

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DE *TRITRICHOMONAS FOETUS*  
EM GATOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE  
ARAÇATUBA – SP, BRASIL**

**Roberta Picciuto Duarte**

Médica Veterinária

Araçatuba – SP

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DE *TRITRICHOMONAS FOETUS*  
EM GATOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE  
ARAÇATUBA – SP, BRASIL**

**Roberta Picciuto Duarte**

**Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais).

Araçatuba – SP

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

Duarte, Roberta Picciuto

D812o      Ocorrência de *Tritrichomonas foetus* em gatos na região do município de Araçatuba – SP, Brasil / Roberta Picciuto Duarte.  
-- Araçatuba, 2015.

44 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

Orientadora: Profa. Gisele Fabrino Machado

1. Parasitos. 2. Diarreia. 3. Genes de protozoários. 4.  
Reação em cadeia da polimerase. I. T.

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba  
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Ocorrência de Tritrichomonas foetus em gatos na região de Araçatuba - São Paulo - Brasil.

**AUTORA:** ROBERTA PICCIUTO DUARTE

**ORIENTADORA:** Dra. GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO

Dra. GISELE FABRINO MACHADO

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 1 de dezembro de 2015.

Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. GISELE FABRINO MACHADO

- Orientadora -

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**ROBERTA PICCIUTO DUARTE** - Nascida em São Paulo no dia 24 de outubro de 1983. Iniciou e concluiu o curso de graduação em Desenho Industrial, habilitação em Programação Visual, pela Faculdade de Arquitetura, Artes e Comunicação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Câmpus de Bauru, SP (2001 – 2007). Atualmente, é médica veterinária. Iniciou e concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária, pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Câmpus de Araçatuba, SP (2009 – 2013). Durante a graduação, realizou treinamentos técnicos junto às disciplinas de Anatomia Patológica Geral Veterinária, Laboratório Clínico e Clínica Médica de Pequenos Animais; atividades de extensão com bolsa por duas vezes com o projeto intitulado “Eficácia de Carrapaticidas no Controle Estratégico de *Boophilusmicroplus* na Região Noroeste do Estado de São Paulo”; atividades de iniciação científica sem bolsa junto à disciplina de Técnica Cirúrgica Veterinária; atividades de iniciação científica por duas vezes com bolsa FAPESP (Processos 2011/11243-6 e 2012/18782-2) com os projetos intitulados: “Avaliação da expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF no câncer da mama em gatas e correlação com outros indicadores morfológicos de prognóstico” e “Tumores testiculares em cão: correlação entre padrão histológico e marcadores imuno-histoquímicos” sob a orientação da Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado; estágio extracurricular na Clínica VetMasters na área de Clínica Médica e Cirúrgica em Medicina Felina; estágios curriculares realizados na Clínica Veterinária Gatos & Gatos, UP Vet Clínica Veterinária, Universidade do Porto, e Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Câmpus de Araçatuba, SP. Em 2014, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Câmpus de Araçatuba, SP.

*“Não há ponto final para o amor. Amor é vida e vida é eternidade.”*

André Luiz

Dedico este trabalho à minha família, porto seguro eterno. Às minhas amigas, Giovana e Pollyanna, pelas longas conversas. Aos meus companheiros de quatro patas, os gatos Amendoim, Missô, Batatinha e Chokito.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Gisele Fabrino Machado, por ter apostado na minha ideia, ter transformado meu Trabalho de Conclusão de Curso da graduação em um projeto para o mestrado. E, principalmente, por compartilharmos da mesma paixão por felinos!

Ao Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, pelos ensinamentos transmitidos, pela incalculável contribuição e paciência.

Ao Alex Akira Nakamura, pela orientação e disponibilidade.

À Milena Arauz Viol pela parceria para hematologia. Também, à Profa. Suely Regina Mogami Bomfim pela contribuição, disponibilidade e apoio.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, especialmente aos médicos veterinários Rafael Cipriano e Tatiane Sampaio, assim como toda a equipe pela parceria e convivência.

Aos colegas de laboratório, Paulo Ricardo Dell Armelina Rocha, José Eduardo dos Santos Silva e Guilherme Dias de Melo, e todos do laboratório de imunologia e de ornitopatologia, que de certa forma estavam por perto, solidários, e principalmente pela convivência diária.

À banca examinadora do Exame Geral de Qualificação, Professores Márcia Marinho e Wagner Luis Ferreira.

Por fim, à FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2014/00243-3).



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 <i>T. foetus</i> como agente etiológico de diarreia crônica em gatos.....	14
2.2 Patogenia .....	15
2.3 Fatores de risco .....	16
2.4 Tratamento .....	17
2.5 Infecção por <i>T. foetus</i> no trato reprodutivo de gatos .....	18
2.6 Potencial zoonótico .....	18
2.7 Ocorrência mundial .....	18
2.8 Justificativa e objetivo geral .....	19
2.8.1 Objetivos específicos .....	19
3 MATERIAL E MÉTODO .....	20
3.1 Animais .....	20
3.2 Colheita de fezes .....	20
3.3 PCR para <i>T. foetus</i> .....	21
3.4 PCR para <i>Giardia</i> spp. ....	22
3.5 Nested-PCR para <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	22
3.6 Eletroforese .....	23
3.7 Sequenciamento genético .....	23
3.8 Hematologia .....	24
3.9 Análise estatística .....	24
4 RESULTADOS .....	25
4.1 Caracterização dos felinos .....	25
4.2 Análise das fezes por meio do exame direto .....	27
4.3 Pesquisa do DNA e sequenciamento genético do <i>T. foetus</i> .....	27
4.4 História clínica dos gatos positivos para <i>T. foetus</i> .....	28

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
4.5 Pesquisa do DNA de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. e respectivos sequenciamentos genéticos .....	29
4.6 Achados de hematologia.....	29
4.7 Resultados estatísticos .....	30
5 DISCUSSÃO .....	30
6 CONCLUSÃO .....	35
7 REFERÊNCIAS .....	36

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1 - Distribuição dos gatos de acordo com o sexo, idade e raça.....	25
Tabela 2 - Distribuição dos gatos de acordo com a presença de diarreia, histórico de diarreia, tratamento prévio e ambiente multigatos .....	26
Gráfico 1 - Distribuição dos gatos de acordo com a origem .....	26
Gráfico 2 - Distribuição dos gatos de acordo com o estilo de vida .....	26
Tabela 3 - Características individuais e ambientais dos gatos positivos para <i>T. foetus</i> .....	28
Tabela 4 - Resultados do exame direto das fezes, pesquisa de outros patógenos intestinais e achados de hematologia dos gatos positivos para <i>T. foetus</i> .....	28

## OCORRÊNCIA DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* EM GATOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA – SP, BRASIL

**RESUMO** - O presente estudo investigou a ocorrência de *Tritrichomonas foetus* em gatos no Brasil. *T. foetus* é um protozoário que em felinos coloniza o cólon causando colite. O sinal clínico é a diarreia crônica do intestino grosso. Gatos infectados podem apresentar resolução espontânea da diarreia, mas podem permanecer infectados pela vida toda. Existem três métodos diagnósticos mais difundidos que identificam a presença de *T. foetus* nas fezes do animal, sendo: o exame direto das fezes utilizando o microscópio óptico, a cultura e a PCR. No presente estudo, foram comparados dois métodos diagnósticos, o exame direto das fezes e a PCR. Também foi realizado o sequenciamento genético. Foram colhidas amostras fecais de 129 gatos por meio da técnica de lavado retal. Cada amostra foi examinada ao microscópio óptico. A presença de DNA do *T. foetus* foi verificada pela PCR através da amplificação de 347 pares de bases a partir dos primers TFR3 e TFR4. Amplicons dos casos positivos foram sequenciados. *T. foetus* foi observado em uma amostra através do exame direto das fezes, enquanto que a PCR foi positiva para cinco gatos (6,45%). À análise estatística não houve correlação significativa entre positividade para *T. foetus* e sexo, idade, raça, presença de diarreia, histórico de diarreia, tratamento prévio, estilo de vida, ambiente, origem dos animais e presença de coinfeções. O isolado de *T. foetus* mostrou 100% de similaridade com outros isolados do parasito de felino no mundo e revelou polimorfismo num único nucleotídeo (T>C) quando comparado com o isolado de bovino. Devido ao crescente interesse sobre este parasito em gatos, o presente estudo visa contribuir com futuros registros da ocorrência do *T. foetus* em gatos visto que se trata do primeiro estudo sobre sua ocorrência no Brasil.

