

Aspects of *trichomonas vaginalis*' infection and diagnostic methods

Aspectos relacionados com a infecção por *trichomonas vaginalis* e diagnóstico laboratorial

Patricia Abreu Pinheiro de Lemos*, Marco Tulio Antonio García-Zapata**
Universidade Federal de Goiás – Faculdade de Medicina

Abstract

Trichomonas vaginalis is a flagellate protozoan which causes sexually transmitted diseases and has a higher prevalence in women from undeveloped and/or under developed countries. About one hundred and twenty cases of trichomoniasis are diagnosed in Brazil each year. The direct and indirect diagnostic methods for *Trichomonas* detection include the Wet Mount method, the culture method, the OSON rapid test, PCR, the Affirm rapid test, the Aptima assay and the ATV assay. Proteins which may harm the vaginal epithelium are in the *T. vaginalis* cytoplasmatic membrane. This may facilitate HIV virus entry in human organism dueto hemorrhagic points in the uterine cervix and may lead to cervical cancer due to the important alterations in the vaginal epithelium cells.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; Women; HIV; Cervical cancer.

INTRODUÇÃO

Os protozoários, seres unicelulares, eucariontes, cuja nomenclatura vem do grego (*proto*, primeiro, *zoon*, animal) são formas simples de vida. A possibilidade de eucariontes serem advindos da transformação evolutiva de eubactérias gram-positivas como a arqueobactéria aceita por vários autores. Célula única, os protozoários apresentam membrana, citoplasma e núcleo desempenhando funções de nutrição, respiração, reprodução, excreção e locomoção^{1,2}.

Filo Sarcomastigophora e subfilo Mastigophora, os flagelados do gênero *Trichomonas* podem variar em suas formas dependendo do local em que se encontram. Em cultura axênica, estes parasitos se apresentam em forma de pêra ou ovais, porém podem adquirir uma forma ameboide ao se aderirem a células epiteliais.³ O citoplasma (massa gelatinosa e semi fluida) se diferencia em ectoplasma e endoplasma, este último apresenta uma porção mais granulosa e fluida, contém vacúolos, reservas alimentares e produtos metabólicos. Costamagna e Figueroa (2001) constataram a elevada quan-

tidade de glicogênio e, através da microscopia eletrônica, demonstraram a existência de fenômenos de micropinocitose associados com vesículas apresentando um mecanismo habitual de endo e exocitose seletiva e também a freqüente fagocitose de partículas maiores. Aparelho de Golgi é encontrado nos protozoários com suas membranas paralelas e suas vesículas desempenhando a secreção e a absorção^{4,5}.

Os protozoários do gênero *Trichomonas* são anaeróbios facultativos, medem cerca de 10 µm de comprimento por 7 µm de largura³, apresentam-se como uma célula polimorfa (trofozoíto) tanto no hospedeiro natural quanto em meios de cultura⁶. Um bastonete rígido percorre seus corpos, termina em uma extremidade livre e é constituído pela justaposição de microtúbulos (citoesqueleto) que não apresenta afinidade a corantes (Figura 1). Para a locomoção apresentam quatro flagelos na parte anterior (canal periflagelar) que se dirigem para frente, uma membrana ondulante voltada para trás que emerge fora do canal juntamente com a costa ou rede hexagonal contendo estrias transversais (Figura 2)^{6,7}. O núcleo, estrutura globular situada no endoplasma, apresenta nos Mastigophora vesículas com cromatina em grânulos pequenos ou finos distribuídos no interior.

*M.D.

**MD/PhD

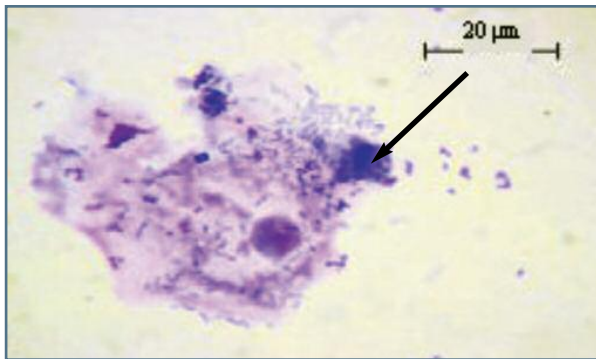


FIGURA 1. *T. vaginalis* em preparação corada pelo Giemsa. (Núcleo vesicular) (Lemos *et al.*, 2009)

A forma evolutiva de *T. vaginalis*, conhecida, era unicamente a trofozoítica. No entanto recentemente Afzan e Suresh (2012) observaram a invaginação dos flagelos no citoplasma de *T. vaginalis* dando origem à forma pseudocística deste que provavelmente são as formas que ficam preservadas no meio ambiente e que podem ser transmitidas através de fômites (Figura 3)⁸.

ASPECTOS HISTÓRICOS

Descoberta e prevalência

Alfred Donn encontrou o flagelado em 1836, denominando-o *Trichomonas* por pensar sê-lo coberto de cabelos (grego *thrix*, cabelo)⁹ e em 1837 publicou um pequeno tratado com características microscópicas do parasito. Nesta época, em Paris, Donn se deparou com as fotografias de Daguerre, colaborou com o físico Foucault e obteve a primeira fotomicrografia da espécie¹⁰.

Em 1885 Koelliker e Scanzoni, citado por Pessôa & Martins (1982) encontraram *T. vaginalis* em cerca de 10% da secreção de mulheres grávidas. O parasito foi considerado um comensal até meados de 1950 quando foi esclarecido o seu papel de agente patogênico causador de infecção sexualmente transmitida^{11,12}.

