

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Daniele Maria Knupp de Souza

**Aspectos diagnósticos, epidemiológicos, microbiológicos e
moleculares de *Gardnerella vaginalis* em mulheres atendidas na rede
pública e particular de Juiz de Fora, MG.**

Juiz de Fora
2013

DANIELE MARIA KNUPP DE SOUZA

Aspectos diagnósticos, epidemiológicos, microbiológicos e moleculares de *Gardnerella vaginalis* em mulheres atendidas na rede pública e particular de Juiz de Fora, MG.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

ORIENTAÇÃO

Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva (Orientadora)
Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (Co-orientador)

Juiz de Fora
2013

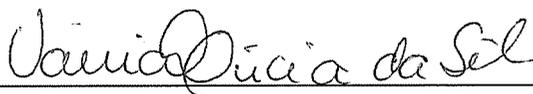
DANIELE MARIA KNUPP DE SOUZA

**Aspectos diagnósticos, epidemiológicos, microbiológicos e moleculares de
Gardnerella vaginalis em mulheres atendidas na rede pública e particular de Juiz
de Fora, MG**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 25 / 04 / 2013 .

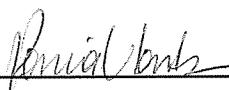
BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dr^ª. Vânia Lúcia da Silva

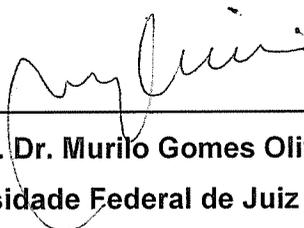
Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof^ª. Dr^ª. Kênia Valéria dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira

Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico esse trabalho á Deus, meu amparo e meu guia em todos os momentos.
Aos meus pais, Sebastião e Lucimar, pelo amor incondicional, pelo incentivo e
apoio em todas as minhas escolhas e decisões .*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Sua presença constante em minha vida, iluminando meu caminho, livrando-me de todo o mal e me presenteando com pessoas abençoadas ao longo da caminhada.

Agradeço à professora Vânia, minha orientadora e ao professor Cláudio, meu co-orientador, pela orientação, paciência, disponibilidade e todos os ensinamentos partilhados.

Aos meus pais, Sebastião e Lucimar, os pilares da minha vida, meus exemplos de honestidade, trabalho e fé, o meu maior tesouro. Agradeço pelo amor incondicional, toda força e incentivo na realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, Dayane e Débora, e à Tainara (de coração) pela amizade, pelo carinho e força nas horas de desânimo.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, Thalles, por todo amor, por ser o meu maior incentivador e por compreender minha ausência.

À minha família por todas as orações e por todo carinho.

À Alessandra, pelos importantes ensinamentos e auxílio até aos finais de semana.

Ao Thiago, pela amizade e pelo auxílio imprescindível durante a parte experimental.

À Michele, Laura, Carol, Claudinha, Mare, Ju, Ivna, Alessandra, Thiago, por todos os momentos de convívio, amizade e apoio constante.

Às minhas queridas alunas, Débora e Luciana, que em momento algum mediram esforços para executarem qualquer tarefa referente ao nosso trabalho, por todo envolvimento e compromisso, continuem assim em tudo o que fizerem e terão um futuro brilhante.

A todos os demais alunos de Iniciação Científica e professores do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, do Departamento de Parasitologia, Imunologia e Microbiologia do ICB/UFJF, pela constante ajuda, incentivo e também pela amizade e convívio.

Ao Dr. Didier e toda equipe da Ginecologia do HU-CAS, pela ajuda na coleta das amostras para realização desse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório, pelo apoio.

A todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro, que tornou possível a concretização dos ensaios e a minha dedicação plena a este trabalho.

A todos os meus amigos, que direta ou indiretamente, sempre me apoiaram, me deram força e me fizeram acreditar que eu seria capaz.

Muito Obrigada!

RESUMO

Vaginose Bacteriana (VB) é uma síndrome polimicrobiana, caracterizada pelo desequilíbrio da microbiota vaginal, associada à substituição da população bacteriana vaginal predominantemente aeróbia (*Lactobacillus spp.*) por uma população anaeróbia (principalmente *Gardnerella vaginalis*), gerando descarga vaginal anormal em mulheres em idade reprodutiva. O objetivo desse trabalho foi a avaliação de aspectos fisiológicos e moleculares de *G. vaginalis* em pacientes com e sem VB, atendidas na rede pública (SUS) e privada de Juiz de Fora/MG, além da determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. Amostras de secreção vaginal foram coletadas e processadas para isolamento seletivo, conforme descrito na literatura. *G. vaginalis* foi identificada presuntivamente pela β -hemólise ou hemólise difusa e os testes da oxidase e catalase. A identidade bacteriana foi confirmada por reação de PCR. O gene codificador para a vaginolisina (*vly*) foi detectado por PCR. O perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas foi determinado pelo método da diluição em ágar, de acordo as recomendações do CLSI para microrganismos anaeróbios. A genotipagem foi realizada por AP-PCR. De 89 pacientes, *G. vaginalis* foi isolada de 42 por cultivo em meio de cultura, sendo 35 com VB, 02 com quadro intermediário e 05 saudáveis. Em 47 pacientes não foi possível realizar o isolamento de *G. vaginalis* por método de cultivo, sendo a reação de PCR positiva para 26 destas pacientes. Para classificar as pacientes em sintomáticas e saudáveis, foi realizado o escore de Nugent, Todos os 204 isolados de *G. vaginalis* submetidos à reação de PCR tiveram sua identidade confirmada, e destes, em 96,5% foi detectado o gene *vly*. Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, alta sensibilidade a ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol foi observada, e alta resistência foi observada a ampicilina, metronidazol, secnidazol e tinidazol. A cultura positiva de *G. vaginalis*, *per se*, não garante o diagnóstico de VB, já que os microrganismos fazem parte da microbiota residente. Não foi possível correlacionar a detecção do gene *vly* como marcador para determinação de linhagens patogênicas. A resistência bacteriana frente aos antimicrobianos mais utilizados na clínica corroboram outros estudos, e alertam para os riscos da terapia empírica rotineira. A técnica de genotipagem utilizada não permitiu o agrupamento de *G. vaginalis*, de acordo com sua origem de isolamento, sugerindo, assim, uma heterogeneidade populacional. Essa observação sustenta-se pelo não agrupamento bacteriano também em função da tipagem pelo perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, embora outras técnicas de genotipagem não tenham sido utilizadas. Além disso, ainda não são descritos oligonucleotídeos iniciadores específicos para genotipagem de *G. vaginalis* por AP-PCR. Espera-se que esses resultados possam servir de base para suscitar discussões relacionadas ao tratamento empírico da vaginose bacteriana, considerando-se limitações na disponibilidade de diagnóstico ou mesmo terapia antimicrobiana.

Descritores: Vaginose Bacteriana, *Gardnerella vaginalis*, Escore de Nugent, Papanicolaou.

ABSTRACT

Bacterial vaginosis (BV) is a polymicrobial syndrome characterized by an imbalance in the vaginal microbiota associated with the replacement of the vaginal bacterial population predominantly aerobic (*Lactobacillus spp.*) by an anaerobic population (especially *Gardnerella vaginalis*) leading to abnormal vaginal discharge in women of reproductive age. The aim of this study was to evaluate physiological and molecular aspects of *G. vaginalis* in patients with and without BV, treated at public (SUS) and private services in Juiz de Fora/MG, in addition to determining the antimicrobial susceptibility patterns. Vaginal secretion samples were collected and processed for selective isolation, as described in the literature. *G. vaginalis* was presumptively identified by β -hemolysis or diffuse hemolysis and oxidase and catalase negative tests. The bacterial identity was confirmed by PCR. The encoding gene for vaginolisin (*vly*) was detected by PCR. Antimicrobial susceptibility patterns were determined by agar dilution method, according to CLSI guidelines for anaerobic microorganisms. Genotyping was performed by AP-PCR. Out of 89 patients, *G. vaginalis* was isolated from 42 by cultivation in culture medium, 35 of which with VB, 02 with intermediate clinical and 05 healthy. In 47 patients it was not possible to perform the isolation of *G. vaginalis* by cultivation method, with a positive PCR result for 26 of these patients. To classify patients in symptomatic and healthy, Nugent score was performed. All 204 isolates of *G. vaginalis* subjected to PCR reaction had its identity confirmed and, of these, *vly* gene was detected in 96.5%. Regarding antimicrobial susceptibility patterns, high sensitivity to ampicillin/sulbactam, clindamycin and chloramphenicol was observed, and high resistance was observed to ampicillin, metronidazole, secnidazole and tinidazole. The positive culture of *G. vaginalis*, *per se*, does not ensure the diagnosis of BV, as the microorganism may be considered resident microbiota. It was not possible to correlate *vly* gene detection as a marker for determination of pathogenic strains. Bacterial resistance against antimicrobial drugs commonly used in clinical corroborate with others studies, and warn to the risks of empiric therapy routine. The genotyping technique used did not allow *G. vaginalis* grouping, according to their source of isolation, suggesting, therefore, a heterogeneous population. This observation is sustained by the impossibility of grouping using the bacterial typing by antimicrobial susceptibility profile too, although other genotyping techniques have not been used. In addition, specific primers for genotyping *G. vaginalis* by AP-PCR have not been described yet. It is expected that these results can serve as basis for raising discussions related to empiric treatment of bacterial vaginosis, considering limitations in the availability of diagnostic or antimicrobial therapy.

Keywords: Bacterial Vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, Nugent Score, Papanicolaou.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 01 Coloração de Gram e cultura de *Gardnerella vaginalis*. A - "Clue-cells" visualizada pelo método de Gram. B - β -hemólise em Ágar Vaginalis Modificado..... 51

Fotografia 02 Identificação molecular dos isolados de *Gardnerella vaginalis* por PCR utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: MW (Padrão de peso molecular); 1 - 11: amostras de isolados; C+ (Controle positivo): ATCC *G.vaginalis* 14018; C- (Controle negativo)..... 52

Fotografia 03 Detecção do gene de vaginolisina nos isolados de *Gardnerella vaginalis* por PCR utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: MW (Padrão de peso molecular); 1 - 9: amostras positivas; 10 e 11: amostras negativas; C+ (Controle positivo): ATCC *G.vaginalis* 14018; C- (Controle negativo)..... 53

Fotografia 04 Detecção de *Gardnerella vaginalis* por PCR direto do espécime clínico utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: MW (Padrão de peso molecular); 1 - 10: amostras positivas; 11: amostra negativa; C+ (Controle positivo): ATCC *G.vaginalis* 14018; C- (Controle negativo)..... 54

Figura 01 Matriz de dissimilaridade representativa do agrupamento das linhagens de *Gardnerella vaginalis* em relação a sua origem e o fenômeno de resistência às drogas..... 58

Fotografia 05 Genotipagem por AP-PCR das linhagens de *Gardnerella vaginalis* utilizando o oligoiniciador aleatório D11344. Os fragmentos de DNA foram separados por PAGE. Canaletas: MW (padrão de peso molecular);

demais canaletas: isolados de *G. vaginalis* das pacientes 107 (isolados 1 a 5), 109 (isolados 1 a 5), 104 (isolados 1, 2 e 4), 110 (isolados 1 a 5) e 113 (isolados 1 a 5)..... 59

Fotografia 06 Genotipagem por AP-PCR das linhagens de *Gardnerella vaginalis* utilizando o oligoiniciador aleatório D8635. Os fragmentos de DNA foram separados por PAGE. Canaletas: MW (padrão de peso molecular); demais canaletas: isolados de *G. vaginalis* das pacientes 107 (isolados 1 a 5), 109 (isolados 1 a 5), 104 (isolados 1, 2 e 4), 110 (isolados 1 a 5) e 113 (isolados 1 a 5)..... 60

Figura 02 Matriz de dissimilaridade resultante do agrupamento das linhagens de *Gardnerella vaginalis* após genotipagem pela técnica do AP-PCR utilizando o oligonucleotídeo aleatório D11344. Foi utilizado o método UPGMA com o coeficiente de Dice e *bootstrap* de 1000 réplicas. Agrupamentos com repetibilidade > 50% são significativos..... 61

Figura 03 Matriz de dissimilaridade resultante do agrupamento das linhagens de *Gardnerella vaginalis* após genotipagem pela técnica do AP-PCR utilizando o oligonucleotídeo aleatório D8635. Foi utilizado o método UPGMA com o coeficiente de Dice e *bootstrap* de 1000 réplicas. Agrupamentos com repetibilidade > 50% são significativos. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Genes, sequência dos oligonucleotídeos e condições de PCR utilizados para identificação molecular e detecção do gene que codifica a vaginolisina em <i>Gardnerella vaginalis</i>	41
Tabela 02 Características sócio-demográficas da população estudada.....	48
Tabela 03 Concordância entre os critérios de Nugent e Papanicolaou (Rede Particular).....	49
Tabela 04 Concordância entre a presença de “clue-cells” e Papanicolaou (Rede Particular).....	49
Tabela 05 Concordância entre os critérios de Nugent e Papanicolaou (SUS).....	50
Tabela 06 Concordância entre a presença de “clue-cells” e Papanicolaou (SUS).....	50
Tabela 07 Concordância entre o método molecular (PCR) e o cultivo em meio de cultura.....	54
Tabela 08 Pontos de corte das drogas antimicrobianas utilizadas.....	55
Tabela 09 Concentração Inibitória Mínima das linhagens de referência.....	55
Tabela 10 Perfil de susceptibilidade e classificação dos isolados de <i>Gardnerella vaginalis</i> a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Primers Aleatórios
ATCC	American Type Culture Collection
AVM	Ágar Vaginalis Modificado
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>"Clinical Laboratory Standards Institute"</i> - Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial
DIU	Dispositivo intrauterino
DNA	"deoxyribonucleic acid" - Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPV	Papiloma Vírus Humano
HU-CAS	Hospital Universitário – Centro de Atenção à Saúde
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	"ribonucleic acid" - Ácido ribonucléico
RP	Rede privada de saúde
SUS	Sistema Único de Saúde (Rede Pública)
TGM	Meio de Transporte específico para <i>Gardnerella vaginalis</i>
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

UPGMA "Unweighted Pair Group Method" - Método de grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas

VB Vaginose Bacteriana

VLV Vaginolisina

vly gene que codifica a vaginolisina

VPP Valor Preditivo Positivo

VPN Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

1	Introdução e Justificativa.....	16
2	Revisão de literatura	18
2.1	Microbiota vaginal.....	18
2.2	Vaginose Bacteriana: Aspectos Gerais.....	21
2.2.1	Aspectos epidemiológicos.....	23
2.2.2	Aspectos microbiológicos e diagnóstico.....	25
2.3	<i>Gardnerella vaginalis</i> : Características morfológicas e bioquímico-fisiológicas..	29
2.3.1	<i>Gardnerella vaginalis</i> e Vaginose Bacteriana.....	31
2.4	Tratamento.....	33
3	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	Material e métodos.....	38
4.1	População amostrada.....	38
4.2	Coleta do espécime clínico.....	39
4.3	Exame microscópico direto dos espécimes clínicos.....	39
4.4	Cultivo, isolamento e identificação presuntiva de <i>Gardnerella vaginalis</i>	39
4.5	Confirmação da identidade bacteriana por PCR e detecção do gene que codifica a vaginolisina.....	40
4.6	Detecção de <i>Gardnerella vaginalis</i> em amostras clínicas por PCR.....	42
4.7	Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	42
4.8	Genotipagem Bacteriana.....	44
4.9	Construção das matrizes de dissimilaridade.....	44
5	Resultados.....	46
5.1	Perfil epidemiológico, microbiológico e comparação entre métodos diagnósticos das pacientes.....	46
5.2	Cultivo, isolamento e identificação presuntiva de <i>Gardnerella vaginalis</i>	50
5.3	Confirmação da identidade bacteriana por PCR.....	51

5.4	Detecção do gene que codifica a vaginolisina.....	52
5.5	Comparação do isolamento de <i>Gardnerella vaginalis</i> por cultivo em meio de cultura e detecção do microrganismo por PCR.....	53
5.6	Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	54
5.7	Genotipagem Bacteriana.....	59
6	Discussão.....	63
6.1	Perfil epidemiológico, microbiológico e comparação entre métodos diagnósticos das pacientes.....	63
6.2	Cultivo, isolamento, identificação presuntiva de <i>Gardnerella vaginalis</i> e confirmação da identidade bacteriana por PCR.....	67
6.3	Detecção do gene que codifica a vaginolisina.....	69
6.4	Comparação do isolamento de <i>Gardnerella vaginalis</i> por cultivo em meio de cultura e detecção do microrganismo por PCR.....	69
6.5	Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	70
6.6	Genotipagem Bacteriana.....	76
6.7	Considerações Finais.....	78
7	Conclusões.....	79
	Referências.....	80
	Apêndices	88
	Anexos	90

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A vulvovaginite é um dos problemas ginecológicos mais comuns, sendo o corrimento genital umas das 25 razões mais frequentes pela qual a mulher procura atendimento médico. As infecções vaginais são responsáveis por sintomas bastante desagradáveis, que muitas vezes provocam grande desconforto orgânico e psicossocial para a vida da mulher.

A etiopatogenia das vulvovaginites é bastante variável, sendo a causa infecciosa a mais importante. Os principais agentes etiológicos dessas infecções são a bactéria *Gardnerella vaginalis*, associada a vaginose bacteriana (VB), e o fungo do gênero *Candida sp.*, causador da candidíase vaginal.

A VB é uma síndrome polimicrobiana, comumente associada com descarga vaginal anormal em mulheres em idade reprodutiva. Sua etiologia é pobremente compreendida e envolve um desequilíbrio na microbiota vaginal, por um supercrescimento de microrganismos anaeróbios na vagina, levando à substituição dos lactobacilos da microbiota residente e aumento no pH, de menos de 4,5 para mais do que 7,0. Um dos microrganismos anaeróbios isolados com maior frequência da secreção vaginal de mulheres portadoras de VB é a *G. vaginalis*.

Considerando a grande importância da *G. vaginalis* no desenvolvimento da VB e a associação desta patologia com sérias complicações ginecológicas e obstétricas, com conseqüente repercussão na saúde pública, o estudo clínico dessas vulvovaginites torna-se importante, tendo em vista a alta incidência de casos nos consultórios ginecológicos, sintomáticos ou não, e o alto grau de recidivas.

A cultura não é útil para diagnóstico de *G. vaginalis*, uma vez que esse microrganismo faz parte da microbiota de pacientes assintomáticos para VB, sendo encontrado nessas e em pacientes sintomáticas para VB.

Existem dois critérios diagnósticos postulados, os de Amsel e os de Nugent. Os critérios de Amsel baseiam-se em um conjunto de achados que, associados, confirmariam o diagnóstico de uma doença, caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas. Estes critérios são: corrimento homogêneo e fino, teste das aminas (KOH 10%) positivo, identificação de células epiteliais recobertas por bactérias no exame microscópico a fresco do conteúdo vaginal ("clue-cells") e pH vaginal > 4,5.

Ocorrendo três destes quatro critérios citados, pode-se estabelecer o diagnóstico clínico-laboratorial de VB em 90% das mulheres acometidas.

Em uma abordagem puramente laboratorial, considera-se possível o diagnóstico de VB através do escore de Nugent, o qual é resultante da soma de valores diferenciados para a observação quantitativa por meio da coloração de esfregaços pelo método de Gram, onde são identificados e quantificados os morfotipos bacterianos, como *Lactobacillus*, *Mobiluncus* e *G. vaginalis*. Este método laboratorial é considerado, atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico da VB. Entretanto, o escore de Nugent não permite a identificação de várias outras bactérias implicadas em VB, tais como espécies de *Mycoplasma* e *Atopobium vaginae*, o qual apresenta uma morfologia variável, levando a erros na identificação.

As drogas anti-anaeróbias de escolha, recomendadas para o tratamento da VB, tanto pelo guia de tratamento das doenças sexualmente transmissíveis do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) nos Estados Unidos, quanto pelo Ministério da Saúde no Brasil são o metronidazol e a clindamicina. Entretanto, diversos estudos apontam elevados índices de resistência da *G. vaginalis* a essas drogas.

O presente trabalho visa mostrar a importância da bacterioscopia como método complementar ao diagnóstico, correlacionando esses resultados aos do exame de Papanicolaou, além de abordar os aspectos epidemiológicos, clínicos e microbiológicos das infecções vaginais, mais precisamente a VB, causada por *G. vaginalis*.

Assim, dando sequência a linha de pesquisa "Patógenos associados às doenças cérvico-vaginais em mulheres em idade reprodutiva em Juiz de Fora/MG", o presente estudo pretende contribuir, além do diagnóstico complementar, também para conhecimento sobre a ecologia e dinâmica populacional bacteriana das doenças cérvico-vaginais em nosso meio. As informações epidemiológicas geradas neste estudo poderão servir de base para o desenvolvimento de políticas de saúde pública e, assim, contribuir para um melhor aproveitamento dos recursos financeiros a serem aplicados em medidas preventivas, minimizando os riscos associados às infecções cérvico-vaginais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota vaginal

A vagina, do ponto de vista ecológico, pode ser considerada um sítio anatômico complexo, onde mais de 50 espécies de microrganismos já foram isoladas e vivem em harmonia, e por isso são consideradas comensais, mas que podem, em situações de desequilíbrio, tornarem-se patogênicas. O equilíbrio do ecossistema vaginal é mantido por complexas interações entre a microbiota vaginal saudável, os produtos do metabolismo microbiano, o estado hormonal e a resposta imune do hospedeiro (GIRALDO et al., 2005; LIVENGOOD, 2009).

