



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA DURSKI

CORRELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DA MICROBIOTA  
VAGINAL COM O PERFIL DO MICROBIOMA

CURITIBA

2021

MARIANA DURSKI

CORRELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DA MICROBIOTA  
VAGINAL COM O PERFIL DO MICROBIOMA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia e Saúde da Mulher.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Marconi

CURITIBA

2021

D966 Durski, Mariana

Correlação entre características microscópicas da microbiota vaginal com o perfil do microbioma [recurso eletrônico] / Mariana Durski. – Curitiba, 2021.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Marconi

1. Microbiota. 2. Vaginite. 3. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 4. Microscopia. I. Marconi, Camila. II. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM: WP 255





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCGINECOLOGIA E  
SAÚDE DA MULHER - 40001016084P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TOCGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIANA DURSKI** intitulada: **Correlação entre características microscópicas da microbiota vaginal com o perfil do microbioma**, sob orientação da Profa. Dra. CAMILA MARCON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Fevereiro de 2021.

CAMILA MARCON

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RITA MAÍRA ZANINE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MÁRCIA GUIMARÃES DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE EST. PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela saúde e força para finalizar este trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Camila Marconi, pela orientação desde 2016, por toda a paciência, conhecimento e apoio.

Ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, do setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de cursar o programa.

A todos os professores que passaram por mim por todos esses anos e me fizeram ser quem eu sou hoje. E em especial, à melhor professora da minha vida, minha mãe.

Ao meu pai, irmã e avós pelo incentivo e apoio de sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## **LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE AMOSTRAS DO ESTUDO .....	<b>36</b>
FIGURA 2 - RESULTADOS DE ANÁLISE DISCRIMINANTE LINEAR ASSOCIADA A TAMANHO DE EFEITO (LEFSE) DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS 71 TÁXONS IDENTIFICADOS PELO SEQUENCIAMENTO DE RNAR 16S DAS PARTICIPANTES COM RESULTADOS DE WMS-DON.....	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DE MORFOTIPOS MICROBIANOS SEGUNDO SPIEGEL et al. (1983).....	21
TABELA 2 - SISTEMA DE ESCORES (0 A 10) DOS ESFREGAÇOS VAGINAIS CORADOS POR GRAM SEGUNDO NUGENT ET AL. (1991) .....	22
TABELA 3 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE ESFREGAÇOS VAGINAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE VAGINITE AERÓBIA. ....	24
TABELA 4 - SISTEMA DE ESCORE (0-8) PARA A PONTUAÇÃO DE MORFOTIPOS BACTERIANOS* DOS ESFREGAÇOS A FRESCO .....	26
TABELA 5 - CATEGORIAS AVALIADAS DAS IMAGENS DOS ESFREGAÇOS VAGINAIS À FRESCO PARA A CLASSIFICAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL SEGUNDO CRITÉRIOS DE DONDERS .....	32
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E FATORES COMPORTAMENTAIS DAS 624 MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO. ....	34
TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS CATEGORIAS DE MICROBIOTA VAGINAL POR CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE GSS-NUG E WMS-DON, DE ACORDO COM OS TIPOS DE COMUNIDADE MICROBIANA VAGINAL (CSTs).....	37
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DE ESCORES DE GSS-NUG E ESCORES DE WMS-DON PARA DETECÇÃO DO ESTADO DE AUSÊNCIA DE <i>Lactobacillus</i> spp. (CST IV).....	39
TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA ESTRATIFICAÇÃO COMPLETA DAS CATEGORIAS DA MICROBIOTA VAGINAL A PARTIR DA CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA USANDO INTERPRETAÇÃO DE WMS-DON, DE ACORDO COM AS TRÊS CATEGORIAS DEFINIDAS GSS-NUG.....	40
TABELA 10 - AMOSTRAS DE ESTUDO COM INTERPRETAÇÕES DISCORDANTES NOS DOIS MÉTODOS MICROSCÓPICOS (GSS-NUG E WMS-DON) DE ACORDO COM OS TIPOS DE ESTADO DA MICROBIOTA VAGINAL (CSTs).....	41

TABELA 11 - ABUNDÂNCIA RELATIVA GERAL DOS TÁXONS BACTERIANOS  
IDENTIFICADOS NA POPULAÇÃO DO ESTUDO. TÁXONS LISTADOS  
EM ORDEM DECRESCENTE DE SUA ABUNDÂNCIA RELATIVA.....43



*“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

**Introdução:** Apesar dos avanços nos testes moleculares para o diagnóstico de alteração de microbiota vaginal (AMV), a microscopia continua sendo amplamente utilizada. A observação microscópica de esfregaços com coloração de Gram usando critérios de Nugent (GSS-Nug) é o padrão ouro para o diagnóstico de vaginose bacteriana (VB). A interpretação microscópica da microbiota vaginal também pode ser realizada em esfregaços a fresco usando os critérios de Donders (WMS-Don), que também incluem o diagnóstico de vaginite aeróbia (VA). O perfil do microbioma vaginal baseado no sequenciamento do gene RNAr 16S frequentemente resulta em cinco tipos de comunidades bacterianas, as CSTs (do inglês *community-state types*) de I a V, sendo a CST IV caracterizada pela ausência de *Lactobacillus* spp. **Objetivos:** Foram comparados, neste trabalho, os diagnósticos de AMV usando GSS-Nug e WMS-Don para detecção da CST IV. Além disso, o perfil do microbioma da interpretação das microbiotas do tipo VB e VA por método de WMS-Don também foi comparado. **Metodologia:** Foram recrutadas 624 mulheres brasileiras em idade reprodutiva, das quais 512 tinham dados completos disponíveis em microscopia e sequenciamento de RNAr 16S V3-V4 (Illumina). Curvas de características de operação do receptor (ROC) de GSS-Nug e WMS-Don foram elaboradas, e suas áreas sob a curva (AUCs) e intervalo de confiança (IC) de 95% calculadas para detecção da CST IV. As abundâncias relativas dos táxons foram usadas para uma análise discriminante linear associada a tamanho de efeito (LEfSe) para identificar táxons aumentados em VA em relação a VB. **Resultados:** O diagnóstico de VB por GSS-Nug obteve melhor desempenho para detecção da CST IV (AUC: 0.88, 95% IC: 0.84-0.91) quando comparada ao WMS-Don (AUC 0.83; IC: 0.80 - 0.87) ( $P < 0,01$ ). A maioria dos táxons aumentados em VA foram *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*. **Conclusão:** O uso de GSS-Nug para interpretação da microbiota vaginal é preferível ao WMS-Don. Diferentemente da VB, o microbioma associado a VA é aumentado em *Lactobacillus* spp. e componentes do trato gastrointestinal.

**Palavras-chave:** Microbioma vaginal. Vaginite Aeróbia. Sequenciamento de nova geração. Microscopia. Diagnóstico molecular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Despite the advances on molecular tests for diagnosis of abnormal vaginal microbiota (AVM), microscopy remains widely used. Microscopic observation of Gram-stained smears for Nugent scoring (GSS-Nug) is the gold standard for the diagnosis of bacterial vaginosis (BV). Vaginal microbiota may also be assessed using wet-mounted smears using Donders criteria (WMS-Don), that also comprises aerobic vaginitis (AV) scoring. Microbiome profiling of the 16S rRNA gene often results into five vaginal community-state types (CSTs), of which CST IV is *Lactobacillus*-deprived. **Objectives:** We compared the diagnosis of AVM using GSS-Nug and WMS-Don for detection of CST IV. We further compared the microbiome profiling of AV- and BV-microbiota of WMS-Don. **Methods:** We enrolled 624 women of reproductive aged in Brazil, of which 512 had full data available on microscopy and V3-V4 16S rRNA sequencing (Illumina). We constructed receiver operating characteristic (ROC) curves of GSS-Nug and WMS-Don and calculated their area under the curves (AUCs) and 95% confidence interval (CI) for detecting CST IV. We used the relative abundances of taxa for a linear discriminant analysis effect size (lefs) to identify the AV-enriched taxa in relation to BV. **Results:** Diagnosis of BV by GSS-Nug more accurately detected CST IV (AUC: 0.88, 95% CI: 0.84-0.91) when compared to WMS-Don (AUC 0.83; CI: 0.80 - 0.87) ( $P < 0.01$ ). Most of the AV-enriched taxa were *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium nucleatum* and *Enterococcus faecalis*. **Conclusion:** The use of GSS-Nug for interpretation of vaginal microbiota is preferred over WMS-Don. Differently from BV, AV-associated microbiome is enriched in *Lactobacillus* spp. and components of gastrointestinal tract.

**Keywords:** Vaginal microbiome. Bacterial vaginosis. Aerobic vaginitis. Next generation sequencing. Microscopy. Molecular diagnostics.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
3.1 MICROBIOTA VAGINAL .....	14
3.2 ALTERAÇÕES DE MICROBIOTA VAGINAL .....	17
3.3 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....	20
3.4 MICROBIOMA VAGINAL .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1. DESENHO DO ESTUDO, POPULAÇÃO, ASPECTOS ÉTICOS E COLETA DE DADOS .....	28
4.2 TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS .....	29
4.3 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA POR MÉTODOS DE MICROSCOPIA .....	30
4.3.2 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL SEGUNDO MÉTODO DESCRITO POR NUGENT et al. (NUGENT et al., 1991).....	30
4.3.3 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL SEGUNDO MÉTODO DESCRITO POR DONDERS et al. (DONDERS et al., 2002).....	30
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA VAGINAL .....	32
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E RESUMO CLÍNICO .....	34
5.2 COMPARAÇÃO DOS DOIS MÉTODOS MICROSCÓPICOS PARA IDENTIFICAR A CST IV .....	37
5.3 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS VAGINAIS COM DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DISCORDANTE.....	39
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Alteração de microbiota vaginal (AMV) é geralmente definida como a mudança de um estado de predomínio de *Lactobacillus* spp. para um microbiota altamente diversa, composta principalmente de espécies anaeróbias (estritas ou facultativas). (SMITH; RAVEL, 2017) A vaginose bacteriana (VB) é o tipo mais frequente de AMV em mulheres em idade reprodutiva no mundo todo. (KOUMANS et al., 2007; MARCONI et al., 2015; MORRIS et al., 2001) Apesar da VB causar um aumento do corrimento e mau odor, ela costuma ser uma condição assintomática. (KOUMANS et al., 2007; MORRIS et al., 2001) Como a autopercepção da mulher em relação a alteração do corrimento vaginal é subjetiva e pode ter outras causas além da AMV, estas queixas não são confiáveis para fins diagnósticos.

A microscopia tem sido o método preferido para o diagnóstico de AMV, uma vez que pode ser realizada durante as visitas ao consultório, embora dependa de habilidades e experiências individuais. Vários métodos de interpretação e classificação microscópica de esfregaços vaginais já foram desenvolvidos. (REDELINGHUYS et al., 2020) Dois deles estão entre os mais comumente usados e são baseados na atribuição de escores de acordo com a proporção dos morfotipos bacterianos presentes em esfregaços vaginais. Um foi desenvolvido pela primeira vez por Nugent et al., em 1991 (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991) usando esfregaços vaginais corados pelo método de Gram para o diagnóstico de VB. A classificação microscópica com o sistema de escores de GSS-Nug é considerado padrão-ouro para o diagnóstico de VB (NENADIĆ et al. 2015). Mais tarde em 2002, esfregaços a fresco foram utilizados por Donders et al. para propor um novo método microscópico para diagnóstico de VB com um sistema de escores adicional para o diagnóstico de vaginite aeróbia (VA) – outro tipo de AMV. (DONDERS et al., 2002)

Embora útil na prática clínica, a microscopia não permite avaliar a composição exata do microbioma vaginal altamente complexo. (SMITH; RAVEL, 2017) O sequenciamento de nova geração (SNG) de regiões do gene RNAr 16S permitiu a identificação de múltiplos micro-organismos presentes, mesmo em baixa abundância, no microbioma vaginal. Estudos usando SNG mostraram que quase todas as mulheres em idade reprodutiva apresentam um dos cinco tipos de comunidades bacterianas, as CSTs (do inglês *community-state types*). Quatro CSTs (I, II, III e V)

são dominados por diferentes *Lactobacillus* spp., já a CST IV é privada de espécies de *Lactobacillus* e é altamente diversa quando comparada a outras CSTs. O microbioma vaginal da maioria das mulheres com VB no GSS-Nug se encaixa na CST IV. (RAVEL et al., 2011; GAJER et al., 2012; MARCONI et al., 2020;) A composição do microbioma da VA ainda é pouco investigada. Estudos muito recentes mostraram que os *Lactobacillus* spp. e a bactéria associada a VB, *Gardnerella vaginalis*, estão entre os táxons bacterianos mais abundantes na VA. (OERLEMANS et al., 2020; WANG et al., 2020)

Apesar dos métodos de diagnóstico baseados em SNG nos permitir acessar de forma exata a composição bacteriana do ambiente vaginal, eles possuem alto custo e não são factíveis de implementação na rotina clínica ginecológica e obstétrica por apresentarem longo tempo de execução. Sendo assim, a microscopia continua sendo a abordagem mais viável para o diagnóstico de AMV, principalmente em países em desenvolvimento. No entanto, ainda é pouco explorado como a classificação microscópica da microbiota se relaciona com os achados do microbioma.

Dessa forma, considerando que os dois principais métodos de classificação microscópica da microbiota vaginal (GSS-Nug e WMS-Don) apresentam vantagens e desvantagens quanto a realização, bem como a ausência de informação de como os padrões de microbiota vaginal identificados por eles se associam com o microbioma vaginal, o trabalho proposto é de fundamental importância para nortear a prática clínica na avaliação da microbiota vaginal.