No estudo feito por Wilson *et al.* (1996) *T. vaginalis* esteve presente em 23,4% das secreções de gestantes contra 17,7% nas não-grávidas¹³. Panaretto *et al.* (2006) encontraram o parasito em 7,2% de gestantes aborígenes no norte da Austrália e Rompalo *et al.* (2001), estudando uma população de 793 mulheres nos Estados Unidos, encontraram uma prevalência de 6,4%¹³⁻¹⁵. A presença da infecção por *T. vaginalis* foi detectada em 7.349 mulheres (7,13%) em uma pesquisa retrospectiva que envolveu 206.036 mulheres

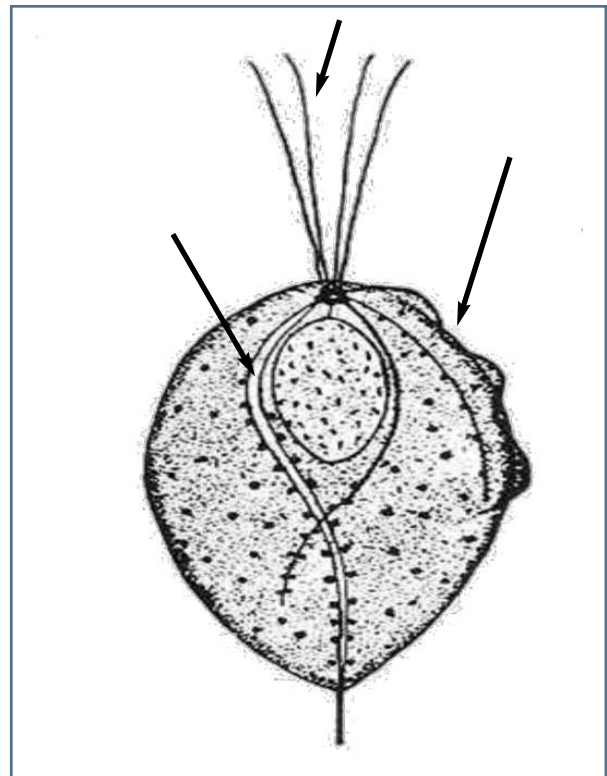


FIGURA 2. Desenho esquemático de *T. vaginalis*. (4 flagelos), (Membrana ondulante), (Axóstilo)

analisadas pela citologia de Papanicolaou em um centro de referência da mulher no estado do Sergipe, cidade de Aracaju (Brasil) entre os anos de 2004 e 2005¹⁶. No estado do Ceará (Brasil) foi analisada a distribuição dos achados citopatológicos e microbiológicos provenientes de 672 prontuários em um presídio feminino. *T. vaginalis* esteve presente em 12 %¹⁷. No estado de Goiás, cidade de Goiânia (Brasil) a prevalência deste parasito foi 8,9% em uma população de 112 mulheres apresentando padrão econômico baixo e baixa escolaridade e em uma população feminina rural no sul de Moçambique (África) *T. vaginalis* foi prevalente em 31% (78/254) porcentagem esta alta em relação a outras populações de áreas rurais na África subsaariana^{18,19}.

Um estudo realizado em um hospital estadual da Turquia envolveu 19.630 participantes. A análise diagnóstica empregada foi apenas o exame citológico de Papanicolaou que também caracterizou outros microorganismos infectantes da microbiota vaginal. *T. vaginalis* esteve presente em 143 participantes (0,7%) de um total de 1.633 esfregaços apresentando vaginose bacteriana²⁰. É possível que o programa de prevenção às

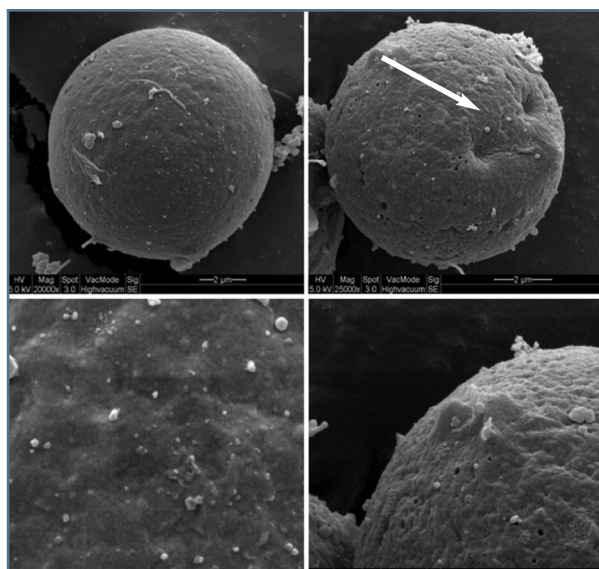


FIGURA 3. Formas pseudocísticas: invaginação flagelar em *T. vaginalis* (Afzan e Suresh, 2012)

doenças sexualmente transmitidas desenvolvido na Turquia tenha tornado a prevalência da infecção por *T. vaginalis* quase irrelevante neste local quando comparada aos índices encontrados nos estudos realizados no Brasil. Em um estudo retrospectivo envolvendo mulheres atendidas no Centro de Saúde Sexual em Sydney (Austrália) a prevalência de *T. vaginalis* também esteve baixa com a frequência de apenas 0,2% (111/27.602) demonstrando juntamente com estudos similares que *T. vaginalis* tem sido praticamente eliminado das populações urbanas neste país²¹.

Biologia e Patogenia

T. vaginalis infecta a vagina. Cresce bem em temperaturas entre 20 e 40°C e na faixa de pH compreendida entre 5 e 7,5¹¹. Murta *et al.* (2005) afirmaram que a infecção por *T. vaginalis* não é influenciada pelo pH vaginal ou pela presença de células endocervicais²². A respiração é feita pelos hidrogenossomos, semelhantes às mitocôndrias, porém, não completam o ciclo de Krebs e produzem moléculas de hidrogênio ao invés de oxigênio⁹. Os hidrogenossomos possuem a ferredoxina, enzima que converte o piruvato em acetato e não é encontrado nas mitocôndrias, fato que aproxima o parasito à anaerobiose, além disso, não dispõe da enzima que converte H₂O₂ em oxigênio e água, o que pode explicar o fato do O₂ ser nocivo às culturas³. A identificação da Hmp31 nos hidrogenossomos, homóloga ao carreador de ADP/ATP (ANT) das mitocôndrias, sus-

tenta a idéia de que ambos compartilham a mesma origem ancestral²³.

