



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Mariana Morena de Vieira Santos Greatti

**Flora intermediária em mulheres em idade
reprodutiva: aspectos inflamatórios, atividade de
sialidases e carga bacteriana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Dra. Camila Marconi

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

**Botucatu
2014**

Mariana Morena de Vieira Santos Greatti

**Flora intermediária em mulheres em idade reprodutiva:
aspectos inflamatórios, atividade de sialidases e carga
bacteriana**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Patologia.

Orientadora: Dra. Camila Marconi

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu

2014

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus”

Aristóteles

Dedico este trabalho à minha família.

Ao meu amor, Thiago. Meu companheiro, meu amigo, meu namorado e meu marido. Sei que por muitos momentos você compreendeu todo o meu cansaço, dividiu comigo todas as minhas angústias e me confortou sempre com o seu amor. Não tenho palavras para dizer o quanto você foi importante neste projeto e o quanto você é importante na minha vida.

Te amo!

*Ao meu filho, Lucca, que veio em meio a esta
trajetória, sofreu com minhas ausências e só
me traz alegria.*

Amo você!

*Aos meus pais, Iara Maria e Luiz Alberto, que
sempre me incentivaram a buscar
conhecimento e me apoiaram
incondicionalmente durante toda a minha
caminhada acadêmica.*

Amo vocês!

*Aos meus irmãos, Ana Carolina e Rafael Luiz,
ao meu cunhado, Guilherme, à minha
cunhada, Danielle e às minhas riquezas Ana
Clara e Beatriz, mesmo tão longe me apóiam
sempre.*

Amo vocês!

*À minha cachorrinha, Dominique, que me
ama incondicionalmente e me acompanha nas
madrugadas desde o mestrado.*

Amo você!

À minha amiga e orientadora Camila, meu exemplo e minha irmã. Obrigada por toda amizade, carinho, dedicação e confiança em mim depositada. Isso significou muito!

Adoro você!

À minha amiga e também orientadora, Márcia Guimarães da Silva, obrigada pela paciência, confiança e pelos ensinamentos de vida compartilhados neste período.

Adoro você!

Agradecimentos

Dedico e agradeço a todos que estiveram presentes diretamente ou indiretamente nestes cinco anos de caminhada!

Agradeço;

Aos alunos do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Minhas queridas e corajosas companheiras de laboratório, Aline Bolpetti, Amanda Manoel Della Coletta, Bruna Ribeiro de Andrade Ramos, Ana Carolina Pereira, Carolina Sanitá Tafner Ferreira, Jossimara Polettini, Larissa Doddi Marcolino, Laura Fernandes Martin, Natália Prearo Moço, Nathália Mayumi Noda Nicolau, e ao meu querido companheiro Gabriel Vitor da Silva Pinto. Vocês estarão para sempre no meu coração!

Aos meus sócios do Instituto de Patologia de Avaré, Dr. Flávio de O. Lima e Renata Paulucci Negrão que entenderam a minha ausência e tiveram muita paciência nesse meu desafio. Obrigada!

Às funcionárias do Instituto de Patologia de Avaré, especialmente à Bruna de Lima Ribeiro Agostini e Fernanda Félix Prieto, que entenderam minhas ausências e estiveram sempre ao meu lado, me apoiando incondicionalmente. Obrigada!

À secretária do Programa de Pós Graduação em Patologia, Vânia Soller e aos funcionários da Pós Graduação da Faculdade de Medicina pela atenção de sempre!

A todos os professores do corpo docente do Curso de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que estiveram sempre presentes na minha formação acadêmica.

Aos membros da Banca do Exame Geral de Qualificação, Dra. Andrea da Rocha Tristão e Profa. Dra. Cristina Maria Garcia de Lima Parada pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para a confecção final deste trabalho.

A todos os queridos amigos da Faculdade Sudoeste Paulista, em especial a Maressa de Freitas Vieira (pela revisão de língua portuguesa!), Glenda Maris de Barros Tartaglia e Fábio Mello. Vocês acompanharam muito de perto minhas angústias, minhas dificuldades, minhas decepções e minhas alegrias neste projeto. Agradeço de coração o companheirismo!

Aos meus queridos alunos da Faculdade Sudoeste Paulista que sempre acreditaram em mim e alimentam a minha vontade de aprender a cada dia mais para poder ensiná-los. Meus filhotes queridos!

Sumário

1. Revisão da literatura.....	9
2. Referências.....	20
3. Resumo.....	27
4. Artigo científico.....	28
5. Anexos.....	52

Revisão de Literatura

Características microbiológicas do ambiente vaginal têm sido objeto de estudo de muitos pesquisadores há mais de um século. Em 1892, Albert Doderlain¹ demonstrou pela primeira vez a presença de lactobacilos no conteúdo de mulheres saudáveis e a ausência dessas espécies em mulheres apresentando endometrite pós-parto¹. Após essa descrição inicial da microbiota vaginal, diversos estudos sobre o tema foram iniciados visando à compreensão da composição bacteriana deste ambiente. Tais estudos não só descreveram as primeiras alterações que podem ocorrer na microbiota vaginal, como também puderam associá-las a algumas complicações gestacionais como parto prematuro e baixo peso ao nascimento²⁻⁵.

Inúmeros critérios de avaliação microscópica foram desenvolvidas para classificação da microbiota vaginal, sendo que todos eles se baseiam na semiquantificação microscópica dos morfotipos bacterianos encontrados e na proporção observada de lactobacilos em relação aos demais morfotipos que podem ser encontrados⁶⁻¹⁰. Dessa forma, a predominância de morfotipos compatíveis com lactobacilos neste ambiente em relação às demais espécies caracteriza uma microbiota vaginal normal^{11,12}. Muitas espécies de lactobacilos já foram descritas na microbiota humana, enquanto que no ambiente vaginal normal as principais espécies descritas são *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus*¹³⁻¹⁵. Dentre essas, as mais frequentemente identificadas em mulheres em idade reprodutiva são *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*, cuja prevalência varia de acordo com a origem da população e etnia^{16,17}.

Os lactobacilos se tornam bactérias predominantes no ambiente vaginal logo após a

menarca, quando há aumento dos níveis de estrogênio¹⁸. De fato, sob ação estrogênica, as células epiteliais vaginais aumentam suas reservas de glicogênio, que é um importante substrato para os lactobacilos que, por sua vez, liberam ácido lático como produto desse metabolismo^{19,20}. Devido à liberação de ácido lático pelos lactobacilos, há diminuição do pH vaginal que inibe a proliferação excessiva de outras bactérias anaeróbias, também encontradas nesse ambiente^{21,22}. Além disso, grande parte das linhagens de *Lactobacillus* sp. possuem capacidade de liberar peróxido de hidrogênio e bacteriocinas no ambiente vaginal, conferindo importante atividade antimicrobiana^{23,24}.

O papel protetor dos lactobacilos já foi demonstrado por diversos estudos^{25,26} e, assim, a depleção total ou parcial destes micro-organismos que ocorre concomitantemente à sua substituição por outras espécies bacterianas, anaeróbias em sua maioria²⁷, pode levar ao estabelecimento de importantes alterações na microbiota vaginal. Tais alterações podem exercer efeito deletério para a saúde reprodutiva da mulher visto que estão associadas a inúmeras complicações ginecológicas e obstétricas²⁸. As intercorrências ginecológicas associadas à alteração na microbiota vaginal incluem doença inflamatória pélvica²⁹ e as infecções pós-cirúrgicas³⁰, além do documentado risco de aquisição de doenças sexualmente transmissíveis dentre elas Síndrome da Imunodeficiência Adquirida^{31,32}, herpes genital³³, tricomoníase³⁴ e endocervicite clamidiana e gonorréia³⁵. Já mulheres grávidas com microbiota vaginal alterada apresentam maior risco de aborto espontâneo, corioamnionite, trabalho de parto pré-termo, parto pré-termo e, como consequência, baixo peso ao nascimento³⁶⁻³⁹.

A primeira descrição de uma entidade relacionada à alteração de microbiota vaginal foi realizada em 1955 por Gardner & Dukes⁴⁰. Tais autores atribuíram a denominação “vaginite não específica” a uma condição da microbiota vaginal encontrada em mulheres

com sintomas vaginais incluindo mau odor e aumento do corrimento das quais eram isoladas *Haemophilus vaginalis*, espécie bacteriana a quem foi atribuída, naquele momento, a etiologia da vaginite recém-descrita. Atualmente tal espécie bacteriana, inicialmente incluída no gênero *Haemophilus*, é denominada *Gardnerella vaginalis*⁴¹. Por algum tempo considerou-se que a *G. vaginalis* era o único agente etiológico dessa alteração de microbiota, que posteriormente, devido à ausência de infiltração leucocitária no local, passou a ser denominada vaginose bacteriana⁶.

A vaginose bacteriana é uma condição que acomete cerca de 30,0% das mulheres da população geral, sendo que sua frequência varia conforme a etnia, sendo mais prevalente em afro-descendentes⁴². Sintomas são relatados em apenas 50,0% das mulheres com essa condição e incluem aumento do conteúdo vaginal, prurido e, principalmente, o mau odor vaginal⁴². A alta porcentagem de mulheres assintomáticas dificulta o diagnóstico da condição, deixando grande parcela da população em idade reprodutiva sob risco aumentado das complicações associadas às alterações de microbiota vaginal.

