

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VAGINOSE BACTERIANA: IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE *ATOPOBIUM VAGINAE*,  
*LEPTOTRICHIA SP* E *MEGASPHAERA SP***

**Thalita de Almeida Tavares**

Monografia apresentada ao  
Instituto de Biociências, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP  
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VAGINOSE BACTERIANA: IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE *ATOPOBIUM VAGINAE*,  
*LEPTOTRICHIA SP* E *MEGASPHAERA SP***

**Thalita de Almeida Tavares**  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao  
Instituto de Biociências, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas

BOTUCATU – SP  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Tavares, Thalita de Almeida.

Vaginose Bacteriana: Identificação e quantificação de *Atopobium vaginae*,  
*Leptotrichia* sp e *Megasphaera* sp / Thalita de Almeida Tavares - Botucatu,  
2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40103005

1. Ciências médicas. 2. Medicina familiar. 3. Vaginose bacteriana.

Palavras-chave: Gestação; PCR Tempo Real; Quantificação bacteriana;  
Vaginose bacteriana.

## Dedicatória

Dedico este trabalho, toda minha formação acadêmica, os sucessos alcançados e aqueles que não de vir a *Deus*, que sempre me acompanhou e me deu força e vontade de vencer; ao meu pai por ter conseguido deixar marcas positivas e bons pensamentos mesmo em tão pouco tempo e, claro, à minha mãe, a mãe guerreira que fez o muito do pouco e sempre me incentivou a correr atrás do que queria. A vocês que me trouxeram até aqui!

Ainda comemoraremos muito nessa vida!

## Agradecimentos

Esse trabalho de poucas páginas representa meus quatro anos de graduação, os anos anteriores à faculdade e todas as pessoas que me envolveram nessa longa caminhada até me tornar o que sou hoje: uma Biomédica em desenvolvimento. Por isso, dedico esse espaço para agradecer àqueles que me ajudaram.

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Márcia Guimarães da Silva, que é um dos meus exemplos por exercer vários papéis e todos com excelência: lecionar, pesquisar, administrar, ser esposa, mãe e muitos outros que desconheço. Agradeço à Camila por dividir comigo o que sabe e por ter orientado talvez a mais confusa e difícil das alunas e por servir de exemplo pra mim. A todas as *gírls* do laboratório mais rosa e feminino da UNESP, pela paciência, pelos conselhos, ajudas e ensinamentos: Carol, Jô, Mam's, Bru, Mari, Fran, Kaskatynha. Um abraço especial na Laura, companheira de vááárias coisas (inclusive de roupas) e por sempre, de algum jeito, ter me feito rir. E um agradecimento especial pra Top's, já que essa mulher já vem marcando minha vida desde o 1º ano: quem já me deu medo (bixete assustada) e hoje é minha companheira, exemplo e que muitas vezes me acudiu!

Aos meus queridos amigos da Federal. Sim, boa parte desse trabalho veio das milhões de conversas e dos (ótimos) exemplos de vida que vocês me deram (sem contar os risos): Pat, Bru, Carol, Elvis, Marcela, Cecê, Feliz, Dé, Chinelo, Tita, Ivan, Césinha,

A toda minha família, meus tio, tias (as mais engraçadas fofocas e conversas), vó (minha veinha), vô, primos sempre lindos por quem sou apaixonada: Naná, Nino, Vitinho e Tél!, aos quase irmãos: Vini e Jé, às novas anjinhas: Rafa e Fernandinha. Meus irmãos, Thiago, por ter me ajudado a crescer e ter sido sempre meu exemplo de homem e Alan, por ter sido sempre meu irmãozinho confidente. Minha mãe: a mais lutadora de todas as mulheres que conheço.

À minha família botucuda, pois juntos crescemos, enfrentamos dificuldades e sempre venceremos. Vocês foram meu suporte aqui e quando eu caí, foram vocês que me ajudaram a andar, cada um da sua forma especial que tenho certeza que sabem. De longe as maiores risadas, diversões e momentos de felicidade juntos. E a certeza que isso não acaba: Jow, Bru, Japa, Lê, Kita, Amandi, Rê, Sol,

À minha tutora do PET e conselheira da vida: Cláudia Helena Pellizzon, a ela e todos meus amigos do PET-CBB, com quem construí (na minha opinião) meus maiores e mais importantes conhecimentos desses anos todos de graduação e enumerá-los seria maior que as reuniões dos xwevers-Pet da vida =). Alguns petianos especiais por terem me marcado e ensinado muito: Assaí, Japa (de novo!), Carni, Farras, Quia, Zuca.

Ao Quasi por ter aparecido no momento certo, ter me ajudado nesse último ano, por ser meu apoio sempre, por todas as mil risadas e milhões de sorrisos. Por ser meu amigo, confidente e namorado. Nessa fase de término de curso em que surtos eram frequentes, foi quem teve paciência, sempre foi perpicaz e me ajudou chegar até aqui.

Ao profº Wilson, pela paixão que demonstrou por ensinar; à Biomed XLIII pelas muitas risadas; à drª Luciane Kershe e às enfermeiras do CSE Vila dos Lavradores que colaboraram no trabalho e sempre me ajudaram; à profª Marli Teresinha Cassamassimo Duarte e todas as envolvidas no projeto de Belém, essencial para que este trabalho fosse realizado; a todo o departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Agradeço a **Deus** por trilhar mais um passo da minha vida. Vibrações positivas para todos nós.



## Sumário

1. Resumo.....	2
2. Introdução .....	3
3. Objetivo.....	10
4. Material e Métodos .....	10
4.1. Desenho do estudo.....	10
4.2.Casuística .....	10
4.3. Protocolo de atendimento .....	11
4.4. Colheita do material .....	11
4.5. Avaliação microscópica do conteúdo vaginal.....	12
4.5.1. Exame a fresco .....	12
4.5.2. Coloração de Gram.....	12
4.6. Detecção e quantificação relativa de <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Leptotrichia</i> sp. e <i>Megasphaera</i> sp. por PCR em Tempo Real.....	13
4.6.1.Extração do DNA bacteriano.....	13
4.6.2. Protocolo de amplificação .....	13
4.7. Análise Estatística.....	14
5. Resultados .....	15
6. Discussão .....	21
7. Referências Bibliográficas.....	25
8-Anexos.....	29
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	29
Anexo 2. Protocolo de Pesquisa .....	31
Anexo 3. Pedido de realização de bacterioscopia do esfregaço vaginal .....	32