A presença do parasito na vagina está associada a um corrimento de aspecto cremoso, ácido e de cor amarelada caracterizando uma leucorréia persistente. É transmitido principalmente pela via sexual, entretanto por ser resistente ao meio externo conserva sua infeciosidade em gotículas de secreção vaginal depositadas em fômites como artigos de toalete e assentos de privada¹¹. Os sinais e sintomas da Tricomoníase vão depender das condições individuais, da agressividade e do número de parasitos⁶. Foi constatado que há um aumento na incidência da infecção por *T. vaginalis* no período do ciclo após a menstruação. Este fato é possivelmente causado pela capacidade de fagocitar hemácias a fim de adquirir o ferro da hemoglobina que, segundo López *et al.* (2000), constitui um nutriente essencial ao metabolismo deste parasito. De Carli *et al.* (1996) observaram a atividade hemolítica dos flagelados em um experimento feito com lavado de hemácias humanas do grupo sanguíneo tipo O^{24,25}.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Exame a Fresco

Em 1957, Barreto *et al.* estudaram, na microscopia de luz, a secreção vaginal instilada pelo líquido de Ringer no fundo de saco uterino¹¹.

Hoje, segundo outros autores, a secreção é somente embebida em solução salina e, imediatamente, examinada^{26,27} onde o parasito é perfeitamente visto na sua movimentação flagelar, sendo o método considerado de alta especificidade (99,8% segundo Wise *et al.*, 2000)²⁸, entretanto com uma sensibilidade menor (58 a 82%). Kissinger *et al.* (2005), estudando mulheres HIV positivas, verificaram que o exame direto feito com lavado cérvico - vaginal obteve maior sensibilidade comparado aos swabs vaginais (18,9% versus 13,3%)²⁹. A revisão de Patel *et al.* (2000) expõe a vantagem do baixo custo do método direto, considerando-o o diagnóstico mais conveniente e amplamente usado na pesquisa dos tricômonas³⁰. Clark *et al.* (2007) verificaram que pessoas com positividade no exame a fresco são aquelas que apresentam alta carga parasitária, onde os sinais da inflamação se mostram mais evidentes no exame de Papanicolaou³¹ (Quadro I).

Exame de Cultura

T. vaginalis foi obtido em uma cultura axênica por

Trussel, citado por Clark *et al.*, 2002, em 1940³². Ele é hoje isolado diretamente no meio de cultura, incorporado de antifúngicos e antibióticos bactericidas. Dois meios foram utilizados para o seu isolamento: TYM e suas modificações e TYI-S-33, o qual foi modificado da sua forma original, para *Entamoeba histolytica*, pela diminuição do pH. YI-S também comporta crescimento exuberante ao ser modificado similarmente, porém não foi testado como meio de isolamento. O termo Meio “Diamond” (anexo 1) veio substituir os: TYM, TYM modificado por Hollander, TYI-S-33 e YI-S³², constituindo o meio de cultura de escolha para o cultivo dos tricômonas, contendo soro de cavalo ou fetal bovino no seu preparo e apresenta pico de crescimento em 24-48 horas. Os meios TB1 e TB2, apesar de conterem ferro e vitamina B12 em sua composição, não incluem o soro-animal. No trabalho de Limoncu *et al.* (2007) o TB1 apresentou grande sensibilidade no isolamento do *T. vaginalis* e na manutenção de culturas em laboratório³³. Mirhaghani & Warton (1998) obtiveram os parasitos a partir do “Oxoid médium” (anexo 2) sem a presença de ágar, porém suplementado com 5% de soro de cavalo inativado alcançando, também, um crescimento em até 48 horas³⁴. Um produto comercial denominado In Pouch TV tem sido relatado como apresentando resultados comparáveis aos demais meios, além da vantagem de vir pronto e com longa data de validade²⁶. A cultura permanece o padrão ouro por apresentar elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, por ser simples de interpretar e requerer somente 300 a 500 tricomonas/ml de inóculo

para iniciar o tratamento⁶. Mabey *et al.* (2006) afirmam que a maioria dos tubos de cultura estarão positivos em 48 horas, porém deverão ser mantidos por 7 a 10 dias antes de serem descartados³⁵.

O meio de Diamond produz o máximo crescimento dos parasitos *in vitro*³⁰. Sakru *et al.* (2005), utilizando o meio de Diamond, pesquisaram 93 mulheres, das quais 3 positivas para *T. vaginalis*. Através do repique a cada 48 horas encontraram outras 5 positivas, alertando para a importância deste procedimento nos casos de baixas cargas parasitárias³⁶. A revisão de Patel *et al.* (2000) mostrou que os meios de Diamond e CPLM (anexos 1 e 3) são os mais apurados, com sensibilidades maiores que 95%³. (Quadro I).

Exame citológico de Papanicolaou

A citologia oncoparasitária iniciou-se a partir dos experimentos do médico George Papanicolaou, que conduziu os experimentos de Stockard e formulou a teoria de que todas as fêmeas de espécies superiores têm uma descarga vaginal periódica, base dos seus experimentos posteriores. Tiemman (1913), citado por Spriggs (1977), examinou as amostras vaginais dos roedores e descobriu nelas diferentes padrões e sequências citológicas que o incitou a realizar a primeira citologia exfoliativa, corada com os corantes que levariam seu nome²⁷. Os padrões citológicos que Papanicolaou detectou foram imediatamente associados com as fases do ciclo ovariano e menstrual, que foram reforçados com os trabalhos de Stockard (1917) revelando a existência de um ciclo estrógeno, por Allen & Doisy

QUADRO I. PRINCÍPIO, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES PARA O DIAGNÓSTICO DE *T. VAGINALIS*

Teste Diagnóstico	Princípio	Sensibilidade	Especificidade
Exame a Fresco	Direto sob Lâmina-lamínula	70	100
Cultura	Swab Cérvico-vaginal em meio líquido	95	100
Citologia de Papanicolaou	Esfregaço cérvico-vaginal corado pelo método de Papanicolaou	61	97
Teste Rápido OSON	Imunocromatografia	97	99
Imunofluorescência Direta	Reação antígeno-anticorpo marcado com fluoresceína	85	99
PCR	Amplificação de DNA	95	98
Affirm Teste Rápido	Teste de Hibridização DNA e rRNA	63	99
Ensaio ATV	Amplificação do gene 16srRNA	100	98
Ensaio Aptima	Amplificação de ácido nucleico totalmente automatizada (TMA) Gene 18rRNA	100	99

Os dados são apresentados em porcentagem (95% CI).

Os valores na tabela são advindos de artigos de alto padrão relacionados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Biblioteca Virtual de Saúde (Bireme).

