



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

**Prevalência e validação dos testes diagnósticos para
Trichomonas vaginalis em mulheres grávidas, não grávidas e
portadoras do HIV**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação


Nome completo do autor: Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

Título do trabalho: Prevalência de validação dos testes para diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* em mulheres grávidas, não grávidas e portadoras do HIV.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 09 / 02 / 2017

Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

**Prevalência e validação dos testes diagnósticos para
Trichomonas vaginalis em mulheres grávidas, não grávidas e
portadoras do HIV**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador:
Profº Drº Waldemar Naves do Amaral

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lemos, Patrícia Abreu Pinheiro de

Prevalência e validação dos testes para diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* em mulheres grávidas, não grávidas e portadoras do HIV [manuscrito] / Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos. - 2017.
xvi, 76 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Mulheres. 3. Gestantes. 4. HIV. 5. Imunossupressão. I. Amaral, Waldemar Naves do, orient. II. Título.

CDU 576.8



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Goiás

Ata da Defesa de Tese de Doutorado realizada por **Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos**. Aos quatro dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 10:00hs, reuniu-se no Hospital e Maternidade Dona Iris a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: **"Prevalência e validação dos testes diagnósticos em mulheres grávidas, não-grávidas e portadoras do HIV"**, como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Doutora, área de concentração **Dinâmica do Processo Saúde-Doença** o Presidente da Comissão julgadora, **Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra a candidata, para exposição em até 50 minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata aprovada ou reprovada.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral - Presidente
Prof. Dr. Dejan Rodrigues Nonato - Membro
Profa. Dra. Glaucimeire Marquez Franco - Membro
Profa. Dra. Sara Rosa de Sousa Andrade - Membro
Prof. Dr. Eduardo Camêlo de Castro - Membro
Prof. Dr. Juarez Antônio de Souza - Suplente
Prof. Dr. Rui Gilberto Ferreira - Suplente

Aprovado(a)/Reprovado(a)

aprovada
aprovada
aprovada
aprovada
aprovada
aprovada

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos** Habilitada () Não habilitada (). Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura

Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral - Presidente
Prof. Dr. Dejan Rodrigues Nonato - Membro
Profa. Dra. Glaucimeire Marquez Franco - Membro
Profa. Dra. Sara Rosa de Sousa Andrade - Membro
Prof. Dr. Eduardo Camêlo de Castro - Membro
Prof. Dr. Juarez Antônio de Souza - Suplente
Prof. Dr. Rui Gilberto Ferreira - Suplente

Waldemar Naves do Amaral
Dejan Rodrigues Nonato
Glaucimeire Marquez Franco
Sara Rosa de Sousa Andrade
Eduardo Camêlo de Castro
Juarez Antônio de Souza
Rui Gilberto Ferreira

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

Discente: Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

***Dedico este trabalho às análises clínicas e à sua continuidade
enquanto pesquisa científica.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à força onipotente que me conduziu ao caminho da ciência, dos seus mistérios e das suas descobertas;

Aos meus queridos pais Marúcia e Zenon que mesmo em seus momentos mais difíceis nunca deixaram de transmitir seus cuidados e seu amor;

À minha filha Beatriz pela companhia adorável de todos os dias;

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, UFG pela conduta humana, atenciosa e respeitosa que a cada dia valoriza mais a instituição a qual pertence;

Ao Professor e orientador Dr. Waldemar Naves do Amaral pela postura ética, pelo compromisso com a ciência e pelo exemplo de dedicação e amor à docência.

SUMÁRIO

Resumo	xii
Abstract	xiv
1 Introdução	1
Revisão da Literatura	2
I. Estrutura, classificação e ciclo biológico.....	2
II. Métodos de identificação.....	4
II.1. Exame a fresco.....	4
II.2. Exame citológico.....	5
II.3. Cultura.....	5
II.4. Técnica molecular.....	6
III. Epidemiologia.....	7
III.1. Prevalência.....	7
III.2. Faixa etária.....	7
III.3. Fatores de risco.....	8
Gravidez.....	8
Vírus da imunodeficiência.....	9
Câncer cervical.....	9
III.4. Fisiopatologia.....	9
III.5. Reação inflamatória.....	9
III.6. Tratamento.....	10
2 Objetivos	12
3 Métodos	13
Desenho do estudo	13
Aspectos da população	13
Aspectos laboratoriais	13

Critérios de inclusão/ exclusão	14
Amostragem	14
Considerações ético – legais	15
Análise dos dados	15
Publicações	17
Artigo 1 <i>Trichomonas vaginalis</i> , genetic variation, and pathogenicity: a systematic review.....	18
Artigo 2 Association between <i>Trichomonas vaginalis</i> in pregnant, non-pregnant, and HIV-positive women.....	20
Conclusão	31
Considerações finais	32
Referências	33

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1: Form for the application of the relevant tests.....	20
Tabela 2: Retrieved articles per database.....	20
Tabela 3: Qualitative analysis of the articles selected using the Medical Subject Headings (MeSH): “ <i>Trichomonas vaginalis</i> & genetic variation”.....	21
Tabela 4: Qualitative analysis of the articles selected using the health Sciences Descriptors (DeCS): <i>Trichomonas vaginalis</i> & oxidative stress”.....	21
Tabela 5: Distribution of <i>T. vaginalis</i> ’ frequency taking PCR as gold standard in three groups of women in Goiânia, 2016.....	27
Tabela 6: Distribution of <i>T. vaginalis</i> ’ frequency among five techniques in pregnant, non-pregnant and HIV-positive women in Goiânia, 2016	27
Tabela 7: Distribution of <i>T. vaginalis</i> ’ infection in pregnant, non-pregnant and HIV-positive women in Goiânia, 2016.....	28
Tabela 8: Distribution of <i>T. vaginalis</i> ’ frequency with the presence of cytological abnormalities in three groups of women in Goiânia, 2016	28
Tabela 9: Distribution of <i>T. vaginalis</i> ’ frequency among different vaginal microbiota in three groups of women in Goiânia, 2016	28
Figura 1: <i>T. vaginalis</i> em meio ao infiltrado leucocitário na Citologia de Papanicolaou.....	3
Figure 2: Study flow chart: Relevant test 1.....	20
Figura 3: Study flow chart: Relevant test 2.....	20
Anexo 1– Parecer do Comitê da Instituição Proponente.....	49
Anexo 2 – Parecer do Comitê da Instituição Co-Participante.....	51

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	56
Anexo 4 - Outras publicações	58
Artigo 1 - <i>Trichomonas vaginalis</i> e sua associação com o câncer cervical: uma revisão sistemática.....	59
Artigo 2 - Prevalence of <i>Trichomonas vaginalis</i> in women with precancerous and indeterminate lesions.....	66
Artigo 3 - Laboratory diagnosis of <i>Trichomonas vaginalis</i> in pregnant and non-pregnant women.....	71
Anexo 5 - Distribuição da frequência de <i>T. vaginalis</i> por faixa etária em mulheres não-grávidas, grávidas e HIV positivas	76

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC-US – Células escamosas atípicas de significado indeterminado;

CDC – Centro de controle e prevenção de doenças

CLM – Concentração Letal Mínima;

ADN – Ácido dexoxirribonuclêico;

E – Especificidade;

FN – Falso Negativo;

FP – Falso Positivo;

HC/UFG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás;

HDT/SES/GO – Hospital de Doenças Tropicais/ Secretaria Estadual de Saúde de Goiás;

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana;

HMDI/FMS/GO – Hospital e Maternidade Dona Iris/ Fundo Municipal de Saúde/ Goiânia, Goiás;

HR – HAZARD RATIO;

HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau;

IC₅₀ – índice Inibitório médio;

IL8 – Interleucina 8;

LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau;

µg/mL – micrograma por mililitro;

µg/L – micrograma por litro;

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – ODDS RATIO;

PCR – reação em cadeia da polimerase;

S – Sensibilidade;

TARV – Terapia Antiretroviral;

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

T. vaginalis – *Trichomonas vaginalis*;

VP – Verdadeiro Positivo;

VPP – Valor Preditivo Positivo;

VPN – Valor Preditivo Negativo;

RESUMO

Introdução *Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado encontrado em secreções genitais humanas. A Tricomoniase é considerada a doença sexualmente transmissível não viral mais frequente no mundo. Gestantes e portadoras do vírus da imunodeficiência são as que têm apresentado frequências mais elevadas. **Objetivos** O presente estudo realizou uma revisão sistemática “*Trichomonas vaginalis, genetic variation, and pathogenicity*” e um artigo original intitulado “*Association between T. vaginalis in pregnant, non-pregnant and HIV-positive women*” no intuito de: a) estabelecer a frequência dos testes de diagnóstico para detecção do parasito nos 3 grupos de mulheres; b) verificar se as condições de imunossupressão ou coinfeção são fatores de risco para *T. vaginalis*; c) avaliar a acurácia das técnicas de diagnóstico tendo como padrão-ouro a reação em cadeia da polimerase (PCR). **Métodos** A população do estudo foi constituída por 309 mulheres atendidas em três hospitais de referência de Goiânia: gestantes no Hospital e Maternidade Dona Iris (HMDI), 106 não gestantes atendidas no Hospital das Clínicas/ Universidade Federal de Goiás, e 103 HIV-positivas atendidas no Hospital de Doenças Tropicais da secretaria estadual de saúde, Goiânia, Goiás, Brasil. A detecção do parasito foi realizada comparativamente através de quatro técnicas de diagnóstico: exame a fresco, cultura, citologia de Papanicolaou e PCR. A acurácia das técnicas foi realizada para as três populações de mulheres onde a PCR foi considerada o padrão ouro. **Resultados** O presente estudo encontrou chance significativa de associação entre a frequência de *T. vaginalis* em HIV positivas e a sua frequência em não grávidas representada pelo *ODDS RATIO* (OR) 2,26. A comparação entre gestantes e o grupo controle de não gestantes não apresentou chance significativa (OR=1,07). A PCR e o exame a fresco apresentaram os percentuais mais elevados no grupo das gestantes e das HIV positivas e a sensibilidade de ambas foi também mais elevada nos dois grupos em relação ao grupo de não grávidas. A cultura apresentou percentuais de acurácia quase que semelhante nos 3 grupos (sensibilidade) e as técnicas coradas foram as mais sensíveis, porém as menos específicas devido ao elevado

número de falsos positivos (FP). A presença de lesões pré-cancerígenas esteve associada à presença de *T. vaginalis* tanto no grupo das grávidas quanto no das HIV positivas ($OR= 4,65$ e $OR= 2,14$). **Conclusão** A frequência de *T. vaginalis* em mulheres não grávidas foi 18%, em gestantes foi 19% e em portadoras do HIV foi 33%. A imunossupressão fisiológica (gravidez) não é fator de risco *para T. vaginalis*, sendo que a co-infecção pelo HIV é fator de risco. No teste de acurácia o exame a fresco e a cultura apresentaram taxas de sensibilidade maior no grupo das HIV-positivas (54% e 70%). Os percentuais de especificidade da cultura corada apresentaram-se baixos nos 3 grupos.

Palavras-Chave: *Trichomonas vaginalis*, mulheres, gestantes, HIV, imunossupressão.

ABSTRACT

Introduction *Trichomonas vaginalis* is a flagellate protozoa found in genital human secretions. Trichomoniasis is considered the most prevalent non viral sexually transmitted disease worldwide. Pregnant women and population with immunosuppression had the highest frequencies in accord with literature.

Purposes The present study aimed firstly at the systematic review “*Trichomonas vaginalis*, genetic variation, and HIV-positive women” and secondly focused at the original article “*Association between T. vaginalis in pregnant, non-pregnant and HIV-positive women*” in order to: a) establish the prevalence of diagnostic techniques in 3 groups of women; b) verify whether immunosuppression and/or coinfection conditions represents a risk factor for acquiring *T. vaginalis*; d) evaluate the accuracy of diagnostic techniques taking PCR as gold standard.

Methods The study population included 309 women receiving care at 3 referral public healthcare centers in Goiânia. Pregnant women (100) at Dona Iris Maternity and General Hospital, non-pregnant women at Federal University of Goiás’ Teaching Hospital and 103 HIV-positive women in healthcare at an outpatient clinic of the Tropical Diseases Hospital in Goiânia, Goiás, Brazil. The parasite has been detected comparatively through 4 diagnostic techniques: wet mount, culture, Papanicolaou’s smear and PCR. Accuracy from all techniques was performed in the three women population and PCR was considered gold standard.

Results The present study found a positive association between *T. vaginalis*’ frequency in HIV positive compared with non-pregnant women (*ODDS RATIO (OR) 2,26*). Comparison between pregnant women and the non-pregnant women control group demonstrated no association (*OR 1,07*). PCR technique and wet mount presented the most elevated percentage in the pregnant and HIV positive groups correlated with the women control group. Culture presented almost the same accuracy percentages in the three groups (sensitivity) and the staining techniques were the most sensible however with the lowest specificities due to the vast number of false positives (FP). Precancerous lesions were associated with *T. vaginalis*’ presence both in pregnant and HIV positive women (*OR=4,53* and *OR-2,12*).

Conclusion *T. vaginalis*’ frequency in non-

pregnant-women was 18%, in pregnant women was 19% and in HIV positive was 33%. Physiological immunosuppression (pregnancy) did not represent risk factor for *T. vaginalis*' infection however coinfection for HIV represented risk factor. Accuracy of diagnostic techniques (wet mount and culture) presented higher sensitivity rates in HIV-positive women (54% e 70%). Cultured *T. vaginalis* stained by Quick Panoptic presented lower specificity rates in the 3 study groups.

Key-words: *Trichomonas vaginalis*, women, pregnant women, HIV, immunosuppression.

1 INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis, espécie descoberta pelo pesquisador francês Alfred François Donné, em 1836, é um protozoário flagelado (subfilo Mastigophora) encontrado em secreções genitais humanas. O primeiro registro fotográfico de *T. vaginalis* ocorreu a partir do encontro de Donné com o físico Léon Focault (1819-68) (DIAMANTIS; MAGIORKINIS; ANDROUTSOS, 2009; THORBURN, 1974).

A tricomoníase é considerada a doença sexualmente transmitida não viral mais frequente no mundo. No ano de 2008 foram notificados 276,4 milhões de novos casos da infecção pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Na região das Américas a prevalência foi 22% na população feminina com incidência de 177,7% a cada 1000 mulheres (WHO, 2012).

O estado imunológico das mulheres é uma importante característica a ser analisada no levantamento da prevalência do parasito, uma vez que gestantes e portadoras do HIV são as que apresentam as frequências mais elevadas, de acordo com trabalhos revistos na literatura (KUREWA et al, 2010; MIRANDA; PINTO; GAYDOS, 2010).

O estado gestacional pode favorecer a infecção por *T. vaginalis* porque representa um período onde a imunidade está fisiologicamente reduzida. A tricomoníase está associada ao risco de parto prematuro segundo revisão sistemática baseada em evidências feita em acordo com o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) (MEITE et al, 2015).

A porta de entrada e saída do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é induzida por *T. vaginalis* devido à erosão que sua presença causa na mucosa vaginal. Além disso o HIV apresenta tropismo pelas células de defesa do organismo, podendo exercer um papel de carreador de partículas virais, facilitando a replicação viral no hospedeiro (GUENTHNER; SECOR; DEZZUTI, 2005; REDOM-MALDONADO, 1998).

O objetivo desta pesquisa foi estabelecer a frequência de *T. vaginalis* em gestantes, não gestantes e portadoras do HIV por meio da comparação de quatro técnicas de diagnóstico.

REVISÃO DA LITERATURA

I. Estrutura, classificação e ciclo biológico

Espécie do reino animal e subreino protozoa, *T. vaginalis* é uma célula polimorfa que apresenta núcleo bem definido, com envelope nuclear. Possui uma organela própria para cada função, como toda célula eucarionte, mas sua energia é produzida por hidrogenossomos onde o ciclo respiratório é interrompido e o hidrogênio é liberado (NEVES, David, 2005).

T. vaginalis apresenta-se na forma trofozoítica e pseudocística, não tendo sido verificada a sua forma cística até a presente data. Os trofozoítos são as formas mais jovens e de flagelos livres enquanto os pseudocistos caracterizam-se por flagelos interiorizados, conferindo ao organismo o aspecto ameboide (AFZAN; SURESH, 2012).

De acordo com Cheon et al. (2013) o corpo de *T. vaginalis* mede em média 9,5 µm (7,4 a 11,4 µm), com uma membrana ondulante que se estende até três quartos do comprimento total de seu corpo. Os quatro flagelos saem de um só canal periflagelar medindo em média 11 µm, o axóstilo ou citoesqueleto segue da parte anterior à parte posterior final da célula, apresentando a função de suporte, participando no processo da divisão celular e causando a constrição do núcleo durante a cariocinese. O axóstilo tende a apresentar comprimento maior nas espécies recém extraídas do hospedeiro (frescas), no entanto *T. vaginalis* tende a crescer em tamanho (corpo) sob condições desfavoráveis de cultivo. As espécies com maior tempo de incubação apresentaram medidas de comprimento e largura maiores do que as recém extraídas, à exceção apenas do axóstilo (CHEON et al, 2013).

T. vaginalis é constituído por um genoma de aproximadamente 160 megabases, altamente repetitivo, com uma predição de 254 cópias de 18S rRNA e 251 cópias de 5.8S rRNA. O parasito divide-se por mitose, processo no qual uma única célula eucarionte origina duas idênticas. A diversidade das espécies do gênero *Trichomonas* pode ser uma consequência da clonalidade (divisões por mitose), onde as diferenças genéticas, adquiridas ao longo do tempo de infecção, podem permanecer fixas à população e levarem a uma estrutura populacional diversa. *T. vaginalis* vem desenvolvendo um recente e substancial aumento no tamanho de seu genoma em detrimento do fenômeno

da duplicação (FIGUEROA-ÂNGULO, 2012; IBAÑEZ-ESCRIBANO et al, 2014; KAY et al, 2012).

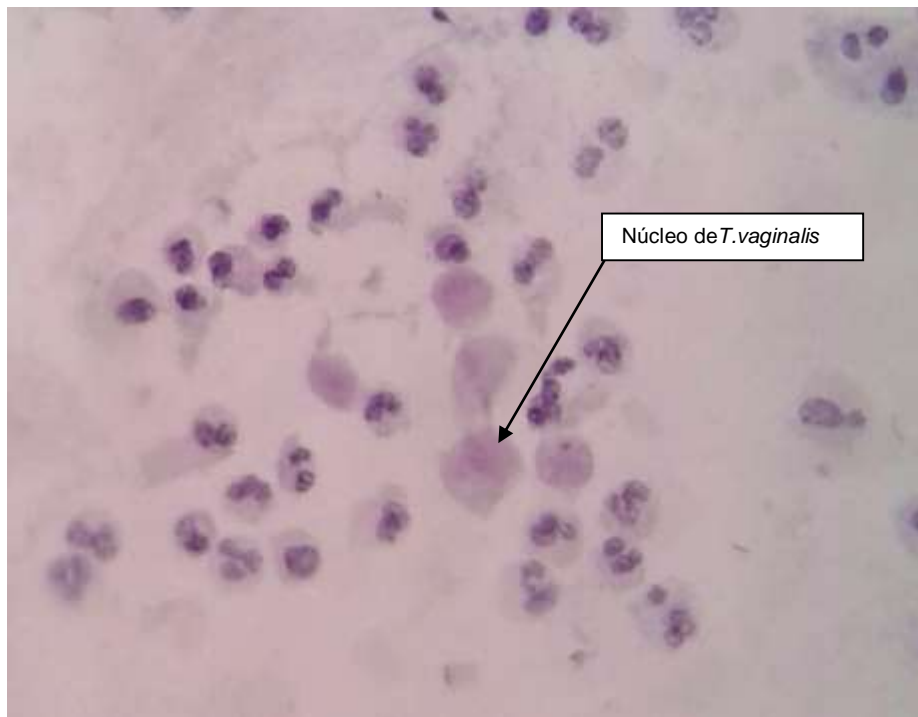


Figura 1: *T. vaginalis* em meio ao infiltrado leucocitário na Citologia de Papanicolaou (40 x).

As condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica, podem afetar o aspecto de *T. vaginalis*. A faixa de pH entre 5,0 e 7,5 e as temperaturas entre 20 e 40°C são adequadas a esta espécie (NEVES, David, 2005).

Anaeróbio facultativo *T. vaginalis* é capaz de manter em reserva o glicogênio. O epitélio vaginal é rico em glicogênio, sendo a acidez vaginal um produto de seu metabolismo (carboidrato), o qual provê uma fonte de carbono para a microbiota vaginal (SPEAR et al, 2014).

Durante o crescimento in vitro, *T. vaginalis* pode utilizar o glicogênio como fonte de carbono. O parasito pode desencadear atividades enzimáticas com propriedades bioquímicas de uma alfa-amilase, estando em meio condicionado. Esta atividade é responsável pela degradação do glicogênio exógeno, e libera compostos simples como a maltose (HUFFMAN et al, 2015).

A principal forma de transmissão do parasito é a sexual, mas a transmissão não sexual da tricomoníase já foi descrita em casos de fômites,

assentos úmidos e água de piscinas. A transmissão vertical também já foi demonstrada em lavados nasofaríngeos, tais como no caso de um recém-nascido relatado por Carter e Whithaus (2008) onde a presença de *T. vaginalis* foi verificada, detectada por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e pela técnica molecular (CARTER; WHITHAUS, 2008; PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2008).

II. Métodos de Identificação

II.1. Exame a fresco

O diagnóstico de *T. vaginalis* tem como base a microscopia óptica. O exame microscópico é realizado tradicionalmente para o diagnóstico de *T. vaginalis* tendo em vista sua rapidez e seu baixo custo, no entanto é necessária agilidade na realização da análise direta no intuito de evitar a perda da mobilidade dos parasitos (TETARDINI et al, 2016).

O exame a fresco é uma técnica realizada a partir do swab cérvico-vaginal com adição de apenas uma gota de solução fisiológica, sob lâmina-lamínula e ao microscópio óptico. Nela, *T. vaginalis* é visto em movimentação flagelar, que o distingue dos leucócitos polimorfonucleares. Stoner et al. (2013) verificaram que, no exame a fresco, os flagelos de *T. vaginalis* vão perdendo os seus movimentos, gradativamente, a partir dos 30 minutos da coleta. É presumível que a exposição ao oxigênio seja a causa dessa perda, uma vez que o parasito não completa o ciclo do ácido cítrico sendo ele considerado um anaeróbio facultativo (STONER et al, 2013).

A técnica do exame a fresco comparada à PCR em tempo real apresentou sensibilidade de 40% e especificidade de 100%. O swab contendo o fluido vaginal foi examinado no período de até 10 minutos após a coleta (LELI et al, 2016). Percentuais de sensibilidade mais elevados são alcançados com a utilização de variadas técnicas de coloração, tais como o Giemsa e a safranina combinada com o azul de metileno (TESTARDINI et al, 2016).

Em uma população de 386 mulheres grávidas, a sensibilidade de 45,8% foi encontrada a partir da técnica direta em solução salina, corada pelo Giemsa. Esta acurácia foi obtida a partir da alternância de PCR e cultura como padrão ouro (TESTARDINI et al, 2016). No Hospital Universitário de Benha,

no Egito, dentre 200 mulheres não grávidas pesquisadas o exame a fresco obteve a sensibilidade de 59,1%, tendo como padrão ouro a cultura (HUSSEIN et al, 2015). Na província de Hue, região central do Vietnam, 783 mulheres, sintomáticas e assintomáticas, foram testadas pelo exame a fresco, obtendo 6% (52/783) de prevalência com diferença significativa entre assintomáticas e sintomáticas (0,7% e 19,3% respectivamente) (TON NU et al, 2015).

II.2. Exame citológico

A citologia oncoparasitária (COP) é o método de diagnóstico mais utilizado na detecção de *T. vaginalis* tendo em vista ser de baixo custo e de fácil acesso nos laboratórios clínicos. Entretanto esse método requer profissionais treinados (citotécnicos) e/ou especialistas para sua execução (LEMOS; AMARAL, 2016).

O diagnóstico citológico é feito sob a microscopia óptica nos aumentos de 100 e 400 vezes. A coloração de Papanicolaou possibilita a visualização do núcleo ovalado e do citoplasma basofílico de *T. vaginalis*. Pelo Papanicolaou *T. vaginalis* obteve a melhor visualização de seu núcleo e de seus flagelos comparada à de duas outras técnicas de coloração (Giemsa, Gram e Papanicolaou) (KARAMAN et al, 2008; MENEZES et al, 2016).

A amplificação do DNA de *T. vaginalis* foi realizada em 130 esfregaços positivos no teste de Papanicolaou. O nested PCR demonstrou a positividade de 75,4% (98/130) dos espécimens comprovando a presença significativa do parasito nos esfregaços vaginais (ZIAEI HEZARJARIBI et al, 2015). Loo et al (2009) apresentaram a sensibilidade e a especificidade do teste de Papanicolaou (98 e 96% respectivamente), com valor preditivo positivo de 88%. O esfregaço foi considerado verdadeiro positivo (VP) quando este coincidiu com os resultados do exame a fresco e da cultura simultaneamente (LOO et al, 2009).

II.3. Cultura

A cultura para *T. vaginalis* é uma técnica que visa a manutenção e a multiplicação dos parasitos em suas formas trofozoíticas. O cultivo é realizado em meio líquido e necessita do seguimento minucioso e da análise

microscópica. Em 1940 foi desenvolvida a primeira cultura axênica da espécie, o meio TYM e suas modificações, atualmente denominado Diamond, é o mais utilizado pelos pesquisadores. Esse meio é constituído pela adição de soro bovino fetal e pela adição de antibióticos bactericidas e antifúngicos (LEMOS; GARCÍA-ZAPATA, 2014).