## 1. Resumo

A vaginose bacteriana (VB) é a alteração de flora vaginal mais freqüente em mulheres em idade fértil e se caracteriza pela substituição dos lactobacilos por outras espécies bacterianas. Inúmeras complicações ginecológicas e obstétricas estão associadas à VB, como a doença inflamatória pélvica, o aumento da vulnerabilidade à aquisição do HIV, a corioamnionite clínica e histológica e o baixo peso ao nascimento. Estudos recentes demonstraram que várias espécies até então raramente ou nunca isoladas em laboratório são associadas à VB. O Objetivo desse estudo foi avaliar a freqüência de isolamento de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp. em gestantes com vaginose bacteriana. Foi realizado um estudo de corte transversal prospectivo. Foram incluídas no estudo 88 gestantes com diagnóstico de VB, atendidas no Centro de Saúde Escola da UNESP no período de janeiro a setembro de 2010. Durante o exame especular e utilizando-se zaragatoas estéreis, foram coletadas amostras da parede vaginal para a confecção dos esfregaços vaginais em lâminas. O exame a fresco foi utilizado para o diagnóstico de vaginite aeróbia, de acordo com os critérios descritos por Donders et al. (2002). Os esfregaços vaginais corados pelo método de Gram, foram utilizados para o diagnóstico de flora normal, intermediária e VB de acordo com os critérios de Nugent et al. (1991). Em seguida, 5 mL de solução fisiológica foi injetada com seringa estéril na parede vaginal posterior, e após homogeneização dessa solução com o auxílio de espátula, o conteúdo foi coletado. Os lavados vaginais coletados foram centrifugados e os *pellets* armazenados para posterior detecção de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp. pela técnica de PCR em tempo real. Do total das 88 amostras de VB, 46 (52,3%) foram positivas para os 3 microrganismos pesquisados e apenas 5 amostras (5,7%) foram negativas para todos. A espécie mais freqüentemente detectada foi *Atopobium vaginae*, com 89,8%, seguida por *Megasphaera* sp. e *Leptotrichia* sp. em 81,8% e 59,1% das amostras, respectivamente. A freqüência de isolamento *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp., *Megasphaera* sp. é alta em pacientes com VB e não apontam para possível participação benéfica dessas espécies na flora vaginal.

## 2. Introdução

O aspecto do conteúdo vaginal é extremamente variável entre as mulheres e também difere individualmente dependendo de fatores como idade, status hormonal, hábitos de higiene, presença de infecções, entre outros. Normalmente o conteúdo vaginal é composto por secreções vulvares das glândulas sebáceas e sudoríparas, como as de Bartholin e Skene, transudato proveniente da parede vaginal, células de descamação, muco cervical, além da importante presença de microrganismos da flora vaginal e de seus produtos metabólicos.<sup>1</sup> O epitélio vaginal é composto por células que respondem a estimulação hormonal de estrogênio e progesterona. As células do tipo superficiais são as mais freqüentemente encontradas no conteúdo de mulheres em idade fértil, já que prevalecem na presença de estimulação estrogênica<sup>1</sup>. Essas células também têm como característica o armazenamento de glicogênio, importante na manutenção da microbiota vaginal.<sup>2</sup>

A flora vaginal normal é um dinâmico e complexo exemplo de colonização microbiana, cuja regulação ainda não é completamente entendida<sup>3</sup>. É predominantemente colonizada por bactérias aeróbias e em mulheres em idade fértil encontra-se predomínio de espécies de *Lactobacillus spp*<sup>1,2</sup>. Os lactobacilos são bacilos longos Gram positivos quem crescem em meio ácido<sup>2</sup>. As espécies de lactobacilos possuem um metabolismo estritamente fermentativo de carboidratos<sup>4</sup>, como o glicogênio que é armazenado nas células epiteliais descamativas<sup>2</sup>; como resultado há a produção de ácido láctico que desempenha importante papel na manutenção do

---

pH vaginal entre 3,5 e 4,5<sup>4</sup>. Atribui-se o efeito protetor dos lactobacilos contra o crescimento de outras espécies bacterianas ao processo de acidificação da vagina<sup>4</sup> e também à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>4</sup>.

Apesar dos lactobacilos serem dominantes na flora vaginal normal, outros microrganismos podem estar presentes, desde que em menor número. Vários outros gêneros como *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Enterococcus* e *Mycoplasma* podem compor a flora vaginal normal, desde que em menor quantidade que as espécies de lactobacilos<sup>5</sup>. Nos casos onde é observada a diminuição, ou até mesmo substituição dos lactobacilos, acompanhado por aumento na colonização por outras espécies bacterianas, em sua maioria anaeróbios<sup>2,4</sup>, desenvolve-se uma flora vaginal anormal - a vaginose bacteriana (VB).

A VB é uma importante alteração na microbiota vaginal e é a causa mais comum de conteúdo vaginal anormal em mulheres em idade fértil<sup>6,7</sup>. Esta alteração de flora vaginal é considerada uma infecção polimicrobiana já que seu desencadeamento não está relacionado à único microrganismo, mas a um conjunto heterogêneo de espécies bacterianas.

A prevalência de mulheres com VB, no mundo, varia entre 5,8% a 24,4%,<sup>8,9</sup>. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de correlacionar o desenvolvimento de VB com características étnicas entre outras variáveis. Já foi demonstrado que a VB é mais comum em mulheres negras<sup>3</sup>, nas que fumam<sup>9</sup>, nas mulheres sexualmente ativas<sup>10</sup> e que fazem uso de ducha vaginal<sup>4</sup>. Níveis sócio-econômicos mais baixos também têm sido associados à VB em vários estudos<sup>9</sup> apesar de não se ter uma razão clara para essa alteração.

A importância da VB se dá não somente pela sua grande prevalência nas diferentes populações, mas também pelas complicações obstétricas e ginecológicas associadas à doença, incluindo doença inflamatória pélvica<sup>9</sup> e associação com aumento na aquisição de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) como cervicites por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*<sup>11</sup>, além de infecção por *Trichomonas vaginalis*<sup>12</sup> e HIV<sup>13</sup>. Já durante a gravidez, estudos indicam que a prevalência de VB varia entre 5% e 26%<sup>9</sup>. Wilks et al.<sup>2</sup> identificaram alto nível de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por lactobacilos provenientes de mulheres grávidas. Sendo assim, foi demonstrado que esses microrganismos atuam como protetores contra aquisição de VB, corioamnionite e prematuridade. Inúmeros estudos já confirmaram a relação de VB diagnosticada durante a gestação e ocorrência de corioamnionite<sup>2,3</sup>, infecção intra-amniótica<sup>9</sup>, parto pré-termo<sup>2,12</sup> com e sem rotura prematura de membranas<sup>14</sup> e baixo peso ao nascimento<sup>9,14</sup>. Embora outros estudos tenham demonstrado que o tratamento de VB com antibióticos durante a gestação não diminui o risco de mau prognóstico gestacional<sup>3</sup>, ainda é recomendando a busca por VB em gestantes com mau passado obstétrico.