(1923), além da influência do ciclo sexual na citologia exfoliativa (George, 1933, *situ* em Felipe, 2002-2003 e Spriggs, 1977)^{37,27}. A detecção de *T. vaginalis* pelo exame de Papanicolaou, apresenta valores de sensibilidade variando entre 51 e 63%, e a especificidade permanece em torno de 97% segundo Wiese *et al.* (2000)²⁸ (Quadro I).

Lara-Torre & Pinkerton (2003) verificaram que pacientes apresentando inflamação nos esfregaços de base líquida foram mais predispostos a positividade de *T. vaginalis* (50% versus 13%, $p < .001$). Esfregaços costumam exibir sinais inflamatórios³⁸. Gonçalves *et al.* (1999) apontaram, na citologia oncoparasitária, as principais alterações inflamatórias relacionadas a *T. vaginalis*: halos perinucleares com frequência de 53%, núcleos aumentados (fase aguda) com 35% e hiperqueratose com 18%, além da pseudoeosinofilia (fase crônica) com 64%; Perda de borda citoplasmática e alterações nucleares também foram observadas. Fonseca, 1975 descreveu as características teciduais após a infecção pelo parasito, sendo os halos presentes ao redor do núcleo que se cora mais suavemente que o restante do citoplasma, o apagamento das bordas citoplasmáticas: imprecisas, mal delimitadas e em grupos celulares^{40,39}. Segundo Koss (1992) a infecção pelo parasito causa também marcante eosinofilia nas células escamosas, citólise excessiva e até a inversão do padrão do epitélio sugerindo um aumento da atividade estrogênica devido ao aumento da descamação celular⁴¹.

Reações antígeno-anticorpo

A infecção por *T. vaginalis* pode ser detectada em amostras sanguíneas através das reações antígeno-anticorpo. Considerando um antígeno como toda partícula capaz de iniciar uma resposta imune a qual começa com o reconhecimento pelos linfócitos e acumula com a produção de um anticorpo específico, as técnicas para a pesquisa de anticorpos têm sido testadas, no entanto ao serem comparadas às técnicas diretas não apresentam boa sensibilidade⁴².

O teste de imunocromatografia para *Trichomonas* constitui um teste rápido que se baseia na reação antígeno-anticorpo para a pesquisa do antígeno que pode estar representado por proteínas deste parasito. O swab cérvico-vaginal é solubilizado com o tampão do kit OSON e inserido na membrana do teste. A mistura irá migrar e caso os tricômonas estejam presentes será formado um complexo do antígeno com o anticorpo conjugado com partículas corantes (azul). Este complexo

será então coberto por outro anticorpo anti-trichomonas revestido na membrana de nitrocelulose. A aparência de uma linha azul visível contrastando com a do controle negativo (vermelho) irá indicar a positividade do resultado. Um estudo envolvendo 258 mulheres comparou as técnicas do exame direto a fresco, exame direto corado, a cultura em meio Diamond, a cultura InPouch e o teste rápido OSON. O teste rápido apresentou 97 casos positivos perdendo apenas o método da cultura em meio Diamond com 99 casos e concluindo ser ele um teste eficaz para a detecção de *T. vaginalis*⁴³ (Quadro I).

O método *western blot*, próprio para a detecção de anticorpos, considerado um teste de grande especificidade, foi utilizado no diagnóstico de *T. vaginalis* no trabalho de Yap *et al.* (1995) obtendo alta taxa de positividade em mulheres apresentando câncer cervical invasivo. Este teste tem como princípio a utilização de um antígeno específico (isolados de *T. vaginalis*) em forma de um homogenato. Esta técnica usa eletroforese em gel para separar proteínas desnaturadas por massa⁴⁴. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, onde foram usados como sonda anticorpos específicos à proteína. Como um resultado, os pesquisadores podem examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos.

Métodos Moleculares

A reação em cadeia da polimerase apesar de não ser considerada padrão ouro para o diagnóstico de *T. vaginalis* (a Cultura é "gold standard"), ela tem se tornado importante à medida que as técnicas moleculares se aprimoram e avançam na elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores⁴⁵. O método da PCR apresenta a vantagem de avaliar outro tipo de amostra, além do swab cérvico-vaginal, que é a amostra urinária. No entanto Schwebke *et al.* (2011) detectou (por PCR) menor índice de positividade nas amostras de urina em relação à detecção em amostras de swabs cérvico-vaginais, concluindo que este último tipo de amostra deve ser preferido para a avaliação da ocorrência desta infecção em mulheres⁴⁶. Na revisão de Patel *et al.* (2000) a PCR obteve sensibilidade de 95% e especificidade de 98%³⁰ (Quadro I).

O ensaio Aptima para *T. vaginalis* é um teste totalmente automatizado que amplifica o ácido nucleico utilizando o método da captura, a amplificação mediada (TMA), a hibridização por quimioluminescência e o sistema automatizado "Tigris DST" no seu

princípio metodológico para a caracterização da região 18s rRNA de *T. vaginalis*. Este método tem apresentado grande sensibilidade e especificidade (100% e 99%)⁴⁶ (Quadro I).

O ensaio Affirm constitui um teste rápido de hibridização que pode ser usado na automação para a detecção do DNA ou RNA ribossômico de *T. vaginalis*. No trabalho de Andrea e Chapin (2011) o teste Affirm obteve sensibilidade baixa em relação aos outros métodos moleculares (63,4%), porém uma especificidade de 99,9%⁴⁷. O ensaio ATV (Apta Combo 2), utilizado para a detecção da região 16S rRNA de *T. vaginalis* obteve a sensibilidade de 100%, significativamente maior em relação ao ensaio Affirm, no estudo de Andrea e Chapin (2011)⁴⁷ (Quadro I).

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

T. vaginalis acomete 170 a 200 milhões de pessoas em todo o mundo²⁸, no entanto existem poucos trabalhos publicados a respeito da sua prevalência (Sorvillo *et al.*, 2001)⁴⁸. A organização mundial de saúde apontou, no ano de 2005, 153 milhões de casos da infecção por *T. vaginalis*. No Brasil, em 2011, foram registrados 118.721 casos da infecção, e em 2012 houve uma redução para aproximadamente 88.000 mulheres infectadas por *T. vaginalis*. Entre os anos de 2006 a 2012 foram registrados 21.020 casos de tricomoníase no estado de Goiás e na capital, Goiânia, o total neste mesmo período foi de 4.568⁴⁹⁻⁵¹.