O crescimento ótimo e a reprodução de *T. vaginalis* requerem condições anaeróbias. Nutrientes como carboidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos graxos e ferro são essenciais em seu cultivo. Uma série de fórmulas comerciais vem sendo produzidas para o cultivo de *T. vaginalis*, grande parte delas, modificações do meio Diamond. Um meio de cultura comercial que, em geral, apresenta ingredientes comuns ao meio Diamond é o tioglicolato. A empresa Hardy diagnostics produziu uma fórmula semelhante à do caldo tioglicolato e denominou-a Diamond modificado (HARDY DIAGNOSTICS, 2016; PERAZZI et al, 2010; POCH et al, 1996).

A técnica da cultura em meio tioglicolato modificado apresentou 75% de sensibilidade para presença de *T. vaginalis* e 100% de especificidade, tendo como parâmetro a PCR. A população avaliada foram 386 mulheres grávidas atendidas no Hospital das Clínicas de Buenos Aires (TESTARDINI et al, 2016). A cultura em meio Diamond apresentou 10% de casos positivos em uma população de 200 mulheres não grávidas atendidas no Hospital Universitário de Benha, no Egito, percentual este, que correspondeu a 90,9% dos casos positivos obtidos mediante o exame a fresco e outras duas técnicas de coloração (HUSSEIN, 2015).

A cultura foi considerada padrão ouro, mas vem sendo substituída pelas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (MENEZES; MELLO; TASCA, 2016).

II.4. Técnica molecular

As reações em cadeias de polimerases (PCR) são altamente específicas (98%) porque são preparadas para amplificar genes próprios do parasito através de oligonucleotídeos selecionados (primers). A sensibilidade das PCRs (aproximadamente 95% de acordo com trabalhos mais recentes) é dependente de otimização e padronização adequadas, as quais vão requerer esforço e dedicação dos pesquisadores (LEMOS; GARCÍA ZAPATA, 2014).

Patil et al. (2012) encontraram maior positividade de *T. vaginalis* pelo exame da PCR em relação à cultura em meio In Pouch, utilizando os primers TVK3 e TVK7. Khalaf e Kadhim (2010) avaliando uma população de 662 mulheres ao sul do Iraque, encontraram a positividade de 4,5% com mesma técnica molecular e o mesmo par de iniciadores (TVK3/TVK7) (KHALAF; KADHIM, 2010; PATIL et al, 2012).

A detecção de *T. vaginalis* em trabalhadoras do sexo nas Filipinas foi realizada pelos métodos da cultura e da PCR. Ambos os métodos obtiveram sensibilidade de 97% em padrão ouro expandido. Apenas duas amostras foram negativas na PCR e positivas na cultura. Os primers TVK3 e TVK7 apresentaram-se os mais eficientes (QUEZA; RIVERA, 2013).

III. Epidemiologia

III.1. Prevalência

T. vaginalis acomete 170-200 milhões de pessoas em todo mundo sendo a Tricomoniase considerada a doença sexualmente transmitida não viral mais frequente (CONRAD et al, 2011). A OMS apontou 276,4 milhões de novos casos em 2008. A população feminina obteve prevalência de 22% e incidência de 177,7% a cada 1000 mulheres na região das Américas (WHO, 2012).

As taxas de prevalência de *T. vaginalis* estão mais elevadas nas populações carentes (10 a 40%), de países como Zimbábue e Zambia, Egito, região costeira do Peru, nordeste do Brasil na América Latina (KUREWA et al, 2010; LEON et al, 2009; MIRANDA; PINTO; GAYDOS, 2010; SAYED EL-AHL, 2002).

III.2. Faixa etária

O aumento da prevalência de *T. vaginalis* em mulheres em idade avançada pode sugerir um prolongamento da infectividade e também o predomínio da natureza assintomática da infecção. A média de idade de maior prevalência variou de 33 e 35,4 anos em estudos realizados na Índia, no Sri Lanka e no Iran (FERNANDO et al, 2012; KALANTARI et al, 2014; SIVARANGINI et al, 2013).

Em mulheres após os 40 anos *T. vaginalis* esteve prevalente em 11,8% através de diagnóstico realizado por testes moleculares com processo de captura (NAAT), amplificação por transcrição mediada (AMT) (GINOCCCHIO ET AL, 2012). O estudo retrospectivo de Meites et al. (2013) encontrou 33,7% da prevalência de *T. vaginalis* entre mulheres sintomáticas com 50 anos ou mais. Em Sutton et al (2007) *T. vaginalis* obteve 20% de frequência na faixa etária entre 40 e 49 anos contra 8,3% na faixa entre 14 e 19 anos (MEITES et al, 2013; SUTTON et al, 2007).

Após os 40 anos, a prevalência de *T. vaginalis* esteve elevada em uma população masculina, onde o percentual atingiu 60% em idade superior aos 50 anos (SEO et al, 2014).

III.3. Fatores de risco

III.3.1. Gravidez

A infecção por *T. vaginalis* vem apresentando frequências mais elevadas em populações gestantes e HIV positivas (SALAWU; ESUME, 2016; TESTARDINI et al, 2016).

A gravidez representa um estado onde a imunidade se encontra fisiologicamente reduzida. Parturientes apresentando a infecção por *T. vaginalis* estão predispostas ao parto prematuro. Gestantes inseridas no programa Medicaid na Carolina do Sul (108.346) foram avaliadas quanto ao risco de associação entre doença sexualmente transmissível (DST) e prematuridade ao nascimento. A infecção por *T. vaginalis* diagnosticada nos 8 primeiros meses de gestação apresentou risco maior de associação com o parto entre a 33^o e a 36^o semanas de gravidez (HAZARD RATIO 1,22, $p=0,032$) e o diagnóstico positivo até o 7^o mês apresentou risco associativo elevado no período até as 33 semanas de gestação (HR 1,59, $p=0,002$) (MANN et al, 2009).

Gestantes com tricomoníase podem transmitir os parasitos através de partos naturais. Sintomas como o baixo peso ao nascimento, secreções supurativas nasais, desconforto respiratório e pneumonias estão envolvidos com as infecções por *T. vaginalis* (CARTER E WHITHAUS, 2008).

III.3.2. Vírus da imunodeficiência

Através do mecanismo da fagocitose, *T. vaginalis* pode favorecer a permanência e a disseminação de microorganismos no organismo do hospedeiro, dentre eles o vírus da imunodeficiência (PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2007). O estudo prospectivo de Maese et al (2011) demonstrou que a terapia antirretroviral (TARV) pode manter a supressão do HIV-1 na maioria das mulheres, mesmo quando a infecção por *T. vaginalis* permanece presente. Os autores avaliaram o número de cópias virais de pacientes HIV positivas, no swab vaginal, durante a infecção por *T. vaginalis* e após o tratamento (MAESE et al, 2011).

III.3.3. Câncer cervical

As lesões pré-invasivas do colo uterino ocorrem com maior frequência em mulheres que apresentam comprometimento imunológico. O exame clínico visual realizado com o ácido acético à 5% encontrou 22,1% (99/448) de lesões pré-cancerígenas em uma população de HIV positivas (GEDEFW et al, 2013). Através do método de Papanicolaou foi encontrada frequência mais elevada em portadoras do HIV quando comparadas a um grupo controle (12,1 versus 5,4%) (LEMOS; GARCÍA-ZAPATA; TAVARES, 2012).

T. vaginalis foi observado com frequência na presença de anormalidades citológicas. Lemos e Amaral (2016) encontraram 4,2% de lesões indeterminadas e de baixo grau na presença do parasito e Misra e Signh 8,1% em lesões de baixo grau segundo Bethesda. As lesões pré-cancerígenas geralmente apresentam-se em um ambiente de estresse vaginal caracterizado por infiltrado leucocitário e maior número de hemácias (LEMOS; AMARAL, 2016; MISRA; SIGHN, 2006).

III.4. Fisiopatologia

III.4.1. Reação Inflamatória

A presença da infecção por *T. vaginalis* é, na maioria das vezes, caracterizada por um acúmulo local de células do sistema imune. Em contato com as células epiteliais vaginais o parasito propicia a ativação de mastócitos sanguíneos, que passam a liberar beta-hexosaminidase e citocinas

inflamatórias, subsequentemente induzindo a migração neutrofílica (HAN et al, 2012).

O leucotrieno B4 é um dos lípidos mediadores secretados por *T. vaginalis* e que induz a quimiotaxia dos neutrófilos durante a infecção. A IL8 também vem sendo detectada em altas proporções a partir de experimentos empreendidos com o cultivo de *T. vaginalis* em células epiteliais vaginais (CEVs). Neutrófilos estimulados pela lise parasitária (produtos excretórios e secretórios) induzem a elevação da IL8 (NAM et al, 2012).

T. vaginalis induz a sinalização purinérgica contribuindo para a produção do óxido nítrico pela ação dos neutrófilos estimulados. O óxido nítrico constitui um efeito de citotoxicidade que advem da mediação dos macrófagos contra o parasito. A membrana glicofosfolipídica de *T. vaginalis* é a estimuladora da liberação do óxido nítrico pelos leucócitos polimorfonucleares no meio cérvico – vaginal (FRASSON et al, 2012).

III.4.2. Tratamento

Metronidazol é uma droga derivada do nitroimidazole, antimicrobiana, que foi especialmente desenvolvida para o tratamento da tricomoníase. Apesar de seu uso excessivo, por mais de 50 anos, o metronidazol continua sendo a droga de escolha no tratamento e profilaxia das infecções por *T. vaginalis*. Do total de 15 mulheres infectadas pelo parasito, 5 foram clinicamente resistentes ao metronidazol. Cepas selvagens e cepas resistentes foram cultivadas em diluições seriadas do medicamento (400 µg/mL à 3µg/mL) A concentração mínima letal (CML) para as cepas resistentes, após 24 horas de incubação foi 200 µg/mL e a menor concentração efetiva foi 20 µg/mL (RABIEE et al, 2012).

A resistência clínica ao metronidazol tem sido relatada em 2 a 4% de isolados clínicos de *T. vaginalis*. Um novo tipo de metronidazol, derivado da ureia e da tioureia, foi preparado através de reações de 2-(2-metil-5-nitroimidazol) hidrocloreto de etilamina com vários cianatos e tiocianatos. Vários dos compostos apresentaram significativa atividade antitricomoníase com valores apresentando índice inibitório médio (IC₅₀) de 4,9 a 6,8 µg/mL, comparados ao metronidazol padrão que obteve IC₅₀ de 8,0 µg/L. O composto

6b foi o melhor preparado e foi 1,6 vezes mais potente do que o metronidazol (ALAWADI et al, 2014).

A multidose de metronidazol (500 miligramas 2 vezes ao dia durante 7 dias) pode ser superior à dose única de 2 gramas no tratamento de *T. vaginalis* em mulheres HIV positivas em uso de terapia antiretroviral (TARV). O risco relativo de falha do tratamento foi de 2,63 (intervalo de confiança 95%, 1,04-6,63) em mulheres com TARV comparadas às sem TARV ($p=0,03$) (ADAMSKI et al, 2014).

Efeitos adversos ao metronidazol existem, dentre os mais comuns estão náuseas e desconforto abdominal. O tratamento da tricomoníase com produtos naturais vem sendo desenvolvido por pesquisadores, porém nenhum com progressão clínica. Uma gama de moléculas ativas e um grande número de novas drogas contra o parasito vêm sendo originadas de compostos tais como os terpenes, os fenólicos e os alcaloides (VIEIRA et al, 2015).

2 OBJETIVOS

Geral:

Estabelecer a prevalência e a validação dos testes para diagnóstico de *T. vaginalis* em mulheres não grávidas, grávidas e portadoras do HIV.

Específicos:

1. Fazer um artigo original (artigo 1) com o tema: “*Trichomonas vaginalis*, genetic variation, and pathogenicity: a systematic review”,
2. Fazer um artigo original (artigo 2) com o tema: “Association between *Trichomonas vaginalis* in pregnant, non-pregnant, and HIV-positive women”.
 - 2.1. Estabelecer a frequência de *T. vaginalis* em mulheres não gestantes, em gestantes e em portadoras de HIV;
 - 2.2. Verificar se as condições de imunossupressão ou coinfeção são fatores de risco para *T. vaginalis*;
 - 2.3. Verificar a acurácia dos testes diagnósticos (exame a fresco, citologia, cultura) para *T. vaginalis* tendo como padrão ouro a PCR.

3 MÉTODOS

Desenho do estudo

Estudo transversal e prospectivo.

Aspectos da população

A população estudada foi de 309 mulheres. 100 gestantes, 106 não gestantes e 103 HIV positivas atendidas no Hospital e Maternidade Dona Iris, no Hospital das Clínicas e no Hospital de Doenças Tropicais em Goiânia, no período entre agosto de 2015 a agosto de 2016.

Aspectos laboratoriais

O conteúdo cérvico-vaginal foi coletado durante as consultas ginecológicas pela equipe médica dos hospitais. A coleta foi dupla (ecto e endocervical). Para os exames direto, cultura e PCR foram necessários cotonetes estéreis (swabs) e para a citologia foram utilizadas a espátula de Ayre e a escovinha para a feitura dos esfregaços. Os swabs cérvico-vaginais foram transportados em solução salina para o exame direto, em meio líquido (tioglicolato modificado) para a cultura e em água desionizada para a PCR. O exame a fresco foi realizado sob lâmina-lamínula ao microscópio óptico nos respectivos locais do estudo. Em seguida foram encaminhados aos laboratórios São Francisco de Assis e Alpha DNA onde foram realizadas as análises dos exames da cultura e da PCR.

Para o exame da PCR foi preparado um controle positivo para *T. vaginalis* a partir de isolados da Cultura seguido da extração de seu DNA com a utilização do QIAamp DNA mini kit (marca QIAGEN®).

Os primers selecionados para a amplificação do gene de 262 pares de bases foram: TVK3 (*forward*): ATTGTCGAACATTGGTCTTACCCT e TVK7 (*reverse*): TCTGTGCCCGTCTTAAGTATGC.

Critérios de inclusão / exclusão de pacientes para as amostras do estudo:

Os critérios básicos para inclusão consideraram pacientes do sexo feminino apresentando os comprovantes dos diagnósticos laboratoriais relacionados com as doenças. A seleção destas pacientes foi feita pelos profissionais especialistas (ginecologistas) mediante os exames (comprovantes do diagnóstico) que estiveram contidos nos respectivos prontuários médicos: portadoras do HIV atendidas no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia (HDT/GO).

Houve um grupo de mulheres saudáveis: gestantes em consulta pré-natal, não gestantes em fase adequada para a coleta ginecológica, mulheres que não apresentaram sangramento no momento da coleta e que aceitaram participar do projeto, após terem tomado conhecimento das informações básicas do mesmo, dos seus procedimentos e de seus riscos, e que assinaram, na presença de uma testemunha, o “Termo de Consentimento” (anexado).

Os procedimentos e coleta dos exames laboratoriais necessários para o estudo foram feitos nos hospitais de estudo e encaminhados ao laboratório onde foram realizados.

As amostras foram consideradas satisfatórias de acordo com o Sistema Bethesda 2001.

Foram excluídos todos os casos que não se enquadraram nesses critérios.

Amostragem

Na fase preliminar, foi feito um estudo piloto, durante os três primeiros meses. Durante esse período, foi preparado o meio líquido para a cultura de *T. vaginalis*, o mesmo utilizado por Testardini et al (2016).

O meio de cultura foi testado através de amostras aleatórias de secreção vaginal que foram encontradas positivas no Exame direto. O estudo piloto foi realizado com mulheres atendidas no Hospital e Maternidade Dona Iris, em Goiânia (HMDI/GO), o qual foi observado e aprovado por docente –

doutor do departamento de Ginecologia e Obstetrícia FM/UFG (Professor Dr. Waldemar Naves do Amaral).

Na fase de desenvolvimento foram coletadas amostras aleatórias de mulheres em consulta ginecológica no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG), no HMDI e no HDT onde foram examinadas “a fresco” ao microscópio óptico, em cada respectivo hospital. Depois elas foram encaminhadas aos laboratórios (Laboratório São Francisco de Assis) onde foram coradas pelo Papanicolaou, analisadas e cultivadas no meio de cultura. Após esta etapa as amostras foram congeladas para a realização da técnica da PCR (Laboratório Alpha DNA).

Considerações ético-legais

Qualquer resultado de pacientes individuais obtido nesta pesquisa foi mantido de forma estritamente sigilosa, e não foi divulgado publicamente, sem autorização da própria paciente. A identificação das amostras foi feita apenas com as iniciais de cada nome e através de uma numeração consecutiva.

Os aspectos ético-legais foram regidos pelas disposições regulamentares das comissões éticas de pesquisa médica das instituições envolvidas no projeto.

Análise dos dados

Os dados originais obtidos nesta pesquisa foram armazenados num banco de dados tipo EPIINFO 7.0. Pela natureza do estudo foram calculados testes não-paramétricos (Teste do Qui-quadrado, Teste entre duas proporções e Teste exato de Fisher). O nível de significância dos testes não foi menor de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 PUBLICAÇÕES

Artigo 1 – *Trichomonas vaginalis*, genetic variation, and pathogenicity: a systematic review.

Autores: Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos; Waldemar Naves do Amaral.

Revista: World Journal of Research and Review (WJRR), vol 3, n6, pp 60-64. (Publicado).

Artigo 2 – Association between *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant, non-pregnant and HIV-positive women.

Autores: Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos; Rosane Silva Carneiro de Araújo; Waldemar Naves do Amaral.

Revista: Interlink Continental Journal of Medicine and Medical Sciences (ICJMMS) vol 2(4), pp. 039-045, 2016. (Publicado).

Artigo 1

Trichomonas vaginalis, Genetic Variation, and Pathogenicity: a Systematic Review

Patricia Abreu Pinheiro de Lemos, Waldemar Naves do Amaral

Abstract. Trichomoniasis is a sexually transmitted infection that has been associated with acquired immunodeficiency syndrome and cervical cancer. The objective of the present study was to conduct a systematic review of the literature to identify the genetic variations of *Trichomonas vaginalis* and their correlations with the vaginal environment in the human host. Two electronic databases, PubMed and the Virtual Health Library (*Biblioteca Virtual de Saúde*), were searched using Medical Subject Headings (MeSH) and Health Sciences Descriptors (DeCS), respectively. The terms "*T. vaginalis* and genetic variation" and "*T. vaginalis* and oxidative stress" were searched to identify relevant original articles. The inclusion and exclusion criteria established took into consideration the specific characteristics of each article, thus guaranteeing the quality of the papers selected (the first and second tests of relevance). Two principal types of population structure of *T. vaginalis* were reported in the papers: type 1 and type 2. Type 1 parasites were associated with pathogenicity, as shown by findings of increased viral loads in human immunodeficiency virus (HIV)-positive women.

Index Terms— Genetic variation, immunosuppression, oxidative stress, *Trichomonas vaginalis*.

I. INTRODUCTION

Trichomoniasis, a sexually transmitted infection that is principally associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and with cervical cancer, has been increasing in prevalence in countries of Africa and Latin America [1-4]. The protozoan *Trichomonas vaginalis* inhabits the human vagina and is morphologically characterized by four flagella and one undulating membrane. The movement of the flagella characterizes the active forms, while immobility denotes a less active stage that, nevertheless, conserves the parasite's mitotic capacity [5].

With a genome of approximately 160 megabases and a capacity for expansion, *T. vaginalis* possesses a wide, diverse set of repeated, mobile genetic elements that provide it with a mechanism for expansion and diversity [6, 7]. Furthermore, as an anaerobe, *T. vaginalis* can respond to oxidative stress, reducing the oxygen resulting from the Krebs cycle through its reductive enzymes [8, 9].

Patricia Abreu Pinheiro de Lemos, Biomedical scientist at Laboratory São Francisco de Assis, PhD student at Postgraduate Program in Health Science, Federal University of Goiás/ School of Medicine/, Goiânia, Goiás, Brazil.

Waldemar Naves do Amaral, Professor of the Postgraduate Program in Health Science, Federal University of Goiás/ School of Medicine/ Academic Director at the Dona Iris Hospital and Maternity Unit, Municipal Health Fund, Goiânia, Goiás Brazil.

The objective of the present study was to conduct a systematic review to identify the principal genetic types of *T. vaginalis*. Correlating the parasite with oxidative stress may explain the putative association between trichomoniasis and immunodeficiency status.

II. METHODS

A systematic review of the literature was conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) specifications [10]. Papers identified in indexed database were selected to answer the following question: "Is there a genetic variation in *Trichomonas vaginalis* infection?"

The database PubMed and Virtual Health Library (*Biblioteca Virtual de Saúde*) were electronically searched for Medical Subject Headings (MeSH) and Health Science Descriptors (DeCS), respectively. The term initially used was "*Trichomonas vaginalis* and genetic variation". The papers identified were included in the review only if the inclusion and exclusion criteria were met and the papers were found to be relevant to the study objective (Table 1). The first test included the best papers found with the first cross-referencing. In the second test, articles were selected using a second pair of keywords: "*Trichomonas vaginalis* and oxidative stress".

All the studies included in the selection were published between 2006 and 2016 except for 2 papers from 2004 and 2005, respectively. These latter articles were considered relevant to the present study and since the search yielded so few papers they were included.

III. RESULTS

A. The first test of relevance

The search for articles in the English language using the term "*Trichomonas vaginalis* and genetic variation" retrieved 103 papers. Of these, 70 were identified using MeSH and 33 with DeCS (Table 2).

Of the 70 articles retrieved from PubMed using the first MeSH term "*Trichomonas vaginalis* and genetic variation", 19 were included (Table 2-a) and 51 excluded. Of the 51 papers excluded, 36 were published prior to 2006, 8 dealt with unrelated aspects, 3 were short communications, 2 were

Trichomonas vaginalis, Genetic Variation, and Pathogenicity: a Systematic Review

Table 1: Form for the application of the relevance tests.

Form for the application of the test 1	Yes	No
Inclusion Criteria:		
1) "Is there a genetic variation in <i>Trichomonas vaginalis</i> infection?"		
Exclusion Criteria:		
1) Do not obey inclusion criteria		
2) Editorial, letter or review?		
Reason for the exclusion:		
Form for the application of the test 2		
Inclusion Criteria:		
1) "Is there a correlation between <i>Trichomonas vaginalis</i> and oxidative stress?"		
Exclusion Criteria:		
1) Do not obey inclusion criteria		
2) Insufficient data for evaluation?		
Reason for the exclusion:		

Table 2: Retrieved articles per database

Data Base	Date	Time	Total
MeSH	12/07/2006	8:30	70
DeCS	12/07/2006	9:30	66
DeCS	12/07/2006	10:30	33
Total	12/07/2006	11:30	129

review articles, 1 was a case study, and 1 was in another language.

Of the 33 articles retrieved from the Virtual Health Library using the DeCS "*Trichomonas vaginalis* and genetic variation", 1 was included (Table 2-a), while the remaining 32 were excluded. Of the papers excluded, 16 were published prior to 2006, 9 dealt with unrelated aspects, 6 were duplicates and 1 was a short communication. Of those initially excluded because they were published before 2006, an exception was made for one paper published in 2004, which was considered relevant.

B. The second test of relevance

The second MeSH term "*Trichomonas vaginalis* and oxidative stress" retrieved six papers from PubMed, with four of these being included (Table 2-b) and two excluded. The two that were excluded were review articles. Of the four papers included, one was published in 2005 but nevertheless was considered relevant to the study.

The second DeCS "*Trichomonas vaginalis* and oxidative stress" retrieved 16 papers from the Virtual Health Library, one of which was included (Table 2-b), while the remaining 15 were excluded. Of these, 10 dealt with unrelated aspects, 4 were duplicates, and 1 consisted of a review article.

IV. DISCUSSION

Two principal types of population structure of *T. vaginalis* were reported in the selected articles: type 1 and type 2. Type 1 corresponds to the wild type G3 strain, which is the type most commonly found at wet mount microscopy. This corresponds to the most active stage, since positivity at wet mount microscopy is associated with movement of the flagella of the parasite. In addition, Matini et al. found the CT66 mutation in internal transcribed spacer (ITS) region 1. This consists of the substitution of cytosine by thymine at nucleotide location 66^[13, 15, 16].

Figure 1: Study flowchart: Relevance test 1

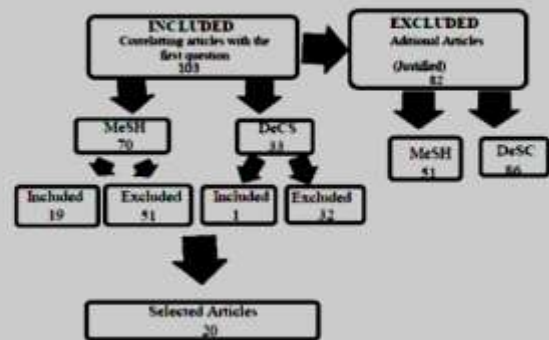
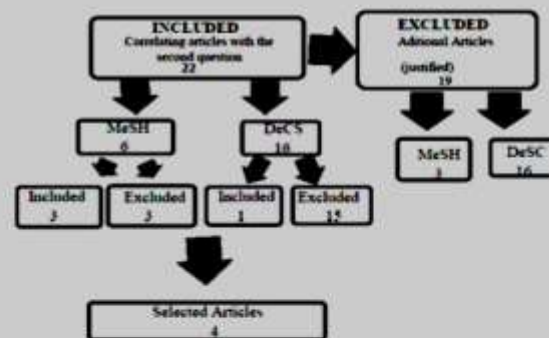


Figure 2: Study flowchart: Relevance test 2



A statistically significant ($p=0.01$) and clinically important association was found between type 1 *T. vaginalis* infections and increased viral loads in HIV-positive women in use of antiretroviral therapy (ART). Nevertheless, compared to population-based groups (HIV-positive women and controls), there was no genetic difference between the species^[15].