Embora a composição bacteriana de mulheres com microbiota vaginal alterada já tenha sido descrita¹⁷, ainda muito se discute sobre a etiologia dessa condição. De fato, já foi demonstrado que a *G. vaginalis* é a bactéria mais comumente isolada tanto de mulheres sintomáticas quanto mulheres assintomáticas com microbiota alterada⁴³. No entanto, trabalho precursor realizado em 1969⁴⁴ demonstrou que a inoculação de *G. vaginalis* obtida a partir de culturas puras em mulheres saudáveis não foi capaz de causar alteração vaginal na maior parte das mulheres testadas, enquanto que a inoculação do conteúdo vaginal de mulheres com vaginose bacteriana no canal vaginal de mulheres com flora normal fez com que a maioria destas também desenvolvesse tal alteração de microbiota. Tais achados apontam para a grande complexidade microbiológica da vaginose bacteriana dificultando a

atribuição da sua etiologia a uma ou a um conjunto de espécies. Estudos realizados utilizando cultura do material vaginal identificaram diversos gêneros de bactérias neste ambiente, como *G. vaginalis*, *Mobiluncus sp.*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella sp.*, *Mycoplasma hominis*, *Peptoniphilus anaerobius*⁴⁵⁻⁴⁷.

Além da dificuldade de entendimento da fisiopatologia da vaginose bacteriana, a grande diversidade bacteriana encontrada nesta condição dificulta qualquer tentativa de diagnóstico utilizando métodos baseados em cultura. Dessa forma, passou-se a estudar critérios clínicos⁴⁸ e microscópicos baseados na semiquantificação e proporção entre os morfotipos existentes no conteúdo vaginal^{49,50}. O método de análise dos esfregaços descrito por Spiegel et al.⁶ sugeriu que a microbiota vaginal fosse dividida em duas classes. De acordo com estes pesquisadores, as floras, quando na presença de lactobacilos, poderiam ser classificadas como normal, enquanto que os esfregaços vaginais com ausência ou com poucos lactobacilos e predominância de *G. vaginalis* ou outras bactérias eram interpretados como vaginose bacteriana. Este critério foi amplamente utilizado até 1991, quando Nugent et al.⁸ padronizaram um método de classificação da microbiota vaginal considerado hoje o padrão ouro para o diagnóstico da vaginose bacteriana. Tal metodologia consiste na avaliação microscópica de esfregaços corados pela técnica de Gram e classifica a microbiota vaginal em 3 categorias seguindo o sistema de escore, onde 0-3 determinam a flora normal, 4-6 referem-se à flora intermediária e escores de 7 a 10 caracterizam a vaginose bacteriana. Tais escores são atribuídos de acordo com a semiquantificação das bactérias existentes, levando em conta a morfologia e o padrão de coloração.

No entanto, ao longo dos anos, novas classificações da microbiota vaginal^{9,10,51} para os esfregaços de conteúdo vaginal foram propostas. Todas estas classificações possuem um objetivo comum que consiste em padronizar um método de análise de esfregaços que

contemple todos os morfotipos bacterianos em uma só classificação. Uma delas foi estabelecida por Ison & Ray⁵², que acrescentam duas outras classes à classificação proposta por Nugent⁸: classe 0, indicando ausência de bactérias e classe IV, caracterizada por células epiteliais cobertas somente por cocos Gram-positivos. Um estudo comparativo destas duas principais classificações foi realizado por Chawla et al.⁵³ e demonstrou que existe boa correlação entre esses métodos em esfregaços classificados como normais e com vaginose bacteriana. Portanto, por ser considerado um método de fácil execução e altamente reprodutível, o critério estabelecido por Nugent et al.⁸ é o mais utilizado para o diagnóstico microscópico da vaginose bacteriana. Embora a identificação das mulheres com vaginose bacteriana seja feita com sucesso por esse critério, algumas questões permanecem acerca da composição microbiológica e relevância clínica dos casos classificados como flora intermediária. Tal questão se torna ainda mais relevante quando se considera as evidências da literatura acerca das complicações obstétricas e ginecológicas associadas a esse padrão de flora vaginal⁵⁴⁻⁵⁶.

Tendo em vista a importância clínica e a dificuldade de interpretação do diagnóstico da flora intermediária estabelecida por Nugent et al.⁸, Donders et al. 2002⁵¹ propuseram uma nova classificação baseada não só nos achados microbiológicos, mas também na quantidade das células epiteliais descamativas e presença e quantidade de leucócitos encontrados no conteúdo vaginal. Baseado nesse sistema de classificação, tais autores descreveram uma nova alteração de microbiota vaginal denominada vaginite aeróbia, que é caracterizada pelo aumento de leucócitos local, presença de células parabasais, aumento do pH, além de uma composição bacteriana distinta daquela encontrada na VB¹⁰. Além disso, tais autores sugeriram que muitos dos casos classificados como flora intermediária utilizando os critérios de Nugent et al.⁸ estejam contidos dentro do grupo classificado como vaginite aeróbia,

quando utilizado o novo método proposto. Isso explicaria inclusive a discordância, já relatada por Chawla et al.⁵³, entre os métodos de Nugent et al.⁸ e Ison & Hay⁵² em relação à flora intermediária.

Mesmo com as diversas classificações microscópicas, o diagnóstico assertivo das alterações de microbiota vaginal continua sendo alvo de diversos estudos, pois muitas das espécies estudadas, como *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp, *Megasphaera* SP, Bacterial vaginosis-associated bactéria (BVAB)-1, (BVAB)-2, (BVAB)-3^{17,57,58} são encontradas no conteúdo vaginal, no entanto, só puderam ser detectadas em estudos mais recentes que utilizaram técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem seguida de sequenciamento do gene bacteriano RNAr 16S.

Além da composição bacteriana no conteúdo vaginal, estudos foram realizados objetivando a avaliação da carga bacteriana no conteúdo vaginal como possível ferramenta para o diagnóstico da vaginose bacteriana⁵⁹. De fato, embora mulheres normais e com vaginose bacteriana, segundo Nugent et al.⁸, apresentem *G. vaginalis* no ambiente vaginal, a quantificação dessa espécie apresenta disparidades nos diferentes padrões de microbiota, como a vaginose bacteriana⁶⁰, flora normal⁶¹ e flora intermediária⁶². Além disso, Fredricks et al.⁶³ demonstraram que a presença de *Leptotrichia* sp, *Megasphaera* sp, somada à de *A. vaginae*, apresenta maiores valores de sensibilidade para o diagnóstico de VB quando comparada aos critérios de Amsel et al.⁴⁸ e Nugent et al.⁸ Embora os métodos de quantificação bacteriana por biologia molecular tenham se mostrado ferramenta útil para a classificação da flora vaginal, ainda apresentam alto custo e maior tempo para execução, quando comparados aos métodos microscópicos.

Muitos estudos se basearam em métodos de cultura, microscopia e algumas ferramentas de biologia molecular com a finalidade de caracterizar a composição bacteriana

da microbiota vaginal normal e alterada, no entanto todos esses métodos possuem limitações metodológicas.^{59,64} Sendo assim, Ravel et al.¹⁷ realizaram o maior estudo do microbioma vaginal até o momento, empregando sequenciamento de *high throughput* do gene bacteriano RNAr 16S, que permite a determinação exata das espécies bacterianas presentes no ambiente vaginal, bem como a abundância relativa de cada uma delas. Os dados desse estudo revelaram que, apesar da grande diversidade microbiana vaginal, as comunidades bacterianas de mulheres em idade reprodutiva podem ser agrupadas em 5 tipos, conforme a maior abundância de determinadas espécies em sua composição. Do total de 5 tipos de comunidades bacterianas vaginais descritas, 4 são caracterizadas pela predominância de uma das espécies de lactobacilos: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* nas quais se concentram cerca de 75,0% das mulheres. Já na comunidade bacteriana vaginal remanescente, a predominância de espécies de lactobacilos é substituída por grande diversidade de outras espécies bacterianas, sendo que tal comunidade abriga grande parte, embora não a totalidade dos casos de vaginose bacteriana determinados pelos critérios de Nugent et al.⁸ Já com relação à flora intermediária, estes casos podem ser encontrados dispersos pelas 5 comunidades descritas, mas com a maioria deles na comunidade dominada por *L. iners* ou naquela sem predominância lactobacilar.

Existe uma relação muito estreita entre a microbiota vaginal e o sistema imune local⁶⁵. Sendo assim, o estudo da resposta imune aos diferentes tipos de microbiota realizado por diversos autores demonstraram que o organismo responde ao desequilíbrio na microbiota vaginal através de mecanismos da imunidade inata, resultando em aumento local de diversas citocinas pró-inflamatórias, principalmente a Interleucina (IL)-1 β ⁶⁶. De fato, na vaginose bacteriana encontramos um aumento expressivo de IL-1 β ⁶⁷, citocina chave na resposta imune inata contra micro-organismos. No entanto, aumentos expressivos desse

mediador pode ocasionar lesão tecidual, que é um dos mecanismos propostos para a associação da vaginose bacteriana com o maior risco de aquisição de doenças sexualmente transmissíveis^{68,69}. Inclusive já foi demonstrado que existe um aumento da infectividade pelo HIV e Herpes simplex vírus 2 em mulheres com aumento nos níveis vaginais de IL-1beta^{31,33}. A IL-1beta induz a produção de uma série de outros mediadores, inclusive IL-8^{67,69}. O aumento de IL-1beta e IL-8 ocorre não só na vaginose bacteriana, mas também na flora intermediária⁷⁰. No entanto, embora já tenham sido descritas algumas alterações nos mediadores da imunidade local na presença da flora intermediária, o padrão de liberação das citocinas na presença desse tipo de microbiota vaginal ainda não é bem estabelecido.

Além da IL-1beta, outra citocina que é rapidamente liberada após estímulos bacterianos é o fator de necrose tumoral (TNF)-alfa. Entretanto, estudos não revelaram aumentos significativos de seus níveis em pacientes com microbiota vaginal alterada^{66,70}. Porém, já foi demonstrada maior produção *in vitro* dessa citocina por células epiteliais quando estimuladas com sobrenadante de conteúdo vaginal de mulheres com vaginose bacteriana⁷¹. Dessa forma, sugere-se que também haja maior produção dessa citocina *in vivo*, que, assim como a IL-1beta, também é um possível mecanismo pelo qual há aumento da transmissão do HIV na presença da vaginose bacteriana⁷¹. Com relação à IL-6, níveis inalterados dessa citocina são encontrados na flora intermediária e vaginose bacteriana^{70,72}, enquanto que está aumentada na vaginite aeróbia⁵¹.