O estudo realizado por Magnus *et al.* (2003) relatou maior prevalência de *T. vaginalis* dentre as doenças sexualmente transmissíveis (DST) relacionadas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV): 13,1% *T. vaginalis*, 5,3% *C. trachomatis* e 4,9% *N. gonorrhoeae*. Chesson *et al.* (2004) estimaram que 6,2% das infecções por HIV são atribuíveis à infecção por *T. vaginalis*^{52,53}. Na região sudeste da Nigéria a ocorrência de *T. vaginalis* foi 37,8% em soropositivas⁵⁴ e em uma cidade localizada na região central do Brasil a presença do parasito foi encontrada em uma população de 125 mulheres HIV positivas⁵⁵.

De 1980 a junho de 2011 foram notificados 608.230 casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) no Brasil. O estado de Goiás apontou um crescimento de 32,1% entre os anos de 1998 (10,6/100.000 habitantes) e 2010 (14,0/100.000 habitantes) e em Goiânia, capital do estado, a incidência esteve em 22,0/100.000 habitantes ao final do ano de

2010. Neste mesmo ano houve a notificação de 5.666 casos de HIV em gestantes no Brasil com taxa de detecção de 2 casos HIV – positivos por cada 1000 nascidos vivos⁵⁶.

Estudos relacionando a presença de lesões cervicais e a presença de agentes causadores de infecções sexualmente transmitidas (ISF) incluindo a infecção por *T. vaginalis*, têm sido empreendidos uma vez que alterações citológicas em esfregaços cervicais podem desencadear processos pré-cancerígenos ou cancerígenos¹⁹. O risco estimado de câncer do colo do útero no Brasil é de aproximadamente 17 casos a cada 100.000 habitantes. Na região centro-oeste é de 28 a cada 100.000 sendo o terceiro tipo mais comum entre as mulheres. A quantidade de exames anatomopatológicos anormais (do colo do útero) no Brasil foi 8.253 no período de 2006 a 2011⁵¹.

TRANSMISSÃO VERTICAL DE *T. VAGINALIS*

T. vaginalis é transmitido durante o parto normal⁵⁷. O estudo de Hoffman *et al.* (2003) evidenciou a presença de *Trichomonas* na urina de um recém-nascido do sexo feminino no seu 15º dia de vida⁵⁸. Um estudo feito na Polônia (citado em Hoffman *et al.*, 2003) descreveu 7,2% de casos de crianças menores que 3 semanas que desenvolveram corrimento vaginal e sugeriu que o efeito do estrogênio materno sobre o epitélio vaginal possa predispor neonatos do sexo feminino a infecção por *T. vaginalis*⁵⁸. Redman *et al.* (2003) aponta o flagelado como causador de recém-nascidos de peso baixo e pequenos para a idade gestacional e como desencadeador de transtornos no bebê, tais como, secreções nasais supurativas e aflição respiratória⁵⁷. No trabalho realizado por Temesvári *et al.* (2004), o parasito foi encontrado em aspirados traqueais de dois recém-nascidos prematuros e um estudo de Sutton *et al.* (1999) verificou que de 634 mulheres HIV positivas, 20,5% apresentaram parto prematuro, 18,9% associado ao peso baixo do bebê no nascimento e 24% recém-nascidos pequenos para a idade gestacional cujas mães possuíam *T. vaginalis* em suas secreções⁵⁹⁻⁶¹.

O trabalho de Simhan *et al.*, 2007 relaciona a Tricomoníase com a ativação dos neutrófilos associada à presença de defensinas e interleucina 8 e afirma que há um aumento das defensinas no líquido amniótico na presença desta infecção subclínica intra-uterina, o que propicia a ruptura prematura das membranas placentárias⁶¹.

ASPECTOS RELACIONADOS A IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

T. vaginalis é considerado um fator importante que favorece a aquisição da Síndrome da Imunodeficiência Humana⁶², visto que é comprovado que a infecção promove maceração e erosão ao colo uterino segundo a intensidade da agressão inflamatória facilitando a porta de entrada para o vírus nos indivíduos HIV negativos e expandindo a porta de saída nos HIV positivos, pois provoca acumulação local de células infectadas por HIV que são susceptíveis a linfócitos e macrófagos^{62,63}. Outro fator que favorece a transmissão é a capacidade de *T. vaginalis* degradar a secreção leucocitária inibidora da protease que é um produto capaz de bloquear a invasão do vírus à célula³⁴. Segundo o trabalho de Guenther *et al.* (2005), *T. vaginalis* pode também ativar essas células imunes, aumentando a replicação do vírus devido ao aumento na produção da citocina TNF- α na presença do parasito⁶⁴. O trabalho de Rén-dón-Maldonado *et al.* (2003) descreveu a capacidade de *T. vaginalis* englobar linfócitos infectados pelo HIV⁶⁵. O estudo de Kreiss *et al.* (1994) apontou a Tricomoniase como desencadeadora de cervicite (inflamação cervical) e associou-a significativamente à presença do DNA-HIV cervical⁶⁶. Este mesmo trabalho também associou o DNA-HIV cervical à maior estimulação progesterônica evidenciada na avaliação citológica de células ectocervicais pelo valor de maturação ≤ 85 ⁶⁶. No trabalho de Magnus *et al.* (2003) *T. vaginalis* não foi referido como agente oportunista, já que não houve associação da infecção com a contagem de células CD4⁵².

ASPECTOS RELACIONADOS AS LESÕES CERVICAIS

O mecanismo no qual *T. vaginalis* causa dano à célula ainda não está bem definido, porém pesquisaram a presença de componentes glicoconjugados na membrana externa do parasito marcando-os citoquimicamente com partículas de ouro e chegando a conclusão de que os mesmos favorecem a aderência do parasito à célula humana conferindo-lhe a sua patogenicidade³⁴. A expressão da proteína AP65 presente na membrana celular de *T. vaginalis* está envolvida na adesão do mesmo às células humanas⁶⁷. Outras proteínas como a AP33 e a α -actina também expressaram intensidade durante o contato do parasito com a célula de-

monstrando que há um aumento da transcrição de genes e há translação correspondente de transcritos a proteínas⁶⁸.