Type 2 *T. vaginalis* has been found to be more resistant to metronidazole. Resistance was related to the inhibition of nitroreductase (*ntn*). Variations in the DNA sequences affected only one base in the *ntn-4*, *ntn-6*, *ntn-9*, and *ntn-10* haplotypes of *T. vaginalis*. The *ntn-4* and *ntn-5* haplotypes were associated with each other. The minimum lethal doses of metronidazole were significantly associated with the *ntn-5* genotype^[13]. On the other hand, Type 1 parasites were more susceptible to infection by the *T. vaginalis* virus (TVV) and were more susceptible to metronidazole compared to the type 2 parasites, confirming the greater resistance of this second type^[17].

The virulence of *T. vaginalis* may be impacted by the presence of the TVV because of the ability of the virus to trigger variations in phenotype. The study conducted by Fraga et al. included isolates with TVV in Group 2. The presence of TVV was associated with the genetic polymorphism. Of the 37 clinical isolates of *T. vaginalis* analyzed, 21 were infected with the genetic group 1^[20].

The active state of *T. vaginalis* may reflect its greater capacity for phagocytosis. Bearing in mind that a phagocyte



Table 2a: Qualitative analysis of the articles selected using the Medical Subject Headings (MeSH) "Trichomonas vaginalis & genetic markers".

Authors	Country of Publication Year	Diagnostic Methods	Journal	Impact Factor
Morones et al. ¹⁸	Germany 2013	Culture, PCR-RFLP	Eur Parasitol	1.64
Wieder et al. ¹⁷	United Kingdom 2014	Culture, RT-PCR	Int J Gen Sex	1.68
Pedro-Balboa et al. ¹⁷	United States 2014	Culture, NMP	Am J Obstet Gynecol	4.47
Lara-González et al. ¹⁴	United States 2014	DGAC, IFP	Sex Transm Infect	3.83
Conrad et al. ¹⁷	United Kingdom 2013	Culture, PCR, MS	Sex Transm Infect	3.83
Mattos et al. ¹⁸	Malawi 2012	Culture, NMP, PCR	Sex Transm Infect	3.83
Harcavates et al. ⁴	United Kingdom 2017	Culture, rDNA, Metagenomics with ITS ¹	Genom Biol Evol	4.77
Papadimitrakaki et al. ¹⁷	United Kingdom 2012	Culture, RT-PCR, Apical bodies assay ²	Parasitol	2.18
Conrad et al. ¹⁷	United States 2012	Culture, PCR, MS ³	J Clin Microb	3.93
Kerr et al. ¹⁷	United States 2012	Culture, RT-PCR, confocal microscopy, MS ³	PLoS Negl Trop Dis	4.44
Trigo et al. ¹⁸	Germany 2012	Culture, IAD ¹ , PCR multiplex	Eur Parasitol	1.64
Conrad et al. ¹⁸	United States 2012	Culture, PCR, MS	PLoS Negl Trop Dis	4.44
Trigo et al. ¹⁸	Germany 2011	Culture, PCR, RAPD	Eur Parasitol	1.64
Conrad et al. ¹⁷	United States 2011	Culture, MS, NGS ⁴ , FISH ⁵	Mol Microbiol	2.68
Cui et al. ²²	United States 2010	Culture, PCR, RT-PCR	PLoS Negl Trop Dis	4.44
Rivera et al. ¹⁹	Germany 2009	Culture, PCA	Parasitol Res	2.83
Iskender et al. ¹⁸	United States 2009	Culture, PCR, RFLP	Am J Trop Med Hyg	2.89
Creschi et al. ²⁰	Switzerland 2008	Culture, nested PCR, RFLP	Clin Microbiol Infect	4.17
Bonczar et al. ¹⁸	United States 2007	Culture, PCR, MS, PAGE ⁶	Mol Microbiol	3.10
Bonds et al. ¹⁸	United Kingdom 2002	Culture, PCR, RT-PCR	J Clin Microbiol	2.52

1. RFLP, Restriction Enzyme Digestion; 2. IAD, Intraepithelial Inflammation; 3. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 4. NGS, Next-Generation Sequencing; 5. FISH, Fluorescence In Situ Hybridization; 6. PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis; 7. MS, Microsatellite Analysis; 8. RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; 9. rDNA, recombinant DNA; 10. NMP, Nucleic Acid Amplification; 11. IAD, Intraepithelial Inflammation; 12. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 13. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 14. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 15. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 16. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 17. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 18. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 19. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 20. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 21. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 22. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.

may contain a series of different microorganisms including viruses, bacteria and fungi, *T. vaginalis* may act as a carrier, spreading and facilitating other infections in the host organism^[19, 20].

T. vaginalis may be associated with the endosymbiotic presence of the Mollicutes class of bacteria. Species of Mollicutes were detected in 7.5% of isolates (3/40). *Mycoplasma hominis* was detected in the C12 and A163 isolates. Isolate C147 was positive for Mollicutes class but negative for the other four species tested. However, it was the only one that reflected clinical symptomatology^[18].

The endosymbiosis of TVV increases the virulence of the parasite in the host organism, since there are immunogenic proteins on the surface of *T. vaginalis* that may flourish due to the presence of the endosymbiont, as suggested by Conrad et al.^[19] Fichorova et al. argued that placental insufficiency in pregnant women may be the result of the *T. vaginalis* virus inducing the production of interleukin 8^[23].

Different manifestations of trichomoniasis may be due to the variations in the host's individual factors. The molecular behavior of *T. vaginalis* has already been evaluated based on clinical signs and symptoms. Rivera et al. conducted a study with a population of asymptomatic sex workers in different regions of the Philippines. Sequencing of the 5.8SrDNA gene and the internal transcriber spacer (ITS) regions was conducted using 57 isolates of *T. vaginalis*. Using the G3 strain as reference, similarity was 99-100% for the isolates from the Philippines. Of the 57 isolates, 46 belonged to H1 and this had the best representation, with 6 types of sequences. Seven isolates belonged to H4, while of the four other types each one represented a single isolate. The sequences of types 2 and 6 (H2 and H6) differed from the reference strain by only one nucleotide position. Types 1 and 4 did not reflect random mutations alone, but, rather, *T. vaginalis* strains possibly associated with the patients' asymptomatic state^[23].

Woehle et al. experimentally validated the expression of a set of long, non-coding RNAs (lncRNAs) in the T1 strain, in

Table 2b: Qualitative analysis of the articles selected using the Health Sciences Databases (HSD) "Trichomonas vaginalis & genetic markers".

Authors	Country of Publication Year	Diagnostic Methods	Journal	Impact Factor
Saenz et al. ²⁴	China 2014	Culture, Western blot, Metagenomics using T1 ⁷	Acta Agric Sci	2.72
Gould et al. ²⁵	Japan 2012	Genomic analysis in silico using array NGS ⁸	Eur Parasitol	1.68
Peter et al. ²⁵	United States 2009	Culture, MS ³ , Metagenomic analysis, Phylogenetic tree, Metagenomics, MS sequencing, MS ⁹	J Biol Chem	2.68
Creschi et al. ²⁰	United States 2008	Culture, Chaperone mediated PCR	J Biol Chem	4.17

1. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 2. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 3. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 4. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 5. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 6. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 7. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; 8. NGS, Next-Generation Sequencing; 9. MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.

the virulent T016 strain and in the highly virulent FMV1 strain. Six cases of lncRNAs were found in each of the three strains tested. One set of pseudogenes included 7% of all the transcripts analyzed^[12].

T. vaginalis infection was classified into three different types according with its intensity: mild, moderate or severe. The asymptomatic patients had four specific markers. The 1724 pb marker was found in all the isolates from women in whom the infection was mild, while 2418 was found in isolates from women in whom infection was moderate and two genetic markers (534 and 1360 pb) were amplified only in the group of women with severe infections^[22].

Genes that encode many protein families in the species genome may explain its adaptation to the different microenvironments of the host, given the multiplication of the parasite by cloning (mitosis) and the expansion of its genome^[27]. *T. vaginalis* contains 2 *tpi* genes that encode triose phosphate isomerase (TIM). This enzyme catalyzes the isomerization between glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate in the parasite. At the end of the study, results showed that the *tpi2* transcript was approximately 3.3 times more abundant than *tpi1*^[8].

Lara-González et al. reported the TvTIM1 enzyme to be a more stable protein than TvTIM2, since the former contains an isoleucine whereas the latter contains a valine. The removal of a methyl group causes a decrease in the stability of various isoleucine (Ile) mutations in valines, since the difference in stability is associated with the loss of van der Waals interactions and with the difference in hydrophobia^[14].

The ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family expands considerably in *T. vaginalis*, including expansion of membrane transport and flow. According with the topology of each protein and based on the number and order of transmembrane domains and of the nucleotide binding domain (NDB), *T. vaginalis* was found not to encode full-length transporters. Furthermore, a large number of orphan ABC genes were found in *T. vaginalis*, denoting the suppression of stop codons by *T. vaginalis*. The study concluded that the absence of full-length ABC transporters in *T. vaginalis* is unique among the sequenced eukaryotes^[7].

Six genes were selected for a phylogenetic analysis. Different evolutionary relationships were found between strains: with GP63a, PMS1, M1h 1a, CRN, GP63b and LLF4 representing potentially virulent genes and a potential drug target for later analysis. The set of data on the surface protein consisted of 4,182 positions aligned with 30 local polymorphisms translated to 24 varying locations in the protein sequence, with one having three variant amino acids.

The set of data consisted of 5,619 unequivocally aligned positions including 34 polymorphic positions, translating to 23 varying locations in the protein sequence. The phylogeny of the maintenance gene sustains the B7RC2 and F1623 strains [21].

Actin plays a role in the pathogenicity of *T. vaginalis*. It is presumed that its ability to change morphologically is related to its virulence, and the importance of cytoskeletal integrity must be emphasized [11]. Momeni et al. amplified the actin gene using nested polymerase chain reaction (PCR) and showed an 1100 pb fragment in 7 isolates of sequenced *T. vaginalis*. According with agarose gel electrophoresis examination, no change occurred in the length of 45 amplicons. Four different types of *T. vaginalis* (G, E, He and I) were identified in the 45 isolates. The most common type was G (51.1%) [11].

Oxidative stress in the human body may play a role in the state of activation of *T. vaginalis*. Since these parasites are anaerobic, they can act by reducing oxygen and other metabolites through a reductive system linked to the enzymes thioredoxin, peroxiredoxin and rubrerythrin [8, 30, 31]. The malate enzyme (ME) and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) catalyze the oxidative decarboxylation of malate and pyruvate in the hydrogenosomes of *T. vaginalis* and may be able to act in the absence of the iron element, since the expression of 4 ME and 2 PFOR genes has been demonstrated under these circumstances [6]. Smutná et al. characterized the catalytic properties of an iron-sulfur flavoprotein (TvIsf) present in *T. vaginalis* hydrogenosomes, and found that it had a short extension of 8 amino acids, with an amino-terminal (N-terminal) that is not present in homologous prokaryotes. The TvIsf flavoprotein, acting within the hydrogenosomes and consequently causing activation, may represent a defense mechanism against xenobiotics in the host organism [28].

V. CONCLUSION

Two principal types of population structure of *T. vaginalis* were found: type 1 and type 2. *T. vaginalis* can reduce the oxygen resulting from cellular respiration to remain in anaerobiosis. The conditions of oxidative stress may thus lead to possible activation of the parasite in the vaginal environment. The genetic variations in the parasite correspond to the genetic polymorphisms that originate from the wild type G3 strain (type 1), which are the result of resistance to metronidazole, of horizontal transferences caused by endosymbionts and/or of the simple adaptive process due to an environmental condition caused by adequate immunity (type 2).

REFERENCES

[1] P. A. P. Lemos, "Occurrence of *Trichomonas vaginalis* infection in HIV positive and negative women attended in referral hospitals in Goiânia, Goiás, Brazil". *Rev. Patol. Trop.* 2009;38(1):71-72.
 [2] P. A. P. Lemos, W. N. Amaral, "Trichomonas vaginalis associated with cervical cancer: a systematic review". *Femina* 2015; 43:209-214.
 [3] N. E. Kurewa, M. P. Mapingure, M. W. Munjoma, M. Z. Chirenje, S. Rusakaniko, B. Stray Pedersen, "The burden and risk factors of Sexually Transmitted Infections and Reproductive Tract Infections

among pregnant women in Zimbabwe". *BMC Infect Dis.* 2010;10:127.
 [4] S. R. Leon, K. A. Konda, K. T. Bernstein, J. B. Pajuelo, A. M. Rosasco, C. F. Caceres, T. J. Coates, J. D. Klausner, "Trichomonas vaginalis, infection and associated risk factors in a socially-marginalized female population in coastal Peru". infection and associated risk factors in a socially-marginalized female population in coastal Peru. *Infect Dis Obstet Gynaecol.* 2009; 2009:1-6.
 [5] A. Pereira-Neves, K. C. Ribeiro, M. Benchimol, "Pseudocysts in Trichomonads - new insights". *Protist* 2003;154: 313-329.
 [6] L. Horváthová, L. Safariková, M. Basler, I. Hrdy, N. B. Campo, J. W. Shin, K. Y. Huang, P. J. Huang, R. Liu, P. Tang, J. Tachezy, "Transcriptomic Identification of Iron-Regulated and Iron-Independent Gene Copies within the Heavily Duplicated *Trichomonas vaginalis* Genome". *Genome Biol Evol.* (2012) 4(10):1017-29.
 [7] Kay, K. D. Woodward, K. Lawler, T. J. Self, S. D. Dnyall, I. D. Kerr, "The ATP-binding cassette proteins of the deep-branching protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*". *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6): e1693.
 [8] E. Figueroa-Angulo, P. Estrella-Hernández, Estrella-Hernández, H. Salgado-Lugo, A. Ochoa-Leyva, A. G. Puyou, S. S. Campos, G. Montero-Moran, J. Ortega-Lopez, G. Saab-Rincón, R. Arroyo, C. G. Benítez Cardoza, L. G. Briebe "Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerase from *Trichomonas vaginalis*". *Parasitol.* (2012) 139: 1729-1738.
 [9] S. Plütz, G. Gelius-Dietrich, M. Piotrowski, K. Henze, "Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*". *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 142(2): 212-23.
 [10] Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D. G. Altman "The PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement". *PLoS Med.* 2009;6(6): e1000097.
 [11] Z. Momeni, J. Sadraei, B. Kazemi, A. Dalimi, "Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-RFLP in Iran". *Exp Parasitol.* 2015;159: 259-63.
 [12] Woehle, G. Kusdian, C. Radine, D. Graur, G. Landan, S. B. Gould "The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes". *BMC Genom.* 2014;15(906): 1-12.
 [13] T. E. Paulish-Miller, P. Augustini, J. A. Schuyler, W. L. Smith, E. Mordechai, M. E. Adelson, S. E. Oygax, W. E. Secor, D. W. Hilbert, "Trichomonas vaginalis metronidazole resistance is associated with Single Nucleotide Polymorphisms in the nitroreductase genes *ntv-1v* and *ntv-6v*". *Antimicrob Ag Chemoth.* 2014;58(5): 2938-2943.
 [14] S. Lara-González, P. Estrella-Hernández, A. Ochoa-Leyva, M. C. Portillo-Télez, L. A. Caro-Gómez, E. E. Figueroa-Angulo, H. Salgado-Lugo, J. F. T. Miranda-Ozuna, J. Ortega-López, R. Arroyo, L. G. Briebe, C. G. Benítez-Cardoza, "Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication". *Proteins* 2013;82(1):22-33.
 [15] M. D. Conrad, P. Kissinger, N. Schmidt, D. H. Martin, J. M. Carlton "Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* reinfection in HIV positive women". *Sex. Transm. Infect.* 2013;89(6): 473-478.
 [16] M. Matini, M. Rezaieian, M. Mobeali, A. H. Maghsood, S. Rabiee, A. Rahimi-Foroushani, M. Fallah, A. Miahpour, S. Rezaie, "Genotyping of *Trichomonas vaginalis* isolates in Iran by using single strands conformational polymorphism of PCR technique and internal transcribed spacer regions". *Trop. Biom.* 2012; 29(4): 605-612.
 [17] C. Cornelius, D. A. Robinson, C. A. Muzny, L. A. Mena, D. M. Aanensen, W. B. Lushbaugh, J. C. Meade, "Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates by use of Multilocus Sequence Typing". *J Clin. Microbiol.* 2012;50(10):3293-300.
 [18] J. Fraga, N. Rodriguez, C. Fernández, B. Mondeja, I. Sariego, A. Fernández-Calienes, L. Rojas, "Mycoplasma hominis in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: association with parasite genetic polymorphism". *Exp. Parasitol.* 2012; 131(3):393-8.
 [19] M. D. Conrad, A. W. Gorman, J. A. Schillinger, P. L. Fiori, R. Arroyo, N. Malla, M. L. Dubey, J. Gonzalez, S. Blank, W. E. Secor, J. M. Carlton, "Extensive genetic diversity, nique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*". *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(3): e1573.
 [20] J. Fraga, L. Rojas, I. Sariego, A. Fernández-Calienes, "Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and correlation with genetic polymorphism of isolates". *Exp. Parasitol.* 2011; 127(2):593-9.
 [21] M. Conrad, Z. Zubacova, L. A. Dunn, S. A. Sullivan, J. Tachezy, J. M. Carlton, "Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted



- human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite". *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011; 175(1):30-8.
- [22] J. Cui, S. Das, T. F. Smith, J. Sammelson, "Trichomonas transmembrane cyclases result from massive gene duplication and concomitant development of pseudogenes". *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8): e782.
- [23] W. L. Rivera, V. A. Ong, M. C. Masahunga, "Molecular characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates from the Philippines". *Parasitol. Res.* 2009; 106(1): 105-10.
- [24] J. C. Meade, J. De Mestral, J. K. Stiles, W. E. Secor, R. W. Finley, J. D. Cleary, W. B. Lushbaugh, "Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI Restrict Fragment Length polymorphism of heat shock protein 70 genes". *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(2): 245-51.
- [25] T. Cruciani, S. Abdellati, E. Van Dyck, A. Buvé, "Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism". *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(9):844-52.
- [26] M. T. Brown, H. M. Goldstone, F. Bastida-Corcuera, M. G. Delgadillo-Correa, A. G. McArthur, P. J. Johnson, "A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry". *Mol Microbiol.* 2007; 64(5):1154-63.
- [27] M. Bradic, S. D. Warring, V. Low, J. M. Carlton, "The Tc1/mariner transposable element family shapes genetic variation and gene expression". In the protist *Trichomonas vaginalis*. *Mob DNA* 2014; 5:12.
- [28] T. Smutná, Pilarová K., J. Tarábek, J. Tachezy, I. Hrdý, "Novel functions of an iron-sulfur flavoprotein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes". *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6): 3224-32.
- [29] S. B. Gould, C. Whole, G. Kudian, G. Landan, J. Tachezy, V. Zimorski, W. F. Martin, "Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition". *Int J Parasitol.* 2013; 43(9):707-19.
- [30] S. Pütz, G. Gelius-Dietrich, M. Piotrowski, K. Henze, "Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*". *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 142(2): 212-23.
- [31] H. Coombs, G. D. Westrop, P. Suchan, G. Puzova, R. P. Hirt, T. M. Embley, J. C. Mottram, S. Müller "The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system". *J Biol Chem.* 2004; 279(7): 5249-56.
- [32] L. Rojas, J. Fraga, J. Sariego, "Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation". *Infect. Gen. Ev.* 2004; 53-58.
- [33] R. N. Fichorova, Lee Y. Yamamoto, Y. Takagi, G. R. Hayes, R. P. Goodman, "Endosymbiotic viruses sensed by the human host – beyond conventional antiparasitic therapy". *PLoS One.* 2012;7 (11): e48418.

Artigo 2

Full Length Research Paper

Association between *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant, non-pregnant and HIV-positive women

Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos^{1,3*}, Rosane Silva Carneiro de Araújo² and Waldemar Naves do Amaral^{3,4}

¹Laboratório São Francisco de Assis

²Laboratório Alpha DNA

³Tropical Diseases Hospital in Goiás, Postgraduate program in Health Sciences/ Federal University of Goiás

⁴Dona Iris General and Maternity Hospital.

Accepted 07 January, 2017

Trichomonas vaginalis is a parasitic protozoan responsible for the sexually transmitted disease trichomonosis. The objective of the present study was to evaluate and compare the frequency of the parasite in groups of pregnant, non-pregnant, and HIV-positive women according with five different techniques and establishing a putative correlation between trichomonosis and immunodeficiency status. The study population was pregnant women receiving care at *Dona Iris Hospital and Maternity Unit* (100), non-pregnant attending health care at the *Federal University of Goiás' Teaching Hospital* (106) and HIV-positive women attending an outpatient clinic at the *Tropical Diseases Hospital in Goiás* (103) in Goiânia, Goiás, Brazil. The polymerase chain reaction (PCR) wet mount microscopy, culture, Papanicolaou (Pap) smears, and a stained preparation from cultured *T. vaginalis* were the five techniques used. In this study, HIV-positive women presented a higher chance of acquiring trichomonosis (OR= 2,26). There was a higher risk of association between the infection and pre-cancerous lesions diagnosed by Papanicolaou's method. PCR was considered the gold standard. The comparative study showed the frequency of *T. vaginalis* in three groups of women in Goiânia, Goiás, Brazil.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, pregnant women, HIV, diagnostic techniques, uterine neoplasms, immunosuppression.

*Corresponding Author E-mail: patricia.apl@hotmail.com; Phone number: (62) 998067263

INTRODUCTION

Trichomonas vaginalis is a parasitic protozoan responsible for the sexually transmitted disease trichomonosis. This parasitic infection is reaching higher incidence in groups of pregnant women and women with the human immunodeficiency virus (HIV). HIV was

detected in 201 women infected by *T. vaginalis* diagnosed by wet mount microscopy (Salawu and Esume, 2016). Additionally the parasite was detected in 6.2% of pregnant women attending care at the Obstetrics Clinic at the University Hospital of Buenos Aires. The gene 18S

rRNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) (Testardini et al., 2016).

Detecting *T. vaginalis* infection in HIV-positive women using different diagnostic techniques is highly relevant from a clinical point of view, bearing in mind that no single currently available technique combines complete efficacy with simplicity. PCR is considered the gold standard technique according to papers recently published in the literature. PCR resulted in high specificity with primers TVK3/TVK7 amplifying the conserved region of the gene, with a mutation risk that was considered minimal or zero (Crucciti et al., 2003; Khalaf and Kadhim, 2010).

Wet mount microscopy is a highly specific technique however with sensitivity rates around 40% compared to the gold standard (PCR) (Leli et al., 2016; Testardini et al., 2016). Culture was considered gold-standard in the past however has been replaced by the nucleic acid amplification techniques (Menezes et al., 2016). In a study conducted with pregnant women culture in modified thioglycollate medium successfully detected 75% of *T. vaginalis* infections and 100% of specificity compared with PCR (Testardini et al., 2016). Papanicolaou (Pap) smear is the diagnostic method mostly used in detecting the parasite. In the present study this stained method was performed under microscopic examination with a magnification of a hundred and 400 times. *T. vaginalis* DNA had been amplified from 130 archived Papstained cervical and vaginal smears which contained the parasite. A total of 98 Pap smears were found positive by nested PCR giving a sensitivity and specificity of 75.4% and demonstrating that the results obtained by the microscopic examination were confirmed by the PCR method (Lemos e Amaral, 2016; Ziaei Hezarjaribi et al., 2015).

The objective of the present study was to establish the frequency of *T. vaginalis* infection in three population groups: pregnant, non-pregnant and HIV-positive women by comparing five different techniques verifying the risk of co-infection and comparing the accuracy of the techniques to detect *T. vaginalis* taking PCR as the gold-standard.

METHODS

Population

This cross-sectional, prospective study involved 309 women, 100 of whom were pregnant, 106 non-pregnant and 103 women were HIV-positive. Low-risk pregnant patients of any age who were requesting gynecological examination comprised the group of pregnant women. The non-pregnant group consisted of sexually active in an appropriate phase of the cycle to permit samples to be

taken for testing. In the case of HIV-positive women a confirmed diagnosis of HIV infection (ELISA and Western-blot) and the patient's awareness of their primary conditions were required.

Site

The patients receiving care at three principal referral public healthcare centers in the state of Goiás, Brazil: the *Dona Iris Hospital and Maternity Unit*, a reference in women's healthcare and linked to the Municipal Health Fund, the *Federal University of Goiás' Teaching Hospital* and the *Tropical Diseases Hospital*, a referral center affiliated to the Goiás State Health Department situated in the city of Goiânia.

Sampling procedures

Secretion samples were collected by the medical teams at the respective hospitals in the period of a year (from August 2015 to August 2016). During a gynecological examination, cervicovaginal secretion were collected using a sterile swab against ectocervix and endocervix.

Wet mount

For this exam, the swabs were immediately soaked in sterile saline solution (0,85%). Microscopic examination was performed within half an hour of sampling.

Culture

Modified thioglycollate medium was used for the culture of *T. vaginalis*. Sampling was performed as for wet mount microscopy, with the vaginal swabs immediately being transferred into the liquid medium. The samples were incubated at 37°C until the parasite peaked in growth (48 hours) and then examined on a glass slide under a coverslip.

Stained preparation from cultured *T. vaginalis*

After a 72-hour period, the cultures in liquid medium were centrifuged at 3,500 rpm and their pellets were smeared onto glass slides. The smears were placed at 37°C for air-drying fixation. Next, the preparations were stained using the Quick Panoptic method.

Pap smears

Fine and homogeneous smears distributed evenly over the slides and identified in pencil at the extremities and fixed using 70% ethanol to prevent inadequate air drying. This slides were then submitted to the Papanicolaou staining process.

Table 1. Distribution of *T. vaginalis*' frequency taking PCR as the gold standard in three groups of women, in Goiânia, 2016.

<i>T. vaginalis</i>	Non-pregnant	95% CI	Pregnant	95% IC	HIV positive	95% IC
Present	19 (17,9%)	11,1 26,2	19 (19,0%)	11,8 21,9	34 (32,2%)	23,6 42,2
Absence	87 (82,1%)	73,4 88,8	81 (81,0%)	71,9 88,6	69 (67,8%)	57,8 76,4
Total	106 (100%)		100 (100%)		103 (100%)	
			OR= 1,07	0,53 2,17	² OR= 2,26	1,18 4,30

¹ODDS RATIO: ¹Pregnant versus Non-pregnant; ²HIV positive versus Non-pregnant women.