Clinicamente a VB pode ser caracterizada por conteúdo vaginal fino branco e homogêneo e odor fétido, causado pela produção de aminas, e são freqüentes motivos pelos quais mulheres procuram serviço médico. No entanto, as alterações microbiológicas compatíveis com VB são detectadas freqüentemente na ausência desses sintomas clínicos, sendo que 50% das mulheres diagnosticadas com VB são assintomáticas<sup>15</sup>.

A VB pode ser diagnosticada pela presença de pelo menos três dos quatro critérios propostos por Amsel<sup>16</sup>. Os critérios são: pH elevado (>4.5),

---

conteúdo vaginal homogêneo de cor branca, liberação de aminas com adição de solução de hidróxido de potássio (*whiff test*), e a presença de *clue cells* na avaliação microscópica do esfregaço vaginal a fresco<sup>16</sup>. No entanto o método mais recomendado para o diagnóstico da VB é análise microscópica do esfregaço vaginal corado pelo método de Gram, conforme Nugent et al.<sup>17</sup>. O diagnóstico por esse método é rápido e relativamente simples e é considerado padrão-ouro pela sua reprodutibilidade e sensibilidade.

Embora alguns fatores tenham sido relacionados ao desenvolvimento da VB, sua patogenia é pouco conhecida, de modo que ainda não se conhece qual é o fator desencadeante da transição da microbiota vaginal normal para VB. Ou seja, ainda não foi estabelecido se o desaparecimento das espécies de lactobacilos é um evento precedente à instalação da VB ou se esta é consequência secundária à perturbação da flora vaginal, que levaria a mudanças no microambiente vaginal, como aumento do pH, não favoráveis à persistência dos lactobacilos.

Muitas espécies bacterianas podem ser isoladas do conteúdo vaginal de mulheres com VB, sendo observada grande diversidade entre as espécies isoladas nos diferentes casos<sup>18</sup>. Durante as últimas décadas, vários estudos foram realizados na tentativa de definir o padrão de espécies bacterianas associadas à VB utilizando cultura do conteúdo vaginal<sup>19</sup>. Embora alguns microrganismos tenham sido associados à VB, como *Gardnerella vaginalis*<sup>20</sup>, *Mobiluncus curtisi*<sup>21</sup>, *Mycoplasma hominis*<sup>22</sup>, essas espécies também podem ser encontradas colonizando o TGI de mulheres com microbiota normal<sup>19,23</sup>, portanto o simples isolamento dessas espécies não é útil para o diagnóstico de VB. Além disso, deve-se ressaltar que os estudos que utilizaram cultura vaginal

---

como método para avaliação microbiológica da VB podem ter apresentado resultados incompletos quanto a real composição da microbiota vaginal<sup>24</sup>, já que apenas pequena porcentagem de espécies bacterianas pode ser cultivada em laboratório<sup>25</sup>.

Considerando que muitos aspectos relacionados ao desenvolvimento da VB ainda são desconhecidos, é possível que grandes avanços sejam possíveis com base nos resultados de estudos recentes, empregando técnicas moleculares para detecção e quantificação dos microrganismos presentes na microbiota vaginal<sup>24,26,27</sup>. Esses estudos já demonstraram que existe maior diversidade dentre as espécies bacterianas presentes em casos de VB quando comparados à microbiota vaginal normal<sup>27</sup>. Além disso, verificou-se que existe correlação entre contagem bacteriana total presente no conteúdo vaginal, em Unidades Formadoras de Colônia (UFC), e o *score* dos esfregaços vaginais<sup>28</sup>, segundo a classificação de Nugent et al.<sup>17</sup>.

Os métodos moleculares utilizados para caracterização dos microrganismos presentes na microbiota vaginal permitiram a identificação de inúmeras espécies bacterianas até então nunca detectadas em culturas do conteúdo vaginal<sup>26,27</sup>. Somado a isso, foram encontradas novas espécies de microrganismos associadas à VB, como *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp, *Megasphaera* sp., entre outros. Apesar de relevantes as informações quanto à associação dessas espécies aos casos de VB, deve-se ressaltar que esses microrganismos também são detectados no conteúdo vaginal de mulheres apresentando padrão normal da microbiota vaginal<sup>26,27,28</sup>.

A realização de estudos empregando metodologia de clonagem seguida de seqüenciamento gênico para identificação das espécies presentes

nos casos de VB, permitiu grande avanço para determinação exata dos microrganismos presentes nesse ambiente. Zhou et al.<sup>24</sup>, utilizando essa metodologia para a avaliação da composição da microbiota vaginal de mulheres sem qualquer infecção do TGI, demonstraram que, nem sempre, os *Lactobacillus* sp são predominantes em mulheres normais, já que foram observadas microbiotas vaginais com predominância de espécies associadas à VB como *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp. Extremamente relevante é a informação de que essas espécies são produtoras de ácido lático, componente fundamental do microambiente vaginal, por reduzir o pH e, conseqüentemente, inibir o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos<sup>24,29</sup>. Dessa forma, Zhou et al.<sup>24</sup> afirmam que a manutenção do pH ácido apresenta maior importância para a conservação da microbiota vaginal normal do que a diversidade das espécies bacterianas em sua composição. Essa observação pode explicar a razão pela qual mulheres assintomáticas e saudáveis apresentam ausência de lactobacilos nos esfregaços vaginais<sup>30</sup>.

A espécie *Atopobium vaginae* foi descrita somente em 1999<sup>29</sup>. Esse microrganismo tem morfologia variável, de cocos alongados até bacilos, ambos Gram-positivos, e podem se apresentar isolados, em pares ou em pequenas cadeias. Crescem em placas de ágar-sangue incubadas em anaerobiose a 37°C como pequenas colônias, porém seu isolamento a partir de materiais clínicos é ainda difícil. Embora já tenha sido verificada sua presença na microbiota de mulheres normais<sup>24</sup>, muitos estudos têm demonstrado que o *A. vaginae* é mais freqüentemente encontrado na microbiota vaginal de pacientes com VB e têm sugerido importante papel dessa espécie na patogênese dessa

alteração de flora<sup>26,31</sup>. A detecção do *A. vaginae* no conteúdo vaginal apresenta alto valor preditivo para o diagnóstico de VB<sup>26,27,32</sup>, principalmente quando há co-deteção de *Gardnerella vaginalis*<sup>26,32</sup>. Outro importante aspecto relacionado ao *A. vaginae* é a grande porcentagem de pacientes que apresentam recorrência da VB quando na sua presença<sup>32</sup>, o que pode ser explicado pelas altas taxas de resistência apresentadas por essa espécie ao metronidazol, tratamento mais utilizado para a VB<sup>33</sup>.

