion. Four of the 11 amplicons were sequenced and each showed 100% nucleotide similarity over 297 bases (=amplicon after removal of the primer sequences), with sequences deposited in the GenBank as originating from feline (accession number KC594038.1) or canine (accession number KC953860.1) isolates of *P. hominis*. The sequence of a representative isolate was deposited in the GenBank with the accession number KF953914.

4. Discussion

This is the first confirmed report of *P. hominis* isolation from cats in Brazil, although several strains of *P. hominis* have been isolated from a variety of vertebrates in other countries^{23,9}. However, in cats few studies have been carried out, which is surprising given the necessity for differential diagnosis between *T. foetus* and *P. hominis*. In dogs, *P. hominis* is considered pathogenic and may even be fatal and therefore a greater number of studies have examined the question of with making differential diagnosis between *T. foetus* and *P. hominis*³⁵.

The analysis of fecal samples recorded 27% as positive for *P. hominis*. This could be considered as a relatively high frequency considering that the literature describes levels of only 1.9 to 2.1% within a the feline population studied¹⁹. Investigations into the frequency of *P. hominis* in dogs indicate higher rates. In one study, as many as 15, 8 % of the puppies were positive by culture²⁰.

The animals examined in this study were kept in collective catteries, separated only by sex. However, when an experiment was under development the animals were held individually. The high density, or very close contact between these animals possibly contributed to a high number of positive animals as a consequence of the dissemination of the protozoa among the animals. Environments with high animal density, as commonly found in catteries, shelters or in houses with large numbers of animals, is considered as one of the key risk factors for feline trichomoniasis²⁶. In the current work, age and gender were not related to infection by *P. hominis* which was in agreement with previous studies^{12,21}. In addition, age does not appear to be a risk factor for the development of infection or the manifestation of clinical signs since cats of any age can acquire the infection¹⁷. Nevertheless, clinical impressions suggest that infection is more common in young animals^{14,20}.

For the diagnosis of trichomonosis, direct examination of fresh feces diluted in Hanks solution and Diamond culture - medium was used. A total of 10 samples were positive upon examination of fresh feces, and an additional sample was also positive by culture. Comparison between the two diagnostic methods showed a significant difference ($p \leq 0,01$). In two other earlier studies diagnosis rates of 100% (13/13)¹ and 88% (33/38)³⁵ were presented for the samples evaluated by fresh examination of the feces.

In the current study, only *P. hominis* was identified in fecal samples, which matches the findings of a previous study³⁰, wherein feline intestinal tissue sections were examined by chromogenic *in situ* hybridization, with the absence of *T. foetus* being confirmed by PCR. Moreover, our findings correlate with the isolation of pure cultures of *P. hominis* from a single cat with diarrhea in the Czech Republic, using a commercial medium system³. In contrast, other researchers have reported that *P. hominis* was detectable by PCR in the feces of a

limited number of the animals examined, but that *P. hominis* was not detected in any fecal samples that were not also positive for *T. foetus* infection¹⁹.

Traditionally, *P. hominis* is presumed to be a commensal; in contrast, *T. foetus* is recognized as an important pathogen of cats with diarrhea¹⁸. The number of positive animals exhibiting a history of diarrhea was significantly higher than positive animals without diarrhea. Through this study it was observed that large bowel diarrhea in cats is not uniquely associated with infection by *T. foetus*, since only *P. hominis* was diagnosed. As previously mentioned the high density and diarrhea history are the main risk factors for *P. hominis* infection in this study. In this sense, reliable diagnosis of parabasalid infections of cats is important to ensure the most effective clinical treatment.

On the other hand, some authors have suggested the ability of this species to cause gastrointestinal disturbance in cats based on the presence of parabasalids morphologically consistent with *P. hominis* in fecal samples^{32, 33, 14}. The current study reinforces this assertion, because it reports the first identification of *P. hominis* associated with cats with diarrhea in Brazil. It is pertinent to note, that the lack of host specificity of *P. hominis*, raises questions concerning the zoonotic potential of this species, particularly in light of reports from companion animals^{17, 18, 20}. *P. hominis* is euryxenic, with reports of this parasite colonizing the gastrointestinal tract of several mammalian species including dogs, cats, cattle, mice, monkeys and humans³². More recently, additional hosts including the Philippine scops-owl *Otus megalotis* and the eastern racer *Coluber constrictor* were reported in the Philippines. These observations may be linked to the dietary habits of these predators and clearly demonstrate how easily this parabasalid adapts to different hosts⁹.