Define-se microbiota vaginal como um grupo variado de microrganismos que colonizam a vagina, sem ocasionar doença. Nos recém-nascidos do sexo feminino, a vagina é colonizada por lactobacilos, bactérias que predominam durante cerca de seis semanas e persistem enquanto o pH permanecer ácido. Quando o pH se torna neutro e há declínio dos níveis de estrogênios maternos, a microbiota vaginal se modifica, e observa-se a presença de uma microbiota mista, composta por cocos e bacilos. Na puberdade, quando se inicia a produção de estrogênio, a microbiota novamente sofre mudanças, e os lactobacilos aeróbios e anaeróbios reaparecem em grande número, contribuindo assim para a manutenção do pH ácido pela produção de ácido láctico a partir de carboidratos, sobretudo o glicogênio. Trata-se aparentemente, de um mecanismo importante para prevenir o estabelecimento de outros microrganismos possivelmente prejudiciais para a vagina. Após a menopausa, os lactobacilos novamente diminuem em número, e reaparece uma microbiota mista (JAWETZ, MELNICK e ADELBERG, 2005).

As bactérias que habitam a vagina são uma importante barreira de defesa do organismo, representando um complexo sistema microbiológico. Os lactobacilos (ou *Bacilos de Doderlein*) são bastonetes Gram positivos produtores de vários metabólitos com propriedades microbicidas, incluindo ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O ácido láctico mantém o ambiente ácido inibindo o desenvolvimento de muitas espécies bacterianas, sendo um eficiente mecanismo de

proteção das mucosas (AROUTCHEVA et al., 2001). A proteção da mucosa vaginal depende também do reconhecimento específico de estruturas na superfície dos lactobacilos (adesinas) e do epitélio vaginal (receptores). Essa interação adesinas-receptores resulta na formação do biofilme, que exerce uma ação protetora contra microrganismos indesejáveis (CASTELLANO-FILHO, DINIZ e SILVA, 2010).

A microbiota vaginal saudável é dominada por *Lactobacillus* spp. produtores de H_2O_2 , característica vantajosa para esses microrganismos, pois elimina bactérias incapazes de sintetizar catalase. O efeito bactericida do H_2O_2 é determinado pela sua atividade oxidante, gerando as espécies reativas de oxigênio, que perturbam o DNA celular. Entre os lactobacilos produtores de H_2O_2 estão o *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, dentre outros (LIVENGOOD, 2009; CASTELLANO-FILHO, DINIZ e SILVA, 2010).

Os lactobacilos produtores de H_2O_2 mostram, *in vitro*, a capacidade de inibir várias bactérias, incluindo-se entre elas a *G. vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*. A proliferação de bactérias como *G. vaginalis*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* sp., *Mobiluncus* sp. e *Mycoplasma hominis*, pouco frequentes na microbiota vaginal saudável, determina redução acentuada dos *Lactobacillus* e elevação do pH vaginal acima de 4,5, propiciando o surgimento dos sintomas de VB (LEITE et al., 2010).

Outro mecanismo de defesa da mucosa produzido pelos lactobacilos são as bacteriocinas, que são peptídeos com atividade antagonista. O espectro de ação das bacteriocinas é variável. Bacteriocinas com estreito espectro de ação inibem o crescimento de espécies de lactobacilos (isoantagonismo). Bacteriocinas com um amplo espectro de ação inibem um diversificado grupo de bactérias, incluindo *G. vaginalis* (heteroantagonismo). Sugere-se que o ácido láctico e o baixo pH trabalham sinergicamente com bacteriocinas, e, em conjunto, podem ser mais importantes que o H_2O_2 para inibir o crescimento de *G. vaginalis* (AROUTCHEVA et al., 2001).

O pH fisiológico da vagina situa-se entre 3,5 e 4,5 em mulheres na menacme, não grávidas e em não lactantes. Aquelas na pós-menopausa e outras condições de hipoestrogenismo e meninas pré-púberes têm o pH vaginal elevado (4,7 ou mais). Alguns fatores podem elevá-lo, como muco cervical, sêmen, sangue menstrual, alterações hormonais diversas (como gravidez e menopausa), doenças sexualmente transmissíveis e crescimento excessivo de outros microrganismos da microbiota

vaginal, como resultado do uso de duchas internas e antibióticos (AROUTCHEVA et al., 2001; MIJAC et al., 2006).

A microbiota bacteriana vaginal de uma mulher adulta pode incluir patógenos oportunistas, que não ocasionam doença nos tecidos saudáveis do hospedeiro. Os *Lactobacillus* spp. somam 90% das bactérias presentes na microbiota vaginal de uma mulher sadia em idade reprodutiva, sem vaginite ou cervicite. Apesar dos lactobacilos serem quase que exclusivos neste ambiente, existem muitos outros microrganismos que, em diminuta quantidade (menos de 10% do total de bactérias), compõem a microbiota residente da vagina. Entre esses microrganismos, estão os *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp., *Atopobium vaginae*, *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *G. vaginalis*, dentre outros. Fungos, como *Candida albicans*, também estão presentes, compondo uma pequena parcela da microbiota vaginal (PRIESTLY et al., 1997; SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008).

A microbiota vaginal humana sofre prováveis mudanças na representação e abundância de espécies ao longo do tempo, que são influenciados por fatores que podem incluir idade da mulher, flutuações hormonais (fase do ciclo menstrual, contracepção), atividade sexual (tipos de atividades sexuais como sexo oral ou anal seguido de sexo vaginal, frequência de sexo, número de parceiros sexuais, bem como a microbiota do trato geniturinário destes parceiros), condições de saúde (diabetes, infecção do trato urinário), uso de medicamentos (intravaginal e antibióticos sistêmicos), duchas intravaginais e higiene (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008). Essas mudanças nos tipos e proporções relativas das espécies microbianas na vagina poderiam conduzir a um estado de doença.

Os microrganismos desempenham um papel crítico na determinação do perfil bioquímico e inflamatório do ambiente vaginal. Existem evidências que indicam que apenas uma pequena fração da microbiota vaginal pode ser demonstrada por meio dos métodos disponíveis de cultivo *in vitro*, o que leva a incertezas sobre a constituição da microbiota vaginal (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008).

Assim, novas metodologias, como a biologia molecular, independente de cultivo, são necessárias para melhorar a detecção dos microrganismos e ampliar os conhecimentos sobre a complexa microbiota vaginal. Um dos aspectos do Projeto Microbioma Humano (HMP) é a necessidade de explorar a diversidade de bactérias da vagina saudável e doente para compreender se as mudanças no microbioma vaginal podem estar correlacionadas com mudanças na saúde humana (LING et al., 2010).

2.2 Vaginose Bacteriana: Aspectos Gerais

A secreção vaginal é uma resposta fisiológica do organismo feminino, e quando não há alteração devido a processo patológico, essa se apresenta de cor clara, com quantidade e aspecto podendo variar devido ao período do ciclo menstrual. Por outro lado, quando o equilíbrio da microbiota é rompido e se instala um processo patológico, um dos primeiros sinais é o corrimento vaginal, sendo uma das principais queixas ginecológicas entre as pacientes que procuram a atenção médica (GIRALDO et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2009).

Quando há um desequilíbrio da microbiota, com quadros de irritação vaginal, associados com corrimento vaginal característico de origem inflamatória com leucorréia e prurido, os agentes etiológicos são geralmente *Candida* spp. ou *Trichomonas vaginalis*, e esta condição denomina-se "vaginite específica". Em outra situação de desequilíbrio da microbiota, com irritação vaginal de origem bacteriana, acompanhado de corrimento homogêneo e fétido, alteração no pH vaginal, ausência de inflamação e pequeno número de leucócitos, esta condição denomina-se "vaginite inespecífica", que atualmente é definida como Vaginose Bacteriana (VB) (CATLIN, 1992; TEIXEIRA, 2010).

Segundo Giraldo e colaboradores (2007), a atual VB já teve diferentes nomes com o avanço dos conhecimentos microbiológicos:

1892 – Krönig - Vaginite inespecífica – causada por estreptococos anaeróbios.

1947 – Henriksen – Vaginite inespecífica – *Diplobacillus variabilis*.

- 1978 – **Pheifer et al.** – Vaginite inespecífica – causada por anaeróbios.
- 1955 – **Gardner e Dukes** – Vaginite por *Haemophilus vaginalis* – *Haemophilus vaginalis*.
- 1963 – **Zinneman e Turner** – Vaginite por *Corynebacterium vaginalis* – *Corynebacterium*.
- 1980 – **Greenwood e Picket** – Vaginite por *Gardnerella* – *Gardnerella vaginalis*.
- 1982 – **Blackwell e Barlow** – Vaginose anaeróbica – Anaeróbios.
- 1984 – **Thomason et al.** – Vaginose inespecífica – Polimicrobiano.
- 1984 – **Weström et al.** – Vaginose bacteriana – Polimicrobiana (Primeiro Simpósio Internacional sobre Vaginite, Estocolmo).

Usa-se o termo vaginose para diferenciá-lo de vaginite, na qual ocorre infecção dos tecidos vaginais. Porém, na vaginose não há lesões nos tecidos ou estas são muito discretas, havendo apenas um desequilíbrio na microbiota vaginal saudável. Mais recentemente cogitou-se a hipótese de denominar VB de “bacteriose vaginal”, pelo fato do sufixo “ose” denominar “aumento”, podendo significar o aumento de bactérias na vagina (GIRALDO et al., 2007; TEIXEIRA, 2010).

Define-se VB como uma síndrome, cuja etiologia ainda não é bem elucidada e onde há um desequilíbrio na microbiota saudável com um aumento de bactérias anaeróbias em substituição aos *Lactobacillus* spp., particularmente aqueles produtores de H₂O₂, com aparecimento de corrimento vaginal fétido. Esse odor é exacerbado após as relações sexuais e ao final da menstruação, pois a alcalinização da vagina pelo esperma ou pelo sangue menstrual reage com as substâncias produzidas pelos microrganismos anaeróbios liberando aminas voláteis (putrescina e cadaverina), resultando no odor semelhante a “peixe podre”. O corrimento vaginal, entretanto, costuma ser discreto, homogêneo, escasso, podendo ainda apresentar coloração variada, esbranquiçada, acinzentada ou amarelada. O prurido estará ausente em quase todos os casos em que não haja outra infecção concomitante (FACHINI et al., 2005; GIRALDO et al., 2007).

Segundo Giraldo e colaboradores (2007), há um sinergismo entre *G. vaginalis* e outras bactérias anaeróbias, particularmente espécies de *Mobiluncus* e *Bacteroides*. Essa síndrome está presente em grande parte das mulheres em idade reprodutiva, sendo a causa mais comum da procura em consultórios ginecológicos.

A ausência de lactobacilos produtores de H_2O_2 causa, portanto um desequilíbrio microbiológico, o glicogênio vaginal não é mais degradado em ácido láctico por esses lactobacilos, sendo transformado ao invés disso em ácidos graxos por bactérias anaeróbias. Esses ácidos graxos elevam o pH vaginal ($> 4,5$) criando um ambiente desfavorável para os lactobacilos e favorável ao crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos, catalase negativos, encontrados em elevadas concentrações entre as mulheres com VB, dentre eles, destaca-se a *G. vaginalis* (ESCHENBACH et al., 1989; FETHERS et al., 2009; CASTELLANO-FILHO, DINIZ e SILVA, 2010).

2.2.1 Aspectos epidemiológicos

O Brasil é um país com muitas disparidades sócio-econômicas. Com isso, há grande divergência quanto à prevalência de infecções vaginais em diferentes regiões do país. Sabe-se que há regiões mais pobres, como a região Norte, que possui uma infraestrutura muito precária para dar suporte à saúde da mulher, em comparação com outras regiões do país (TEIXEIRA, 2010).

A prevalência da VB é de difícil determinação, uma vez que grande parte das mulheres portadoras é assintomática, ou seja, não procuram atendimento médico, por não terem queixa, não sendo, portanto, incluídas nos estudos. A VB é a causa mais comum de corrimento vaginal nas mulheres em idade reprodutiva, sendo mais comum em mulheres negras do que brancas, naquelas mulheres com dispositivos intrauterinos (DIU) e naquelas fumantes (KOUMANS e KENDRICK, 2001).

Em pesquisas realizadas em diversos países observou-se que o índice de VB é mais elevado em mulheres com vários parceiros sexuais do que em mulheres sem atividade sexual. Muitas observações correlacionam a aquisição de VB à atividade sexual, uma vez que ela é mais frequente em mulheres sexualmente ativas, que iniciaram atividade sexual mais jovens, ou nas que possuem histórico de doenças sexualmente transmissíveis (DST). Por outro lado, existem casos – detectados mais raramente, em mulheres virgens e em crianças, o que indica que a ocorrência deste

desequilíbrio da microbiota não é decorrente exclusivamente do contato sexual. Além disso, existem fortes evidências de que o tratamento do parceiro sexual não diminui a frequência ou o intervalo das recorrências, mais um indício de que, apesar de ser uma doença relacionada ao sexo, não pode ser considerada como uma verdadeira DST (SIMÕES et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2009).

O uso de métodos de barreira e anticoncepcionais orais parece proteger contra a VB (LEITE et al., 2010). Nos EUA, a VB tem sido diagnosticada em 17% a 19% das mulheres em clínicas de planejamento familiar, e dentre 589 mulheres com alguma queixa genital, 46% foram diagnosticadas com VB. No Brasil, a VB mostra-se muito frequente, atingindo cerca de 45% das mulheres com queixa de corrimento vaginal, podendo também estar presente mesmo em mulheres assintomáticas (GIRALDO et al., 2007; LEITE et al., 2010).

Muitos outros fatores comportamentais e inerentes ao hospedeiro estão envolvidos na gênese da VB, como o fumo, a idade, a etnia, o baixo nível socioeconômico, o hábito de realizar ducha vaginal, o antecedente de DST, a higiene vaginal precária, o uso de DIU como método contraceptivo e o comportamento sexual (SIMÕES et al., 2006).

Estudos mostram que um dos fatores mais relevantes de risco para VB é o uso de DIU. Um estudo realizado por Doria (2003) mostrou que a prevalência de infecções cérvico-vaginais em pacientes usuárias de DIU foi de 29,1%, sendo VB a mais frequente (19,7%). Segundo Livengood (2009), o fumo provavelmente suprime o crescimento de lactobacilos produtores de H_2O_2 , aumentando o risco de VB.

Quanto à etnia, estudos mostram que a ocorrência de espécies de *Lactobacillus* produtores de H_2O_2 parece ser menos frequente em mulheres negras, sendo assim, o pH vaginal das mulheres negras é maior que o pH vaginal das mulheres brancas. Assim, haveria uma predisposição à VB entre as mulheres negras. A maior prevalência de VB detectada pelo Gram em mulheres negras talvez possa meramente refletir a presença de outras bactérias, que não *Lactobacillus*, como predominantes na população negra, o que não significa que tais mulheres sejam portadoras de VB (LINHARES, GIRALDO e BARACAT, 2010).

O uso de certos antibióticos, principalmente os de amplo espectro, interfere na manutenção e no equilíbrio da microbiota residente. Estudos sobre o assunto

indicam que o uso indiscriminado e frequente de duchas vaginais higiênicas poderia levar à perda do equilíbrio entre os vários microrganismos da microbiota vaginal, facilitando o aparecimento e manutenção de vulvovaginites. Tal suposição seria justificada pelo fato de as duchas vaginais promoverem limpeza mecânica das bactérias da microbiota local e ao mesmo tempo introduzir substâncias exógenas, que poderiam alterar o pH vaginal e causar reações alérgicas locais. Outro fator importante que teoricamente poderia levar a alteração da microbiota vaginal seria o alto número de coitos, seja pela deposição de sêmen (meio alcalino) no epitélio vaginal, seja pelo estímulo local da mucosa ou mesmo pela introdução de bactérias estranhas ao ambiente vaginal (GIRALDO et al., 2005).

Um estudo realizado por Simões e colaboradores (2006) no estado de São Paulo, entre mulheres profissionais ou não-profissionais do sexo, apresentou um resultado expressivo com frequência significativamente maior de VB nas mulheres profissionais do sexo, as quais apresentaram um risco pelo menos quatro vezes maior de VB em relação ao grupo controle. Além disso, também foi observada uma frequência significativamente maior de antecedente de DST entre as profissionais do sexo, quase nove vezes maior.

Contudo, a presença de VB para a mulher é um fator negativo, pois, além do incômodo habitual que o fluxo patológico determina, prejudica também a vida sexual e poderá associar-se a trabalho de parto prematuro (ZIMMERMANN et al., 2009).

A importância da VB em saúde pública permanece ambígua, e é incerto se esta patologia é a causa substancial de morbidade reprodutiva, particularmente nascimentos prematuros e infecções do trato genital superior, ou simplesmente uma ofensiva descarga vaginal (MORRIS et al., 2001).

2.2.2 Aspectos microbiológicos e diagnóstico

Do ponto de vista microbiológico a VB passou por várias etapas. A época da microbiologia descritiva começou em 1894 pela descrição de um lactobacilo por Döderlein, que pertenceria à microbiota vaginal saudável, e que hoje é reconhecido

como um agente ativo no processo de defesa da mulher contra doenças (DÖDERLEIN, 1894; HILLIER et al., 1992). Em 1914, Curtis descreveu um bacilo curto (conhecido como *Mobiluncus curtis*) que em conjunto com os *Bacteroides* spp. e os cocos anaeróbios estavam associados tanto com o corrimento vaginal quanto à endometrite pós-parto (CURTIS, 1913; CURTIS, 1914). Já em 1955, Gardner e Dukes publicaram um artigo clássico de epidemiologia clínica, onde descreveram um novo microrganismo, que chamaram de *Haemophilus vaginalis*, e que atualmente é conhecido como *G. vaginalis*. Além disto, expuseram minuciosamente as características clínicas que formam a base do diagnóstico atual de VB. Praticamente todas as observações clínicas de Gardner e Dukes (1955) são válidas (ESCHENBACH, 1993).

Microrganismos anaeróbios associados com a VB incluem principalmente espécies de *G. vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* sp., *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp. e outros anaeróbios. Os microrganismos envolvidos e os produtos que eles produzem diferem consideravelmente entre mulheres com VB, e provavelmente o risco de infecções do trato genital superior também varia entre os indivíduos (KOUMANS e KENDRICK, 2001). O isolamento de *G. vaginalis* não pode ser usado para o diagnóstico de VB, pois este microrganismo faz parte da microbiota da vagina de mais de 50% das mulheres assintomáticas para VB. Uma alta concentração de *G. vaginalis* geralmente está associada com a presença de VB (CDC, 2000).

A hipótese diagnóstica é frequentemente elaborada quase exclusivamente por uma anamnese superficial acompanhada eventualmente de exame especular. Por maior que seja a experiência do ginecologista, não se pode confiar apenas em sinais e sintomas clínicos para fazer o diagnóstico das vulvovaginites, e, em especial, da VB (GIRALDO et al., 2007).

Em um número muito grande de casos, os sinais e sintomas não são característicos, normalmente são ocultados pelo uso incorreto de cremes vaginais, duchas vaginais, coito recente, associação de diferentes doenças, entre outros. A automedicação, higiene inadequada ou o uso de substâncias irritantes locais dificultam o diagnóstico do corrimento vaginal (GIRALDO et al., 2007).

As características clínicas trazem sim, algum subsídio para o diagnóstico, mas ainda assim não são totalmente confiáveis. Portanto, para uniformizar o diagnóstico foram propostos alguns critérios que poderão incluir dados clínicos e laboratoriais ou apenas dados microbiológicos. Os critérios mais conhecidos e divulgados são os de Amsel e os de Nugent (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008).

Os critérios de Amsel são usualmente empregados na clínica para o diagnóstico da VB, a abordagem é rápida, mas exige a utilização de um microscópio, que nem sempre está disponível. Pelo menos 3 de 4 desses critérios devem estar presentes para estabelecer um diagnóstico, tais como: (1) o pH do fluido vaginal elevado, > 4,5; (2) o "teste do cheiro" ou "teste das aminas" (Whiff) positivo, que consiste na detecção de um odor de "peixe podre" devido à volatilização de aminas aromáticas (putrescina e cadaverina) com a adição de duas gotas de hidróxido de potássio (KOH) a 10% em uma lâmina contendo o fluido vaginal; (3) a presença ao exame bacterioscópico a fresco de células indicadoras, "células-guia" ou "clue-cells" (> 20%) no fluido vaginal, que são células epiteliais vaginais recobertas com bactérias, como *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp. e *Mobiluncus* spp., criando fronteiras indistintas; e (4) corrimento vaginal branco-acinzentado, em pequena quantidade, homogêneo e leitoso (AMSEL et al., 1983; GIRALDO et al., 2007; SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008; CASTELLANO-FILHO, DINIZ e SILVA, 2010). Nota-se que assim é possível ter um diagnóstico de VB com base nos critérios de Amsel sem a presença do corrimento vaginal. Com isso, presumir que mulheres sem corrimento vaginal não têm VB, não é válido, e estudos da vagina em mulheres assintomáticas para VB deveriam idealmente empregar um método objetivo para avaliar a VB (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008).

Em uma abordagem puramente laboratorial, considera-se possível o diagnóstico da VB através do score de Nugent (NUGENT, KROHN e HILLIER, 1991), um método alternativo, que depende da visualização de esfregaços do fluido vaginal corados pelo método de Gram. Esta abordagem é mais comumente empregada na pesquisa do que no ambiente clínico, porque a análise do Gram requer um grau de especialização que é raramente disponível em tempo real quando o médico é confrontado com a decisão de se tratar de VB (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008).