As recentes análises das seqüências do gene RNAr 16S dos microrganismos presentes no conteúdo vaginal também permitiram a identificação de novas espécies presentes na microbiota vaginal de mulheres com VB, como *Megasphaera* sp. e *Leptotrichia* sp.<sup>27</sup>. Essas espécies, assim como o *A. vaginae*, também são produtoras de ácido láctico, contribuindo para manutenção do baixo pH vaginal. Além da associação de presença de *Megasphaera* sp. e *Leptotrichia* sp. com a VB, Fredricks et al.<sup>34</sup> demonstraram que a presença dessas duas espécies, somada à de *Atopobium* sp, apresenta maiores valores de sensibilidade para o diagnóstico de VB quando comparada aos critérios de Amsel<sup>16</sup> et al. e Nugent et al.<sup>17</sup>, que são amplamente utilizados. Entretanto Witkin et al.<sup>30</sup> propõem que essas espécies, da mesma forma que os lactobacilos, são capazes de manter o pH vaginal ácido e inibir proliferação de microrganismos patogênicos. Portanto, mulheres que apresentam microbiota com ausência de lactobacilos, mas com pH vaginal ácido mantido por outras espécies produtoras de ácido láctico, não deveriam ser incluídas no grupo de pacientes com VB clássica.

Sabendo a realidade da maioria dos laboratórios de diagnósticos, os métodos preconizados por Amsel et al.<sup>16</sup> e Nugent et al.<sup>17</sup> devem continuar

---

sendo utilizado para o diagnóstico de VB, dada a fácil execução e baixos custos desses métodos quando comparados com técnicas moleculares. No entanto, tendo em vista a grande importância da determinação real das espécies bacterianas envolvidas na VB para a melhor compreensão de sua fisiopatologia e possíveis prejuízos à saúde da mulher, a técnica de PCR quantitativa constituiu a melhor opção metodológica para a realização de estudos com esse objetivo.

### 3. Objetivo

Avaliar a frequência de isolamento de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp. em gestantes com vaginose bacteriana.

### 4. Material e Métodos

#### 4.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal prospectivo. Foram incluídas no estudo as gestantes com diagnóstico de VB atendidas no Centro de Saúde Escola, UNESP Botucatu. O cálculo amostral foi baseado no total de casos novos/ano no referido serviço, bem como a estimativa de prevalência de 30% de VB. O tamanho amostral calculado foi de 100 gestantes.

#### 4.2. Casuística

Foram incluídas 88 gestantes atendidas no Centro de Saúde Escola, UNESP Botucatu, no período de janeiro a setembro de 2010. As pacientes

---

incluídas foram previamente esclarecidas quanto à natureza do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Responderam também ao questionário para informações de dados pessoais, grau de escolaridade, hábitos tabagistas, comportamento sexual, história de DST anterior, além de dados relativos à gestação atual e anteriores, se fosse o caso (Anexo 2). No momento da inclusão no estudo, as pacientes obedeceram aos seguintes critérios: ausência de tratamento de qualquer infecção do trato genital inferior no período de 40 dias; 72 horas de abstinência sexual e de procedimentos vaginais como toque digital e ultrassom vaginal. Também foram excluídas desse estudo pacientes com infecção urinária, candidíase ou tricomoníase associadas à VB.

#### ***4.3. Protocolo de atendimento***

Após o atendimento e antes de qualquer procedimento vaginal, o conteúdo vaginal foi avaliado quanto à mensuração do pH vaginal e realizado o teste das aminas, através da adição de KOH a 10% ao conteúdo vaginal. Esses dados juntamente com outras informações relevantes dos aspectos clínicos das pacientes foram anotados em formulário especificamente construído para o estudo (Anexo 3).

#### ***4.4. Colheita do material***

Utilizando-se zaragatoas estéreis, foram coletadas amostras do terço médio da parede vaginal para a confecção de dois esfregaços vaginais em lâminas. Uma lâmina foi utilizada para realização do exame microscópico a

---

fresco e a outra foi corada pela técnica de Gram para avaliação do padrão de flora vaginal.

Em seguida, um volume de 5 mL de solução fisiológica foi injetado com seringa estéril na parede vaginal posterior, e após homogeneização dessa solução com o auxílio de espátula, o conteúdo foi coletado cuidadosamente com a mesma seringa, evitando o contato com o intróito vaginal. Os lavados vaginais coletados foram centrifugados a 8000g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes e *pellets* armazenados separadamente a -70°C até o momento do processamento.

#### ***4.5. Avaliação microscópica do conteúdo vaginal***

##### **4.5.1. Exame a fresco**

Após adição de solução fisiológica ao esfregaço vaginal, o conteúdo foi avaliado quanto à presença de células epiteliais, morfotipos bacterianos, presença de polimorfonucleares, *clue cells* e elementos micóticos. Também foi utilizado para o diagnóstico de vaginite aeróbia, de acordo com os critérios descritos por Donders et al.<sup>35</sup>. A tricomoníase vaginal foi diagnosticada pela visualização do protozoário *Trichomonas vaginalis* na preparação a fresco.

##### **4.5.2. Coloração de Gram**

Através das observações da morfologia, coloração e quantidade dos microrganismos observados, foram atribuídos escores, segundo critérios de Nugent et al.<sup>17</sup>, para classificação de flora Normal (1-3), flora Intermediária (4-6) e vaginose bacteriana (igual ou >7).

#### *4.6. Detecção e quantificação relativa de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia sp.* e *Megasphaera sp.* por PCR em Tempo Real*

##### 4.6.1.Extração do DNA bacteriano

O DNA bacteriano total foi extraído dos *pellets* dos lavados vaginais armazenados. Os procedimentos para extração foram realizados utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante, aplicando as modificações necessárias para adequação às condições laboratoriais. Após a extração, todas as amostras foram diluídas para obtenção de concentração final de DNA de 100ng/μL, em Epoch® (Biotek, VT, USA).

##### 4.6.2. Protocolo de amplificação

As reações foram realizadas em volumes finais de 25μL contendo 12,5μL de Sybr Fermentas®, 1μL do *primer* F, 1μL do *primer* R e 2μL de amostra. O protocolo de incubação consistiu em 95° C por 10 minutos, seguindo por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos, 60° C por 30 segundos e 72 por 30 segundos em termociclador Bioer®. Os dados referentes a fluorescência emitida durante a amplificação foram captados pelo software LineGeneK (Versão 4.1.00), onde são feitas as análises dos dados de cada reação.

As amostras nas quais se observou emissão de fluorescência e, portanto, a confirmação da presença de amplificados foram selecionadas. Um total de 10 amplificados de amostras distintas, para cada microrganismo em

questão, foi aplicado em gel de agarose 1,5% e submetida à eletroforese. Em seguida, foi verificado que os *amplicons* estavam de acordo com os descritos para cada par de *primers* específicos utilizados (Tabela 1).

**Tabela 1.** *Primers* para as espécies *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp., *Megasphaera* sp. e do gene bacteriano RNAr 16S<sup>27</sup>.