**Palavras-chave:** parasitos, diarreia, genes de protozoários, reação em cadeia da polimerase.

## OCCURRENCE OF *TRITRICHOMONAS FOETUS* IN CATS FROM REGION OF ARAÇATUBA CITY, SP, BRAZIL

**SUMMARY** - The present study investigated the occurrence of *T. foetus* in cats from Brazil. *T. foetus* is a protozoan that in cats it colonizes the colon resulting in colitis. The major clinical sign is chronic large bowel diarrhea. Infected cats may have spontaneous resolution of diarrhea, but they can remain infected for all life. In veterinary medical practice, there are three most widespread diagnostic methods that identify *T. foetus* in animal feces: direct examination of feces under the microscope, culture and PCR. In the present study, it was compared two diagnosis methods, direct examination of feces and PCR. And also it was done the genetic sequencing. Fecal samples from 129 cats were collected by rectal flush technique. Each sample was examined by optical microscopy (direct examination). The presence of *T. foetus* DNA was verified using PCR by amplification of 347 bases pairs from the primers TFR3 and TFR4. Amplicons of positive cases were sequenced. *T. foetus* was observed in one sample by direct microscopic examination of feces while PCR was positive in five cats (6.45%). Statistical analyses showed no significant associations between *T. foetus* infection and sex, age, breed, presence of diarrhea, history of diarrhea, previous treatment, lifestyle, environment, origin of the animals, and co-infections. The isolate of *T. foetus* showed 100% identical sequences with other *T. foetus* isolates from cats around the world and revealed a single nucleotide polymorphism (T>C) when compared with *T. foetus* isolate from cattle. Due the increasing interest in this parasite in cats, the present study contributes in further reporting the worldwide occurrence of *T. foetus* in cats because it is the first study about its occurrence in Brazil.

**Keywords:** parasites, diarrhea, spores protozoan, polymerase chain reaction.

## 1 INTRODUÇÃO

**O número de pessoas que optam por ter o gato como animal de estimação é cada vez maior.** De acordo com matéria publicada na coluna PME – Pequenas e Médias Empresas, do Jornal Estadão (2012), dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet) apontam que o número de gatos no Brasil cresceu aproximadamente duas vezes mais que o de cães em 2011, 8,19% e 4,08%, respectivamente. Estima-se que existam 19,8 milhões de gatos no Brasil, 6,5 milhões só no Estado de São Paulo. Ainda, **segundo matéria publicada na revista VEJA (TEIXEIRA, 2013),** cães eram mais queridos porque se adaptavam melhor a um mundo que está ficando cada vez mais no passado, casas com quintais espaçosos e famílias numerosas, em que as mães eram donas de casa e cuidavam de tudo. Em muitos países essa cena já é uma raridade, por exemplo, na Alemanha, onde o PIB *per capita* é de 44.100 dólares, há 59% a mais de felinos em relação aos cães, enquanto que em países em desenvolvimento, como a Índia, em que o PIB *per capita* é de 1.500 dólares, há 850% a mais de caninos se comparado ao percentual de gatos. Ou seja, o crescimento do número de gatos como animal de estimação se deve em muito ao fato de o gato ser **mais independente e de fácil manutenção, o que implica em menor gasto, além da fácil adaptação em apartamentos pequenos, possuindo menos restrições em condomínios já que é um animal silencioso. E também, em parte devido à crescente diminuição do preconceito contra esta espécie por parte das pessoas decorrente de boas experiências com gatos de conhecidos e vizinhos (TEIXEIRA, 2013).**

**No entanto, assim como o cão, o gato também exige cuidados veterinários. Entre as doenças que acometem os felinos, a diarreia é uma síndrome muito comum em animais de companhia.** A diarreia possui etiologia variada, podendo ser desencadeada por estresse, distúrbios eletrolíticos, nutricionais, dieta, neoplasia, doença inflamatória, agentes patógenos como

macroparasitos intestinais, bactérias, protozoários, vírus e coinfeções mistas. E a relação entre hospedeiro e parasito que resulte em diarreia é complexa e pode ser afetada por vários fatores (PAYNE; ARTZER, 2009).

O *Tritrichomonas foetus* tem sido apontado como o principal agente etiológico de diarreia crônica em felinos. Sua patogenicidade como agente primário de diarreia em gatos já foi confirmada em muitos estudos (GOOKIN et al., 2001; KUEHNER et al., 2011; LEVY et al., 2003; TOLBERT; GOOKIN et al., 2009). O sinal clínico característico é a diarreia de intestino grosso. A consistência das fezes pode variar de pastosa a semilíquida, com presença de muco e/ou sangue (hematoquezia), diferente da diarreia de intestino delgado em que não há muco e o sangue é digerido (melena). Geralmente, o animal não apresenta perda peso e desidratação. A frequência de defecações fica evidentemente aumentada e muitas vezes os gatos apresentam flatulência, tenesmo, podendo chegar a apresentar incontinência fecal e deposições fora da caixa de areia. Ao exame físico, pode ser observada inflamação do ânus, inchaço e dor à manipulação. A duração da diarreia na maioria dos gatos infectados não altera significativamente a qualidade de vida desses animais, que podem apresentar diarreia por dois anos ou mais, com resolução espontânea da mesma, podendo, contudo, permanecer infectados pela vida toda (ESTEBAN, 2010; GRUFFYDD-JONES et al., 2013; MANNING, 2010; TOLBERT; GOOKIN, 2009; XENOULIS et al., 2013).

A tricomonose felina é rotineiramente diagnosticada após se tornar aparente que a diarreia é não responsiva a terapias de rotina (PAYNE; ARTZER, 2009), geralmente em casos de insucesso após tratamento contra infecção por *Giardia* spp. (FREY et al., 2009). Atualmente, para o diagnóstico de rotina de infecção por *T. foetus* em gatos, três métodos são os mais utilizados e difundidos, sendo eles o esfregaço de fezes com observação direta ao microscópio, o cultivo e a PCR.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *T. foetus* como agente etiológico de diarreia crônica em gatos

A presença de tricomonídeos como o *Pentatrichomonas hominis* e o *T. foetus* no trato gastrointestinal e fezes de gatos foi primeiramente descrita em 1920 (XENOULES et al., 2010), entretanto, somente na década de 90, é que foram relatados os primeiros casos de diarreia em felinos domésticos associada à infecção intestinal por esses dois organismos (GOOKIN et al., 1999). Em 2003, pela técnica da PCR e sequenciamento genético, foi demonstrado que o *T. foetus*, e não o *P. hominis*, era o agente etiológico da tricomonose felina. O *P. hominis* seria comensal no trato intestinal dos gatos (LEVY et al., 2003).

O *T. foetus* é uma espécie de protozoário flagelado anaeróbico que se multiplica por fissão binária (YAO; KÖSTER, 2015), que assim como a *Giardia* spp., a rota de transmissão é fecal-oral (GRUFFYDD-JONES et al., 2013; MANNING, 2010). No entanto, o *T. foetus* não apresenta formação de cistos como observado no ciclo de vida da *Giardia* spp., mas de pseudocistos, menos resistentes no ambiente (GRUFFYDD-JONES et al., 2013).

Mais conhecido por causar doença sexualmente transmissível em bovinos (YULE et al., 1989), a infecção do trato reprodutivo por *T. foetus* nas fêmeas resulta em morte embrionária prematura, aborto e infertilidade com esterilidade permanente (BONDURANT, 1997), e por isso, a origem do nome. O *T. foetus* que infecta o bovino é morfológicamente idêntico ao *T. foetus* que infecta o gato, por este motivo, o nome foi aplicado ao parasito em gatos (YAO; KÖSTER, 2015). Em adição, *T. foetus* ainda seria sinônimo de *Tritrichomonas suis* (DOI et al., 2012; YAO; KÖSTER, 2015), que no suíno, coloniza a cavidade nasal, estômago e ceco, e parece ser comensal nesta espécie, não tendo sido associado como agente etiológico de nenhuma doença (LOPES et al., 1998).