Table 2. Distribution of *T. vaginalis*' frequency among five techniques in pregnant, non-pregnant, and HIV-positive women in Goiânia, 2016.

Diagnostic techniques	Non-pregnant	CI %	CP%	Pregnant	CI %	CI %	HIV-positive	CI %	CI %	Total
PCR	19 (17,9%)	11,15	26,57	19 (19,0%)	11,84	28,07	34 (33,0%)	24,06	42,97	72 (100,0%)
Wet mount	3 (2,8%)	0,59	8,05	9 (9,0%)	4,20	16,40	21 (20,3%)	24,94	43,97	33 (100,0%)
Culture	32 (30,2%)	21,65	39,87	37 (37,0%)	27,56	47,24	35 (33,9%)	13,09	29,46	104 (100,0%)
Pap smear	58 (54,7%)	44,75	64,41	38 (38,0%)	28,48	48,25	69 (66,9%)	57,03	75,94	165 (100,0%)
Cultured <i>T. vaginalis</i> stained	95 (89,6%)	89,19	94,70	80 (80,0%)	70,82	87,33	87 (84,4%)	76,00	90,85	262 (100,0%)
Total	106 (34,3%)			100 (3,2%)			103 (33,3%)			309 (100,0%)

CI%: 95% Confidence Interval

DNA extraction

For this exam the swabs were immediately soaked into distilled water. *T. vaginalis* was extracted from the vaginal samples using the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN[®]).

PCR

The primers selected were TVK3 and TVK7, as recommended by Khalaf and Khadim (2010). The PCR reaction mix yielded a final volume of 22 μ L which consisted of 1 μ L of each primer, 10 μ L of DNA, 0,5 of Taq polymerase (5 IU/Invitrogen), 0,5 μ L of buffer mix (10 mM) and 6,5 μ L of water. The target DNA was amplified in accordance with the following protocol: 2 minutes at 96°C, 33 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 60°C, 1 minute and 30 seconds at 70°C and another 30 minutes for

the final extension of the target DNA. The amplicons were submitted to electrophoresis using a Mega BACE 1000 DNA-sequencer (GE Healthcare, USA). Genotyping analysis were performed using Fragment Profiler[®] software.

Ethical issues

The study protocol was approved by the institution's internal review board which is credited by the National Commission of Ethics in Research (CONEP). The study was conducted in accordance with the 2008 revised Helsinki Declaration and all the participants signed a consent form.

Statistical analysis

The chi-square test and Fisher's exact test were used in the statistical analysis which was

conducted using the EpiInfo software program version 7. Significance level was defined as $p < 0,05$.

RESULTS

The present study showed HIV-positive women strongly associated with *T. vaginalis*' infection (OR= 2,26). Comparison between pregnant and non-pregnant women showed OR close to be associated (OR=1,07).

PCR and wet mount techniques presented the highest percentages in the HIV-positive group (33,0% and 20,3%). Culture showed around 30% in the three groups and culture stained by Papanoptic detected the highest frequencies of all, around 80%.

Table 3. Distribution of *T. vaginalis* infection in non-pregnant, pregnant and HIV-positive women in Goiânia, 2016.

Diagnostic techniques	PCR gold standard			
	Non-pregnant women			
	% Sensitivity	% Specificity	PPV	NPV
Wet mount	23	99	80	85
Culture	47	73	25	88
Cultured <i>T. vaginalis</i> stained with Panoptic	100	12	17	100
Pap smear	53	45	15	83
	Pregnant women			
	% Sensitivity	% Specificity	PPV	NPV
Wet mount	47	96	75	89
Culture	53	66	26	85
Cultured <i>T. vaginalis</i> stained with Panoptic	89	23	20	90
Pap smear	50	65	24	85
	HIV positive			
	% Sensitivity	% Specificity	PPV	NPV
Wet mount	54	99	67	85
Culture	70	81	81	85
Cultured <i>T. vaginalis</i> stained with Panoptic	94	19	36	87
Pap smear	75	37	35	74

Table 4. Distribution of *T. vaginalis* frequency with the presence of cytological abnormalities in three groups of women in Goiânia, 2016.

Cytological abnormalities	Non-pregnant		Pregnant		HIV positive	
	<i>T. vaginalis</i>					
	+	-	+	-	+	-
Negative for Malignity	19 (100,0%)	82 (94,2%)	17 (89,4%)	79 (97,5%)	28 (85,35%)	60 (86,96%)
ASC-US	0 (0,0%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (8,82%)	3 (8,82%)
LSIL	0 (0,00%)	4 (4,60%)	2 (10,5%)	2 (2,4%)	5 (7,25%)	5 (7,25%)
	OR= 4,65 (IC % 0,61-35,34)				OR= 2,14 (IC % 0,72-6,29)	

*Frequency taking PCR as gold-standard;ASC-US: Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance; LSIL: Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions. OR: ODDS RATIO. CI%: 95% Confidence Interval.

Comparing diagnostic techniques in the detection of *T. vaginalis* taking PCR as gold-standard, this present study verified that the wet mount technique in non-pregnant women showed lower sensitivity (23%) than in pregnant women (47%) and in HIV-positives (54%). Culture specificity was higher than 80% among the three groups of women.

Stained methods (Papanicolaou and Quick Panoptic) presented the highest frequencies however with high false-positives rates.

The present study evaluated the presence of cytological abnormalities in three groups of women correlating the rates found in pregnant women and the

rates found in the HIV-positive group with the rates found in the non-pregnant group. The purpose was to give further strength to correlate *T. vaginalis* infection with a status of immunosuppression.

The results found a strong association between trichomoniasis and cytological abnormalities in both groups of pregnant and HIV-positive women (OR=4.65 and OR=2,14).

There was no significant association between *T. vaginalis* frequency and vaginal microbiota predominated with cocci and short bacilli. Comparing pregnant group with non-pregnant women OR=0,51 and HIV-positive women with non-pregnant group OR=0,78.

Table 5: Distribution of *T. vaginalis*' frequency among different vaginal microbiota in three groups of women in Goiânia, 2016*

<i>T. vaginalis</i>	Microbiota						Total
	Lactobacilli	Cocci and short bacilli	Mixed	Polymicrobial	Bacilli	Cocci	
Non-pregnant							
+	7 (36,8%)	9 (47,4%)	3 (15,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	19 (100,0%)
-	30 (34,5%)	28 (32,2%)	22 (25,3%)	1 (1,1%)	5 (5,7%)	1 (1,1%)	87 (100,0%)
Total	37 (34,9%)	37 (34,9%)	25 (23,6%)	1 (0,9%)	5 (4,7%)	1 (0,9%)	106 (100,0%)
Pregnant							
+	7 (36,8%)	6 (36,6%)	3 (15,8%)	1 (5,3%)	2 (10,5%)	0 (0,0%)	19 (100,0%)
-	47 (58,0%)	13 (16,0%)	15 (18,5%)	5 (6,2%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)	81 (100,0%)
Total	54 (54,0%)	19 (19,0%)	18 (18,0%)	6 (6,0%)	3 (3,0%)	0 (0,0%)	100 (100,0%)
HIV-positive							
+	10 (29,4%)	14 (41,2%)	6 (17,6%)	1 (2,94%)	0 (0,0%)	3 (8,8%)	34 (100,0%)
-	22 (31,9%)	20 (28,9%)	16 (23,1%)	5 (7,2%)	3 (4,3%)	3 (4,3%)	69 (100,0%)
Total	32 (31,0%)	34 (33,0%)	22 (21,3%)	6 (5,8%)	3 (2,9%)	7 (6,8%)	103 (100,0%)

*Frequency taking PCR as gold-standard ($p > 0,05$)

DISCUSSION

The higher frequencies of *T. vaginalis*' infection in pregnant and in HIV-positive women (33,0% and 19,0%) observed in this study demonstrated the better susceptibility of the parasite to cytological abnormalities, indicating also a risk factor for HIV infection ($OR=2,26$). Epidemiological studies similarly indicated a two to three-fold increase in HIV infection risk with concomitant *T. vaginalis* infection (Serwin and Koper, 2013).

The frequency of 19% found in pregnant women, taking PCR as gold-standard, was similar to the rates found by Testardini et al (2016) whose PCR detected exactly 19.2% in a similar group.

HIV has a tropism for the defense cells in the human host while *T. vaginalis* in the cervix and vagina leads to an accumulation of cells from the immune system. The phagocytic ability of *T. vaginalis* may lead to a dissemination of viral particles in HIV-positive women co-infected with trichomoniasis (Rêdom-Maldonado, 1998; Benchimol and Pereira-Neves, 2007).

T. vaginalis causes the activation of neutrophils and the release of a series of inflammatory cytokines (interleukin-8) producing toxicity (nitric-oxide) in the vaginal environment, altering the microbiota consequently leading to an oxidative stress in the mucosal tissue (Frasson et al., 2012; Nam et al., 2012).

PCR technique was considered gold-standard since the number of samples testing positive for *T. vaginalis* was higher principally in the HIV-positive group. Culture analysis conducted post-incubation at 37°C, 48 hours later enabled *T. vaginalis*' visualization of trophozoite and pseudocyst's forms. Representing a normal portion of the life cycle rather than being degenerative forms,

pseudocysts undergo mitosis by a different process from that of trophozoites (Pereira-Neves et al., 2003; Csw et al., 2014).

Detection of *T. vaginalis* by Pap smear diagnostic test was lower compared with the other methods. The vaginal microbiota in pregnancy frequently associated with an intense vaginal discharge may in part justify this finding. Staining parasitological techniques (a cultured parasite and/or a positive wet mount stained with Giemsa or Quick Panoptic) were proved to be more sensitive than cytological methods in the diagnosis of *T. vaginalis* (Karaman et al., 2008).

Positivity at wet mount microscopy is associated with movement of the flagela of the parasite corresponding to the most active stage. *T. vaginalis*' active stage may reflect its greater capacity for phagocytosis. Type 1 is the most commonly parasite type found at wet mount microscopy and corresponds to the wild type G3 strain. Culture in the modified fluid thioglycollate medium detected only 47% of *T. vaginalis* infections in pregnant and non-pregnant women groups. Nevertheless in the HIV-positive group sensitivity was very close to that reported by Testardini et al (2016) using an identical culture medium.

The staining parasitological method used here (quick Panoptic) is the technique with the highest frequencies of detection; however, their false-positive rates were high. That may, however, suggest past untreated infections that generates an adaptive response of *T. vaginalis* in the host. The association between wet mount and permanent staining methods can improve the sensitivity in the diagnosis of trichomoniasis (Menezes et al., 2016).

Immunodeficient women are at higher risk of developing precancerous than immunocompetent

women. The prevalence of precancerous cervical cancer lesions applied by visual inspection with acetic acid among HIV infected was found to be 22.1% (Gedefaw et al., 2013). A higher frequency of cytological abnormalities diagnosed with Papanicolaou's method was found in HIV-positive women compared with a control group (12.1% versus 5.4%) (Lemos et al., 2012).

Cytological abnormalities were strongly associated with both groups of pregnant and HIV-positive women ($OR=4,65$ and $OR=2,14$ respectively). Indeterminate lesions and precancerous lesions were found in the presence of *T. vaginalis* with a frequency of 4.2%. Adherence of parasite in the host cell was considered the principal inflammatory change indicative of cytopathogenic development (Lemos and Amaral, 2016).

A pathogenic microbiota may occur during pregnancy when physiological changes disrupt this balanced ecosystem (Redelinguys et al., 2015). Bacterial vaginosis is a microbiota consisting of cocci and short bacilli in a pattern referred as anaerobic. In this study, cocci and short bacilli did not predominate when *T. vaginalis* was present taking PCR gold-standard. However bacterial vaginosis has predominated in the parasite's presence taking only Pap smear diagnostic technique (Lemos and Amaral, 2016).

Commensal microbiota (lactobacilli) at the vaginal mucosa provides protection from parasitic protozoan infections (Bär et al., 2015). Increased vaginal discharge is typical of pregnancy when the higher estrogen levels stimulate the cervix to secrete more discharge predisposing pregnant women to bacterial vaginosis (Redelinguys et al., 2015). In the present study the parasite was substantially present together with lactobacilli in the microbiota of pregnant women (36.8%).

This study found the prevalence rate of 41% for the co-infection trichomoniasis-bacterial vaginosis in the HIV-positive group. Gatski et al. (2011) found the co-occurrence of HIV with bacterial vaginosis in 61% and 17.5% of prevalence between *T. vaginalis* co-infection with anaerobic bacteria.

CONCLUSION

The frequency of *T. vaginalis* in non-pregnant women was 18%, in pregnant women was 19% and in the HIV-positive group was 33%.

The physiological immunosuppression condition during pregnancy was not a risk factor for trichomoniasis while HIV-co-infection was.

A strong association was found between trichomoniasis and cytological abnormalities in both groups of pregnant and HIV-positive women ($OR=4,65$ and $OR=2,14$).

PCR was considered the gold standard for diagnosis of *T. vaginalis*.

The comparative study showed the frequency of *T. vaginalis* in three groups of women in Goiânia, Goiás, Brazil

REFERENCES

- Abdolali M, Zohreh KA, Shahintaj A, Parvin G, Jamshidi A (2016). Comparison of three methods of clinical diagnosis, microscopic and pcr techniques for detection of *Trichomoniasis* in women in the Yasuj city. *Sc. J. Clin. Med.* 5(1): 12-15.
- Bär AK, Phukan N, Pinheiro J, Simões-Barbosa A (2015). The interplay of host microbiota and parasitic protozoans at mucosal interfaces: implications for the outcomes of infections and diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(12): e0004176.
- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Maila N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic Exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(3): e1573.
- Crucitti T, Dyck EV, Teke A, Abdellati S, Vuyistekke B, Buve A, Laga M (2003). Comparison of Culture and different PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in self collected vaginal swab specimens. *Sex. Transm. Infect.* 79:393-398.
- Caw B, Edan EM, Jassim AN, Adhiad A (2014). Study of growth curve and morphological change for *Trichomonas vaginalis* parasite in the tow media. *Baghdad Sc. J.* 11(2): 761-767.
- Declaration of Helsinki (1964). 2008 Recommendations guiding medical doctors in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, 1964 and as revised by the 35th WMMA General Assembly, Venice, Italy.
- Frasson AP, De Carli GA, Bonan CD, Tasca T (2012). Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purin. Sign.* 8:1-9.
- Gatski M, Martin DH, Clark RA, Harville E., Schmidt, N., Kissinger, P., 2011. Co-Occurrence of *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis among HIV-positive women. *Sex. Transm. Dis.* 38(3): 163-166.
- Gedefaw A, Astatkie A, Tessema GA (2013). The Prevalence of precancerous cervical cancer lesion among HIV-Infected women in Southern Ethiopia: a cross-sectional study. *PLoS One*, 8(12): e84519.
- Hussein AH, Saleh MH, Nagaty IM, Ghieth KA, El-Azab NA (2015). Prevalence, clinical criteria and sociodemographic predictors of *Trichomonas vaginalis* infection in suspected egyptian women, using direct diagnostic techniques. *Iran. J. Paras.* 10(3):432-440.
- Karaman Ü, Karadağ N, Atambay M, Arserim Kaya NB, Daldal NÜ (2008). A Comparison of cytological and parasitological methods in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Türk. Paraz. Derg.* 32(4): 309-312.
- Khalaf AK, Kadhim KJ (2010). Use TVK 3/7gene as a target to detect *Trichomonas vaginalis* from urine of women in Southern Iraq. *Thi-Qar Med. J. (TQMJ)* 4(1): 36-46.
- Leli C, Castronari R, Levorato L, Luciano E, Pistoni E, Perito S, Bozza S, Mencacci A (2016). Molecular sensitivity threshold of wet mount and an immunochromatographic assay evaluated by quantitative real-time PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection in a low-risk population of childbearing women. *Infez. Med.* 24(2): 112-6.
- Lemos PAP, Amaral WN (2016). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in women with precancerous and indeterminate lesions at cytology. *World J. Res. Rev.* 2(3): 6-9.
- Lemos PAP, Garcia-Zapata MTA, Tavares SBN (2012). Cervical cytopathology in a population of HIV-positive and HIV-negative women. *J. Trop. Med.* pp.1-4.
- Menezes CB, Mello MS, Tasca T (2016). Comparison of permanent staining methods for the laboratory diagnosis of Trichomoniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 58: 5.

- Nakubulwa S, Kaye DK, Bwanga F, Mbona NT, Mirembe FM (2015). Genital infections and risk of premature rupture of membranes in Mulago Hospital, Uganda: a case control study. *BMC Res. Notes* 8:573.
- Nam YH, Min A, Kim SH, Lee YA, Kim KA, Song KJ, Shin MH (2012). Leukotriene B4 receptors BTL1 and BTL2 are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis* - derived secretory products. *Inflam. Res.* 61: 97-102.
- Patil MJ, Nagamoti JM, Metgud SC (2012). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from vaginal specimens by wet mount microscopy, in pouch TV culture system, and PCR. *J. G. Infect. Dis.* 4(1): 22 - 25.
- Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M (2003). Pseudocysts in *Trichomonas vaginalis* - New Insights. *Protist.* 154: 313-329.
- Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Kock MM (2015). Normal flora and bacterial vaginosis in pregnancy: an overview. *Crit. Rev. Microb.*, 1-12, Abril.
- Salawu OT, Esume CN (2016). Frequency of human immunodeficiency virus (HIV) in *Trichomonas vaginalis* infected women in Badagry, Lagos, Nigeria. *J. Rep. Infert.* 17(1):61-63.
- Serwin AB, Koper M (2013). Trichomoniasis - an important cofactor of human immunodeficiency virus infection. *Przegl. Epidemiol.* 67: 47 - 50.
- Silva Filho AM, Longato Filho AL (2000). "Colo uterino e vagina: processos inflamatórios - aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos". Rio de Janeiro, Revinter, chap. 7: 85-90.
- Testardini P, Vaulet MLG, Entrocassi AC, Menghi C, Eliseth MC, Gatta C, Losada M, Touzón MS, Corominas A, Vay C, Tatti S, Farniglietti A, Fermepin MR, Perazzi B (2016). Optimization of *Trichomonas vaginalis* diagnosis during pregnancy at a University Hospital, Argentina. *Kor. J. Paras.* 54(2): 191-195.
- Trintis J, Epie N, Boss R, Riedel S (2010). Neonatal *Trichomonas vaginalis* infection: a case report and review of literature. *Int. J. STD and AIDS* 21: 606-607.
- Ziaei Hezarjaribi H, Taghavi M, Fakhari M, Gholami S (2015). Direct diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection on archived pap smears using nested PCR. *Acta Cytol.* 59: 104-108.

4 CONCLUSÕES

- Existem dois tipos principais da espécie *T. vaginalis*: tipo 1 e tipo 2. As variações genéticas do parasito correspondem aos polimorfismos genéticos originados da cepa selvagem (tipo 1). A possível ativação de *T. vaginalis* durante o seu processo de redução do oxigênio pode ocorrer em condições de estresse oxidativo no ambiente vaginal.
- A frequência de *T. vaginalis* foi 18% em mulheres não grávidas, 19% em grávidas e 33% em portadoras do HIV;
- As condições de imunossupressão da gravidez não é fator de risco para a tricomoníase, mas a co-infecção por HIV o é;
- Existe uma forte associação entre tricomoníase e anormalidades citológicas em ambos os grupos de grávidas e HIV-positivas;
- A PCR é considerada padrão-ouro para o diagnóstico de *T. vaginalis*. Nos testes de acurácia destaca-se o índice maior de positividade no exame a fresco entre os grupos de grávidas e HIV-positivas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

SUGESTÕES

- A importância da infecção por *T. vaginalis* apresenta-se concomitante à idiosincrasia de cada paciente;
- Em condições de estresse profundo o diagnóstico laboratorial e o tratamento tornam-se indispensáveis tendo em vista que existe a possibilidade de ativação do parasito nestes casos.
- O exame citológico (COP) positivo para *T. vaginalis* deve ser observado considerando o tipo de microbiota tendo em vista que os lactobacilos podem diminuir a ação de patógenos no meio vaginal e que o parasito esteve bastante frequente na flora lactobacilar principalmente em grávidas.

RECOMENDAÇÕES

- Além do exame citológico (de Papanicolaou) recomenda-se o diagnóstico através de métodos parasitológicos que utilizam o auxílio das técnicas de coloração, por exemplo, Cultura corada pelo Panótico Rápido, pelo fato de apresentarem sensibilidades elevadas auxiliando no diagnóstico da infecção;
- O exame a fresco realizado pelo próprio clínico durante a consulta ginecológica seria de grande benefício para as pacientes, tendo em vista a alta especificidade desta técnica e a patogenicidade maior das cepas que se apresentam em movimento;
- A técnica da PCR, por ser bastante específica, deve ser requisitada uma vez que se encontre o laboratório habilitado para a sua execução.

6 REFERÊNCIAS

1. ADAMSKI, Alys; CLARK, Rebecca A; MENA, Leandro; HENDERSON, Harold; LEVISON, Judy; SCHMIDT, Norine; GEBREKRISTOS, Hirut T; MARTIN, David H; KISSINGER, Patricia. The Influence of ART on the treatment of *Trichomonas vaginalis* among HIV-Infected Women. **Clinical infectious diseases** 59(6):883–7, 2014.
2. AFZAN, M. Yusof; SURESH, Kumar. Phenotypic ‘variant’ forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from cervical neoplasia patients. **Exponential Parasitology** 131(2012):267-73, 2012.
3. ALAWADI, Dua’ Y; SAADEH, Haythem A; KAUR, Hargobinder; GOYAL, Kapil; SEHGAL, Rakesh; HADDA, Taibi Bem; ELSAWY, Naser A; MUBARAK, Mohammad S. Metronidazole derivatives as a new class of antiparasitic agents: synthesis, prediction of biological activity, and molecular properties. **Medicinal Chemistry Research** August, 2014.
4. AZARGOON, Azam; DARVISHZADEH, Shiva. Association of bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis*, and vaginal acidity with outcome of pregnancy. **Archive of Iranian Medicine** 9(3):213-7, Jul 2006.
5. BÄR, Ann-Katrein; PHUKAN, Niha; PINHEIRO, Jully, SIMÕES-BARBOSA, Augusto. The interplay of host microbiota and parasitic

protozoans at mucosal interfaces: implications for the outcomes of infections and diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 9(12): e0004176, 2015.

6. BROTMAN, Rebecca M; BRADFORD, L. Lattey; CONRAD, Melissa; GAJER Pawel; AULT Kevin; PERALTA Ligia; FORNEY, Larry J; CARLTON, Jane M; ABDO, Zaid; RAVEL, Jacques. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. **Sexually Transmitted Diseases** 39(10):807–812, 2012.
7. CARTER, J. Elliot; WHITHAUS, Kenneth C. Neonatal Respiratory Tract Involvement by *Trichomonas vaginalis*: A Case Report and Review of the Literature. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 78(1):17–19, 2008.
8. CHEON San-Hoon, KIM Seung Riong, SONG Hyum-Ouk, AHN Myoung-Hee, Hyu Jae-Sook. The dimension of *Trichomonas vaginalis* as measured by scanning electron microscopy. **Korean Journal of Parasitology** 51(2):243-6, 2013.
9. CONRAD, Melissa; ZUBACOVA, Zuzana; DUNN, Linda A; UPCROFT, Jacqui; SULLIVAN, Steven A; TACHEZY, Jan; CARLTON, Jane M. Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human

pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. **Molecular Biochemical Parasitology** 175(1):30-8, 2011.

10. DIAMANTIS, Aristidis; MAGIORKINIS, Emmanouil; ANDROUTSOS, George. Alfred François Donne´ (1801–78): a pioneer of microscopy, microbiology and haematology. **Journal of Medical Biography** 17:81–87, 2009.

11. FERNANDO, Sumadhya D; HERATH, Sathya; RODRIGO, Chaturaka; RAJAPAKSE, Lalani. Clinical features and sociodemographic factors affecting *Trichomonas vaginalis* infection in women attending a central sexually transmitted diseases clinic in Sri Lanka. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases** 33:25-31, 2012.

12. FIGUEROA-ÂNGULO, Elisa E; REDÓN-GNADARILLA, Francisco Javier; PUENTE-RIVERA, Jonathan; ARROYO, Rossana. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and Infection** 14:1411e1427, 2012.

13. FRASSON, Amanda Piccoli; DE CARLI, Geraldo Attilio; BONAN. Carla Denise; TASCA, Tiana. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. **Purinergic Signalling** 8:1–9, 2012.

14. GATSKI, Megan; MARTIN, David H; CLARK, Rebecca A; HARVILLE, Emily; SCHMIDT, Norine; KISSINGER, Patricia. Co-Occurrence of *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis among HIV-positive women. **Sexually Transmitted Diseases** 38(3):163–166, 2011.

15. GEDEFAW, Abel; ASTATKIE, Ayalew; TESSEMA, Gizachew A. The prevalence of precancerous cervical lesion among HIV-infected women in Southern Ethiopia: a cross-sectional study. **PLoS One**, 8(12):e84519, 2013.

16. GINOCCHIO, Christine C; CHAPIN, K; SMITH, J. S; ASLANZADEH, J; SNOOK, J; HILL, C. S; GAYDOS, C. A. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and coinfection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in the United States as determined by the Aptima *Trichomonas vaginalis* nucleic acid amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology** 50(8):2601-8, 2012.

17. GUENTHNER, Patricia C; SECOR, W. Evan; DEZZUTTI, Charlene S. *Trichomonas vaginalis*- induced epithelial monolayer disruption and Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. **Infectious Immunology** 73(7): 4155-60, 2005.