Recentemente foi demonstrado que níveis aumentados de IL-1beta na vaginose bacteriana correlacionam-se com o aumento de enzimas bacterianas, as sialidases⁶⁹. Essas enzimas são produzidas por várias bactérias anaeróbias associadas à vaginose bacteriana⁷³ como *G. vaginalis*, *P. bivia*, *M. hominis*, entre outras⁶⁹. Sialidases são capazes de degradar diversos fatores protetores da mucosa, tais como o ácido siálico de glicoproteínas, dentre

elas a IgA, mucinas e receptores celulares de células do hospedeiro⁶⁹ e, dessa forma, estão associadas à evasão microbiana da imunidade vaginal⁷⁴. Sendo assim, tais enzimas são capazes de desregular a resposta antimicrobiana e imunológica dos hospedeiros, gerando um estado de imunossupressão local.

Os achados em relação à correlação positiva entre níveis vaginais de IL-1beta com concentração de sialidases⁷⁵ tornam-se principalmente importantes em gestantes, já que foram considerados importantes fatores de risco para desfechos gestacionais desfavoráveis⁶⁹. Em relação à flora intermediária, Cauci et al.⁵⁴ demonstraram que este tipo de flora se comporta como a vaginose bacteriana para a atividade de sialidase, incluindo os mesmos riscos adversos da gestação. Ainda neste contexto, Marconi et al.⁷⁶ obtiveram os mesmos resultados em estudos com flora normal e vaginose bacteriana, demonstrando que a concentração de sialidases se correlaciona positivamente com IL-1beta.

A produção de IL-10 foi primeiramente determinada em células Th2 e se considerava que esta citocina era produzida apenas por células do sistema imune, no entanto já foi demonstrado que pode também ser produzida e liberada por queratinócitos, células epiteliais e células tumorais⁷⁷. No conteúdo vaginal, foi demonstrado que a microbiota local não interfere na produção de IL-10, visto que não há diferença nos níveis dessa citocina na vaginose bacteriana e na flora normal⁷².

Ainda com papel importante na regulação da cascata de mediadores da resposta imune inata, a atividade da IL-1beta é modulada por um antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra), que compete pelos seus sítios de ligação, porém sem capacidade de induzir sinais de transdução nas células. A síntese do IL-1ra ocorre num período mais tardio da infecção com a finalidade de interromper a fase aguda da inflamação e seus possíveis danos a células sadias⁷⁸. O gene do IL-1ra é localizado no cromossomo 2 próximo ao da IL-1beta e possui

uma região penta-alélica em seu intron 2 que contém um número variável de repetições em tandem (VNTR – *VariableNumber Tandem Repeat*) com 86bp⁷⁹. Já foram descritos cinco polimorfismos nessa região VNTR, sendo que a presença de homozigose para o alelo 2 (VNTR2), constituído por duas repetições em tandem, confere um aumento na produção do IL-1ra e está relacionado com um aumento quantitativo na composição bacteriana na microbiota vaginal⁸⁰. Dessa forma, sugere-se um papel deste mediador inflamatório para o desenvolvimento da vaginose bacteriana, já que um desbalanço na razão IL-1b/IL-1ra causado pelo nível aumentado de IL-1ra podem prejudicar o papel protetor da IL-1b contra infecções⁸⁰.

Tendo em vista a importância da resposta imune e a caracterização dos diferentes tipos de flora encontrados nas mulheres em idade reprodutiva, estudos recentes demonstram que existe uma limitação em relação a estudos transversais da microbiota vaginal. Atualmente os trabalhos mostram que a microbiota vaginal é altamente variável quando avaliada longitudinalmente^{81,82}. Em estudo de Brotman et al.⁸², foi observado que metade das mulheres participantes do estudo apresentou uma flora flutuante durante 16 semanas, quando avaliadas seguindo a classificação de Nugent et al.⁸ Sendo assim, os estudos prospectivos para caracterização da microbiota e sua relação com a imunidade do hospedeiro tornam-se cada vez mais importantes para esclarecer a dinâmica da microbiota vaginal, uma vez que a rápida flutuação da microbiota faz com que os estados temporários avaliados nos estudos transversais apresentem significados clínicos limitados.

Apesar das importantes descobertas em relação ao microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva, principalmente em relação às bactérias presentes na microbiota normal e na alteração mais frequentemente encontrada que é a vaginose bacteriana, o conhecimento da dinâmica que envolve uma entidade importante, porém pouco estudada

que é a flora intermediária, continua escasso. Nesse sentido, estudos prospectivos relacionados ao estudo do microbioma e da regulação da imunidade inata nessa condição são de fundamental importância para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção de uma microbiota vaginal saudável.

Referências

1. Doderlain A. Das Scheiden sekret und seine Bedeutung für das puerperale fieber. Leipzig: Verlag von Edard Besold. Jan 1892.
2. Holst E, Goffeng AR, Andersch B. Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. J Clin Microbiol 1994;32:176-186.
3. Eschenbach DA, Gravett MG, Chen KC, Hoyme UB, Holmes KK. Bacterial vaginosis during pregnancy. An association with prematurity and postpartum complications. Scand J Urol Nephrol Suppl 1984;86:213-222.
4. McDonald HM, O'Loughlin JA, Jolley P, Vigneswaran R, McDonald PJ. Prenatal microbiological risk factors associated with preterm birth. Br J Obstet Gynaecol 1992;99:190-6.
5. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. Am J Obstet Gynecol 2003;189:139-47.
6. Spiegel CA, Amsel R, Holmes, KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. J Clin Microbiol 1983:170-7.
7. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. Sex Transm Infect 2002;78:413-5.
8. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991;297-301.
9. Thomason JL, Anderson RJ, Gelbart SM, et al. Simplified Gram stain interpretative method for diagnosis of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1992;167:16-9.
10. Donders GGG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2007;21:355-73.
11. Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Vereecken A, Van Bulck B, Spitz B. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. Am J Obstet Gynecol 2000;182:872-8.
12. Schwebke JR, Flynn MS, Rivers CA. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* among women with lactobacillus-predominant vaginal flora. Sex Transm Infect 2013;90:61-3.
13. Palova SI, Kilic AO, Kilic SS, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. J Appl Microbiol 2001;91:1-9.

14. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999;180:863-8.
15. Cribby S, Taylor M, Reid G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008;25:6490.
16. Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Li C, Kato H, Watanake K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol* 1999;37:3062-4.
17. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *PNAS* 2011;108(1):4680-7.
18. Petrova MI, van denBroek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:762-92.
19. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod* 2001;16:1809-13.
20. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun* 1999;67:5170-5.
21. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *Plos One* 15:e10197.
22. Xarrifard MR, Saiffudin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis* *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34:277-81.
23. McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol* 2000;49:543-52.
24. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1989;27:251-6.
25. Lai SK, Hida K, Shukair S, et al. Human Immunodeficiency Virus Type1 Is Trapped by Acidic but Not by Neutralized Human Cervicovaginal Mucus. *J Virol* 2009;83:11196-200.

26. Graver MA, Wade JJ. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011;10:8.
27. Sobel JD. Bacterial Vaginosis – an ecologic mystery. *Ann Intern Med* 1989; 111:551-3.
28. Kovachev SM. Obstetric and Gynecological Diseases and Complications resulting from Vaginal Dysbacteriosis. *Microb Ecol* 2014;68:173-84.
29. Sweet RL. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis implications for the non-pregnant patient. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8:184-90.
30. Guaschino S, De Santo D, De Seta F. New perspectives in antibiotic prophylaxis of obstetric and gynecology surgery. *J Hosp Infect* 2002;50:S13-6.
31. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997;350:546-50.
32. Schwebke JR. Role of vaginal flora as a barrier to HIV acquisition. *Curr Infect Dis Rep* 2001;3:152-5.
33. Chernes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association with acquisition of herpes simplex virus type 2 in women with bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003;37:319-25.
34. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis* 2012;39:807-12.
35. Weiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:663-8.
36. Donders GG, Van Bulk B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:431-7
37. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
38. Platz-Christensen JJ, Pernevi P, Hagmar B, Andersson E, Brandberg A, Wijkvist N. A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72:99-102.

39. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:139-47.
40. Gardner HL & Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified 'non specific vaginitis'. *Am J Obstet Gynecol* 1955;69:962-76.
41. Greenwood JR, Pickett MJ: Transfer of *Haemophilus vaginalis* to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. *Nov Int J Syst Bact* 1980;30:170-8.
42. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis* 2007;34:864-9.
43. Fredricsson B, Hagström B, Evaldson G, Nord CE. *Gardnerella* associated-vaginitis and anaerobic bacteria. *Gynecol Obstet Invest* 1984;17:236-41.
44. Criswell BS, Ludwig CL, Gardner HL, et al. Vaginitis by inoculation from culture. *Obstet Gynecol* 1969;33:195.
45. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993;16:S273–81.
46. Rosenstein IJ. Bacterial vaginosis and the normal vaginal flora: a dynamic relationship. *Clin Lab* 1998;44:949–60.
47. Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D, Schoenknecht F, Holmes KK. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N Engl J Med* 1980;303:601-7.
48. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
49. Hay PE, Taylor-Robinson D, Lamont RF. Diagnosis of bacterial vaginosis in a gynaecology clinic. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:63-6.
50. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol* 2005; 5:61.