Respectivas análises comparativas de sequenciamento genético sugerem que o *T. foetus* que infecta o felino não é o mesmo que infecta o bovino, assim, seria necessário o reconhecimento do “genótipo felino” e do “genótipo bovino” de *T. foetus* (SLAPETA et al., 2010). Gatos que foram infectados experimentalmente com *T. foetus* isolados de novilhas, demonstraram diferenças significantes quanto à infectividade e patogenicidade do *T. foetus* (STOCKDALE et al., 2007; 2008). No estudo em que novilhas foram infectadas com isolados de *T. foetus* felino, à análise histopatológica revelou que as novilhas apresentaram infecção uterina, porém a doença não se manifestou idêntica e com a mesma severidade da tricomonose bovina sexualmente transmissível (STOCKDALE et al., 2007). Nos gatos infectados com isolados de *T. foetus* bovino, dos seis gatos do estudo, somente um foi infectado, apresentando cultura das fezes positiva para *T. foetus*, mas não exibiu diarreia durante o estudo (STOCKDALE et al., 2008).

Em um estudo mais recente, foram encontradas diferenças de variação intraespecífica na região ITS1 do gene de *T. foetus* em isolados de felinos, o que, segundo os autores, justificaria a nomeação de uma nova espécie, *Tritrichomonas blagburni*, como agente etiológico da tritrichomonose felina (WALDEN et al., 2013).

## 2.2 Patogenia

Há pouca informação disponível sobre os mecanismos de patogenia do *T. foetus* em gatos naturalmente infectados. Até o momento, sabe-se que o *T. foetus* coloniza o lúmen intestinal do cólon, formando colônias próximas à superfície da mucosa (PAYNE; ARTZER, 2009).

Em estudo sobre achados histopatológicos em gatos infectados experimentalmente, foi constatada que a presença de colônias de *T. foetus* próximos à mucosa intestinal, principalmente na região das criptas, desencadeia uma reação inflamatória linfoplasmocitária e neutrofílica

moderada à severa. As células epiteliais da cripta podem encontrar-se hipertrofiadas, hiperplásicas e com aumento da atividade mitótica. Pode haver necrose das células caliciformes, presença de micro abscessos e atrofia da mucosa do cólon. Lesões mais intensas relacionadas com invasão da lâmina própria e camadas mais profundas do cólon também podem estar presentes (YAEGER; GOOKIN, 2005).

Estudos *in vitro* com o *T. foetus* bovino têm sido utilizados para explicar os mecanismos de patogênese em felinos. Esses estudos relatam que existiriam duas relações de contato entre parasito e hospedeiro: a relação de contato dependente e a de contato independente, que em ação conjunta desencadearia a doença. A relação de contato dependente se daria através da adesão do parasito à mucosa induzindo a apoptose das células epiteliais intestinais por meio de proteases produzidas pelas próprias células. Enquanto que a relação de contato independente ou citotóxico ocorreria decorrente da presença do parasito no lúmen intestinal por meio da produção de proteases extracelulares que também induziriam a apoptose celular (GRUFFYDD-JONES et al., 2013; YAO; KÖSTER, 2015).

### 2.3 Fatores de risco

Alguns fatores de risco têm sido associados à infecção de gatos por *T. foetus*, como idade e ambientes multigatos.

Gatos mais jovens, com menos de um ano de idade, parecem mais susceptíveis ao *T. foetus* (BELL et al., 2010; GRUFFYDD-JONES et al., 2013; GUNN-MORE et al., 2007; MANNING, 2010), talvez pelo sistema imunológico imaturo que os deixam mais vulneráveis à infecção (STOCKDALE et al., 2009). Gatos adultos geralmente são assintomáticos (TOLBERT; GOOKIN, 2009; XENOULIS et al., 2010), assim, nem toda infecção por *T. foetus* em gatos está associada com presença de diarreia (GRUFFYDD-JONES et al., 2013).

A convivência em ambientes multigatos é relatada por vários autores como principal fator de risco (BELL et al., 2010; DOI et al., 2012; GOOKIN et al., 2004; GRUFFYDD-JONES et al., 2013; HOLLIDAY et al., 2009; HOSEIN et al., 2013; KINGSBURRY et al., 2010; KUEHNER et al., 2011; MANNING, 2010; MIRÓ et al., 2011; PHAM, 2009; PROFIZI et al., 2013; TYSNES et al., 2011; XENOULIS et al., 2010; YAO; KÖSTER, 2015), uma vez que os pseudocistos de *T. foetus* têm capacidade limitada de sobrevivência fora do gato, não persistindo por um longo período de tempo no ambiente (GRUFFYDD et al., 2013; HALE et al., 2009; TOLBERT; GOOKIN, 2009). E por essa razão, o contato próximo é muito importante para facilitar a disseminação do parasito (HOUSEIN et al., 2013; MIRÓ et al., 2011), principalmente através da lambertura mútua, quando um felino higieniza o outro (BELL et al., 2010; TOLBERT; GOOKIN, 2009; TYSNES et al., 2011).

#### 2.4 Tratamento

Até o momento, a única droga efetiva para o *T. foetus* é o ronidazol, que até então não é aprovado para uso em animais de companhia, embora o composto químico se encontre disponível para formulação (LIM et al., 2012).

O ronidazol pertence ao mesmo grupo de drogas como o metronidazol e o tinidazol (PHAM, 2009). A dose indicada é de 20 a 30mg/Kg, via oral, a cada 24 horas, durante 14 dias (BELL et al., 2010; MANNING, 2010; PHAM, 2009).

Efeitos adversos, incluindo neurotoxicose, podem acontecer quando a dose máxima é ultrapassada. Gatos podem exibir ataxia, tremores, fraqueza nos membros pélvicos e hiperestasia a estímulos externos. Com a suspensão do tratamento, há a melhora do quadro clínico apresentado pelo animal decorrente da neurotoxicose (PHAM, 2009).

## 2.5 Infecção por *T. foetus* no trato reprodutivo de gatos

Já foi descrito um relato de caso sobre a presença de *T. foetus* em trato reprodutivo de uma gata associada à endometrite e piometra. Contudo, é plausível que a hiperestrogenemia decorrente da administração de anticoncepcional tenha resultado na abertura do cérvix uterino e consequente, infecção do trato reprodutivo através da higienização mútua entre os felinos, uma vez que outros gatos do mesmo local apresentavam diarreia causada por *T. foetus* (DAHLGREN et al., 2007).

## 2.6 Potencial zoonótico

A infecção de diferentes hospedeiros por *T. foetus* levanta a questão de seu potencial zoonótico (PROFIZI et al., 2013). A infecção por *T. foetus* em humanos é rara. Até o momento, três casos foram relatados e em todos eles as pessoas infectadas apresentavam comprometimento do sistema imunológico. Em um dos casos, existiu a suspeita, enquanto que nos outros dois casos o *T. foetus* foi o responsável pela infecção, não sendo esclarecida a rota de transmissão. Um dos indivíduos de um dos casos de infecção comprovada morava numa fazenda com muitos porcos, cavalos e gatos (YAO, 2012).

## 2.7 Ocorrência mundial

A ocorrência do *T. foetus* em gatos tem sido registrada em vários países como Estados Unidos da América (STOCKDALE et al., 2009), Reino Unido (GUNN-MORE et al., 2007), Itália (HOLLIDAY et al., 2009), Suíça (FREY et al., 2009), Coréia do Sul (LIM et al., 2010), Austrália (BELL et al., 2010), Nova Zelândia (KINGSBURRY et al., 2010), Grécia (XENOULES et al., 2010), Alemanha (KUEHNER et al., 2011), Noruega (TYSNES et al., 2011), Espanha (MIRÓ et al., 2011), Japão (DOI et al., 2012), Canadá (HOSEIN et al., 2013) e

França (PROFIZI et al., 2013). Tantos estudos recentes sobre esse parasito em gatos podem sugerir que a tricomonose felina se trata de uma doença emergente, porém, o aumento na frequência do diagnóstico de *T. foetus* em gatos pode estar relacionado ao aumento no conhecimento entre os veterinários e melhora dos métodos diagnósticos, mais do que um aumento na incidência (TYSNES et al., 2011).