## 2 OBJETIVOS

Testar a associação dos padrões de microbiota vaginal determinados pelos métodos de classificação microscópica de esfregaços vaginais descritos por Nugent et al. (1991) e Donders et al. (2002) com a composição do microbioma vaginal de mulheres brasileiras em idade reprodutiva.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os diagnósticos de AMV usando os métodos de Nugent et al. (1991) e Donders et al. (2002) para detectar o padrão de microbiota com ausência de *Lactobacillus* spp. (CST IV);



- Identificar o perfil do microbioma que pode levar a resultados discordantes pelos dois métodos microscópicos
- Identificar as diferenças no perfil do microbioma dos dois tipos de alteração de microbiota vaginal (VB e VA) preconizado por Donders et al. (2002).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MICROBIOTA VAGINAL

Sabe-se que a microbiota vaginal é complexa e composta por diversas espécies de micro-organismos, tendo os *Lactobacillus* spp. como principais protagonistas deste ambiente. Albert Doderlein foi o primeiro pesquisador a evidenciar esse protagonismo de espécies de *Lactobacillus* na microbiota vaginal de mulheres saudáveis e os descreveu como bacilos Gram-positivos, podendo ser longos e delgados, apresentando-se sozinhos ou em cadeia, que produzem ácido láctico o que poderia inibir o crescimento de patógenos. (DODERLEIN, 1892) O alemão também demonstrou que a diminuição no número destas espécies pode levar a complicações ginecológicas e obstétricas (DODERLEIN, 1892). Diversas espécies de *Lactobacillus* já foram descritas e estudos revelaram que *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* e *L. iners* são as espécies mais comuns encontradas no ambiente vaginal.(VANEECHOUTTE, 2017)

No ambiente vaginal saudável há um equilíbrio funcional e interações benéficas de forma recíproca entre o hospedeiro e seus micro-organismos residentes. (KRISHNA et al. 2017) O mutualismo entre o hospedeiro e os micro-organismos fornece a primeira proteção contra a colonização de patógenos oportunistas. Sendo assim, a microbiota vaginal pode influenciar a fisiologia reprodutiva do hospedeiro, assim como pode ser influenciada pelo hospedeiro. (SMITH; RAVEL, 2017)

Durante todo o ciclo de vida da mulher, a microbiota vaginal sofre mudanças principalmente na puberdade, no ciclo menstrual, na gravidez e na menopausa, ou seja, em ciclos hormonalmente modulados. (FARAGE; MAIBACH, 2006) As condições do ambiente vaginal começam a se tornar favoráveis para o crescimento dos *Lactobacillus* spp. a partir do início da fase reprodutiva da mulher, que é quando há o

aumento dos níveis de estrogênio, responsáveis por estimular o crescimento do epitélio vaginal e do glicogênio intraepitelial, e dos níveis de progesterona, que causa a liberação do glicogênio através do rompimento das células epiteliais vaginais. Esse glicogênio é metabolizado pelos *Lactobacillus* spp. em glicose e maltose e posteriormente em ácido láctico, causando a diminuição do pH vaginal (3.8 – 4.4), estabelecido como normal. (SCHWIERTZ, 2016) O pH mais ácido torna o ambiente menos favorável ao crescimento de outras bactérias anaeróbias que também podem colonizar este local. (SMITH; RAVEL, 2017)

Uma outra vantagem dos *Lactobacillus* spp. é a sua atividade antimicrobiana, visto que algumas espécies presentes na microbiota vaginal são capazes de produzir bacteriocinas, peptídeos ou proteínas produzidas por algumas espécies bacterianas que atuam como toxinas, evitando a invasão de outras espécies ou contribuindo na estabilidade no ambiente da cepa produtora. (ZHENG et al., 2014) Além disso, os *Lactobacillus* spp. controlam o crescimento de outras espécies no ambiente vaginal pela produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Eschenbach e colaboradores (1989) postularam que o  $H_2O_2$  produzido por algumas espécies de *Lactobacillus* são importantes na manutenção de uma microbiota vaginal normal, já que esse composto pode inibir ou matar organismos que não possuem enzimas neutralizadoras de  $H_2O_2$ , como por exemplo *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* sp. e *Mycoplasma hominis*. (ESCHENBACH et al., 1989). No entanto, o fator protetor do  $H_2O_2$  vem sendo questionado pois para a produção de uma concentração de  $H_2O_2$  suficiente para agir como um antimicrobiano é necessária a presença de uma grande quantidade de oxigênio ( $O_2$ ) (TACHEDJIAN et al., 2018), o que dificilmente pode ser encontrado no ambiente cervicovaginal que é hipóxico. (HILL et al., 2005) Quando os *Lactobacillus* spp. crescem em um ambiente aeróbio, as NADH oxidase e piruvato oxidase competem com a lactato desidrogenase pelo NADH favorecendo a produção de  $H_2O_2$  ao invés do lactato. Porém, levando em consideração o baixo nível de  $O_2$  no ambiente vaginal é esperado que os *Lactobacillus* spp. favoreçam a fermentação, ou seja que a lactato desidrogenase produza lactato ao invés de  $H_2O_2$  como produto metabólico final. (VANECHOUTTE, 2017) Outros estudos também demonstraram que o ácido láctico é o maior fator antimicrobiano produzido pelos *Lactobacillus* spp. (GONG et al., 2014; O'HANLON et al. 2011) Além disso, o ácido láctico produzido pelo *L. crispatus* e *L. gasseri*, e não o  $H_2O_2$ , é capaz de inativar a *Chlamydia trachomatis* (GONG et al., 2014; NARDINI et al., 2016), *Neisseria gonorrhoeae* (GRAVER; WADE, 2011) e

*Escherichia coli* (VALORE et al., 2002) *in vitro*. Sendo assim, o ácido láctico e não o  $H_2O_2$  é eficiente contra infecções bacterianas sexualmente transmissíveis. (WITKIN et al., 2013)

O ácido láctico vaginal é produzido predominantemente pelos *Lactobacillus* spp. na forma de dois isômeros, D- lactato e L- lactato, sendo que <15% de L- lactato é produzido pelas células epiteliais vaginais. (BOSKEY et al., 2001) Ambos são produtos do metabolismo da glicose que ocorre no ambiente aeróbio vaginal e as concentrações de D-lactato e L- lactato podem ser diferentes dependendo da espécie dominante de *Lactobacillus* presente. (WITKIN et al., 2013) Em culturas axênicas, *L. crispatus* e *L. gasseri* produzem tanto D- lactato quanto L- lactato, enquanto que *L. iners* produz apenas o isômero L e o *L. jensenii* apenas o isômero D. (WITKIN et al., 2013) A proteção de *L. crispatus* comparado com *L. iners* contra uropatógenos (BORGDORFF et al., 2014; VAN DE WIJGERT et al., 2014) e intercorrências durante a gestação (KINDINGER et al., 2017) é bem estabelecida e têm sido atribuída ao maior papel protetor do D- lactato do que do L- lactato. (WITKIN et al., 2013)

O crescimento exacerbado das espécies de *Lactobacillus* associado com o baixíssimo pH podem causar a denominada vaginose citolítica. Essa alta acidificação do ambiente vaginal causa o rompimento das células epiteliais causando sintomas como: queimação, irritação, corrimento vaginal esbranquiçado, prurido, dispareunia e disúria vaginal. (VANEECHOUTTE, 2017) Um estudo de 2019 descreveu uma correlação positiva entre a citólise e o *L. crispatus*, demonstrando que a citólise reflete às condições favoráveis ao crescimento do *L. crispatus* e não que ele causa citólise, já que o conteúdo vaginal de mulheres com vaginite citolítica apresentava níveis elevados de L-lactato, produzido pelas outras espécies de *Lactobacillus*, enquanto que o *L. crispatus* produz D-lactato. (VIRTANEN et al., 2019) Estudos longitudinais têm sugerido que diferentes espécies de *Lactobacillus* podem exercer maior ou menor efeito protetor no ambiente vaginal. (GAJER et al., 2012) Esses estudos revelaram que a microbiota com predomínio de *L. iners* tende a flutuar para um estado de disbiose (e vice-versa) mais frequentemente do que as outras espécies. (GAJER et al., 2012) E, dentre as cinco espécies de *Lactobacillus*, esta é a espécie que vem sendo mais associada à VB. (TAMRAKAR et al., 2007; VERSTRAELEN et al., 2009)

### 3.2 ALTERAÇÕES DE MICROBIOTA VAGINAL

Em condições normais, o ambiente vaginal é colonizado predominantemente por espécies de *Lactobacillus* e caracterizado por um pH abaixo de 4,5. (VANEECHOUTTE, 2017) A redução no número de *Lactobacillus* spp. que resulta na elevação do pH do meio vaginal, acompanhado ao crescimento de outras espécies bacterianas menos acidófilas resultam em alterações de microbiota vaginal. (SOBEL, 1989)

Essa disbiose pode ser associada a distúrbios ginecológicos e obstétricos. (KOVACHEV, 2014) Como distúrbios ginecológicos causados pela depleção do número de *Lactobacillus* spp. podemos citar o aumento de infecções pós-cirúrgicas (GUASCHINO et al., 2002), doença inflamatória pélvica (DIP) (SWEET, 2000) e aumento do risco de aquisição de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) como herpes genital (CHERPES et al., 2003), tricomoníase (BROTMAN et al., 2013), endocervicites por *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (WIESENFELD et al., 2003) e infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ATASHILI et al., 2008; SEWANKAMBO et al., 1997). E como distúrbios obstétricos podemos mencionar dificuldade de engravidar (ECKERT et al., 2003), parto prematuro (USUI et al., 2002) e aborto espontâneo. (VERSTRAELEN et al., 2007)

A primeira alteração de microbiota vaginal foi denominada “vaginite não específica” e classificada desta maneira para distinguir de alterações vaginais causadas por *Trichomonas vaginalis* e leveduras. (SPIEGEL, 1991) Então, em 1955, os autores Gardner & Dukes, renomearam esta condição como “*Haemophilus vaginalis* vaginite”, tendo como agente etiológico a espécie *Haemophilus vaginalis* que foi isolada do conteúdo vaginal de mulheres com sintomas de mau odor. Outros sintomas característicos desta microbiota vaginal descritos foram corrimento homogêneo de cor acinzentada, com pH entre 5,0 e 5,5. Quanto aos achados microscópicos por Gram, uma característica marcante foi a presença de bacilos pequenos pleomórficos Gram-negativos. E pelos achados a fresco, um outro padrão muito importante é o aspecto granuloso das células epiteliais, denominadas “*clue cells*”. (GARDNER; DUKES, 1955) Essa espécie bacteriana foi denominada como *H. vaginalis* até 1980 quando foi reclassificada como *Gardnerella vaginalis*, denominação usada até hoje. (GREENWOOD; PICKETT, 1980)

Acreditava-se que a *G. vaginalis* era a única espécie responsável pela vaginite não específica, no entanto, em um estudo de 1991, Carol A. Spiegel descreveu que organismos que são parte da microbiota vaginal normal, como *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp., inclusive a *G. vaginalis*, quando em dominância, podem ser associados a esta alteração de microbiota. E nos casos de alteração, os *Lactobacillus* spp. estão significativamente reduzidos (SPIEGEL, 1991)

Em razão da ausência de resposta inflamatória local na maioria dos casos, a vaginite não específica foi intitulada como vaginose bacteriana (VB) (SPIEGEL et al., 1983)

A VB é caracterizada pela substituição de *Lactobacillus* spp. por micro-organismos anaeróbicos. (BAUTISTA et al., 2016) Essa condição é diagnosticada, segundo critérios de Amsel, na presença de ao menos três destas quatro condições: 1) presença de corrimento fino, não-granular, podendo ser de cor cinza; 2) pH vaginal alto (>4,5); 3) odor fétido ao adicionar hidróxido de potássio (KOH) 10% ao corrimento vaginal, já que alcalinização do corrimento vaginal KOH pode volatilizar as aminas, produzindo o odor característico de peixe; e 4) presença de células epiteliais cobertas com bactérias, as “*clue cells*”. Essas bactérias que envolvem as células epiteliais se mostram cocobacilos Gram-variáveis. (AMSEL et al., 1983)

Grande parte das mulheres com VB não apresentam sintomas (KOUUMANS et al., 2007), o que, além de dificultar o diagnóstico desta alteração, também faz com que essas mulheres não diagnosticadas estejam mais suscetíveis às complicações relacionadas a essa condição.

É estimado que 30% das mulheres em idade reprodutiva apresentam a VB, sendo a AMV mais comum nesta população. Essa prevalência pode chegar a 50-60% em populações com comportamento sexual de alto risco. (BAUTISTA et al., 2016) Uma revisão sistemática publicada em 2013 relatou também que essa prevalência pode variar entre países/raças. (KENYON et al., 2013) E um outro estudo de Koumans e colaboradores (2007) também demonstrou que a população afrodescendente tem maior prevalência de VB, corroborando a hipótese de variação da frequência de VB de acordo com a etnia. (KOUUMANS et al., 2007)

Existem alguns fatores de risco epidemiológicos que tornam mulheres mais suscetíveis a apresentarem a VB como ter vários parceiros sexuais, ser solteira, ser mais jovem na primeira relação sexual, se identificar como profissional do sexo e

praticar duchas regularmente. (BAUTISTA et al., 2016) Outros fatores que também podem ser citados, porém em menor grau, são alta frequência de relações sexuais, histórico de gravidez e tabagismo. (SCHWEBKE; DESMOND, 2005).

Além dessas evidências de que o comportamento influencia a aquisição da VB, também há indícios de que a VB pode ter transmissão sexual: cinco estudos publicados entre os anos de 1995 e 2014 citaram a alta prevalência (25% a 50%) de VB entre mulheres que mantêm relações sexuais com outras mulheres. (VODSTRCIL et al., 2015) Em um estudo de 2015 também foi demonstrado que mulheres que permaneceram com uma parceira VB negativa tinham menor risco de adquirir VB na ausência de novas parceiras. (VODSTRCIL et al., 2015)

Levando em consideração a diversidade da microbiota vaginal, algumas formas de AMV não podem ser classificadas apenas como normais, “flora intermediária” ou como VB. Diante disto, Donders e colaboradores descreveram outra forma de AMV, a denominada vaginite aeróbia (VA). (DONDEERS et al., 2002) Esta condição é caracterizada pela presença de células inflamatórias locais (leucócitos), células epiteliais parabasais (PBC, do inglês *parabasal cells*) e espécies bacterianas predominantemente aeróbias como *Streptococcus* grupo B, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* e quanto mais severa for a alteração, maior é a probabilidade desses organismos serem cultivados (DONDEERS et al., 2005). Os sinais clínicos da VA incluem inflamação vaginal com sensação de queimação, podendo se apresentar com aspecto avermelhado, edemaciada e, às vezes, com ulcerações, corrimento amarelado com mau cheiro, dispareunia e pH vaginal superior a 6,0, causado pela depleção parcial ou total de *Lactobacillus*, assim como nos casos de VB. Segundo tais autores, a VA apresenta ser classificada como leve, moderada e severa, com base nos achados microscópicos. Além disso, os autores descreveram que as duas condições, VA e VB, podem coexistir, o que pode explicar porque algumas mulheres apresentam leucócitos locais e um corrimento diferente daquele observado em casos de VB total. (DONDEERS et al., 2005) A VA também está associada a distúrbios obstétricos, como risco aumentado de parto prematuro, corioamnionite, que consiste na inflamação das membranas fetais e funisite do feto (DONDEERS et al., 2011) A inflamação do epitélio vaginal, característico desta alteração, pode aumentar o risco de aquisição de ISTs e a probabilidade de obter o exame de Papanicolau alterado principalmente em VA moderada e severa (VAMs), causado pelo grau de lesão do epitélio. (DONDEERS et al., 2017) A prevalência da VA em mulheres em idade



reprodutiva pode variar entre 7 a 23,7%, dependendo da região. E os estudos de prevalência de VA durante a gravidez são escassos, mas está entre 4 e 8%. (DONDEERS et al., 2017) O fato de anteriormente apenas a VB ser considerada como única alteração de microbiota vaginal pode explicar algumas falhas de tratamento em algumas mulheres, já que o manejo adequado da VA difere do tratamento da VB. (DONDEERS et al., 2005)

Outro fator importante é que o desequilíbrio da microbiota vaginal ativa mecanismos da imunidade inata, resultando no aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias, principalmente a Interleucina (IL)-1beta, (MATTSBY-BALTZER et al., 1998) citocina chave na resposta inata contra micro-organismos. Em casos de VB, há um aumento expressivo desta citocina. (CAUCI et al., 2003) Entretanto, os níveis aumentados desta citocina podem causar lesão do epitélio vaginal, sendo este um dos mecanismos propostos para o aumento do risco de aquisição de ISTs observado nos casos de VB. (CAUCI et al., 2008; DINARELLO, 2002) Também já foi demonstrado que em mulheres com VB e consequentemente com níveis aumentados de IL-1beta existe um aumento do grau de infecção pelo herpes simplex vírus 2 e HIV. (CHERPES et al., 2003; SEWANKAMBO et al., 1997) A IL-1beta também induz a produção de quimiocinas, especialmente a IL-8, no entanto, achados sugerem que em casos de VB os níveis de IL-8 não aumentam, o que pode explicar a ausência do aumento do número de neutrófilos em mulheres com VB. (CAUCI et al., 2003) A IL-6 também permanece inalterada em casos de VB, quando comparada com a microbiota normal, enquanto que está aumentada em casos de VA. (DONDEERS et al., 2002) A IL-6 é um marcador bem conhecido para amnionite bacteriana e parto prematuro. (GREIG et al., 1993; IMSEIS et al., 1997; ROMERO et al., 1993) E a IL-6 e IL-8 são quimiocinas conhecidas e diretamente ligadas ao aumento de prostaglandinas e trabalho de parto. (ROMERO et al., 1993)

### 3.3 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Todos os métodos descritos a seguir se baseiam na observação microscópica de esfregaços em lâmina contendo material biológico coletado da parede vaginal com *swabs* estéreis, para classificação da microbiota vaginal. Os critérios utilizados por

tais métodos se baseiam na observação dos morfotipos bacterianos presentes nos esfregaços e na proporção daqueles morfotipos compatíveis com *Lactobacillus* spp. em relação aos demais tipos bacterianos.