Os critérios de Nugent, apesar de serem menos sensíveis na identificação da VB, parecem ser mais confiáveis do ponto de vista de reprodutibilidade, pois eliminam os aspectos subjetivos encontrados nos critérios de Amsel (aspecto do corrimento e odor de aminas), sendo o diagnóstico pelos critérios de Nugent considerado o “padrão ouro” (GIRALDO et al., 2007). Nugent e colaboradores (1991) propuseram um sistema de escores, o qual é resultante da soma de valores diferenciados para a observação quantitativa por meio da coloração de esfregaços pelo método de Gram, onde são identificados e quantificados diferentes morfotipos bacterianos, como *Lactobacillus*, *Mobiluncus* e *G. vaginalis*. Um escore de 0-3 é considerado saudável (assintomática para VB) e caracteriza-se pela predominância de bastonetes Gram-positivos. Um escore de 7-10 confere o diagnóstico de VB (sintomática para VB) e é marcada pela ausência de bastonetes Gram-positivos e a presença de elevadas concentrações de morfotipos de *G. vaginalis* ou *Mobiluncus* spp. Um escore de 4-6 é designado intermediário, e tem morfotipos característicos entre os dois pólos.

Entretanto, o escore de Nugent não permite a identificação de várias outras bactérias implicadas em VB, tais como espécies de *Mycoplasma* e *Atopobium vaginae*, o qual apresenta uma morfologia variável, levando a erros na identificação (MENARD et al., 2008).

As colorações de Papanicolaou e Gram são as mais usadas na rotina laboratorial para a identificação de VB. A técnica de Papanicolaou apresenta sensibilidade em torno de 50% e especificidade média de 95% para detecção de VB, quando comparada ao teste padrão (ERIKSSON et al., 2007; HASENACK et al., 2008). Segundo Martins e colaboradores (2007), em um estudo realizado no Paraná demonstrou-se uma boa correlação dos resultados de ambas. Isto significa que um resultado de Papanicolaou indicativo de VB representa uma forte evidência de que a doença está presente, enquanto que um resultado negativo no Papanicolaou não exclui o diagnóstico de VB (LIVENGOOD, 2009). Por esta razão, esta metodologia se tornou uma alternativa prática e útil para a caracterização da doença, particularmente quando o resultado é positivo (ERIKSSON et al., 2007; KARANI et al., 2007; HASENACK et al., 2008; LIVENGOOD, 2009; SCHWEBKE, 2009). É um exame diagnóstico atraente por ser de fácil execução e possuir boa cobertura

populacional, visto fazer parte do programa para a prevenção do câncer de colo uterino, além de permitir o diagnóstico da VB assintomática (ERIKSSON et al., 2007; HASENACK et al., 2008).

2.3 *Gardnerella vaginalis*: Características morfológicas e bioquímico-fisiológicas

A *G. vaginalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa, imóvel, observada sob a forma de cocobacilos Gram-variáveis. Foi originalmente descrita em 1955 por Gardner e Dukes, como um microrganismo causador de infecção, previamente classificada como vaginite não-específica, sendo detectada em pacientes sintomáticas. Com o desenvolvimento de meios seletivos para este microrganismo, ela tem sido um dos agentes bacterianos mais frequentemente isolados associados à VB, e tem como principais características: são cocobacilos pleomórficos, Gram-negativos ou Gram-variáveis, catalase e oxidase negativos, apresentando crescimento fastidioso, β -hemolíticos em sangue humano e não em sangue de carneiro e cavalo, além de serem encapsulados (CATLIN, 1992). O interesse científico pelo seu estudo se relaciona ao fato desta bactéria ser identificada na quase totalidade das mulheres com VB, exercendo papel importante na sua patogênese (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008; LIVENGOOD, 2009; CASTELLANO-FILHO, DINIZ e SILVA, 2010).

As bactérias associadas à VB produzem um corrimento abundante de cor branco acinzentado e de odor fétido (peixe podre) oriundos da produção de aminopeptidases com formação de aminas (principalmente putrescina, cadaverina e trimetilamina), que rapidamente volatilizam em pH elevado e produzem o odor característico (NESS et al., 2004). Estas bactérias fazem parte da microbiota indígena vaginal de mulheres assintomáticas, sendo também encontrada na uretra distal de muitos homens, sendo muito mais abundante e preferencial sua colonização no trato genital feminino. O fato se deve a duas razões: o líquido seminal contém altas concentrações de zinco, que pode inibir a bactéria, e o epitélio

prostático contém células colunares, que dificultam a adesão da *G. vaginalis*. Este microrganismo está ocasionalmente associado com infecção do trato urinário e raramente provoca bacteremia; entretanto, é mais conhecido por sua associação com a VB (SILVEIRA, SOUZA e ALBINI, 2010).

Uma característica marcante dessa bactéria é assumir a Gram positividade ou negatividade, sendo, portanto, Gram-lábil. A parede celular de *G. vaginalis* não retém o cristal violeta durante a coloração de Gram, mas exibe características Gram-positivas, como a formação de septo durante a divisão celular. Alguns autores, analisando a estrutura da parede celular desse microrganismo por microscopia eletrônica de transmissão, afirmaram que a estrutura se assemelha com a parede de Gram-negativos. O fato ocorre devido à fina camada de peptidoglicano encontrada, constituindo apenas 20% do peso da parede celular, sendo muito baixa para um microrganismo Gram-positivo e semelhante aos 23% encontrados em Gram-negativos (SADHU et al., 1989; SILVEIRA, SOUZA e ALBINI, 2010). Sadhu e colaboradores (1989) concluíram que os isolados de *G. vaginalis* podem aparecer como Gram-positivos, Gram-negativos ou Gram-variáveis, porque têm uma parede celular com ultraestrutura organizada como os Gram-positivos, mas essa estrutura é muito delgada, levando ao equívoco de que possa ser um Gram-negativo. A composição química é semelhante à encontrada nas espécies de *Corynebacterium*, motivo que justifica o fato de a bactéria ter sido descrita junto aos Gram-positivos por algum tempo (SILVEIRA, SOUZA e ALBINI, 2010). Estudos baseados na composição da parede celular e nas diferenças de conteúdo em guanina-citosina e estudos de hibridização de DNA mostraram não haver relação genética com o gênero *Corynebacterium* e nem com o gênero *Haemophilus*. Assim, *G. vaginalis* foi denominada por Greenwood e Pickett (1980) e reclassificada como único membro de um novo gênero, *Gardnerella* (TEIXEIRA, 2010).

Por ser uma bactéria fastidiosa, necessita de meios ricos para seu isolamento. O Ágar Vaginalis Modificado (AVM), que é o ágar Columbia contendo biotina, ácido fólico, niacina e tiamina, acrescido de anfotericina B, gentamicina, ácido nalidíxico e 5% de sangue humano tem um resultado de isolamento satisfatório após incubação em atmosfera rica em CO₂ por 48-72 horas (FRANCISCO, 1990). Entre as principais características bioquímicas, destaca-se:

oxidase (-), catalase (-), hidrólise do hipurato (+), produção de ácido a partir de glicose, inositol (-), manitol (-) e rhamnose (-) (SILVEIRA, SOUZA e ALBINI, 2010).

Devido a *G. vaginalis* estar presente em quase 100% das mulheres com VB, é provável que ela tenha um papel no desenvolvimento desta condição. Entretanto, a cultura deste microrganismo não é recomendada como ferramenta de diagnóstico para VB, devido esta bactéria estar presente na microbiota de aproximadamente 60% das mulheres assintomáticas (CDC, 2000). Além disso, *G. vaginalis* tem sido detectada em, aproximadamente, 50% da microbiota vaginal indígena por cultura microbiológica e, em até 70%, por métodos moleculares. As culturas de *G. vaginalis*, além do alto custo-benefício, são de difícil emprego na prática clínica. O diagnóstico definitivo com a cultura e ferramentas de biologia molecular têm sido restritas a pesquisa (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008; LIVENGOOD, 2009).

2.3.1 *Gadnerella vaginalis* e Vaginose Bacteriana

Indiscutivelmente, a vagina é colonizada por numerosas bactérias anaeróbias durante a VB, mas se os sintomas e a síndrome são consequência da associação de múltiplas espécies, ou se existe uma espécie-chave em cada caso que precipita a desordem, tem sido uma questão de debate há décadas (PATTERSON et al., 2010).

Por mais de meio século, o mecanismo de virulência da *G. vaginalis* permaneceu pouco compreendido (GARDNER e DUKES, 1955). Relatórios recentes sobre a análise genômica comparativa das linhagens de *G. vaginalis* de vários isolados de pacientes sintomáticas para VB e indivíduos assintomáticos para VB forneceram novas informações sobre as potenciais características de virulência de *G. vaginalis*. A diferença na citotoxicidade entre linhagens de *G. vaginalis* é atribuída à sua capacidade de aderir às células do epitélio vaginal e formar biofilme (PLECKAITYTE et al., 2012). A adesão é o passo fundamental na patogênese, permitindo a bactéria colonizar a mucosa vaginal, minimizando o contato com enzimas extracelulares e anticorpos locais, reduzindo assim as chances dela ser eliminada junto com o fluxo de urina e o fluxo de secreções vaginais. Além disso, a

adesão é um primeiro passo para a formação de um biofilme. O biofilme incorpora outros grupos bacterianos em suas camadas, permitindo que outros anaeróbios também colonizem a vagina. A formação de biofilme confere aumento da tolerância aos antibióticos e resistência às defesas do sistema imune do hospedeiro, levando a falhas no tratamento e recidivas (PATTERSON et al., 2010).

Apesar de reconhecidamente demonstrar baixa virulência, *G. vaginalis* apresenta alguns fatores de virulência já bem estabelecidos. Além de pili, ela apresenta uma camada de exopolissacarídeo, que justifica o grande poder de adesão dessa bactéria às células epiteliais (SILVEIRA, SOUZA e ALBINI, 2010).

As “clue-cells” ou “células-guia” são células epiteliais escamosas recobertas por *G. vaginalis*, dando o aspecto de um “rendilhado”. Essas células são visualizadas no esfregaço da secreção vaginal a fresco ou corado pelo método de Gram, e ilustram o grande poder de adesão da *G. vaginalis* às células epiteliais vaginais (GIRALDO et al., 2007).

G. vaginalis também produz uma toxina citolítica que age como uma hemolisina, e é pertencente à família de citolisinas colesterol-dependente (CDC). É denominada vaginolisina (VLY), é uma porina e tem seletividade por células vermelhas humanas e células do epitélio vaginal. Há a hipótese de que a VLY esteja envolvida na patogênese da VB levando à morte celular (GELBER et al., 2008). Patterson e colaboradores (2010) analisaram a atividade citotóxica de bactérias anaeróbias associadas à VB e constataram que apenas *G. vaginalis* foi capaz de induzir a lise de células epiteliais vaginais, enquanto as outras bactérias estudadas não provocaram alterações citopatológicas detectáveis.

Outros fatores de virulência produzidos pela *G. vaginalis* e que também podem estar envolvidos na patogênese de VB são a sialidase e a prolidase, que são enzimas hidrolíticas que podem ter um papel na degradação de vários dos principais fatores de proteção da mucosa, como mucinas, estando associadas com a invasão bacteriana ao hospedeiro. Estudos mostraram que bactérias associadas à VB produzem sialidase e sua atividade está inversamente relacionada com a resposta de IgA vaginal contra VLY produzida por *G. vaginalis* (PLECKAITYTE et al., 2012).

De acordo com alguns estudos, devido a um conjunto de fatores de virulência importantes na patogênese de VB, é provável que *G. vaginalis* possa ser o patógeno

chave em alguns casos de VB. Outros autores afirmam que possa haver um sinergismo entre *G. vaginalis* e outras bactérias anaeróbias, particularmente espécies de *Mobiluncus* e *Bacteroides*. Além disso, os anaeróbios associados à VB também podem possuir fatores de virulência que ainda não foram descritos (GIRALDO et al., 2007; GELBER et al., 2008; PATTERSON et al., 2010).

2.4 Tratamento

A introdução dos agentes antimicrobianos na prática clínica representou um dos grandes avanços na medicina para o tratamento dos mais diversos tipos de doenças infecciosas. Diante desse fato é inquestionável a validade do potencial terapêutico dos antibióticos e a contribuição que estes trouxeram para a saúde. O grande problema é que em muitas, se não na maioria das vezes, eles são utilizados sem real necessidade, sem indicação médica, em doses inadequadas, por tempo insuficiente ou prolongado demais. Esses fatores desencadeiam alterações genéticas nas bactérias patogênicas e fazem com que estas desenvolvam mecanismos de resistência. Desde a introdução do primeiro antimicrobiano, a resistência bacteriana a estes agentes vem sendo descrita, e, vem emergindo em uma ampla variedade de patógenos multirresistentes, tanto de origem nosocomial quanto comunitária (POWERS, 2004; OLIVEIRA, 2006).

A indicação adequada de um antibiótico é mais precisa e segura quando a sensibilidade da bactéria tiver sido demonstrada por testes apropriados. Isso contribui para o uso racional de antibióticos, evitando o aparecimento de resistência e falência terapêutica (WANNMACHER, 2004).

O tratamento e o controle da VB visam a restabelecer o equilíbrio da microbiota vaginal, mediante a redução da população de microrganismos anaeróbios e um possível incremento dos lactobacilos produtores de peróxido de hidrogênio (GIRALDO et al., 2007).

Há estudos propondo métodos alternativos de tratamento de VB, como o de Amorim e Santos (2003) que testaram uma planta medicinal, com bom resultado, e o

de Teixeira (2010) que selecionou uma linhagem de lactobacilo com efeito probiótico.

As drogas anti-anaeróbias de escolha, recomendadas para o tratamento da VB, tanto pelo manual de tratamento das doenças sexualmente transmissíveis do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC), quanto pelo Ministério da Saúde no Brasil, são o metronidazol e a clindamicina (WORKOWSKI e BERMAN, 2006).

Em 2006, o Programa Nacional de DST emitiu recomendações específicas para o tratamento de VB: (A) para mulheres não grávidas, a primeira opção inclui o metronidazol oral (400-600 mg), duas vezes ao dia durante 7 dias, e a segunda opção inclui metronidazol oral (2g) em dose única, ou metronidazol em creme intravaginal a 7,5% duas vezes ao dia, durante 5 dias, ou clindamicina por via oral (300 mg), duas vezes ao dia durante 7 dias, ou clindamicina em creme intravaginal 2%, uma vez ao dia por 7 dias; (B) para as mulheres grávidas, após o primeiro trimestre e durante a amamentação, o metronidazol oral, 250-400 mg, três vezes ao dia durante 7 dias, ou clindamicina 300 mg, duas vezes ao dia durante 7 dias (BRASIL, 2006).

O metronidazol foi descoberto em 1957 e tem sido largamente utilizado nos últimos 30 anos (GIRALDO et al., 2007). A eficácia do tratamento é supostamente elevada. Em uma meta-análise, a taxa de cura esperada após um mês é de 70%-80% para metronidazol e 82% para clindamicina. No entanto, na prática clínica, estas taxas de eficácia elevadas são frequentemente observadas (LARSSON et al., 2011). Segundo Nagaraja (2008), a taxa de cura da terapia por via oral depois de um curso de sete dias tem sido 84-96% e 94%, respectivamente para metronidazol e clindamicina. As taxas de cura com géis vaginais foram relatados em 75% e 86%, respectivamente.

Devido à resistência ao metronidazol, outros esquemas terapêuticos têm sido propostos na clínica médica, além da associação com clindamicina. São os derivados nitroimidazólicos de segunda geração, mais potentes, como o tinidazol e o secnidazol, com indicações e efeitos colaterais semelhantes ao metronidazol, sendo utilizados na VB não complicada na dose única de 2g, com índices de cura semelhantes (GIRALDO et al., 2007).

O grande problema com a terapia antimicrobiana é que não visa reestabelecer a microbiota vaginal, erradicam não só os microrganismos patogênicos, mas também os lactobacilos da microbiota vaginal saudável, importantes no controle de infecções, podendo levar a recidivas (AMORIM e SANTOS, 2003).

Até o presente momento, os tratamentos preconizados ainda são insatisfatórios, verificando-se altos índices de recidiva e resistência, mesmo porque a patogênese do processo envolvendo *G. vaginalis* ainda não está bem esclarecida.

Neste contexto, este trabalho poderá contribuir na geração de conhecimentos regionais sobre o envolvimento de *G. vaginalis* no processo de VB, além de determinar os perfis de susceptibilidade às drogas antimicrobianas utilizadas no tratamento da mesma, a fim de estudarmos as linhagens microbianas circulantes na região.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as características fisiológicas, moleculares, epidemiológicas e aspectos diagnósticos de *G. vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB atendidas no serviço de ginecologia da rede pública (SUS) e privada de Juiz de Fora, MG, e avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença de VB utilizando o escore de Nugent (Diagnóstico Laboratorial), e correlacionar esses resultados com os resultados do exame preventivo (Papanicolaou);
- Isolar, por cultivo em meio de cultura específico, linhagens de *G. vaginalis*, provenientes de espécime clínico colhido de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB atendidas na rede pública (SUS) e privada de Juiz de Fora, MG;
- Identificar, presuntivamente e por PCR, as linhagens de *G. vaginalis* isoladas do espécime clínico colhido de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB atendidas na rede pública (SUS) e privada de Juiz de Fora, MG;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antibacterianas das bactérias isoladas e identificadas;

- Detectar, por PCR, a presença de *G. vaginalis* diretamente do espécime clínico colhido das pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB atendidas na rede pública (SUS) e privada de Juiz de Fora, MG;
- Traçar o perfil epidemiológico das pacientes participantes do estudo em questão;
- Detectar a presença do gene que codifica a vaginolisina (*vly*), por PCR, nos isolados de *G. vaginalis*;
- Analisar possíveis correlações entre *G. vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas para VB em relação as pacientes assintomáticas para VB, após genotipagem, e agrupamento segundo o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População amostrada

A população amostrada é composta de pacientes do sexo feminino, atendidas nos serviços parceiros (Serviço de Ginecologia do HU-CAS/UFJF e consultório particular do médico Dr. Didier Silveira Castellano Filho), entre abril de 2011 e abril de 2012. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob parecer número 152/2011 (Anexo A).

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: todas as pacientes que foram realizar o exame de Papanicolaou, que não fizeram uso de drogas antibacterianas e antifúngicas sistêmicas nos últimos 30 dias, que não mantiveram relação sexual nos 5 dias que antecedem ao exame, que não utilizaram produtos tópicos vaginais e que aceitaram participar do estudo, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo B). Foram considerados critérios de exclusão: pacientes grávidas, pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de infecções cervico-vaginais por outras causas, além daquelas que não consentirem em participar do estudo.

As pacientes participantes responderam a um questionário para caracterização do perfil epidemiológico (Apêndice A). Considerando-se os riscos envolvendo pesquisa com seres humanos, de acordo com o preconizado pela legislação vigente, o estudo é classificado como de risco mínimo, isto é, o procedimento não acarretou risco para as pacientes. Eventuais desconfortos emocionais foram minimizados, uma vez que as amostras foram coletadas durante consulta ginecológica pelo médico responsável, concomitantemente aos procedimentos que são realizados rotineiramente neste serviço.

4.2 Coleta do espécime clínico

Amostras de secreção vaginal das pacientes, sintomáticas e assintomáticas, foram coletadas ao exame clínico, utilizando *swab* flexível de algodão esterilizado. Após a coleta, os *swabs* foram colocados em um tubo de ensaio contendo meio de transporte específico para *G. vaginalis* (TGM) e levados ao Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, do ICB/UFJF, no mesmo dia, para cultura e/ou procedimentos de biologia molecular.

4.3 Exame microscópico direto dos espécimes clínicos

Das amostras coletadas, foram preparados esfregaços em lâmina que foram submetidos à coloração pelo método de Gram, para visualização de células epiteliais recobertas por bactérias (“clue-cells”) e determinação do escore de Nugent (Diagnóstico Laboratorial – Apêndice B).

4.4 Cultivo, isolamento e identificação presuntiva de *Gardnerella vaginalis*

Os espécimes clínicos oriundos das pacientes foram semeados em ágar Columbia acrescido de ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, Deutschland), gentamicina (Novafarma, Brasil), anfotericina B (Sigma-Aldrich, Deutschland), proteose peptona (Himedia), solução de Tween a 10% (Sigma-Aldrich, Deutschland) e 5% de sangue (Ágar Vaginalis Modificado – AVM) (FRANCISCO, 1990) e incubados em condições de anaerobiose mecânica, em jarra (90% N₂, 10% CO₂) a 37° C, por 48-72h. Para a identificação presuntiva dos isolados, a partir das culturas crescidas, as colônias pequenas, com β-hemólise ou hemólise difusa, foram submetidas à coloração de Gram. Caso fossem observados cocobacilos Gram-variáveis, sugestivos de serem

G. vaginalis, cinco colônias diferentes de cada paciente eram repicadas para ágar Columbia (Himedia) acrescido de proteose peptona (Himedia), solução de Tween a 10% (Sigma-Aldrich, Deutschland) e 5% de sangue (Ágar Vaginalis), para obtenção de cultura pura e massa celular. A partir dessas culturas puras foi realizado o teste da oxidase em fita reagente (oxidase negativo), usando como controle positivo uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e também o teste da catalase, a partir do crescimento das colônias em Caldo Columbia (Himedia) (catalase negativo), usando como controle positivo uma linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As culturas puras foram congeladas em meio de transporte específico para *G. vaginalis* (TGM) acrescido de 10% de glicerol, e armazenadas em freezer a -20°C.

4.5 Confirmação da identidade bacteriana por PCR e detecção do gene que codifica a vaginolisina

Das culturas puras, foram feitas extrações do DNA bacteriano, utilizando o Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI - USA), de acordo com o protocolo para bactérias Gram-negativas, com modificações. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliação da qualidade. Para verificação da concentração, o DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o Nanodrop Thermo[®].

O DNA genômico total foi utilizado para confirmação da identidade bacteriana e também para a detecção do gene da vaginolisina, utilizando reação de PCR. As reações foram feitas em um volume final de reação de 25µL, contendo 0,5 µL de cada primer, 1,0 µL do DNA molde e 12,5 µL de Gotaq Green Master Mix 2X (Promega, WI - USA), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. Os oligonucleotídeos utilizados, as condições de amplificação da reação de PCR e o tamanho dos amplicons estão descritos na Tabela 01.