## 2.8 Justificativa e objetivo geral

Devido ao crescente interesse nesse protozoário em medicina felina e tendo em vista a falta de estudos sobre a ocorrência do parasito em gatos no Brasil, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a ocorrência do *T. foetus* em gatos na região do município de Araçatuba – SP, Brasil, por meio do exame direto das fezes e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e também realizar o sequenciamento genético do parasito.

### 2.8.1 Objetivos específicos

- Determinar se existe concordância entre os dois meios diagnósticos, o exame direto de fezes e PCR;
- Avaliar se existe relação entre positividade para *T. foetus* e sexo, idade, raça, presença de diarreia no momento da colheita de fezes, histórico de diarreia, tratamento prévio, origem dos animais, estilo de vida, ambiente multigatos e presença de coinfeções;
- Realizar a avaliação hematológica dos gatos estudados e verificar se existe relação entre a positividade para *T. foetus* e os achados laboratoriais.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Animais

O estudo foi composto por 129 gatos escolhidos por conveniência que incluíam machos e fêmeas, entre jovens, com menos de um ano de idade, e adultos, com mais de um ano de idade. Filhotes com menos de dois meses de idade foram excluídos do estudo por ser um período em que os mesmos estão sob os cuidados maternos de higienização. Não houve critério de seleção de raça, mesmo que os nossos gatos locais de pelo curto sejam reconhecidos internacionalmente pela *World Cat Federation* desde 1998 como “Brazilian Shothair”, no presente estudo os gatos foram categorizados como sem raça definida (SRD) pela ausência de pedigree. Buscaram-se animais provenientes de diferentes populações de gatos, considerando a origem e o estilo de vida, residentes na região do município de Araçatuba – SP, Brasil.

Foi feita uma parceria com Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba em que foi possível ter acesso a algumas colheitas, onde estava sendo oferecida castração gratuita de felinos de posse de proprietários carentes, acumuladores e de organizações não governamentais de proteção animal (ONGs) do município.

#### 3.2 Colheita de fezes

A colheita de fezes foi feita por meio da técnica de lavado retal (disponível em: <https://cvm.ncsu.edu/research/labs/clinical-sciences/tfoetus>), que consistiu na infusão de 10mL de solução fisiológica 0.9% com uso de uma seringa acoplada a uma sonda uretral nº8. A solução fisiológica foi injetada diretamente na ampola retal do animal, então, aspirada de volta à seringa. O material colhido foi, então, transferido para um tubo *vacutainer* e mantido em temperatura ambiente para precipitação. Todas as amostras coletadas foram

analisadas em microscopia em até 6 horas após a colheita (HALE et al., 2009). Para tal, uma gota do precipitado de cada amostra fecal foi analisada em lâmina sob lamínula ao microscópio óptico com baixa intensidade luminosa resultante da descida do condensador em objetivas de 10x e 40x - exame direto das fezes (GRUFFYDD-JONES et al., 2013; TOLBERT; GOOKIN, 2009;). Em até 24 horas e conservados ainda em temperatura ambiente, foi feita a extração de DNA a partir dos lavados retais utilizando o *kit* comercial ZR Fecal DNA Kit, Zymo Research, Orange, CA (STAUFFER et al., 2008). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

### 3.3 PCR para *T. foetus*

A presença de DNA de *T. foetus* foi detectada por meio da amplificação de 347 pares de bases (pb) a partir de um par de iniciadores específicos (“primers”), TFR3 e TFR4, 5'- CGG GTC TTC CTA TAT GAG ACA GAA CC - 3' e 5' - CCT GCC GTT GGA TCA GTT TCG TTA A - 3' respectivamente, para amplificação de fragmento de DNA localizado entre os espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 (FELLEISEN et al., 1998).

Para a reação de amplificação foi preparada solução com volume final de 25µL contendo 500nM de cada *primer*, 0.2mM de solução de deoxinucleotídeos (A, C, T e G), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5µL de tampão 10x, 0.5U de *Taq* DNA polimerase (*Platinum*®) e 2µL da amostra de DNA extraído. O DNA de *T. foetus* usado como controle positivo foi comprado comercialmente (VetMAX™ *T. foetus* Control, INVITROGEN) e para controle negativo foi usado água ultra pura (SIGMA-ALDRICH). Desta forma seria possível identificar falha do ensaio (controle positivo) ou de contaminação do reagente (controle negativo).

A amplificação em termociclador (*Mastercycler eppendorf, Realplex*<sup>2</sup>) seguiu as condições estabelecidas por Gookin et al. (2002) com modificação mínima, em que foi feita desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos,

desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 67°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, repetidamente por 50 ciclos, seguida por extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### 3.4 PCR para *Giardia* spp.

A presença de DNA de *Giardia* spp. foi investigada por meio da amplificação de 768-pb a partir dos *primers* GDH1 e GDH4 (gene codificador da glutamato desidrogenase), 5' - ATC TTC GAG AGG ATG CTT GAG - 3' e 5'- AGT ACG CGA CGC TGG GAT ACT - 3' (HOMAN et al., 1998). Para a reação de amplificação foi preparada solução com volume final de 25µL contendo 200nM de cada *primer*, 0.2mM de solução de deoxinucleotídeos, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5µL de tampão 10x, 0.5U/µL de *Taq* DNA polimerase (*Platinum*®), 0.6µg/µL de BSA e 2.5µL da amostra de DNA extraído.

A amplificação seguiu como as condições estabelecidas por Homan et al. (1998) em termociclador, onde foi realizada desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, repetidamente por 35 ciclos, seguida por extensão final a 72°C por 7 minutos.

#### 3.5 Nested-PCR para *Cryptosporidium* spp.

A presença de RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. foi investigada por meio da amplificação de aproximadamente 1325-pb na reação primária a partir dos *primers* 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG - 3' e 5' - CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA - 3'; e 840-pb na reação secundária a partir dos *primers* 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG - 3' e 5' - AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3' (XIAO et al., 1999a, 2000).



Para a reação de amplificação da reação primária foi preparada solução com volume final de 25 $\mu$ L contendo 200nM de cada *primer*, 0.2mM de solução de deoxinucleotídeos, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 $\mu$ L de tampão 10x, 0.5U/ $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase (*Platinum*®), 0.5pmol/ $\mu$ L de BSA e 2.5 $\mu$ L da amostra de DNA extraído. Para a reação de amplificação da reação secundária foi preparada solução com volume final de 25 $\mu$ L contendo 200nM de cada *primer*, 0.2mM de solução de deoxinucleotídeos (A, C, T e G), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 $\mu$ L de tampão 10x, 0.5U/ $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase e 2.5 $\mu$ L da reação primária amplificada. Para amplificação das reações primária e secundária foi realizada desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, por 39 ciclos, seguida por extensão final a 72°C por 7 minutos.

### 3.6 Eletroforese

Após reação de amplificação, os “amplicons” foram visualizados com uso de luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose 1.5% a partir de 10 $\mu$ L da solução de reação diluído com 1 $\mu$ L de *Gel Red* (10.000X, BIOTIUM) dissolvido em solução tampão de fosfato (PBS), conforme instruções do fabricante.

### 3.7 Sequenciamento genético

Os produtos de reação de cada amostra positiva à PCR foram purificados utilizando o kit comercial Gel Extraction Kit, QIAquick® (QIAGEN) e submetidos à análise da concentração e da qualidade do DNA através de espectrofotômetro. As amostras foram, então, encaminhadas para o sequenciamento do DNA para o CREBIO do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal - SP. A identidade dos isolados foi conferida através de

comparações com outras sequências genéticas utilizando a plataforma BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) disponíveis no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Para caracterização do *T. foetus*, os isolados obtidos foram comparados com as sequências de *T. foetus* bovino, GenBank acesso U85967 (FELLEISEN et al., 1998) e de *T. blagburni*, GenBank acessos EU569301 a EU569312 (WALDEN et al., 2013).