Madero da Costa *et al.* (2005) verificaram que a cepa JT isolada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Rio de Janeiro, Brasil) e a cepa T016 isolada no Centro de Saúde da Universidade do Texas (EUA) são ambas capazes e interagir com células do adenocarcinoma (Caco-2 cells) exibindo intensa movimentação flagelar em meios enriquecidos com ferro⁶⁹. Singn *et al.* (2008) revelaram o efeito da resposta inflamatória humana aos componentes da camada lipofosfoliglicano de *T. vaginalis*. Estes mesmos autores utilizaram a espectrofotometria de massa e analisaram os açúcares liberados das enzimas (glicans) em isolados UR1, obtidos em meio Diamond e advindos de pacientes apresentando sinais clínicos da infecção por *T. vaginalis*⁶⁹.

Cepas de *T. vaginalis* advindas de mulheres portadoras de Neoplasia Cervical (NC) foram comparadas com cepas deste mesmo parasito em mulheres não portadoras desta neoplasia (NNC) apresentando formas distintas de crescimento em meio Hollander. Os isolados de *T. vaginalis* em NC mostraram significativamente maior número de massas cromatínicas, hidrogenossomos e vacúolos em relação aos isolados em NNC⁷².

CONCLUSÃO

Trichomonas vaginalis, agente causador da DST não viral mais comum no mundo apresenta estrutura semelhante à de uma célula humana à exceção da incompletude do ciclo do ácido cítrico, que ocorre no interior de uma de suas principais organelas citoplasmáticas: a mitocôndria. Nos protozoários do gênero *Trichomonas* as mitocôndrias estão substituídas por hidrogenossomos e ao invés de terminarem produzindo O₂ apresentam como produto final o hidrogênio (H). Esta quebra no ciclo do ácido cítrico é observada nos seres anaeróbios. Por este motivo *T. vaginalis* é descrito como anaeróbio facultativo. Há em torno de 100.000 infectados por este parasito no Brasil.

Os métodos diagnósticos diretos (pesquisa de antígenos) são os mais recomendáveis para a detecção de *T. vaginalis*. Tendo em vista que a manifestação da infecção pode ser dependente do número de parasitos, o organismo hospedeiro pode requerer maior tempo na produção dos anticorpos específicos. A cultura deste

parasito é considerada o padrão ouro de seu diagnóstico e ela requer a adição de ferro, um componente essencial para o metabolismo de *T. vaginalis*.

À medida que as técnicas moleculares se aprimoram na elaboração de oligonucleotídeos iniciadores específicos para as variadas porções de *T. vaginalis*, uma maior utilização por parte dos pesquisadores começa a ocorrer e a biologia molecular ganha espaço na ampliação do conhecimento e do diagnóstico deste parasito.

O estudo de *T. vaginalis* tem se tornado cada vez mais importante na medida em que ele se apresenta como um facilitador da entrada do vírus HIV no organismo humano e, além disto, existe uma suposta relação deste com o câncer cervical. Proteínas da membrana citoplasmática de *T. vaginalis* têm sido pesquisadas assim como os genes que podem ser transmitidos lateralmente e o possível dano que este parasito pode causar à célula humana através do seu contato com a mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koonin EV. The two empires and three domains of life in the postgenomic age. *Nature Evolution*, 2010, 3(9): 27.
- Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52: 297-354.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Review*, 11(2): 300-17, 1998.
- Costamagna SR e Figueroa MP. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitology al día*, 2001, 25: 3-4.
- Pfeffer SR. Constructing a Golgi complex. *Journal of Cell Biology*, 2001, 155: 873-5.
- Maciel GP, Tasca T, De Carli GA. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*, 2004, 40(3): 152-160.
- Rey L. In: *Parasitologia* (3ª ed.) ed. Guanabara Koogan, 2001, Rio de Janeiro.
- Afzan MY, Suresh K. Phenotypic (variant) forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from Cervical Neoplasia patients. *Experimental Parasitology*, 2012, 131: 267-273.
- Schmidt GDR, Larry S. *Foundations of Parasitology*, 1996, EUA, Wm. C. Brown Publishers.
- Campbell WC. A historic photomicrograph of a parasite (*Trichomonas vaginalis*). *Trends in Parasitology*, 2001, 17(10): 499-500.
- Pessôa SB, Martins, AV. In: *Parasitologia Médica* (11ª ed.) Ed. Guanabara Koogan, 1982, Rio de Janeiro.
- Swygard H, Seña AC, Hobbs MM, Cohen MS. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sexual Transmitted Infection*, 2004, 80(2): 91-5.
- Wilson TEBM, Howard MD, Mccalla SMD; Jaccard J. The relationship between pregnancy and sexual risk taking. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1996, 174(3): 1033-1036.
- Panaretto KSMH, Mitchell MR, Larkins SL, Manassis V, Buettner PG, Watson D. Prevalence of sexually transmitted infectious in pregnant urban aboriginal and Torres Strait Islander women in northern Australia. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2006, 46: 217-224.
- Rompalo AM, Gaydos C, Tennant M, Crotchfelt K, Madico G, Quinn C, Daniel R, Shah KV, Gaydos JC, Mckee JR, Kelly T. Evaluation of a Single Intra-vaginal Swab to Detect Multiple Sexually Transmitted Infections in Active-Duty Military Women. *Clinical Infections Diseases*, 2001, 33: 1455-61.
- Almeida MS, Argôlo DS, Júnior JSA, Pinheiro MS. Tricomoníase: prevalência no gênero feminino em Sergipe no biênio 2004-2005. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2010, 5(1): 1417-1421.
- Lessa PRA, Ribeiro SG, Lima DJM, Nicolau AIO, Damasceno AKC, Pinheiro AKB. Presença de lesões intraepiteliais de alto grau entre mulheres privadas de liberdade: estudo documental. *Revista Latino Americana de Enfermagem*, 2012, 20(2): [9 telas].
- Lemos PAP, García-Zapata MTA. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in HIV - positive and negative patients in referral hospitals in Goiania, Goiás, Brazil. *International Journal of Tropical Medicine*, 2010, 5(2): 24-27.
- Menéndez C, Castellsagué X, Renom M, Sacarl J, Quintó L, Lloveras B, Klaustermeier J, Kornegay JR, Sigauque B, Bosh FX, Alonso PL. Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women from a rural area of Southern Mozambique. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2010, 2010: 1-9.
- Karabulut A, Alan T, Ekiz MA, Iritas A, Kensen Z, Yashi S. Evaluation of cervical screening results in a population at normal risk. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2010, 110: 40-42.
- Uddin RNN, Ryder N, McNulty AM, Wray L, Donovan B. *Trichomonas vaginalis* infection among in a low prevalence setting. *Sexual Health*, 2011, 8: 65-68.
- Murta EFC, Silva AO, Silva EAC, Adad SJ. Frequency of infectious agents for vaginitis in non and hysterectomized women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2005, 273: 152-156.
- Chose ONC, Gerbod D, Brenner C, Viscogliosi E, Roseto A. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the mitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. *El-servier Science (USA)*, 2002, 276: 32-39.
- López LBB, Melo MB, López, JO, Arroyo R, Silva Filho, FC. Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision making process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*; 72(2): 173-86. 2000.
- De Carli GA, Brasseur P, Silva AW, Rott M. Hemolytic Activity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1996, 91(1): 107-110.
- Ohlemeyer CL, Hornberger LL, Lynch DA, Swierkosz EM. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in adolescent females: in pouch TV culture versus wet-mount microscopy. *Journal of Adolescent Health*, 1998, 22(3): 205-8.
- Spriggs AI. History of Cytodiagnosis. *Journal of Clinical Pathology*, 1977, 30: 1091-1102.
- Wiese W, Patel SR, Patel SC, Ohl CA, Estrada CA. A meta-analysis of the Papanicolaou smear and wet mount for the