A growing number of human cases of trichomoniasis involving *P. hominis* and *T. foetus* have emerged recently. Specifically, *P. hominis* has been considered as a causative agent of gastrointestinal illness in humans, with clinical presentation of irritable bowel syndrome^{30, 3}, and in two cases where it was detected in both stool and exudative pleural effusion². *P. hominis* is most commonly found in the digestive tract, but samples of vaginal swabs of women with vaginitis that were subjected to PCR based diagnosis of trichomoniasis indicated the presence of this species in the vaginal mucosa in the absence of *T. vaginalis*⁶.

Regardless of the certainty of *P. hominis* pathogenicity or of its zoonotic potential, more studies should be conducted on this parasite to this investigation. In this sense, diagnostic methods should be available to assist in the specific identification of these parabasalids. However, current studies, which are primarily academic, on the identification of parabasalids are usually conducted by molecular methods without presenting morphological data that would enable a reliable diagnosis in clinical laboratories, which may lack access to molecular techniques. Taken as a whole, the morphological data provided by this study are in partial agreement with the findings available from previous studies of *P. hominis*, which were generally incomplete and lacking in detail (Table 2). In this context, it is important to emphasize that no detailed description of *P. hominis* from felines was available prior to this study. Moreover, in this study, the relatively simple morphological analysis provided sufficient differentiation between *P. hominis* and *T. foetus* based on specific characteristics such as: number of flagella, the shape and size of the axostyle and the round shape of the nucleus. Subsequently, molecular methods were employed to demonstrate the presence of parabasalids, the absence of *T. foetus* and finally the establishment of pure cultures of *P. hominis*.

The number of flagella is constant in some parabasalids, including *T. foetus*, and has emerged as a key characteristic used for species identification. However in the past, reliance upon this phenomenon has led to the

publication of a number of dubious descriptions of new genera and species¹³. Five anterior flagella were considered as a stable and definitive characteristic feature for *P. hominis*²⁶. In that work, approximately 80% of the trophozoites of *P. hominis* from human and primates had five anterior flagella; 15% had four anterior flagella; and 5% had three anterior flagella. This variation was attributed to factors including culture age and the presence of specific bacteria¹³. The majority of the isolates examined in the current work showed five anterior flagella in agreement with previous morphological studies using *P. hominis* strains from different hosts^{36, 37}. Thus, the number of anterior flagella could be used as convenient characteristic for differentiating *P. hominis* and *T. foetus* infection in cats with clinical signs of diarrhea or dysentery. However, other features must also be used, for example, axostyle formation. In this context, *P. hominis* is tapered gradually and not abruptly as shown in *T. foetus*. The use of this feature, which was readily observable using the staining protocol employed herein, provided a clear identification of the feline isolates as *P. hominis*. These characteristic features were also highlighted by other authors², for the morphological identification of trophozoites of Parabasalia.

Morphological data used for identification of *P. hominis* presented herein agree with the findings of the study with *P. hominis* isolates from swine, which presented five flagella with four of the structures having the same origin while a fifth, independent flagellum originated separately from the others²⁸.

In the present study, trophozoites were observed in the process of binary division, and we also observed multiple division with protozoa dividing into four new trophozoites, similar to the findings described with *P. hominis* isolated from man, monkeys, cats and dogs³⁶.

Using primers specific for regions of the rRNA of *P. hominis* (TH3 /TH5) all culture positive samples were PCR positive while the *T. foetus* control DNA was negative. All samples were diagnosed as *P. hominis* based on the presence of products of 339 bp. The specific amplification *P. hominis* using the primers TH3 and TH5 confirms the specificity of this method as described by other authors^{18, 35}. The absolute limit of detection for the pair of primers (TH3 /TH5) was reported to be equivalent to a single trophozoite of *P. hominis* in 10 µL of buffer⁶. In the current study, PCR-RFLP was conducted to perform a preliminary genotypic evaluate of the culture positive samples and to identify a sub population of samples for nucleotide sequencing. The potential zoonotic transmission of *P. hominis* has been suggested since the 1940s based on the findings of a morphological and experimental study of infection in mammals³⁷. More recent studies using molecular tools also contributed to the debate on this topic. Support for this possible zoonotic role is provided by the observation that all strains found in a variety of hosts have 100% nucleotide similarity in the regions of the genome examined to date^{9, 23}. All *P. hominis* strains isolated from cats in current study were genetically identical (100% nucleotide similarity), indicating that the animals which reside in close proximity to and which interact with humans are potential sources of infection and should therefore be monitored as a source of a potential pathogen.