### 3.8 Hematologia

Foi colhido sangue para a realização de hemograma completo de todos os animais amostrados. Os acessos venosos foram as veias cefálica ou femoral, sendo colhidos 0,5mL de sangue. O sangue colhido foi armazenado em tubo *vacutainer* com EDTA, refrigerado, e encaminhado em menos de 24 horas a um laboratório de patologia clínica para respectiva análise.

### 3.9 Análise estatística

A concordância entre os métodos diagnósticos foi calculada utilizando o coeficiente *kappa* ( $\kappa$ ) (CONRATHS & SCHARES, 2006). Para avaliar a correlação entre positividade à PCR para *T. foetus* e sexo, idade, raça, presença de sinais clínicos, histórico de diarreia, tratamento prévio, origem dos animais, estilo de vida, ambiente multigatos e coinfeções, foi usado o teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos felinos

Das 129 amostras colhidas no presente estudo, 83 gatos eram fêmeas, 80 eram adultos e 126 sem raça definida (SRD), conforme pode ser observado na Tabela 1. Sobre os sinais clínicos, 106 gatos não apresentavam diarreia no momento da colheita das fezes. Destes, foi possível obter o histórico clínico de 40 animais, 14 tinham apresentado histórico de diarreia, sendo que três tinham sido tratados anteriormente para *Giardia* spp. sem sucesso ao tratamento. Do total, 59.7% viviam em ambientes com mais de um gato. As informações sobre a distribuição dos felinos de acordo com a presença de diarreia, histórico de diarreia, tratamento prévio e ambiente multigatos, podem ser observadas na Tabela 2.

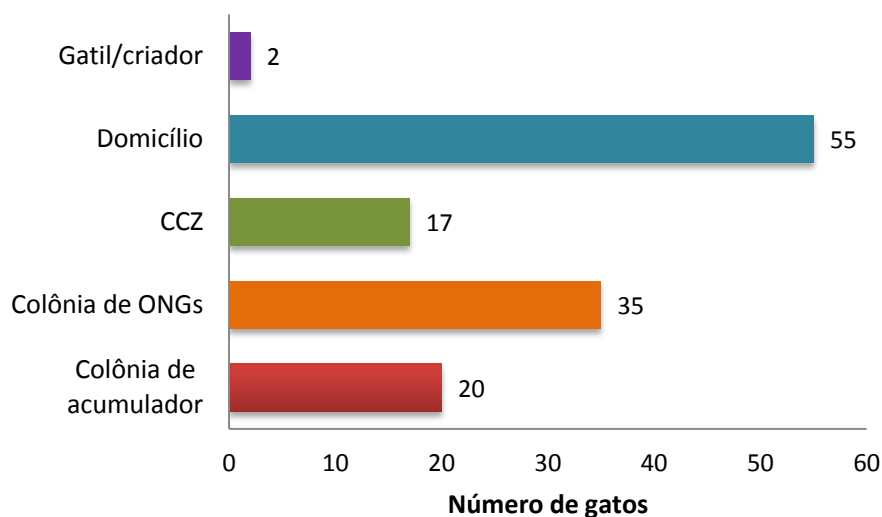
Quanto à origem, 20 gatos eram provenientes de uma colônia de resgate de uma pessoa acumuladora de animais, 35 eram de colônias de resgate de organizações não governamentais (ONGs), 17 eram do CCZ, 55 eram de domicílios e dois eram de um gatil criador de Persas (Gráfico 1). Sobre o estilo de vida, 61 gatos viviam exclusivamente fechados, 36 tinham acesso à rua, ambos em áreas urbanas, e nove viviam na zona rural (Gráfico 2).

**Tabela 1** - Distribuição dos gatos de acordo com o sexo, idade e raça

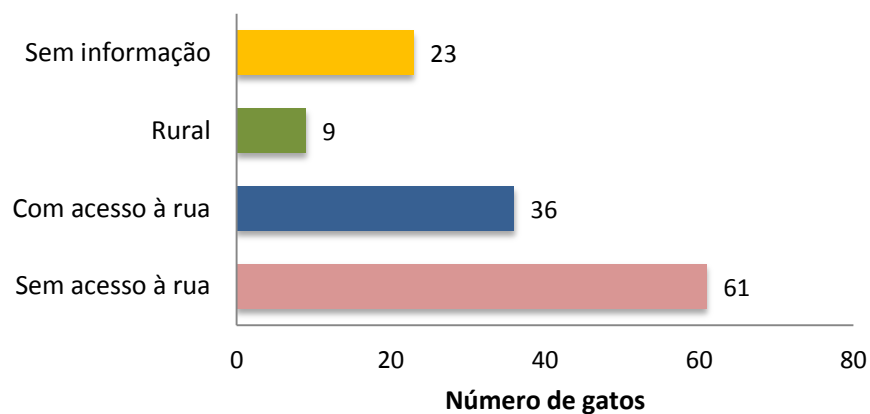
	Nº de gatos	%
Fêmeas	83	64,3
Machos	46	35,7
Jovens	49	38,0
Adultos	80	62,0
SRD	126	97,7
Raça pura	3	2,3
<b>Total</b>	<b>129</b>	<b>100</b>

**Tabela 2** - Distribuição dos gatos de acordo com a presença de diarreia, histórico de diarreia, tratamento prévio e ambiente multigatos

	<b>Sim</b>	<b>%</b>	<b>Não</b>	<b>%</b>	<b>Sem informação</b>	<b>%</b>
Diarreia	19	14,7	110	85,3	-	-
Histórico de diarreia	14	10,9	24	18,6	91	70,5
Tratados	3	2,3	55	42,6	71	55,0
Multigatos	77	59,7	7	5,4	45	34,9



**Gráfico 1** - Distribuição dos gatos de acordo com a origem



**Gráfico 2** - Distribuição dos gatos de acordo com o estilo de vida

#### 4.2 Análise das fezes por meio do exame direto

*T. foetus* foi observado em uma amostra (nº 73) ao exame direto de fezes. Foram observados vários trofozoítos piriformes, translúcidos, com bastante motilidade, exibindo movimento progressivo errático.

Em uma amostra (nº 1) foram observados trofozoítos piriformes, translúcidos, porém exibindo movimento similar a uma “folha caindo”, compatível com *Giardia* spp.

Também foram observados ovos de *Toxocara* spp. e *Ancylostoma* spp., oocistos de *Isospora* spp., proglotes de *Dipylidium caninum* e larvas de *Aelurostrongylus abstrusus* em 19 amostras, sendo que 11 eram gatos adultos e 7 jovens. Apenas um gato jovem apresentava diarreia no momento da colheita das fezes. Destas 19 amostras, três felinos apresentaram coinfeção por dois enteroparasitos, em um felino havia coinfeção por *Ancylostoma* spp. e *Isospora* sp.; e nos outros dois, *Ancylostoma* spp. e *Dipylidium caninum*.

#### 4.3 Pesquisa do DNA e sequenciamento genético do *T. foetus*

Em cinco felinos (6,45%) a PCR confirmou a presença de DNA de *T. foetus* nas fezes, incluindo a amostra positiva ao exame direto. As informações sobre os gatos positivos se encontram nas Tabelas 3 e 4.

O sequenciamento do isolado de *T. foetus* do gato nº 73 (positivo ao exame direto das fezes) mostrou 100% de similaridade com as sequências disponíveis no GenBank acessos: JN006994 (REINMANN et al., 2012); AF466749 (LEVY et al., 2003), em que se confirmou o *T. foetus* como agente etiológico de diarreia crônica em gatos; JX960422 (PROFIZI et al., 2013), isolado de felino proveniente da França; HM856630 (TYSNES et al., 2011), isolado de felino da Noruega; EF165538 (DAHLGREN et al., 2007), isolado do útero de uma gata com piometra também na Noruega; GU170216 (SLAPETA et al., 2010) e JX187000 (SLAPETA et al., 2012), isolados de felinos provenientes da Austrália, classificados como “genótipo felino”; e EU569309

(STOCKDALE et al., 2007; WALDEN et al., 2013), isolado dos Estados Unidos da América.