As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador T1 Termocycler (Biometra - Deutschland). Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5 X, após eletroforese em voltagem constante de 80V, por aproximadamente 1h. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio (Promega, WI – USA). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100bp DNA ladder. Como controle negativo foi realizado reações de amplificação sem o DNA molde. Como controle positivo, foram utilizadas as linhagens de *G. vaginalis* ATCC 14018, ATCC 14019 e ATCC 49145.

Tabela 01 Genes, sequência dos oligonucleotídeos e condições de PCR utilizados para identificação molecular e detecção do gene que codifica a vaginolisina em *Gardnerella vaginalis*.

Gene	Sequência dos primers (5'- 3')	Condições do PCR	Tamanho do produto amplificado	Referências
Identificação molecular (<i>Cpn 60</i>)	R- CAG CAA TCT TTT CGC CAA CT F- CGC ATC TGC TAA GGA TGT TG	Desnaturação inicial a 94°C (05 min.); 30 ciclos de desnaturação a 94°C (01 min.), anelamento a 51°C (01 min.), extensão a 72°C (30 seg.); extensão final de 72°C (05 min.).	100bp	MENARD et al., 2008
Vaginolisina (<i>vly</i>)	R- ACA TAA GCT CCA CGG TGG TC F- GCC AGA CAG CTT GAA GAA CC	Desnaturação inicial a 95°C (05 min.); 30 ciclos de desnaturação a 95°C (30 seg.), anelamento a 60°C (01 min.), extensão a 72°C (30seg.); extensão final de 72°C (05 min.).	459bp	O autor

4.6 Detecção de *Gardnerella vaginalis* em amostras clínicas por PCR

A partir da secreção vaginal das pacientes foi extraído o DNA total, correspondente ao DNA genômico pertencente à microbiota vaginal, utilizando o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo para secreções, com modificações. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliação da integridade e qualidade, sua quantificação foi realizada por espectrofotometria, utilizando o Nanodrop Thermo®. O DNA genômico foi utilizado para realização da reação de PCR com os oligonucleotídeos para *G. vaginalis*, conforme descrito anteriormente, para comparação do isolamento de *G. vaginalis* por cultura e detecção do microrganismo por PCR. As condições de amplificação da reação de PCR estão descritas na Tabela 01.

As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador T1 Thermocycler (Biometra - Deutschland). Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5 X, após eletroforese em voltagem constante de 80V, por aproximadamente 1h. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio (Promega, WI – USA). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100bp DNA ladder. Como controle negativo foi realizado reações de amplificação sem o DNA molde. Como controle positivo, foram utilizadas as linhagens de *G. vaginalis* ATCC 14018, ATCC 14019 e ATCC 49145.

4.7 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Para avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas, o método utilizado foi a diluição em ágar, usando ágar Mueller Hinton (Himedia) suplementado com 1% de proteose peptona (Himedia), de acordo com o padronizado pelo CLSI (2007) para microrganismos anaeróbios, com modificações. Concentrações crescentes das drogas (0,0625 µg/mL a 1024,0 µg/mL), a partir de

soluções estoque das mesmas, juntamente com 5% de sangue de cavalo (Ebefarma, Brasil) foram adicionados a frascos contendo 40,0 ml do meio de cultura fundido (45°C), que foi vertido em placas de Petri estéreis – 40,0 ml para cada placa.

As drogas utilizadas justificam-se pela sua relevância clínico-microbiológica: ampicilina (Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda., Brasil), ampicilina/sulbactam (Cellofarm Indústria Farmacêutica Ltda., Brasil), clindamicina (Sigma-Aldrich), cloranfenicol (Sigma-Aldrich), metronidazol (Sigma-Aldrich), secnidazol (Sigma-Aldrich) e tinidazol (Sigma-Aldrich).

Foi preparada uma solução-estoque de cada droga e, a partir destas, foram feitas as diluições, de modo a obter concentrações-teste conforme preconizado na literatura. As soluções estoque foram obtidas através de pesagem do pó em balança analítica e posterior diluição em água destilada ou outro solvente, conforme instrução do fabricante. As soluções foram esterilizadas em filtro com membrana Milipore (0,22 µm) e mantidas em freezer a -20°C, durante o período dos experimentos, respeitando-se o seu prazo de validade.

Com o uso do Replicador de Steers (STEERS, FOLTZ e GRAVES, 1959), inóculos padronizados na escala de 1,0 McFarland das amostras foram adicionados às placas contendo as drogas (em duplicata), sequencialmente, em ordem crescente de concentração, as quais foram incubadas em condições de anaerobiose anaerobiose mecânica (jarra de CO₂), a 37° C, por 48-72h. Placas controle, sem adição da droga, também foram inoculadas. A leitura dos resultados foi feita após 72 horas de incubação, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) da droga para cada isolado.

O controle de qualidade para os testes de susceptibilidade foi feito por meio do inóculo de linhagens padrão nos testes, *G. vaginalis* ATCC 14018, *G. vaginalis* ATCC 14019, *G. vaginalis* ATCC 49145 e *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

4.8 Genotipagem Bacteriana

A técnica da reação da polimerase em cadeia usando-se oligoiniciadores aleatórios (AP- PCR) foi utilizada para genotipagem dos isolados de *G. vaginalis* obtidos. Foram utilizados os oligoiniciadores D8635 (5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC-3') e D11344 (5'-GTGAATTCGCGGTGAGATGCCA-3') (IDT, IA - USA), (AVILA-CAMPOS et al., 1999; HARALDSSON, HOLBROOK e KÖNÖNEN, 2004). As reações foram feitas em volumes de 20µL, utilizando 10 µL de Gotaq Green Master Mix 2X (Promega, WI - USA), 1,6 µL de cada iniciador e 1 µL de DNA molde bacteriano. As reações foram feitas em duplicata, em termociclador T1 Termocycler (Biometra - Deutschland), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial 94°C e anelamento 35°C por 5 min. seguido por 5 ciclos de desnaturação 94°C por 3 min., anelamento 37°C por 3 min. e extensão 72°C por 3 min., seguido novamente por 30 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min. e 72°C por 3 min., e uma extensão final 72°C por 10 min. (SILVA et al., 2007). Os amplicons foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 6% em TBE 1X, sob transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio (Promega, WI - USA). Como controle negativo foi realizado reações de amplificação sem o DNA molde. Os padrões eletroforéticos foram inspecionados visualmente. Apenas as bandas consistentes foram consideradas na análise.

4.9 Construção das matrizes de dissimilaridade

Para avaliação global das alterações fenotípicas e genotípicas nas diferentes linhagens bacterianas isoladas, foram obtidas matrizes de dissimilaridade pela utilização do software Genes (CRUZ, 2006; CRUZ, 2008). Foi construída uma matriz binária pela atribuição dos parâmetros 1 para a presença de banda majoritária e o parâmetro 0 para a ausência da mesma, e para características fenotípicas, como o

perfil de susceptibilidade, atribuindo valor 0 para sensibilidade e 1 para resistência. A partir desses dados, foi construída uma matriz, onde o coeficiente de Dice foi adotado para estimar a dissimilaridade entre as linhagens estudadas. Para o agrupamento dos dados da matriz, foi utilizado o método Unweighted Pair Group Method (UPGMA), com análise de bootstrap de 1000x. Foram considerados significativos os agrupamentos com mais de 50% de repetibilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil epidemiológico, microbiológico e comparação entre métodos diagnósticos das pacientes

A população amostrada é composta de 89 pacientes, dessas 55,1% (49/89) são provenientes da rede pública e 44,9% (40/89) da rede privada.

A idade média das pacientes atendidas é de 39,9 anos. Entre as pacientes da rede pública a idade média foi de 43,5 anos, e entre as da rede privada, 35,6 anos de idade.

A descrição das características sócio-demográficas (estado civil, raça, escolaridade, ocupação profissional e vida sexual) da população estudada encontra-se na Tabela 02.

Quanto ao escore de Nugent, em 42,7% (38/89) verificou-se escore de 7-10 que implica em VB, ou pacientes sintomáticas para VB, 3,4% (03/89) escore de 4-6 que implica em intermediário, 53,9% (48/89) escore de 0-3, compatível com microbiota saudável, ou pacientes assintomáticas para VB.

Com relação às amostras da rede privada, 50,0% (20/40) apresentaram escore compatível com VB, pacientes sintomáticas para VB, destas 75,0% (15/20) com resultado de Papanicolaou positivo e também 75,0% (15/20) com a presença de "clue-cells", demonstrando boa correlação entre os resultados.

Entre as amostras da rede pública, as 03 pacientes com escore de Nugent compatível com quadro intermediário de VB foram incluídas junto com as sintomáticas para VB, assim, 42,8% (21/49) apresentaram escore compatível com VB, destas, apenas 28,6% (06/21) com resultado de Papanicolaou positivo e em 57,1% (12/21) verificou-se a presença de "clue-cells".

Já entre o total de pacientes assintomáticas para VB, nenhuma apresentou "clue-cells", dentre esse grupo, verificando a boa concordância da coloração de Gram, embora, 25,0% (05/20) da rede privada, e 3,6% (01/28) da rede pública, tiveram resultado positivo para Papanicolaou.

Com estes dados, podemos avaliar a concordância dos resultados pelos critérios de Nugent, "clue-cells" com os resultados do Papanicolaou, calculando os Valores Preditivos Negativos (VPN), Valores Preditivos Positivos (VPP), sensibilidade e especificidade com as pacientes atendidas pela rede privada e pelo SUS (Tabela 03 a 06).

Tabela 02 Características sócio-demográficas da população estudada.

Variáveis analisadas	Rede Pública (n=49)						Rede Privada (n=40)						Total (n=89)					
	Assintomáticas para VB (n=28)		Sintomáticas para VB* (n=21)		Assintomáticas para VB (n=20)		Sintomáticas para VB (n=20)		Assintomáticas para VB (n=48)		Sintomáticas para VB* (n=41)		Assintomáticas para VB (n=48)		Sintomáticas para VB* (n=41)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Estado civil																		
Casada	16	57,2	09	42,9	10	50,0	06	30,0	26	54,2	15	36,6	26	54,2	15	36,6		
Solteira	06	21,4	08	38,1	09	45,0	10	50,0	15	31,2	18	43,9	15	31,2	18	43,9		
Outro	06	21,4	04	19,0	01	5,0	04	20,0	07	14,6	08	19,5	07	14,6	08	19,5		
Raça																		
Branca	25	89,3	14	66,7	18	90,0	19	95,0	43	89,6	33	80,5	43	89,6	33	80,5		
Negra	03	10,7	07	33,3	02	10,0	01	5,0	05	10,4	08	19,5	05	10,4	08	19,5		
Nenhuma	00	0,0	01	4,8	00	0,0	00	0,0	00	0,0	01	2,4	00	0,0	01	2,4		
Escolaridade																		
Primário	06	21,4	04	19,0	00	0,0	00	0,0	06	12,5	04	9,8	06	12,5	04	9,8		
Fundamental	10	35,7	08	38,1	00	0,0	00	0,0	10	20,8	08	19,5	10	20,8	08	19,5		
Médio	08	28,6	06	28,6	01	5,0	03	15,0	09	18,8	09	22,0	09	18,8	09	22,0		
Superior	04	14,3	02	9,5	19	95,0	17	85,0	23	47,9	19	46,3	23	47,9	19	46,3		
Ocupação																		
Do lar	15	53,6	09	42,9	03	15,0	04	20,0	18	37,5	13	31,7	18	37,5	13	31,7		
Outro	13	46,4	12	57,1	17	85,0	16	80,0	30	62,5	28	68,3	30	62,5	28	68,3		
Vida Sexual																		
Sim	20	71,4	17	81,0	20	100,0	20	100,0	40	83,3	37	90,2	40	83,3	37	90,2		
Ativa																		
Não	08	28,6	04	19,0	00	0,0	00	0,0	08	16,7	04	9,8	08	16,7	04	9,8		

(*)Foram incluídos 3 pacientes com quadro intermediário de VB de acordo com Score de Nugent.

A sensibilidade é a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade do teste detectar a doença quando ela está presente. A especificidade é a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a doença quando ela está ausente. VPP é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo. Expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença. VPN é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença (OLIVEIRA e MENDES, 2010).

Tabela 03 Concordância entre os critérios de Nugent e Papanicolaou (Rede Particular).

Critérios de Nugent		VB (+)	VB (-)	Total
	+	15	05	20
Papanicolaou	-	05	15	20
	Total	20	20	40

Sensibilidade: 75%, Especificidade: 75%, VPP: 75% e VPN: 75%

Tabela 04 Concordância entre a presença de "clue-cells" e Papanicolaou (Rede Particular).

"Clue-cells"		(+)	(-)	Total
	+	13	07	20
Papanicolaou	-	02	18	20
	Total	15	25	40

Sensibilidade: 86,6%, Especificidade: 72%, VPP: 65% e VPN: 90%

Tabela 05 Concordância entre os critérios de Nugent e Papanicolaou (SUS).

Critérios de Nugent		VB (+)	VB (-)	Total
	+	06	01	07
Papanicolaou	-	15	27	42
	Total	21	28	49

Sensibilidade: 09%, Especificidade: 96%, VPP: 85% e VPN: 64%

Tabela 06 Concordância entre a presença de "clue-cells" e Papanicolaou (SUS).

"Clue-cells"		(+)	(-)	Total
	+	02	05	07
Papanicolaou	-	10	32	42
	Total	12	37	49

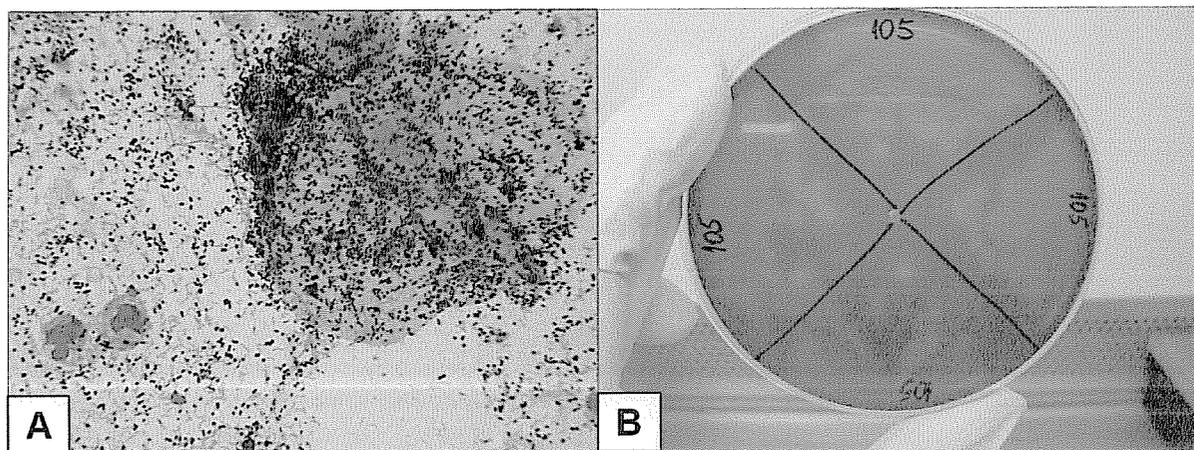
Sensibilidade: 16,6%, Especificidade: 86,5%, VPP: 28,5% e VPN: 76,2%

5.2 Cultivo, isolamento e identificação presuntiva de *Gardnerella vaginalis*

Dentre as 89 pacientes, 38 foram diagnosticadas como sintomáticas para VB, 03 com quadro intermediário e 48 assintomáticas para VB (saudáveis), de acordo com os critérios de Nugent. Das 89 pacientes, foram isolados *G. vaginalis* em 42 pacientes por cultivo em meio de cultura, sendo 35 sintomáticas para VB, 02 intermediárias e 05 assintomáticas para VB. Foram isoladas 5 colônias diferentes de cada paciente, exceto em algumas, onde foram isoladas o número de colônias possíveis, totalizando 204 isolados de *G. vaginalis* (179 de pacientes sintomáticas para VB e 25 de pacientes assintomáticas para VB).

O Ágar Vaginalis Modificado (AVM) por Francisco (1990) mostrou-se altamente seletivo e diferencial, permitindo ótima visualização da β -hemólise ou hemólise difusa, parâmetro importante para identificação. Todos os isolados foram

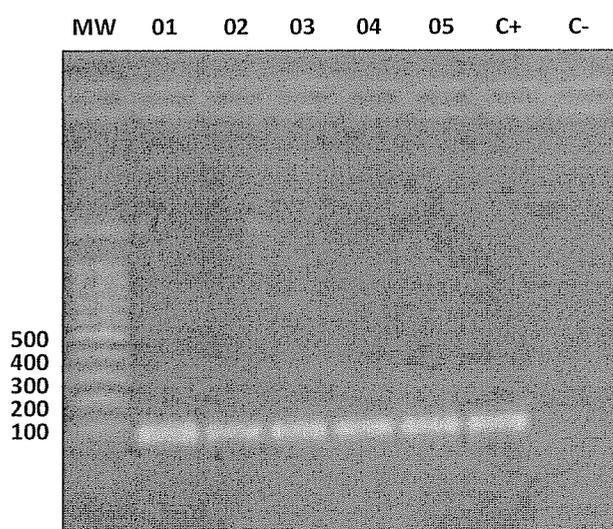
identificados presuntivamente como sendo *G. vaginalis*. Além da hemólise, foram visualizados cocobacilos Gram-variáveis, colônias pequenas e resultado de oxidase e catalase negativos (Fotografia 01).



Fotografia 01 Coloração de Gram e cultura de *Gardnerella vaginalis*. A - “Clue-cells” visualizada pelo método de Gram. B – β -hemólise em Ágar Vaginalis Modificado.

5.3 Confirmação da identidade bacteriana por PCR

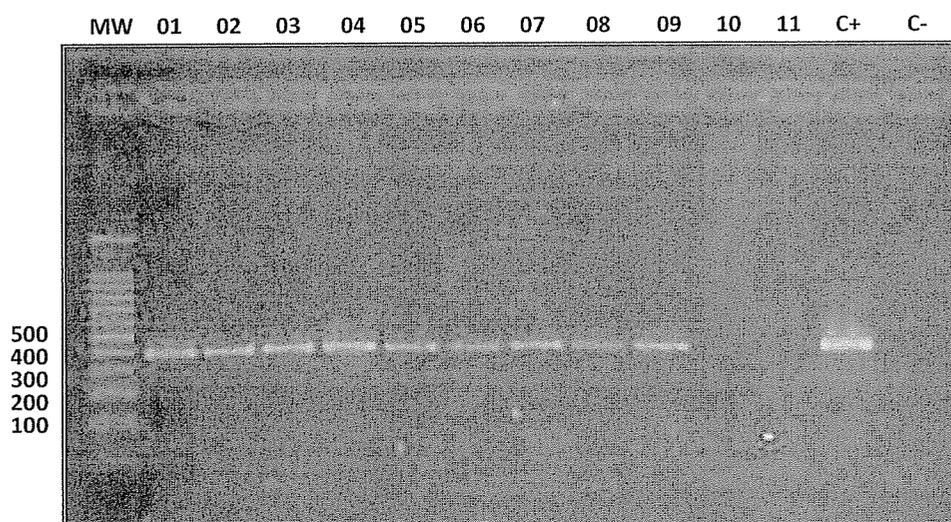
Todos os DNA dos 204 isolados submetidos à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *G. vaginalis* tiveram sua identidade confirmada (Fotografia 02).



Fotografia 02 Identificação molecular dos isolados de *Gardnerella vaginalis* por PCR utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: MW: Padrão de peso molecular; 01 – 05: amostras de isolados; C+ (Controle positivo): ATCC *G.vaginalis* 14018; C- (Controle negativo).

5.4 Detecção do gene que codifica a vaginolisina

Dos 204 isolados submetidos à reação de PCR para detecção do gene da vaginolisina, 96,5% (201/204) possuíam o gene (Fotografia 03). Entre as 03 amostras negativas, todas são provenientes de pacientes sintomáticas para VB.

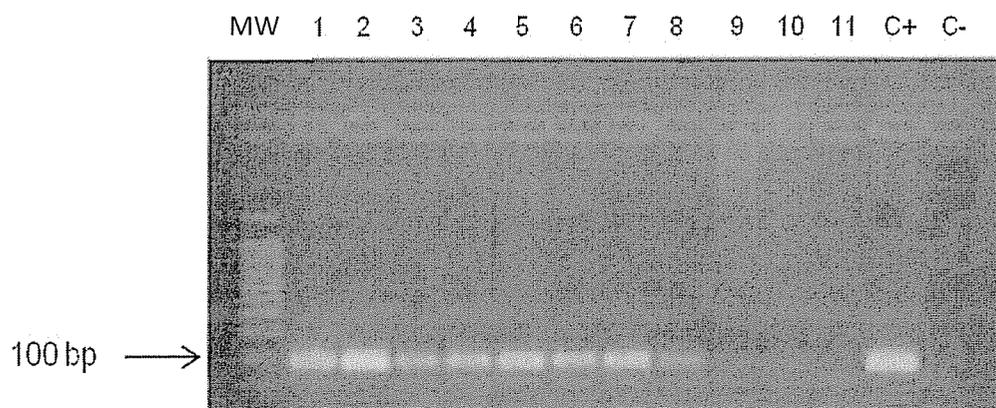


Fotografia 03 Detecção do gene de vaginolisina nos isolados de *Gardnerella vaginalis* por PCR utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: MW: Padrão de peso molecular; 01 – 09: amostras positivas; 10 e 11: amostras negativas; C+ (Controle positivo): ATCC *G.vaginalis* 14018; C- (Controle negativo).