Espécie	Nome	Sequência Iniciadora	Tamanho
<i>Atopobium vaginae</i>	Atop582F	5'- TAGGCGGTYTGTTAGGTCAGGA-3'	81bp
	Atop665R	5'- CCTACCAGACTCAAGCCTGC-3'	
<i>Megasphaera</i> sp.	MegaE-456F	5'- GATGCCAACAGTATCCGTCCG-3'	211bp
	MegaE-667R	5'-CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA-3'	
<i>Leptotrichia</i> sp.	Lepto-395F	5'CAATTCTGTGTGTGTGAAGAAG-3'	251bp
	Lepto-646R	5'-ACAGTTTTGTAGGCAAGCCTAT-3'	
RNAr 16S bacteriano	Eub341F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	193bp
	Eub534R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'	

#### 4.7. Análise Estatística

Os dados relativos à mensuração do pH vaginal de acordo com a classificação da flora em escores e em relação aos microrganismos detectados foram submetidos ao teste de análise de variância e Mann Whitney, respectivamente. A idade gestacional, no momento da inclusão no estudo, foi comparada entre as gestantes com episódio de vaginose bacteriana positiva

---

para *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp ou sem detecção de pelo menos uma das espécies pesquisadas, empregando-se o teste de Mann Whitney. A positividade do teste das aminas assim como a positividade de *C. trachomatis* foram submetidos ao teste de Qui-quadrado. O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5%<sup>23</sup>. O software utilizado para as análises foi o SigmaStat 9.0.

## 5. Resultados

As características sócio-demográficas, bem como dados ginecológicos e obstétricos das 88 pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 2. A média de idade das gestantes foi de 17,7 anos, com média de escolaridade de 6,9 anos. A maioria das pacientes incluídas era nulípara (63,6%), não fumantes (93,2%) e apresentaram único parceiro no ano anterior à inclusão no estudo (68,2%).

Todas as 88 pacientes gestantes incluídas nesse estudo apresentaram padrão de flora vaginal compatível com VB na análise microscópica considerando os critérios de Nugent et al.<sup>17</sup> bem como ausência de candidíase e tricomoníase.

A mensuração do pH, a positividade do teste das aminas e a positividade da cervicite por *C. trachomatis* foram comparadas entre os escores da vaginose bacteriana (Tabela 3) e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada através da comparação entre episódios de VB escore 8 com episódios de VB escores 9 ou 10, cuja definição se dá pela presença de morfotipos compatíveis com *Mobiluncus curtisii*. A

positividade total de cervicite por *Chlamydia trachomatis* foi de 37,5% (Tabela 3).

**Tabela 2.** Características das 88 pacientes com vaginose bacteriana incluídas no estudo.

Variáveis	N (%)
<b>Idade*</b>	17.7 ± 4.9
<b>Idade Gestacional*</b>	18s 3d ± 48d
<b>Estado civil</b>	
Solteira	26 (29.5)
União estável	38 (43.2)
NA	24 (27.3)
<b>Escolaridade*</b>	6.9 ± 2.05
<b>Ocupação</b>	
Remunerado	11 (12.5)
Não remunerado	45 (51.1)
NA	32 (36.4)
<b>Tabagismo</b>	
Sim	4 (4.5)
Não	82 (93.2)
NA	2 (2.3)
<b>Nº Parceiros (ano anterior)</b>	
1	60 (68.2)
2	5 (5.6)
>2	4 (3.4)
NA	19 (21.6)
<b>DST anterior</b>	
Sim	3 (3.4)
Não	25 (28.4)
NA	60 (68.2)
<b>Paridade</b>	
Nulípara	56 (63.6)
Multípara	11 (12.5)
NA	21 (23.9)

\* Variáveis expressas em média ± desvio padrão  
NA : Não avaliadas

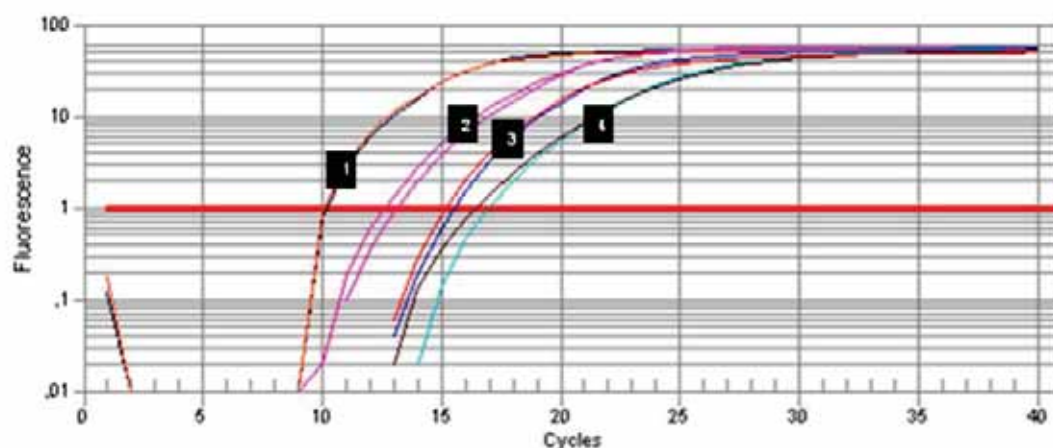
**Tabela 3.** Mensuração do pH, positividade do teste das aminas e positividade de cervicite por *Chlamydia trachomatis* em gestantes com episódio de vaginose bacteriana de acordo com a classificação da flora em escores, segundo Nugent et al.<sup>17</sup>.

	<b>VB Total</b> (N=88)	<b>VB 8</b> (N=69)	<b>VB 9 ou 10</b> (N=19)	<b>p</b>
Mensuração do pH *	4.9±0.2	4.9±0.2	4.8±0.2	0.35
Positividade do teste de aminas n (%) <sup>#</sup>	39 (44.3)	32 (46.4)	7 (36,8)	0.63
Positividade de <i>C. trachomatis</i> n (%) <sup>#</sup>	33 (37.5)	28 (40.6)	5 (26.3)	0.38