diagnosis of vaginal Trichomoniasis. The American Journal of Medicine, 2000, 108(4): 301-308.

29. Kissinger PJ, Dumestre J, Clark RA, Wenthold L, Mohammed H, Hagensee ME, Martin DH. Vaginal swabs versus lavage for detection of Trichomonas vaginalis and bacterial vaginosis among HIV - positive women. Sexually Transmitted Diseases, 2005, 32(4): 227-230.

30. Patel SR, Wiese W, Patel SC, Ohl CA, Byrd JC, Estrada CA. Systematic review of diagnostic tests for vaginal Trichomoniasis. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 2000, 8: 248-257.

31. Clark RA, Theall K, Kissinger PJ. Reply to: Microscopy and culture for Trichomonas vaginalis: are both required? International Journal of STD & AIDS, 2007, 18: 220.

32. Clark CGD, Louis S. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(3): 329-341.

33. Limoncu ME, Kilimcio lu AA, Kurt O, Östan I, Özkütük N, Özbilgin A. Two novel serum free media for the culture of Trichomonas vaginalis. Parasitology Research, 2007, 100: 599-602.

34. Mirhaghani A, Warton A. Involvement of Trichomonas vaginalis surface -associated glycoconjugates in the parasite / target cell interaction. A quantitative electron microscopy study. Parasitology Research, 1998, 84: 374-381.

35. Mabey DA, Adu-Sarkodie Y. Trichomonas vaginalis infection. Sexually Transmitted Infection, 2006, 82(Suppl IV): Iv26-Iv27.

36. Sakru N, Toz SO, Yetkin AC, Akinci P, Kirca. Increased sensitivity of Trichomonas vaginalis isolation from vaginal secretions by subsequent blind passage of preliminary negative cultures. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2005, 52: 75-76.

37. Felipe OG, Dueñas. Historia de George Papanicolaou y de latinción que leva su nombre. © Elizabeth Castro Regla, de la serie Mutaciones, 2002-2003, 19-23.

38. Lara-Torre E, Pinkerton J. Accuracy of detection of Trichomonas vaginalis organisms on a liquid - based Papanicolaou smear. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2003, 188(2): 354-356.

39. Fonseca NM. Atlas de Citopatologia Ginecológica. Rio de Janeiro: Atheneu, 1975.

40. Gonçalves MAG. Associação *T. vaginalis* e *G. vaginalis*: variações nos efeitos epiteliais. Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmitidas, 1999, 11(1): 4-10.

41. Koss LG e Melamed MR. Diagnostic Cytology and its Cytology and its Histopathologic Bases (5th ed.), 2006. p., Rev. ed. Of: Koss LG, Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases (4th ed.), 1992.

42. Henry JB. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods, (20th edition), 2001.

43. Hegazy MM, El-Tantaway NL, Soliman MM, El-Sadek ES, El-Nagar HS. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnostic of Trichomonas vaginalis. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 2012, 74(1): 49-53.

44. Yap EH, Chan TW, Thong TW, Ng GC, Ho LC, Singh M. Serum antibodies to Trichomonas vaginalis in cervical invasive cancer patients. Genitourinary Medicine, 1995, 71: 402-404.

45. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cut cutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAS: A tool to design target-specific pri-

mers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 2012, 13: 134.

46. Schwebke JP, Hobbs MM, Taylor SN, Sena AC, Catania MG, Weinbaum BS, Johnson AD, Getman DK, Gaydos CA. Molecular testing for Trichomonas vaginalis in women: Results from a prospective US Clinical Trial. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49 (12): 4106-4111.

47. Andrea SB, Chapin KC. Aptima Trichomonas vaginalis transcription-mediated amplification assay and BD Affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49 (3): 866-869.

48. Sorvillo FSL, Kerndt P, Ash L. Trichomonas vaginalis, HIV, and African-Americans. Emerging Infectious Diseases, 2001, 7(6).

49. Gülmezoglu AM, Azhar M. Intervention for Trichomoniasis. Cochrane Database Systematic Review, 2011, 5: CD000220.

50. WHO In: Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections: Chlamydia, Neisseria gonorrhoeae, Syphilis and Trichomonas vaginalis. Geneva: WHO, 2011.

51. Datasus - SISCOLO / SISNAMA - Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero e Sistema de Informação do Câncer de Mama - em www.datasus.gov.br, 2012.

52. Magnus M, Clark R, Myers L, Farley T, Kissinger PJ. Trichomonas vaginalis among HIV - I women: are immune statuses or protease inhibitor use associated with subsequent *T. vaginalis* positivity? Sexually Transmitted Infection, 2003, 30(11): 839-843.

53. Chesson HW, Blandford JM, Pinkerton SD. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to Trichomoniasis in the United States. Sexually Transmitted Diseases, 2004, 31(9): 574-551.

54. Nweeze EL, Mounek GN. Trichomonas vaginalis in HIV/AIDS subjects in Nigeria. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2011, 282-288.