18. HAN, Ikhwan; PARK, S. J; AHN, M. H; RYU, J. S. Involvement of mast cells in inflammation induced by *Trichomonas vaginalis* via crosstalk with vaginal epithelial cells. **Parasite Immunology** 34: 8–14, 2012.
19. HARDY DIAGNOSTICS. Modified Diamond's médium. [Catálogo K02]. 2016; https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/ModDiamondsMed.htm
20. HUFFMAN, Ryan D; NAWROCKI, Lauren D; WILSON, Wayne A; BRITTINGHAM, Andrew. Digestion of glycogen by a glucosidase released by *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology** 159(2015): 151e159, 2015.
21. HUSSEIN, Atef Hussein; SALEH, Mohamed Hussein; NAGATY, Ibrahim Maged; GHIETH, Khaled A; EL-AZAB, Nagat Ahmed. Prevalence, clinical criteria and sociodemographic predictors of *Trichomonas vaginalis* infection in suspected egyptian women, using direct diagnostic techniques. **Iranian Journal Parasitology** 10(3):432-440, 2015.
22. IBAÑEZ-ESCRIBANO, Alexandra; NOGAL-DUIZ Juan José; ARÁRI Vicente J; ESCARIO, José Antonio, GOMÉZ-BARRIO, Alicia; ALDERETE, J F. Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in *Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among

- Trichomonas species. **Parasitology International** 63(2014): 427-431, 2014.
23. KHALAF, Amal Khdhayer; KADHIM, Khalid Jameel. Use TVK 3/7 gene as a target to detect *Trichomonas vaginalis* from urine of women in Southern Iraq. **Thi-Qar Medical Journal (TQMJ)** 4(1): 36-46, 2010.
24. KALANTARI, Narges; GHAFFARI, Salman; BAYANI, Masomeh. Trichomonas, Candida and Gardnerella in cervical smears of Iranian women for cancer screening. **North American Journal of Medical Sciences** 6(1):25-29, 2014.
25. KANDAMUTHAN, Subitha; THAMBI, Rheni; YESHODHARAN, Jyotsna. Trichomoniasis: Is it Always sexually transmitted? **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS** 35(2):166-7, 2014.
26. KARAMAN, Ülkü; KARADAĞ, Neşe; ATAMBAY, Metin; ARSERİM KAYA, Neval Berrin; DALDAL, Nilgün Ülfet. A Comparison of cytological and parasitological methods in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **Türkiye Parazitoloji Dergisi** 32(4): 309 -312, 2008.
27. KAY, Christopher; WOODWARD, Katharine D; LAWLER, Karen; SELF, Tim J; DYALL, SD; KERR, Ian D. The ATP-binding cassette proteins of

the deep-branching protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6(6): e1693, 2012.

28. KLEBANOFF, Mark A; CAREY, Christopher; HAUTH, John C; HILLIER, Sharon L; NUGENT, Robert P; THOM et al. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **The New England Journal of Medicine** 345(7), 487-93, 2001.

29. KUREWA, Nyaradzai E; MAPINGURE, Munyaradzi P; MUNJOMA Marshal W; CHIRENJE, Mike Z; RUSAKANIKO, Simbarashe; STRAY PEDERSEN, Babill. The burden and risk factors of sexually transmitted infections and reproductive tract infections among pregnant women in Zimbabwe. **BMC Infect Diseases** 10: 127, 2010.

30. LELI, Christian; CASTRONARI, Roberto; LEVORATO, Lucia; LUCIANO, Eugenio. PISTONI, Eleonora; PERITO, Stefano; BOZZA, Silvia; MENCACCI, Antonella. Molecular sensitivity threshold of wet mount and an immunochromatographic assay evaluated by quantitative real-time PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection in a low-risk population of childbearing women. **Infez Med** 24(2): 112-6, 2016.

31. LEMOS, Patricia A. Pinheiro; AMARAL, Waldemar Naves. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in women with precancerous and

indeterminate lesions at cytology. **World Journal of Research and Review (WJRR)** 2(3):06-09, 2016.

32. LEMOS, Patricia A. P.; GARCÍA-ZAPATA, Marco Tulio A. Aspects of *Trichomonas vaginalis*' infection and diagnostic methods. **Acta Portuguesa Obstétrica e Gynecológica** 8(2):152-162, 2014.

33. LEMOS, Patricia A. P.; GARCÍA-ZAPATA, Marco Tulio A.; TAVARES, Suelene B. N. Cervical cytopathology in a population of HIV-positive and HIV-negative women. **Journal of Tropical Medicine** 2012:1-4, 2012.

34. LOO, Steven K. F; TANG, William Y; LO, K K. Clinical significance of *Trichomonas vaginalis* detected in Papanicolaou smear: a survey in female social hygiene clinic. **Hong Kong Medical Journal** 15: 90-93, 2009.

35. LEON, Segundo R; KONDA, Kelika A; BERNSTEIN, Kyle T; PAJUELO, Jose B; ROSASCO, Ana M; CACERES, Carlos, F; COATES, Thomas J; KLAUSNER, Jeffrey D. *Trichomonas vaginalis* infection and associated risk factors in a socially-marginalized female population in coastal Peru. **Infection Diseases of Obstetric and Gynecology** 2009:1-6, 2009.

36. MANN, Joshua M; MC DERMOTT, Suzanne, GILL, Tarik. Sexually transmitted infection is associated with increased risk of preterm birth in South Carolina women insured by Medicaid. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine** 1-6, 2009.
37. MASESE, Linnet N; GRAHAM, Susan M; GITAU, Ruth; PESHU, Nobert; JAOKO, Walter; NDINYA-ACHOLA, Jeckoniah O; MANDALIYA, Kischorchandra; RICHARDSON, Barbra A; OVERBAUGH, Julie; MCCLELLAND, R. Scoot. A prospective study of vaginal trichomoniasis and HIV-1 shedding in women on antiretroviral therapy. **BMC Infectious Diseases** 11: 307, 2011.
38. MEITES, Elissa, GAYDOS, Charlotte A; HOBBS, Marcia A M; KISSINGER, Patricia; NYIRJESY, Paul; SCHWEBCK, Jane R; SECOR, Evan W; SOBEL, Jack D; WORKOWSK, Kimberly A. A review of evidence-based care of symptomatic trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical Infectious Disease** 61 (S8): S837-48, 2015.
39. MEITES, Elissa; LATA, Eloisa; BRAXTON, Jim; SCHWEBKE, Jane R; BERNSTEIN, Kyle T; PATHELA, Preeti; ASBEL, Lenore E; KERANI, Roxanne P; METTENBRINK, Christie J; WEINSTOCK, Hillard S. *Trichomonas vaginalis* in Selected US Sexually Transmitted Disease Clinics: Testing, Screening, and Prevalence. **Sexually Transmitted Diseases** 40(11): 865–869, 2013.

40. MENEZES, Camila Braz; MELLO, Mariana dos Santos; TASCA, Tiana. Comparison of permanent staining methods for the laboratory diagnosis of Trichomoniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** 58: 5, 2016.
41. MIRANDA, Angelica E; PINTO, Valdir M.; GAYDOS, Charlotte A. *Trichomonas vaginalis* infection among young pregnant women in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases** 37(4): 223-7, 2010.
42. MISRA, Jata S; SINGH, Uma. Results of long-term hospital based cytological screening in asymptomatic women. **Diagnostic Cytopathology** 34(3):184-7, 2006.
43. NAM, Young Hee; MIN, Arim; KIM, Seong Hoon; LEE Young Ah; KIM Kyeong Ah; SONG, Kyoung-Ju; SHIN, Myeong Heon. Leukotriene B4 receptors BTL1 and BTL2 are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis* – derived secretory products. **Inflammatory Research** 61: 97-102, 2012.
44. NEVES, David Pereira. Parasitologia Humana, 11^a ed. São Paulo, ed. Atheneu 2005, cap. 13, p,115-116.
45. PATIL, Madhumati J; NAGAMOTI, Jyoti M; METGUD, Sharada C. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from vaginal specimens by wet

- mount microscopy, in pouch TV culture system, and PCR. **Journal of Global Infectious Diseases** 4(1): 22 - 25, 2012.
46. PERAZZI, Beatriz E; MENGHI, C I; COPPOLILLO, E F; GATTA C, ELISETH, M C; TORRES, R A; VAY, C A; FAMIGLIETTI, A M. Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. **Korean Journal of Parasitology** 48:61-65, 2010.
47. PEREIRA-NEVES, Antonio; BENCHIMOL, Marlene. *Trichomonas vaginalis*: In vitro survival in swimming pool water samples. **Exponential Parasitology** 118(2008): 438–441, 2008.
48. PEREIRA-NEVES, Antonio; BENCHIMOL, Marlene. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, 99: 87–101, 2007.
49. PHUKAN, Niha; PARSAMAND, Tina, BROOKS, Anna E; Ngruyen, Tan NM, Simões-Barbosa, Augusto. The adherence of *Trichomonas vaginalis* to host ectocervical cells is influenced by lactobacilli. **Sexually Transmitted Infection** 207(12):1922-3, 2013.
50. POCH, W; SOBEL, Francesca; LEVIN, Daniel; LEVIN, Samuel; DAN, Michael. Modified Thioglycolate Medium: a simple and reliable means

for detection of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Clinical Microbiology** 2630–2631, 1996.

51. PÜTZ, Simone; GELIUS-DIETRICH, Gabriel; PIOTROWSKI, Markus; HENZE, Katrin. Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 142(2): 212-23, 2005.

52. QUEZA, Macario Ireneo P; RIVERA, Windell L. Diagnosis and molecular characterization of *Trichomonas vaginalis* in sex workers in the Philippines. **Pathogens and Global Health** 107(3):136-140, 2013.

53. RABIEE, S; BAZMANI, A; MATINI, Mohammad; FALLAH, M. Comparison of Resistant and Susceptible Strains of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole Using PCR Method. **Iranian Journal of Parasitology** 7(3):24-30, 2012.

54. RENDÓN-MALDONADO, José; ESPINOSA-CANTELLANO, Martha; SOLER, Carmem; TORRES, José V; MARTÍNEZ-PALOMO, Adolfo. *Trichomonas vaginalis*: In vitro attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 50(1): 53-48, 1998.

55. SALAWU, Oyetunde Timothy; ESUME, Chelsea Ndidi. Frequency of human immunodeficiency virus (HIV) in *Trichomonas vaginalis* infected women in Badagry, Lagos, Nigeria. **Journal of Reproduction and Infertility** 17(1):61-63, 2016.
56. SAYED EL-AHL, Saedia A; EL-WAKIL, Hala S; KAMEL, Nawa M; MAHMOUD, Manal S. E. A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology** 32(1):167-78, 2002.
57. SEO, Jun-Hyeok; YANG, Hye-Won; JOO, so-young; SONG, Su-Min; LEE, Yu-Ran; RYU, Jae-Sook; YOO, Eun Sang; LEE, Won Kee; KONG, Hyun-Hee; LEE, sang-eun; LEE, Won-Já; GOO, Youn-Kyoung; CHUNG, Dong-II; HONG, Yeonchul. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* by PCR in Men Attending a Primary Care Urology Clinic in South Korea. **Korean Journal of Parasitology** 52(5): 551-555, 2014.
58. SERWIN, Agnieszka Beata; KOPER, Marta. Trichomoniasis – na important cofactor of human immunodeficiency virus infection. **Przegląd Epidemiologiczny** 67: 47-50, 2013.
59. SIVARANJINI, R; JAISANKAR, J; THAPPA, Devinder Mohan; KUMARI, Rashmi; CHANDRASEKHAR, Laxmisha; MALATHI, M. PARIJA, Subhash Chandra; HABEEBULLAH, Syed. Trichomoniasis:

How do we diagnose in a resource poor setting? **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases** 34(1): 25-31, 2013.

60. SPEAR, Gregory T; FRENCH, Audrey L; GILBERT, Douglas; ZARIFFARD, M. Reza; MIRMONSEF, Paria; SULLIVAN, Thomas H; SPEAR, William W; LANDAY, Alan; MICCI, Sandra; LEE, Byung-Hoo; HAMAKER, Bruce R. Human alpha amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. **The Journal of Infectious Diseases** 210:1019e1028, 2014.

61. STONER, Kevin Andrew; RABE, Lorna K; MEYN, Leslie A; HILIER, Sharon L. Survival of *Trichomonas vaginalis* in wet preparation and on wet mount. **Sexually Transmitted Infection** 89(6): 485-8, 2013.

62. SUTTON, Madeline; STERNBERG, Maya; KOUMANS, Emilia H; MCQUILLAN, Geraldine; BERMAN, Stuart; MARKOWITZ, Lauri. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the united states, 2001–2004. **Clinical Infectious Diseases** 45:1319–26, 2007.

63. TESTARDINI, Pamela; VAULET, Maria Lucia Gallo; ENTROCASSI, Andrea Carolina; MENGHI, Claudia; ELISETH, Martha Cora; GATTA, Claudia; LOSADA, Mirta; TOUZÓN, Maria Sol; COROMINAS, Ana; VAY, Carlos; TATTI, Silvio; FAMIGLIETTI, Angela; FERMEPIN,

Marcelo Rodriguez; PERAZZI, Beatriz. Optimization of *Trichomonas vaginalis* diagnosis during pregnancy at a University Hospital, Argentina. **Korean Journal of Parasitology** 54(2): 191-5, 2016.

64. THORBURN, A. Lennox. Alfred Francois Donne, 1801-1878, discoverer of *Trichomonas vaginalis* and of leukaemia. **The British Journal of Venereal Diseases** 50: 377, 1974.

65. TON NU, Phuong Anh; NGUYEN, Vu Quoc Huy; CAO, Ngoc Thanh; DESSI, Daniele; RAPPELLI, Paola; FIORI, Pier Luigi. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and asymptomatic women in Central Vietnam. **The Journal of Infection in Developing Countries** 9(6):655-660, 2015.

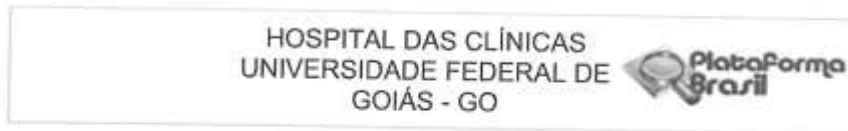
66. TOROK, Michelle R; MILLER, William C; HOBBS, Miller Marcia M; MACDONALD, Pia D. M; LEONE, Peter A; SCHWEBKE, Jane R; SEÑA, Arlene C. The association between *Trichomonas vaginalis* infection and level of vaginal lactobacilli, in nonpregnant women. **The Journal of Infectious Diseases** 196:1102–7, 2007.

67. VIEIRA, Patrícia de Brum; GIORDANI Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José; TASCA; Tiana. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology Research** 114:1249–1261, 2015.

68. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections 2008. Estimativa publicada em 2012. Disponível em: <file:///C:/Users/Pat/Downloads/OMS%20ESTIMATIVAS%202008.pdf>
69. ZIAEI HEZARJARIBI, Hajar; TAGHAVI, Mahbobeh; FAKHAR, Mahdi; GHOLAMI, Shirzad. Direct diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection on archived pap smears using nested PCR. **Acta Cytologica** 59: 104-108, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética da Instituição Proponente



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e em mulheres com câncer do colo do útero em Goiânia, Goiás, Brasil.

Pesquisador: Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 27977914.8.0000.5078

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Goiás - UFG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 646.510

Data da Relatoria: 15/05/2014

Apresentação do Projeto:

Em razão do seu recurso ser considerado NÃO APROVADO por este Comitê de Ética em Pesquisa, a pesquisadora responsável usou do seu direito contemplado na Resolução 466/12 e está submetendo novo recurso solicitando uma nova apreciação do seu projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Neste recurso a pesquisadora submete para análise seus argumentos e esclarecimentos com relação a cada pendência citada no Parecer Consubstanciado n.628683.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória deste recurso foram devidamente anexados e estão de acordo com as recomendações da resolução 466/12.

Recomendações:

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.805-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cepculg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 646.510

atualizado, na sua totalidade em linguagem clara e objetiva e de fácil entendimento. Apresenta-se também de forma pessoal à candidata.

6) No PROJETO: A pesquisadora refere que As gestantes não terão coleta triplíce devido aos riscos de abortamento que esta pode causar. No entanto, Como será a identificação da participante quanto a gravidez e o tempo de gestação; E ainda, FALTA CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO NO PROJETO e os RISCOS E BENEFÍCIOS. CONSTA ORÇAMENTO ATÍPICO: Material de consumo: Será utilizada a infraestrutura física já implantada e implementada do: Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular/ICB II - Rede do Sistema Único de Saúde SUS;

Considerações do relator: A pesquisadora informa que o orçamento financeiro constante na página 20 do projeto de pesquisa atual consta o detalhamento e todo o material de consumo, consta também dos recursos, das fontes e da destinação nas páginas 20 e 21, estando portanto de acordo com a norma operacional CNS 001/2013 citada pelo relator. A forma e valor da remuneração do pesquisador será a bolsa da CAPES no valor mensal de R\$ 2.200,00 conforme vai descrito na página 21 do projeto atualizado que segue anexado.

Diante do que me foi apresentado e considerando que a pesquisadora responsável atendeu satisfatoriamente às pendências citadas no Parecer Consubstanciado n.628683 entendemos que o presente recurso deve ser aprovado. Desta forma o estudo acima citado pode ser realizado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do recurso interposto e do projeto de pesquisa supracitado.

Após início, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, via Plataforma Brasil, relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações. O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufg@yahoo.com.br

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética da Instituição Co-participante



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e em mulheres com câncer do colo uterino atendidas em hospitais de referência de Goiânia

Pesquisador: Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49215915.5.3002.0034

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.536.489

Apresentação do Projeto:

Pesquisar a presença de *T. vaginalis* em mulheres HIV – positivas e em mulheres com câncer cervical é importante porque a presença deste parasito é quase sempre acompanhada de grande número de leucócitos, o que pode facilitar a entrada de HIV, uma vez que este vírus apresenta tropismo por estas células do sistema imune. Também porque a erosão causada por *T. vaginalis* ao epitélio vaginal, além de ser demonstrada clinicamente através da visualização de pontos hemorrágicos no colo uterino, pode ser demonstrada no esfregaço cérvico - vaginal da citologia oncoparasitária onde é notada uma maior descamação das células do epitélio e até certa inversão do mesmo, e, ao provocar importantes alterações inflamatórias nestas células, *T. vaginalis* talvez, possa levar à anormalidades ou à lesões pré cancerígenas.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

Correlacionar a presença da infecção por *T. vaginalis* em mulheres HIV- positivas e em mulheres com câncer do colo do útero atendidas no Hospital de Doenças Tropicais, no Hospital Araújo Jorge, no Hospital das Clínicas, na Maternidade Dona Iris, no Hospital São Francisco de Assis e na Clínica Fértil, em Goiânia.

Específico:

Endereço: Av. Contorno 3556
Bairro: Jardim Bela Vista **CEP:** 74.853-120
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3201-3621 **Fax:** (62)3201-3620 **E-mail:** cep.hdt@lsgsaude.org



Continuação do Parecer: 1.536.489

- Comparar quatro técnicas de diagnóstico: Exame Direto, Citologia Oncoparasitária, Cultura e PCR.
- Comparar a prevalência de *T. vaginalis* em quatro grupos de mulheres: HIV positivas, portadoras de neoplasias uterinas, gestantes e não gestantes.
- Analisar e apontar as principais alterações celulares no exame citológico de Papanicolaou nas mulheres *T. vaginalis* positivas.
- Analisar os efeitos da adesão de *T. vaginalis* à célula humana em cultura de células cancerígenas utilizando técnicas citoquímicas apropriadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As pacientes serão submetidas ao exame ginecológico comum, e além desse, não sofrerão nenhum outro desconforto.

As gestantes não terão coleta tripla devido aos riscos de abortamento que esta pode causar.

Os benefícios diretos à paciente, na execução deste protocolo de estudo são: auxílio ao estabelecimento do diagnóstico *T. vaginalis*, o que facilitará as medidas terapêuticas a serem tomadas pela equipe de saúde. Benefícios indiretos incluem a detecção da infecção por *T. vaginalis* e a padronização de uma técnica a ser utilizada rotineiramente no estabelecimento de tratamentos de futuros casos de pacientes atendidos no ambulatório das instituições de pesquisas destinadas para essa pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de Relevância, porém a forma de abordagem continua, no nosso ponto de vista sendo inadequada, uma vez que a paciente será abordada durante a consulta pelo profissional médico. Considerando que a relação médico/paciente deve ser de confiança e confidencialidade a paciente pode ficar constrangida em recusar a participação na pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos Ok

Recomendações:

Sugerimos que a forma de abordagem seja através de cartaz na sala de espera da instituição marcando o local para que a participante da pesquisa seja atendida pela pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequar a forma de abordagem conforme recomendação do CEP/HDT. Enviar relatórios parcial e final da pesquisa através da Plataforma Brasil. Enviar uma cópia da pesquisa finalizada para

Endereço: Av. Contorno 3556
Bairro: Jardim Bela Vista **CEP:** 74.853-120
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3201-3621 **Fax:** (62)3201-3620 **E-mail:** cep.hdt@lsgsaude.org

Continuação do Parecer: 1.536.489.

compor o acervo da biblioteca do HDT.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_649405_E1.pdf	06/03/2016 19:08:24		Aceito
Outros	Documento_Avulso_referente_aas_pendencias_CEP_HDT.pdf	04/01/2016 14:57:15	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Psicologia.pdf	04/01/2016 14:50:12	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Dra_Rosane.pdf	04/01/2016 14:49:21	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PESQUISA_Trichomonas_Patricia_2015.pdf	04/01/2016 14:48:34	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.pdf	04/01/2016 14:45:48	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	ATENDIMENTO_HDT.pdf	18/08/2015 12:52:37	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_autorizacao_ALPHA.pdf	18/08/2015 12:26:16	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Autorizacao_ST_Helena.pdf	18/08/2015 12:25:40	Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PESQUISA_Trichomonas_-_Patricia_2015.pdf	16/08/2015 10:09:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.pdf	16/08/2015 09:24:32		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao DMTSP_HC_UFG.pdf	16/08/2015 08:47:14		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao Ambulatorio HDT.pdf	16/08/2015 08:46:49		Aceito

Endereço: Av. Contorno 3556
 Bairro: Jardim Bela Vista CEP: 74.853-120
 UF: GO Município: GOIÂNIA
 Telefone: (62)3201-3621 Fax: (62)3201-3620 E-mail: cep.hdt@igs.saude.org

Continuação do Parecer: 1.536.489

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao SAME_HDT.pdf	16/08/2015 08:46:26		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carimbo IEP_HAJ_ACCG.pdf	07/08/2015 08:40:21		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Esclarecimento da Pesquisadora ao CEP.pdf	06/08/2015 14:16:31		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta de Encaminhamento ao CEP_ACCG.pdf	06/08/2015 13:55:48		Aceito
Declaração do Patrocinador	Doc com Endereco_Tel_Mails de todos os Pesquisadores envolvidos.pdf	06/08/2015 13:55:02		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta Garantia Beneficios Projeto.pdf	06/08/2015 13:50:55		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta de Encaminhamento ao SGO do HAJ aa Dra Rossana Catao.pdf	06/08/2015 13:50:24		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta de Encaminhamento ao SAMIS_HC.pdf	06/08/2015 13:49:25		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta de Encaminhamento ao SAMIS_HAJ.pdf	06/08/2015 13:48:04		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Nucleo deEnsinoePesquisa_HC_UFG.pdf	06/08/2015 13:47:07		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Folha de Rosto_Diretor do HC_UFG.pdf	06/08/2015 13:46:06		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta de Encaminhamento ao NEP_HC_UFG.pdf	06/08/2015 13:44:53		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Patricia Abreu Pinheiro de Lemos).pdf	05/08/2015 12:46:03		Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	05/08/2015 08:53:21	Patricia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Link Orientador Prof Dr Waldemar .pdf	03/08/2015 23:14:52		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Informe Funcao Especifica na Pesquisa_Pesquisadora.pdf	03/08/2015 23:11:47		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao Clinica Fertile.pdf	03/08/2015 23:10:17		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao Pesquisadora.pdf	03/08/2015 16:09:11		Aceito

Endereço: Av. Contorno 3556

Bairro: Jardim Bela Vista

CEP: 74.853-120

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3201-3621

Fax: (62)3201-3620

E-mail: cep.hdt@isgsaude.org

Continuação do Parecer: 1.536.489

Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO ORIENTADOR.pdf	03/08/2015 16:08:52		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_HAJ_Servico de Ginecologia e Mama_ACCG.pdf	03/08/2015 16:06:06		Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	11/01/2015 13:14:13	Patricia Abreu Pinheiro de Lemos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao SAMIS Araujo Jorge.pdf	10/01/2015 14:09:04		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao SAMIS HC.jpg	10/01/2015 14:08:43		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao Hospital Sao Francisco de Assis.pdf	10/01/2015 14:07:53		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao HDT.pdf	10/01/2015 14:06:39		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorização do chefe do departamento de ginecologia da FM_HC.jpg	10/01/2015 14:06:20		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao Maternidade Dona Iris.pdf	10/01/2015 14:04:43		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Folha de Rosto 1_Instituicao Proponente.jpg	10/01/2015 14:03:27		Aceito
Brochura Pesquisa	Ficha de Investigação.docx	10/01/2015 14:00:31		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto 1_Instituicao Proponente.jpg	10/01/2015 13:58:53		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 09 de Maio de 2016

Assinado por:
Vilma Aparecida da Silva
 (Coordenador)

Endereço: Av. Contorno 3556	CEP: 74.853-120
Bairro: Jardim Bela Vista	
UF: GO	Município: GOIANIA
Telefone: (62)3201-3621	Fax: (62)3201-3620
E-mail: cep.hdt@isgsaude.org	

Página 05 de 05

Anexo 3 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação será o diagnóstico laboratorial de um protozoário causador de infecção sexualmente transmitida, denominado *Trichomonas vaginalis*. O presente termo segue em acordo com as normas da Resolução 466/2012.