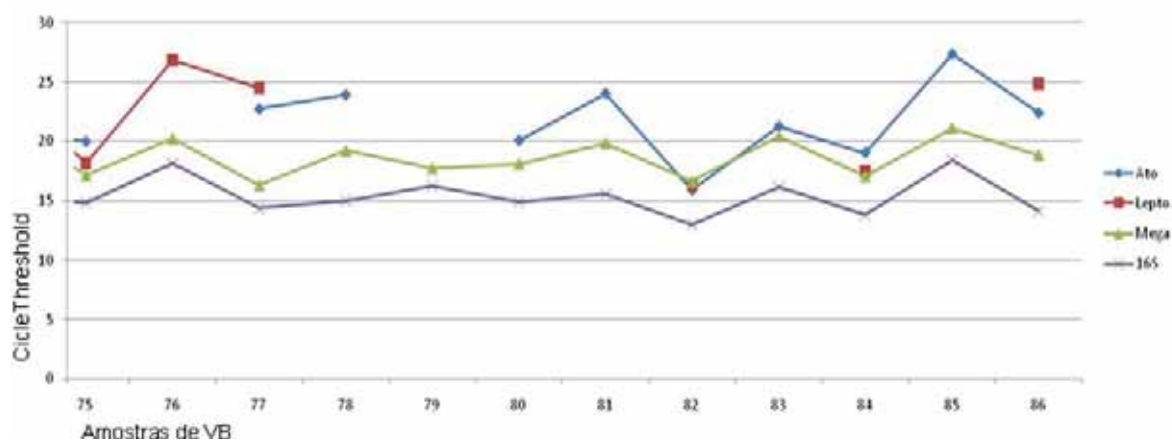
\* Variável expressa em média ± DP; Análise de Variância.

<sup>#</sup> Teste de Qui-quadrado

Para cada amostra de vaginose bacteriana, foram realizadas 4 reações simultâneas para detecção de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp., além da seqüência do gene bacteriano rRNA 16S conservada entre as espécies bacterianas. A Figura 1 representa curvas de amplificações de uma mesma amostra positiva para os genes RNAr 16S das espécies *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp, além da seqüência desse gene conservado entre todas as espécies bacterianas (*primer* EUB). Os valores de *CycleThreshold* (CT) foram, respectivamente, 15,2, 16,6, 12,4 e 9,5, onde menores valores de CT refletem maiores concentrações bacterianas iniciais.



**Figura 1.** Curva de amplificação de PCR em tempo real LineGeneK (Versão 4.1.00), onde Curva 1 – Gene bacteriano RNAr 16S; Curva 2 - *Megasphaera* SP; Curva 3 - *Atopobium vaginae* e Curva 4 - *Leptotrichia* sp, de uma mesma amostra de vaginose bacteriana.



**Figura 2.** Valores de *CycleThreshold* (CT) de PCR em tempo real para o gene bacteriano RNAr 16S, *Megasphaera* sp., *Atopobium vaginae* e *Leptotrichia* sp, de 12 amostras de VB.

Conforme esperado, todas as amostras de VB foram positivas para o gene bacteriano RNAr 16S. Do total das 88 amostras de VB, 46 (52,3%) foram

positivas para os 3 microrganismos pesquisados e apenas 5 amostras (5,7%) foram negativas para todos os microrganismos pesquisados. A espécie mais frequentemente detectada foi *Atopobium vaginae*, com 89,8%, seguida por *Megasphaera* sp. e *Leptotrichia* sp. em 81,8% e 59,1% das amostras, respectivamente.

**Tabela 4.** Distribuição das espécies de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp. nas amostras de vaginose bacteriana incluídas no estudo.

<b>Espécies de Microrganismos</b>	<b>N (%)</b>
<b><i>Atopobium vaginae</i></b>	
Detecção Total	<b>79 (89,8)</b>
Detecção Exclusiva	<b>6 (6,8)</b>
Detecção Associada com <i>Leptotrichia</i> sp. e/ou <i>Megasphaera</i> sp.	<b>27 (30,7)</b>
<b><i>Leptotrichia</i> sp.</b>	
Detecção Total	<b>52 (59,1)</b>
Detecção Exclusiva	<b>0 (0,0)</b>
Detecção Associada com <i>Atopobium</i> sp. e/ou <i>Megasphaera</i> sp	<b>6 (6,8)</b>
<b><i>Megasphaera</i> sp.</b>	
Detecção Total	<b>72 (81,8)</b>
Detecção Exclusiva	<b>3 (3,4)</b>
Detecção Associada com <i>Atopobium</i> sp. e/ou <i>Leptotrichia</i> sp.	<b>23 (26,1)</b>
<b><i>Atopobium vaginae</i>, <i>Leptotrichia</i> sp. e <i>Megasphaera</i> sp</b>	<b>46 (52,3)</b>
<b><i>Atopobium vaginae</i>, <i>Leptotrichia</i> sp. ou <i>Megasphaera</i> sp</b>	<b>83 (94,3)</b>

A avaliação da mensuração do pH, positividade do teste das aminas, presença de co-infecção por *C. trachomatis*, bem como a idade gestacional no momento do episódio de VB e sua graduação em escores não revelaram diferença estatística entre os casos em que houve a detecção dos 3

microrganismos pesquisados (n=46) quando comparados com os casos em que, pelo menos, uma das espécies não foi detectada (n=42) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Mensuração do pH, idade gestacional, positividade do teste das aminas e positividade de cervicite por *Chlamydia trachomatis*, e escores da vaginose bacteriana segundo Nugent et al.<sup>17</sup> em gestantes com episódio de vaginose bacteriana positiva para *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp ou sem detecção de pelo menos uma das espécies pesquisadas.

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	
	<b>N=46</b>	<b>N=42</b>	<b>p</b>
Mensuração do pH vaginal*	4,8±0,2	4,9±0,2	0,56
Idade Gestacional (dias) <sup>#</sup>	132 (56-295)	125 (57-227)	0,89
Positividade de <i>C. trachomatis</i> n(%) <sup>§</sup>	17 (37,0)	16 (38,0)	0,91
Positividade do teste das aminas n(%) <sup>§</sup>	21 (45,7)	18 (42,9)	0,96
Escores da VB n(%) <sup>§</sup>			
VB 8	37 (80,4)	32 (76,2)	0,82
VB 9 ou 10	9 (19,6)	10 (23,2)	0,88

**Grupo 1:** Positivos para *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp

**Grupo 2:** Sem detecção de pelo menos uma das espécies pesquisadas.

\* Variável expressa em média ± desvio padrão; Análise de Variância

<sup>#</sup> Variável expressa em mediana e valores mínimos e máximos; Teste de Mann-Whitney

<sup>§</sup> Variáveis expressas em n (%); Teste de Qui-Quadrado.

## 6. Discussão

A vaginose bacteriana é, sem dúvida, a alteração de flora vaginal mais freqüente em mulheres grávidas<sup>9</sup>. Inúmeras complicações obstétricas são associadas à VB, como corioamnionite e baixo peso ao nascimento<sup>2,3,9,14</sup>. A VB se caracteriza pela substituição dos lactobacilos da microbiota vaginal por outras espécies bacterianas<sup>2,3</sup>. Estudos recentes que utilizaram técnicas de biologia molecular demonstraram que várias espécies até então raramente ou nunca isoladas em laboratório são associadas à VB como *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp., *Megasphaera* sp<sup>24,26,27</sup>. Nesse estudo, foi avaliada a presença dessas espécies bacterianas relacionadas à VB em 88 gestantes com diagnóstico microscópico de VB, de acordo com os critérios de Nugent et al.<sup>17</sup>. Não foram incluídas nesse estudo pacientes com outras alterações de flora vaginais e/ou vulvovaginites, como tricomoníase, candidíase e vaginite aeróbia, com a finalidade de avaliar a participação dessas espécies bacterianas somente na VB.