51. Donders GGG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. BJOG 2002;109:34-43.
52. Ison CA & Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. Sex Transm Infect 2002;78:413-5.
53. Chawla R, Bhalla P, Chadha S, Grover S, Garg S. Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. Biomed Res Int 2013;365194.
54. Cauci S, Hitti J, Noonan C, et al. Vaginal hydrolytic enzymes, immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* toxin, and risk of early preterm birth among women in preterm labor with bacterial vaginosis or intermediate flora. Am J Obstet Gynecol 2002;187:877-81.
55. Guédou FA, Damme LV, Mirembe F, et al. Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants screened for a randomized controlled trial. Sex Transm Infect 2012;88:545-51.
56. Guédou FA, Van Damme L, Deese J, et al. Intermediate vaginal flora and bacterial vaginosis are associated with the same factors: findings from an exploratory analysis among female sex workers in Africa and India. Sex Transm Infect 2013;90:161-4.
57. Frederics DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N Engl J Med 2005;353:1899-911.
58. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, et al. Cloning of 16sRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobiumvaginae*, *Gardnerellavaginalis* and bacterial vaginosis. BMC Microbiol 2004;21;4:16.
59. Martin DH. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. Am J Med Scien 2012;343:2-9.
60. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during, and after episodes of bacterial vaginosis. Microbiome 2013;1:29.
61. Sobel JD. Bacterial Vaginosis – an ecologic mystery. Ann Intern Med 1989; 111:551-3.

62. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age – sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? Plos One 2013;8:e60670.
63. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 2007;45:3270-6.
64. Barlett JG, Oderdonk AB, Drude E, et. al. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. J Infect Dis 1977;136:271-7.
65. Doerflinger SY, Throop AI, Herbst-Kralovetz MM. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. J Infect Dis 2014;209:1989-99.
66. Mattsy-Baltzer I, Platz-Christensen JJ, Hosseini N, Rosén P. IL-1B, IL-6, TNF-A, Fetal fibronectin, and endotoxin in lower genital tract of pregnant women with bacterial vaginosis. Acta Obstet Gynecol Scand 1998;77:701-6.
67. Cauci S, Guaschino S, Aloysio D, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1b and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. Mol Hum Reprod 2003;9:53-8.
68. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. Clin Exp Rheumatol 2002;20:S1-13.
69. Cauci S, Culhane J F, Di Santolo M, Mc Collum K. Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1B. Am J Obstet Gynecol 2008;198:132.e1-7.
70. Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and Systemic Cytokine Levels in Relation to Changes in Vaginal Flora. J Infect Dis 2006;193: 556-62.
71. Zariffard MR, Novak RM, Lurain N, Sha BE, Graham P, Spear GT. Induction of Tumor Necrosis Factor- α secretion and *Toll-like* Receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. J Infect Dis 2005;191:1913-21.
72. Weissenbacher T, Walter C, Mylonas I, Scholz C, Gengelmaier A, Friese K. Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. Arch Gynecol Obstet 2010;281:77-80.

73. McGregor JA, French JI, Jones W, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamicyn cream. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1048-59.
74. Cauci S, Monte R, Driussi S, Lanzafame P, Quadrifoglio F. Impairment of the mucosal immune system: IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of a subgroup of patients with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 1998;178:1698-706.
75. Cauci S, Driussi S, Guaschino S, Isola M, Quadrifoglio F. Correlation of local interleukin-1beta levels with specific IgA response against *Gardnerella vaginalis* cytolyisin in women with bacterial vaginosis. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:257-64.
76. Marconi C, Donders GG, Bellen G, Brown DR, Parada CM, Silva MG. Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;167:205-9.
77. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10:170-81.
78. McIntyre KW, Stepan GJ, Kolinsky KD, et al. Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. *J Exp Med* 1991;173:931-9.
79. Webb AC, Collins KL, Auron PE, et al. Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 1986;5:77-85.
80. Barton PT, Gerber S, Skupski DW, Witkin SS. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, vaginal interleukin-1 receptor antagonist concentrations, and vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization in pregnant women. *Infect Immun* 2003;71:271-4.
81. Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *SciTransl Med*. 2012;4:132ra52.
82. Brotman RM, Ravel J, Cone RA, Zenilman JM. Rapid Fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram Stain analysis. *Sex Transm Infect* 2010;86:297-302.

Resumo

Espécies de lactobacilos são os principais componentes da microbiota vaginal e a manutenção do predomínio lactobacilar é importante para proteção desse ambiente contra possíveis patógenos. A vaginose bacteriana é uma condição em que se observa a perda de lactobacilos e substituição desses microrganismos por espécies bacterianas, anaeróbias em sua maioria. Tal condição pode acarretar inúmeras complicações ginecológicas e obstétricas, como o aumento do risco de aquisição de infecções sexualmente transmissíveis, parto prematuro e baixo peso ao nascimento. O principal método utilizado para o diagnóstico da vaginose bacteriana é o proposto por Nugent et al. (1991) e se baseia na classificação da microbiota vaginal em flora normal, intermediária e vaginose bacteriana. Enquanto que o perfil imunológico e microbiológico da vaginose bacteriana tenha sido amplamente estudado, pouco se sabe sobre tais características na flora intermediária. Portanto, o objetivo desse estudo foi caracterizar a flora intermediária quanto aos níveis cérvico-vaginais de Interleucina (IL)1-beta, IL-6, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, antagonista de receptor de IL-1(IL-1ra), sialidases bacterianas e quanto às cargas de *Gardnerella vaginalis* de bactérias totais, além de verificar se o perfil geral observado na flora intermediária se assemelha ao de mulheres com flora normal ou com vaginose bacteriana. Foi realizado um estudo transversal que incluiu 526 mulheres não grávidas em idade reprodutiva. Deste total, foram constituídos os grupos de estudo de acordo com o padrão de flora vagina, segundo Nugent et al. Todos os 145 casos de vaginose bacteriana foram incluídos nas análises, bem como os 63 casos de flora intermediária e 145 das 318 mulheres que apresentaram flora normal. A determinação dos níveis cérvico-vaginais de citocinas, sialidases e a carga bacteriana foram realizados por, respectivamente, ELISA, conversão de MUAN e PCR em tempo real quantitativo. Todos os dados obtidos foram incluídos numa análise de componentes principais (PCA) para comparar o perfil dos parâmetros pesquisados entre os três grupos de estudo. Os resultados obtidos revelaram que a flora intermediária está associada a níveis aumentados de IL-1beta e IL-10 em relação à flora normal ($P<0,0001$). Além disso, quando comparadas às mulheres com vaginose bacteriana, aquelas com flora intermediária apresentam aumento de IL-8 ($P=0,01$). Quanto às sialidases bacterianas, a flora intermediária apresentou menor concentração vaginal dessa enzima em relação à vaginose bacteriana ($P<0,0001$). Tanto a carga bacteriana total como a de *G. vaginalis* diferiram entre os três grupos ($P<0,0001$), sendo as maiores cargas encontradas na vaginose bacteriana. A PCA mostrou que a flora normal e a intermediária foram distribuídas de forma próxima e majoritariamente sobrepostas, enquanto que as amostras referentes às mulheres com vaginose bacteriana estiveram mais afastadas. Dessa forma, pode-se concluir que embora a flora intermediária apresente algumas diferenças de citocinas, sialidases e carga bacteriana em relação à vaginose bacteriana e flora normal, quanto tais parâmetros são tomados em conjunto, o padrão geral da flora intermediária é mais semelhante ao da flora normal.

**Cervicovaginalcytokines, sialidase activity and bacterial load in reproductive aged women
with intermediate flora**

Mariana M. V. SANTOS-GREATTI, MSc¹, Márcia G. SILVA, PhD¹, Carolina S. T. FERREIRA, BSc¹,
Camila MARCONI, PhD^{1*}

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo,
Brazil.

Disclosure: None of the authors have a conflict of interest.

Financial support: This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de
São Paulo-FAPESP (Grant: 2009/50560-7).

Reprint requests and corresponding author:

Camila Marconi, e-mail: marconi.cml@gmail.com

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Distrito de Rubião Junior
s/n. Botucatu-SP, CEP: 18618-970, Brazil. Phone: +55 14 38801655; Fax: +55 14 3815.2348;
Mobile: +55 11 9898131042

Word count: 3341.

*Apresentado de acordo com as normas para submissão no periódico *American Journal of
Obstetrics and Gynecology*.

Abstract

Objectives: The aim of this study was to characterize the intermediate flora regarding 1) levels of Interleukin (IL)–1beta, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra), IL-10, 2) sialidase activity, 3) loads of *Gardnerellavaginalis* and total bacteria and to verify whether it is closer related to those normal flora or bacterial vaginosis. **Study design:** This cross-sectional study evaluated a total of 526 non-pregnant reproductive aged women. Women were distributed in 3 groups according to pattern of vaginal flora using Nugent's scoring system in normal, intermediate and bacterial vaginosis. Cervicovaginal levels of cytokines, sialidases and loads of *G. vaginalis*, and total bacteria were assessed by ELISA, conversion of MUAN and quantitative real-time PCR, respectively. A principal component analysis (PCA) using the all measured parameters was performed to compare the samples from the 3 different types of flora. **Results:** Intermediate flora is associated with increased cervicovaginal IL-1beta and IL-10 levels in relation to normal flora ($P < 0.0001$). Also, when compared to women with bacterial vaginosis, intermediate flora has higher IL-8 level ($P = 0.01$). Bacterial sialidases were in significantly lower levels in normal and intermediate flora than bacterial vaginosis ($P < 0.0001$). Loads of *G. vaginalis* and total bacterial differed among all groups ($P < 0.0001$), being the highest in bacterial vaginosis. Conversely, PCA showed that normal and intermediate flora samples were closely scattered, while samples from women with bacterial vaginosis were grouped separately. **Conclusions:** Although intermediate flora shows some differences in cytokines, sialidases and bacterial loads in relation to normal flora and bacterial vaginosis, when taken together all inflammatory and microbiological parameters measured, general pattern of intermediate flora resembles normal flora.