Após ler com atenção este documento, ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias, e também será assinado por mim, pesquisadora, em todas as folhas, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável, nesse caso, sou eu. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, eu, Patrícia no telefone 98067263, o Prof. orientador Dr. Waldemar Naves do Amaral (99712943) e a médica Dra. Rosane Silva Carneiro de Araújo (84060707). Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269-8338 e 3269-8426 ou no endereço: 1ª Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Doenças Tropicais no telefone: 32013621.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

- **Título:** Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e em mulheres com câncer do colo uterino atendidas em hospitais de referência de Goiânia.
- Eu, como pesquisadora que irá aplicar o termo de consentimento sou graduada em biomedicina (PUC/GO), com especialização em citologia clínica (FF/UFG), mestrado em medicina tropical – área parasitologia e cursando doutorado em Ciências da Saúde (FM/UFG).
- **Objetivos da pesquisa:** O objetivo fundamental deste estudo é correlacionar a frequência de *T. vaginalis* em quatro grupos de mulheres: HIV positivas, com câncer do colo uterino, mulheres gestantes e não gestantes atendidas no Hospital de Doenças Tropicais, no Hospital Araújo Jorge, na Maternidade Dona Íris em Goiânia, no Hospital das Clínicas da UFG, no Hospital São Francisco de Assis e na Clínica Fértil, em Goiânia.
- **Detalhamento dos procedimentos:** A população estudada será de mulheres acima de 18 anos, sexualmente ativas e submetidas à consulta ginecológica nos ambulatórios de cada hospital. Você, como paciente, está sendo abordada por mim, pesquisadora da pesquisa, na sala de espera, onde será convidada para responder a ficha de investigação.

Seu médico(a) ginecologista fará a coleta das amostras vaginais durante o seu exame clínico de rotina, normalmente como as outras vezes anteriores, localizando o colo uterino pela introdução do espéculeo descartável na vagina, utilizando um cotonete estéril que será embebido em solução salina e outro que ficará dentro do meio de cultura. Com a espátula de madeira e a escovinha serão feitos os esfregaços em duas lâminas de vidro para o exame de prevenção. É esse material que utilizaremos em nossa pesquisa.

• **Forma de acompanhamento:** Haverá um grupo controle de mulheres não portadoras do HIV e que não apresentam câncer do colo uterino (mulheres gestantes e não gestantes). Esse grupo será avaliado na Maternidade Dona Íris, no Hospital das Clínicas, no Hospital São Francisco de Assis e na Clínica Fértil.

- Você será abordada por mim, pesquisadora do projeto, durante a consulta médica

¹**Título**

Visto do pesquisador

Visto do participante **da Pesquisa:** Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e em mulheres com câncer do colo uterino em Goiânia.

sofrer o desconforto pela presença da pesquisadora na hora da coleta, porém esse desconforto será amenizado através do esclarecimento a respeito da pesquisa. Se for gestante não terá coleta tríplice devido aos riscos de abortamento que esta pode causar. Caso você aceite participar desta pesquisa, você será beneficiada com os resultados da pesquisa de *T. vaginalis* pelos métodos da cultura e da PCR que são de alto padrão e não realizados em laboratórios clínicos comuns. Esses resultados poderão ser entregues a você no próprio local da sua consulta, o que facilitará as medidas terapêuticas a serem tomadas pela equipe de saúde. A Citologia Oncótica (exame mais comum) será entregue sem atrasos e possibilitará a você marcar o retorno para no máximo uma semana após a consulta. Além disso, você estará contribuindo para uma importante pesquisa de doutorado que irá gerar uma técnica mais aprimorada para o diagnóstico de *T. vaginalis*.

- No caso de ocorrer algum dano em decorrência da sua participação nesta pesquisa você ficará em pleno direito de solicitar a sua interrupção tendo de volta o seu material biológico e terá ainda o direito de pedir indenização, ou seja uma quantia em dinheiro como forma de reparar a você o dano que porventura ocorrer.
- Gostaria de esclarecer também que você não receberá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira por esta participação. Apenas os benefícios acima citados.
- Pesquisar a presença de *T. vaginalis* na secreção vaginal é importante porque este parasito pode facilitar a entrada do vírus HIV no organismo humano, no momento da relação sexual. Além disso ele pode contribuir para o aumento da carga viral. A presença de *T. vaginalis* também pode contribuir para o aparecimento do câncer cervical porque ele provoca importantes alterações nas células do epitélio vaginal. Sendo assim, o diagnóstico e tratamento de *T. vaginalis* é de fundamental importância nesses dois grupos de mulheres.
- A sua participação nesta pesquisa será de apenas um dia, terá início na sala de espera do ambulatório, no momento em que eu a abordar e terminará no consultório médico, após o exame clínico-ginecológico.
- Os resultados desta pesquisa permanecerão resguardados, não sendo divulgados publicamente em hipótese alguma. Os dados coletados serão armazenados apenas ao longo da execução do projeto sob a guarda, responsabilidade e gerenciamento da pesquisadora.
- Você receberá informação básica sobre o projeto em menção e os procedimentos a serem empregados fica em pleno direito de dar o seu consentimento ou não sem penalidades ou perda de benefícios aos quais teria direito.

2

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, RG/ CPF/ n° de prontuário/ n° de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV.

³**Título da Pesquisa:** Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e em mulheres com câncer do colo uterino em Goiânia.

Visto do pesquisador

Visto do participante

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Assinatura Dactiloscópica:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Anexo 4 – Outras publicações realizadas durante o doutorado:

- **Artigo 1** – *Trichomonas vaginalis* e sua associação com o câncer cervical: uma revisão sistemática. **Femina** 43(5): 209-214, 2015.
- **Artigo 2** – Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in women with precancerous and indeterminate lesions at cytology. **World Journal of Research and Review** 2(3): 06-09, 2016.
- **Artigo 3** – Laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in pregnant and non-pregnant women. **Indian Journal of Research** 5(12): 79-96, 2016.

Artigo 1

Trichomonas vaginalis e sua associação com o câncer cervical: uma revisão sistemática

Trichomonas vaginalis associated with cervical cancer: a systematic review

Patricia Abreu Pinheiro de Lemos¹
Waldemar Naves do Amaral²

Palavras-chave

Trichomonas vaginalis
Neoplasias uterinas
Transdução de sinal

Keywords

Trichomonas vaginalis
Uterine cervical neoplasms
Signal transduction

Resumo

A correlação entre *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) e o desenvolvimento do câncer cervical foi estabelecida. Uma revisão sistemática baseada em artigos originais (padrão ouro) foi conduzida a partir de duas importantes bases eletrônicas: PubMed e MEDLINE. A partir das bases de dados *Medical Subject Headings* (MeSH) e *Descritores em Ciências da Saúde* (DeCS) os seguintes termos "*T. vaginalis* & *uterine cervical neoplasms*" e "*T. vaginalis* & *signal transduction*" foram buscados. Critérios de inclusão e exclusão foram estabelecidos considerando as características específicas de cada artigo visando garantir a qualidade dos artigos selecionados (testes de relevância 1 e 2). Com relação aos efeitos patogênicos de *T. vaginalis*, o teste de relevância 1 selecionou 13 artigos de ambas as bases, PubMed e MEDLINE, enquanto o teste de relevância 2 finalizou com 8 artigos. Os estudos selecionados demonstraram correlação entre *T. vaginalis* e neoplasia cervical, apontando os efeitos citopatogênicos do parasito e enfatizando a importância das vias de sinalização, tais como as proteínas mitógenoativadas (MAPK).

Abstract

A correlation between *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) and the development of cervical cancer was investigated. A systematic review based on original articles (the gold standard) was conducted by performing a search of two major electronic databases, PubMed and MEDLINE. The search was performed by using the exploded MeSH and DeCS terms "*T. vaginalis* & *uterine cervical neoplasms*" and "*T. vaginalis* & *signal transduction*". Inclusion and exclusion criteria were assessed using specific characteristics to determine whether the quality of each article was high enough to warrant selection (the first and second tests of relevance). With reference to the cytopathogenic effects of *T. vaginalis*, the first test of relevance selected 13 articles from both databases, PubMed and MEDLINE, whereas the second test of relevance selected 8 articles. The studies selected showed a correlation between *T. vaginalis* and cervical neoplasia, demonstrating the cytopathogenic effects of the parasite and highlighting the importance of cell signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.

¹Biomédica pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO); Especialista em Citologia Clínica pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO), Brasil.

²Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFG, Diretor Acadêmico do Hospital e Maternidade Dona Iris do Fundo Municipal de Saúde – Goiânia (GO), Brasil.

Endereço para correspondência: Patricia Abreu Pinheiro de Lemos – Rua S-4, 125, apto. 1201 – setor Bela Vista – CEP: 74823-450 – Goiânia (GO), Brasil – E-mail: patricia.ap@hotmail.com

Conflito de interesses: não há.

Introdução

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*), um protozoário que infecta a vagina, atinge cerca de 170 milhões de mulheres no mundo, sendo a tricomoníase considerada a infecção sexualmente transmitida não viral mais frequente no sexo feminino¹ (B). Considerado um comensal até 1950, o seu efeito patogênico começou a ser esclarecido a partir dessa década. Além da transmissão sexual, *T. vaginalis* pode estar presente em objetos úmidos tais como vasos sanitários e artigos de toalete² (A).

A infecção por *T. vaginalis* quase sempre propicia intensas alterações inflamatórias em esfregaços de Papanicolaou, e processos neoplásicos podem ser sugeridos^{3,4} (A). O risco estimado de câncer do colo uterino no Brasil está em torno de 17 casos por 100.000 habitantes. Na Região Centro-Oeste, a estimativa é de 28 mulheres a cada 100.000 habitantes, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres. A quantidade de 8.253 anatomopatológicos anormais foi notificada no Brasil no período de 2006 a 2008⁵ (A).

A forma trofozoítica de *T. vaginalis* pode ser observada em exame direto (solução fisiológica), em meios de cultura e/ou esfregaços de Papanicolaou. Seus tamanhos variam de 7 a 11 µm de comprimento, com axóstilo medindo de 1 a 5 µm e flagelos de 7 a 13 µm. Em esfregaços corados por derivados de Romanowsky (Giemsa, Panótico Rápido) o parasito aparece em formato de pera exibindo um visível núcleo alongado, os quatro flagelos aparecem, entretanto nem sempre conservados. O axóstilo (citoesqueleto), que atravessa o corpo do parasito, não aparece em preparações coradas, mas pode ser visualizado por microscopia de transmissão eletrônica (MTE)^{6,7} (A).

A propriedade de se aderir às células epiteliais é característica de *T. vaginalis*, que, ao entrar em contato com a célula humana, passa à forma ameboide ou pseudocística (demonstrada por MTE), em que os flagelos são adentrados ao corpo do parasito, forma considerada essencial para a iniciação e manutenção da infecção na mucosa cérvico-vaginal⁸⁻¹¹ (A). A adesão de *T. vaginalis* à célula epitelial vaginal (VEC) propicia a troca de sinais químicos, que é iniciada a partir de receptores específicos da célula humana obtendo reconhecimento dos domínios contidos na membrana citoplasmática do parasito¹²⁻¹⁴ (A). O objetivo do presente trabalho foi conduzir uma revisão sistemática para identificar as principais vias de sinalização envolvidas na interação *T. vaginalis* e célula do hospedeiro, com o propósito de estabelecer uma correlação entre esse parasito e o câncer cervical.

Metodologia

Uma revisão sistemática da literatura (RSL) foi conduzida em acordo com as especificações do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis* (PRISMA)¹⁵ (A). Artigos científicos advindos de bases de dados indexadas foram incluídos com o propósito de responder ao seguinte questionamento: "Qual é a principal via de sinalização entre *T. vaginalis* e a célula humana tendo em vista o efeito de citopatogenicidade?".

As bases de dados foram definidas mediante a busca eletrônica e os artigos foram selecionados. Todos os estudos incluídos na seleção foram publicados entre 1980 e 2014. Devido ao escasso número de publicações encontradas no período de 10 anos, o presente estudo optou por começar sua busca e análise a partir de 1980.

As palavras-chave foram pesquisadas nas bases de dados *Medical Subject Headings* (MeSH), PubMed, e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), Biblioteca Virtual de Saúde (BVS). Os termos cruzados foram: "*Trichomonas vaginalis* & uterine cervical neoplasms" e "*Trichomonas vaginalis* & signal transduction".

Os artigos identificados foram incluídos nesta revisão apenas quando os critérios de inclusão e exclusão adotados demonstraram relevância quanto ao objetivo deste estudo (Tabela 1). O teste 1 incluiu os melhores artigos encontrados com o primeiro intercruzamento em que a presença do parasito foi correlacionada com as neoplasias cervicais. O teste 2 envolveu os artigos selecionados usando o segundo par de palavras-chave (Tabela 1).

Resultados

Ao todo, 171 artigos foram selecionados, 50 com MeSH e 121 com DeCS (Tabela 2).

Tabela 1 - Formulário de aplicação dos testes de relevância

Formulário de aplicação do teste 1	Yes	No
Critérios de inclusão:		
1. A infecção por <i>T. vaginalis</i> é relacionada ao câncer do colo uterino?		
Critérios de exclusão:		
1. Não obedece critérios de inclusão		
2. É editorial, carta ou revisão?		
Motivo da exclusão:		
Formulário de aplicação do teste 2		
Critérios de inclusão:		
1. Os resultados indicam efeito citopatogênico e/ou alguma via de sinalização entre <i>T. vaginalis</i> e a célula do hospedeiro?		
Critérios de exclusão:		
1. Não obedece critérios de inclusão		
2. Os dados são insuficientes para análise?		
Motivo da exclusão:		

Dos artigos encontrados a partir das palavras-chave inter cruzadas do primeiro descritor (MeSH) "*Trichomonas vaginalis & uterine cervical neoplasms*", 35 foram selecionados para a análise, sendo que deles 13 foram incluídos e 22, excluídos. Dos 22 excluídos, 5 eram artigos de revisão, 3 eram relacionados a outros aspectos e 14 eram de data anterior a 1980.

As mesmas palavras-chave encontradas no segundo descritor (DeCS) "*Trichomonas vaginalis & uterine cervical neoplasms*" revelaram 99 artigos no teste de relevância 1 (Figura 1), entretanto apenas 13 foram incluídos (Tabela 3), enquanto 86 foram excluídos. Dos artigos excluídos, 53 eram correlacionados a outros fatores, enquanto 3 consistiram artigos de revisão, 5 estiveram em duplicata e 25 eram anteriores a 1980.

O teste de relevância 2 (Figura 2) foi aplicado para avaliar o segundo par de palavras-chave inter cruzadas "*Trichomonas vaginalis & signal transduction*" no primeiro descritor MeSH (PubMed). O teste

Tabela 2 - Estudos selecionados de acordo com as bases de dados

Bases de dados	Data	Hora	Total
MeSH	30/10/2014	8h00	35
	30/10/2014	9h30	15
DeCS	30/10/2014	15h00	99
	30/10/2014	16h30	22
Total			171

MeSH: Medical Subject Headings; DeCS: Descritores em Ciências da Saúde.

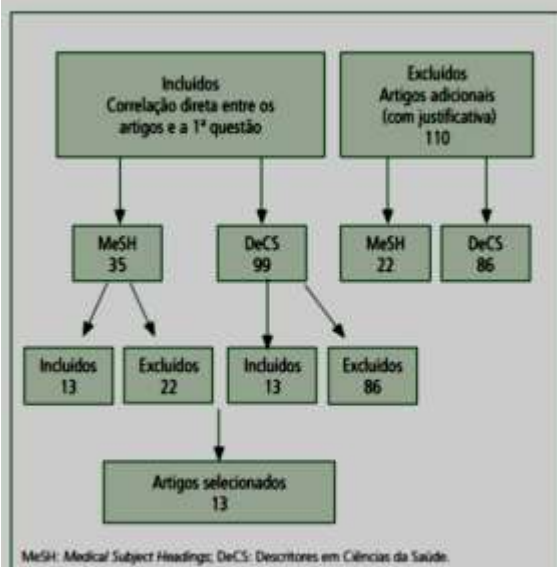


Figura 1 - Fluxograma do estudo: teste de relevância 1

Tabela 3 - Estudo qualitativo dos artigos incluídos nas bases Medical Subject Headings e Descritores em Ciências da Saúde – unitermos: "*Trichomonas vaginalis & uterine cervical neoplasms*"

Autores	País de publicação/ano/lingua	Métodos de diagnóstico	Journal	Fator de Impacto
Yap et al. ¹	Estados Unidos/1995/inglês	Western blot	Genitourin Med	1.14
Yusofe Kumar ⁸	Reino Unido/2012/inglês	Cultura, citoquímica, MTE	Parasit Res	2.32
AlfzaneSuresh ¹¹	Alemanha/2012/inglês	Cultura, citoquímica, epifluorescência	Exp Parasitol	2.03
Lazenby et al. ⁶	Estados Unidos/2014/inglês	NAATS	Clin Therap	2.62
Kharsany et al. ²¹	Reino Unido/1993/inglês	Colposcopia, Papanicolaou	Genitourin Med	1.14
Roeters et al. ²²	Estados Unidos/2006/inglês	Papanicolaou	Diagn Cytopathol	1.52
Misrae Singh ²³	Estados Unidos/2006/inglês	Papanicolaou	Diagn Cytopathol	1.52
Simões-Barbosa et al. ²⁴	Brasil/2002/inglês	Papanicolaou, biópsia	Braz J Infect Dis	1.18
Sayed el-Ahl et al. ²⁵	Egito/2002/inglês	Western blot, immunoblot	Egypt Soc of Paras	0.20
Viki et al. ²⁶	Suécia/2000/inglês	Papanicolaou, biópsia	Acta Oncol	3.71
Zhang et al. ²⁷	Estados Unidos/1995/inglês	Papanicolaou biópsia	Ann Epidemiol	2.89
Omer et al. ²⁸	Kenya/1991/inglês	Papanicolaou Exame a fresco	East African Med Res	0.22
Lukic et al. ²⁹	Estados Unidos/2006/inglês	Colposcopia, Papanicolaou exame a fresco	Anticanc Res	1.87

NAATS: testes de ácidos nucleicos; TEM: microscopia de transmissão eletrônica.

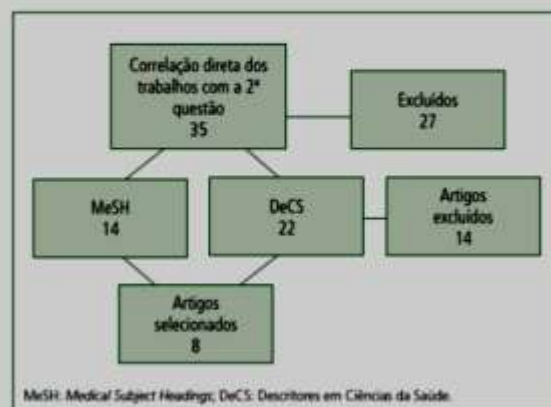


Figura 2 - Fluxograma do estudo: teste de relevância 2

selecionou 15 artigos, dos quais 8 foram incluídos (Tabela 4) e 7, excluídos. Dos sete excluídos, um foi artigo de revisão e os demais eram relacionados a outros fatores.

O mesmo cruzamento de palavras no segundo descritor DeSC (BVS) selecionou 22 artigos, dos quais 8 foram incluídos (todos do MEDLINE), enquanto 14 foram excluídos. Destes, 9 eram artigos correlacionados com outros aspectos, um artigo em chinês, um de revisão da literatura e 2 artigos em duplicata.

Discussão

A associação entre *T. vaginalis* e o câncer cervical vem sendo feita preferencialmente por meio de dois métodos de diagnóstico: o exame histopatológico e o exame de Papanicolaou. O histopatológico ou biópsia é considerado padrão ouro na detecção de neoplasias uterinas, por intermédio dele o parasito pode ser observado envolto a células neoplásicas ou mesmo aderido às suas membranas. E no momento em que é visto dessa forma, as estruturas proeminentes em seu citoplasma são notadas, indicando uma ativação possivelmente ocasional. Núcleo intensamente

corado, cromatina condensada proeminente e maior número de hidrogenossomos foram evidenciados em uma cepa de *T. vaginalis* cultivada em células epiteliais vaginais de pacientes portadoras de neoplasia cervical uterina¹¹ (A).

O estudo recente conduzido por Lazenby et al. encontrou uma alta prevalência de *T. vaginalis* em um pequeno grupo de mulheres com câncer cervical. Os autores utilizaram testes moleculares de alta precisão; além disso, os resultados estiveram em acordo com o trabalho de Yap et al., que utilizaram a técnica de *Western blot*^{5,16} (A).

A adesão de *T. vaginalis* às células epiteliais vaginais humanas (HVEC) ocorre a partir da sua membrana glicofosfolipídica (LPG), composta por uma camada superficial de carboidratos. Fichorova et al. demonstraram a condição de aderência na interação entre LPG e a célula do hospedeiro propiciada por uma via molecular comum que é ancorada por uma proteína adaptadora *Mydoid Differentiation Primary Response Gene 88* (MyD88). Essa via é estimulada pela LPG de *T. vaginalis* e pela interleucina 1 beta (IL-1 β), com a consequente produção de interleucina 8 (IL-8) e a ativação do fator de necrose kappa B (NF-kB). A IL-8, quando produzida no líquido amniótico durante a gravidez, por estimulação de *T. vaginalis*, pode provocar o rompimento da placenta, causando a prematuridade do parto¹² (A).

A interação entre *T. vaginalis* e as HVEC pelas vias dos receptores do tipo Toll (*toll like receptors* ou TLR) não é dependente da MyD88¹² (A). Os TLRs, sendo responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, também levariam *T. vaginalis* a estimular a produção de IL-8. A proteína TRIF e/ou TICAM 1 é um domínio conte do adaptadores de indução à interferon beta (IF- β) e promotores de NF-kB. Ela se liga preferencialmente à TLR3 requerendo a dimerização, mas está envolvida também nas vias TLR2, TLR4 e TLR7. As vias TLR3 e TRIF dependentes, desencadeadas por um vírus endossimbionte, liberado de *T. vaginalis* (denominado vírus de *T. vaginalis* ou TVV na sigla em inglês), foram verificadas por meio da comparação entre culturas tratadas com baciloficina (que inibe a acidificação do endossomo essencial para a via TLR3) e culturas não tratadas. O experimento demonstrou, ao final, a não indução de IL-8, NF-kB e IF β na ausência do TVV¹⁷ (A).

T. vaginalis induz a fosforilação de importantes mediadoras envolvidas na rede intracelular de proteínas tradutoras dos sinais extracelulares: as proteínas quinases mitógenoativadas (MAPK). A introdução de *T. vaginalis* em cultura de células HeLa induziu a fosforilação da p38 MAPK, desencadeando a sua atividade e a da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A fosforilação começou a ser induzida uma hora após a indução de *T. vaginalis* à cultura de células, tendo atingido o pico sete horas depois. O tratamento com inibidores demonstrou uma regulação da expressão gênica de mRNA, TLRs 2, 4 e 9 demonstrando citocinas pré-inflamatórias (IL-8 e TNF- α) mediadas pelas vias MAPK no

Tabela 4 - Estudo qualitativo dos artigos incluídos nas bases *Medical Subject Headings* e *Descritores em Ciências da Saúde* - unitermos: "*Trichomonas vaginalis* & *signal transduction*"

Autores	País de publicação/ ano/lingua	Métodos de diagnóstico	Journal	Fator de impacto
Fichorova et al. ¹¹	Estados Unidos/2006/inglês	Cultura, cromatografia de massa, citoquica	Infect Immunol	4.09
Chang et al. ¹¹	Estados Unidos/2006/inglês	Cultura, PCR, citoquímica	Immunol	3.73
Mudodi et al. ¹⁴	Canadá/2006/ inglês	RT-PCR, immunoblot, imunofluorescência	Microbiol	2.83
Fichorova et al. ¹⁷	Estados Unidos/2012/inglês	Cultura, espectrometria de massa, PCRq	PLoS One	3.73
Ryang et al. ¹⁸	Korea/2004/inglês	Cultura, immunoblot, PCR	Yonsei MJ	1.26
Bricheux et al. ²⁰	Alemanha/2000/ inglês	Cultura, immunoblot, RT-PCR, MEV, imunofluorescência	Euro J of Cell Biol	3.50
Huang et al. ²⁰	Estados Unidos/2012/inglês	Cultura, electroforese de proteínas, análise de imagem, PCRq	Inf Immun	4.15
Nam et al. ²¹	França/2011/inglês	Cultura, RT-PCR	Microb Infect	2.76

MEV: microscopia de transmissão eletrônica; PCRq: reação em cadeia da polimerase quantitativa; PCR: reação em cadeia da polimerase; RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real.

epitélio¹³ (A). A infecção por *T. vaginalis* em macrófagos, produzida *in vitro*, também ativou essa via, tendo sido demonstrada por Ryang et al. por meio da técnica do *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para as quinases¹⁸ (A).

A proteína de superfície TV44 foi isolada de *T. vaginalis* pela técnica do *immunoblot* e o gene *tvv* analisado por análise em *Southern*. Essa proteína é reconhecida pela IgA (imunoglobulina que oferece proteção contra infecções por micro-organismos incluindo parasitoses) e a modulação da sua expressão depende do contato com as HVEC, assim como da demanda de ferro. Na condição de aderido à célula epitelial, *T. vaginalis* manifestou a diminuição da TV44, fato que sugeriu o seu envolvimento na via de sinalização entre o parasito e a célula do hospedeiro¹⁴ (A).