5.5 Comparação do isolamento de *Gardnerella vaginalis* por cultivo em meio de cultura e detecção do microrganismo por PCR

Dentre os 89 espécimes clínicos de secreção vaginal provenientes das pacientes estudadas, em 47 delas não foi possível realizar o isolamento de *G. vaginalis* por método de cultivo em meio de cultura seletivo. Assim, o DNA total foi extraído da secreção vaginal, conforme já descrito, e realizou-se a reação de PCR com oligonucleotídeos específicos para *G. vaginalis*, para detecção da presença ou ausência do mesmo, a fim de se comparar a sensibilidade dos métodos.

Em 55,3% (26/47) das amostras houve detecção de *G. vaginalis*, sendo 24 assintomáticos para VB, 01 com VB e 01 com escore intermediário de VB, demonstrando maior sensibilidade do método molecular em comparação ao método de cultivo (Fotografia 04).



Fotografia 04 Detecção de *Gardnerella vaginalis* por PCR direto do espécime clínico utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: Padrão de peso molecular; 1 – 10: amostras positivas; 11: amostra negativa; C+ (Controle positivo): ATCC *G.vaginalis* 14018; C- (Controle negativo).

Tabela 07 Concordância entre o método molecular (PCR) e o cultivo em meio de cultura.

Método Molecular			Total
	(+)	(-)	
	+	42	42
Cultura	-	26	47
	Total	68	89

Sensibilidade: 61,7%, Especificidade: 100%, VPP: 100%, VPN: 44,7%

5.6 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Considerando-se o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) das drogas ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, secnidazol e tinidazol, para todos os isolados.

Foram considerados os pontos de corte descritos no documento M11-A7 do CLSI (2007), já que não há padronização para *G. vaginalis* (Tabela 08).

Tabela 08 Pontos de corte das drogas antimicrobianas utilizadas.

Drogas antimicrobianas	Concentração inibitória mínima (µg/mL)		
	S	I	R
Ampicilina	≤ 0,5	1	≥ 2
Ampicilina/Sulbactam	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
Clindamicina	≤ 2	4	≥ 8
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32
Metronidazol	≤ 8	16	≥ 32
Secnidazol (*)	≤ 8	16	≥ 32
Tinidazol (*)	≤ 8	16	≥ 32

(*) O guia CLSI (2007) não oferece *breakpoint* para tinidazol e secnidazol. Devido à similaridade na estrutura e atividade, foram utilizados os mesmos valores do metronidazol.

A tabela 09 apresenta os valores da concentração inibitória mínima das linhagens de referência, utilizadas como controles nos experimentos de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Tabela 09 Concentração Inibitória Mínima das linhagens de referência.

Drogas antimicrobianas	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
	<i>G. vaginalis</i> ATCC 14018	<i>G. vaginalis</i> ATCC 14019	<i>G. vaginalis</i> ATCC 49145	<i>B. fragilis</i> ATCC
Ampicilina	0,5	0,5	0,5	64
Ampicilina/Sulbactam	0,25	0,25	0,25	1
Clindamicina	0,0625	0,0625	0,0625	0,25
Cloranfenicol	4	4	4	2
Metronidazol	16	16	16	4
Secnidazol (*)	4	4	4	4
Tinidazol (*)	4	4	4	2

(*) O guia CLSI (2007) não oferece *breakpoint* para tinidazol e secnidazol. Devido à similaridade na estrutura e atividade, foram utilizados os mesmos valores do metronidazol.

A CIM observada entre os isolados de *G. vaginalis* para as drogas antimicrobianas testadas estão descritas na tabela 10. De acordo com os pontos de corte, os isolados foram classificados em sensíveis, intermediários e resistentes em relação às drogas antimicrobianas estudadas.

Altos níveis de resistência bacteriana foram observados, sobretudo aos nitroimidazóis, especialmente o secnidazol, seguido de metronidazol e tinidazol. Ainda para estes antimicrobianos, consideráveis taxas de resistência intermediária foram observadas.

Considerando-se o beta-lactâmico avaliado (ampicilina), foram observados altos níveis de resistência e também resistência intermediária. Entretanto, ao se avaliar a associação do beta-lactâmico com inibidor de beta-lactamase, o sulbactam, observa-se que todas as amostras de *G. vaginalis* avaliadas foram sensíveis.

A clindamicina mostrou-se com boa atividade contra esses microrganismos onde apenas 6,9% mostraram-se resistentes. Não foi observada resistência contra o cloranfenicol.

Foi observada multirresistência entre as amostras estudadas, tanto em pacientes sintomáticas quanto assintomáticas para VB (Anexo C).

A partir dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos avaliados entre as amostras bacterianas neste estudo, foi construída uma matriz de dissimilaridade, considerando-se os parâmetros resistência e sensibilidade para avaliação de comportamento bacteriano em relação à sua origem e o fenômeno da resistência a antimicrobianos. A partir dessa matriz foi construído um fenograma, com o auxílio do programa Genes (Figura 01). Não foi possível estabelecer relação entre perfil de susceptibilidade e origem bacteriana.

Tabela 10 Perfil de susceptibilidade dos isolados de *G. vaginalis* a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico.

Drogas antimicrobianas	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			Critérios de interpretação de acordo com o CLSI*		
	CIM _{50%}	CIM _{90%}	Variação	S	I	R
Ampicilina	2.0	8.0	0.0625 – 64.0	25% (51/204)	20,6% (42/204)	54,4% (111/204)
Ampicilina/Sulbactam	1.0	4.0	0.0625 – 16.0	95,1% (194/204)	4,9% (10/204)	0% (0/204)
Clindamicina	0.0625	0.5	0.0625 – 1024	93,1% (190/204)	0% (0/204)	6,9% (14/204)
Cloranfenicol	1.0	2.0	0.125 – 8.0	100% (204/204)	0% (0/204)	0% (0/204)
Metronidazol	32.0	1024	2.0 - >1024	26% (53/204)	14,2% (29/204)	59,8% (122/204)
Secnidazol	64.0	>64.0	2.0 - >64.0	22% (45/204)	6,4% (13/204)	71,6% (146/204)
Tinidazol	32.0	>64.0	1.0 - >64.0	32,8% (67/204)	6,9% (14/204)	60,3% (123/204)

S= Sensível; I= Intermediário; R= Resistente.

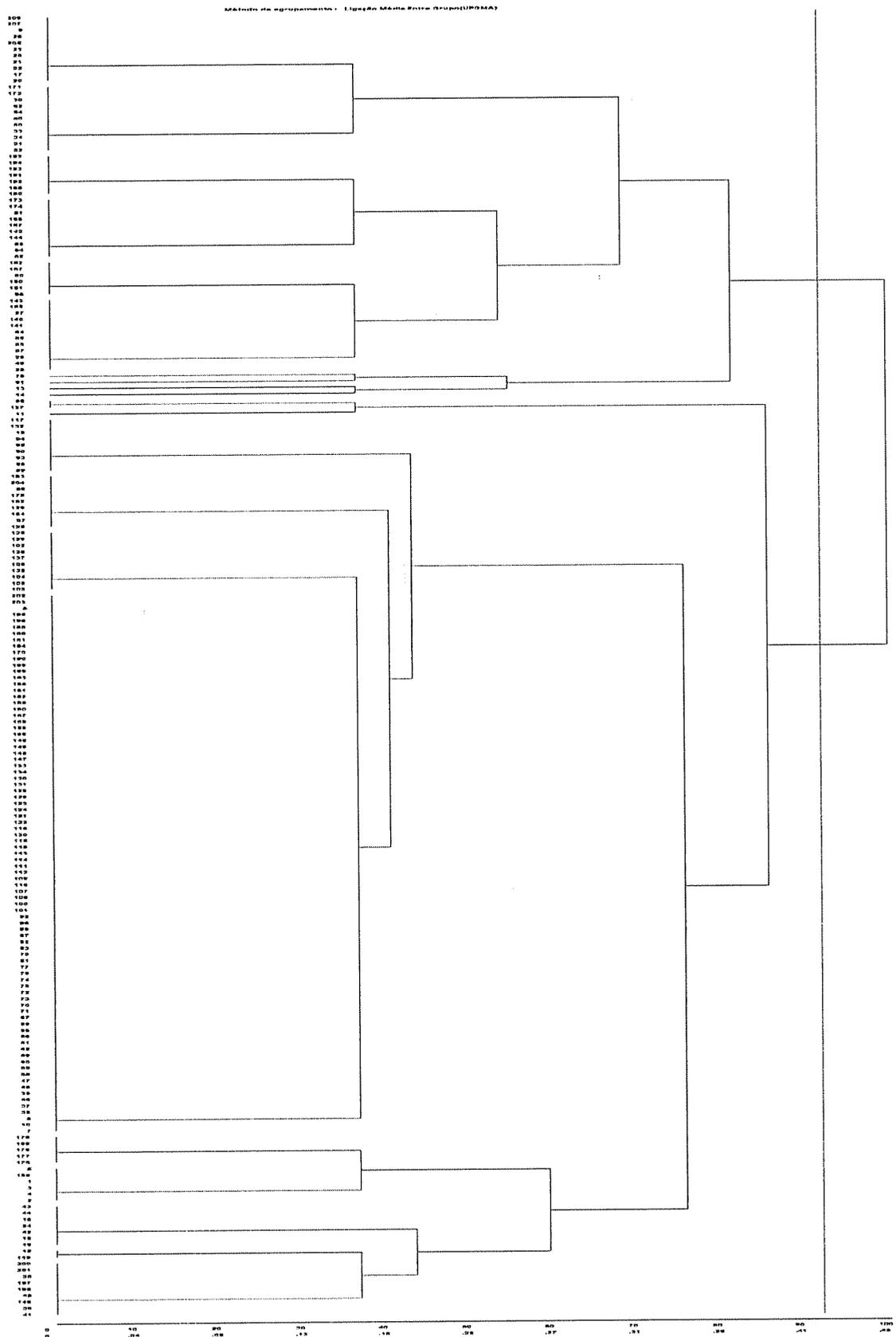
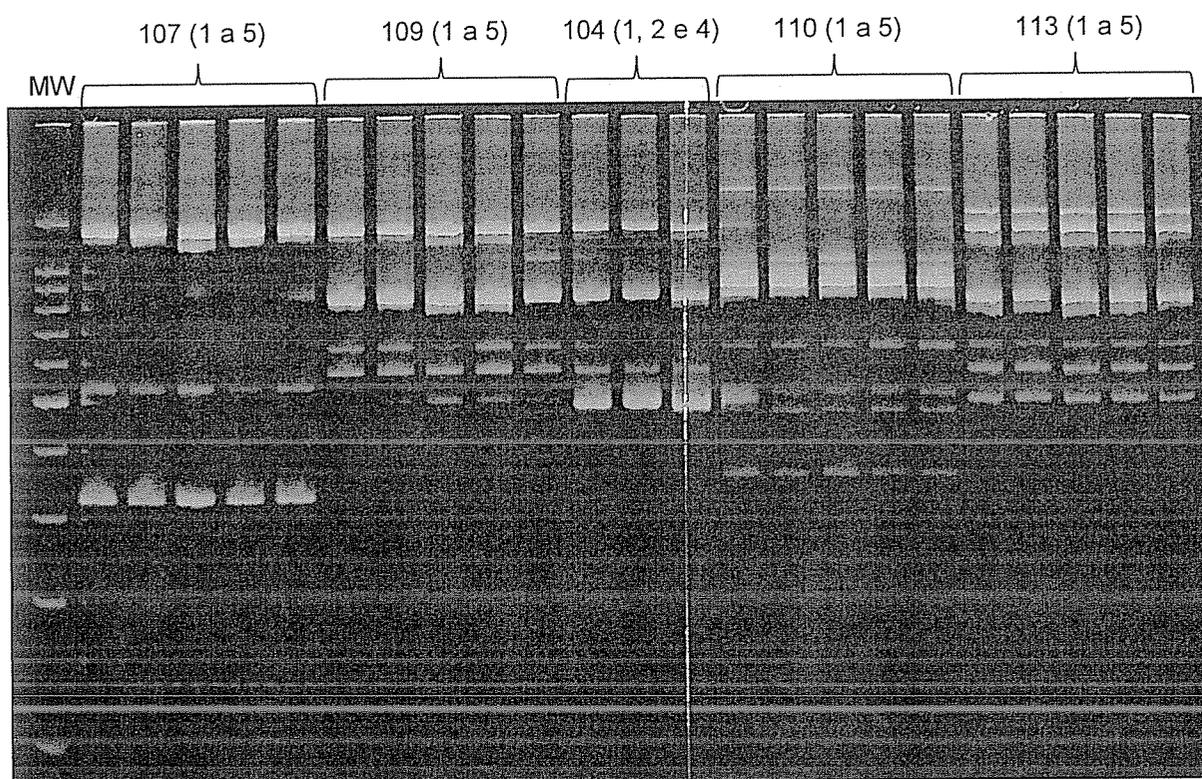


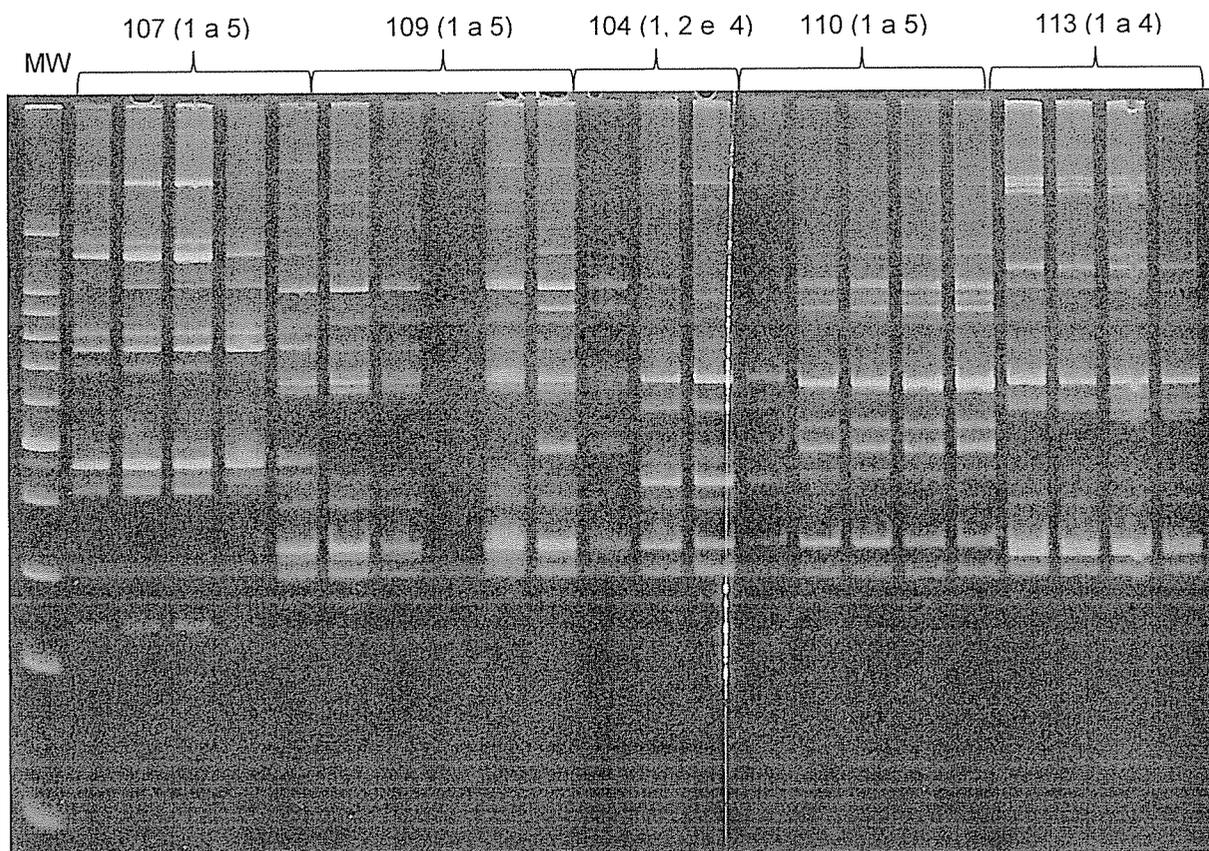
Figura 01 Matriz de dissimilaridade representativa do agrupamento das linhagens de *G. vaginalis* em relação a sua origem e o fenômeno de resistência às drogas. Foi utilizado o método UPGMA com variável categórica (R ou S) e *bootstrap* de 1000 réplicas. Agrupamentos com repetibilidade > 50% são significativos.

5.7 Genotipagem Bacteriana

De acordo com a técnica do AP-PCR, pela utilização dos oligonucleotídeos aleatórios D11344 (Fotografia 05) e D8635 (Fotografia 06), observou-se grande heterogeneidade genética entre as amostras de *G. vaginalis* avaliadas. A partir da construção da matriz de dissimilaridade, não foi possível estabelecer quaisquer relações entre os microrganismos isolados de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB (Figuras 02 e 03).



Fotografia 05 Genotipagem por AP-PCR das linhagens de *Gardnerella vaginalis* utilizando o oligoiniciador aleatório D11344. Os fragmentos de DNA foram separados por PAGE. Canaletas: MW (padrão de peso molecular); demais canaletas: isolados de *G. vaginalis* das pacientes 107 (isolados 1 a 5), 109 (isolados 1 a 5), 104 (isolados 1, 2 e 4), 110 (isolados 1 a 5) e 113 (isolados 1 a 5).



Fotografia 06 Genotipagem por AP-PCR das linhagens de *Gardnerella vaginalis* utilizando o oligoiniciador aleatório D8635. Os fragmentos de DNA foram separados por PAGE. Canaletas: MW (padrão de peso molecular); demais canaletas: isolados de *G. vaginalis* das pacientes 107 (isolados 1 a 5), 109 (isolados 1 a 5), 104 (isolados 1, 2 e 4), 110 (isolados 1 a 5) e 113 (isolados 1 a 5).

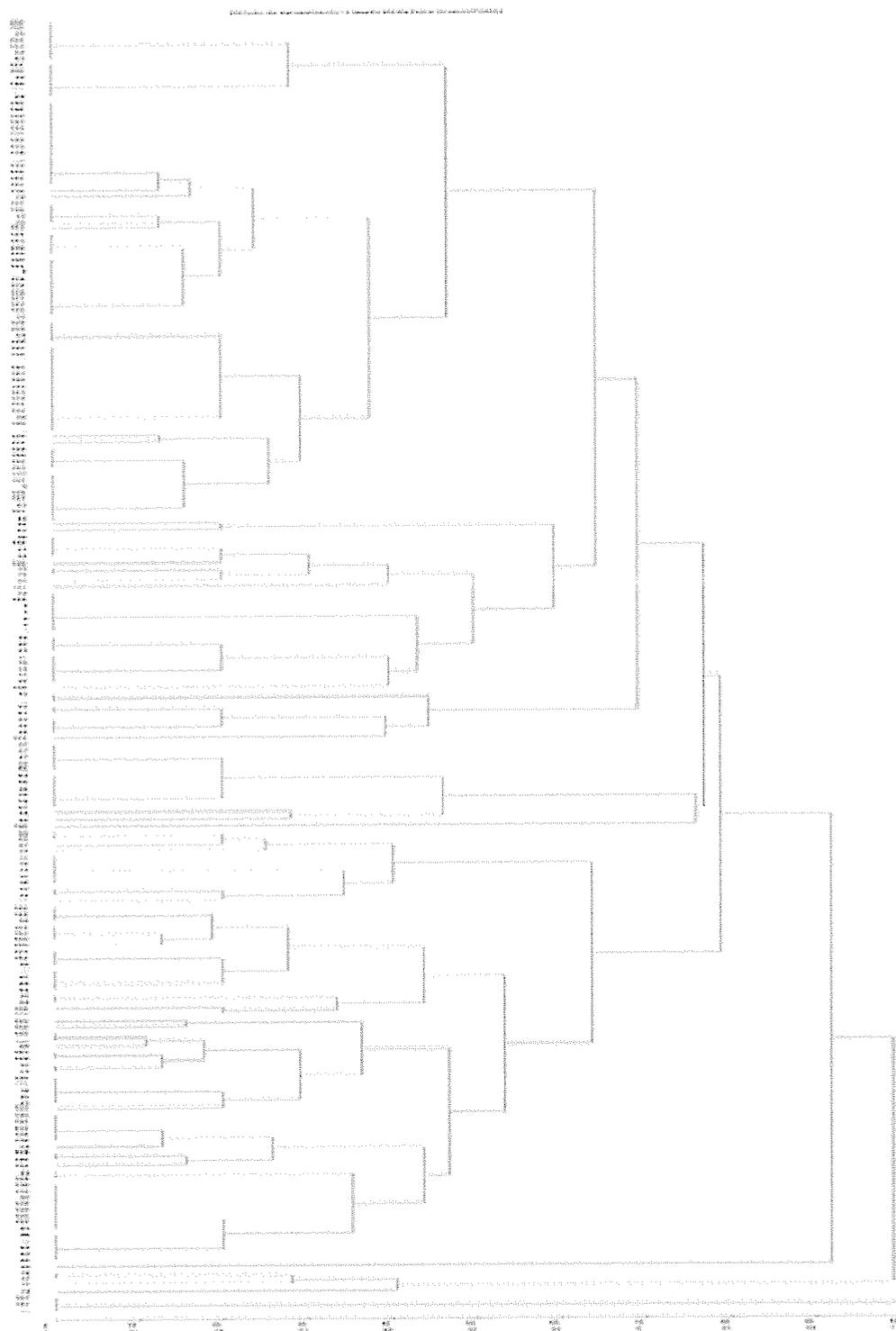


Figura 02 Matriz de dissimilaridade resultante do agrupamento das linhagens de *G. vaginalis* após genotipagem pela técnica do AP-PCR utilizando o oligonucleotídeo aleatório D11344. Foi utilizado o método UPGMA com o coeficiente de Dice e *bootstrap* de 1000 réplicas. Agrupamentos com repetibilidade > 50% são significativos.