As comparações entre as sequências do “genótipo felino” e do “genótipo bovino” no presente estudo revelaram polimorfismo num único nucleotídeo (T>C) na região ITS2, caracterizando o isolado como “genótipo felino”.

**Tabela 3** - Características individuais e ambientais dos gatos positivos para *T. foetus*.

Nº	Sexo	Idade	Raça	Diarreia	Histórico diarreia	Tratado	Ambiente	Multigatos	Outros positivos
30	M	Adulto	SRD	Não	Não	Não	Interno	Sim	Não
63	M	Adulto	SRD	Não	Sim	Não	Interno	Sim	Não
66	F	Adulto	SRD	Sim	*	*	Interno	Sim	*
73	F	Adulto	SRD	Não	*	*	Interno	Sim	*
74	F	Jovem	SRD	Não	*	*	Externo	*	*

\*Sem informação

**Tabela 4** – Resultados do exame direto das fezes, pesquisa de outros patógenos intestinais e achados de hematologia dos gatos positivos para *T. foetus*.

Nº	Exame direto das fezes	PCR <i>Cryptosp.</i>	PCR <i>Giardia</i>	Programa de castração do CCZ	Hematologia
30	Negativo	Negativo	Negativo	Não	Eosinofilia moderada
63	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Sem alterações
66	Negativo	Negativo	Positivo	Sim	Linfopenia leve
73	<i>T. foetus</i>	Negativo	Positivo	Sim	Leucocitose leve por neutrofilia e eosinofilia
74	Negativo	Positivo	Positivo	Sim	Sem alterações

#### 4.4 História clínica dos gatos positivos para *T. foetus*

O gato nº 30 vivia em uma colônia de resgate de propriedade de uma pessoa acumuladora, com alta densidade de animais, e por este motivo, não foi

possível testar todos os gatos do local porque novos gatos chegavam frequentemente à colônia.

O gato nº 63 vivia exclusivamente em um apartamento com outros três gatos que também foram testados, mas no passado, convivia com muito mais gatos e teve acesso irrestrito à rua.

O nº 74 era uma gata de rua, foi capturada por uma ONG somente para a castração e foi libertada após o procedimento cirúrgico.

#### 4.5 Pesquisa do DNA de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e respectivos sequenciamentos genéticos

Os gatos nº 63, 66, 73 e 74 apresentaram coinfeção por *Giardia* spp. O sequenciamento do isolado do gato nº66, único viável para o procedimento, mostrou 99% de similaridade para *Giardia duodenalis assemblage F*, GenBank acesso AB569373 (SUZUKI et al., 2011).

O gato nº 74 foi positivo para *Cryptosporidium* spp. à PCR. O sequenciamento do isolado deste parasito mostrou 100% de similaridade para *C. felis*, GenBank acesso AF112575 (XIAO et al., 1999b).

#### 4.6 Achados de hematologia

De 129 amostras de sangue, 14 estavam impróprias para a realização do exame de sangue. 45 gatos não apresentaram nenhuma alteração. Nos gatos positivos para *T. foetus*, os achados de hematologia foram diversos. Mesmo nos gatos em que foram detectados outros enteroparasitos, os achados também foram diversos.

#### 4.7 Resultados estatísticos

De acordo com o teste *Kappa*, foi encontrada fraca concordância (0,324) entre os dois métodos diagnósticos. Não foi encontrada correlação entre positividade à PCR para *T. foetus* e sexo, idade, raça, presença de sinais clínicos, histórico de diarreia e tratamento prévio. Também não houve correlação com a origem dos animais, estilo de vida, ambiente multigatos e coinfeccções.

### 5 DISCUSSÃO

Não há nenhum outro estudo sobre a ocorrência do *T. foetus* em gatos no Brasil. O presente estudo amostrou gatos de diferentes grupos, jovens e adultos, com e sem diarreia, de várias origens e com estilo de vida diversificado e a ocorrência foi de 6,45% - 5/129. Mundialmente, a ocorrência deste parasito tem variado entre os países. Essa variação é decorrente de dois fatores: 1) Escolha da população de gatos a ser estudada; e 2) Método diagnóstico (GRUFFYDD-JONES et al., 2013). Sendo que, já foi relatado desde 6,2% - 15/241 - em um estudo comparando a ocorrência de *T. foetus* em gatos provenientes de exposição, de sociedade de proteção animal e atendidos em clínica veterinária (HOSEIN et al., 2013), a 82% - 18/22 - somente em gatos de raça pura de exposições (KINGSBURRY et al., 2010).

Embora não tenha sido encontrada nenhuma correlação entre positividade da PCR para *T. foetus* e sexo, idade, raça, presença de diarreia no momento da colheita das fezes, histórico de diarreia, tratamento prévio, origem dos animais, estilo de vida, ambiente multigatos e presença de coinfeccções, algumas destas relações devem ser consideradas com cautela, principalmente presença e/ou histórico de diarreia e ambiente multigatos.



No presente estudo, foram detectados cinco felinos positivos para *T. foetus* através da PCR, sendo que, destes, quatro não apresentavam diarreia no momento da colheita das fezes, concordando com a literatura onde alguns gatos podem apresentar remissão da diarreia, porém, ainda terão evidências da infecção por *T. foetus* à PCR (GRUFFYDD-JONES et al., 2013; TOLBERT; GOOKIN, 2009; YAO; KÖSTER, 2015).

Xenoules et al. (2010) e Tysnes et al. (2011) que estudaram exclusivamente gatos assintomáticos, verificaram alta prevalência de histórico de diarreia nos felinos positivos. Hosein et al. (2013) que não encontraram presença de diarreia ou mesmo histórico clínico em felinos adultos positivos para *T. foetus*, encontraram que os contactantes tinham apresentado diarreia nos últimos seis meses. Então, ao investigar *T. foetus* em um gato, se houve histórico de diarreia durante este período seja do próprio gato a ser investigado ou de outro contactante, há uma chance três vezes maior de esse gato ser positivo para *T. foetus* (YAO; KÖSTER, 2015).

Ainda, no presente estudo, quatro dos cinco gatos positivos conviviam com outros gatos. E, geralmente, a infecção por *T. foetus* está relacionada como resultado das condições de criação em ambiente multigatos, previamente descrito como principal fator de risco para disseminação do parasito (BELL et al., 2010; HOLLIDAY et al., 2009; KUEHNER et al., 2011; PHAM, 2009). Assim, a triagem de portadores assintomáticos como possíveis fontes de infecção deve ser considerada nesse tipo de ambiente (HALE et al., 2009; MIRÓ et al., 2011; XENOULIS et al., 2010). Simultaneamente, o estresse gerado pela pressão ambiental, aumentado quando há superlotação, como em abrigos e colônias de resgate (HOLLIDAY et al., 2009; KUEHNER et al., 2011; SABSHIN et al., 2012), fator este que poderia desencadear episódios de diarreia até mesmo em felinos assintomáticos (KUEHNER et al., 2011).

Em um estudo conduzido por Xenoulis et al. (2013) sobre gatos adultos positivos para *T. foetus* domiciliados, que viviam exclusivamente sozinhos, os autores sugerem que um gato pode vir a ter diarreia anos após a infecção, desde que o gato tenha convivido em ambiente multigatos quando filhote.

Apesar de Gookin et al. (2004) afirmarem que o acesso à rua não é um fator de risco significativo para a infecção por *T. foetus*, no presente estudo dois casos específicos, os gatos nº 63 e nº 74, chamam a atenção justamente porque a rota de infecção poder estar associada a esse estilo de vida. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar essa questão.

No presente estudo, 127 gatos eram sem raça definida. Muitos estudos fizeram relato da tricomonose em felinos de raça pura. Entre as mais citadas, as de pelo longo, são: o Gato da Floresta Norueguesa, a Maine Coon e a Persa, e entre as raças de pelo curto: a Abyssinian, a Siamesa e o pelo curto doméstico local (BELL et al., 2010; DOI et al., 2012; FREY et al., 2009; GUNN-MORE et al., 2007; KINGSBURY et al., 2010; KUEHNER et al., 2011; LIM et al., 2010; MIRÓ et al., 2011; PROFIZI et al., 2013; TYSNES et al., 2011). Somente Holliday et al. (2009) apresentou estudo em que a maioria dos felinos eram sem raça definida provenientes de um abrigo.