55. Lemos PAP, García-Zapata MTA, Guimaraes NMC, Moraes RG. Comparison of methods for the identification of Trichomonas vaginalis in HIV - positive and negative women. International Journal of Tropical Medicine, 2009, 4(2): 76-81.

56. Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico - AIDS/DST - situ em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50652/boletim_aids_2011_final_m_p_df_26659.pdf, 2011.

57. Redman RJD. Newborn with suppurative nasal discharge. Pediatric Infectious Diseases Journal, 2003, 22(10): 933, 937-938.

58. Hoffman DJBG, Wirth FH, Gebert BS, Bailey CL, Anday EK. Infecção do trato urinário com Trichomonas vaginalis no RN prematuro e o desenvolvimento de doença pulmonar crônica. Jornal de Perinatologia, 2003, 23: 59-61.

59. Temesvári PKA. Newborn with suppurative nasal discharge and respiratory distress. Pediatric Infectious Diseases Journal, 2004, 23(3): 282-283.

60. Sutton MY, Sternberg M, Nsuami M, Behets F, Nelson AM, St louis ME. Trichomoniasis in pregnant human virus-infected and Human Immunodeficiency Virus-uninfected congolese women: prevalence, riskfactors, and association with low birth weight. American Journal of Obstetric Gynecology, 1999, 181(3):65-62.

61. Simhan HNA, Brenna L, Krohn MA, Heine P, Tejada BM, Landers DU, Hillier SL. Host immune consequences of asymptomatic

matic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2007, 196(59):1-59 e 5.

62. Lawing LF, Hedges SR, Schwebke JR. Detection of Trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(10): 3585-3588.

63. Buvé A, Weiss HA, Laga M, Van Dyck E, Musonda R, Zekeng L, Kahindo M, Anagonou S, Morison L, Robinson NJ, Hayes RJ. The epidemiology of Trichomoniasis in women in four African cities. AIDS, 2001, 15(4): S89-S96.

64. Guenther PC, Secor WE, Dezzutti CS. *Trichomonas vaginalis* induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. Infectious Immunology, 2005, 73(7): 4155-4160.

65. Rendón-maldonado J, Espinosa-Castellano M, Soler C, Torres JV, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: In vitro Attachment and Internalization of HIV-1 and HIV-1-Infected Lymphocytes. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2003, 50(1): 43-48.

66. Kreiss, JWF, Dennis M, Hensel M, Emony W, Plummer F, Ndinya-azhola J, Roberts PL, Hoskyn J, Hillier S, Kiviat N, Holmes KK. Association between cervical inflammation and cervical shedding of Human Immunodeficiency Virus DNA. The Journal of Infectious Diseases, 1994, 170: 1597-1560.

67. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete JF. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. Cellular Microbiology, 2007, 9(11): 2586-2597.

68. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete JF. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. Infection and Immunity, 2005, 73(10): 6472-6477.

69. Madero RF, Souza W, Benchimol M, Alderete JF, Morgado-Díaz JÁ. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. Cell Research, 2005, 15(9): 704-716.

70. Sign B, Hayes GR, Lucas JJ, Sommer U, Viseux N, Mirgorodskaya E, Trifonova RT, Sassi RRS, Cosello CE, Fichorova RN. Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. Glycoconjugate Journal, 2009, 26: 3-17.

71. Afzan MY, Suresh K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. Parasitology Research, 2012, 111: 371-381.

ANEXO I

Meio de Diamond

Tryptone	10,0 g (DIFCO)
Extrato de levedo	5,0 g (BIOBRÁS)
Maltose	2,5 g (MERK)
L-Cisteína, cloreto	0,5 g (SYNTH)
Ácido ascórbico	0,1 g (VETEC)
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
Agar	0,25 g (ISO FAR)

- Dissolver os sais tampão (cloreto, K₂HPO₄, KH₂PO₄) em 300 ml de H₂O; H₂O destilada deionizada 450 ml
- Acrescentar e dissolver os ingredientes remanescentes na ordem apresentada, com exclusão do agar (completar o volume com H₂O – 150 ml);
- Ajustar o pH em 6,0 e adicionar o agar;
- Autoclavar todo o meio no balão (121° C – 15’);
- Antes do uso suplementar com 10% (v/v) = 50 ml de soro de cavalo ou bovino, estéril e inativado (56° C – 30’);
- Acrescentar 1000 UI/ ml de penicilina G potássica 0,75 ml;
- Acrescentar 1 mg/ ml de Sulfato de estreptomicina 0,75 ml;
- Incubar o meio 24 h a 37° C para teste de esterilidade;
- Armazenar o meio a 4° a 5° C até 10 dias.

ANEXO II

Meio Oxoid para *Trichomonas* (Feinberg & Whittington)

Liver digest	25 g
Glucose	5 g
Sodium chloride.....	6.5 g
Agar	1.0 g
Ph 6.4 +- 0.2	

- Dissolver 37,5 g em 1 litro de água destilada;
- Esterilizar autoclavando a 121°C por 15 minutos;
- Resfriar até aproximadamente 50°C;
- Inativar 80 ml de soro de cavalo, ajustar ao pH 6,0 e adicionar ao meio.

ANEXO III

Meio Base *Trichomonas* CPLM, modificado (Himedia)

Digestão péptica de tecido animal	32 g
Digestão de fígado	20 g
Maltose	1.60 g
Hidrocloreto de L-Cisteína	2.40 g
Solução de Ringer ¼ de concentração	q.s
pH Final (a 25°C)	6.0 + 0.2

- Dissolva 56 gramas em 900 ml de água destilada.
- Aqueça para dissolver o meio completamente.
- Distribua em garrafas em alíquotas de 90 ml e
- Esterilize autoclavando a 10lbs de pressão a 115°C por 10 minutos.
- Resfrie até 50° C e adicione (para 90 ml de meio):
- Solução de Estreptomicina Penicilina estéril: 1ml e Solução Nistatina estéril: 1ml;
- Mexa vigorosamente e distribua em alíquotas apropriadas com precauções estéreis.
- Solução de Penicilina: 1 x 155 unidades de penicilina + 0.1g de Estreptomicina + 10 ml de água destilada estéril;
- Solução de Nistatina: 5 x 10⁴ unidades de Nistatina + água destilada.