In conclusion, the current diagnostic study highlighted some characteristic features that may serve to ensure reliable identification of *P. hominis*. Such identification will be necessary to improve our knowledge of this versatile flagellate.

Acknowledgements

We are thankful to CAPES for supporting this research.

Sources and manufacturers

^a Primo Star Zeiss® trinocular microscope

^b AxionVision Release 4.8.2 (2010)

^c Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada

^d Instagene™ matrix BIO RAD

^e Promega

^f Invitrogen

^g Program NEB-cutter V 2.0 ; New England Biolabs

^h Big-Dye terminator kit, Applied Biosystems, Foster City, CA.

^h GE Healthcare Cleveland , Ohio

Conflicts of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to other research, authorship, and/or publication of this article..

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) process #E-26/111.880/2013 and #E-26/112.563/2012 and in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- 1 Bell ET, et al. Naturally occurring *Tritrichomonas foetus* infections in Australian cats: 38 cases. *J Fel Med Surg* 2010; 12:889- 898.
- 2 Cepicka I, et al. Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist* 2010;161:400-433.
- 3 Cobo ER, et al. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. *Vet Parasitol* 2003; 117:195-211.
- 4 Compaoré C, et al. *Pentatrichomonas hominis* infection in rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Rheumatology* 2013; 52:1534-1535.
- 5 Corbeil LB, et al. Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. *Vet Parasitol* 2008; 154:226–232
- 6 Crucitti T, et al. Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38:510-516.
- 7 Da Cunha AM, Muniz J. Trabalhos do Instituto Oswaldo Cruz: sobre um flagelado parasito do gato. *Bras Med* 1922;36:285-286.
- 8 Diamond LS. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 1957;43:488-490.

- 9 Dimasuay KGB, Rivera WL. Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. *Vet Parasitol* 2013;196:289-295.
- 10 Felleisen RSJ. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol.* 1997;115:111-119.
- 11 Felleisen RSJ, et al. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA Gene Unit Sequences. *J Clin Microbiol* 1998; 36:513-519.
- 12 Foster DM, et al. Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225:888-892.
- 13 Flick EW. Experimental analysis of some factors influencing variation in the flagellar number of *Trichomonas hominis* from man and other primates and their relationship to nomenclature. *Exp Parasitol* 1954; 3:105-121.
- 14 Gookin JL, et al. Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *J Am Vet Med Ass* 1999; 10:1450-1454.
- 15 Gookin JL, et al. Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4126-4130.
- 16 Gookin JL, et al. Use of a commercially available culture system for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:1376-1379.
- 17 Gookin JL, et al. Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2707-2710.
- 18 Gookin JL, et al. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *J Parasitol* 2005; 91:939-943.
- 19 Gookin JL, et al. Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. *Vet Parasitol* 2007; 145:11-15.
- 20 Grellet A, et al. Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Vet Parasitol* 2013; 197:418– 426
- 21 Gunn-Moore D, et al. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in the UK. *J Fel Med Surg* 2007; 9:214- 218.
- 22 Jongwutiwes S, et al. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:185–186.
- 23 Kamaruddin M, et al. Molecular Characterization of Various Trichomonad Species Isolated from Humans and Related Mammals in Indonesia. *Korean J Parasitol*; 2014: 52:471-478.
- 24 Kessel JF. Trichomoniasis in kittens. *Trans Royal Soc Trop Med Hig* 1928; 22:61-80.
- 25 Kirby H. Observations on a trichomonad from instestine of man. *J Parasitol* 1943;49:422-423.
- 26 Kuehner K, et al. *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: Prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. *J Fel Med Surg*; 2011; 13:251-258
- 27 Levy MG, et al. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. *J Parasitol* 2003; 89:99-104.
- 28 Li W, et al. Molecular and Morphologic Identification of *Pentatrichomonas hominis* in Swine. *Vet Parasitol* 2014; 202:241-247.
- 29 Maritz JM, et al. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? *Trends Parasitol* 2014; 30:333-341.