A primeira técnica de classificação dos esfregaços segundo Spiegel e colaboradores (1983) (SPIEGEL et al., 1983) compreende a divisão da microbiota vaginal em duas classes possíveis. Segundo estes autores, a microbiota pode ser classificada como normal, quando na presença de *Lactobacillus* spp., ou como VB na ausência ou com poucos *Lactobacillus* spp. e predominância de *G. vaginalis* e outras bactérias. Os parâmetros observados para diagnóstico da VB são: pH vaginal maior que 4,5, aumento do conteúdo vaginal, mau odor após adição de 10% de KOH e a presença de *clue cells* pela microscopia. (AMSEL et al., 1983) Sendo assim, de acordo com a técnica de Spiegel e colaboradores, a presença de ao menos 3 das 4 características indica a presença de VB. Sendo que, os esfregaços com duas ou menos características são considerados normais, desde que leveduras ou morfotipos de *T. vaginalis* estejam ausentes.

Nesse método de classificação os esfregaços vaginais são corados pela técnica de Gram com modificação de Kopeloff, recomendada para melhor visualização de bactérias anaeróbias. (LIBMAN et al., 2006) Cada morfotipo bacteriano observado é quantificado sob óleo de imersão (1000x) conforme os escores descritos na Tabela 1. Tais autores consideram os bacilos longos Gram-positivos observados como células lactobacilares, já os bacilos curtos Gram-variáveis como *G. vaginalis* e outros micro-organismos classificados apenas pela morfologia. Os esfregaços classificados como normais apresentam apenas *Lactobacillus* spp. ou quando coexistem com a *G. vaginalis*. Já os casos de VB são aqueles com a presença de *G. vaginalis* e outros morfotipos bacterianos não compatíveis com *Lactobacillus* spp.

TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DE MORFOTIPOS MICROBIANOS  
SEGUNDO SPIEGEL et al. (1983)

Escores	Morfotipos/campo
1+	<1
2+	1 a 5
3+	6 a 30
4+	>30

FONTE: Adaptado de SPIEGEL et al. (1983)

Esse método foi amplamente utilizado até 1991, quando Nugent e colaboradores sugeriram um novo método de classificação de microbiota que hoje é considerado o padrão-ouro (NENADIĆ et al. 2015) para diagnóstico da VB. (NUGENT et al., 1991) O sistema de Nugent prevê a classificação da microbiota em três categorias com base semiquantificação dos morfotipos bacterianos e seus respectivos padrões tintoriais sob a coloração de Gram. Nesta observação, alguns morfotipos de interesse como bacilos longos Gram-positivos (*Lactobacillus* spp.), bacilos curtos Gram-variáveis (sugestivos de *G. vaginalis*), bacilos curtos Gram-negativos (*Bacteroides* spp.), bacilos curvos Gram-variáveis (*Mobiluncus* spp.) e cocos Gram-positivos são semiquantificados para atribuição de escores conforme a Tabela 2. A soma dos escores permite a classificação em: normal (escores entre 0 e 3), intermediária (escores entre 4 e 6 ) e VB (escores entre 7 a 10).

TABELA 2 - SISTEMA DE ESCORES (0 A 10) DOS ESFREGAÇOS VAGINAIS CORADOS POR GRAM SEGUNDO NUGENT ET AL. (1991)

Escore	Presença de <i>Lactobacillus</i>	Presença de <i>Gardnerella</i> e <i>Bacteroides</i> sp.	Bacilos curvos Gram-variáveis
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Os morfotipos são quantificados de acordo com o número médio por campo de imersão de óleo, onde 1+ equivale a <1 morfotipos/campo, 2+ equivale a 1 a 4 morfotipos/campo, 3+ equivale a 5 a 30 morfotipos/campo e 4+ equivale a >30 morfotipos/campo

FONTE: Adaptado de NUGENT et al. (1991)

Um método proposto posteriormente por Thomason e colaboradores (1992) (THOMASON et al., 1992) combina a detecção de *clue cells* com os morfotipos bacterianos encontrados nos esfregaços corados por Gram. Os esfregaços são, portanto, observados quanto à proporção de *Lactobacillus* spp. em relação a outros morfotipos e quanto à presença de *clue cells*. Este método, entretanto, não prevê a quantificação dos morfotipos bacterianos encontrados. As mulheres cujos esfregaços apresentam morfotipos bacterianos excedentes aos *Lactobacillus* spp. e um mínimo de 20 campos com *clue cells* são diagnosticadas com VB. Os autores consideram um método de diagnóstico mais simples do que os propostos por Spiegel e colaboradores

(1983)(SPIEGEL et al., 1983) e Nugent e colaboradores (1991) (NUGENT et al., 1991), visto que não despende grande quantidade de tempo para quantificar cada morfotipo bacteriano encontrado, o que, segundo os autores, permite uma maior reprodutibilidade interlaboratorial.

Uma década depois, Ison & Hay (2002)(ISON; HAY, 2002) propuseram um método de classificação que inclui duas outras classes à classificação anteriormente proposta por Nugent et al (1991)(NUGENT et al., 1991): classe 0, indicando ausência de bactérias e classe IV, caracterizada por células epiteliais cobertas apenas por cocos Gram-positivos, presentes em lâminas também coradas pela técnica de Gram. Os autores consideram que a classe 0 sugere a presença de um agente antimicrobiano no ambiente vaginal e que pode ser devido ao uso de géis e cremes vaginais, quanto aos esfregaços classificados como classe IV não há evidências de que estas microbiotas tenham associação com a VB ou sejam anormais.(ISON; HAY, 2002)

Embora a identificação das mulheres com VB seja feita com sucesso por Nugent e colaboradores (1991)(NUGENT et al., 1991) e Ison & Hay (2002)(ISON; HAY, 2002), a composição bacteriana e relevância clínica dos casos classificados como microbiota intermediária permanecem desconhecidos. Tal questão se torna ainda mais relevante quando se consideram as evidências da literatura sobre as complicações obstétricas e ginecológicas relacionadas a esse padrão “intermediário” de microbiota vaginal. (CAUCI et al., 2002; GUÉDOU et al., 2013, 2012) Tais métodos consideraram que a microbiota vaginal intermediária nada mais é do que um estado transitório entre a microbiota normal e a VB. Dessa forma, eles não preveem a existência de outros tipos de AMV, o que não corresponde à complexidade de microbiotas já demonstradas.(DRELL et al., 2013; RAVEL et al., 2011; ROMERO et al., 2014)

Nesse sentido, Donders e colaboradores (2002) desenvolveram um novo método que, segundo os autores, melhor compreenderia a grande diversidade bacteriana encontrada no ambiente vaginal. Os autores também relatam que a condição denominada como “intermediária” abriga tipos de microbiota diversos, dentre as quais a vaginite aeróbia (VA), que compreende a VA leve, moderada e severa e a VB parcial.(DONDEERS et al., 2002) Sendo assim, o diagnóstico dessa nova entidade de microbiota vaginal anormal é passível de ser realizada em esfregaços montados a fresco (*wet mount*), sem coloração, usando um microscópio de contraste de fase. A

partir das variáveis observadas, é calculado um índice ("VA score") que leva em consideração a proporção de morfotipos de *Lactobacillus* spp., da microbiota acessória, da presença de células parabasais (PBC) e de leucócitos tóxicos.(DONDEERS et al., 2002) As amostras são classificadas de acordo com o grau de *Lactobacillus*/lactobacillary grade (LBG). A categoria considerada normal é a LBG I que apresenta predominância absoluta de *Lactobacillus* spp. Já a categoria LBG II, corresponde àquelas amostras nas quais é encontrada uma menor proporção de *Lactobacillus* spp. e a microbiota acessória está presente de forma significativa. O grupo LBG II é subdividido em duas categorias, uma na qual ainda é observado um número significativo de *Lactobacillus* spp. (LBG IIa) e outra onde os *Lactobacillus* spp. estão presentes, porém há a predominância de outros morfotipos bacterianos (LBG IIb). Já no grau considerado anormal predominam outras bactérias, com raros ou nenhum *Lactobacillus* spp. presentes (LBGIII).

Ainda segundo esse método, a VB é diagnosticada quando há uma microbiota LBG III acompanhada por morfotipos representativos de *G. vaginalis*, *Mobiluncus* de forma granular e/ou *clue cells*. Já para o diagnóstico de VA, é realizado um escore somatório, conforme o observado na Tabela 3. As amostras podem ser classificadas como normais (escores 0-2), como VA leve (escores 3-4), VA moderada (escores 5-6) e, finalmente àquelas amostras escores entre 6 e 10 correspondem a VA severa. Esses autores também consideram que é possível que as duas alterações, VB e VA, possam coexistir no mesmo esfregaço vaginal.

TABELA 3 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE ESFREGAÇOS VAGINAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE VAGINITE AERÓBIA.

Escore	Grau de <i>Lactobacillus</i> (LBG)	Número de leucócitos	Proporção de leucócitos tóxicos	Microbiota acessória	Proporção de células parabasais
0	I e IIa	≤10/campo	Nenhum ou esporádico	Não significativo ou citólise	Nenhuma ou <1%
1	IIa	>10/campo e ≤10/cel.epitelial	≤50% dos leucócitos	Bacilos curtos	≤10%
2	III	>10/cel.epitelial	>50% dos leucócitos	Cocos ou cadeia de cocos	>10%

FONTE: Adaptado de DONDEERS et al (2002)

Portanto, além de prever a existência de outros tipos de microbiota vaginal, esse método pode ter melhor aplicabilidade na rotina clínica já que não necessita de etapa prévia de coloração dos esfregaços vaginais. No entanto, dada a necessidade de observação de células bacterianas e eucarióticas sem o auxílio de coloração, este método também requer um melhor treinamento para análise por microscopia. (DONDERS et al., 2015) Outras duas técnicas que também podem ser citadas são as descritas por Platz-Christensen (1989) (PLATZ-CHRISTENSEN et al., 1989) e Schmidt e Hansen (2000). (SCHMIDT; HANSEN, 2000)

Em 1989, Platz-Christensen e colaboradores (PLATZ-CHRISTENSEN et al., 1989) propuseram uma técnica de diagnóstico de VB que se baseia unicamente na detecção de *clue cells* nos esfregaços corados pela técnica de coloração multicromática de Papanicolaou. (PAPANICOLAOU, 1942)

Schmidt e Hansen descreveram, em 2000, outro sistema de escores que também se baseia no método de análise de esfregaços vaginais a fresco em microscópio de contraste de fase. De acordo com esse método, são avaliadas a presença de *clue cells*, de morfotipos compatíveis com *Lactobacillus* spp. (LB), bacilos curtos (SB) que são considerados como os micro-organismos associados à VB, além da relação entre número de leucócitos e células epiteliais. A interpretação é baseada em três campos microscópicos e a contagem deve se limitar a contagem de 30 morfotipos bacterianos. (SCHMIDT; HANSEN, 2000)

Dessa forma, baseado no número de LB e SB são atribuídos escores conforme o detalhado na Tabela 4. Após a soma dos respectivos escores, a microbiota vaginal pode ser classificada em 4 categorias: (1) normal, caracterizada por uma predominância de morfotipos LB (pontuação 0-1); (2) intermediária grau I, caracterizada por uma predominância moderada de morfotipos LB (pontuação 2-4); (3) intermediária grau II, com predominância moderada de morfotipos SB (pontuação 5-6) e, finalmente (4) VB, caracterizada por uma predominância de morfotipos SB (pontuação 7-8). (SCHMIDT; HANSEN, 2000)



TABELA 4 - SISTEMA DE ESCORE (0-8) PARA A PONTUAÇÃO DE MORFOTIPOS BACTERIANOS\* DOS ESFREGAÇOS A FRESCO

Escore	Morfotipos LB	Morfotipos SB
0	>30	0
1	16-30	1-5
2	6-15	6-15
3	1-5	16-30
4	0	>30

\*Pontuação de morfotipos bacterianos= escore de morfotipos relativos

a *Lactobacillus* sp.+ escore de morfotipos relativos a bacilos curtos

FONTE: Adaptado de SCHMIDT E HANSEN (2000)

### 3.4 MICROBIOMA VAGINAL

Apesar dos métodos de microscopia serem úteis na análise da microbiota vaginal, nenhum deles permitem acessar de forma exata as espécies bacterianas presentes nesse ambiente, visto que se baseiam exclusivamente na morfologia dos micro-organismos. Dada a importância da microbiota vaginal para a saúde reprodutiva das mulheres, muitos estudos foram realizados ao longo das últimas décadas com o intuito de determinar a sua real composição. Tais estudos se basearam principalmente na cultura microbiológica e biologia molecular que apresentam capacidade limitada para a elucidação de todas as bactérias presentes nesse ambiente. (HILLIER, 1993; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2009)

Somente em 2011, com a utilização de sequenciamento de nova geração, tornou-se possível caracterizar o microbioma vaginal e, portanto, identificar todas as espécies bacterianas presentes neste ambiente. Neste momento, demonstrou-se pela primeira vez que existem cinco principais tipos de comunidades bacterianas da microbiota vaginal – as denominadas *community-state types* (CSTs). Quatro das cinco CSTs apresentam predomínio de espécies de *Lactobacillus* spp., a CST I (*L. crispatus*), CST II (*L. gasseri*), CST III (*L. iners*) e CST V (*L. jenssenii*). Na CST remanescente (CST IV), os *Lactobacillus* spp. estão ausentes ou em pequeno número, sendo encontradas diversas espécies bacterianas em sua maioria anaeróbias. (RAVEL et al., 2011) Já foi demonstrado que a maior parte das mulheres com VB encontram-se classificadas na CST IV. A frequência dessas comunidades também difere em diferentes origens étnicas, sendo que a CST IV é mais comum (40%) em mulheres negras e hispânicas. (RAVEL et al., 2011) Sendo assim, nota-se

que os *Lactobacillus* spp. não têm o mesmo potencial de manter a homeostase vaginal.