De acordo com Yao e Köster (2015), a possível predisposição racial levantada por alguns estudos como fator de risco para infecção por *T. foetus*, não é válida, pois, dependendo da localidade, cada estudo pode sofrer a interferência da popularidade de uma determinada raça (YAO; KÖSTER, 2015). Além do que, gatos de raça pura se infectariam mais porque comumente estão em contato com gatos de outros gatis ou participantes de exposições (TYSNES et al., 2011). Hosein et al. (2013) ao comparar diferentes populações de gatos provenientes de exposição, de sociedade de proteção animal e atendidos em clínica veterinária, encontraram diferença significativa na prevalência de infecção por *T. foetus* na população de exposição - 23,6% - se comparada com a de gatos atendidos na clínica - 0,7%. E ainda, gatos sem raça gastariam quatro vezes mais tempo fora de casa do que gatos de raça pura, e talvez por esse motivo a tricomonose felina seja mais diagnosticada em raças puras do que em gatos sem raça, uma vez que a observação das fezes e, conseqüente diagnóstico, é mais difícil nesses animais (BELL et al., 2010).

Apesar da alta ocorrência do parasito em determinadas populações susceptíveis de gatos, este é o primeiro estudo que incluiu gatos de zona rural.

Qual a rota de transmissão do parasito, se do bovino para o felino ou o inverso, ainda é uma questão bastante discutida por alguns autores (REINMANN et al., 2012; SLAPETA et al., 2010; 2012; STOCKDALE et al., 2007; 2008). Levando em consideração o *T. foetus* como agente causador de diarreia crônica em gatos, ou seja, diarreia de longa duração, associado ao evento de que o gato pode transitar entre infecção clínica (presença de diarreia) para infecção subclínica e vice-versa, demonstra que a relação entre hospedeiro e parasito já está estabelecida há muito tempo, ou seja, o *T. foetus* que acomete bovino, certamente não é mais o mesmo que acomete felino. O sequenciamento genético do isolado do presente estudo revelou polimorfismo num único nucleotídeo (T>C) na região ITS2 quando comparado com isolado de bovino, que, de acordo com classificação proposta por Slapeta et al. (2010) e Reinmann et al. (2011), permite classifica-lo como “genótipo felino”. Todavia, estudos moleculares ainda discordam a respeito da identidade genética do *T. foetus* (YAO; KÖSTER, 2015). Assim, estudos futuros com um número maior de gatos exclusivamente rurais, seriam de grande valia para melhor elucidar essa relação epidemiológica entre o gato e animais de fazenda.

Sobre os achados de hematologia dos gatos positivos, não foi observado um padrão comum que possa ser associado à infecção por *T. foetus*. Manning (2010) afirma que nenhuma anormalidade é observada rotineiramente à análise hematológica de gatos infectados com *T. foetus*. Geralmente, um aumento do número de eosinófilos pode estar associado a intenso parasitismo gastrointestinal (CENTER et al., 1990). Porém, a eosinofilia, assim como os outros achados observados nos gatos positivos no presente estudo, podem não ter relação com a infecção por *T. foetus*. Assim, é necessária uma investigação mais detalhada sobre a saúde dos animais em questão.

A coinfeção por outros enteroparasitos não foi identificada através do exame direto de fezes nos gatos positivos para *T. foetus*, contudo, foram detectadas coinfeções por *Cryptosporidium felis* (n=1) e *Giardia* spp. (n=4). Outros estudos já relataram coinfeção por *Giardia* spp. (BISSETT et al., 2008; GOOKIN et al., 2004; KINGSBURRY et al., 2010; STOCKDALE et al., 2009;

XENOULIS et al., 2013), *Cryptosporidium* spp. (STOCKDALE et al., 2009), coccídios como *Isospora* sp. (PHAM, 2009; STOCKDALE et al., 2009; XENOULIS et al., 2013), *Sarcocystes* spp. (KINGSBURY et al., 2010) e *Toxoplasma gondii* (MIRÓ et al., 2011). Sendo que as coinfeções mais comuns são por *Giardia* spp. e coccídios em geral (TOLBERT; GOOKIN, 2015). Em gatos com coinfeção por *Cryptosporidium* spp. há um aumento da severidade da diarreia e, concomitantemente, um aumento na disseminação do *T. foetus* (GOOKIN et al., 2001).

A sensibilidade do exame direto de fezes se mostrou muito menor quando comparada à da PCR, similar ao observado em outros estudos (GOOKIN et al., 2004; HOLLIDAY et al., 2009; MIRÓ et al., 2011; TYSNES et al., 2011). BELL et al. (2010) foram os únicos autores que não encontraram diferença significativa quanto à sensibilidade entre os três métodos diagnósticos, exame direto das fezes, cultivo e PCR.

O diagnóstico através do exame direto depende da visualização do organismo vivo, em fezes frescas, preferencialmente diarreicas. É o método diagnóstico mais barato e rápido para o clínico veterinário (GOOKIN et al., 2002). Entretanto, é bastante difícil distinguir os trofozoítos vivos de *T. foetus* de outros, como o *Pentatrichomonas hominis* (GOOKIN et al., 2007; YAO; KÖSTER, 2015). Os trofozoítos de *T. foetus* tem tamanho similar ao da *Giardia* spp., ambos tem formato piriforme, porém o *T. foetus* apresenta movimento enérgico e progressivo, em contraste com o movimento de “folha caindo” da *Giardia* spp. (PHAM, 2009).

O diagnóstico molecular representa uma opção atrativa na ausência de organismos viáveis em amostras fecais, reduzindo assim o diagnóstico de falsos-negativos (DOI et al., 2012; HOLLIDAY et al., 2009; TYSNES et al., 2011) e, até mesmo, o diagnóstico positivo equivocado através de outros métodos como o exame direto das fezes e cultivo (MIRÓ et al., 2011). Contudo, o diagnóstico através da PCR demanda tecnologia e tem um custo elevado (HALE et al., 2009), e assim como outras ferramentas de diagnóstico, também apresenta limitações. Amostras fecais de gatos apresentam grande quantidade

de inibidores, como bilirrubinas, sais de bile, carboidratos complexos, que frequentemente são extraídos concomitantemente com o DNA do patógeno e reduziram a sensibilidade da PCR (GOOKIN et al., 2007). GOOKIN et al. (2002; 2007) utiliza o QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA) para a extração de DNA, porém, modificado, justamente para a eliminação desses inibidores da PCR. Contudo, STAUFFER et al. (2008) verificaram que o ZR Fecal DNA kit (Zymo Research, Orange, CA) foi o melhor dentre os quatro métodos avaliados para extração de DNA na detecção do *T. foetus*,

Outro fator que pode interferir na detecção do *T. foetus* nas fezes e resultaria em falso-negativos é a eliminação intermitente do parasito durante os episódios de diarreia associada a uma única colheita das fezes (HOUSEIN et al., 2013). Para sanar essa dificuldade diagnóstica, em se tratando de pesquisa de parasitos intestinais, o ideal é a colheita de fezes seriadas, no mínimo três colheitas intercaladas (THURMOND; JOHNSON, 2004). No presente estudo, colheitas seriadas se tornaram inviáveis principalmente por causa de limitações práticas, como a ausência de uma política de rastreamento dos animais.

## 6 CONCLUSÃO

- Este é o primeiro estudo sobre a ocorrência do *Tritrichomonas foetus* em gatos no Brasil e seu respectivo sequenciamento genético;
- O sequenciamento genético foi similar a outros isolados do parasito de felinos no mundo, sendo o parasito identificado como *T. foetus* “genótipo felino”;
- A PCR apresentou maior sensibilidade que o exame direto das fezes;
- A avaliação hematológica não apresentou um padrão que possa auxiliar como exame complementar diagnóstico;

- Embora não tenha sido encontrada correlação entre positividade para *T. foetus* e as características individuais e ambientais listadas no presente estudo, assim como a presença de coinfeções, algumas dessas relações devem ser consideradas com cautela;
- A infecção por *T. foetus* deve ser considerada como diagnóstico diferencial em gatos com diarreia residentes no país;
- O diagnóstico de portadores assintomáticos como fontes de infecção deve ser realizado em ambientes multigatos.