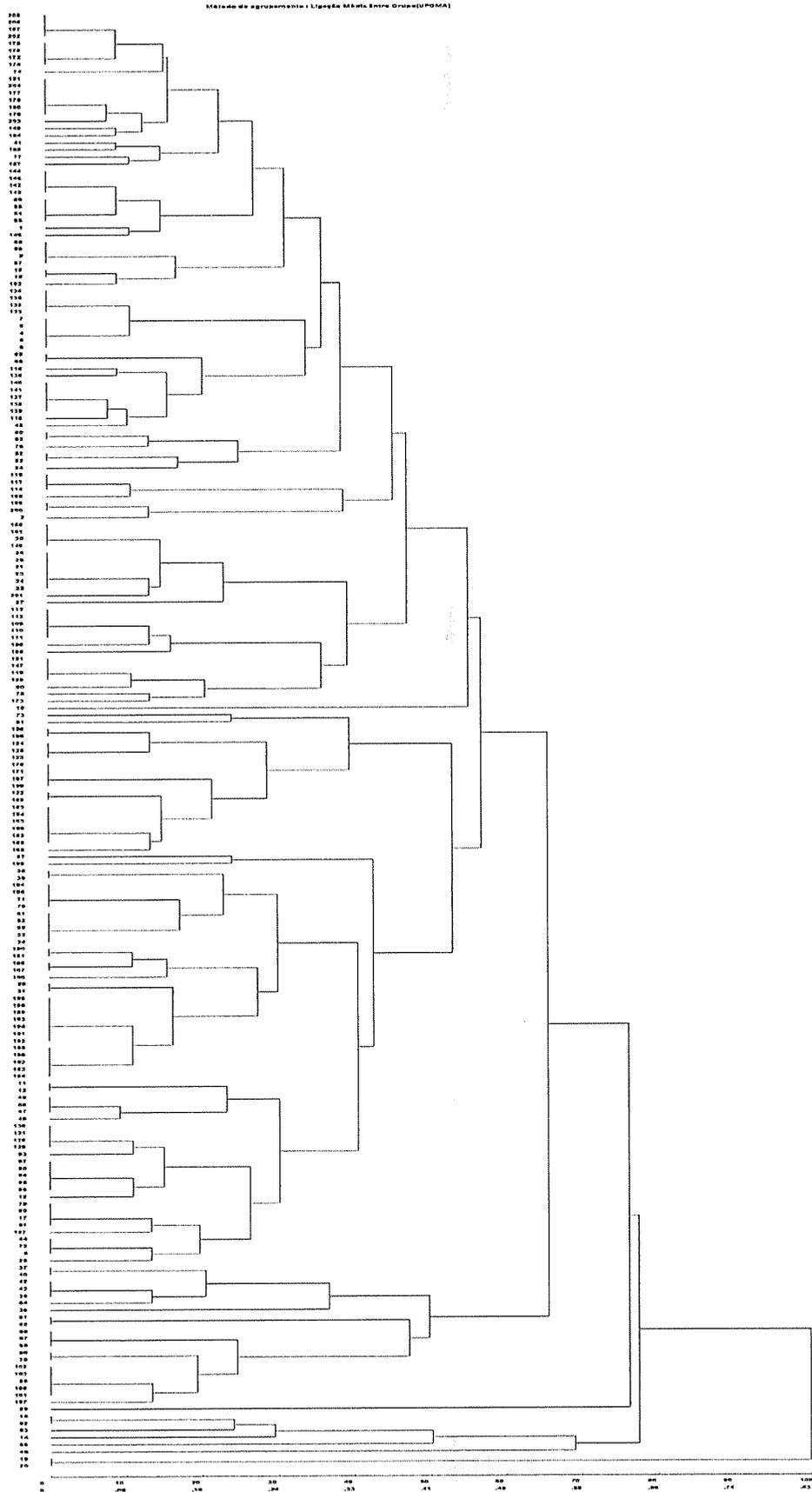


Figura 03 Matriz de dissimilaridade resultante do agrupamento das linhagens de *G. vaginalis* após genotipagem pela técnica do AP-PCR utilizando o oligonucleotídeo aleatório D8635. Foi utilizado o método UPGMA com o coeficiente de Dice e *bootstrap* de 1000 réplicas. Agrupamentos com repetibilidade > 50% são significativos.

6 Discussão

6.1 Perfil epidemiológico, microbiológico e comparação entre métodos diagnósticos das pacientes

A vaginose bacteriana (VB) é a causa mais comum de corrimento vaginal de mulheres em idade reprodutiva. É caracterizada por um crescimento anormal de bactérias anaeróbias como *G. vaginalis*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Bacteroides* sp. e *Mycoplasma hominis*, com concomitante diminuição de lactobacilos da microbiota residente saudável (ZIMMERMANN et al., 2009).

O diagnóstico de VB pode ser baseado em evidências clínicas, como os critérios de Amsel, que incluem a presença de corrimento vaginal homogêneo, o pH vaginal maior do que 4,5, teste das aminas positivo e também a presença de "clue-cells" em, pelo menos, 20% da contagem total de células. O escore de Nugent é outra ferramenta comumente usada para o diagnóstico de VB. Para calcular o escore, um esfregaço em lâmina da secreção vaginal é corado pelo método de Gram e é avaliado quanto a presença e quantidade de diferentes morfotipos bacterianos, tais como bastonetes Gram-positivos, bastonetes Gram-negativos curvos e cocobacilos Gram-variáveis.

A escolha do melhor método diagnóstico é ainda controversa, principalmente devido à discrepância de resultados obtidos em diferentes estudos realizados. Os critérios clínicos são ainda os mais utilizados na prática médica, mas, segundo Mastrobattista, Bishop e Newton (2000), a VB é frequentemente mal diagnosticada, porque os critérios utilizados são subjetivos, como o aspecto do corrimento, a medida correta do pH e o teste das aminas. É importante lembrar que o uso dos critérios clínicos não é útil para o diagnóstico das pacientes assintomáticas, as quais precisam ser devidamente diagnosticadas e tratadas.

Pelo fato de os critérios de Amsel serem dependentes de dados clínicos observados pelo médico no ato do exame preventivo, e, muitas vezes, não documentado, em nosso estudo, os critérios de Nugent foram escolhidos para

classificar as pacientes participantes quanto a presença ou não de VB, pela facilidade em ser realizado no laboratório e pelo fato das lâminas poderem ser analisadas por um único observador, na tentativa de minimizar erros de origem visual. A utilização dos critérios de Nugent é amplamente difundida e é o método mais bem aceito para o diagnóstico da VB. Além disso, os critérios de Nugent parecem ser mais confiáveis do ponto de vista de reprodutibilidade, pois eliminam os aspectos subjetivos encontrados nos critérios de Amsel (aspecto do corrimento e odor de aminas), sendo considerado o “padrão ouro” atualmente (GIRALDO et al., 2007). Desse modo, 46,1% (41/89) das pacientes foram diagnosticadas com VB pelos critérios de Nugent. As pacientes com quadro intermediário de VB (03/89) foram agrupadas juntamente com as VB. Em contraste, Hasenack e colaboradores (2008) diagnosticaram VB através do escore de Nugent em 24,7% (55/223) das pacientes, enquanto Martins et al. (2007) encontraram apenas 5,3% (54/1021) das pacientes diagnosticadas com VB pelos critérios de Nugent.

A técnica de Papanicolaou é usada comumente como teste de triagem para detectar lesões pré-neoplásicas do colo uterino. O sucesso das triagens citológicas para câncer cervical tem feito desta técnica um procedimento de rotina. Em relação ao diagnóstico da VB, a validade do método de Papanicolaou é controversa e estimula a realização de estudos comparativos, com o intuito de definir o seu grau de confiabilidade (HASENACK et al., 2008).

Os dados referentes ao exame de Papanicolaou das pacientes do presente estudo foram liberados por diferentes laboratórios. Sabendo que este resultado é o que muitas vezes o ginecologista lança mão para fechar o diagnóstico, em conjunto com os dados clínicos, foi determinada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), comparando-se o Papanicolaou com os critérios de Nugent, sabidamente o “padrão ouro”, entre os dois grupos de pacientes, atendidas em rede privada (RP) e pública (SUS).

Entre as amostras da RP, 50,0% (20/40) apresentaram escore compatível com VB, destas 75,0% (15/20) com resultado de Papanicolaou positivo. Entre as amostras do SUS, 42,8% (21/49) apresentaram escore compatível com VB, destas, apenas 28,6% (06/21) com resultado de Papanicolaou positivo.

Com estes resultados, obtivemos no grupo da RP, valores de sensibilidade e especificidade de 75%, ou seja, boa probabilidade em captar os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Além disso, obtivemos VPP e VPN também de 75%, apresentando concordância entre o Papanicolaou e Nugent.

Já na rede pública (SUS), obtivemos uma sensibilidade de apenas 09%, ou seja, baixa probabilidade em captar os verdadeiros positivos, e uma especificidade de 96%, demonstrando ser bastante específico em detectar os verdadeiros negativos (VPP de 85% e VPN de 64%).

A sensibilidade encontrada por Hasenack e colaboradores (2008) (71%) e por Martins e colaboradores (2007) (56,8%) é semelhante à encontrada em nosso trabalho na RP (75%), e a especificidade encontrada por estes mesmos autores (93% e 98,1%, respectivamente) se aproxima mais da encontrada no SUS (96%). Hasenack e colaboradores (2008) também encontraram valores de VPP e VPN 78% e 91%, respectivamente, que não se diferem muito dos encontrados em nosso estudo.

Analisando as comparações feitas em ambos os grupos com os trabalhos citados, percebe-se que em todos eles a especificidade é alta, o que evidencia que os esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou podem ser usados para excluírem a patologia, por serem específicos em detectar os verdadeiros negativos. Outros estudos destacaram que a citologia pela técnica de Papanicolaou pode não ser um método adequado para rastreamento, diagnóstico ou exclusão de VB, principalmente, quando existem outros patógenos associados (MARTINS et al., 2007).

Nos exames de Papanicolaou positivo, são visualizados "bacilos supracitoplasmáticos", observados em lâminas coradas pelo método de Gram, que são conhecidos como células-guia ou "clue-cells". Assim, também comparamos a presença de "clue-cells" com os resultados de Papanicolaou entre os dois grupos pesquisados.

Na RP, encontramos uma sensibilidade de 86,6%, especificidade de 72%, VPP de 65% e VPN de 90%. No SUS, sensibilidade de 16,6%, especificidade de 86,5%, VPP de 28,5% e VPN de 76,2%. Uma alta sensibilidade na RP e baixa sensibilidade no SUS. Entre o total de pacientes assintomáticas para VB, em

nenhuma foi visualizada a presença de "clue-cells", demonstrando boa concordância dos critérios de Nugent com a observação das lâminas coradas pelo Gram. Os altos valores preditivos negativos evidenciam que os esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou podem ser usados para excluírem a patologia.

Em relação à idade, nossos resultados mostraram que entre as mulheres diagnosticadas com VB pelos critérios de Nugent, a idade média das pacientes da rede privada é 35,6 anos (faixa etária de 19-56 anos), e das pacientes da rede pública é 35,7 anos (faixa etária de 16-59 anos), ou seja, estão em idade reprodutiva. Nossos resultados diferem da pesquisa realizada por Oliveira e colaboradores (2007), onde a faixa etária das mulheres estudadas com VB foi entre 21-30 anos. O mesmo resultado se aproxima com o encontrado por Zimmermann e colaboradores (2009) em Juiz de Fora, onde o grupo de pacientes estudadas com VB estava na faixa etária entre 20 e 49 anos. Os dados sugerem que a maior prevalência de VB está associada à mulheres jovens, em idade reprodutiva, e isso pode refletir o fato de que os microrganismos causadores de VB utilizam como substrato o glicogênio, cujo acúmulo celular pode estar relacionado à estimulação hormonal (RIBEIRO et al., 2007).

Em relação ao grau de escolaridade, entre as pacientes sintomáticas para VB atendidas pela RP, a grande maioria tem ou cursa o ensino superior. Já entre as pacientes sintomáticas para VB atendidas pelo SUS, a maioria cursou até o ensino fundamental (38,1%), seguidas de 28,6% que cursam ou cursaram o ensino médio. No total de pacientes sintomáticas para VB, o grau de escolaridade das mulheres participantes foi considerado bom, 46,3% (Ensino Superior), 22,0% (Ensino Médio) e 19,5% (Ensino Fundamental) (Tabela 02). A metodologia utilizada não permite verificar associação entre escolaridade e VB, mas, segundo Smart, Singal e Mindel (2004), os anos de estudo não foram considerados como fator de risco para VB.

Com relação à ocupação, no total das mulheres sintomáticas para VB, a maioria trabalha fora, embora no grupo da rede pública (SUS) exista um número significativo de mulheres sintomáticas para VB que se identificaram como "do lar" (42,9%). Tal dado pode estar também relacionado com a baixa escolaridade

observada entre essas mulheres do grupo da rede pública, justificando os 4,8% sem nenhum ano de estudo, 19,0% com ensino primário, 38,1% com ensino fundamental, 28,6% com ensino médio e apenas 9,5% com ensino superior (Tabela 02).

Um fator referido como associado ao aumento do risco de aquisição de VB é o fato de a mulher ser solteira, possivelmente devido a uma maior possibilidade de troca de parceiros. No presente estudo, do total de pacientes, 43,9% das mulheres sintomáticas para VB eram solteiras, contrastando com o encontrado por Leite et al. (2010), que encontraram uma frequência de VB de 58,1% entre as mulheres casadas. Entre os dois grupos de pacientes do nosso estudo, das atendidas pelo SUS, 42,9% eram casadas, e das atendidas pela RP, 50,0% eram solteiras (Tabela 02). Contudo, não podemos fazer associação entre estado civil e VB, visto que na rede pública a maioria das mulheres atendidas era casada, e na rede privada a maioria era solteira. Outro dado que também dificulta essa associação é o fato da grande maioria das mulheres sintomáticas para VB (90,2%), independente do estado civil, declararem ter vida sexual ativa. Segundo Teixeira (2010), o início precoce da vida sexual predispõe a um maior risco de infecções genitais e DST, em especial pela maior chance de exposição e devido aos níveis hormonais altos, que estariam relacionados à etiopatogenia da doença. No entanto, esse dado não foi observado no presente trabalho. Por outro lado, existem casos, detectados mais raramente, em mulheres virgens e em crianças, o que indica que a ocorrência deste desequilíbrio da microbiota não é decorrente exclusivamente do contato sexual (SIMÕES et al., 2006).

6.2 Cultivo, isolamento, identificação presuntiva de *Gardnerella vaginalis* e confirmação da identidade bacteriana por PCR

A utilização de cultura para o diagnóstico da *G. vaginalis* não parece ser muito útil, pois a mesma pode ser detectada na metade das mulheres assintomáticas para VB, pois o microrganismo também faz parte da microbiota

residente saudável (GIRALDO et al., 2007). As culturas microbiológicas fornecem informações críticas sobre as características fenotípicas dos microrganismos, que não são facilmente obtidas a partir de estudos moleculares. Além disso, os microrganismos cultivados permitem a sua manipulação experimental em laboratório e a realização de experimentos sobre patogênese e fatores de virulência. Assim, os métodos de cultivo continuam a ser uma importante área de investigação em microbiologia, apesar das limitações da abordagem, sobretudo na área da pesquisa (SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008).

O meio de cultura utilizado, o ágar vaginalis modificado por Francisco et al. (1990) mostrou-se bastante eficaz no crescimento de *G. vaginalis* e na visualização das colônias pequenas, brilhantes e β -hemolíticas. Em 47,2% (42/89) das pacientes foi isolado *G. vaginalis* por cultivo em meio de cultura. Desses, 92,1% (35/38) das mulheres sintomáticas para VB, 66,7% (02/03) das pacientes com quadro intermediário de VB e em 10,4% (05/48) das pacientes assintomáticas para VB foi isolado *G. vaginalis*. Esse resultado de isolamento difere do encontrado por Teixeira (2010) no que diz respeito às pacientes sintomáticas para VB, onde o autor isolou *G. vaginalis* em 56,7% das pacientes. No entanto, nossos dados se aproximam com os dados de pacientes assintomáticas para VB no estudo de Teixeira (2010), que isolou *G. vaginalis* por cultura em 17,6% das pacientes. Justifica-se o maior isolamento nas pacientes sintomáticas para VB e quadro intermediário de VB pelo fato de nesses casos, a carga bacteriana de *G. vaginalis* estar aumentada, facilitando o isolamento por método de cultivo. O pequeno número de isolados provenientes de pacientes assintomáticas para VB em nosso estudo evidencia a relação deste microrganismo com o quadro clínico em estudo. Todos os 204 isolados identificados presuntivamente foram confirmados por PCR com oligonucleotídeos específicos para *G. vaginalis*, não sendo necessário mais provas de identificação.

6.3 Detecção do gene que codifica a vaginolisina

Sabe-se que *G. vaginalis* pode produzir uma toxina citolítica, denominada vaginolisina, que é uma porina, e há a hipótese dela estar envolvida na patogênese da VB, levando à morte celular (GELBER et al., 2008).

No presente trabalho foi detectada a presença do gene da vaginolisina (*vly*) em 96,5% (201/204) dos isolados de *G. vaginalis* por PCR, utilizando oligoiniciadores específicos. As únicas 03 amostras negativas curiosamente são de pacientes sintomáticas para VB, o que discordaria da hipótese de que a presença da vaginolisina contribuiria com a patogênese da doença, embora não existam dados na literatura para comparar nossos resultados e, além disso, a pequena amostragem também não permita fazer este tipo de associação.

6.4 Comparação do isolamento de *Gardnerella vaginalis* por cultivo em meio de cultura e detecção do microrganismo por PCR

Em nossa pesquisa, a partir da amostra de secreção vaginal, em 52,8% (47/89) não foi possível o isolamento por método de cultivo em meio de cultura. Dessas 47 amostras, 42 são provenientes de pacientes assintomáticas para VB, e sabe-se que *G. vaginalis* faz parte da microbiota residente da vagina. Assim, a partir desses espécimes, o DNA total foi extraído e foi feita a análise por PCR, a fim de compararmos o isolamento e a detecção da presença do microrganismo.

O método molecular se mostrou mais eficiente, conseguindo detectar a presença do microrganismo em 55,3% (26/47) das secreções que em meio de cultura não foi possível isolar, obtendo uma sensibilidade de 61,7%, especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN de 44,7%. Com estes valores de especificidade e VPP, o método molecular afasta qualquer possibilidade de um falso positivo e falso negativo, já que a especificidade é a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a doença

quando ela está ausente. VPP é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo (OLIVEIRA e MENDES, 2010).

Castellano-Filho e colaboradores (2010) compararam o método de cultivo em meio de cultura e o método molecular, neste caso, para isolamento de *Streptococcus* do Grupo B, e na comparação dos métodos também demonstraram maior detecção do microrganismo por PCR (9,5% versus 32,6%).

Entretanto, a cultura de *G. vaginalis* e tampouco sua detecção por PCR não são recomendadas como ferramentas para o diagnóstico para VB, devido esta bactéria estar presente na microbiota saudável de aproximadamente 60% das mulheres assintomáticas (CDC, 2000).

6.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos e modificações na estrutura celular, e que impedem a ação das drogas. O desenvolvimento da resistência é um fenômeno biológico natural decorrente da introdução de agentes antimicrobianos na prática clínica. O uso irracional é que tem contribuído com o aumento deste fenômeno (WANNMACHER, 2004).

A heterogeneidade observada no fenograma que retrata os perfis de susceptibilidade às drogas e a alta resistência antimicrobiana observada tanto em isolados de pacientes assintomáticos quanto sintomáticos para VB reflete, provavelmente, o padrão de distribuição bacteriana na comunidade. Apesar de não ter dados na literatura para comparar esse resultado, esses dados reforçam a epidemiologia da doença, que está relacionada a uma alteração da microbiota, gerando um desequilíbrio, e, portanto os microrganismos envolvidos são residentes endógenos susceptíveis à pressão seletiva imposta pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na comunidade (BRASIL, 2008; NOGUEIRA et al., 2000).

Os regimes de tratamento recomendados para a VB não são baseados na erradicação de um patógeno conhecido, mas, sobretudo, na restauração de um padrão de microbiota vaginal saudável. A terapia de primeira linha recomendada é metronidazol ou clindamicina; estes antibióticos têm diferentes espectros de atividade, mas aparentemente sua eficácia é em curto prazo, com taxas de cura de 80% a 90% em um mês. Taxas de recorrência a longo prazo após o tratamento e fatores associados à recorrência não foram estabelecidos. Dados sobre a eficácia do tratamento a longo prazo são limitados a um estudo observacional, e existem poucos estudos com acompanhamento prolongado. Além disso, as possíveis causas das recidivas ainda permanecem obscuras (CDC, 2000; BRADSHAW et al., 2006).

O metronidazol é um nitroimidazólico, ativo contra uma variedade de protozoários e bactérias. É indicado no tratamento de giardíase, amebíase, tricomoníase, VB por *G. vaginalis* e infecções causadas por bactérias anaeróbias, como *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, dentre outros. Ele penetra na célula como um pró-fármaco, por difusão passiva e é ativado no citoplasma bacteriano ou em organelas específicas nos protozoários. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas consiste na inibição da síntese do ácido desoxirribonucleico e danos ao DNA, por oxidação, causando quebras de cadeia simples e de cadeia dupla que conduzem à degradação do DNA e a morte celular (AUSTIN et al., 2005; BRADSHAW et al., 2006).