Um estudo posterior também utilizando técnicas de biologia molecular demonstrou que as espécies bacterianas anaeróbias encontradas são *Gardnerella*, *Atopobium*, *Sneathia*, *Prevotella* ou *Firmicutes* da família *Lachnospiraceae* característico em mulheres com VB, mas também pode estar presente em mulheres saudáveis. Além disso, demonstraram que a espécie mais estável e distinta de um estado vaginal saudável é o *L. crispatus*, enquanto que o *L. iners* é encontrado tanto em mulheres saudáveis como naquelas em disbiose e que a sua dominância está relacionada a um maior risco de mudar para um grupo não dominado por *Lactobacillus* spp. como por exemplo o grupo CST IV. (VIRTANEN et al., 2019)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. DESENHO DO ESTUDO, POPULAÇÃO, ASPECTOS ÉTICOS E COLETA DE DADOS

Foram realizadas análises de dados de um estudo transversal multicêntrico anterior que caracterizou o microbioma vaginal de mulheres brasileiras em idade reprodutiva, entre os anos de 2013 a 2016. (MARCONI et al., 2020) O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (número de aprovação 306.547; ANEXO 1) e todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram incluídas mulheres em idade reprodutiva que procuraram clínicas de saúde primária para coleta do exame preventivo do câncer de colo do útero de rotina de cinco diferentes regiões do Brasil: Sul (Curitiba/Paraná), Sudeste (Botucatu/São Paulo), Centro-Oeste (Goiânia/Goiás), Nordeste (João Pessoa/Paraíba) e Norte (Belém/Pará). Todas as clínicas participantes estavam localizadas em Unidades Básicas de Saúde (UBS), exceto na região Sul as quais consistiam em clínicas ambulatoriais (ginecologia geral, pré-operatório e pós-operatório) em um hospital de referência. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado na menor diferença estatística dos valores médios de pH vaginal que foram previamente relatados para 2 CSTs. Assumindo  $\alpha = 0,05$  e  $\beta = 0,20$ , foi necessário um mínimo de 100 mulheres por região estudada para descrever os principais tipos de CSTs. Foram recrutadas 624 mulheres com no mínimo de 100 participantes de cada região.

Para inclusão, tais participantes obedeceram aos seguintes critérios de inclusão (idade entre 18 e 50 anos, não gestantes no momento do recrutamento, com abstinência sexual e período menstrual regular) e exclusão (que apresentaram menos de 5 dias do fim do período menstrual, que relataram prática de ducha vaginal, dispositivo intrauterino, uso de qualquer produto/medicação vaginal nas últimas 48 horas, tratamento com drogas antimicrobianas nos últimos 45 dias e diagnóstico positivo para HIV).

As participantes responderam um questionário estruturado administrado individualmente por médicos ou enfermeiras locais abrangendo questões para obtenção de dados demográficos (idade, cor da pele, estado civil e nível de educação), hábitos/comportamento (higiene íntima e práticas sexuais), e clínicos (peso, altura,

data da última menstruação e queixas genitais atuais). Os entrevistadores instruíram as participantes a não responder qualquer questão que as deixassem desconfortáveis.

#### 4.2 TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

No momento do exame ginecológico, após a inserção do espéculo, além das amostras cervicovaginais para a rotina do exame preventivo do câncer de colo uterino, também foram obtidas amostras do terço médio da parede vaginal. As amostras cervicovaginais foram transportadas dos locais de recrutamento de cada região para o laboratório central do estudo (localizado em Botucatu, São Paulo). A primeira amostra obtida da parede vaginal foi utilizando *e-swab* (Copan, Brescia, Italia) que permaneceu armazenado em meio de transporte Amies a -80°C até o processamento para determinação do microbioma. As amostras vaginais foram submetidas à extração DNA utilizando lise mecânica e enzimática utilizando Kit Power Soil (MoBio Inc, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Os microtubos com as amostras de DNA foram imediatamente armazenadas a -80° até o transporte para o Laboratório de Análise de Microbioma no Instituto de Ciências Genômicas na Escola de Medicina da Universidade de Maryland, localizada na cidade de Baltimore, Maryland. As amostras foram enviadas para Baltimore usando um serviço de correio especializado com temperatura monitorada para evitar derretimento durante o trajeto.

*Swabs* de algodão estéreis foram utilizados para obtenção de amostras adicionais da parede vaginal para imediata a confecção de dois esfregaços vaginais em lâminas de vidro para microscopia. No momento da chegada das amostras no laboratório central do estudo, uma das duas lâminas contendo esfregaço foi corada usando a técnica de Gram para classificar a microbiota pelos critérios de Nugent, conforme detalhado abaixo. (NUGENT et al. 1991) Somente se o primeiro esfregaço não fosse adequado para análise, a segunda lâmina era corada e avaliada. As lâminas não coradas foram armazenadas em caixas de armazenamento apropriadas para análises adicionais segundo método de Donders, conforme detalhado abaixo. (DONDERS et al., 2002)

A avaliação do pH vaginal foi realizada usando tiras comerciais indicativas de pH. E como parte do protocolo do estudo, foram obtidas amostras cervicais utilizando escovas cervicais para realização de teste para *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N.*

*gonorrhoeae* usando o método de PCR, conforme métodos anteriormente descritos. (MARCONI et al., 2020)

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA POR MÉTODOS DE MICROSCOPIA

##### 4.3.2 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL SEGUNDO MÉTODO DESCRITO POR NUGENT et al. (NUGENT et al., 1991)

Após a coloração de lâminas pela técnica de Gram, os esfregaços foram observados em microscópio óptico sob óleo de imersão, aumento de 1000x, para semi-quantificação dos morfotipos bacterianos. O sistema de Nugent é um sistema de atribuição de escores (0 a 10) baseado no número de morfotipos bacterianos de *Lactobacillus* (bacilos longos Gram-positivos), *Gardnerella/ Bacterioides* (bacilos curtos Gram-variáveis/ negativos) e *Mobiluncus curtisi* (bacilos curtos Gram-variáveis). Resumidamente, quanto maior o número de *Lactobacillus* presente nos esfregaços em relação a outros morfotipos, menores serão os escores atribuídos. Após a atribuição numérica dos esfregaços, eles foram classificados em três categorias: “microbiota normal” (escores entre 0 e 3), “microbiota intermediária”, (escores entre 4 e 6) e “VB” (escores de 7 a 10).

##### 4.3.3 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL SEGUNDO MÉTODO DESCRITO POR DONDERS et al. (DONDERS et al., 2002)

As lâminas previamente armazenadas foram analisadas para a classificação da microbiota segundo critérios de Donders et al. (DONDERS et al., 2002) Para tal avaliação, os esfregaços vaginais foram preparados para a análise microscópica adicionando uma gota de salina e cobertas com lamínula para avaliação em objetiva de contraste de fase 40x. Neste método, as amostras são classificadas de acordo com o grau de *Lactobacillus* sp. (LBG). A categoria considerada normal é a com predominância de *Lactobacillus* sp. (LBG I). A categoria intermediária, grau II, corresponde a uma menor proporção de *Lactobacillus* sp., na qual estão presentes outras bactérias. Esse grupo é subdividido em duas categorias, um no qual ainda é presente um grande número de *Lactobacillus* sp. (LBG IIa), e outro no qual os

*Lactobacillus* sp. estão presentes, porém há a predominância de outros morfotipos bacterianos (LBG IIb). Já no grau considerado anormal predominam outras bactérias, com nenhum lactobacilo presente (LBGIII). A morfologia dos *Lactobacillus* também é analisada (misto, curto e *lepto-like*) para correção de possíveis falsos negativos, pois os *Lactobacillus* do tipo "curto" podem se assemelhar a bactérias anaeróbias presentes nos casos de VB.(DONDEERS et al., 2000)

Também foram registrados o número de leucócitos, a proporção de leucócitos tóxicos e células epiteliais parabasais (PBC) nos esfregaços vaginais para pontuação do score de VA. Por fim, as amostras classificadas como LBG II ou III, ainda foram classificadas como padrão de microbiota de VB e/ou VA. Consideramos a microbiota como VB quando havia a presença de bacilos (curvos ou não) curtos (indicativo de *G.vaginalis/Mobiluncus*), acompanhados ou não de *clue cells*, em padrão granular. Além disso, classificamos as amostras positivas para VB em "parcial" ou "total", dependendo da extensão da microbiota indicativa de VB no esfregaço. Vale ressaltar que apenas os casos classificados como LBG III foram considerados para o diagnóstico de VB parcial ou total na avaliação por esfregaço a fresco. Os morfotipos indicativos da VA consistem em bacilos curtos e/ou cocos arranjados ou não em cadeias. Para a classificação de VA, características microbianas e celulares foram levadas em consideração, como detalhado na Tabela 1. Como descrito anteriormente, o escore de VA pode variar de 0 a 10 em três categorias: "normal" (escores 0-2); "VA leve" (escores 3-4); "VA moderada" (escores 5-6); e "VA severa" (escores 6-10).(DONDEERS et al., 2005) Para fins de análise, as formas moderada e severa de VA foram agrupadas em "VA de alto grau".



TABELA 5 - CATEGORIAS AVALIADAS DAS IMAGENS DOS ESFREGAÇOS VAGINAIS À FRESCO PARA A CLASSIFICAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL SEGUNDO CRITÉRIOS DE DONDERS

Características	Escore de VA			
	0	0	1	2
Grau Lactobacilar (LBGs)	I (ou 0)	Ila	Ilb	III
Número de Leucócitos	≤10/campo	--	>10/campo a <10/cél.epitelial	>10/cél.epitelial
Proporção de leucócitos tóxicos <sup>a</sup>	0%	--	< 50%	> 50%
Proporção de células parabasais (PBC) <sup>b</sup>	0 a 1%	--	<10%	>10%
Morfotipos de VA	Não	--	Bacilos curtos	Cocos
Morfotipos de VB <sup>c</sup>	Não	Algumas listas granulares e/ou ≤20% <i>clue cells</i>	Granular total e/ou >20% <i>clue cells</i>	

Grau Lactobacilar (LBG) LBG I: predomínio de *Lactobacillus* sobre outros morfotipos bacterianos (microbiota acessória); LBG IIa: predomínio de *Lactobacillus* com microbiota acessória; LBG IIb: *Lactobacillus* são superados em número pela microbiota acessória; LBG III: depleção de *Lactobacillus*. VA: vaginite aeróbia; VB: vaginose bacteriana; *clue cells*: células epiteliais cobertas por microbiota semelhante à VB. <sup>a</sup> pelo total de leucócitos, <sup>b</sup> pelo total de células descamativas, <sup>c</sup> a microbiota de VB não é levada em conta na atribuição de escores de VA.

FONTE: Tabela modificada de Donders et al. (2015) (DONDERS et al., 2015)

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA VAGINAL

Para a análise do microbioma, foram sequenciadas as regiões V3-V4 amplificadas do gene RNAr 16S usando o protocolo 300PE (Illumina, MiSeq, San Diego, CA), segundo a metodologia descrita por Fadrosh et al. (2014) (FADROSH et al., 2014). As sequências brutas foram processadas quanto à qualidade e demultiplexização no software QIIME (versão 1.8.0) como descrito anteriormente. (CAPORASO et al., 2010; MARCONI et al., 2020). A detecção de sequências quiméricas foi realizada em UCHIME (v5.1) usando banco de dados de “greengenes” de sequências de RNAr 16S (agosto, 2013) como referência. (EDGAR et al., 2011; MCDONALD et al., 2012). Foram consideradas amostras com no mínimo 1000 sequências de leitura. As amostras foram posteriormente agrupadas em cinco CSTs (I a V) usando composição taxonômica, bem como suas abundâncias relativas e a

divergência de Jensen-Shannon, de acordo com métodos desenvolvidos por Ravel et al. (2011) (RAVEL et al., 2011) Para as análises deste estudo, foram considerados apenas os táxons que estão presentes na população em leitura superior a  $10^{-4}$  sequências. A alfa-diversidade foi calculada com base no índice de Shannon-Weiner usando o pacote vegan em R. (OKSANEN et al., 2012) Um total de 540 amostras foram sequenciadas e passaram em todos os controles de qualidade.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calculamos a sensibilidade e especificidade dos métodos de Nugent (Esfregaços corados por Gram/ Gram Stain Smears) (GSS-Nug) e Donders (Esfregaços a fresco/ Wet Mount Smears) (WMS-Don) para a detecção de microbioma com depleção de *Lactobacillus* spp. (ou seja, CST IV). Testamos duas interpretações possíveis de alteração de microbiota vaginal (AMV) por GSS-Nug (escores  $>3$  e escores  $>6$ ) e por WMS-Don (escores de VB+VA  $> 2$  e escores de VB+VA  $> 4$ ). Usando a análise da curva de Característica de Operação do Receptor (ROC), comparamos os desempenhos de detecção das quatro interpretações microscópicas baseada em suas áreas sob as curvas (AUCs) e intervalos de confiança de 95% (CI). Comparamos os índices de alfa diversidade de Shannon-Weiner entre participantes com VB e VA usando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para estas análises, nós usamos o Stata/SE (versão 15.1, StataCorp, College Station, TX) e consideramos o valor de  $P < 0,05$  como significativo.

Para determinar os táxons aumentados no microbioma de mulheres VA-positivas foi WMS-Don em relação às positivas para VB, realizamos uma análise discriminante linear associada a tamanho de efeito (LEfSe). (SEGATA et al., 2011) Usamos a abundância relativa de taxa bacteriana recuperada do sequenciamento de RNAr 16S do subconjunto de 114 participantes selecionadas que mostraram (i) dados completos disponíveis na análise do microbioma, (ii) microbiota compatível com VB ou VA em interpretação microscópica WMS-Don. Deve-se ressaltar que excluímos da LEfSe os casos de VA e VB coexistentes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E RESUMO CLÍNICO

Os dados sociodemográficos, de fatores comportamentais e clínicos das 624 mulheres participantes encontram-se resumidos na Tabela 6. A idade média das participantes foi de 34 anos (variando de 18 a 53). Mais da metade (n = 396, 62,5%) das participantes reportaram viver em união estável (casada ou morava com parceiro) e informaram ter ensino médio ou superior (n = 358, 57,4%). Quando questionadas pelo médico/enfermeiro sobre sintomas genitais, 46,0% das participantes relataram corrimento anormal (n = 287) e 23,6% odor desagradável (n = 147). O pH vaginal elevado (> 4,5) foi detectado em 54,3% da população do estudo (n = 339). Infecção cervical causada por um ou mais dos patógenos testados, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e/ou *T. vaginalis*, foi detectada em 39 participantes (6,2%).

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E FATORES COMPORTAMENTAIS DAS 624 MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO.

