

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À VAGINOSE
BACTERIANA EM MULHERES ATENDIDAS PELO SUS NO
MUNICÍPIO DE OURO PRETO/MG**

Pedro Moregola Teixeira

Aluno

Glenda Nicioli da Silva

Orientadora

Luiz Fernando de Medeiros Teixeira

Co-orientador

Ouro Preto – MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À VAGINOSE
BACTERIANA EM MULHERES ATENDIDAS PELO SUS NO
MUNICÍPIO DE OURO PRETO/MG**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia, da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira

Ouro Preto – MG

2018

T266p

Teixeira, Pedro Moregola .

Prevalência e fatores associados à vaginose bacteriana em mulheres atendidas pelo SUS no município de Ouro Preto/MG [manuscrito] / Pedro Moregola Teixeira. - 2018.

83f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Glenda Nicioli da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Bacterioscopia pós-coloração de Gram. 2. Citologia. 3. Vaginose bacteriana. 4. Reação em cadeia da polimerase. I. Silva, Glenda Nicioli da. II. Teixeira, Luiz Fernando de Medeiros. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 611.018.1:611.65

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 145ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Pedro Moregola Teixeira**, com a defesa da dissertação intitulada: “Prevalência e fatores associados à vaginose bacteriana em mulheres atendidas pelo SUS no município de Ouro Preto/MG”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 16 de agosto de 2018.

Regina Maria Nardi Drummond

Profª. Dra. Regina Maria Nardi Drummond
UFMG

Breno de Mello Silva

Prof. Dr. Breno de Mello Silva
UFOP

Glenda Nicoli da Silva

Profª. Dra. Glenda Nicoli da Silva
UFOP

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof. Dr. Wendel Coura Vital

Departamento de Análises Clínicas - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof^a. Dr^a. Angélica Alves Lima

Departamento de Análises Clínicas - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof^a. Dr^a. Fatima Soares Motta Noronha

Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais

Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto

Dedico este trabalho aos meus pais, José Orione e Deborah,
ao meu irmão Rafael, e à minha noiva, Raquel, por serem meus pilares
e a razão para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar a todo momento e guiar meus passos.

Aos meus pais e ao meu irmão por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado.

À minha noiva Raquel, por sempre me incentivar e me acalmar nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Glenda, pela oportunidade, atenção, confiança e ensinamentos nestes dois anos.

Ao meu co-orientador Luiz Fernando, pela oportunidade, confiança e acolhida.

Ao Wendel, pela grande ajuda e colaboração neste trabalho.

Às professoras Angélica, Fátima e Cláudia pela colaboração.

Às meninas do LPC, pela ajuda nos experimentos, amizade e por sempre estarem ao meu lado quando precisei.

À Nayara, pela ajuda e por sempre estar à disposição.

Às alunas do projeto de extensão (Raíssa, Débora, Gabryela e Catarina) pela dedicação e participação neste trabalho.

À Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto e, em especial, às enfermeiras Naiara, Michelle, Glauciane, Carla, Deysiane e Isadora por me receberem nas unidades de saúde e colaborarem neste trabalho.

Ao Setor de Citologia do LAPAC, por fornecerem informações essenciais neste estudo.

Às mulheres que aceitaram participar deste trabalho, peças fundamentais para a realização do mesmo.

Aos professores e funcionários do CiPharma por fazerem parte desta conquista.

Ao CNPq, Fapemig e UFOP pelo apoio financeiro.