A forma amebóide de *T. vaginalis*, configurada durante a adesão celular, é proveniente dos monômeros de actina, essenciais nos processos dinâmicos que transformam as formas celulares e geram as forças necessárias para locomoção celular, divisão celular, quimiotaxia, fagocitose, macropinocitose e citocinese, assim como para a polaridade celular e o processo de diferenciação. Filamentos de actina levam à locomoção de muitas partículas citoplasmáticas, incluindo endossomos, bactérias patogênicas e vírus, inclusive partículas se dirigindo para o engolfamento durante a fagocitose. A adesão celular e o sinal de transdução são processos coordenados que podem estar ligados a proteínas associadas à actina. Dentre as proteínas regulatórias da actina, a representativa coronina interage com a F-actina^{19,20} (A).

A coronina é uma das proteínas-chave na regulação do citoesqueleto de *T. vaginalis* em resposta à sua interação com as células do hospedeiro. Essa proteína se concentra às margens da célula aderente e eventualmente em outros locais. Bricheux et al. caracterizaram molecularmente a coronina do citoesqueleto de actina de *T. vaginalis* localizando-a ultraestruturalmente em dinâmicos locais das células amebóides. A coronina em *T. vaginalis*

é constituída de repetidas regiões WD, uma estrutura C-terminal e α -helical, além de muitas fosforilações entre C1 e C2. O trabalho de Bricheux et al. não esclareceu a parte da proteína responsável pela ligação à actina, no entanto gerou a expectativa da existência de uma via de sinalização onde a coronina seja protagonista da reorganização do citoesqueleto para a adaptação de *T. vaginalis* à forma amebóide durante o contato celular²⁰ (A).

As formas amebóides de *T. vaginalis* têm sido estudadas por vários autores, dentre eles, Huang et al., cujos experimentos expuseram outra matriz extracelular (ECM), a fibronectina. Os autores verificaram, por intermédio de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa, um menor número de genes expressos nas formas amebóides de *T. vaginalis* em relação às formas trofozoíticas, fato que pode sugerir uma incorporação proteico-enzimática que, consequentemente, enfatiza o papel citopatogênico do parasito²¹ (A).

Conclusão

T. vaginalis é uma agente infeccioso do epitélio vaginal que atinge mulheres em todo o mundo, sendo sua prevalência oscilante e de acordo com a população estudada. O método diagnóstico mais utilizado na detecção desse agente é a citologia de Papanicolaou, que apresenta sensibilidade em torno de 80% e é requerida no rastreamento do câncer cervical. O contato dele com as HVEC induz sinalizações químicas provavelmente capazes de gerar danos significativos na mucosa local. A produção da IL-8 por *T. vaginalis* tem sido comprovada mediante experimentos de alta complexidade.

As importantes MAP quinases representam, no momento, as principais vias de sinalização entre *T. vaginalis* e a célula humana, tendo em vista o efeito da citopatogenicidade. Entretanto, a via molecular ancorada à proteína adaptadora MyD88 e a via dos receptores do tipo Toll independentes constituem alternativas a serem consideradas e melhor avaliadas.

Leituras suplementares

1. World Health Organization. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Syphilis* and *Trichomonas vaginalis*. 2011 [cited 2014 Oct 30]. Available from: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502450_eng.pdf>
2. Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan AS; 1982.
3. Yap EH, Ho TH, Chan YC, Thong TW, Ng GC, Ho LC, et al. Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. *Gemittourin Med*. 1995;71 (6):402-4.
4. Silva Filho AM, Longato Filho AL. Colo uterino e vagina: processos inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Editora Revinte R Ltda.; 2000.
5. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus). SISCOLO/ SISNAMA – Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero e Sistema de Informação do Câncer de Mama. 2012. [cited 2014 Oct 30]. Available from: <<http://w3.datasus.gov.br/siscam/index.php>>
6. Cheon S-H, Kim SR, Song H-O, Ahn MH, Hyu J-S. The dimension of *Trichomonas vaginalis* measured by scanning electron microscopy. *Korean J Parasitol*. 2013;51 (2):243-6.
7. Lemos PAF, Garcia-Zapata MTA, Guimarães NMC, Moraes RiG. Comparison of methods for the identification of *Trichomonas vaginalis* in HIV – positive and negative women. *Int J Trop Med*. 2009;4 (20):76-81.
8. Yusof AM, Kumar S. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol Res*. 2012;111:371-81.
9. Alderete JF, Bencharml M, Leiker MW, Crouch ML. The complex fibronectin – *Trichomonas vaginalis* interactions and *Trichomonos*. *Parasitol Int*. 2012;51 (3):285-92.
10. Tasca T, De Carl GA. Shape variations of *Trichomonas vaginalis* in presence of different substrates. *Parasitol Latinoam*. 2002;57:5-8.

11. Afzan MY, Suresh K. Phenotypic 'variant' forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from cervical neoplasia patients. *Exp Parasitol*. 2012;131 (2012):267-73.
12. Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, Costello CE, Hayes GR, Lucas L, Sign BN. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect Immun*. 2006;74 (10):5773-9.
13. Chang JH, Park JY, Kim SK. (2006) Dependence on p38 MAPK signaling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. *Immunol*. 2006;118 (2):164-70.
14. Mudodi V, Kucknoor AS, Chang TH, Alderete JF. A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2006;31 6-6.
15. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. The PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009;6 (6):e1000097.
16. Lazenby GB, Taylor PT, Badman BS, McHaki E, Korte JE, Soper DE, et al. An association between *Trichomonas vaginalis* and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clin Ther*. 2014;36 (1):38-45.
17. Fichorova RN, Lee Y, Yamamoto HS, Takagi y, Hayes GR, Goodman RP, et al. Endobiont viruses sensed by the human host - beyond conventional antiparasitic therapy. *PLoS One*. 2012;7 (11):e48418.
18. Ryang YS, Chang JH, Park JY. Involvement of MAP kinases in apoptosis of macrophage treated with *Trichomonas vaginalis*. *Yonsei Med J*. 2004;45 (4):751-4.
19. Demirezen S, Safi Z, Beksac S. The interaction of *Trichomonas vaginalis* with epithelial cells, polymorphonuclear leucocytes and erythrocytes on vaginal smears: light microscopic observation. *Cytopathol*. 2000;11:326-32.
20. Bricheux G, Coffe G, Bayle D, Brugerolle G. Characterization, cloning and immune localization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis*. *Eur J Cell Biol*. 2000;79 (6):413-22.
21. Kharsany AB, Hoosen AA, Moodley J, Bagaratee J, Gowus E. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Med*. 1993;69 (5):357-60.
22. Roeters AM, Boon ME, Van Haften M, Vernooij F, Bontekoe TR, Heintz AP. Inflammatory events as detected in cervical smears and squamous intraepithelial lesions. *Diagn Cytopathol*. 2010;38 (2):85-93.
23. Misra JS, Singh U. Results of long-term hospital based cytological screening in asymptomatic women. *Diagn Cytopathol*. 2006;34 (3):184-7.
24. Simões-Barbosa A, Coutinho Feijó G, da Silva JX, Rama Leal T, Paes Barbosa TW. Six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasília, the capital of Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2002;6 (3):110-8.
25. Sayed el-AH SA, El-Wakil HS, Kamel NM, Mahmoud MS. A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. *J Egypt Soc Parasitol*. 2002;32 (1):167-78.
26. Viski M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol*. 2000;39 (1):71-5.
27. Zhang ZF, Graham S, Yu SZ, Marshall J, Zielesny M, Chen YX, et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer: A prospective study in China. *Ann Epidemiol*. 1995;5 (4):325-32.
28. Omer EE, Naem HA, Al-MH, Catterall RD, Erwa HH. Vaginal and cervical abnormalities associated with trichomonal infection. *East Afr Med J*. 1991;68 (6):455-60.
29. Lukic A, Canzio C, Patella A, Giovagnoli MR, Cipriani P, Frega A, et al. Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: the role of *Ureaplasma urealyticum*. *Anticancer Res*. 2006;26 (6C):4843-9.
30. Huang KY, Huang PJ, Ku FM, Lin R, Alderete JF, Tang P. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infect Immun*. 2012;80 (11):3900-11.
31. Nam YH, Min D, Kim HP, Song KI, Lee YA, Kim SH, et al. Leukotriene B4 receptor BLT-mediated phosphorylation of NF- κ B and CREB is involved in IL-8 production in human mast cells induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Microbes Infect*. 2011;13 (14-15):1211-20.

Artigo 2

Prevalence of *Trichomonas Vaginalis* in Women with Precancerous and Indeterminate Lesions at Cytology

Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos, Waldemar Naves do Amaral

Abstract— *Trichomonas vaginalis* was investigated by cervicovaginal cytology in pregnant and non-pregnant women receiving care at two public referral hospitals in Goiânia, Goiás, Brazil. The frequency of *Trichomonas vaginalis* infection, the correlation between its presence and a diagnosis of precancerous and indeterminate lesions, and potential inflammatory changes in the vaginal epithelial cells in the presence of the parasite were evaluated. Overall, 359 Papanicolaou smears from 157 pregnant women and 202 non-pregnant women were evaluated. The principal inflammatory changes associated with the presence of *T. vaginalis* were registered. A second examiner reevaluated the slides. *T. vaginalis* infection was found in 46% of the slides, with precancerous lesions being found in 4.2% of the infected women. Perinuclear halos were the most common inflammatory change associated with the presence of the parasite. Adherence of the parasite to the vaginal epithelial cells and ill-defined cytoplasmic borders were more commonly found in the group of pregnant patients. The prevalence of *T. vaginalis* was high in the present study, both in the pregnant and non-pregnant women. The socioeconomic level of the study population and the examiners' experience played a particularly relevant role in the results obtained.

Index Terms—*Trichomonas vaginalis*; Papanicolaou smear; uterine neoplasms.

I. INTRODUCTION

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) is an extracellular protozoan parasite that infects the vagina, affecting around 170 million women worldwide. The presence of the parasite triggers inflammatory processes in the vaginal epithelial cells that range from moderate to severe (according to the Papanicolaou classification). However, there is speculation that these inflammatory processes may consequently lead to a diagnosis of precancerous lesions (classified according to the Bethesda system for reporting cervical cytology) [1].

Cytology is the method of choice for diagnosing *T. vaginalis* because of its low cost and ease of use as well as its wide range of advantages in cervical cancer screening. *T. vaginalis* has been associated with the neoplastic process, particularly following the discovery of its characteristic adherence to the vaginal epithelial cells, which is responsible for the interaction between these cells and the parasite, with an exchange of chemical signals between them [1, 2].

Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos, PhD student in Health Sciences at the School of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil
Waldemar Naves do Amaral, Professor of the Postgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Goiás, Academic Director of the Dona Iris Maternity Hospital, Municipal Health Fund, Goiânia, Goiás, Brazil.

The present study evaluated the detection frequency of *T. vaginalis* by cytology. Cytological abnormalities and inflammatory changes were evaluated as a function of the presence of the parasite in pregnant and non-pregnant women receiving care at referral hospitals in Goiânia, Goiás, Brazil.

II. METHODS

A. Study Population and Site

The study population consisted of 359 healthy women (157 pregnant women and 202 non-pregnant women) receiving care at two public hospitals in Goiânia: the Dona Iris Maternity Hospital, a reference center for women's healthcare associated with the Goiânia Municipal Health Fund, Goiânia, Goiás, Brazil; and the Teaching Hospital of the Federal University of Goiás, a reference health center for the state of Goiás.

B. Ethical Aspects

The internal review board of the Federal University of Goiás Teaching Hospital approved the study protocol. The study was conducted in accordance with the 2008 amendment of the Declaration of Helsinki [3]. The women signed an informed consent form.

C. Data Collection and Processing

During gynecological consultations, the medical teams at the participating hospitals collected the cervicovaginal smears using cervical brushes and spatulas. The smears were immediately fixed in 70% alcohol. The conventional method of Papanicolaou (Pap) smear preparation was used and the slides were analyzed using an Olympus optical microscope, model CBA (Figures 1, 2 and 3).

D. Papanicolaou Smears

The slides were examined by the principal investigator of the study, who has a postgraduate degree in clinical cytology from the School of Pharmacy, Federal University of Goiás. Quality control consisted of rescreening 10% of all slides examined. A technician trained at the José Alencar Gomes da Silva National Cancer Institute conducted a test-retest of all smears that tested positive for *T. vaginalis* in order to allow a consensus to be reached regarding results.

The cytopathology reports were prepared in accordance with the 2001 Bethesda system for reporting cervical cytology [4].

Prevalence of *Trichomonas Vaginalis* in Women with Precancerous and Indeterminate Lesions at Cytology

E. Scanning Electron Microscopy

For illustrative and comparative purposes, scanning electron microscopy was performed using a sample from a pregnant patient cultured in Diamond's modified medium. The smear was fixed under a cover slip measuring 24 x 24 cm, coated with 0.1% gelatin, fixed in 4% paraformaldehyde and stored overnight in a humidified chamber. Dehydration was performed in increasing solutions of ethanol. The slide was dried in hexamethyldisilazane and deposition of gold films was performed under vacuum using a Denton vacuum system. The specimen was examined using a Jeol scanning electron microscope (JSM-610), equipped with energy-dispersive spectrometry and Thermo Scientific NSS spectral imaging, operated at 4 kV, and installed in the microscopy laboratory of the Physics Institute, Federal University of Goiás (Figure 4).

F. Statistical Analysis

The chi-square test and Fisher's exact test were used in the statistical analysis, which was conducted using the EpiInfo software program, version 7. Significance level was defined as $p < 0.05$.

III RESULTS

Overall, 46% of the women investigated in the present study were infected with *T. vaginalis*. The frequency was higher in the group of non-pregnant women compared to the group of pregnant patients (54% versus 37%) and this difference was statistically significant ($p < 0.05$) (Table 1).

Table 1: Frequency of *T. vaginalis* infection in pregnant men receiving care in referral hospitals in Goiânia.

<i>T. vaginalis</i>	Pregnant Women	Non-Pregnant Women	Total
Positive	58 (37%)	109(54%)	167(46%)
Negative	99 (63%)	93 (46%)	192(53%)
Total	157(100%)	202(100%)	359(100%)

the patients with *T. vaginalis* (Table 2). Fisher's exact test 0,001

Table 2: Association of precancerous lesions with the presence of *T. vaginalis* in women receiving care at referral hospitals in Goiânia

	Positive	Negative	Total
ASC-US	4 (2.4%)	1 (0.5%)	5(1.4%)
LSIL	3 (1.8%)	6 (3.1%)	9 (2.5%)
HSIL	0	1 (0.5%)	1 (0.3%)
Negative for malignancy	160(95.8%)	184(95.8%)	344(95.8%)

ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance
 LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion
 HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion

The main inflammatory change found in the patients infected with *T. vaginalis* consisted of perinuclear halos in both groups, including 100% of the 24 slides analyzed in the group of non-pregnant women. Enlarged nuclei and hyperkeratosis were also more common in the group of non-pregnant women (91% versus 79%); however, the percentages with ill-defined cytoplasmic borders and adherence of the parasite to the vaginal epithelial cells were higher in the group of pregnant women at the Dona Iris Maternity Hospital (Table 3).

Table 3: Principal inflammatory changes found in the presence of *T. vaginalis* in pregnant and non-pregnant women receiving care at referral hospitals in Goiânia.

Inflammatory changes	Pregnant Women	Non-Pregnant Women	Total
Perinuclear halos	24(100%)	43 (98%)	67 (98%)
Enlarged nuclei	19 (79%)	40 (91%)	59 (87%)
Ill-defined cytoplasmic border	23 (96%)	36 (82%)	59 (87%)
Adherence to vaginal epithelial cells	21 (87%)	37 (84%)	58 (85%)

IV. FIGURE

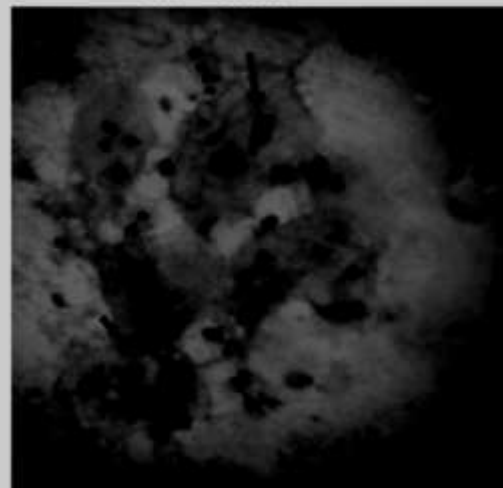


Fig.1 Adherence of *T. vaginalis* to the vaginal epithelial cells and perinuclear halo (Pap smear).



V. DISCUSSION

The prevalence of *T. vaginalis* infection found in the present study was high compared to previous reports in the literature. A study conducted in the Manhiça district of Mozambique reported the presence of the infection in 31% of cases examined (78/254); however, in addition to the socioeconomic and cultural characteristics of that population, 47% of whom are illiterate, it is also important to take into consideration that the sensitivity of the diagnostic technique used (i.e. wet mount examination) is considered low [5,6].

predisposes women to infection by parasitic agents; however, the prevalence of *T. vaginalis* in the group of pregnant women in the present study was lower than that found in the non-pregnant group. The characteristics of the population receiving care in the latter group (women living in conditions of poverty) may in part justify this finding. Another factor may be the diagnostic technique used, bearing in mind that the specificity of the Pap smear is lower than that obtained with other methods [7]. The frequency of *T. vaginalis* was evaluated in pregnant women in Papua New Guinea, where the infection was found in 21.3% of the 400 samples analyzed by polymerase chain reaction (PCR) [8]. In another study conducted in Zimbabwe, infection was detected by wet mount examination in 11.8% of 691 pregnant women (≥ 36 weeks of pregnancy) [9].

Pap smear is considered a highly sensitive technique compared to microscopy, culture and even PCR. Nevertheless, the specificity of this technique is arguable, since false-positive results have been reported in the literature as a consequence of possible diagnostic confusion between *T. vaginalis* and cell remnants [10]. In this case, the experience of the examiner becomes a relevant factor in determining the sensitivity and specificity of the exam. Howel et al. reported a better performance by cytotechnologists in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Gynecologic Cytology (CAPPAP program) for evaluation of the presence of the parasite in cervicovaginal smears [11]. Loo et al. reported sensitivity of 98%, specificity of 96% and a positive predictive value of 88% for detection of the parasite in the Pap smear in relation to the gold-standard culture in Feinberg's medium [12].

The indeterminate lesions and the precancerous lesions detected in this study were associated with the presence of *T. vaginalis* in 4.2% of the 359 women analyzed. Donders et al. reported the presence of *T. vaginalis* in 1.3% of cases of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) (Bethesda) compared to 0.03% when no malignant lesions were found [13]. Misra and Singh found *T. vaginalis* in 8.1% of cases of low-grade lesions defined according to the Bethesda system [14].

The principal inflammatory changes associated with the presence of *T. vaginalis* in the present study are similar to those reported by Noel and Engohan-Aloghe [15]. There was a high rate of perinuclear halos, nuclear enlargement and adherence of the parasite to vaginal epithelial cells in both studies. No case of ill-defined cytoplasmic border was reported in the aforementioned study, however, according to Lemos et al. that change is characteristic of the presence of the parasite, which was found in 50% of the smears analyzed [16].

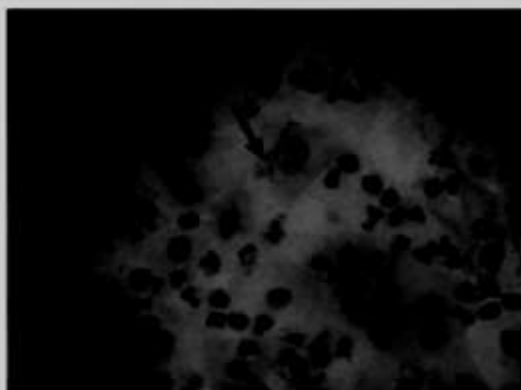


Fig. 2 Adherence of *T. vaginalis* to the vaginal epithelial cells and ill-defined cytoplasmic border.

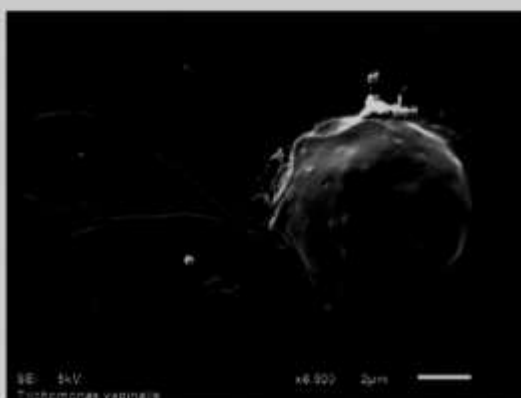


Fig. 3 Trophozoite form of *T. vaginalis* in scanning electron microscopy.

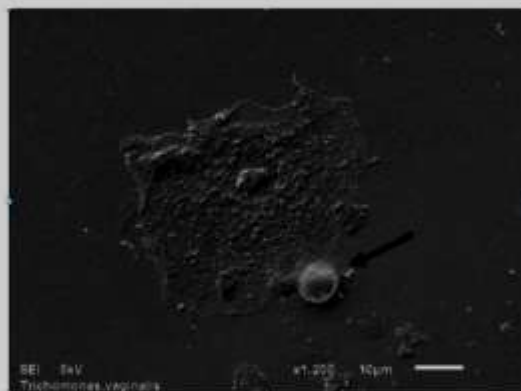


Fig. 4 Amoeboid form of *T. vaginalis* and vaginal epithelial cell in scanning electron microscopy.

In the present study, ill-defined cytoplasmic borders were present in 87% of the infected pregnant women and in 84% of the infected non-pregnant women. Greater importance is now being given to this change as well as to the adherence of *T. vaginalis* to the vaginal epithelial cells, in view of the recent discovery of the pseudocystic or amoeboid form, the form acquired by the parasite when it comes into contact with the vaginal epithelial cells, at which time the signaling process begins [1]. Blurring of the cytoplasmic border and adherence to the vaginal epithelial cells were found principally in microbiota consisting of cocci and short bacilli.

Bär et al. highlighted the importance of commensal microbiota in providing protection from parasitic protozoan infections at the vaginal mucosa. In the present study, cocci and short bacilli predominated when *T. vaginalis* was present. The infectious agent that was most commonly associated with its presence was the Gram-negative bacteria *Gardnerella vaginalis*, a fact already reported in the literature when clue cells (vaginal epithelial cells coated with coccobacilli) are a constant part of the microbiota, in a pattern referred to as anaerobic [17,18].

T. vaginalis and lactobacilli may compete with one another in the microbiota and *Lactobacillus gasseri* significantly inhibits adherence to the vaginal epithelial cells [17,18]. In the present study, the parasite was present together with lactobacilli in the microbiota of 18% of the pregnant women compared to 8% of the non-pregnant women. This fact may indicate an advantage in favor of the former group, since the presence of lactobacilli could play a role in reducing the cytopathogenic effect of *T. vaginalis*.

VI. CONCLUSION

The detection frequency of *T. vaginalis* by cytology was high compared to previous reports in the literature. There is a considerable variation in sensitivity and specificity found in articles in which the different techniques are compared. The ability to detect *T. vaginalis* in vaginal smears was associated with the diagnostic technique used and with the experience of the examiner [12,19]. Evaluating *T. vaginalis*' presence in cases of precancerous lesions and illustrating the adherence of *T. vaginalis* to vaginal epithelial cells under optical and scanning electron microscopy the present study demonstrates that this parasite may potentiate or accelerate the neoplastic process through its contact with the vaginal epithelial cells [13,14]. Adherence of *T. vaginalis* to the host cell may be considered one of the principal inflammatory changes indicative of cytopathogenic development [15].

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the technical personnel at the Santa Helena Laboratory for their collaboration in performing the Papanicolaou smears and would like to thank the biologist and cytotechnologist, Otávio C Barros, of the Federal University of Goiás and the Alpha Laboratory for reviewing the cytology reports and identifying the principal inflammatory changes associated with the presence of *T. vaginalis*. The authors also would like to thank the Federal University of Goiás for the financial support of this project.

REFERENCES

- [1] Lemos PA, Anaral WN (2015, October) *Trichomonas vaginalis* associated with cervical cancer: a systematic review. *Feminis* [Online]43:209-214.
- [2] Tambouret RH (2013). The evolution of the Papanicolaou smear. *Clin Obstet Gynecol*. [Online] 56:3-9.
- [3] WMA Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, 1964 and amended by the 59th WMA General Assembly, Seoul, Republic of Korea, 2008.
- [4] Nayyar R, Wilbur DC (2015). The pap test and Bethesda 2014 "The reports of my demise have been greatly exaggerated. (after a quotation from Mark Twain). *Acta Cytol*. [Online] 59:121-132.
- [5] Menéndez C, Castellano X, Renom M, Sacaral J, Quintó L, Lloveras B, Klausnermeier J, Kornegay JR, Sigauque B, Bosch FX, Alonso PL. (2010). Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women from a rural area of Southern Mozambique. *Infect Dis Obstet Gynecol*. [Online]2010.pii: 609315. doi: 10.1155/2010/609315.
- [6] Perazzi BE, Menghi CI, Coppolillo EF, Gatta C, Eliseth MC, Torres RA, Vay CA, Familietti AM (2010). Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. *Korean J Parasitol*. 48:61-65.
- [7] Lemos PA, Garcia-Zapata MT (2014) Aspects of *Trichomonas vaginalis* infection and diagnostic methods. *Acta Obstet Gynecol Port*. [Online] 8:152-162.
- [8] Wangnapi RA, Soso S, Unger HW, Sawewa C, Ona M, Unibers AJ, Ndewei N, Siba P, Li Wai Sum CS, Valley A, Wapling J, Ryan C, Mueller I, Rogerson SJ (2015). Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Papua New Guinea. *Sex Transm Infect*. [Online]91:194-200.
- [9] Kurewa NE, Mapingure MP, Munjoma MW, Chirenje MZ, Rusakaniko S, Stray-Pedersen B (2010). The burden and risk factors of sexually transmitted infections and reproductive tract infections among pregnant women in Zimbabwe. *BMC Infect Dis*. [Online] 10:127.
- [10] Lobo TT, Feijó G, Carvalho SE, Costa PL, Chagas C, Xavier J, Simões-Barbosa A. (2003). A comparative evaluation of the Papanicolaou test for the diagnosis of trichomoniasis. *Sex Transm Dis* [Online]30:694-699.
- [11] Howell LP, Durragh TM, Souers RJ, Thomas N, Moriarty AT (2013). Identification of *Trichomonas vaginalis* in different Papanicolaou test preparations: trends over time in the College of American Pathologists Educational Interlaboratory Comparison Program. *Arch Pathol Lab Med* [Online]137:1043-1046.
- [12] Loo SK, Tang WY, Lo KK (2009). Clinical significance of *Trichomonas vaginalis* detected in Papanicolaou smear: a survey in female social hygiene clinic. *Hong Kong Med J*. [Online]15:90-93.
- [13] Donders GG, Depuydt CE, Borges JP, Verrecken AJ. (2013) Association of *Trichomonas vaginalis* and cytological abnormalities of the cervix in low risk women. *PLoS One* [Online]8:e86266.
- [14] Misra JS, Singh U (2006) Results of longterm hospital based in cytological screening in asymptomatic women. *Diagn Cytopathol*. [Online]34:184-187.
- [15] Noël JC, Engohan-Aloghe C (2010) Morphologic criteria associated with *Trichomonas vaginalis* in liquid-based cytology. *Acta Cytol*. [Online]54:582-586.
- [16] Lemos PA, Garcia-Zapata MT, Guimaraes NM, Moais RG. (2009) Comparison of methods for the identification of *Trichomonas vaginalis* in HIV-positive and negative women. *Int J Trop Med*. [Online]. 4:76-81.
- [17] Bär AK, Phukan N, Pinheiro J, Simões-Barbosa A (2015) The interplay of host microbiota and parasitic protozoans at mucosal interfaces: implications for the outcomes of infections and diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. [Online]9:e0004176.
- [18] Silva Filho AM, Longato Filho AL "Colo uterino e vagina: processos inflamatórios - aspectos histológicos, citológicos e colposcópico". Rio de Janeiro, Revinter, 2000, chap. 7, pp. 85-90.
- [19] Queza MI, Rivera WL (2013) Diagnosis and molecular characterization of *Trichomonas vaginalis* in sex workers in the Philippines. *Pathog Glob Health* [Online]. 107:136-140.