Características das Participantes	N	%
Idade		
<22 anos	68	10.9
22 - 40 anos	405	64.9
≥41 anos	151	24.2
Etnia		
Preto/Pardo	348	55.8
Branco	251	40.2
Outro	25	4.0
Estado civil		
Casada/mora junto com parceiro	396	63.5
Solteira	228	36.5
Ensino médio completo (11 anos de escola)		
Não	266	42.6

Sim	358	57.4
Consumo de álcool		
Não	439	70.4
Sim	185	29.6
Cigarro		
Não	553	88.6
Sim	71	11.4
Número de parceiros sexuais <sup>a</sup>		
0	37	5.9
1	519	83.2
2+	68	10.9
Novo parceiro sexual <sup>b</sup>		
Não	574	92.0
Sim	50	18.0
Relato de corrimento anormal		
Não	337	54.0
Sim	287	46.0
Relato de mau odor vaginal		
Não	477	76.4
Sim	147	23.6
Relato de prurido vaginal		
Não	521	83.5
Sim	103	16.5
pH vaginal		
≤4.5	285	45.7
>4.5	339	54.3
PCR-positivo para CT		
Não	588	94.2
Sim	36	5.8
PCR-positivo para NG		

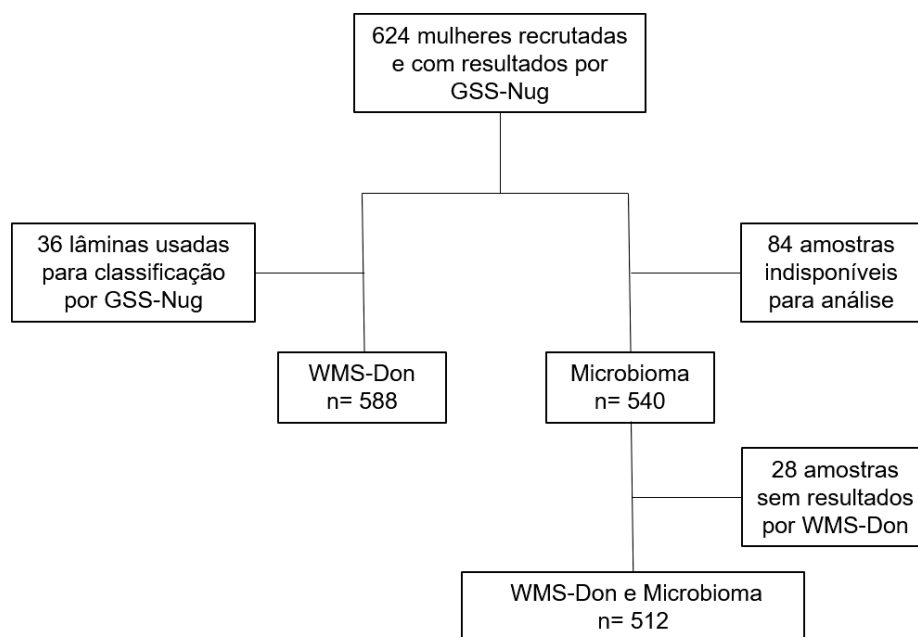
Não	621	99.5
Sim	3	0.5
PCR-positivo para TV		
Não	616	98.7
Sim	8	1.3

<sup>a</sup> Um ano antes do ingresso ao estudo. <sup>b</sup> Dois meses antes do ingresso ao estudo

PCR: reação em cadeia da polimerase, CT: *Chlamydia trachomatis*, NG: *Neisseria gonorrhoeae*, TV: *Trichomonas vaginalis*.

As 624 mulheres incluídas no estudo tinham resultados da análise microscópica por Nugent (GSS-Nug) disponíveis. Como descrito anteriormente, se o primeiro esfregaço não fosse adequado para análise, a segunda lâmina era corada e avaliada, dessa forma, 36 lâminas adicionais foram coradas pelo método de Gram e diagnosticadas por GSS-Nug, resultando em 588 amostras analisadas por WMS-Don. 540 amostras foram sequenciadas para determinação do microbioma, já que 84 amostras não estavam disponíveis para análise. Destas, 540 amostras, 28 não tinham resultados pelo método de WSM-Don, resultando em 512 amostras com resultados disponíveis de WMS-Don e microbioma. O fluxograma de amostras encontra-se resumido na Figura 1.

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE AMOSTRAS DO ESTUDO



FONTE: A autora (2021)

## 5.2 COMPARAÇÃO DOS DOIS MÉTODOS MICROSCÓPICOS PARA IDENTIFICAR A CST IV

A Tabela 7 mostra a distribuição das categorias microscopicamente definidas da microbiota vaginal por GSS-Nug e WMS-Don, de acordo com as cinco CSTs recuperadas da análise do microbioma. A maioria das mulheres (91,0%) com microbioma dominante por *L.crispatus* (CST I) tinha uma microbiota “normal” por GSS-Nug. Uma frequência menor (~70%) de mulheres com microbiota dominada por outras espécies de *Lactobacillus* (CST III, e CST II/V) foram classificadas como “normal” por GSS-Nug. Oitenta e quatro por cento das 144 participantes com CST IV (ausência de *Lactobacillus* spp.) tinham “VB” por GSS-Nug. Um total de 12 (8,3%) de participantes com CST IV foram consideradas como “normal” por GSS-Nug. A interpretação microscópica de WMS-Don resultante como “normal” representou entre 74 a 85% de todas as mulheres que tiveram qualquer CST com dominância de *Lactobacillus* spp. (CST I, CST III e CST II/V). Por outro lado, 17% das participantes com CST IV (desprovida de *Lactobacillus* spp.) foram classificadas como “normal” por WMS-Don. O tipo de AMV mais diagnosticada por WMS-Don foi a VB, identificada em 27,6% das participantes. CST IV incluiu a maioria dos casos de VB (81 de 90). A CST IV correspondeu a maioria dos casos de VA de alto grau (8 de 21) e microbiota mista de VB mais VA (17 de 28).

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS CATEGORIAS DE MICROBIOTA VAGINAL POR CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE GSS-NUG E WMS-DON, DE ACORDO COM OS TIPOS DE COMUNIDADE MICROBIANA VAGINAL (CSTs)

Método microscópico/classificação	CST I	CST III	CST IV	CSTs II e V <sup>a</sup>	Total*
<b>GSS-Nug/</b>	<b>N=168</b>	<b>N=198</b>	<b>N=144</b>	<b>N=30</b>	<b>N=540</b>
Normal	153 (91.0)	145 (73.2)	12 (8.3)	21 (70.0)	331 (61.3)
Intermediária	7 (4.2)	31 (15.7)	11 (7.7)	5 (16.7)	54 (10.0)
Vaginose Bacteriana	8 (4.8)	22 (11.1)	121 (84.0)	4 (13.3)	155 (28.7)
<b>WMS-Don/</b>	<b>N=162</b>	<b>N=184</b>	<b>N=139</b>	<b>N=27</b>	<b>N=512</b>
Normal	138 (85.2)	137 (74.5)	24 (17.3)	20 (74.1)	319 (62.3)
VB	4 (2.4)	4 (2.2)	81 (58.3)	1 (3.7)	90 (17.6)



VB Parcial <sup>b</sup>	2 (1.2)	0 (0.0)	4 (2.9)	0 (0.0)	6 (1.2)
VB Total	2 (1.2)	4 (2.2)	77 (55.4)	1 (3.7)	84 (16.4)
<b>VA-Leve<sup>c</sup></b>	<b>16 (9.9)</b>	<b>25 (13.6)</b>	<b>9 (6.5)</b>	<b>4 (14.8)</b>	<b>54 (10.5)</b>
<b>VA-Alto Grau</b>	<b>3 (1.9)</b>	<b>9 (4.9)</b>	<b>8 (5.8)</b>	<b>1 (3.7)</b>	<b>21 (4.1)</b>
VA Moderada	3 (1.9)	3 (1.6)	4 (2.9)	1 (3.7)	11 (2.2)
VA Severa	0 (0.0)	6 (3.3)	4 (2.9)	0 (0.0)	10 (1.9)
<b>VB+VA</b>	<b>1 (0.6)</b>	<b>9 (4.9)</b>	<b>17 (12.2)</b>	<b>1 (3.7)</b>	<b>28 (5.5)</b>

\* Dados de 540 participantes com dados disponíveis de GSS-Nug e microbioma e 512 participantes com dados disponíveis de WMS e microbioma. <sup>a</sup>CSTs II e V foram mesclados, uma vez que estão sub-representados na população do estudo (CST II presente em 22 e CST V em 5 participantes). <sup>b</sup>VB parcial: grau lactobacilar III (LBG III) mais microbiota granular com traços irregulares e/ou <20% de *clue cells*. <sup>c</sup>Considerado apenas VB parcial ou total combinada com VA moderada ou severa.

VB: vaginose bacteriana; VA: vaginite aeróbia

A comparação das performances de GSS-Nug e WMS-Don para detectar a presença da CST IV encontra-se disponível na Tabela 8. Duas abordagens diferentes para classificação de AMV foram testadas para cada um dos métodos microscópicos. Na observação por GSS-Nug, a presença de “VB” (escore de Nugent > 6) apresentou melhor desempenho (AUC: 0,88, 95% IC: 0,84-0,91) para identificar a CST IV quando comparado à presença de “microbiota intermediária mais VB” (escore de Nugent > 3). Na análise por WMS-Don, as duas interpretações utilizadas para a classificação AMV foram: VB e/ou VA (escore de Donders > 2) e, VB e/ou VA de alto grau (escore de Donders > 4). A última interpretação por WMS-Don mostrou melhor desempenho para identificar a CST IV (AUC: 0,83, 95% IC: 0,80-0,87). Ao comparar as AUCs mais altas de GSS-Nug e WMS-Don, a melhor interpretação microscópica de AMV para detecção da CST IV foi o diagnóstico de VB pelo método de GSS-Nug (valor-P < 0,01).

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DE ESCORES DE GSS-NUG E ESCORES DE WMS-DON PARA DETECÇÃO DO ESTADO DE AUSÊNCIA DE *Lactobacillus spp.* (CST IV)

Categorias microscópicas para AMV	N	CST IV				
		Sensibilidade	Especificidade	AUC	95% IC	Valor-P*
GSS-Nug						
Intermediária ou VB (escores >3)	209	91.7%	80.6%	0.86	0.83 - 0.89	0.038
VB (escores >6)	155	84.0%	91.4%	0.88	0.84 - 0.91	0.005
WMS-Don						
VB e/ou VA (qualquer grau) <sup>a</sup>	146	75.5%	89.0%	0.82	0.78 - 0.86	-
VB e/ou VA alto-grau <sup>b</sup>	122	72.7%	94.4%	0.83	0.80 - 0.87	-

\*Respectivamente para as diferenças entre AUCs de GSS-Nug “Intermediária ou VB” e WMS-Don “VB e/ou VA (qualquer grau)” e entre GSS-Nug “VB” e WMS-Don “VB e/ou VA alto- grau”.

<sup>a</sup> Grau lactobacilar III (LBG III) mais microbiota semelhante a VB e/ou escores de VA > 2.

<sup>b</sup> Grau lactobacilar III (LBG III) mais microbiota semelhante a VB e/ou escores de VA > 4.

AMV: alteração de microbiota vaginal

### 5.3 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS VAGINAIS COM DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DISCORDANTE

A tabela 9 mostra a distribuição das categorias microscópicas da microbiota vaginal obtidas pela interpretação de WMS-Don, de acordo com as categorias da microbiota definida por observação por GSS-Nug. A comparação dos resultados obtidos nas duas interpretações microscópicas mostrou três grandes grupos discordantes (células em destaque). Um total de 55 participantes com microbiota normal por WMS-Don foram diagnosticadas com “VB” (n=18, grupo discordante 1) ou “microbiota intermediária” (n=37, grupo discordante 2) na interpretação por GSS-Nug. Quarenta e sete participantes com microbiota “normal” por GSS-Nug estavam com AMV (VB e/ou VA) na análise por WMS-Don (grupo discordante 3).

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA ESTRATIFICAÇÃO COMPLETA DAS CATEGORIAS DA MICROBIOTA VAGINAL A PARTIR DA CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA USANDO INTERPRETAÇÃO DE WMS-DON, DE ACORDO COM AS TRÊS CATEGORIAS DEFINIDAS GSS-NUG.

Classificação microscópica por WMS-Don	Classificação microscópica por GSS-Nug			Total N=624
	Normal	Intermediária	VB	
	N=377	N=65	N=182	
<b>Normal</b>	<b>310 (86.8)</b>	<b>37 (66.1)</b> <small>D2</small>	<b>18 (10.3)</b> <small>D1</small>	<b>365 (62.1)</b>
<b>VB<sup>a</sup></b>	<b>2 (0.6)</b> <small>D3</small>	<b>2 (3.6)</b>	<b>99 (56.5)</b>	<b>103 (17.5)</b>
VB-Parcial	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.4)	6 (1.0)
VB-Total	2 (0.6)	2 (3.6)	93 (53.1)	97 (16.5)
<b>VA-leve</b>	<b>32 (9.0)</b> <small>D3</small>	<b>11 (19.6)</b>	<b>19 (10.9)</b>	<b>62 (10.6)</b>
<b>VA-Alto grau</b>	<b>11 (3.0)</b>	<b>4 (7.1)</b>	<b>11 (6.3)</b>	<b>26 (4.4)</b>
VA-Moderada	7 (1.9)	3 (5.3)	4 (2.3)	14 (2.4)
VA-Severa	4 (1.1)	1 (1.8)	7 (4.0)	12 (2.0)
<b>VB+VA<sup>b</sup></b>	<b>2 (0.6)</b> <small>D3</small>	<b>2 (3.6)</b>	<b>28 (16.0)</b>	<b>32 (5.4)</b>
<b>Indisponíveis<sup>c</sup></b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>36</b>

<sup>a</sup> VB parcial ou total: considerado apenas os casos de LBG III mais a presença de morfotipos característicos de VB. <sup>b</sup> Considerado apenas VB parcial ou total combinado com VA moderada ou severa. <sup>c</sup> Um total de 36 amostras vaginais não estavam disponíveis para análise a fresco.

Células em destaque mostram os principais grupos discordantes.

VB: vaginose bacteriana; VA: vaginite aeróbia; D1: grupo discordante 1; D2: grupo discordante 2; D3: grupo discordante 3.

Com relação aos resultados da análise do microbioma (Tabela 10), as participantes do “grupo discordante 1” apresentaram principalmente o microbioma com ausência de *Lactobacillus*, CST IV (62%), concordando assim com GSS-Nug em mais da metade dos casos. No “grupo discordante 2”, 62% dos casos foram agrupados na CST III, dominada por *L. iners*. Com exceção de um caso, todas as mulheres no “grupo discordante 3” apresentaram uma microbiota dominada por *Lactobacillus spp.* (CST I, CST II e CST III com, respectivamente 36%, 7% e 41%) em discordância da interpretação “normal” por WMS-Don.