## 7 REFERÊNCIAS

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.

BISSETT, S.; GOWAN, R.; O'BRIEN, C.; STONE, M. R.; GOOKIN, J. L. Feline diarrhoea associated with *Tritrichomonas cf 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 Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, p.345-361, 1997.

CENTER, S. A.; RANDOLPH, J. F.; ERB, H. N.; REITER, S. Eosinophilia in the cat: a retrospective study in 312 cats (1975 to 1986). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.26, p.349-358, 1990.

CONRATHS, F.J.; SCHARES, G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.91-98, 2006.

DAHLGREN, S. S.; GJERDE, B.; PETTERSEN, H. Y. First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus. **Journal of Small Animal Practice Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p. 654-657, 2007.

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. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 74, n. 4, p. 413-417, 2012.

ESTADÃO PME. **Dono de petshop deve estar atento: gatos ganham espaço dos cães como animais de estimação.** Disponível em: <<http://pme.estadao.com.br/noticias/noticias,dono-de-petshop-deve-estar-atento-gatos-ganham-espaco-dos-caes-como-animais-de-estimacao,18770.html>>. Acesso: fev.2015.

ESTEBAN, D. *Tritrichomonas foetus* como agente etiológico de diarreia en el gato. **Revista Clínica Veterinaria de Pequeños animales**, v. 30, n. 2, p. 101-106, 2010.

FELLEISEN, R. S. J; LAMBELET, N; BACHMANN, P.; NICOLET, J.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. **Journal of Microbiology**, v.36, n.02, p.513-519, 1998.

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.

GOOKIN, J. L.; LEVY, M. G.; LAW, J.M. Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1690-1697, 2001.

GOOKIN, J. L.; STAUFER, 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, 2007.

GOOKIN, J. L.; BIRKENHEUER, J. A.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEVY, M. G. Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.10, p.4126-4130, 2002.

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.; STEBBINS, M.E.; HUNT, E.; BURLONE, K.; FULTON, M.; HOCHERL, R.; TALAAT, M.; POORE, M.; LEVY, M. G. Prevalence and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. **Journal of Clinical Microbiology**; v.42, p.2707-2710, 2004.

GRUFFYDD-JONES, T.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. Tritrichomoniasis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, p.647-649, 2013.

GUNN-MOORE, D. A.; 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.; SLAPETA, J. Prolonged resilience of *Tritrichomonas foetus* in cat feces at ambient temperature. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.60-65, 2009.

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

HOMAN, W. L.; GILSING, M.; BENTALA, H.;LIMPER, L.; KNAPEN, F. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. **Parasitology Research**, v.84, p.707-714, 1998.

HOSEIN, A.; KRUTH,S. A.; PEARL, D. L.; RICHARDSON, D.; MAGGS, J. C.; PEACH, H. A.; PEREGRINE, A. S. Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.15, P.706-711, 2013.

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, n.1, p. 6-10, 2010.

KUEHNER,K. A.; MARKS, S. L.; 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.

LEVY, M. G.; GOOKIN, J. L.; POORE, M.; BIRKENHEUER; A. J.; DYK-STRA, M. J.; LITAKER, R. W. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. **Journal Parasitology**, v. 89, p. 99-104, 2003.

LIM, S.; PARK, S.; AHN, K.; OH, D.; SHIN, S. Efficacy of ronidazole for treatment of cats experimentally infected with a Korean isolate of *Tritrichomonas foetus*. **Korean Journal Parasitology**, v. 50, n. 2, p. 161-164, 2012.

LIM, S.; PARK, S.; AHN, K.; OH, D.; RYU, J.; SHIN, S. First report of feline intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in Korea. **Korean Journal Parasitology**, v. 48, n. 3, p. 247-251, 2010.

LOPES, L. M. S.; DE JESUS, V. L. T.; SERRA-FREIRE, N. M. Ocorrência de *Tritrichomonas suis* em criações de suínos de subsistência e comerciais no Estado do Rio de Janeiro. **Semina: Ciências Agrárias**, v.19, p.50-53, 1998.

MANNING, K. Update on the diagnosis and management of *Tritrichomonas foetus* Infections in Cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, 2010.

MIRÓ, G.; HERNÁNDEZ, L.; MONTOYA, A.; ARRANZ-SOLÍS, D.; DADO, D.; ROJO-MONTEJO, S.; 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.

PAYNE, P. A.; ARTZER, M. The biology and control of *Giardia spp.* And *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.39, p.993-1007, 2009.

PHAM, D. Chronic intermittent diarrhea in a 14-month-old Abyssinian cat. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 85-87, 2009.

PROFIZI, C.; CIAN, A.; MELONI, D.; HUGONNARD, M.; LAMBERT, V.; GROUD, K.; GAGNON, A.; VISCOGLIOSI, E.; ZENNER, L. Prevalence of

*Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.50-55, 2013.

REINMANN, K.; MÜLLER, N.; KUHNERT, P.; CAMPERO, C. M.; LEITSCH, D.; HESS, M.; HENNING, K.; FORT, M.; MULLER, 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 $\alpha$ . **Veterinary Parasitology**, v.185, p.138-144, 2012.

SABSHIN, S. J.; LEVY, J. K.; TUPLER, T.; TUCKER, S. J.; GREINER, E. C.; LEUTENEGGER, C. M. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.241, p.331-337, 2012.

SLAPETA, 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.

SLAPETA, J.; MULLER, N.; STACK, C. M.; WALKER, G.; LEW-TABOR, A.; TACHEZY, J.; FREY, C.F. Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmuller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. **International Journal of Parasitology**, v.42, p.1143-1149, 2012.

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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 639-641, 2008.

STOCKDALE, H. D.; GIVENS, M. D.; DYKSTRA, C. C.; BLAGBURN, B. L. *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 13-17, 2009.

STOCKDALE, H.; RODNING, S.; GIVENS, M.; CARPENTER, D.; LENZ, S.; SPENCER, J.; DYKSTRA, C.; LINDSAY, D.; BLAGBURN B. Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 6, p. 1429-1434, 2007.

STOCKDALE, H. D.; DILLON, A. R.; NEWTON, J. C.; BIRD, R. C.; BONDURANT, R. H.; DEINNOCENTES, P.; BARNEY, S.; BULTER, J.; LAND, T.; SPENCER, J. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 156-161, 2008.

SUZUKI, J.; MURATA, R.; KOBAYASHI, S.; SADAMASU, K.; KAI, A.; TAKEUCHI, T. Risk of human infection with *Giardia duodenalis* from cats in Japan and genotyping of the isolates to assess the route of infection in cats. **Parasitology**, v.138, n.4, p.493-500, 2011.

TEIXEIRA, D. **Em dez anos, os brasileiros vão preferir gatos a cachorros.** Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/ciencia/o-indice-big-cat>> Acesso: jun.2015.

THURMOND, M. C.; JOHNSON, W. O. Effect of multiple sampling on diagnostic sensitivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.233-236, 2004.

TOLBERT, M. K.; GOOKIN, J. *Tritrichomonas foetus*: a new agent of feline diarrhea. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v.31, p.374-381, 2009.

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.

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, n.6, p.2227-2235, 2013.

XENOULIS, P. G.; LOPINSKI, D. J.; READ, S. A.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, n.12, p.1098-1103, 2013.

XENOULIS, P. G.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; READ, S. A.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Detection of *Tritrichomonas foetus* in cats in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 831-833, 2010.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a smallsubunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R., LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999a.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p.3386-3391, 1999b.

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. Opportunistic human infections caused by *Tritrichomonas* species: a mini-review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 34, n. 16, p. 127-131, 2012.

YAO, C.; KÖSTER, L. S. *Tritrichomonas foetus* infection, a causative of chronic diarrhea in the domestic cat. **Veterinary Research**, v.46, n.35, DOI: 10.1186/s13567-015-0169-0, 2015.

YULE, A.; SKIRROWTA, S. Z.; BONDURANT, R. H. Bovine trichomonosis. **Parasitology Today**, v.5, p.373-377, 1989.