Resumo

A vaginose bacteriana é a causa de corrimento vaginal mais comum no mundo, caracterizada pela substituição da microbiota vaginal comensal, composta principalmente por *Lactobacillus* spp. e por outros microrganismos anaeróbios obrigatórios ou facultativos. As causas da vaginose ainda não foram completamente elucidadas, mas sabe-se que o comportamento sexual e alguns hábitos de vida estão associados com o desenvolvimento dessa doença. O diagnóstico laboratorial é realizado utilizando a bacterioscopia pós-coloração de Gram (padrão-ouro) ou o método citológico, empregando a coloração de Papanicolaou. Ferramentas moleculares, como a PCR, surgiram como uma alternativa para a detecção de patógenos causadores de DSTs que podem estar associados com a presença de vaginose, possuindo maior sensibilidade que as técnicas tradicionalmente empregadas. Os objetivos desse estudo foram: 1) determinar a prevalência de vaginose bacteriana em mulheres e sua recorrência na área urbana de Ouro Preto; 2) identificar os fatores de risco associados à vaginose bacteriana; 3) determinar e comparar a frequência de doenças genitais por espécies não comensais *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) e *Trichomonas vaginalis* (TV) utilizando diferentes métodos diagnósticos (Gram e citológico); 4) avaliar a possível associação entre a presença de vaginose e a detecção das espécies não comensais; 5) avaliar a associação entre a presença de vaginose pelo método de Gram e citológico e alterações no exame citológico. 6) verificar, em uma sub-amostra, a capacidade de detecção das espécies não comensais como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e HPV pela PCR e a sua associação com a presença de vaginose. Para isso, foi realizado um estudo transversal no município de Ouro Preto/MG composto por 341 mulheres com idade igual ou superior a 18 anos, usuárias do SUS. Foram colhidas amostras cervicais para a avaliação citológica do colo do útero e dois swabs vaginais para a avaliação da microbiota vaginal (método de Gram) e realização da PCR para pesquisa de patógenos não comensais. Os resultados mostraram prevalência de vaginose de 32,5% utilizando o método de bacterioscopia pós-coloração de Gram e 27,7% utilizando o método citológico, com uma concordância de 90,1% entre os métodos ($kappa=0,77$). Os fatores de risco relacionados com o desenvolvimento de vaginose foram: tabagismo, uso de DIU e histórico prévio de vaginose. Não foi detectada a presença de CT pelo método de Gram, mas 1 caso foi detectado pelo citológico e 20 pela PCR. Somente 1 caso de infecção por NG foi detectado utilizando o método de Gram e dois utilizando a PCR. O patógeno TV foi detectado pelo método citológico em 20 casos e 13 pela PCR. HPV foi detectado em 17 casos, sendo 12 em mulheres com vaginose. Em conclusão, o método citológico é eficaz e aplicável ao diagnóstico de vaginose, sendo os fatores de risco para essa doença o uso de DIU, o tabagismo e o histórico prévio de vaginose. Os patógenos *Trichomonas vaginalis* e HPV apresentaram-se mais frequentes em mulheres com vaginose. O aumento de casos estudados usando a PCR trará informações importantes sobre a aplicabilidade dessa técnica juntamente com os métodos padrão-ouro para a detecção de diferentes patógenos, trazendo resultados mais seguros e confiáveis.

Palavras-chave: Bacterioscopia pós-coloração de Gram, citologia, fatores de risco, HPV, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vaginose.

Abstract

Bacterial vaginosis is the most common cause of vaginal discharge in the world, characterized by the replacement of the commensal vaginal flora, composed mainly of *Lactobacillus* spp and other strict anaerobic or facultative microorganisms. The causes of vaginosis have not yet been fully elucidated, but it is known that sexual behavior and some lifestyle habits are associated with the development of this disease. The laboratory diagnosis is performed using bacterioscopy post Gram staining (gold standard) or the cytological method, using Papanicolaou staining. Molecular tools, such as PCR, have emerged as an alternative for the detection of pathogens causing STDs that may be associated with the presence of vaginosis, having a higher sensitivity than the techniques traditionally employed. The objectives of this study were: 1) to determine the prevalence of bacterial vaginosis in women and their recurrence in the urban area of Ouro Preto city; 2) to identify the risk factors associated with bacterial vaginosis; 3) to determine and compare the frequency of genital diseases by non-commensal species *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) and *Trichomonas vaginalis* (TV) using different diagnostic methods (Gram and cytological); 4) to evaluate the possible association between the presence of vaginosis and the detection of non-commensal species; 5) to evaluate the association between the presence of vaginosis by Gram and cytological methods and abnormalities in cytological examination. 6) to verify, in a sub-sample, the capacity of detection of non-commensal species such as *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* and HPV by PCR and their association with the presence of vaginosis. For this, a cross-sectional study was carried out in Ouro Preto city, MG, Brazil, comprising 341 women aged 18 years and older, users of public health units. Cervical samples were collected for cervical cytology evaluation and two vaginal swabs were used to evaluate the vaginal flora (Gram method) and PCR for non-commensal pathogens. The results showed a prevalence of 32.5% vaginosis using Gram method and 27.7% using the cytological method, with a concordance of 90.1% between the methods ($\kappa = 0.77$). Risk factors related to the development of vaginosis were: smoking, use of DIU and previous history of vaginosis. The presence of CT by the Gram method was not detected, but 1 case was detected by cytology and 20 by PCR. Only 1 case of NG infection was detected using the Gram method and two using PCR. The TV pathogen was detected by cytological method in 20 cases and 13 by PCR. HPV was detected in 17 cases, being 12 in women with vaginosis. In conclusion, the cytological method is effective and applicable to the diagnosis of vaginosis, the risk factors for the vaginosis are use of DIU, smoking and previous history of vaginosis. The pathogens *Trichomonas vaginalis* and HPV were more frequent in women with vaginosis. The increase of cases studied using PCR will provide important information about the applicability of this technique together with standard gold methods for the detection of different pathogens, bringing results safer and reliable.