Introduction

Normally, *Lactobacillus* species are the most frequent components of the vaginal microbiota.^{1,2} Maintenance of a healthy vaginal flora is crucial for protecting women against several sexually transmitted infections (STI), such as those caused by *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* and human immunodeficiency virus (HIV).³⁻
⁶The most common type of abnormal vaginal flora is a polymicrobial entity called bacterial vaginosis in which the lactobacilli-dominated flora is replaced by an overgrowth of anaerobic bacteria.⁷ Mechanisms by which bacterial vaginosis increases significantly the risk for STI acquisition and transmission remain poorly understood,^{8,9} but it was already shown that the high levels of proinflammatory cytokines and bacterial sialidases found in this condition contributes for increasing the local vulnerability for infections.^{10,11} In fact, vaginal non-lactobacilli load of bacteria is positively correlated with higher levels of interleukin (IL)-1 beta and several strains of the bacterial vaginosis-associated *G. vaginalis* are recognized as good sialidases-producers.^{12,13}

Bacterial vaginosis can be detected in about 30% of reproductive aged women, but only half of them report symptoms such as increased vaginal discharge and unpleasant vaginal odor.^{14,15} The high rates of asymptomatic women with bacterial vaginosis challenges its diagnosis, leaving an expressive rate of the population in risk for STI acquisition. Currently, the gold standard for BV diagnosis is the Nugent's scoring system, which is based in the microscopic semi-quantification of bacterial morphotypes found in Gram-stained vaginal smears.¹⁶ Using this method, vaginal flora can be classified as normal (scores 0 to 3), intermediate (scores 4 to 6) and bacterial vaginosis (scores 7 to 10). This is a validated method that presents good overall interobserver agreement.¹⁶ Although this is considered a good tool for bacterial vaginosis detection, the clinical meaning and importance of

intermediate flora for women's reproductive health remains a matter of discussion. Intermediate flora is found in from 19.2% to 30.0 % of the population and is even less symptomatic than bacterial vaginosis.^{17,18} Some studies showed that intermediate flora shares several of bacterial vaginosis risk factors and, more importantly, it is also associated with vulnerability for HIV.¹⁹ However, little is known about the local microbiological and immunological aspects of women with intermediate flora and literature data have been controversial whether it should be considered as a transitory type of flora between normal and bacterial vaginosis or a single different entity.^{20,21}

Considering the increasing evidences from the literature around the deleterious effect of intermediate flora for women's health and the few information available regarding the cytokine and sialidase profile of this condition, the aim of this study was to determine the cytokine levels of IL-1beta, IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10 and Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha, as well as sialidase activity, *G. vaginalis* and total bacterial load in intermediate flora. We also aimed to verify whether its overall profile is comparable to normal flora or bacterial vaginosis.

Material and methods

From 2010 to 2013, 783 non pregnant reproductive aged women attending in one unit of Primary Health Care in Botucatu for routine cervical cancer screening were invited to participate of this cross-sectional study. Women were not considered for enrollment if they were menstruating, reported urinary loss, used antibiotics in previous 30 days and did had sexual intercourse in the last 48 hours before sampling. Women were not eligible if they presented vaginal candidosis, cytolytic vaginosis and those who tested positive for *C. trachomatis* endocervicitis and/or *N. gonorrhoeae*. All subjects were informed about the

study aims and signed a consent form. This study was approved by the Ethics Committee Board of Botucatu Medical School, São Paulo State University (Protocol #3629-2010). Sociodemographic and behavioral data were acquired by applying a standardized questionnaire.

During the physical exam for routine pap-smear screening, additional vaginal samples were taken to assess the local pH, 10% KOH testing and to detect, by microscopy, the presence of *Candida* sp. pseudo hyphae, *Trichomonas vaginalis* and for classifying the vaginal flora according to the Nugent's scoring system in normal (scores 0-3), intermediate (4-6) and bacterial vaginosis (7-10).¹⁶ Cervical samples were also taken for assessing of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* status by PCR, according to methods previously described.^{22,23} Additionally, cervicovaginal lavages were performed using 3mL of a sterile 0.9% NaCl solution and, after allowing contact of the solution with the vaginal wall, samples were recovered using a plastic pipette. Cervicovaginal lavages samples were centrifuged at 800 x g for 10 minutes within 4 hours after collection, with pellets and supernatants stored separately at -80°C until analysis. We excluded of this study those women whose vaginal smears were not satisfactory for analysis (n=24) and those with blood in the cervicovaginal samples (n=11).

A total of 179 (22.9%) women tested positive for chlamydia endocervicitis, 14 (1.8%) for gonorrhea and 2 (0.3%) for both infections and therefore were not considered eligible for inclusion in the study, as well as those who presented vaginal candidosis (n=25, 3.2%) and cytolytic vaginosis (n=2, 0.3%). Therefore, among the 526 women enrolled in the study, bacterial vaginosis was detected in 145 (27.6%), while 63 (12.0%) had intermediate flora and 318 (60.5%) normal lactobacilli-dominated vaginal flora. All pellets and supernatant samples from cervicovaginal lavages from women with bacterial vaginosis (n=145, 27.6%),

intermediate flora (n=63, 12.0%) and 145 (27.6%) out of 318 randomly selected women with normal flora were subjected to determination of bacterial load and cytokine and sialidases quantification.

Bacterial DNA was extracted from the pellets of 1mL of cervicovaginal samples using DNEasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) with final elution in 100µL. Loads in number of copies/mL of cervicovaginal samples of *G. vaginalis* and the conserved sequence of 16S rRNA were determined by quantitative real-time PCR. Reactions were performed individually in a final volume of 13 µL using Maxima SYBR Green/ROX (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), with 2µL of DNA template and the specific couple of primers at 0.3µM (Table 1) in 40 amplification cycles in LineGene equipment (Bioer, China). Unknown numbers of copies of bacterial DNA from samples were calculated from standard curves of 10-fold serial plasmids dilution. Plasmids were obtained from a taxon-specific sequence of *G. vaginalis* (ATCC 14018) and 16SrRNA from *Staphylococcus aureus* (ATCC 19095) using broad range primers (Table 1) to determine the total bacterial load.^{24,25} *G. vaginalis* and *S. aureus* amplicons were sequenced in Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and final sequences were analyzed by BLAST algorithm (available at www.ncbi.nlm.nih.gov) to confirm they matched to the sequences of interest. Sequences were then cloned into *Escherichia coli* DH5-α (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the final plasmidial DNA was used for determination of the number of copies/µL through the Avogadro's equation. All samples were tested in duplicates and retested if more than 1 cycle threshold was detected between the duplicates. Results from the qPCR, relative to the 2µL volume of template used, were multiplied by 50 in order to reach the elution volume of 100µL that corresponded to 1mL of cervicovaginal fluid. Thus, final bacterial loads were expressed by number of copies/mL of cervicovaginal lavages.

Table 1. Oligonucleotide primers for quantitative real time PCR designed from the 16S rRNA gene of *Gardnerella vaginalis* and the broad range 16S rRNA to estimate the total bacterial load.

Target	Oligo name	Sequence	Amplicon size
<i>Gardnerella vaginalis</i>	GV1F	5'-TTACTGGTGTATCACTGTAAGG-3'	332bp ⁴
	GV3R	5'-CCGTCACAGGCTGAACAGT-3'	
Broad range 16S rRNA	Eub341F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	193bp ²⁵
	Eub534R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'	

Interleukin-1beta, IL1-ra, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha levels were measured by ELISA using Duo Set Kits(R&D Systems,Minneapolis, MN)in the supernatants of cervicovaginal lavages, according to manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate and those with values set above the standard curve range were diluted (1:5 and 1:10) and retested. The minimum detectable levels in the IL-1beta, IL-1ra IL-6, IL-8 and TNF-alpha assays were, respectively, 0.1 pg/mL, 775.0 ng/mL, 1.3 pg/mL, 7.8 pg/mL, 0.4 pg/mL. Intra and inter-assay variability remained <10.0% for all cytokines.

Measurement of sialidase activity in the supernatants was performed using the fluorogenic substrate 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUAN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), according to protocol previously described.²⁶ Briefly, assays were performed in black 96-well plates by adding 50 μ L of 0.35% MUAN (wt/vol) to 50 μ L of each sample. After incubation for 30 minutes at 37°C, the reactions were read at 450 nm, 365 nm excitation and filter at 420 nm. Samples were tested in duplicate and compared to the standard curve (range 1000.0-1.0ng/mL) of commercial *Clostridium perfringens* sialidase (Sigma-Aldrich, MO). In every assay, a negative control, consisting of a sample previously heated at 95°C for 15 min, and a positive control of a known sialidase-positive sample with visible fluorescence on UV transilluminator were included. The minimum detectable levels

for sialidases was 0.02 ng/mL, while intra- and inter-assay variability remained <5.0%.

Comparison of discrete and continuous variables among the women with normal vaginal flora, intermediate and bacterial vaginosis was performed, respectively, by Chi-squared and the non-parametric Kruskal Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison post-test, when group effects were significant. Bacterial load, cytokine and sialidase levels among the groups were also compared with Kruskal-Wallis, followed by Dunn's test. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA) and $P < 0.05$ was considered as significant. Principal component analysis (PCA) is a tool by which complex data are converted in simple values (principal components), allowing the evaluation of the samples based on the different variables they express. We performed this analysis to compare the general profile of normal flora, intermediate and bacterial vaginosis samples based on the combination of their cytokine levels, sialidase activity, *G. vaginalis* and total bacterial loads. An auto-scaled PCA analysis was performed with $\log_{10}$ transformed data using MVSP software, version 3.13a (Kovach Computing Services, Pentraeth, UK). Post-hoc analysis showed a power test superior to 95%, considering the difference of IL-1 β among the groups with normal, intermediate flora and bacterial vaginosis.

Results

Sociodemographic, behavioral and gynecologic characteristics of the women enrolled are shown in Table 2, distributed according their pattern of vaginal flora. The three study groups did not differ for major of the variables evaluated, but women who were single at enrollment ($p < 0.001$), with smoking habit ($P = 0.02$) and that reported at least one previous episode of bacterial vaginosis ($P < 0.001$) were more frequent in bacterial vaginosis group. Regarding the clinical findings at time of enrollment, vaginal pH differed among all groups ($P < 0.001$), with highest values in bacterial vaginosis, followed by intermediate and normal

floraThe number of samples with positive or doubtful result at 10% KOH test was also more frequent in women with bacterial vaginosis and intermediate flora when compared to normal ($P<0.001$).