- 30 Mostegl MM, et al. Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. *Vet Parasitol* 2012;183:20-14.
- 31 Meloni D, et al. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in two patients with gastrointestinal symptoms. *J Clin Pathol* 2011; 64:933-935.
- 32 Romatowski J. An uncommon protozoan parasite (*Pentatrichomonas hominis*) associated with colitis in three cats. *Fel Pract* 1996; 24:10-14.
- 33 Romatowski J. *Pentatrichomonas* infection in four kittens. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216:1270-1272.
- 34 Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. [Statistics applied to animal experimentation] Belo Horizonte: FEP MVZ Editora; 2002. Portuguese.
- 35 Tolbert MK, et al. Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. *Vet Parasitol* 2012; 187:319-322.
- 36 Wenrich DH. Morphology of the intestinal trichomonad flagellates in man and of similar forms in monkeys, cats, dogs, and rats. *J Morphol* 1944; 74:189-211.
- 37 Wenrich DH. The species of *Trichomonas* in man. *J Parasit* 1947; 33:177-188
- 38 Zalonis CA, et al. Rare Case of Trichomonal peritonitis. *Emerg Infec Dis* 2011; 17:1312-1313.

Table 2. Comparative morphology of *Pentatrichomonas hominis* trofozoites isolated from cats and humans.

Authors	Wenrich (1944)	Kirby (1945)	Da Cunha & Muniz (1922)	Kessel (1928)	Present study
Hosts	Human	Human	Cat	Cat	Cat
	Structure		Average and limits in µm		
Body Shape	Fusifforme/piriform /rounded	piriform	Piriform to globular	rounded	Fusifform/piriform
Body Length	8,3 (6 -13,5)	8-20	7,5	8-15	10,69 (6,87-14,87)
Body Width	-	3-14	6	5-8	8,22 (5,5-12,45)
Nucleus Shape	Round / oval	-	elliptic	-	round
Length	-	-	-	-	3,51 (2,66-5,19)
Nucleus Width	-	-	-	-	3,29 (2,61-5,02)
Shape Of Parabasal Body	-	ellipsoid	-	-	round
Length Of	-	small	-	-	1,36

Parabasal Body					
Width Of Parabasal Body					
Parabasal Body	-	-	-	-	1,07
N° Anterior Flagella	majority 5 (4 - 3)	majority 5 (4)	4	4	5
Size					
Number 1	Equal to or greater than the length of the body	Equal to or greater than the length of the body	Equal to or greater than the length of the body	-	13,50
Number 2	-	-	-	-	13,48
Number 3	-	-	-	-	13,30
Number 4	-	-	-	-	13,00
Number 5	-	-	-	-	13,00
Posterior Flagella	-	5	-	2-4	8,67 (5,25-12,05)
Axostyle Protusion	-	-	-	-	4,15 (3,42-5,04)
Waves					
Membrane Undulating	3-5	-	-	-	3-5

Figure Legends

Figure 1. Forms of division of *Pentatrichomonas hominis* recovered from domestic cats. (A) Trofozoite in binary division, with two nuclei and two groups of flagella Eosin. (B) Trophozoite in cytokinesis. (C-D) Multiple division with formation of three / four organisms. Heidenhain's iron hematoxylin. NU= nucleous, AF= anterior flagela.. Mag. 1000X. Scale bar: 5µm.

Figure 2. *Pentatrichomonas hominis* recovered from domestic cats. (A) Trophozoites present five anterior flagellum visible, round nucleus and typical axostyle. Eosin. (B) *P. hominis* showing undulating membrane, anterior flagella group and pelta. Heidenhain's iron hematoxylin. (C) Trophozoite present anterior flagella group, undulating membrane and a long posterior flagella . Heidenhain's iron hematoxylin. (D) Trophozoite showing the visible costa below the undulating membrane and for its entire length, round nucleus, thin pelta, and visible

axostyle in its entire length. Eosin. NU = nucleous, FA= anterior flagella, AX = axostyle, CO = costa, Pe = pelta, UM = undulating membrane, PF= posterior flagella. Mag. 1000X. Scale bar: 5µm.

Figure 3 Composite line drawing of a representative trophozoite of *Pentatrichomonas hominis* recovered from domestic cats. Ax = axostyle, Co = costa, Nu – nucleous, Pb = parabasal body, Pe = pelta, UM = undulating membrane. Scale bar: 5µm.