Keywords: Cytology, Gram bacterioscopy, HPV, Polymerase Chain Reaction (PCR), risk factors, vaginosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

AGC-SOE: células glandulares atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

CO₂: dióxido de carbono

CT: *Chlamydia trachomatis*

DIU: dispositivo intrauterino

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio-padrão

DST: doença sexualmente transmissível

ESF: Estratégia Saúde da Família

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HC2: captura híbrida de segunda geração

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV: Papiloma Vírus Humano

IC: intervalo de confiança

IgA: imunoglobulina A

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Lapac: Laboratório Piloto de Análises Clínicas

LOS: lipooligossacarídeo

LPC: Laboratório de Pesquisas Clínicas

LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

MG: Minas Gerais

NaCl: cloreto de sódio

NG: *Neisseria gonorrhoeae*

nm: nanômetro

OH: radical hidroxila

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

RP: razão de prevalência

RS: Rio Grande do Sul

SUS: Sistema Único de Saúde

TV: *Trichomonas vaginalis*

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

VB: vaginose bacteriana

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Bacterioscopia pós-coloração de Gram
de uma mulher infectada por diplococos Gram negativos
sugestivos de *Neisseria gonorrhoea*.....55
- Figura 2:** Gel de agarose a 2% para *Trichomonas vaginalis*,
Neisseria gonorrhoeae, *Chlamydia trachomatis* e HPV.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil socioeconômico da população de estudo, Ouro Preto-MG, 2017.....	46
Tabela 2: Hábitos de vida da população de estudo, Ouro Preto-MG, 2017.....	47
Tabela 3: Comportamento sexual da população de estudo, Ouro Preto-MG, 2017.....	48
Tabela 4: Prevalência de vaginose por região de Ouro Preto-MG utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram.....	49
Tabela 5: Prevalência de vaginose por região de Ouro Preto-MG utilizando método citológico.....	50
Tabela 6: Análise univariada correlacionando a presença de vaginose e o perfil socioeconômico da população estudada.....	51
Tabela 7: Análise univariada correlacionando a presença de vaginose e os hábitos de vida da população estudada.....	52
Tabela 8: Análise univariada correlacionando a presença de vaginose e o comportamento sexual da população estudada.....	53
Tabela 9: Fatores de risco para o desenvolvimento de vaginose bacteriana.....	54
Tabela 10: Detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i> utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram.....	55
Tabela 11: Detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i> utilizando método citológico.....	56
Tabela 12: Detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> e HPV utilizando PCR.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Geral	17
3.2 Específicos.....	17
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4.1 Microbiota vaginal normal	18
4.2 Vaginose bacteriana	19
4.2.1 Conceito.....	19
4.2.2 Causas e mecanismo de patogenicidade da vaginose bacteriana	20
4.2.3 Características, fatores de risco e consequências.....	21
4.2.4 Tratamento	21
4.2.5 Epidemiologia	22
4.3 Métodos de diagnóstico de vaginose bacteriana	23
4.3.1 Avaliação clínica	23
4.3.2 Avaliação microscópica pós-coloração pelo método de Gram	24
4.3.3 Avaliação citológica	25
4.3.4 Outros métodos de diagnóstico	26
4.4 Doenças sexualmente transmissíveis.....	26
4.4.1 Tricomoníase	27
4.4.2 Gonorréia.....	28
4.4.3 Clamídia.....	30
4.4.4 HPV	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1 Análise epidemiológica	35