Considerando que a VB é fator de risco para aquisição de inúmeras DSTs, como cervicite por *C. trachomatis*<sup>16</sup>, também foi realizada nesse estudo a pesquisa desse patógeno em secreções endocervicais. A presença de *C. trachomatis* foi detectada em 37,5% das gestantes, freqüência superior à relatada em mulheres grávidas atendidas nesse serviço<sup>37</sup> e também em gestantes de outros países<sup>37,38</sup>. Diversos fatores de risco já estão definidos para a infecção clamidiana. Sua maior prevalência em mulheres jovens, com idade inferior a 25 anos e que apresentem comportamento sexual de risco, como múltiplos parceiros ao longo da vida é um consenso na literatura

mundial<sup>39</sup>. No presente estudo a média de idade das gestantes foi de 17,7 anos, fato que pode estar relacionado à alta prevalência encontrada.

A VB é uma alteração de flora vaginal com composição bacteriana e sintomatologia muito variáveis<sup>14,24</sup>. Os critérios de Amsel et al.<sup>16</sup> para diagnóstico ainda são utilizados para o diagnóstico de VB, no entanto apresentam baixa sensibilidade quando comparados ao sistema de classificação de flora vaginal, conforme o preconizado por Nugent et al.<sup>17,40</sup>. Conforme os dados encontrados no presente estudo, não há uma correlação entre critérios de Amsel, como pH vaginal e teste das aminas, e o aumento da graduação em escores do esfregaço vaginal. Também pode-se concluir que embora haja associação entre VB e infecção por *Chlamydia trachomatis*<sup>11</sup> essa infecção não se correlaciona com a graduação da VB em escores.

Já foi demonstrado que a participação das espécies *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp., *Megasphaera* sp. na flora vaginal é variável<sup>24,26,27</sup>. Além disso, a detecção simultânea de *Atopobium vaginae* e *Gardnerella vaginalis* apresenta alta sensibilidade para o diagnóstico de VB (96,0%), sendo que a espécie *Atopobium vaginae* apresenta ainda maior especificidade (77,0%) para essa alteração de flora vaginal, quando comparada à *Gardnerella vaginalis* (35,0%)<sup>32</sup>. As freqüências detectadas de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp. e *Megasphaera* sp, no presente estudo, foram similares as relatadas anteriormente em mulheres não grávidas<sup>27,29,31,33</sup>. A importância da detecção dessas espécies em mulheres grávidas se dá principalmente ao fato de já terem sido detectadas no líquido amniótico de mulheres com trabalho de parto prematuro e rotura prematura de membranas pré-termo<sup>42,43</sup>. A infecção intramniótica é causa freqüente dessas intercorrências gestacionais, já que a

---

presença de microrganismos na cavidade amniótica aumenta a produção local de citocinas inflamatórias, estimulando a síntese de prostaglandinas, estimulando a contratilidade uterina e desencadeando o trabalho de parto prematuro acompanhado ou não de rotura das membranas corioamnióticas<sup>43</sup>.

Tem sido proposto que casos de VB com predomínio de espécies *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp., *Megasphaera* sp. não seriam tão prejudiciais como os outros tipos de VB com menor participação desses microrganismos na microbiota vaginal, já que essas espécies possuem como característica comum a produção de ácido láctico<sup>30</sup>, além de terem sido encontradas no conteúdo vaginal de mulheres sem nenhuma sintomatologia característica de VB<sup>24</sup>. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo não revelaram diferenças entre parâmetros como idade gestacional, mensuração de pH vaginal, positividade do teste das aminas, além da prevalência de cervicite por *C. trachomatis* entre os episódios de VB com a presença dessas espécies bacterianas, quando comparadas com amostras de VB negativas para pelo menos uma das espécies pesquisadas.

Apesar das evidências que apontam para possível participação benéfica das espécies de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia* sp., *Megasphaera* sp. na flora vaginal, os resultados deste trabalho não permitem diferenciar os episódios de VB com maior participação dessas espécies, em relação os demais casos dessa alteração de flora vaginal. A alta frequência dessas espécies na flora vaginal de gestantes e as suas associações com casos de infecção intramniótica ressaltam a importância de futuros estudos para a maior compreensão das alterações microbiológicas da flora vaginal que poderão colaborar com a diminuição das taxas de prematuridade resultantes das

---

complicações gestacionais relacionadas a alterações de flora vaginal e/ou infecções do trato genital durante a gestação.

## 7. Referências Bibliográficas

- 1- Berek JS, Berek & Novak Tratado de Ginecologia. 14.Ed. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 2008
- 2- Wilks M, Wiggins R, Whiley A, et al. Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. J Clin Microbiol; 2004;713:717-42
- 3- Larsen B, Monif GRG. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. Clin Infect Dis.; 2001;32:69-77
- 4- Martín R, Suárez JE. Biosynthesis and degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by vaginal lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol; 2010;400:405-76
- 5- Newton ER, Piper JM, Shain RN, et al. Predictors of the vaginal microflora. Am J Obstet Gynecol 2001; 184:845-55
- 6- 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;277:281-34
- 7- Simões JA, Discacciati MG, Brolazo EM, et al. Clinical diagnosis of bacterial vaginosis. Int J Gynaecol Obstet.; 2006;28:32-94
- 8- Tolosa JE, Chaithongwongwatthana S, Daly S, et al. The International Infections in Pregnancy (IIP) study: Variations in the prevalence of bacterial vaginosis and distribution of morphotypes in vaginal smears among pregnant women. Am J Obstet Gynecol; 2006;195:1198-204
- 9- Sobel JD. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis? Infect Dis Clin N Am.; 2005;387:406-19
- 10- Beigi RH, Wiesenfeld HC, Hillier SL, et al. Factors associated with absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing Lactobacillus among women with bacterial vaginosis. J Infect Dis.; 2005;924:929-6
- 11- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, et al. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. Clin Infect Dis; 2003; 36:663-8
- 12- Myer L, Denny L, Telerant R, et al. Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: a nested case-control study. J Infect Dis; 2005; 192:1372-80