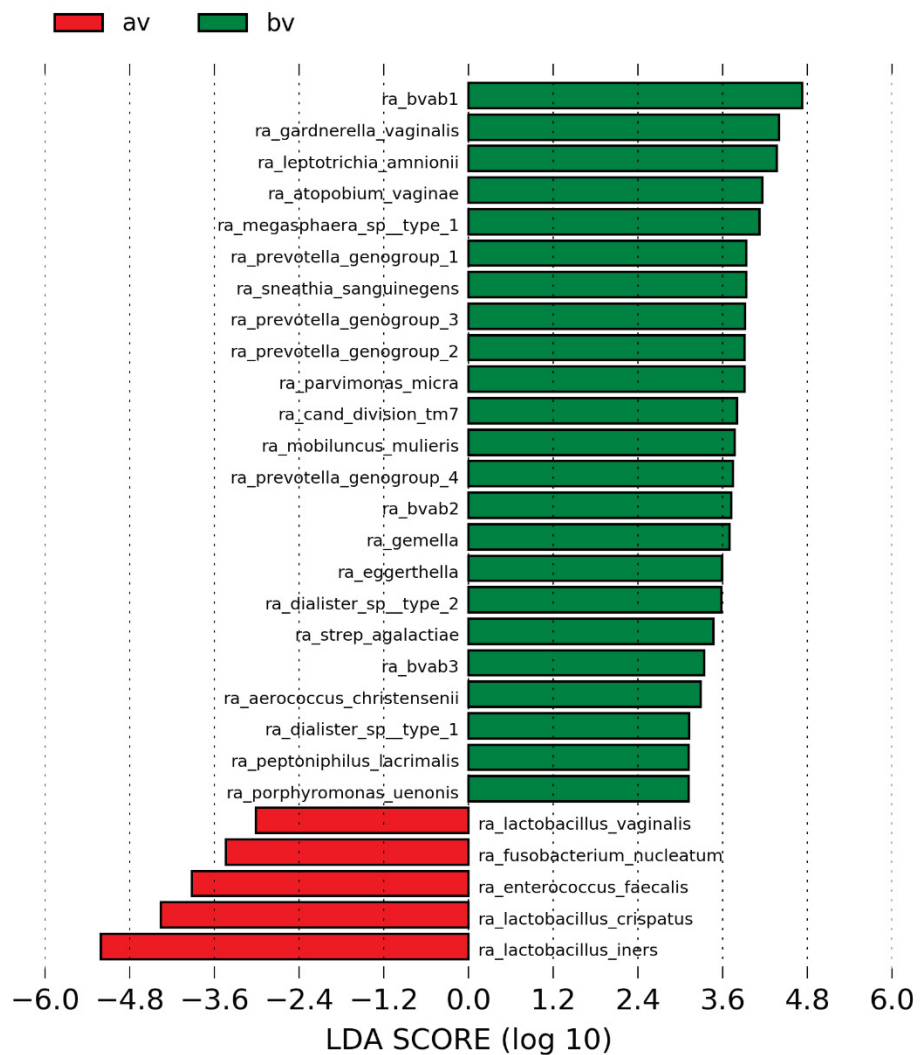
TABELA 10 - AMOSTRAS DE ESTUDO COM INTERPRETAÇÕES DISCORDANTES NOS DOIS MÉTODOS MICROSCÓPICOS (GSS-NUG E WMS-DON) DE ACORDO COM OS TIPOS DE ESTADO DA MICROBIOTA VAGINAL (CSTs).

	<b>Grupo discordante 1<sup>a</sup></b>	<b>Grupo discordante 2<sup>b</sup></b>	<b>Grupo discordante 3<sup>c</sup></b>
	GSS-Nug: VB WMS-Don: Normal	GSS-Nug: Intermediária WMS-Don: Normal	GSS-Nug: Normal WMS-Don: VB e/ou VA
<b>CST I</b>	2 (12.5%)	5 (15.6%)	16 (36.4%)
<b>CST II</b>	1 (6.3%)	2 (6.3%)	3 (6.8%)
<b>CST III</b>	3 (18.7%)	20 (62.5%)	24 (54.5%)
<b>CST IV</b>	10 (62.5%)	4 (12.5%)	1 (2.3%)
<b>CST V</b>	0 (0.0%)	1 (3.1%)	0 (0.0%)
<b>Total</b>	16 (100.0%)	32 (100.0%)	44 (100.0%)

<sup>a</sup> total de 2 participantes sem dados do microbioma; <sup>b</sup> total de 5 participantes sem dados do microbioma;

<sup>c</sup> total de 3 participantes sem dados do microbioma

FIGURA 2 - RESULTADOS DE ANÁLISE DISCRIMINANTE LINEAR ASSOCIADA A TAMANHO DE EFEITO (LEFSE) DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS 71 TÁXONS IDENTIFICADOS PELO SEQUENCIAMENTO DE RNAR 16s DAS PARTICIPANTES COM RESULTADOS DE WMS-DON DE APENAS VB (N = 90) E APENAS VA (N = 24).



A Figura 2 mostra os resultados de LEfSe realizado para comparar a composição bacteriana dos dois tipos de AMV (VB e VA) por WMS-Don. Um total de 71 táxons bacterianos foram identificados e amplamente representados na população do estudo (Tabela 11). As abundâncias relativas de 28 deles diferiram entre as microbiotas de VB e VA. Um maior número de táxons ( $n = 23$ ) foi aumentado em VB. Apenas 5 táxons foram aumentados na VA, dois quais 3 pertencem ao gênero de *Lactobacillus* (*iners*, *crispatus* e *vaginalis*). O coco Gram-positivo *E. faecalis* também

figurou entre os táxons aumentados na VA. Podemos destacar que, nenhuma espécie pertencente aos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* foi aumentada na VA e na VB. Encontramos vinte e três táxons aumentados na VB em relação a VA. Como esperado, a alfa-diversidade foi significativamente maior na VB (índice de Shannon médio: 1,88, intervalo: 0,01-2,79) quando comparado com a VA (índice de Shannon médio: 0,83, intervalo: 0,03-2,63), (valor-P de Mann-Whitney < 0,001).

TABELA 11 - ABUNDÂNCIA RELATIVA GERAL DOS TÁXONS BACTERIANOS IDENTIFICADOS NA POPULAÇÃO DO ESTUDO. TÁXONS LISTADOS EM ORDEM DECRESCENTE DE SUA ABUNDÂNCIA RELATIVA.

Nr	Táxon Bacteriano	Abundância relativa de toda a população*
1	<i>Lactobacillus iners</i>	39.496
2	<i>Lactobacillus crispatus</i>	25.580
3	<i>Gardnerella vaginalis</i>	9.410
4	<i>Atopobium vaginae</i>	3.763
5	<i>Lachnocurva vaginae</i> (formely BVAB1)	3.332
6	<i>Lactobacillus gasseri</i>	2.555
7	<i>Leptotrichia amnionii</i>	1.727
8	<i>Lactobacillus jensenii</i>	1.488
9	<i>Megasphaera</i> sp. type 1	1.300
10	<i>Prevotella</i> genogroup 2	1.220
11	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1.045
12	<i>Sneathia sanguinegens</i>	0.959
13	BVAB2	0.685
14	<i>Prevotella</i> genogroup 1	0.629
15	<i>Prevotella</i> genogroup 3	0.561
16	Candidate division tm7 vaginal	0.458
17	<i>Parvimonas micra</i>	0.441
18	<i>Prevotella bivia</i>	0.401
19	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.400
20	<i>Eggerthella</i>	0.373



21	<i>Aerococcus christensenii</i>	0.333
22	<i>Mobiluncus mulieris</i>	0.310
23	<i>Gemella</i>	0.274
24	<i>Prevotella</i> genogroup 4	0.262
25	<i>Ureaplasma parvum</i>	0.260
26	<i>Dialister</i> sp. type 2	0.178
27	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	0.173
28	<i>Dialister</i> sp. type 1	0.170
29	<i>Megasphaera</i> sp. type 2	0.156
30	<i>Mageeibacillus indolicus</i> (formely BVAB3)	0.138
31	<i>Streptococcus oralis</i>	0.131
32	<i>Porphyromonas uenonis</i>	0.129
33	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.117
34	<i>Raoultella planticola</i>	0.108
35	<i>Clostridium colicanis</i>	0.093
36	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	0.087
37	<i>Prevotella buccalis</i>	0.084
38	<i>Escherichia coli</i>	0.082
39	<i>Prevotella disiens</i>	0.072
40	<i>Mycoplasma hominis</i>	0.070
41	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.060
42	<i>Veillonella montpellierensis</i>	0.051
43	<i>Finegoldia magna</i>	0.050
44	<i>Anaerococcus tetradius</i>	0.050
45	<i>Peptoniphilus harei</i>	0.047
46	<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	0.046
47	<i>Dialister propionicifaciens</i>	0.043
48	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0.041
49	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	0.029

50	<i>Howardella ureilytica</i>	0.026
51	<i>Prevotella</i> genogroup 7	0.025
52	<i>Lactobacillus salivarius</i>	0.025
53	<i>Bifidobacterium breve</i>	0.023
54	<i>Bacteroides uniformis</i>	0.023
55	<i>Streptococcus anginosus</i>	0.023
56	<i>Lactobacillus coleohominis</i>	0.022
57	<i>Anaerococcus vaginalis</i>	0.022
58	<i>Corynebacterium accolens</i>	0.021
59	<i>Actinomyces neuii</i>	0.021
60	<i>Sutterella moribirens</i>	0.020
61	<i>Prevotella melaninogenica</i>	0.020
62	<i>Mobiluncus curtisii</i>	0.018
63	<i>Porphyromonas</i> sp. type 1	0.016
64	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0.015
65	<i>Atopobium minutum</i>	0.013
66	<i>Prevotella</i> genogroup 5	0.012
67	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0.012
68	<i>Actinomyces urogenitalis</i>	0.012
69	<i>Enterococcus faecium</i>	0.011
70	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0.011
71	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	0.010

\* Abundância relativa mediana (15231 leituras) normalizada da contagem de táxons.

## 6 DISCUSSÃO

Na maioria dos ambientes clínicos, especialmente naqueles em países em desenvolvimento, os métodos de diagnóstico de alterações de microbiota vaginal baseados em técnicas de biologia molecular ou sequenciamento de nova geração (SNG) ainda são inacessíveis. (REDELINGHUYS et al., 2020) Sendo assim, a

microscopia continua sendo a ferramenta mais utilizada, apesar das poucas informações disponíveis sobre a correlação com a real composição bacteriana que só pode ser avaliada por SNG. Aqui, comparamos dois sistemas de classificação microscópica da microbiota vaginal amplamente usados (GSS-Nug e WMS-Don) e mostramos que GSS-Nug, que foi descrito pela primeira vez em 1991, é melhor para detectar um estado de depleção de *Lactobacillus* spp. (aqui referido como CST IV). Apesar da VA ser reconhecida como entidade única de alteração de microbiota vaginal e causar mudanças significativas das citocinas inflamatórias no meio vaginal, sua composição do microbioma permanece sob investigação. (DONDERS et al., 2017; MARCONI et al., 2013) Embora existam alguns relatos de microbioma associado a VA usando SNG, eles são poucos e limitados em termos de população e tamanho da amostra. (OERLEMANS et al., 2020; WANG et al., 2020) Neste estudo, mostramos que os *Lactobacillus* spp. aparecem entre as espécies aumentadas na VA, assim como outros poucos cocos Gram-positivos (*E. faecalis*) e bacilos Gram-negativos (*E.coli* e *F.nucleatum*), quando comparado com a VB. Os dados atuais referem-se a um grande número de mulheres em idade reprodutiva das cinco regiões geopolíticas do Brasil. Até onde sabemos, este foi o maior estudo até agora realizado com tais propósitos.

Devido à singularidade da população brasileira em termos de miscigenação de origens étnicas e diferenças socioeconômicas/comportamentais entre as regiões do país, a associação entre as características das participantes com o status do microbioma vaginal foi profundamente explorada em estudos anteriores. (MARCONI et al., 2020; NOVAK et al. 2019) Todas as participantes do estudo estavam na menacme, de modo que o impacto esperado do baixo nível de estrogênio na microbiota vaginal foi minimizado. (HILLIER; LAU, 1997) Além disso, a maioria dos participantes mantinha um relacionamento conjugal estável e um bom nível educacional (57% tinham, ao menos, o ensino médio completo). Tais características podem explicar a baixa prevalência de infecção cervical por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis* que foram menores na população deste estudo quando comparadas aos estudos anteriores no Brasil. (ROCHA et al., 2014; SIMÕES; GIRALDO; FAÚNDES, 1998)

Em relação a comparação dos achados microscópicos com as CSTs do microbioma, mostramos que o diagnóstico de AVM por GSS-Nug resultou em poucos casos com dominância de *L. crispatus* (CST I). Por outro lado, uma a cada quatro

participantes com dominância de *L. iners* (CST III) foram diagnosticadas com AMV por GSS-Nug (intermediária ou VB). Isso pode ser explicado pelos achados recentes sobre a estrutura da parede de peptidoglicano do *L. iners* por Kim e colaboradores. (KIM et al., 2020) Esses autores mostraram que essa estrutura é mais fina em *L. iners* quando comparada a outros *Lactobacillus* spp., o que pode levar a uma interpretação Gram-negativa por GSS-Nug.

Assim como GSS-Nug, a maioria dos casos de CST I foram corretamente interpretados como “normais” por WMS-Don. Apesar da ausência de coloração de Gram anterior à observação por WMS-Don, a porcentagem de CST III próxima à GSS-Nug. No entanto, praticamente 17% das participantes com microbiota com ausência de *Lactobacillus* (CST IV) foram erroneamente interpretados como “normais” por WMS-Don e, portanto, poderiam ser negligenciados para um tratamento adequado. A maioria dos casos de “VA-leve” eram na verdade dominados por *Lactobacillus* (distribuídos nas CSTs I, III e II/V), o que pode ser devido a uma interpretação errada de morfotipos mais curtos de *Lactobacillus* como uma microbiota semelhante a VA.

A exata significância clínica das diferentes CSTs é desconhecida. No entanto, é um consenso geral que a microbiota com ausência de *Lactobacillus*, como na CST IV, é prejudicial à saúde reprodutiva das mulheres, aumentando o risco de aquisição de ISTs e desfechos gestacionais desfavoráveis. (LEWIS et al. 2017) Assim, comparamos duas estratégias de diagnóstico de GSS-Nug e WMS-Don a fim de determinar qual das quatro abordagens melhor indica a presença de CST IV. O método de GSS-Nug apresentou melhores resultados, independentemente da estratégia de interpretação utilizada para diagnóstico de AVM. A única exceção deve ser feita para o *L. iners* que precisa de cuidado na sua identificação microscópica, a coloração de Gram traz informações importantes para a interpretação microscópica de esfregaços vaginais e deve ser incentivada, apesar de ser relativamente mais trabalhosa do que a preparação a fresco de esfregaços vaginais.

A fim de compreender quais tipos microbianos levariam a resultados conflitantes pelos dois métodos microscópicos usados, investigamos os componentes bacterianos dos três principais grupos com resultados discordantes. Em geral, os resultados mostraram que as amostras que foram diagnosticadas com AMV (escores > 6) por GSS-Nug, mas classificadas como “normal” na análise de WMS-Don (grupos discordantes 1 e 2) apresentaram ausência de *Lactobacillus* (CST IV) ou ou predomínio de *L. iners* (CST III). Isso reforça o fato de que a coloração de Gram é

necessária para o reconhecimento de bacilos longos Gram-negativos que em WMS-Don são frequentemente interpretados como *Lactobacillus* spp. Os casos “normais” diagnosticados por GSS-Nug que foram classificados como AMV (VB ou VA) por WMS-Don (grupo discordante 3, n = 44), todos apresentaram predomínio de *Lactobacillus* spp., com exceção de um caso, estando de acordo com a interpretação por GSS-Nug.