Results of the comparison of the cytokines levels in the cervicovaginal samples among the three groups showed that for IL-1 β , levels were significantly higher in women with bacterial vaginosis (56.0pg/mL, 0.0-1950.0) and intermediate flora (28.7pg/mL, 0.0-462.4) than in normal flora (7.8pg/mL, 0.0-286.2) (Table 3). IL-1 α levels were significantly increased in bacterial vaginosis (935.6pg/mL, 775.4-8067.0) when compared to normal flora (668.5pg/mL, 70.4-4185.0), but not in relation to intermediate flora (1008.0pg/mL, 0.0-3727.0). When evaluating IL-6 levels, this mediator did not differ between the groups, while IL-8 was significantly higher in intermediate flora (441.5pg/mL, 0.0-2053.0), when compared to bacterial vaginosis (260.9pg/mL, 0.0-2220.0), but did not differ from women with normal vaginal flora (294.3pg/mL, 0.0-2010.0). Women with intermediate flora also had significantly increased IL-10 (36.7pg/mL, 0.0-417.1) when compared with to normal flora (0.0pg/mL, 0.0-508.2), but not in relation to bacterial vaginosis (0.0pg/mL, 0.0-62.3). Levels of TNF- α did not differ among the groups.

Sialidase activity was detected in 83 (57.2%) samples from women with bacterial vaginosis, while in only 8 (12.7%) women with intermediate flora and 4 (2.8%) with normal flora (data not shown). Levels of sialidase measured in the cervicovaginal samples from women with bacterial vaginosis (4.6ng/mL, 0.0-576.4) whereas superior to those from intermediate (0.0ng/mL, 0.0-0.04) and normal flora (0.0ng/mL, 0.0-5.2), ($P<0.001$), while intermediate flora had statistically the same sialidase levels than normal flora (Table 3). Results on the analyses of the quantitative PCR for *G. vaginalis* and the conserved sequence of 16S rRNA, to assess the total bacterial load, showed statistical difference between all the

groups (Table 3). Bacterial loads were higher in the group of women with bacterial vaginosis, followed by intermediate and normal vaginal flora.

A PCA was performed to evaluate the distribution of normal flora, intermediate flora and bacterial vaginosis samples according to the parameters measured. As observed in Figure 1, samples were distributed in two groups, the one on the left side shows a predominance of the intermediate and normal vaginal flora, while the other is predominately constituted by bacterial vaginosis samples. It can be noticed a clear overlap of normal and intermediate samples in the left side of the graph.

Table 2. Sociodemographic, behavioral and gynecological characteristics from 353 women whose samples were included in the study analysis, distributed according to their pattern of vaginal flora.

Variables*	Normal flora (n=145)	Intermediate flora (n=63)	Bacterial vaginosis (n=145)	P
Age, median (range), years [£]	32 (15-56) ^a	33 (18-54) ^a	31 (14-55) ^a	0.23
Race (self-defined), n/total (%) [£]				
White	73/106 (68.9) ^a	39/49 (79.6) ^a	79/125 (63.2) ^a	0.11
Nonwhite	33/106 (31.1) ^a	10/49 (20.4) ^a	46/125 (36.8) ^a	
Marital status, n/total (%) [£]				
Single	23/125 (18.4) ^b	10/56 (17.9) ^b	52/139 (37.4) ^a	<0.001
Married	102/125 (81.6) ^a	46/56 (82.1) ^a	87/139 (62.6) ^b	
Years at school, median (range) [£]	9 (0, 18) ^a	8 (0, 16) ^a	9 (0, 28) ^a	0.74
Remunerated activity, n/total (%) [£]	72/126 (57.1) ^a	24/53 (45.3) ^a	78/138 (56.5) ^a	0.30
Smoking habit, n/total (%) [£]	20/128 (15.6) ^b	7/54 (13.0) ^b	38/138 (27.5) ^a	0.02
Sex partners, prior 12 months, n/total (%) [£]				
0 or 1	117/125 (93.6) ^a	47/53 (88.7) ^a	124/139 (89.2) ^a	0.39
2 or more	8/125 (6.4) ^a	6/53 (11.3) ^a	15/139 (10.8) ^a	
Number of vaginal intercourse/week, median (range) [£]	3 (0-7) ^a	3 (0-7) ^a	2 (0-30) ^a	0.14
Previous BV, n (%) [£]	21/117 (18.0) ^b	12/46 (26.1) ^{ab}	50/123 (40.7) ^a	<0.001
Previous STD, n (%) [£]	19/114 (16.7) ^a	6/47 (12.8) ^a	9/123 (7.3) ^a	0.08
Consistent condom use, n (%)	10/79 (12.7) ^a	8/40 (20.0) ^a	18/130 (13.4) ^a	0.54
Hormonal contraception use, prior 12 months, n/total (%) [£]	34/98 (34.7) ^a	11/45 (24.4) ^a	32/126 (25.4) ^a	0.27
Parity, n/total (%) [£]				
0	44/127 (34.7) ^a	17/53 (32.1) ^a	43/138 (30.4) ^a	0.83
≥1	83/127 (65.4) ^a	36/53 (67.9) ^a	95/138 (68.8) ^a	
Vaginal pH, median (range) [£]	4.4 (3.5, 6.5) ^c	4.5 (4.0, 6.5) ^b	5.0 (3.5, 7.0) ^a	<0.001
KOH test, n/total (%) [£]				
Positive or doubtful	17/123 (13.8) ^c	16/55 (29.1) ^b	87/133 (65.4) ^a	<0.001
Negative	106/123 (86.2) ^a	39/55 (70.9) ^b	46/133 (34.6) ^c	

*Total of women may vary among the categories, as some of the data were unavailable or due to patient's refusal to answer;

**Values followed by the same letter (a,b,c) did not differ statistically ;

[£]Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn's multiple comparisons;

[£]Chi-squared test.

Table 3. Bacterial vaginosis associated bacteria and total bacterial load in women with normal flora, intermediate flora and BV.

Number of positive cases for each species (N) and median bacterial load (number of copies/mL) in the vaginal samples.

Parameters*	Normal	Intermediate	Bacterial vaginosis	P**
IL-1beta (pg/mL)	7.8 (0.0, 286.2) ^b	28.7 (0.0-462.4) ^a	56.0 (0.0, 1950.0) ^a	<0.0001
IL-1ra (ng/mL)	668.5 (70.4,4185.0) ^b	1008.0 (0.0, 3727.0) ^{a,b}	935.6 (775.4, 8067.0) ^a	0.02
IL-6 (pg/mL)	0.0 (0.0, 195.6) ^a	0.0 (0.0, 205.4) ^a	0.0 (0.0, 324.4) ^a	0.66
IL-8 (pg/mL)	294.3 (0.0, 2010.0) ^{ab}	441.5 (0.0,2053.0) ^a	260.9 (0.0, 2220.0) ^b	0.01
IL-10 (pg/mL)	0.0 (0.0, 508.2) ^b	36.7 (0.0, 417.1) ^a	0.0 (0.0, 62.3) ^{ab}	<0.0001
TNF-alpha (pg/mL)	0.0 (0.0, 80.1) ^a	0.0 (0.0, 1489.0) ^a	0.0 (0.0, 657.9) ^a	0.67
Sialidase (ng/mL)	0.0 (0.0, 5.2) ^b	0.0 (0.0, 0.04) ^b	4.6 (0.0, 576.4) ^a	<0.0001
16S rRNA (nr of copies/mL)	10 ⁹ (10 ³ , 10 ¹¹) ^c	10 ⁸ (10 ⁵ , 10 ⁹) ^b	10 ¹⁰ (10 ⁸ , 10 ¹¹) ^a	<0.0001
<i>Gardnerellavaginalis</i> (nr of copies/mL)	0 (0, 10 ⁷) ^c	10 ² (0, 10 ⁶) ^b	10 ⁶ (0, 10 ⁸) ^a	<0.0001

* Values followed by the same letter (a,b,c) did not differ statistically;