5.1.1 Delineamento e área de estudo	35
5.1.2 Cálculo da amostra	36
5.1.3 Critérios de inclusão e exclusão	36
5.1.4 População de estudo	37
5.1.5 Procedimento e obtenção das amostras.....	37
5.2 Detecção de vaginose por bacterioscopia pós-coloração de Gram	38
5.3 Detecção de vaginose e alterações cervicais pelo método citológico	39
5.4 PCR para detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV), <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG), <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) e Papiloma Vírus Humano (HPV)	40
5.4.1 Amplificação do gene β globina	40
5.4.2 PCR para detecção da <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV)	41
5.4.3 PCR para detecção de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG).....	41
5.4.4 PCR para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT)	41
5.4.5 PCR para detecção do Papiloma Vírus Humano (HPV)	42
5.4.6 Eletroforese em gel de agarose a 2%.....	42
5.5 Avaliação estatística e epidemiológica.....	43
6. RESULTADOS.....	45
6.1 Análise epidemiológica	45
6.1.1 Características da população avaliada	45
6.1.2 Prevalência e recorrência de vaginose utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram	49
6.1.3 Prevalência de vaginose utilizando método citológico	49
6.1.4 Fatores de risco associados à vaginose	50
6.1.5 Associação entre vaginose bacteriana e alterações citológicas	54
6.2 Detecção de patógenos não comensais	54
6.2.1 Detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i> utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram.....	54

6.2.2 Detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i> utilizando o método citológico	55
6.2.3 Detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> e HPV em uma sub-amostra utilizando PCR.....	56
7. DISCUSSÃO.....	59
8. CONCLUSÃO.....	66
9. REFERÊNCIAS.....	67
10. ANEXOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal tem sido descrita como sendo constituída principalmente por bacilos Gram positivos do gênero *Lactobacillus*, sendo as espécies *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* e *L. jensenii* as predominantes. A flora lactobacilar tem um importante papel na manutenção da saúde do trato genital feminino, atuando na prevenção de infecções do trato genitourinário (MACHADO *et al.*, 2016).

Vaginose bacteriana (VB) é a enfermidade decorrente da alteração da flora vaginal, de ocorrência comum entre as mulheres. Esta condição é caracterizada pela substituição total ou parcial da flora local lactobacilar por outras bactérias, principalmente a espécie *Gardnerella vaginalis*, e algumas anaeróbias obrigatórias (MARCONI *et al.*, 2015; LUCHIARI *et al.*, 2015). Dentre as infecções genitais, VB é a principal desordem vaginal em mulheres em idade fértil, contribuindo em mais de 60% das alterações vulvovaginais (MACHADO *et al.*, 2016). Estima-se que entre 20 a 30% das mulheres no mundo apresentam VB. Entretanto, essa prevalência pode ser de 50 a 60% em populações que apresentam comportamento sexual de risco (BAUTISTA *et al.*, 2016).

Até recentemente, o papel da *G. vaginalis* na patogênese não estava bem elucidado. Entretanto, a presença de biofilme bacteriano em VB recorrentes, sugere a sua participação nesse processo (BACKER *et al.*, 2007). *G. vaginalis* tem sido detectada em cultura de amostras de quase todas as mulheres sintomáticas com VB e em 50% das mulheres saudáveis. Outras bactérias podem causar VB, tais como as dos gêneros *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Bacterioides*, *Mobiluncos*, *Micoplasma* e a espécie *Atopobium vaginae* (MALAGUTI *et al.*, 2015 ; BAUTISTA *et al.*, 2016).

Clinicamente, a vaginose bacteriana é frequentemente diagnosticada baseada no critério descrito por Amsel e colaboradores (1983), em que três dos quatro seguintes critérios devem estar evidentes: I) fluido vaginal com pH superior a 4,5; II) presença de corrimento vaginal homogêneo no momento da avaliação médica; III) detecção de odor de peixe após a adição de hidróxido de potássio a 10% sobre o fluido vaginal e IV) presença significativa de *clue cells* (>20%) (AMARAL, 2012).