A interpretação microscópica por WMS-Don abrange a classificação da microbiota em VB e VA. (DONDEERS et al., 2002, 2005) A fim de revelar quais tipos bacterianos levam à classificação como VB ou VA, comparamos o perfil do microbioma entre esses dois tipos de AVM. Encontramos um maior número de táxons bacterianos mais abundantes e também uma maior alfa-diversidade na VB, o que corrobora com descobertas recentes de Lynch e colaboradores. (LYNCH et al., 2019). Em relação aos componentes bacterianos, observamos que a VA é composta majoritariamente por *Lactobacillus* spp. De fato, esses dados corroboram com os achados da literatura sobre a alta abundância relativa de gêneros de *Lactobacillus* em casos de VA. (OERLEMANS et al., 2020; WANG et al., 2020) Interessantemente, no estudo atual, a abundância relativa de espécies que estão mais associadas a VA, como *Streptococcus* spp., não diferiu entre VA e VB. Isso pode ser devido a (i) *Streptococcus* é abundante na tanto na microbiota associada a VA quanto na VB e/ou (ii) *Streptococcus* é facilmente cultivado usando métodos tradicionais, portanto, pode parecer mais representado em toda a população do que realmente é. Corroborando com a hipótese, um estudo recente baseado em cultura por Wang e colaboradores (2020) mostrou que a *E. coli*, que é facilmente cultivada, foi seguida por *Streptococcus* do Grupo B (GBS), *Streptococcus viridans* e *Streptococcus anginosus* como as bactérias mais comumente recuperadas nos casos VA (nenhum grupo de controle foi testado). (WANG et al., 2020)

De fato, espécies de *Streptococcus* (*agalactiae*, *oralis* e *anginosus*) apareceram entre os táxons identificados neste estudo, mas não foram particularmente aumentadas na VA. Estudo de Oerlemans e colaboradores (2020) mostrou que os *Streptococcus* são mais abundantes na VA quando comparados com a VB e a microbiota normal. (OERLEMANS et al., 2020) No entanto, seus achados são difíceis de comparar com os nossos porque eles realizam a atribuição taxonômica em nível de gênero e avaliaram menos casos de VB (n = 20).

Podemos ressaltar que, dois estudos muito recentes mostraram que várias espécies tipicamente associadas a VB são abundantes em casos de VA (*G. vaginalis*, *Atopobium* spp., *Prevotella* spp. e outros) (OERLEMANS et al., 2020; WANG et al., 2020) Não podemos excluir a possibilidade de haver tais espécies associadas à VB colonizando os casos de VA do nosso estudo, porém elas foram, sem dúvida, aumentadas nos casos de VB quando comparadas à VA.

No estudo atual, as espécies não-lactobacilares aumentadas na VA eram na verdade da microbiota oral (*F. nucleatum*) e intestinal (*E. faecalis*) Assim, pode-se sugerir que as diferenças nas respostas inflamatórias da VB e VA podem ser devido à presença de componentes bacterianos do trato gastrointestinal que podem colonizar (mesmo temporariamente) o ambiente vaginal. (MARCONI et al., 2013; OERLEMANS et al., 2020) Por último, *Howardella ureilytica* também foi aumentada nos casos de VA, corroborando com literatura anterior. (LYNCH et al., 2019)

## 7 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Podemos concluir que este estudo revelou que o diagnóstico de VB por GSS-Nug mostra melhor desempenho para detectar o estado do microbioma vaginal com ausência de *Lactobacillus* spp. (CST IV), e ainda assim deve ser considerado o padrão ouro para este propósito. Apesar da coloração de Gram adicionar informações cruciais para a interpretação de morfotipos bacterianos em esfregaços vaginais, os microscopistas devem ser cautelosos ao interpretar bacilos Gram-negativos como microbiota semelhante à VB, pois eles podem, na realidade, ser *L. iners*.

Finalmente, as novas descobertas sobre a microbiota relacionada a VA mostram que esta é uma condição que difere da VB, principalmente por causa do aumento de *Lactobacillus* spp. e componentes conhecidos do trato gastrointestinal.

Estudos longitudinais adicionais são necessários para elucidar a variabilidade temporal dos componentes microbianos de VA e o manejo clínico dessa condição, assim como é importante determinar se a VA consiste em uma condição estável ou se é mais um estado transitório entre VB e/ou uma microbiota vaginal com predomínio de *Lactobacillus* spp.



## REFERÊNCIAS

- AMSEL, Richard; TOTTEN, Patricia A.; SPIEGEL, Carol A.; CHEN, Kirk C. S.; ESCHENBACH, David; HOLMES, King K. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. A28, 1983. DOI: 10.1016/0002-9343(83)91137-3.
- ATASHILI, Julius; POOLE, Charles; NDUMBE, Peter M.; ADIMORA, Adaora A.; SMITH, Jennifer S. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: A meta-analysis of published studies. **AIDS**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 1493–1501, 2008. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283021a37.
- BAUTISTA, Christian T.; WURAPA, Eyako; SATEREN, Warren B.; MORRIS, Sara; HOLLINGSWORTH, Bruce; SANCHEZ, Jose L. Bacterial vaginosis: A synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. **Military Medical Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1186/s40779-016-0074-5.
- BORGDORFF, Hanneke; TSIVTSIVADZE, Evgeni; VERHELST, Rita; MARZORATI, Massimo; JURRIAANS, Suzanne; NDAYISABA, Gilles F.; SCHUREN, Frank H.; VAN DE WIJGERT, Janneke H. M. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in african women. **ISME Journal**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1781–1793, 2014. DOI: 10.1038/ismej.2014.26.
- BOSKEY, E. R.; CONE, R. A.; WHALEY, K. J.; MOENCH, T. R. Origins of vaginal acidity: High D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 1809–1813, 2001. DOI: 10.1093/humrep/16.9.1809.
- BROTMAN, Rebecca M. et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacteria community composition among reproductive-age women. **Sexual Transmitted Diseases**, [S. l.], v. 39, n. 10, p. 807–812, 2013. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e3182631c79. Association.
- CAUCI, Sabina; CULHANE, Jennifer Flatow; DI SANTOLO, Manuela; MCCOLLUM, Kelly. Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1 $\beta$ . **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 198, n. 1, p. 132.e1-132.e7, 2008. DOI: 10.1016/j.ajog.2007.05.035.
- CAUCI, Sabina; GUASCHINO, Secondo; DE ALOYSIO, Domenico; DRIUSSI, Silvia; DE SANTO, Davide; PENACCHIONI, Paola; QUADRIFOGLIO, Franco. **Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1 $\beta$  and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women** *Molecular Human Reproduction*, 2003. DOI: 10.1093/molehr/gag003.
- CAUCI, Sabina; HITTI, Jane; NOONAN, Carolyn; AGNEW, Kathy; QUADRIFOGLIO, Franco; HILLIER, Sharon L.; ESCHENBACH, David A. 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. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 187, n. 4, p. 877–881, 2002. DOI: 10.1067/mob.2002.127454.

CHERPES, Thomas L.; MEYN, Leslie A.; KROHN, Marijane A.; LURIE, Joel G.; HILLIER, Sharon L. Association between acquisition of Herpes Simplex Virus Type 2 in women and bacterial vaginosis. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 37, p. 319–325, 2003. DOI: 10.4067/s0716-10182003000400012.

DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, [S. l.], v. 20, p. S1-13, 2002.

DODERLEIN, Albert. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das puerperalfieber. **Leipzig: Verlag von Edard Besold**, [S. l.], 1892.

DONDERS, G. G. G.; BELLEN, G.; REZEBERGA, D. **Aerobic vaginitis in pregnancy** **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 2011. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2011.03020.x.

DONDERS, Gilbert G. G.; BELLEN, Gert; GRINCEVICIENE, Svitrigaile; RUBAN, Kateryna; VIEIRA-BAPTISTA, Pedro. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 168, n. 9–10, p. 845–858, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.04.004.

DONDERS, Gilbert G. G.; MARCONI, Camila; BELLEN, Gert; DONDERS, Francesca; MICHIELS, Thirsa. Effect of short training on vaginal fluid microscopy (wet mount) learning. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 165–169, 2015. DOI: 10.1097/LGT.0000000000000052.

DONDERS, Gilbert G. G.; VEREECKEN, Annie; BOSMANS, Eugene; DEKEERSMAECKER, Alfons; SALEMBIER, Geert; SPITZ, Bernard. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis : aerobic vaginitis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [S. l.], v. 109, n. January, p. 34–43, 2002.

DONDERS, Gilbert G. G.; VEREECKEN, Annie; BOSMANS, Eugene; DEKEERSMAECKER, Alfons; SALEMBIER, Geert; SPITZ, Bernard. Aerobic vaginitis: Abnormal vaginal flora entity that is distinct from bacterial vaginosis. **International Congress Series**, [S. l.], v. 1279, p. 118–129, 2005. DOI: 10.1016/j.ics.2005.02.064.

DONDERS, Gilbert G. G.; VEREECKEN, Annie; DEKEERSMAECKER, Alfons; VAN BULCK, Ben; SPITZ, Bernard. Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary flora better than gram stain. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 308–314, 2000. DOI: 10.1136/jcp.53.4.308.

DRELL, Tiina et al. Characterization of the Vaginal Micro- and Mycobiome in Asymptomatic Reproductive-Age Estonian Women. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. E54379, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0054379.

ECKERT, Linda O.; MOORE, Donald E.; PATTON, Dorothy L.; AGNEW, Kathy J.; ESCHENBACH, David A. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. **Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 11–17, 2003. DOI: 10.1155/S1064744903000024.

ESCHENBACH, D. A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, S. J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C. M.; HOLMES, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial

vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 251–256, 1989. DOI: 10.1128/jcm.27.2.251-256.1989.

FARAGE, Miranda; MAIBACH, Howard. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [S. l.], v. 273, n. 4, p. 195–202, 2006. DOI: 10.1007/s00404-005-0079-x.

GAJER, Pawel et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 132, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003605.

GARDNER, Herman L.; DUKES, Charles D. Haemophilus vaginalis vaginitis. A newly defined specific infection previously classified “nonspecific” vaginitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 69, n. 5, p. 962–976, 1955. DOI: 10.1016/0002-9378(55)90095-8.

GONG, Zheng; LUNA, Yesmin; YU, Ping; FAN, Huizhou. Lactobacilli Inactivate Chlamydia trachomatis through Lactic Acid but Not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e107758, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107758.

GRAVER, Michelle A.; WADE, Jeremy J. The role of acidification in the inhibition of Neisseria gonorrhoeae by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 8, 2011. DOI: 10.1186/1476-0711-10-8.

GREENWOOD, J. R.; PICKETT, M. J. Transfer of Haemophilus vaginalis Gardner and Dukes to a new genus, Gardnerella: G. vaginalis (Gardner and Dukes) comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 170–178, 1980. DOI: 10.1099/00207713-30-1-170.

GREIG, Phillip C.; ERNEST, J. M.; TEOT, Lisa; ERIKSON, Mark; TALLEY, Russell. Amniotic fluid interleukin-6 levels correlate with histologic chorioamnionitis and amniotic fluid cultures in patients in premature labor with intact membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 169, n. 4, p. 1035–1044, 1993. DOI: 10.1016/0002-9378(93)90050-S.

GUASCHINO, S.; SANTO, D. De; SETA, F. De. New perspectives in antibiotic prophylaxis for obstetric and gynaecological surgery. **The Journal of hospital infection**, [S. l.], v. 50 Suppl A, p. 13–16, 2002. DOI: 10.1053/jhin.2001.1124.

GUÉDOU, Fernand A.; DAMME, Lut Van; DEESE, Jennifer; CRUCITTI, Tania; MIREMBE, Florence; SOLOMON, Suniti; BECKER, Marissa; ALARY, Michel. 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. **Sexually Transmitted Infections**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 161–164, 2013. DOI: 10.1136/sextrans-2012-050896.

GUÉDOU, Fernand Aimé; DAMME, Lut Van; MIREMBE, Florence; SOLOMON, Suniti; BECKER, Marissa; DEESE, Jennifer; CRUCITTI, Tania; ALARY, Michel. 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. **Sexually Transmitted Infections**, [S. l.], v. 88, n. 7, p. 545–552, 2012. DOI: 10.1136/sextrans-2011-050319.

HILL, Donna R.; BRUNNER, Marianne E.; SCHMITZ, Deborah C.; DAVIS, Catherine

C.; FLOOD, Janine A.; SCHLIEVERT, Patrick M.; WANG-WEIGAND, Sherry Z.; OSBORN, Thomas W. In vivo assessment of human vaginal oxygen and carbon dioxide levels during and post menses. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 99, n. 4, p. 1582–1591, 2005. DOI: 10.1152/japplphysiol.01422.2004.

HILLIER, S. L.; LAU, R. J. Vaginal microflora in postmenopausal women who have not received estrogen replacement therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [S. l.], v. 25 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S123-6, 1997. DOI: 10.1086/516221.

HILLIER, Sharon L. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 169, n. 2, p. 455–459, 1993. DOI: 10.1016/0002-9378(93)90340-O.

IMSEIS, Hytham M.; GREIG, Phillip C.; LIVENGOD, Charles H.; SHUNIOR, Emily; DURDA, Paul; ERIKSON, Mark. Characterization of the inflammatory cytokines in the vagina during pregnancy and labor with bacterial vaginosis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 90–94, 1997. DOI: 10.1016/S1071-5576(97)00003-8.

ISON, C. A.; HAY, P. E. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. **Sexually Transmitted Infections**, [S. l.], v. 78, n. 6, p. 413–415, 2002.

KENYON, Chris; COLEBUNDERS, Robert; CRUCITTI, Tania. The global epidemiology of bacterial vaginosis: A systematic review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 209, n. 6, p. 505–523, 2013. DOI: 10.1016/j.ajog.2013.05.006.

KIM, Hyaekang; KIM, Taehyun; KANG, Jaeku; KIM, Younghoon; KIM, Heebal. Is lactobacillus gram-positive? A case study of lactobacillus iners. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1–8, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8070969.

KINDINGER, Lindsay M. et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. **Microbiome**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1186/s40168-016-0223-9.

KOUMANS, Emilia H.; STERNBERG, Maya; BRUCE, Carol; MCQUILLAN, Geraldine; KENDRICK, Juliette; SUTTON, Madeline; MARKOWITZ, Lauri E. The Prevalence of Bacterial Vaginosis in the United States, 2001–2004; Associations With Symptoms, Sexual Behaviors, and Reproductive Health. **Sexual Transmitted Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 11, p. 864–869, 2007. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565.

KOVACHEV, Stefan Miladinov. Obstetric and Gynecological Diseases and Complications Resulting from Vaginal Dysbacteriosis. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 173–184, 2014. DOI: 10.1007/s00248-014-0414-5.

KRISHNA, S. B. N.; WILSON, Stacey L.; ADAM, Jamila K. The vaginal microbiota in women health and disease: Current understanding and future perspectives - A review. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 190–205, 2017.