Clindamicina é uma lincosamida, tem propriedades antibacterianas similares aos macrolídeos e agem pelo mesmo mecanismo de ação. São agentes bacteriostáticos, que atuam pela ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, interferindo na elongação da cadeia peptídica durante a translação e bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas. A clindamicina é um antibiótico amplamente utilizado, que possui melhor atividade e maior absorção por via oral. A clindamicina é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções periféricas causadas por *Bacteroides fragilis* ou outras bactérias anaeróbias resistentes a penicilina. Este fármaco é também topicamente utilizado para o tratamento de acne, e em associação com metronidazol, para o tratamento de VB (CDC, 2000; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Pelo fato da VB ser uma síndrome polimicrobiana, avaliar o sucesso no tratamento é complexo. A terapia da VB tornou-se um tema de debate, com a pesquisa apontando para a complexidade da questão, e prováveis novos patógenos também podem estar associados com esta condição clínica. A recomendação primária para o tratamento de VB é o metronidazol (oral ou intra-vaginal), com 500 mg duas vezes por dia durante uma semana. No entanto, várias pacientes vêm apresentando recorrência de sintomas dentro de um curto período de tempo da conclusão do tratamento (JOESOEUF, SCHMID e HILLIER, 1999; CDC, 2000).

A resistência aos antibióticos é cada vez mais relatada em todo o mundo. Goldstein e colaboradores, em 1993, demonstraram uma resistência de 20% de *G. vaginalis* ao metronidazol, e o mesmo grupo relatou a resistência de 29% ao metronidazol, em 2002 (WORKOWSKI e BERMAN, 2006).

Os efeitos adversos atribuídos ao metronidazol (droga de primeira escolha) são frequentes, e isto pode conduzir a problemas de adesão ao tratamento, e em conjunto com a alta taxa de resistência, resultar em falha terapêutica. Consequentemente, outros fármacos da classe dos nitroimidazólicos têm sido explorados como alternativas ao metronidazol para o tratamento de VB.

Tinidazol e secnidazol são derivados nitroimidazólicos de segunda geração, com estrutura e atividade semelhantes à do metronidazol. Administrados oralmente atingem maior pico de concentração sérica, por ter uma lipossolubilidade maior; maior concentração nos tecidos reprodutivos; têm menos efeitos colaterais e uma maior meia-vida que permite que sejam administrados como uma terapia de dose única. A diferença entre tinidazol e secnidazol é que esse último tem sua meia-vida um pouco maior (AUSTIN, MEYN e HILLIER, 2006).

No presente estudo, não foi avaliado o tratamento das pacientes. A partir dos isolados de *G. vaginalis*, foi determinada a CIM de alguns antimicrobianos de interesse clínico-microbiológico. Com base nos resultados, obtiveram-se altas taxas de sensibilidade à clindamicina em 93,1% (190/204) das amostras (CIM_{50%} = 0,0625 µg/mL e CIM_{90%} = 0,5 µg/mL). Este dado se aproxima ao encontrado por Nagaraja (2008) e Teixeira (2010), onde 76% e 100%, respectivamente (CIM_{90%} < 0.0625 µg/mL) das amostras se mostraram sensíveis à clindamicina. Apesar da

sensibilidade das amostras, percebe-se neste trabalho uma variação muito ampla (0,0625 – 1024,0 µg/mL), semelhante à encontrada por Nagaraja, em 2008 (0,016 - >256 µg/mL). Entretanto, a concentração em que 50% e 90% dos isolados são inibidos ($CIM_{50\%} = 0,0625$ µg/mL e $CIM_{90\%} = 0,5$ µg/mL) são baixas, dentro dos limites da sensibilidade para clindamicina. Assim, o resultado pode ser considerado favorável, já que o referido antimicrobiano completa o esquema terapêutico para VB.

Com relação ao perfil de susceptibilidade do metronidazol, foi observado elevado índice de resistência. Entre os isolados, 59,8% (122/204) apresentaram-se resistentes ao metronidazol, com uma $CIM_{50\%}$ de 32,0 µg/mL, $CIM_{90\%}$ de 1024,0 µg/mL e uma variação de 2,0 - >1024 µg/mL. Esse resultado corrobora com o encontrado por Austin, Meyn e Hillier (2006), que obtiveram 68% de resistência, com uma $CIM_{50\%}$ de 32,0 µg/mL, $CIM_{90\%}$ de > 256,0 µg/mL e uma variação de 2,0 - > 256,0 µg/mL, sendo que a maior concentração testada por eles foi 256,0 µg/mL. Em um estudo realizado em Belo Horizonte, Teixeira (2010) verificou um índice de 70% de resistência ao metronidazol, e a $CIM_{90\%}$ de > 512 µg/mL (maior concentração testada).

Assim como no trabalho de Austin, Meyn e Hillier (2006) e Teixeira (2010), nesta pesquisa, a CIM para 90% dos isolados também foi representada pela última concentração testada (>256 µg/ml, 512 µg/ml e 1024,0 µg/ml, respectivamente). Mesmo havendo diferença entre a atividade "*in vitro*" e "*in vivo*" este fato é muito preocupante, pois em nosso trabalho, a última concentração testada é ainda maior que a última concentração testada por estes autores, e o metronidazol continua sendo uma das primeiras opções clínicas.

Com relação ao tinidazol e secnidazol, no presente estudo, dentre os isolados de *G. vaginalis*, 60,3% e 71,6% se mostraram resistentes a estas drogas, respectivamente. Quanto ao tinidazol, nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Austin, Meyn e Hillier (2006), onde 54% dos isolados foram resistentes ao tinidazol, valor bem próximo aos 60,3% encontrados no presente trabalho. Além disso, os autores encontraram o mesmo valor de $CIM_{50\%}$ das amostras (32,0 µg/mL) e $CIM_{90\%}$ das amostras foi a última concentração testada, em ambos os estudos. Comparando tinidazol e secnidazol com o metronidazol,

verificou-se em nosso trabalho um percentual de resistência menor para o metronidazol. Teixeira (2010) encontrou maior atividade de tinidazol e secnidazol contra *G. vaginalis*, quando comparada ao metronidazol (20% e 30% de resistência a tinidazol e secnidazol, respectivamente). Comparando a CIM_{50%} das amostras, Austin, Meyn e Hillier (2006) observaram apenas um logaritmo de diferença entre tinidazol e metronidazol contra *G. vaginalis* (32,0 versus 64,0 µg/mL). No presente trabalho esse dado também foi observado, comparando tinidazol, secnidazol e metronidazol. Para a CIM_{50%} das amostras, os mesmos valores foram encontrados para metronidazol e tinidazol (32 µg/mL) e para secnidazol (64,0 µg/mL).

Estudos “*in vitro*” comparando metronidazol e tinidazol mostraram semelhança na atividade contra as bactérias clinicamente relevantes. Farmacocineticamente, o aumento da meia-vida do tinidazol oferece alguns benefícios em comparação ao metronidazol, como a dose reduzida ou a frequência de administração. Outro atributo positivo do tinidazol comparado ao metronidazol é o seu perfil favorável quanto aos eventos adversos. No entanto, o metronidazol tem permanecido a droga de escolha para o tratamento de VB. Embora o estudo de Austin, Meyn e Hillier (2006) reforce o uso de tinidazol contra anaeróbios estritos e facultativos associados à VB, há ainda a necessidade de mais estudos clínicos comparando metronidazol, tinidazol e secnidazol (AUSTIN, MEYN e HILLIER, 2006; DICKEY, NAILOR e SOBEL, 2009).

Embora o cloranfenicol não seja uma droga rotineiramente utilizada para o tratamento de infecções envolvendo *G. vaginalis*, a determinação do seu perfil de susceptibilidade tem um valor científico-microbiológico, visto que a droga é tida como de alta eficiência no tratamento de infecções envolvendo microrganismos anaeróbios (BROOK, 2011; NAIDOO et al., 2011; FILHO et al., 2012). Porém, devido a sua elevada toxicidade só é recomendado para tratamento de infecções potencialmente fatais ou quando não se podem utilizar fármacos alternativos mais seguros, devido a problemas de resistência ou alergias. O cloranfenicol age inibindo a síntese protéica nas bactérias por bloqueio específico na subunidade 50S ribossomal bacteriana, inibindo assim a fase de transpeptidação da síntese protéica (RANG et al., 2007). Especificamente contra *G. vaginalis*, Shanker,

Toohey e Munro (1982), Hubrechts e colaboradores (1984) e Kharsany, Hoosen e Ende (1993) já haviam encontrado 100% de sensibilidade ao cloranfenicol. Embora não existam dados recentes na literatura para comparar nossos resultados, neste estudo também não foram observados microrganismos resistentes ao cloranfenicol, confirmando, assim, sua eficácia contra microrganismos associados a infecções anaeróbicas, ou mais especificamente, envolvendo *G. vaginalis*, no nosso meio.

A ampicilina não é rotineiramente utilizada para o tratamento de VB, devido a sua ineficácia em erradicar a *G. vaginalis* ou de promover a cura clínica. Isto ocorre provavelmente devido à inativação da ampicilina por beta-lactamases produzidas por outros anaeróbios vaginais, não especificamente pela *G. vaginalis* (KHARSANY, HOOSEN e ENDE, 1993; GOLSTEIN et al., 2002).

Com relação a ampicilina, foi observado alta taxa de resistência bacteriana (54,4%), além de resistência intermediária (20,6%). Avaliando a associação ampicilina – sulbactam (inibidor de beta-lactamase), não foram observadas amostras bacterianas resistentes, embora 4,9% tenham sido classificadas na categoria resistência intermediária. Este resultado é semelhante ao encontrado por Goldstein e colaboradores (2002), que obtiveram 100% de sensibilidade ao mesmo antimicrobiano. Considerando-se os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos já descritos na literatura, como alteração na permeabilidade celular, alteração no alvo de ação, efluxo ativo e produção de beta-lactamases (KHARSANY, HOOSEN e ENDE, 1993), nossos dados permitem sugerir que o fenômeno de resistência observado entre as linhagens de *G. vaginalis* pode estar associado principalmente à produção de beta-lactamases.

Neste trabalho não foi verificada a presença ou não de recidivas entre as pacientes, e sabe-se que com a utilização de antimicrobianos, esses podem além de eliminar o microrganismo patogênico, destruir grande parte dos microrganismos responsáveis na manutenção do equilíbrio da microbiota residente saudável. Além disso, a falta de parâmetros para o correto diagnóstico de VB, o uso empírico e incorreto de antimicrobianos agrava as recidivas e a problemática da resistência. Os dados apresentados são alarmantes em relação à resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da VB.

Esse problema emergente tem levado pesquisadores e clínicos à procura de métodos alternativos para o tratamento de VB, o que é evidenciado no trabalho de Amorim e Santos (2003), que testaram a eficácia de gel vaginal da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), uma planta medicinal de uso amplamente difundido no Nordeste para tratamento de diversas infecções. Os autores concluíram que o gel de aroeira pode ser utilizado com a indicação de tratamento da VB em mulheres não gestantes, sintomáticas. O percentual de cura neste ensaio foi de 84%, constatando-se também uma restauração da microbiota vaginal autóctone, o que poderia minimizar o problema das recidivas. Outro trabalho que propõe um método de tratamento alternativo, como a utilização de lactobacilos como probióticos é o de Teixeira (2010), que selecionou uma linhagem de lactobacilos (*Lactobacillus johnsonii*) capaz de colonizar animais isentos de germes, e foi observada uma certa proteção contra a infecção experimental por *G. vaginalis*.

6.6 Genotipagem Bacteriana

A técnica de AP-PCR tem sido extensivamente utilizada na bacteriologia de anaeróbios, dentre outras áreas da ciência, para estudos relacionados à clonalidade e detecção de polimorfismos no genoma celular, associado aos estudos epidemiológicos para avaliação de semelhança entre organismos relacionados taxonomicamente (CAMARENA et al. 1995; GEORGE et al., 1997; SONG, 2005).

Neste estudo, considerando-se a técnica utilizada, não foi possível estabelecer nenhuma relação genotípica entre as diferentes linhagens bacterianas isoladas. Assim, pode-se sugerir a princípio uma grande heterogeneidade populacional entre representantes de *G. vaginalis* envolvidos na etiologia de VB, o que dificultaria o estabelecimento de marcadores epidemiológicos, corroborando dados da literatura acerca da etiopatogenia da doença: alteração da microbiota e

aumento nos níveis populacionais de microrganismos endógenos (SIMÕES et al., 2006; SRINIVASAN e FREDRICKS, 2008)

7 Considerações Finais

Do exposto, observa-se que embora não exista consenso no diagnóstico de VB, espera-se que a bacterioscopia pelo Gram possa ser um método incorporado aos critérios diagnósticos, é rápido e de fácil execução, sendo necessário apenas um profissional treinado na visualização das lâminas. Além de auxiliar no diagnóstico complementar, associado à suspeita clínica, direciona para um correto diagnóstico e tratamento, reduzindo o uso indiscriminado e abusivo de antimicrobianos.

Espera-se ainda que as informações epidemiológicas e microbiológicas geradas neste estudo possam servir para caracterização do problema na região de Juiz de Fora, ou suscitar discussão e monitoramento epidemiológico em outras regiões, que sirvam de base para o desenvolvimento de políticas de saúde pública e, assim, possam contribuir para um melhor aproveitamento dos recursos financeiros a serem aplicados em medidas preventivas, minimizando os riscos associados às infecções cérvico-vaginais e a antibioticoterapia empírica inadequada.

Também é de extrema importância a continuidade e o aprofundamento desta linha de pesquisa pela chance de elucidar algumas questões, principalmente aquelas relacionadas à patogênese da VB, à genética da resistência bacteriana e mecanismos de regulação, cujas implicações nas características morfológicas, fisiológicas e expressão de virulência dos microrganismos são, hoje, inquestionáveis, mas pouco consideradas na prática clínica, e requer um suporte mais objetivo da pesquisa básica.

8 Conclusões

- Existe um elevado percentual de pacientes sintomáticas para VB dentro do grupo estudado;
- Na prática clínica, a coloração de Gram pode servir como método complementar ao Papanicolaou, auxiliando e agilizando o diagnóstico de VB;
- O método molecular (PCR) é adequado para a detecção do microrganismo em estudo, quando comparado ao método de cultivo em meio de cultura, considerando-se a relação sensibilidade-especificidade;
- Clindamicina apresenta-se como boa opção para terapia empírica nas VB associadas a *G. vaginalis*, embora resistência bacteriana tem sido observada para este antimicrobiano, *in vitro*;
- Ampicilina associada a inibidor de beta-lactamase, como o sulbactam, mostrou-se, *in vitro*, altamente eficaz contra *G. vaginalis*;
- Linhagens de *G. vaginalis* na região amostrada são altamente resistentes, *in vitro*, aos nitroimidazóis, esse resultado desencoraja o uso destes antimicrobianos como drogas de escolha na terapia empírica de VB;
- Com uma população altamente heterogênea albergando o gene responsável pela codificação da vaginolisina, não foi possível associar a presença do gene como marcador genético para determinação de linhagens patogênicas;
- Dada a origem comunitária da VB, não é possível estabelecer relações baseada na tipagem por susceptibilidade a antimicrobianos entre amostras de *G. vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB;
- Existe uma grande heterogeneidade entre os isolados de *G. vaginalis* circulantes na nossa região.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Treatment of bacterial vaginosis with *Schinus terebinthifolius* Raddi vaginal gel: a randomized controlled trial. **RBGO**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- AMSEL, R., TOTTEN, P. A., SPLEGEL, C. A., CHEN, K. C. S., ESCHENBACH, D.A., HOLMES, K.K. Non-specific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **Am J Med**, v. 74, p. 14-22, 1983.
- AROUTCHEVA, A. A., SIMÕES, J. A., BEHBAKHT, K., FARO, S. Defense factors of vaginal lactobacilli. **Am J Obstet Gynecol**, v. 185, p. 375-379, 2001.
- AUSTIN, M. N., BEIGI, R. H., MEYN, L. A., HILLIER, S. L. Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4492-4497, 2005.
- AUSTIN, M. N.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. Susceptibility of vaginal bacteria to metronidazole and tinidazole. **Anaerobe**, v. 12, p. 227-230, 2006.
- AVILA-CAMPOS, M.J., SACCHI, C.T., WHITNEY, A.M., STEIGERWALT, A.G., MAYER, L.W. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Periodontology**, v. 70, p.1202-1208, 1999.
- BRADSHAW, C. S., MORTON, A. N., HOCKING, J., GARLAND, S. M., MORRIS, M. B., MOSS, L. M., HORVATH, L. B., KUZEVSKA, I., FAIRLEY, C. K. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 Months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. **J Infect Dis**, v. 193, p. 1478-86, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis**. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Uso Racional de Antimicrobianos e a Resistência Microbiana**. Brasília, 2008.
- BROOK, I. Antimicrobial treatment of anaerobic infections. **Expert Opin Pharmacother**, v. 12, n.11, p.1691-707, 2011.

CAMARENA, J. J.; NOGUEIRA, J. M.; DASÍ, M.; MORENO, A. F.; GARCÍA, R.; LEDESMA, E.; LLORCA, J.; HERNÁNDEZ, J. DNA amplification fingerprinting for subtyping *Neisseria gonorrhoeae* strains. **Sexually Transmitted Disease**, v. 22, p. 128-135, 1995.

CASTELLANO-FILHO, D. S.; SILVA, V. L.; NASCIMENTO, T. C.; VIEIRA, M. T.; DINIZ, C. G. Detection of Group B *Streptococcus* in brazilian pregnant women and antimicrobial susceptibility patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 1047- 1055, 2010.

CASTELLANO-FILHO, D. S.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L. Bacterial vaginosis: clinical, epidemiologic and microbiological features. **HU Rev**, v. 36, n. 3, p. 223-230, 2010.

CATLIN, B. W. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, p. 213-37, 1992.

CDC, Division of Sexually Transmitted Diseases: Bacterial Vaginosis (BV). Online http://www.cdc.gov/nchstp/dstd/Fact_Sheets/FactsBV.htm. , 2000.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A7. 7th ed. Wayne, PA: CLSI, 2007.

CRUZ, C. D. Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV: 1. 285 p. 2006.

CRUZ, C. D. Programa Genes - Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV: 1. 278 p. 2008.

CURTIS, A. H. A motile curved anaerobic bacillus in uterine discharge. **J Infect Dis**, v. 12, p. 165-9, 1913.

CURTIS, A. H. On the etiology and bacteriology of leucorrhoea. **Surg Gynecol Obstet**, v. 18,p 299-306, 1914.

DICKEY, L. J., NAILOR, M. D., SOBEL, J. D. Guidelines for the treatment of bacterial vaginosis: focus on tinidazole. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, p. 485–489, 2009.

DÖDERLEIN, A. Die Scheidensekretuntersuchungen. **Zentralb Gynakol**, v. 18, p. 10-4, 1894.

DORIA, R. F. F. L. Seguimento de usuárias de dispositivo intra-uterino com e sem vaginose bacteriana. 2003. 46 f. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ERIKSSON, K., FORSUM, U., BJORNEREM, A., PLATZ-CHRISTENSEN, J. J., LARSSON, P. G. Validation of the use of Pap-stained vaginal smears for diagnosis of bacterial vaginosis. *APMIS*, v.115, p.809-13, 2007.

ESCHENBACH, D. A. Bacterial vaginosis: emphasis on upper genital tract complications. *Obstet Gynecol Clin North Am*, v. 16, p. 593-610, 1989.

ESCHENBACH, D.A. History and review of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, v. 169, p. 441-5, 1993.

FACHINI, A. M., GIRALDO, P., ELEUTÉRIO JÚNIOR, J., JACYNTHO, C., GONÇALVEZ, A. K., LINHARES, I. Bacterial vaginosis and preterm labor: an association not very well understood. *DST – J bras Doenças Sex Transm*, v. 17, n. 2, p. 149-152, 2005.

FETHERS, K. A., FAIRLEY, C. K., MORTON, A., HOCKING, J. S., HOPKINS, C., KENNEDY, L. J., FEHLER, G., BRADSHAW, C. Early sexual experiences and risk factors for bacterial vaginosis. *J Infect Dis*, v. 200, p. 1662–70, 2009.

FILHO, J. A. S., DINIZ, C. G., BARBOSA, N. B., FREITAS, M. C. R., NEVES, M. S. L., MAZZEI, R. N. G., GAMEIRO, J., COELHO, C. M., SILVA, V. L. Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Anaerobe*, v.18, n. 6, p. 566-575, 2012.

FRANCISCO, W. *Gardnerella vaginalis* no trato genito-urinário em São Paulo, capital: aspectos epidemiológicos e de diagnóstico laboratorial. 1990. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1990.

GARDNER, H.L.; DUKES, C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "non specific vaginitis". *Am J Obstet Gynecol*, v. 69, p. 962-76, 1955.

GELBER, S.E., AGUILAR, J. L., LEWIS, K. L. T., RATNER, A. J. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol*, v. 190, n. 11, p. 3896-3903, 2008.

GEORGE, M. L. C.; BUSTAMAM, M.; CRUZ, W. T.; LEACH, J. E.; NELSON, R. J. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. **Phytopathology**, v. 87, p. 302-309, 1997.

GIRALDO, P. C., AMARAL, R. L. G., GONÇALVES, A. K., VICENTINI, R., MARTINS, C. H., GIRALDO, H., FACHINI, A. M. Influence of frequency of vaginal intercourses and the use of douching on vaginal microbiota. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 5, p. 257-62, 2005.

GIRALDO, P. C., PASSOS, M. R. L., BRAVO, R., VARELLA, R. Q., CAMPOS, W. N. A., AMARAL, R. L., MARUSSI, E. Review: Challenge of understanding and dealing with bacterial vaginosis. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v. 19, n. 2, p. 84-91, 2007.

GOLDSTEIN, E. J., CITRON, D. M., VRENI MERRIAM, C., WARREN, Y. A., TYRRELL, K. L., FERNANDEZ, H. T. In vitro activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 3995-6, 2002.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARALDSSON G., HOLBROOK, W.P. AND KÖNÖNEN, E. Clonal similarity of salivary and nasopharyngeal *Fusobacterium nucleatum* in infants with acute otitis media experience. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 161-165, 2004.

HASENACK, B. S., MIQUELÃO, A. K. M. B., MARQUEZ, A. S., PINHEIRO, E. H. T., URNAU, A. P. Comparative study for the diagnosis of bacterial vaginosis by Papanicolaou and Gram staining techniques. **RBAC**, v. 21, p. 40-4, 2008.