- 
- 13- 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
- 14- Simões JA, Giraldo PC, Cecatti JG, et al. Complicações perinatais em gestantes com e sem vaginose bacteriana. *RBGO*; 1998;437:441-8
- 15- Guise JM, Mahon SM, Aickin M, et al. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy. *Am J Prev Med.*; 2008;62:72-20
- 16- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74:14-22
- 17- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;297:301-29
- 18- Pereira L, Culhane J, McCollum K, et al. Variation in microbiologic profiles among pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:746-51
- 19- Forsum U, Holst E, Larsson PG, et al. Bacterial vaginosis - a microbiological and immunological enigma. *Apmis* 2005;81:90-113
- 20- 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
- 21- Spiegel CA, Eschenbach DA, Amsel R, Holmes KK. Curved anaerobic bacteria in bacterial (nonspecific) vaginosis and their response to antimicrobial therapy. *J Infect Dis* 1983; 148:817-148
- 22- Thorsen P, Jensen IP, Jeune B, et al. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:580-7
- 23- Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:485-502
- 24- Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, et al. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiol.*; 2004; 150:2565-73
- 25- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180:4765-74
- 26- Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol.* 2004;21:16-26

- 
- 27- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005;353:1899-911
- 28- Nikolaitchouk N, Andersch B, Falsen E, et al. 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
- 29- Rodriguez JM, Collins MD, Sjöden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1573-6
- 30- Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female tract: function and immune regulation. *Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21:347-54
- 31- Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, et al. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *J Clin Microbiol* 2004;42:1829-31
- 32- Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis* 2006;194:828–36
- 33- Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, et al. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis* 2004;4:5-13
- 34- Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, et al. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3270-6
35. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, et al. Definition of a type of abnormal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002;109:34-43
- 36- Ramos BRA, Poletini J; Marcolino LD, et al. Prevalence and risk factors of Chlamydia trachomatis cervicitis in pregnant women at the Genital Tract Infection in Obstetrics Unit Care at Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Brazil. *J Lower Genital Tract Dis*; In press.
- 37- Chen KT, Chen SC, Chiang CC, et al. Chlamydial infection among patients attending STD and genitourinary clinics in Taiwan. *BMC Public Health* 2007; 7:120
- 38- Joyee AG, Thyagarajan SP, Vikram Reddy E, et al. Diagnostic utility of serologic markers for genital chlamydial infection in STD patients in Chennai, India. *J Assoc Physicians India* 2007; 55:777-80
- 39– Kucinskiene V, Sutaite I, Valiukeviciene S, et al. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Med (Kaunas)* 2006;885:894-42

40- Gallo MF, Jamieson DJ, Cu-Uvin S, et al. Accuracy of clinical diagnosis of bacterial vaginosis by Human Immunodeficiency Virus infection status. *Sex Transm Dis.* 2010; In press

41- DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 64(1):38-57

42- Han YW, Shen T, Chung P, et al. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol.* 2009;38-47-47

43- Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest.* 2009;924:936-89

## 8-Anexos

### *Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

Convidamos a senhora para participar da pesquisa “**Vaginose Bacteriana em Gestantes: isolamento e quantificação de *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia sp* e *Megasphaera sp***”, que tem por objetivo analisar alguns aspectos relacionados à infecção genital denominada Vaginose Bacteriana e suas variações presentes nos diferentes casos das mulheres atendidas no Centro de Saúde Escola 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 pela clínicos durante a consulta. Para o exame ginecológico, será necessária a introdução de um aparelho de metal, estéril, conhecido como “bico de pato” (espécule), 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 do colo do útero para pesquisa de uma bactéria conhecida como *Chlamydia trachomatis*. Esta pesquisa é de responsabilidade da graduanda Thalita de Almeida Tavares, sob orientação da Profª Drª. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e participação da doutoranda Camila Marconi.

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** e que não receberei nenhuma gratificação financeira para participar desse estudo, 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 20 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente

\_\_\_\_\_  
Thalita de Almeida Tavares

Rua Prof Mário Guimarães, 468

Vila Nova Botucatu, Botucatu, SP

Fone: 11 9645-8358

e-mail: [thalita.tavares@hotmail.com](mailto:thalita.tavares@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](mailto:mgsilva@fmb.unesp.br)

---

## *Anexo 2. Protocolo de Pesquisa*

Nome .....

RG .....

Idade... .. Idade Gestacional .....

Etnia.....

Estado civil:.....

Escolaridade.....Profissão .....

Fumante  Sim  Não Quantos cigarros/dia :.....

Número de parceiros sexuais (1 ano).....

História de DST anterior.....

.....

Paridade .....

Número de partos vaginais.....

Histórico de parto prematuro anterior:  Sim  Não  Não se aplica

Histórico de RPM-PT:  Sim  Não  Não se aplica

Histórico de baixo peso ao nascer (<2500g)  Sim  Não  Não se aplica

Histórico de aborto:  Sim  Não  Não se aplica

---

Pesquisador Responsável

*Anexo 3. Pedido de realização de bacterioscopia do  
esfregaço vaginal*

## Rotina Diagnóstica das Infecções do Trato Genital Inferior

Nome _____ RG _____
Idade _____ Clínica _____
Data do atendimento ____/____/____.

Última RS \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Médico Solicitante: \_\_\_\_\_

**1. Queixas**

Corrimento	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Às vezes	
Tempo de evolução	<input type="checkbox"/> Até 7 dias	<input type="checkbox"/> De 08 a 30 dias	<input type="checkbox"/> Mais de 30 dias	<input type="checkbox"/> Não sabe
Intensidade	<input type="checkbox"/> Pouco	<input type="checkbox"/> Moderado	<input type="checkbox"/> Muito	<input type="checkbox"/> Não sabe
Aspecto	<input type="checkbox"/> Fluido	<input type="checkbox"/> Pastoso	<input type="checkbox"/> Não sabe	
Cor	<input type="checkbox"/> Branco	<input type="checkbox"/> Amarelo	<input type="checkbox"/> Esverdeado	<input type="checkbox"/> Não sabe
Odor	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Às vezes	<input type="checkbox"/> Não sabe
Prurido	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Às vezes	<input type="checkbox"/> Não sabe

**2. Exame Físico**

Corrimento	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
Intensidade	<input type="checkbox"/> Pouco	<input type="checkbox"/> Moderado	<input type="checkbox"/> Muito	
Aspecto	<input type="checkbox"/> Fluido	<input type="checkbox"/> Pastoso	<input type="checkbox"/> Bifásico	<input type="checkbox"/> Outros: _____
Cor	<input type="checkbox"/> Branco	<input type="checkbox"/> Amarelo	<input type="checkbox"/> Acinzentado	<input type="checkbox"/> Outros: _____
Whiff Test	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Duvidoso	
Achados	<input type="checkbox"/> Vulvite	<input type="checkbox"/> Endocervicite	<input type="checkbox"/> Ectopia	<input type="checkbox"/> Outros: _____
PH vaginal: _____	<input type="checkbox"/> Não realizado	JEC: _____		

 Real Time:

---



---

 Exame Microscópico Direto do Conteúdo Vaginal (GRAM):

---



---



---