LEWIS, Felicia M. T.; BERNSTEIN, Kyle T.; ARAL, Sevgi O. Vaginal microbiome and its relationship to behavior, sexual health, and sexually transmitted diseases.



**Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 129, n. 4, p. 643–654, 2017. DOI: 10.1097/AOG.0000000000001932.

LIBMAN, Michael D.; KRAMER, Michael; PLATT, Robert. Comparison of Gram and Kopeloff stains in the diagnosis of bacterial vaginosis in pregnancy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 197–201, 2006. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.09.017.

LYNCH, Tarah et al. Molecular diagnosis of vaginitis: Comparing quantitative PCR and microbiome profiling approaches to current microscopy scoring. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 9, 2019. DOI: 10.1128/JCM.00300-19.

MARCONI, C.; DONDEERS, G. G. G.; BELLEN, G.; BROWN, D. R.; PARADA, C. M. G. L.; SILVA, M. G. Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [S. l.], v. 167, n. 2, p. 205–209, 2013. a. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2012.12.003..

MARCONI, C.; DONDEERS, G. G. G.; BELLEN, G.; BROWN, D. R.; PARADA, C. M. G. L.; SILVA, M. G. Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, [S. l.], v. 167, n. 2, p. 205–9, 2013. b. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2012.12.003.

MARCONI, Camila et al. Characterization of the vaginal microbiome in women of reproductive age from 5 Regions in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, [S. l.], v. 47, n. 8, p. 562–569, 2020. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000001204.

MARCONI, Camila; DUARTE, Marli T. C.; SILVA, Daniela C.; SILVA, Márcia G. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1016/j.ijgo.2015.05.016.

MATTSBY-BALTZER, Inger; PLATZ-CHRISTENSEN, Jens J.; HOSSEINI, Nosrat; ROSÉN, Petra. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , fetal fibronectin, and endotoxin in the lower genital tract of pregnant women with bacterial vaginosis. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, [S. l.], v. 77, n. 7, p. 701–706, 1998. DOI: 10.1034/j.1600-0412.1998.770701.x.

MORRIS, Marianne; NICOLL, Angus; SIMMS, Ian; WILSON, Janet; CATCHPOLE, Mike. Bacterial vaginosis: a public health review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 439–450, 2001. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2001.00124.x.

NARDINI, Paola; NÃHUI PALOMINO, Rogers Alberto; PAROLIN, Carola; LAGHI, Luca; FOSCHI, Claudio; CEVENINI, Roberto; VITALI, Beatrice; MARANGONI, Antonella. Lactobacillus crispatus inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis elementary bodies, in vitro study. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1038/srep29024.

NENADIĆ, Dane B.; PAVLOVIĆ, Miloš D.; MOTRENKO, Tatjana. A novel microscopic method for analyzing Gram-stained vaginal smears in the diagnosis of disorders of vaginal microflora. **Vojnosanitetski Pregled**, [S. l.], v. 72, n. 8, p. 670–676, 2015. DOI: 10.2298/VSP140612065N.

NOVAK, Juliano; MARCONI, Camila; SILVA, Marcia Guimarães Da.  
**CHARACTERISTICS ASSOCIATED WITH *Lactobacillus iners* -DOMINATED VAGINAL MICROBIOTA IN BRAZIL.** Artigo submetido. Texto disponível em Repositório da UNESP <<http://hdl.handle.net/11449/181201>>.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 297–301, 1991. DOI: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991.

O'HANLON, Deirdre E.; MOENCH, Thomas R.; CONE, Richard A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 200, 2011. DOI: 10.1186/1471-2334-11-200.

OERLEMANS, Eline F. M. et al. The Dwindling Microbiota of Aerobic Vaginitis, an Inflammatory State Enriched in Pathobionts with Limited TLR Stimulation. **Diagnostics**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 879, 2020. DOI: 10.3390/diagnostics10110879.

PAPANICOLAOU, George N. A new procedure for staining vaginal smears. **Science**, [S. l.], v. 95, n. 2469, p. 438–439, 1942.

PLATZ-CHRISTENSEN, Jens-Jorgen; LARSSON, Per-Goran; SUNDSTROM, Evan; LENNART BONDESON. Detection of bacterial vaginosis in Papanicolaou smears. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 1987–1988, 1989. DOI: 10.1016/0002-9378(89)90104-X.

RAVEL, Jacques et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 108, n. Supplement 1, p. 4680–4687, 2011. DOI: 10.1073/PNAS.1002611107.

REDELINGHUYS, Mathys J.; GELDENHUYS, Janri; JUNG, Hyunsul; KOCK, Marleen M. **Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00354.

ROCHA, Danielle Albuquerque Pires; FILHO, Roberto Alexandre Alves Barbosa; MARIÑO, Josiane Montanho; SANTOS, Cristina Maria Borborema Dos. “Hidden” sexually transmitted infections among women in primary care health services, Amazonas, Brazil. **International Journal of STD and AIDS**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 878–886, 2014. DOI: 10.1177/0956462414523742.

ROMERO, Roberto et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and Gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 169, n. 4, p. 805–816, 1993. DOI: 10.1016/0002-9378(93)90009-8.

ROMERO, Roberto et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–19, 2014. DOI: 10.1186/2049-2618-2-10.

SCHMIDT, H.; HANSEN, J. G. Diagnosis of bacterial vaginosis by wet mount identification of bacterial morphotypes in vaginal fluid. **International Journal of STD & AIDS**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 150–155, 2000.

SCHWEBKE, Jane R.; DESMOND, Renee. Risk Factors for Bacterial Vaginosis in Women at High Risk for Sexually Transmitted Diseases. **Sexually Transmitted Diseases**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 654–658, 2005. DOI: 10.1097/01.olq.0000175396.10304.62.

SCHWIERTZ, Andreas. **Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease**. [s.l.] : Advances in experimental medicine and biology, 2016. v. 902 DOI: 10.1007/978-3-319-31248-4..

SEGATA, Nicola; IZARD, Jacques; WALDRON, Levi; GEVERS, Dirk; MIROPOLSKY, Larisa; GARRETT, Wendy S.; HUTTENHOWER, Curtis. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, [S. l.], v. 12, n. 6, 2011. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.

SEWANKAMBO, Nelson et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. **The Lancet**, [S. l.], v. 350, n. 9077, p. 546–550, 1997. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)01063-5.

SIMÕES, J. A.; GIRALDO, P. C.; FAÚNDES, A. Prevalence of cervicovaginal infections during gestation and accuracy of clinical diagnosis. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 129–133, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1098-0997(1998)6:3<129::AID-IDOG6>3.0.CO;2-S.

SMITH, Steven B.; RAVEL, Jacques. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. **Journal of Physiology**, [S. l.], v. 595, n. 2, p. 451–463, 2017. DOI: 10.1113/JP271694.

SOBEL, JD. Bacterial Vaginosis-An Ecologic Mystery. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 111, n. 7, p. 551–553, 1989.

SPIEGEL, CA. Bacterial vaginosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 485–502, 1991. DOI: 10.5005/jp/books/13087\_19.

SPIEGEL, Carol A.; AMSEL, Richard; HOLMES, King K. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Direct Gram Stain of Vaginal Fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 170–177, 1983.

SRINIVASAN, Sujatha; FREDRICKS, David N. The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, [S. l.], v. 2008, 2009. DOI: 10.1155/2008/750479.

SWEET, Richard L. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: Implications for the non-pregnant patient. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 8, n. 3–4, p. 184–190, 2000. DOI: 10.1155/s1064744900000260.

TACHEDJIAN, Gilda; O'HANLON, Deirdre E.; RAVEL, Jacques. The implausible “in vivo” role of hydrogen peroxide as an antimicrobial factor produced by vaginal microbiota. **Microbiome**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 3–7, 2018. DOI: 10.1186/s40168-018-0418-3.

TAMRAKAR, Renuka; YAMADA, Takashi; FURUTA, Itsuko; CHO, Kazutoshi; MORIKAWA, Mamoru; YAMADA, Hideto; SAKURAGI, Noriaki; MINAKAMI, Hisanori. Association between Lactobacillus species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 7, p. 128, 2007. DOI: 10.1186/1471-2334-7-128.



THOMASON, L.; ANDERSON, Robert; GELBART, Sheldon M.; OSYPOWSKI, Peter; ASCP, M. T.; SCAGLIONE, Nancy; TABBAKH, Gamal E. I. Simplified Gram stain interpretive method for diagnosis of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 167, n. 1, p. 16–19, 1992. DOI: 10.1016/S0002-9378(11)91617-2.

USUI, Rie; OHKUCHI, Akihito; MATSUBARA, Shigeki; IZUMI, Akio; WATANABE, Takashi; SUZUKI, Mitsuaki; MINAKAMI, Hisanori. Vaginal lactobacilli and preterm birth. **Journal of Perinatal Medicine**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 458–466, 2002. DOI: 10.1515/JPM.2002.072.

VALORE, Erika V.; PARK, Christina H.; IGRETI, Sorina L.; GANZ, Tomas. Antimicrobial components of vaginal fluid. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 187, n. 3, p. 561–568, 2002. DOI: 10.1067/mob.2002.125280.

VAN DE WIJGERT, Janneke H. H. M.; BORGDORFF, Hanneke; VERHELST, Rita; CRUCITTI, Tania; FRANCIS, Suzanna; VERSTRAELEN, Hans; JESPER, Vicky. The Vaginal Microbiota: What Have We Learned after a Decade of Molecular Characterization? **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e105998, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0105998.

VANEECHOUTTE, Mario. The human vaginal microbial community. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 168, n. 9–10, p. 811–825, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.08.001.

VERSTRAELEN, Hans; VERHELST, Rita; CLAEYS, Geert; DE BACKER, Ellen; TEMMERMAN, Marleen; VANEECHOUTTE, Mario. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 9, 2009. DOI: 10.1186/1471-2180-9-116.

VERSTRAELEN, Hans; VERHELST, Rita; ROELEN, Kristien; CLAEYS, Geert; WEYERS, Steven; DE BACKER, Ellen; VANEECHOUTTE, Mario; TEMMERMAN, Marleen. Modified classification of Gram-stained vaginal smears to predict spontaneous preterm birth: a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 196, n. 6, p. 528.e1-528.e6, 2007. DOI: 10.1016/j.ajog.2006.12.026.

VIRTANEN, Seppo; RANTSI, Tiina; VIRTANEN, Anni; KERVINEN, Kaisa; NIEMINEN, Pekka; KALLIALA, Ilkka; SALONEN, Anne. Vaginal Microbiota Composition Correlates Between pap smear Microscopy and Next Generation sequencing and Associates to socioeconomic status. **Scientific Reports**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-44157-8.

VODSTRCIL, Lenka A. et al. Incident Bacterial Vaginosis (BV) in women who have sex with women is associated with behaviors that suggest sexual transmission of BV. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 60, n. 7, p. 1042–1053, 2015. DOI: 10.1093/cid/ciu1130.

WANG, Chen; FAN, Aiping; LI, Huiyang; YAN, Ye; QI, Wenhui; WANG, Yingmei; HAN, Cha; XUE, Fengxia. Vaginal bacterial profiles of aerobic vaginitis: a case–control study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 114981, 2020. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114981.

WIESENFELD, Harold C.; HILLIER, Sharon L.; KROHN, Marijane A.; LANDERS, Daniel V.; SWEET, Richard L. Bacterial Vaginosis Is a Strong Predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infection . **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 663–668, 2003. DOI: 10.1086/367658.

WITKIN, Steven S.; MENDES-SOARES, Helena; LINHARES, Iara M.; JAYARAM, Aswathi; LEDGER, William J.; FORNEY, J. Influence of Vaginal Bacteria and D - and L -Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer : Implications. **mBio**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1–7, 2013. DOI: 10.1128/mBio.00460-13.Editor.

ZHENG, Jinshui; GÄNZLE, Michael G.; LIN, Xiaoxi B.; RUAN, Lifang; SUN, Ming. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 2133–2143, 2014. DOI: 10.1111/1462-2920.12662.

## ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização do microbioma vaginal de mulheres brasileiras em idade reprodutiva.

**Pesquisador:** Márcia Guimarães da Silva

**Área Temática:** Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

**Versão:** 3

**CAAE:** 02381512.5.1001.5411

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 306.547

**Data da Relatoria:** 17/06/2013

#### Apresentação do Projeto:

Sabe-se que a microbiota residente exerce papel fundamental na prevenção de inúmeras doenças humanas. Em especial, as modificações na microbiota vaginal (i.e., alterações na composição bacteriana local) interferem na saúde da mulher, aumentando o risco de aquisição de doenças sexualmente transmissíveis (DST), vaginose bacteriana (VB) entre outros problemas de saúde. Portanto, a caracterização da microbioma vaginal de mulheres brasileiras em idade reprodutiva, provenientes de diferentes regiões do país, trará contribuições para o conhecimento da flora predominante. Assim, a partir dessa descrição será possível desenvolver estratégias futuras no país para manutenção de um ambiente vaginal saudável com a redução de importantes problemas na saúde reprodutiva da mulher.

#### Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar a microbioma vaginal de mulheres brasileiras em idade reprodutiva, de acordo com: 1) Abundância das diferentes espécies presentes e padrões de classificação da microbiota vaginal; 2) Normal, intermediária e vaginose bacteriana; 3) Contagem total e caracterização das sub-comunidades bacterianas presentes na VB por clusters das espécies prevalentes; 3) Residência nas diferentes regiões brasileiras.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

## FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 306.547

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Este estudo oferece riscos mínimos à saúde das mulheres participantes que incluem o desconforto durante o exame especular e a surpresa ou perturbação emocional após a divulgação do diagnóstico. As participantes incluídas neste estudo serão submetidas à pesquisa de tricomoníase, gonorréia e infecção por *Chlamydia trachomatis*, além da avaliação da microbiota vaginal por microscopia. As participantes que apresentarem sinais de vaginose bacteriana e/ou de DST serão tratadas conforme a necessidade e segundo o protocolo de cada serviço.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa trará informações importantes para o conhecimento da flora vaginal predominante da mulher brasileira. Todas as autorizações pertinentes foram incluídas no processo e os custos da pesquisa serão bancados por agência de fomento a pesquisa (FAPESP).

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi descrito na forma de convite, com linguagem acessível, com esclarecimentos sobre os objetivos do estudo, sigilo e participação voluntária dos envolvidos na pesquisa.

Foi incluído esclarecimento às pacientes que haverá uma equipe de saúde disponível para orientar e realizar o tratamento físico e emocional das pacientes diagnosticadas com doenças vaginais.

### **Recomendações:**

Nada a acrescentar.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após atendimento aos questionamentos feitos pela CEP local e CONEP, sou de parecer favorável à aprovação da execução desse projeto de pesquisa.

### **Situação do Parecer:**

Aprovado

### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Haja Vista que todas as recomendações feitas pela CONEP foram atendidas de forma satisfatória, o projeto está em condições de ser iniciado. Deliberado em reunião EXTRAORDINÁRIA DO CEP de 17/06/2013.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 306.547

BOTUCATU, 17 de Junho de 2013

---

Assinador por:  
Trajano Sardenberg  
(Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br