HILLIER, S.L., KROHN, M. A., NUGENT, R. P., GIBBS, R. S. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 166, p. 938-44, 1992.

HUBRECHTS, J. M. H., VANHOOF, R. L., DAEMS, A., BUTZLER, J. P. Susceptibility of *Gardnerella vaginalis* to Thiamphenicol: Clinical experience with nonspecific vaginitis. **Sex Transm Diseases**, v. 11, n. 4, p. 456-459, 1984.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 22.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 651 p., 2005.

JOESOEUF, M. R., SCHMID, G. P., HILLIER, S. L. Bacterial Vaginosis: Review of Treatment Options and Potential Clinical Indications for Therapy. **CID**, v. 28, n. 1, p. 57-65, 1999.

KARANI, A., DE VUYST, H., LUCHTERS, S., OTHIGO, J., MANDALIYA, K., CHERSICH, M.F. The Pap smear for detection of bacterial vaginosis. *Int J Gynecol Obstet*, v. 98, p 20-3, 2007.

KHARSANY, A. B. M., HOOSEN, A. A., ENDE, J. V. D. Antimicrobial Susceptibilities of *Gardnerella vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 12, p. 2733-2735, 1993.

KOUMANS, E. H.; KENDRICK, J. S. Preventing adverse sequelae of bacterial vaginosis. *Sex Transm Diseases*, v. 28, p. 292-297, 2001.

LARSSON, P. G., BRANDSBORG, E., FORSUM, U., PENDHARKAR, S., KROGH-ANDERSEN, K., NASIC, S., HAMMARSTROM, L., MARCOTTE, H. Extended antimicrobial treatment of bacterial vaginosis combined with human lactobacilli to find the best treatment and minimize the risk of relapses. *BMC Infectious Diseases*, v. 11, n. 223, 2011.

LEITE, S. R. R. F., AMORIM, M. M. R., CALÁBRIA, W. B., LEITE, T. N. F., OLIVEIRA, V. S., JÚNIOR, J. A. A. F., XIMENES, R. A. A. Clinical and microbiological profile of women with bacterial vaginosis. *Rev Bras Ginecol Obstet*. v. 32, n. 2, p. 82-7, 2010.

LING, Z., KONG, J., LIU, F., ZHU, H., CHEN, X., WANG, Y., LI, L., NELSON, K. E., XIA, Y., XIANG, C. Research article: Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics* 2010, v. 11, p. 488, 2010.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P.C.; BARACAT, E.C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. *Rev Assoc Med Bras*, v. 56, n. 3, p. 370-4, 2010.

LIVENGOOD, C. H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol*, v. 2, n. 1, p. 28-37, 2009.

MARTINS, M. C. L., BÔER, C. G., SVIDZINSKI, T. I. E., DONIDA, L. G., MARTINS, P. F. A., BOSCOLI, F. N., CONSOLARO, M. E. L. Evaluation of the method of Papanicolaou for screening of some cervico-vaginal infections. *RBAC*, v. 39, n. 3, p. 217-221, 2007.

MASTROBATTISTA J.M., BISHOP K.D., NEWTON E.R. Wet smear compared with Gram stain diagnosis of bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women. *Obstet Gynecol*, v. 96, p. 504–506, 2000.

MENARD, J.P., FENOLLAR, F., HENRY, M., BRETELLE, F., RAOULT, D. Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to Predict Bacterial Vaginosis. **Clin Infect Diseases**, v. 47, p.33–43, 2008.

MIJAC, V.D., DUKIĆ, S. V., OPAVSKI, N. Z., DUKIĆ, M. K., RANIN, L. T. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 129, p. 69-76, 2006.

MORRIS, M., NICOLL, A., SIMMS, I., WILSON, J., CATCHPOLE, M. Bacterial vaginosis: a public health review. **British J Obstet and Gynecol**, v. 108, p.439-450, 2001.

NAGARAJA, P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. **J Med Microbiol** , v. 26, p.155-7, 2008.

NAIDOO, S., PEROVIC, O., RICHARDS, G.A., DUSE, A.G. Clinically significant anaerobic bacteria isolated from patients in a South African academic hospital: antimicrobial susceptibility testing. **S Afr Med J**, v. 101, n. 10, p. 732-734, 2011.

NESS, R. B., HILLIER, S. L., KIP, K. E., SOPER, D. E., STAMM, C. A., MCGREGOR, J. Á., BASS, D. C., SWEET, R. L., RICE, P., RICHTER, H. E. Bacterial vaginosis and risk of pelvic inflammatory disease. **Am J Obstet Gynecol**, v. 104, p. 761-769, 2004.

NOGUEIRA, I. A.; BRASIL, P.; CONCEIÇÃO, M.; MARTINS, I. S. Recomendações para o Uso Adequado dos Antimicrobianos. **Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar, Secretaria de Estado de Saúde**, Rio de Janeiro, 2000.

NUGENT, R. P.; KROHN, M.A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnostic bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. **J Clin Microbiol**, v. 29, p. 297-301, 1991.

OLIVEIRA, A. L. Resistência Bacteriana a Antibióticos: Uma Análise da Conduta Hospitalar. **Rev. Cesumar – Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 11, n. 1, p. 59-69, 2006.

OLIVEIRA, A. B., FRANÇA, C. A. S., SANTOS, T. B., GARCIA, M. A. F., TSUTSUMI, M. Y., BRITO JÚNIOR, L. C. Prevalência de *Gadnerella* e *Mobiluncus* em exames de colpocitologia em Tomé-Açu, Pará. **Rev. Para. Med.**, v. 21, n.4, 2007.

OLIVEIRA, C. A. (Org.); MENDES, M. E. (Org.). **Gestão da Fase Analítica do Laboratório – Como assegurar a qualidade na prática**. 1 ed., v. 1, 144 p. Rio de Janeiro: Controllab, 2010.

PATTERSON, J.L., STULL-LANE, A., GIRERD, P. H., JEFFERSON, K. K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial vaginosis-associated anaerobes. **Microbiology**, v. 156, p. 392–399, 2010.

PLECKAITYTE, M., JANULAITIENE, M., LASICKIENE, R., ZVIRBLIENE, A. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, p. 1-9, 2012.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 23-31, 2004.

PRIESTLY, C. J., JONES, B. M., DHAR, J., GOODWIN, L. What is normal vagina flora? **Genitourin Med**. v. 73, p. 23-28, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.; RITTER, J.M.; FLOWER, K.J. Farmacologia. 5° ed. Elsevier: Rio de Janeiro. 2007.

RIBEIRO, A. A., OLIVEIRA, D. F., SAMPAIO, M. C. N., CARNEIRO, M. A.S., TAVARES, S. B. N., SOUZA, N. L. A. Agentes microbiológicos em exames citopatológicos: estudo de prevalência. **RBAC**, v. 39, n. 3, p. 179-181, 2007.

SADHU, K., K. SADHU, DOMINGUE, P. A. G., CHOW, A. W., NELLIGAN, J., CHENG, N., COSTERTON, J. W. *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. **J. Med. Microbiol**, v. 29, p. 229-235, 1989.

SHANKER, S., TOOHEY, M., MUNRO, R. In vitro activity of seventeen antimicrobial agents against *Gardnerella vaginalis*. **Eur. J. Clin. Microbiol**, v. 1, n. 5, p. 298-300, 1982.

SCHWEBKE, J.R. Bacterial vaginosis: Are we coming full circle? **J Infect Dis**, v. 200, p. 1633–5, 2009.

SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; SANTOS, S.G.; GOMES R. M. F.; MAGALHÃES, P.P.; MENDES, E.N.; CARVALHO, M.A.R. E FARIAS, L.M. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 20-26, 2007.

SILVEIRA, A. C. O.; SOUZA, H. A. P. H. M.; ALBINI, C. A. The *Gardnerella vaginalis* and the urinary tract infections. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 4, p. 295-300, 2010.

SIMÕES, J. A., DISCACCIATI, M. G., BROLAZO, E., PORTUGAL, P. M., PAUPÉRIO, R. P. S., AROUTCHEVA, A., LIN TAO, V. Behavior factors and characteristics of microbial vaginal flora related to the establishment of bacterial vaginosis in sex workers and non- sex workers. **DST–J bras Doenças Sex Transm**, v. 18, n. 2, p. 108-112, 2006.

SMART, S.; SINGAL, A.; MINDEL, A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. **Sex Transm Infect.**, v. 80, n. 1, p. 58-62, 2004.

SONG, Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. **Anaerobe**, v.11, p. 79-91, 2005.

SRINIVASAN, S.; FREDRICKS, D. N. The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis. **Interdisciplinary Perspectives on Infect Dis**, v. 2008:750479, 22 p., 2008.

STEERS, E.; FOLTZ, E.; GRAVES, B. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 9, p. 307-11, 1959.

TEIXEIRA, G. S. Microbiota vaginal de mulheres com e sem vaginose bacteriana, com ênfase em *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2010.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?. **Infarma**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, S. M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. **MMWR Recomm Rep**, v. 4, n. 55, p. 1-94, 2006.

ZIMMERMANN, J. B., PEREIRA, L. A., CARDOSO, B. S., ALMEIDA, P. L., CALDEIRA, R. M., REZENDE, D. F. Vaginose bacteriana: frequência entre usuárias do serviço público e da rede privada de saúde. **HU Rev**, v. 35, n. 2, p. 97-104, 2009.

APÊNDICE B – Escore de Nugent (Diagnóstico Laboratorial)

Escore de Nugent		
Tipo Morfológico	Nº de microrganismos/Campo de imersão	Pontuação
<i>Lactobacillus</i> spp. ou Bacilos de Doderlein (BGP)	>30	0
	5 – 30	1
	1 – 4	2
	1	3
	0	4
<i>Mobiluncus</i> sp. (BGN curvos)	0	0
	1 – 4	1
	5	2
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Bacteroides</i> sp. (CBGV; BGN com vacúolos)	>30	4
	5 – 30	3
	1 – 4	2
	1	1
	0	0
Some os pontos obtidos e verifique a interpretação		
Pontuação	Interpretação	
0-3	Normal	
4-6	Intermediário	
7-10	Vaginose Bacteriana	

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 152/2011

Protocolo CEP-UFJF: 2402.142.2011 **FR:** 433719 **CAAE:** 0145.0.180.000-11

Projeto de Pesquisa: Participação bacteriana, fúngica e viral em infecções cervico-vaginais em Juiz de Fora/MG: estudo quantitativo sobre etiologia, recorrência e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Área Temática: Grupo III

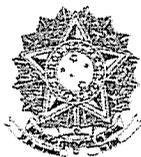
Pesquisador Responsável: Vania Lúcia da Silva

Data prevista para o término da pesquisa: Jul 2013

Pesquisadores Participantes: Cláudio Galuppo Diniz; Maria Luiza da Rosa e Silva; Betânia Paiva Drumond; Márcio Tavares Rodrigues; Cintia Marques Coelho; Juliana Barroso Zimmermann; Didier Silveira Castellano Filho; Danielle Maria Knupp de Souza.

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Análise do protocolo:		Sim	Não	P	NA
Itens Avaliados					
Justificativa	O estudo proposto apresenta pertinência e valor científico	X			
	Objeto de estudo está bem delineado	X			
Objetivo(s)	Apresentam clareza e compatibilidade com a proposta	X			
	Atende ao(s) objetivo(s) proposto(s)				
Material e Métodos	Informa				
	Tipo de estudo	X			
	Procedimentos que serão utilizados	X			
	Número de participantes	X			
	Justificativa de participação em grupos vulneráveis				X
	Critérios de inclusão e exclusão	X			
	Recrutamento	X			
	Coleta de dados	X			
	Tipo de análise	X			
Cuidados Éticos	X				
Revisão da literatura	Atuais e sustentam o(s) objetivo(S) do estudo	X			
Resultados	Informa os possíveis impactos e benefícios	X			
Cronograma	Agenda as diversas etapas de pesquisa	X			
	Informa que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo comitê	X			
Orçamento	Lista a relação detalhada dos custos da pesquisa	X			
	Apresenta o responsável pelo financiamento	X			
Referências	Segue uma normatização	X			
Instrumento de coleta de dados	Preserva o sujeito de constrangimento	X			
	Apresenta pertinência com o(s) objetivo(s) proposto(s).	X			
Termo de dispensa de TCLE	Solicita dispensa				X
Termo de assentimento	Apresenta o termo em caso de participação de menores				X
TCLE	Está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito	X			
	Apresenta justificativa e objetivos	X			
	Descreve suficientemente os procedimentos	X			
	Apresenta campo para a identificação dos sujeitos	X			
	Informa que uma das vias do TCLE deverá ser entregue ao sujeito	X			
	Assegura liberdade do sujeito recusar ou retirar o consentimento sem penalidades	X			



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036906- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

	Garante sigilo e anonimato	X			
	Explicita	Riscos e desconfortos esperados	X		
		Ressarcimento de despesas	X		
		Indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa	X		
		Forma de contato com o pesquisador	X		
		Forma de contato com o CEP	X		
		Como será o descarte de material coletado (no caso de material biológico)	X		
		O arquivamento do material coletado pelo período mínimo de 5 anos	X		
Pesquisador (es)		Apresentam titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa	X		
	Apresenta comprovante do Currículo Lattes do pesquisador principal e dos demais participantes.	X			
Documentos	Carta de Encaminhamento à Coordenação do CEP	X			
	Folha de Rosto preenchida	X			
	Projeto de pesquisa, redigido conforme Modelo de Apresentação de Projeto de Pesquisa padronizado pela Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ)	X			
	Declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável pelo setor/serviço onde será realizada a pesquisa	X			

P= parcialmente

NA=Não se aplica

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 25 de agosto de 2011


Pro^{fa} Dr^a Iêda Maria Ávila Vargas Dias
Coordenadora – CEP/UFJF

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Sr^a está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa "**Participação bacteriana, fúngica e viral em infecções cérvico-vaginais em Juiz de Fora/MG: estudo qualitativo sobre etiologia, recorrência e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**". Neste estudo pretendemos gerar conhecimentos sobre a presença de bactérias causadoras de vaginose bacteriana, fungos causadores de candidíase vulvovaginal e candidíase vulvovaginal recorrente, além de detectar a presença do papiloma vírus humano (HPV), para fins epidemiológicos. O motivo que nos leva a estudar este assunto é para ampliar os conhecimentos sobre a participação bacteriana, fúngica e viral nas doenças cérvico-vaginais, que constituem um problema clínico comum e um dos principais motivos que levam as mulheres a procurar o serviço ginecológico. As participantes, voluntárias não serão submetidas a nenhum procedimento clínico que ofereça riscos físicos ou dolorosos. Uma amostra de secreção será colhida pelo uso de um cotonete esterilizado na vagina durante sua consulta. Considerada pesquisa com risco mínimo, eventuais desconfortos emocionais serão minimizados, uma vez que as amostras serão coletadas pelo seu médico durante os exames ginecológicos que são realizados rotineiramente. Estes estudos vão permitir formular ações para uma diminuição de riscos associados ao uso incorreto dos medicamentos.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo seu médico. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição ao final da pesquisa. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. A Sr^a. não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portadora do documento de Identidade _____ fui informada dos objetivos do estudo "**Participação bacteriana, fúngica e viral em infecções cérvico-vaginais em Juiz de Fora/MG: estudo qualitativo sobre etiologia, recorrência e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo e que eventuais microrganismos isolados sejam mantidos na coleção de culturas biológicas do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20_____.

Assinatura da participante

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Vânia Lúcia da Silva
 ENDEREÇO: ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Campus Universitário s/n, Martelos
 CEP: 36036-900 – JUIZ DE FORA – MG
 FONE: (32) 2102-3213.
 E-MAIL: vania.silva@ufff.edu.br

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 CEP 36036-900
 FONE: 32 3229 3788

ANEXO C - Fenótipos de resistência entre as amostras de *Gardnerella vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB.
 AMP – Ampicilina; AMP/SUB – Ampicilina/ Subactam; CLI – Clindamicina; MTZ – Metronidazol;
 SCZ – Secnidazol; TNZ – Tinidazol

Amostras	Fenótipos
01.1	SCZ
01.2	SCZ
01.3	SCZ
01.4	SCZ
01.5	SCZ
02.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
02.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
02.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
02.4	MTZ
02.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
03.1	CLI, SCZ, TNZ
03.2	CLI, MTZ, SCZ, TNZ
03.3	TNZ
03.5	MTZ, TNZ
201.1	MTZ, SCZ
201.2	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
201.3	MTZ
201.4	MTZ, SCZ
201.5	MTZ, SCZ
202.1	MTZ
202.2	MTZ
202.3	MTZ
202.4	MTZ
202.5	MTZ, SCZ
208.1	MTZ
208.2	MTZ
208.3	AMP, MTZ
208.4	AMP, MTZ
208.5	AMP, MTZ
209.1	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
209.2	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
209.3	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
209.4	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
209.5	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
211.1	MTZ, SCZ, TNZ
211.2	MTZ, SCZ, TNZ
211.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
211.4	MTZ, SCZ, TNZ
211.5	MTZ, SCZ, TNZ
216.1	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
216.2	MTZ, SCZ, TNZ
216.3	MTZ. SCZ
216.4	MTZ. SCZ
216.5	MTZ. SCZ

ANEXO C - Fenótipos de resistência entre as amostras de *Gardnerella vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB.
 AMP – Ampicilina; AMP/SUB – Ampicilina/ Sulbactam; CLI – Clindamicina; MTZ – Metronidazol;
 SCZ – Secnidazol; TNZ – Tinidazol

217.1	MTZ, SCZ, TNZ
217.2	MTZ, SCZ, TNZ
217.3	MTZ, SCZ, TNZ
217.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
217.5	AMP, MTZ
219.1	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
219.2	AMP
219.3	AMP
219.4	AMP
219.5	AMP
221.1	AMP, MTZ
221.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
221.5	AMP, MTZ
222.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
222.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
222.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
222.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
222.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
224.1	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
224.2	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
224.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
224.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
224.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
226.1	AMP, SCZ, TNZ
226.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
226.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
226.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
226.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
230.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
230.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
230.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
230.5	AMP, MTZ, TNZ
231.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
231.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
231.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
231.4	AMP, MTZ, SCZ
231.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
232.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
232.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
232.3	AMP, MTZ
232.4	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
232.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
237.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
237.2	AMP, MTZ
237.3	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ

ANEXO C - Fenótipos de resistência entre as amostras de *Gardnerella vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB.
 AMP – Ampicilina; AMP/SUB – Ampicilina/ Sulbactam; CLI – Clindamicina; MTZ – Metronidazol;
 SCZ – Secnidazol; TNZ – Tinidazol

237.4	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
237.5	AMP, TNZ
243.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
243.2	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
243.3	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
243.4	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
243.5	AMP, CLI, SCZ, TNZ
245.1	AMP, SCZ, TNZ
245.2	AMP, MTZ, SCZ
245.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
245.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
245.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
247.1	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
247.2	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
247.3	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
247.4	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
247.5	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
103.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
103.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
103.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
103.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
103.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
104.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
104.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
104.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
104.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
104.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
105.1	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
105.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
105.3	CLI, MTZ, SCZ, TNZ
106.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
106.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
106.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
106.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
106.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
107.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
107.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
107.3	AMP, CLI, SCZ, TNZ
107.4	AMP, SCZ, TNZ
107.5	AMP, SCZ, TNZ
109.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
109.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
109.3	AMP, CLI, MTZ, SCZ, TNZ
109.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
109.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ

ANEXO C - Fenótipos de resistência entre as amostras de *Gardnerella vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB.

AMP – Ampicilina; AMP/SUB – Ampicilina/ Sulbactam; CLI – Clindamicina; MTZ – Metronidazol;
SCZ – Secnidazol; TNZ – Tinidazol

110.1	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
110.2	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
110.3	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
110.4	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
110.5	AMP, AMP/SUB, MTZ, SCZ, TNZ
113.1	AMP, MTZ
113.2	AMP, MTZ
113.3	AMP
113.4	AMP, MTZ
113.5	AMP
115.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
115.2	MTZ, SCZ, TNZ
115.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
115.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
115.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
117.1	AMP, MTZ, SCZ
117.2	AMP, MTZ, SCZ
117.3	AMP, MTZ, SCZ
117.4	AMP, SCZ
117.5	AMP, SCZ, TNZ
118.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
118.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
118.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
118.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
118.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
119.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
119.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
119.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
119.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
119.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
126.1	AMP
126.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
126.3	AMP
126.4	AMP, MTZ
126.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
127.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
127.2	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
127.3	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS
127.4	AMP
127.5	AMP
128.1	AMP, SCZ, TNZ
128.2	SCZ, TNZ
128.3	SCZ, TNZ
128.4	SCZ, TNZ
128.5	SCZ, TNZ

ANEXO C - Fenótipos de resistência entre as amostras de *Gardnerella vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB.
 AMP – Ampicilina; AMP/SUB – Ampicilina/ Sulbactam; CLI – Clindamicina; MTZ – Metronidazol;
 SCZ – Secnidazol; TNZ – Tinidazol

129.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
129.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
129.3	AMP, SCZ, TNZ
129.4	AMP, SCZ, TNZ
129.5	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
134.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
134.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
134.3	AMP, MTZ, SCZ
134.4	AMP, SCZ
134.5	SCZ
135.1	AMP, SCZ
135.2	AMP, SCZ
135.3	AMP, SCZ
135.4	AMP, SCZ
135.5	AMP, SCZ
138.1	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
138.2	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
138.3	MTZ, SCZ, TNZ
138.4	MTZ, SCZ, TNZ
138.5	SCZ, TNZ
139.1	MTZ, SCZ, TNZ
139.2	MTZ, SCZ, TNZ
139.3	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
139.4	AMP, MTZ, SCZ, TNZ
139.5	AMP, SCZ, TNZ