** Kruskal Wallis test; Dunn's multiple comparison test; P<0.05;

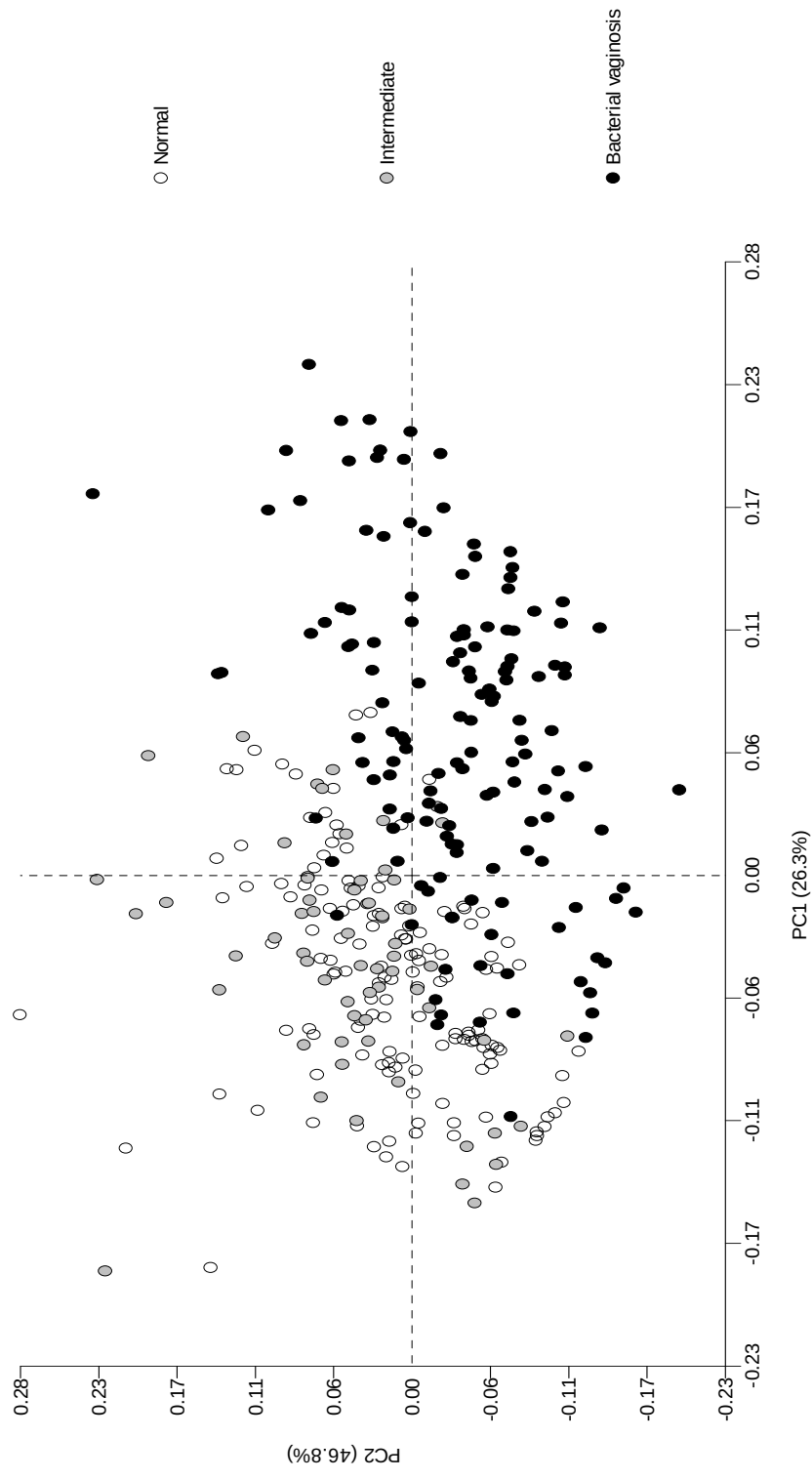


Figure 1. Scatter plots of the principal component analysis (PCA) case scores parameters of women with bacterial vaginosis, intermediate and normal vaginal flora. The values presented on the ordinate and abscissa axes represent the largest amount of variation in the data set.

Discussion

This study is the first full description of the cervicovaginal profile of cytokines and bacterial sialidases levels, as well as the *G. vaginalis* and total bacterial load according to the pattern of vaginal flora, based on the most widely accepted method for flora classification proposed by Nugent et al.,¹⁶ in normal, intermediate flora and bacterial vaginosis. The inclusion criteria of women in this study were very strict to assure that none of the samples had any concurrent infection that could interfere in the immunological and bacterial parameters measured. The analyses of the sociodemographic characteristics in the current study showed that some of the variables commonly associated with bacterial vaginosis, such as age and ethnicity, were not associated with the type of vaginal flora.^{27,28} This inconstancy in the findings might be explained by the fact that we only included women in reproductive age and the fact that Brazilian population is particularly composed by admixed ethnicities.²⁹

On the other hand, the present data are in agreement with the literature, as women who reported being single at time of enrollment, had smoking habit and with at least one previous episode of bacterial vaginosis were more likely to present bacterial vaginosis.³⁰⁻³² We are aware that smoking status can influence vaginal cytokine levels and this might have produced some biased results in the current study.³³ As expected, BV women had significant higher vaginal pH and were more likely to have positive KOH test, both well-recognized markers of BV.¹⁴ Although women with intermediate flora also had significantly increased pH and positivity at KOH test, clinical diagnosis of this condition using these parameters and symptomatology is not sufficiently accurate.³⁴

In agreement with the literature, the cervicovaginal levels of IL-1 β in both, intermediate flora and bacterial vaginosis, were increased in relation to normal vaginal flora.^{26,35-37} As increased cervicovaginal levels of IL-1 β were already associated with

pregnancy complications, such as abortion and premature birth,³⁸ and also with increased risk for STI acquisition,⁸ it can be hypothesized that women with bacterial vaginosis and intermediate flora are at same risk for the deleterious effects of high levels of IL-1beta. Regarding the IL-6 levels measured in this population, no difference could be observed among the groups. Although, as recently described by Donders et al.,³⁹ IL-6 levels may be elevated in a particular type of vaginal flora called aerobic vaginitis, several studies have failed in demonstrating IL-6 production induced by BV.^{36,40,41} Reinforcing these findings, Nikolaitchouk et al.⁴² did not find correlation between the number of bacterial vaginosis-associated bacteria with IL-6 levels. However, recent study that used a more sensitive method for cytokine quantification in vaginal samples showed that IL-6 is actually increased in bacterial vaginosis.⁴³ We might have failed in showing this difference, as the commercial assay used was only able to detect presence of IL-6 in 34% of the samples (data not shown).

Still in relation to the inflammatory response, the pattern of cervicovaginal levels of IL-8 is controversial. Some studies have shown this chemokine is significantly increased in bacterial vaginosis,^{37,40} while other authors have failed in demonstrating such association.^{26,35} Actually, IL-8 is a potent neutrophil chemotactic factor and, as bacterial vaginosis is not associated with increases in neutrophil counts, IL-8 levels are expected to be unchanged in this condition.⁴⁴ Hereby we were able to show that intermediate flora is associated with increased IL-8 when compared to bacterial vaginosis, but unchanged in relation to normal flora. This finding suggests that, in fact, IL-8 may present some differences in the bacterial composition in relation to normal and bacterial vaginosis flora. Supporting this evidence, as it was already demonstrated that the quantity of the different bacterial species found in vaginal flora correlates differently with local levels of IL-8.⁴² Additionally, it was recently demonstrated by our group that aerobic vaginitis, an entity that also differs

from bacterial vaginosis in terms of bacterial composition, increases the local levels of IL-8.²⁶ Although it was known that IL-8 levels correlate negatively with quantity of lactobacilli,⁴⁵ it is still not well established the exact deleterious effects of increased vaginal IL-8 levels. However, it was recently shown that in HIV-positive women vaginal IL-8 levels correlate positively with HIV RNA concentrations,⁴⁶ providing evidence that women with intermediate flora may present increased HIV shedding and potentially increased risk of transmission.

The proinflammatory cytokine TNF-alpha is normally found in low and unchanged levels in the lower genital tract from women with normal and altered vaginal flora,^{26,38} as supported by the current study that showed same TNF-alpha levels also in intermediate flora. On the other hand, there are few data available regarding the cervicovaginal levels of the anti-inflammatory IL-10 and they show no difference between bacterial vaginosis and normal flora.⁴¹ This study is consistent with this finding that indeed normal and bacterial vaginosis groups have same IL-10 levels, but it also shows that women with intermediate flora have increased IL-10. It is well established that bacterial lipopolysaccharide induces an initial burst of pro-inflammatory cytokine production and release by several human cells. This event is followed by increased IL-10 production for down-regulating the inflammatory response. Therefore, the high IL-10 level in intermediate flora points out an amplified inflammatory response found in this condition. When evaluating IL-1ra, another anti-inflammatory cytokine, it was observed increases only in women with bacterial vaginosis when compared to those with normal flora. The role of IL-1ra is to modulate the proinflammatory activity of IL-1beta and, in agreement with the current findings, it was already demonstrated that cervicovaginal loads of *G. vaginalis* correlates with local levels of this cytokine.⁴⁷

Regarding the microbial composition of the vaginal flora, it was already

demonstrated that bacterial vaginosis is associated with increase in bacterial diversity and quantity.^{2,7,42} Corroborating with this previous knowledge, it is hereby demonstrated that total bacterial load is different among all flora types, pointing out that intermediate flora has increased bacterial load when compared to women with normal flora. Similar results were found in relation to the sialidase-producer species, *G. vaginalis*. Despite women with intermediate flora show higher loads of *G. vaginalis* when compared to normal flora, no difference in sialidases levels were observed between this two flora types. It was demonstrated by Cauci et al.¹⁸ that intermediate flora has increased sialidase levels in relation to normal flora, which differs from our study. This discrepancy in the findings might be due to the fact that these authors evaluated only pregnant women, while it was recently demonstrated that pregnant women present increased instability of vaginal microbiota when compared to non-pregnants.⁴⁸ In fact, the finding of increased sialidase levels exclusively found in bacterial vaginosis supported by other studies^{26,44} and reinforces the immunologic impairment that may be present in the lower genital tract of women with this condition.⁴⁹

Although some microbiological and immunological parameters are different in intermediate flora when compared to those measured in normal flora, PCA analysis showed that the general pattern this two flora types are similar. Samples from women with bacterial vaginosis tend to form a distinct group from normal and intermediate flora. However, the current data provide evidences that intermediate flora should not be overlooked, as it is associated with significant changes in the vaginal milieu. Moreover, based in the inflammatory and microbiological variables evaluated, Nugent category of intermediate flora fails to identify those women at increased risk for the deleterious effects associated with vaginal imbalanced levels of these parameters.^{8,10,46}

Considering that recent studies have been consistent in demonstrating that vaginal flora is highly dynamic over time,^{50,51} further longitudinal studies should be conducted to evaluate the hypothesis that intermediate flora do not bring any serious consequences when detected once, whereas this scenario changes if this condition persists for longer periods of time. In this case, such women would be at risk for the severe consequences already associated with this type of flora.