Artigo 3



Laboratory Diagnosis Of *T. Vaginalis* In Pregnant And Non-Pregnant Women

* **Patrícia Abreu Pinheiro de Lemos**

Biomedical Scientist; Specialist in Clinical Cytology; Master's Degree in Parasitology and Doctoral Student in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil., * Corresponding author

Waldemar Naves do Amaral

Professor of the Postgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Goiás; Academic Director of the Dona Iris Hospital and Maternity Unit, Municipal Health Fund, Goiânia, Goiás, Brazil

ABSTRACT

Objectives: To determine the frequency of *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) infection according to different clinical laboratory techniques in a population of pregnant and non-pregnant patients receiving care at reference hospitals in Goiânia, and to perform molecular identification of the parasite using polymerase chain reaction (PCR).

Methods: Traditional techniques were used: culture (gold-standard), wet mount microscopy and Papanicolaou (Pap) smears. Additionally, a stained preparation from cultured *T. vaginalis* was used. Molecular identification of *T. vaginalis* was made by PCR using the TVK3/TVK7 primer set.

Results: There was no statistically significant difference in the rates of *T. vaginalis* infection between the groups of pregnant and non-pregnant women: culture (20.8 versus 25.5%); wet mount microscopy (12.5 versus 7.1%); Pap smear (31.4 versus 48.9%); stained preparation from cultured *T. vaginalis* (37.5 versus 52.0%) and PCR (12.5 versus 7.1%). Accuracy was established by comparison with culture. Sensitivity with wet mount microscopy was greater in the pregnant group (50% versus 30% in non-pregnant women), while the sensitivity of the Pap smear was 100% in the pregnant women and 97% in the non-pregnant women. Specificity was 100% with wet mount examination in both groups, while the specificity of Pap smear was 83% in the pregnant women versus 64% in the non-pregnant women.

Conclusions: The prevalence of *T. vaginalis* in this study was high, both in the pregnant women and in the non-pregnant women. The comparative study showed the degree of effectiveness obtained with the techniques evaluated.

KEYWORDS

Trichomonas vaginalis; clinical laboratory techniques; women; pregnant women; polymerase chain reaction

Introduction

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) is a flagellated protozoan that infects the vagina. Its prevalence varies in accordance with the characteristics of the populations evaluated. The prevalence rates of *T. vaginalis* are higher in poor populations (10-40%) from countries such as Zimbabwe and Zambia (in Africa), Egypt (in the Middle East), the coastal regions of Peru, and northeastern Brazil (in Latin America).^{1,4} Hygiene conditions and women's immune status are important characteristics to be analyzed when calculating the prevalence of this parasite since the frequency of this infection is highest in pregnant women and in women with pathologies that affect the immune system.^{1,2}

There are three main clinical laboratory techniques routinely used in the diagnosis of *T. vaginalis*. With wet mount microscopy, specificity is 100%; however, the sensitivity of this exam is fairly poor due to the rapid loss of flagellar motility (within 30 minutes).⁵ With liquid culture, sensitivity and specificity are considered high (around 95%), since culture provides the parasite with the ideal nutritional conditions for its development and multiplication.⁶ Papanicolaou (Pap) smears are the most commonly used method for the detection of *T. vaginalis*. Specificity and sensitivity are only moderate with Pap smears (around 80%), since the presence of static trophozoite forms can be a confounding factor, making the effectiveness of this method highly dependent on the examiner's experience.⁷

Polymerase chain reaction (PCR) techniques are highly specific (98%) and allow a specific target DNA sequence to be am-

plified *in vitro*. Amplification techniques use specific primers to identify the DNA sequence of the parasite. The sensitivity of PCR of approximately 95%, according to the most recent studies, depends on the optimization and standardization of the protocols applied, demanding effort and dedication from investigators.⁸

Pregnancy may favor *T. vaginalis* infection, since this is a period in which immunity is physiologically reduced. The infection may trigger early onset placental insufficiency, principally in the second trimester of pregnancy, resulting in premature delivery of the newborn infant.^{3,9}

The objective of the present study was to compare the techniques of wet mount microscopy and Papanicolaou (Pap) smears with the gold standard, liquid culture, and to also perform molecular identification of *T. vaginalis* using the TVK3/TVK7 primer set in pregnant and non-pregnant patients receiving care at reference hospitals in Goiânia.

Materials and Methods

Population

This cross-sectional, experimental study involved 170 patients, 72 of whom were pregnant, while the remaining 98 were not. Low-risk pregnant patients of any age who were requesting gynecological examination comprised the group of pregnant women. The control group consisted of sexually active, non-pregnant women in an appropriate phase of the cycle to permit samples to be taken for testing.

Site

The patients were receiving care at two of the principal referral public healthcare centers in the state of Goiás, Brazil: the *Dona Iris Hospital and Maternity Unit*, a reference in women's healthcare and linked to the Municipal Health Fund, and the *Federal University of Goiás' Teaching Hospital*. Both institutes are part of the Brazilian National Health Service network in the city of Goiânia, Goiás, Brazil.

Ethical issues

The study protocol was approved by the internal review board of the Federal University of Goiás Teaching Hospital, accredited by the National Commission of Ethics in Research (CONEP). The participants signed an informed consent form and the study was conducted in accordance with the 2008 revision of the Declaration of Helsinki.¹⁰

Sampling

Medical teams at the respective hospitals collected the samples.

Sampling procedures

During a gynecological examination, cervicovaginal secretion samples were collected using a sterile swab against the posterior vaginal fornix, ectocervix and endocervix. This triple sample collection was not performed in the group of pregnant women due to the potential risk of bleeding and/or miscarriage.

Wet mount microscopy

For this exam, a sterile swab was used to collect samples. The swabs were immediately soaked in sterile saline solution (0.85%). Microscopic examination was performed within half an hour of sampling.

Liquid culture

Modified Diamond's medium, considered the gold standard, was used for the culture of *T. vaginalis*.¹⁰ Sampling was performed as for wet mount microscopy, with the vaginal swabs immediately being transferred into the liquid medium. The samples were examined on a glass slide under a coverslip, both immediately following sampling. Later analyses were conducted at 24, 48 and 72 hours.

Stained preparation from cultured *T. vaginalis*

After a 72-hour period, the cultures in liquid medium were centrifuged at 3,500 rpm and their pellets were smeared onto glass slides. These smears were placed in an oven at 37°C for air-drying fixation. Next, the preparations were stained using the Quick Panoptic method with Romanowsky stains.

DNA extraction

To extract the DNA, the tubes containing the swabs in liquid culture medium were shaken vigorously and the swabs were then removed. Next, the tubes were centrifuged at 3,500 rpm for 5 minutes. The supernatants were removed and the pellets were re-suspended in 10 ml of deionized water and centrifuged again, after which their supernatants were removed. The washed pellets were stored at -21°C. DNA extraction was later performed using the QIAamp Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA).

PCR

To perform PCR and amplification of the target DNA, the following primers were synthesized: TVK3: TCTGTGCCCGTCTAAGTATGC and TVK7: ATTGTCGAACATTGGCTTACCCTC from a conserved region of DNA from *T. vaginalis* containing 262 pb. The synthesized sequences were checked and aligned with the GenBank NCBI database using the basic local alignment search tool (BLAST) (blast.ncbi.nlm.nih.gov). To amplify the DNA target sequence, a mix was prepared with 2.5 µl buffer (10x), 1.0 µl of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl of dNTP mix (10 mM), 6.5 µl of Milli-Q H₂O, 0.5 µl of Taq polymerase (5 IU), 1 µl of each primer and 10 µl of DNA extracted from the sample, resulting in a total volume of 25 µl. Amplification was performed using the PTC-0200 DNA Engine® thermal cycler

(Bio-Rad, Hercules, CA). The amplification protocol was as follows: 2-minute initial denaturation at 96°C, 33 cycles of 1 minute at 94°C for denaturation, 1-minute annealing at 60°C, 1 minute and 30 seconds for extension at 70°C, and 30 minutes at 60°C for the final extension of the target DNA. The amplicons were electrophoresed using the automated DNA sequencer MegaBACE 1000 (GE Health Care, USA). The genotyping analyses were performed using the Fragment Profiler® software program.

Quality control

Positive and negative controls were included in all the PCR runs. The DNA isolated from *T. vaginalis* (above 10 x 10⁶ cells/ml), developed in vitro, was used as positive control. The negative control consisted of a mix of PCR with primers but without the addition of DNA.

Results

The frequencies of *T. vaginalis* found with liquid culture, the gold standard technique, were practically the same in the two groups: 20.8% in the group of pregnant women versus 25.5% in the group of non-pregnant women (Table 1). With the Pap smear technique (Figure 1A), the number of samples testing positive for *T. vaginalis* was higher (31.43% in the pregnant women versus 48.9% in the non-pregnant women).

In the stained preparations from cultured *T. vaginalis* (Figure 1B), the number of samples testing positive for the parasite was the highest in both groups (37.5% versus 52.0%). With wet mount microscopy (Figure 1C), the percentage in the two groups was similar to that found with PCR (12.5% versus 7.4%).

The DNA extraction technique and the protocol used for PCR were found to be effective, allowing confirmation of the presence of the parasite DNA in a large proportion of the samples that tested positive in culture. PCR positivity was 12.5% in the group of pregnant women and 7.1% in the non-pregnant women (Figure 2).

The effectiveness of wet mount microscopy and Pap smear was established by comparing these techniques with the gold standard liquid culture (Tables 2 and 3). The Pap smear technique was found to be fairly sensitive, with the presence of *T. vaginalis* being detected in 100% of cases; however, compared to the gold standard, the rate of false positives was high, particularly in the group of non-pregnant women, where specificity was 64% compared to 83% in the group of pregnant women. The sensitivity of wet mount microscopy was higher in the group of pregnant women (50%) compared to the non-pregnant women (30%); however, specificity was 100% in both groups.

Table 1: Frequency of *T. vaginalis* infection according to three different diagnostic techniques in pregnant and non-pregnant women.

Techniques	Pregnant Women		Non-Pregnant Women		Total	
	<i>T. vaginalis</i> +	<i>T. vaginalis</i> +	<i>T. vaginalis</i> +	<i>T. vaginalis</i> +	n	%
Wet mount microscopy	9 (12.50)	7 (7.14)	16 (9.41)			
Liquid culture	15 (20.83)	25 (25.51)	40 (23.53)			
Pap smear	22 (31.43)	48 (48.98)	70 (41.18)			
Stained preparation from cultured <i>T. vaginalis</i>	27 (37.50)	51 (52.04)	78 (45.88)			
PCR	9 (12.50)	7 (7.14)	16 (9.41)			
Total	72 (100.00)	98 (49.6)	170 (100.00)			

Table 2: Accuracy of the techniques used to detect *T. vaginalis* in pregnant women receiving care at the Dona Iris Hospital and Maternity Unit, Goiânia, Goiás, Brazil.

Techniques		Liquid Culture (gold standard)			Measures of Accuracy	%
		Positive	Negative	Total		
Wet mount microscopy	Positive	7	0	7	Sensitivity	50
	Negative	7	58	65	Specificity	100
	Total	14	58	72	Positive predictive value	89
					Negative predictive value	80
Pap smear	Positive	14	10	24	Sensitivity	100
	Negative	0	48	48	Specificity	83
	Total	14	58	72	Positive predictive value	58
					Negative predictive value	100

Table 3: Accuracy of the techniques used to detect *T. vaginalis* in non-pregnant women receiving care at the Dona Iris Hospital and Maternity Unit, Goiânia, Goiás, Brazil.

Techniques		Liquid Culture (gold standard)			Measures of Accuracy	%
		Positive	Negative	Total		
Wet mount microscopy	Positive	7	0	7	Sensitivity	30
	Negative	16	75	91	Specificity	100
	Total	23	76	98	Positive predictive value	100
					Negative predictive value	82
Pap smear	Positive	21	27	48	Sensitivity	95
	Negative	1	49	50	Specificity	64
	Total	22	76	98	Positive predictive value	44
					Negative predictive value	98

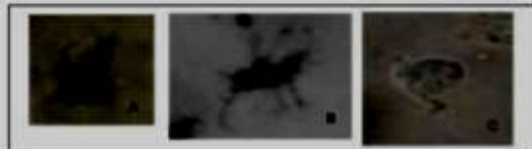


Figure 1. A: *T. vaginalis* in a Papanicolaou smear under optical microscopy (x1,000). B: *T. vaginalis* on a smear of cultured material in liquid medium, stained using Romanowsky-type stain (Quick Panoptic), under optical microscopy (x1,000). C: *T. vaginalis* in a sample of vaginal secretion with saline solution on a glass slide under cover slip, using optical microscopy (x1,000).

Discussion

The present study found a high prevalence of *T. vaginalis*, both in the group of pregnant women and in the non-pregnant women. The frequencies varied according to the technique used, with PCR being more effective in the group of pregnant women. Although not significant, this difference may reflect greater success in obtaining DNA from pregnant women compared to non-pregnant women.

The DNA extraction and PCR techniques successfully detected and confirmed positive cases found with liquid culture. The method of extracting DNA from *T. vaginalis* was performed directly from the liquid medium culture, as previously described by Kengne et al. in 1994, confirming the effectiveness and precision of the procedure.¹²

The results found with the PCR technique confirmed those

reported by Lawing et al., with a percentage that was close to that achieved with the gold standard liquid culture.¹³ PCR resulted in high specificity, amplifying the conserved region of the gene, with a mutation risk that was considered minimal or zero, as previously shown in the studies published by Khalaf & Kadhim and Crucitti et al.^{14,15}

In the present study, even after the DNA from *T. vaginalis* has deteriorated, the molecular technique was able to detect its presence, albeit in very small quantities. With the MegaBAC 1,000 automated DNA sequencer used to perform the electrophoretic run, it was possible to detect the presence of the precise region of interest, collected in culture medium and confirmed in an electrophoretic run in polyacrylamide gel.

Kurewa et al. reported the presence of the parasite in 11.8% of pregnant women using only wet mount microscopy. Those results are in agreement with the findings of the present study in which a rate of 12.5% was found in a similar group using the same technique.¹

Wet mount microscopy is a highly specific technique in which *T. vaginalis* is identified by its flagellar motility at a time when the parasite load in most cases is generally high. With this technique, the parasite was found within 30 minutes of sampling.

Stoner et al. found that, with wet mount microscopy, the flagella of *T. vaginalis* gradually lose motility within 30 minutes after collection. Exposure to oxygen is presumed to be the cause of this loss, since *T. vaginalis*, which is considered a facultative anaerobic parasite, fails to complete the citric acid cycle.⁶

In the study conducted by Saleh et al., sensitivity with wet mount microscopy was high, with high rates of positivity. Those results contradict the findings of most of the paper found in the literature. The high sensitivity found by those authors may be due to the use of glucose (5%) in the saline solution, with the sample being stored at body temperature (37°C) and examined 10 minutes later.¹⁶ In the present study sensitivity was low with wet mount microscopy and this is in agreement with other studies in which the unmodified classical technique was used.¹³

Bearing in mind that culture for *T. vaginalis* is a technique that involves the maintenance and multiplication of the parasites in their trophozoite form and that these forms are distinguished from polymorphonuclear leukocytes by flagellar movement we presume that after 48 hours (two days) the cultures in liquid medium should be centrifuged, the sediments placed as smears on glass slides and then stained using Romanowsky stains (Giemsa and/or Quick Panoptic). With this method positivity for *T. vaginalis* was high.

Higher frequencies of *T. vaginalis* were found in the culture staining preparations and Pap smears. Because flagellar motility is not needed for them to be recognized, the trophozoite forms of the parasite are distinguished from cell remnants by the presence of their unique and slightly elongated nuclei that are perfectly visible and characterized using common staining techniques (Romanowsky-type stains) and with Papanicolaou staining.

The study conducted by Mahmoud et al. reported poor sensitivity (33%) with Giemsa staining, a Romanowsky-type dye. Those authors emphasized the fact that the trophozoites have been lost on the slide or damaged at the time of microscopic visualization.¹⁷ Nevertheless, the results of the present study confirm that these dyes represent an important tool for visualizing cultured parasites.

The individual host conditions as well as the aggressiveness and the number of parasites are other factors that always affect the signs and symptoms of trichomoniasis.¹⁸ For this reason, we believed that pregnancy could have resulted in a greater number of positive results compared to the control group, a hypothesis that, in the present study, was not confirmed.

The presence of *T. vaginalis* in relation to the immune status of patients was done by assessing the relative number of lymphocytes in full blood counts. The blood samples and the gynecological sampling were obtained on dates close to each other. In the group of pregnant women, a slight majority (54%) had a percentage of lymphocytes below 25%, a finding that is considered normal bearing in mind that the organism of pregnant women physiologically establishes an adaptive immunity, stimulating tolerance to fetal antigens (50% of the genetic material being paternal).¹⁹ *T. vaginalis* infection was present in 47.6% of the group of immunosuppressed pregnant women (10/21) and in 37.5% (6/47) of the group of immunosuppressed non-pregnant women, i.e. those women with a percentage of lymphocytes below 25%.

Conclusions

The rates of *T. vaginalis* infection found in the present study were high, both in the group of pregnant women and among the non-pregnant women. The high frequency of the parasite was principally due to the poor socioeconomic conditions of the study population.^{1,2,20}

The comparative study highlighted the degree of effectiveness of the clinical laboratory techniques. The DNA extraction and PCR techniques used for the molecular identification of *T. vaginalis* were also found to be effective.

Acknowledgements

The authors are grateful to the biologist Mr. Jonas Garcia de Almeida for his substantially contribution in performing the molecular technique and we are grateful to the technical director of the Laboratório DNA Alpha e Diagnósticos Moleculares Ltda., Mr. Weliton Menezes Silva, for his collaboration in carrying out the molecular technique, which was of vital importance in the present study. We would also like to thank the Federal University of Goiás for the financial support.

There was no statistically significant difference between the groups ($p > 0.05$).

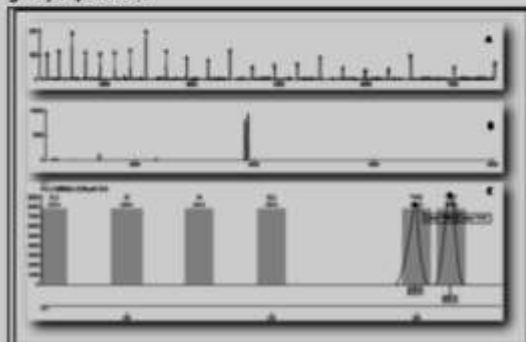


Figure 2: Electropherogram (PCR). A: Internal lane standard (ILS 600) with 22 bands marked with carboxy-x-rhodamine every 20 pb, spaced at every 25 pb. The internal lane standard of 600 pb was used to attribute the sizes of each DNA fragment separated by capillary electrophoresis. B: Localization of the target DNA in the electrophoretic run performed in the MegaBACE 1000 automated sequencer. C: Electropherogram of genotyping, showing the presence and location of the TVK7 and TVK3 genes in the sample of target DNA.

References

1. Kurewa NE, Mupfema MP, Munjoma MW, Chirenje MZ, Rusakaniko S, Stray Pedersen B. The burden and risk factors of Sexually Transmitted Infections and Reproductive Tract Infections among pregnant women in Zimbabwe. *BMC Infect Dis*. 2010;10: 127.
2. Miranda AE, Pinto VM, Gaydos CA. *Trichomonas vaginalis* infection among young pregnant women in Brazil. *Sex Transm Dis*. 2010;37(4): 223-7.
3. Sayed el-Ahi SA, el-Wakil HS, Kameel NM, Mahmoud MS. A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. *J Egypt Soc Parasitol*. 2002;32(1): 167-78.

4. Leon SR, Konda KA, Bernstein KT, Fajuelo JB, Rosasco AM, Caceres CF, Coates TI, Klausner JD. *Trichomonas vaginalis* infection and associated risk factors in a socially-marginalized female population in coastal Peru. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2009; 2009:1-6.
5. Stoner KA, Rabe LK, Mey LA, Hitter SL. Survival of *Trichomonas vaginalis* in wet preparation and on wet mount. *Sex Transm Infect*. 2013;89(6): 485-8.
6. Lemos PAP. Ocorrência da infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e negativas atendidas em hospitais de referência em Goiânia, Goiás, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2009;38(1):71-72.
7. Lemos PAP, Amaral WN. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in women with precancerous and indeterminate lesions at cytology. *W. J. Res. Rev*. 2016;2(3):6-9.
8. Sarafana S, Coelho R, Neves A, Trindade JC. Aspectos da imunologia da gravidez. *Act Med Port*. 2007;20: 355-358.
9. Klebanoff MA, Carey C, Hauth JC, Hillier SL, Nugent RP, Thom EA, Ernest JM et al. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *N Engl J Med*. 2001;345(7): 487-93.
10. Declaration of Helsinki, 1964. Recommendations guiding medical doctors in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, 1964 and As Revised by the 35th WMA General Assembly, Venice, Italy.
11. Hardy Diagnostics. Modified Diamond's medium. [Catalogue K02]. Available at: <https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/ModDiamondsMed.htm>.
12. Kengne P, Veas F, Vidal N, Rey J-L, Cury G. *Trichomonas vaginalis*: repeated. *Cell Mol Biol*. 1994;40(6): 819-831.
13. Lawing LF, Hedges SR, Schwelke JR. Detection of Trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by Culture and PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2000;38(10): 35-85.
14. Khalaf AK, Kadhim KJ. Use TVK3/7 gene as a target to detect *Trichomonas vaginalis* from urine of women in Southern Iraq. *Thi-Qar Med J (TQMJ)*. 2010;4(1): 36-46.
15. Crucitti T, Dyck EV, Teke A, Abdellati S, Vuylsteke B, Buve A, Laga M. Comparison of Culture and different PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in self collected vaginal swab specimens. *Sex Transm Infect*. 2003;79:393-398.
16. Saleh AM, Abdalla HS, Satti AB, Babiner SM, Gasim GI, Adam I. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* by microscopy, latex agglutination, diamond's media, and PCR in symptomatic women, Khartoum, Sudan. *Diagn. Pathol.*. 2014;9:49.
17. Mahmoud A, Sherif NA, Abdella R, El-Gered AR, Kateb AY, Askalani AHH. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Egyptian women using culture and latex agglutination: cross-sectional study. *BMC Women's Health*. 2015;15:7.
18. Maciel GP, Tasca T, De Carli GA. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *J Bras Patol Méd. Lab*. 2004;40(3): 152-160.
19. Vianna P. Imunoregulação da gestação: rumo ao sucesso. Programa de pós graduação em genética e biologia molecular; Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Agosto/2009.
20. Wangnapi RA, Soso S, Unger HW, Sawewa C, Ome M, Umbers AJ, Ndrewei N, Siba F, Liwai S, Vallely A, Wapling J, Ryan C, Mueller I, Rogerson SJ. (2014) Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Papua New Guinea. *Sex Transm Dis* 2014; 91: 194-200.

Anexo 5

Tabela 1: Distribuição da frequência de *T. vaginalis* por faixa etária em mulheres normais, grávidas e HIV positivas em Goiânia, 2016*.

		<i>T. vaginalis</i>					
Faixa	Mulheres normais		Grávidas		HIV positivas		
Etária	+	-	+	-	+	-	
18 a	10	40	15	76	8	15	
35	(52,63%)	(47,06%)	(52,63%)	(92,68%)	(23,53%)	(21,74%)	
anos							
36 a	8	44	3	6	23	44	
55	(42,11%)	(51,76%)	(16,67%)	(7,32%)	(67,65%)	(63,77%)	
anos							
>56	0	1	0	0	3	10	
anos	(0,00%)	(1,18%)	(0,00%)	(0,00%)	(8,82%)	(14,49%)	
Total	18	85	18	82	34	69	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

*Detecção de *T. vaginalis* pela PCR padrão ouro.