References

1. Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med* 2000;51:349-56.
2. Ravel J, Gajer P, Abdo Z et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:4680-7.
3. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999;180:1863-8.
4. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997;350:546-50.
5. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis* 2012;39:807-12.
6. Weiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:663-68.
7. Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D, Schoenknecht F, Holmes KK. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N Engl J Med* 1980;303:601-7.
8. Sturm-Ramirez K, Gaye-Diallo A, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000;182:467-73.
9. Schwebke JR. Role of vaginal flora as a barrier to HIV acquisition. *Curr Infect Dis Rep* 2001;3:152-5.
10. Chernes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association with acquisition of herpes

- simplex virus type 2 in women with bacterial vaginosis. Clin Infect Dis 2003;37:319-25.
11. Cauci S, Thorsen P, Schendel DE, Bremmelgaard A, Quadrifoglio F, Guaschino S. Determination of immunoglobulin A against *Gardnerellavaginalis* hemolysin, sialidase, and prolidase activities in vaginal fluid: implications for adverse pregnancy outcomes. J Clin Microbiol 2003;41:435-8.
 12. Marconi C, Donders GG, Parada CMGL, Giraldo PC, Silva MG. Do *Atopobiumvaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? Sex Transm Infect 2013;89:167-73.
 13. Santiago GL, Deschaght P, El Aila N, et al. *Gardnerellavaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. Am J Obstet Gynecol 2011;204:e1-7.
 14. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med 1983;74:14-22.
 15. Klebanoff MA, Schwebcke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. Obstet Gynecol 2004;104:267-72.
 16. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991;29:297-301.
 17. Guédou FA, Damme LV, Deese J, et al. Intermediate vaginal flora and bacterial vaginosis are associated with the same factors: findings from an exploratory analysis among female sex workers in Africa and India. Sex Transm Infect 2014;90:161-4.
 18. Cauci S, Hitti J, Noonan C, et al. Vaginal hydrolytic enzymes, immunoglobulin A against *Gardnerellavaginalis* toxin, and risk of early preterm birth among women in preterm labor with bacterial vaginosis or intermediate flora. Am J Obstet Gynecol 2002;187:877-81.
 19. Guédou FA, Damme LV, Mirembé F, et al. Intermediate vaginal flora is associated with HIV

- prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants screened for a randomised controlled trial. *Sex Transm Infect* 2012;88:545–51.
20. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PlosOne* 2010;5:e10197.
 21. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21;355-73.
 22. Marconi C, Donders GG, Martin LF, et al. Chlamydial infection in a high risk population: association with vaginal flora patterns. *Arch Gynecol Obstet* 2012;285:1013-8.
 23. Ho BS, Feng WG, Wong BK, Egglestone SI. Polymerase chain reaction for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples. *J Clin Pathol* 1992;45:439-42.
 24. Zariffard MR, Saifuddin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34:277-81.
 25. Smits TH, Devenoges C, Szyński K, Maillard J, Holliger C. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *J Microbiol Methods* 2004;57:369-78.
 26. Marconi C, Donders GG, Bellen G, Brown DR, Parada CM, Silva MG. Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;167:205-9.
 27. Ness RB, Hillier S, Richter HE, et al. Can known risk factors explain racial differences in the occurrence of bacterial vaginosis? *J Natl Med Assoc* 2003;95:201-12.
 28. Koumans EH, Stemberg M, Bruce C, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United states, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis* 2007;34:864-9.

29. Manta FSN, Pereira R, Vianna R, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PlosOne* 2013;8e75145.
30. Jones FR, Miller G, Gadea N, et al. Prevalence of bacterial vaginosis among young women in low-income populations of coastal Peru. *Int J STD AIDS* 2007;18:188-92.
31. Smart S, Singal A, Mindel A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* 2004;80:58-62.
32. Guédou FA, Van Damme L, Deese J, et al. Behavioural and medical predictors of bacterial vaginosis recurrence among female sex workers: longitudinal analysis from a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis.* 2013;13:208.
33. Beigi RH, Yudin MH, Cosentino L, Meyn LA, Hillier SL. Cytokines, pregnancy, and bacterial vaginosis: comparison of levels of cervical cytokines in pregnant and nonpregnant women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2007;196:1355-60.
34. Gondo F, da Silva MG, Polettini J, et al. Vaginal flora alterations and clinical symptoms in low-risk pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 2011;71:158-62.
35. Cauci S, Guaschino S, De Aloysio D, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1b and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod* 2003;9:53-8.
36. Marconi C, Santos-Greatti MM, Parada CM, et al. Cervicovaginal levels of proinflammatory cytokines are increased during chlamydial infection in bacterial vaginosis but not in lactobacilli-dominated flora. *J LowGenitTractDis.* 2014;18:261-5.
37. Basso B, Giménez F, López C. IL-1beta, IL-6 and IL-8 levels in gynecologic infections. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005;13:207-11.

38. Mattsy-Baltzer I, Platz-Christensen JJ, Hosseini N, Rosén P. IL-1beta, IL-6, TNF alpha, fetal fibronectin, and endotoxin in lower genital tract of pregnant women with bacterial vaginosis. *ActaObstetGynecolScand* 1998;77:701-6.
39. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002;109:34-43.
40. Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 2006;193:556-62.
41. Weissenbacher T, Walter C, Mylonas I, Scholz C, Gingelmaier A, Friese K. Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. *Arch GynecolObstet* 2010;281:77-80.
42. Nikolaitchouk N, Andersch B, Falsen E, Strömbeck L, Mattsby-Baltzer I. The lower genital tract microbiota in relation to cytokine, SLPI and endotoxin levels: application of checkerboard DNA-DNA hybridization (CDH). *APMIS* 2008;116:263–77.
43. Spear GT, Kendrick SR, Chen HY. Multiplex immunoassay of lower genital tract mucosal fluid from women attending an urban STD clinic shows broadly increased IL1beta and lactoferrin. *Plos One* 2011;6:e19560.
44. Cauci S, Guaschino S, Driussi S, De Santo D, Lanzafame P, Quadrifoglio F. Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against *Gardnerellavaginalis* hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2002;185:1614-20.
45. Spear GT, Zariffard MR, Cohen MH, ShaBEVaginal IL-8 levels are positively associated with *Candida albicans* and inversely with lactobacilli in HIV-infected women. *JReprodImmunol*. 2008;78:76-9.

46. Mitchell C, Hitti J, Paul K, et al. Cervicovaginal shedding of HIV type 1 is related to genital tract inflammation independent of changes in vaginal microbiota. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:35-9.
47. Genc MR, Witkin SS, Delaney ML, et al. A disproportionate increase in IL-1 over IL-1ra in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth. *Am J ObstetGynecol* 2004;190:1191-7.
48. Romero R, Hassan SS, Gajer P, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2014;2:4.
49. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, et al. Hydrolysis of the secreted sialoglycoprotein Immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J BiolChem* 2012;287:2079-89.
50. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during, and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* 2013;1:29.
51. Lambert JA, John S, Sobel JD, Akins RA. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: recognition of the conversion process. *Plos One* 2013;8:e82599.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 02 de agosto de 2010.

Of. 353/10-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª. Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3629-2010) "Estudo dos parâmetros da resposta imunidade inata local e das enzimas hidrolíticas bacterianas em mulheres com vaginose bacteriana", a ser conduzido por Mariana Morena de Vieira Santos Greatti, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02/08/2010.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora para participar da pesquisa **“Estudo dos parâmetros da resposta imune inata local e das enzimas hidrolíticas bacterianas em mulheres com vaginose bacteriana”**, que tem por objetivo analisar alguns aspectos relacionados à infecção genital denominada Vaginose Bacteriana e suas variações presentes nos diferentes casos das mulheres atendidas nos ambulatórios de Ginecologia do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Sua participação implicará em responder as questões da entrevista, e submeter-se a exame ginecológico, que serão realizados pelos clínicos durante a consulta. Para o exame ginecológico, será necessária a introdução de um aparelho de metal, estéril, conhecido como “bico de pato” (espéculo), que afastará as paredes vaginais, a fim de permitir a visualização das mesmas e do colo do útero, bem como a coleta de amostras (secreção) para exames laboratoriais. O material da parede vaginal e do colo do útero será coletado por meio de um cotonete, para verificação dos tipos de bactérias presentes. Será, também, realizada coleta de material cérvico vaginal através da lavagem do local com solução fisiológica. Esta pesquisa é de responsabilidade da doutoranda Camila Marconi, sob orientação da Profª Drª. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e com a colaboração da Profa. Adjunta Anaglória Pontes, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Pelo presente instrumento, eu _____
devidamente esclarecida, ciente dos procedimentos aos quais serei submetida, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, e ciente, também, de que as informações serão utilizadas exclusivamente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste Hospital**, firmo meu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta.

Esse documento, após aprovação do CEP, será elaborado em duas vias, sendo uma entregue a paciente pesquisada e outra será mantida em arquivo pela pesquisadora.

Botucatu, _____ de _____ de 2010.

Assinatura da paciente

Mariana M. de V. S. Greatti
Rua José Quintiliano Alves, nº 74
Jardim Boa Vista, Avaré, SP
Fone: 14 37312003
e-mail: mariana_morena@hotmail.com

Profª. Drª. Márcia G. da Silva
Rua Izidoro Bertaglia, 746
Jd. Chácara dos Pinheiros, Botucatu, SP
Fone: 14 3814-2417
e-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Questionário de coleta

Nome.....

RG

Idade

Etnia: Branca Não-branca

Estado civil: União-estável Solteira

Escolaridade (anos na escola).....

Profissão.....

Fumante Sim Não Cigarros/dia (no ano anterior):.....

Antecedentes ginecológicos:

Número de parceiros sexuais (1 ano): 1 2 > 2

Frequência de relações sexuais.....

Data do último coito:

História de VB anterior.....

História de DST anterior.....

Métodos contraceptivos (4 meses anteriores):

DIU Pílula/Tipo..... Outro

Antecedentes obstétricos:

Paridade: Nulípara Multípara

Intercorrências em gestações anteriores (parto prematuro, rotura prematura de membranas, aborto espontâneo, morte fetal):

pH: Whiff: GRAM:

Responsável pela coleta