O método laboratorial mais empregado na rotina para o diagnóstico de VB é a bacterioscopia pós-coloração de Gram. Esse método apresenta alta correlação positiva com a cultura, sendo próxima de 100% (MARTINS *et al.*, 2007). O escore definido por Nugent e colaboradores (1991) é considerado a avaliação padrão para o diagnóstico de VB. Utilizando o critério de Nugent, cada morfotipo bacteriano observado no esfregaço vaginal corado é quantificado e pontuado em uma escala de 0 a 10. Se o valor encontrado for igual ou maior que 7, é considerado positivo para VB (FILHO *et al.*, 2010). Por serem realizados rotineiramente no exame preventivo de câncer do colo do útero, os esfregaços de Papanicolaou têm sido também utilizados como método auxiliar no diagnóstico da VB (TONINATO *et al.*, 2016).

Embora a etiologia da VB não esteja elucidada, muitos fatores sociodemográficos e de comportamento sexual têm sido associados com o desenvolvimento dessa condição, como o número de parceiros sexuais, relação sexual entre mulheres e ausência do uso de camisinha (MARCONI *et al.*, 2015; FETHERS *et al.*, 2008). Além disso, estudos têm mostrado associação entre a presença de vaginose e anormalidades no exame citológico e aquisição de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como tricomoníases, gonorréia, clamídia e HPV (NAM *et al.*, 2009; BAUTISTA *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2015).

Devido à importância da vaginose bacteriana, este estudo está sendo realizado com o objetivo de investigar a associação, prevalência e os possíveis fatores de risco da VB, de modo a permitir o conhecimento do seu perfil epidemiológico nas mulheres usuárias do Sistema Único de Saúde do município de Ouro Preto, MG. Além disso, a pesquisa de patógenos causadores de DSTs por três diferentes métodos permite melhor detecção desses agentes, possibilitando uma associação mais fidedigna entre vaginose e DSTs.

2. JUSTIFICATIVA

A vaginose bacteriana é uma enfermidade de alta prevalência em todo o mundo (BAUTISTA *et al.*, 2016). Embora os tratamentos medicamentosos atualmente disponíveis apresentem bons resultados, tem-se observado elevadas taxas de recorrência. A presença de biofilme contendo principalmente *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* tem sido a principal razão para falhas no tratamento (POLLATI *et al.*, 2012). Além disso, hábitos de vida e comportamento sexual têm sido apontados como fatores de predisposição à vaginose recorrente (BRADSHAW *et al.*, 2013). Diante de um cenário em que há aumento do número de novos casos de DSTs, e, levando em consideração que a vaginose pode ser um fator de risco, faz-se necessário a realização de estudos que abordem esta relação (BAUTISTA *et al.*, 2016).

Os avanços dos métodos moleculares para detecção de agentes causadores de DSTs têm contribuído para melhorar o diagnóstico destas doenças quando comparado aos métodos tradicionais empregados (ABOUTAYOUN *et al.*, 2015). Desta forma, é de grande importância que técnicas mais refinadas possam ser validadas e estarem disponíveis para os laboratórios clínicos, o que irá contribuir para um diagnóstico mais preciso.

A realização de estudos populacionais permite que sejam coletadas informações sobre hábitos e histórico de vida das pessoas que podem estar diretamente relacionados com o surgimento de doenças. Isso permite que medidas sócio-educativas possam ser tomadas a fim de se prevenir doenças e melhorar a qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a prevalência e os fatores associados com a vaginose bacteriana em mulheres residentes na área urbana de Ouro Preto.

3.2 Específicos

- Determinar a prevalência de vaginose bacteriana em mulheres e sua recorrência na área urbana de Ouro Preto;
- Identificar os fatores de risco associados à vaginose bacteriana;
- Determinar e comparar a frequência de doenças genitais por espécies não comensais *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis* utilizando diferentes métodos diagnósticos (Gram e citológico);
- Avaliar a possível associação entre a presença de vaginose e a detecção das espécies não comensais;
- Avaliar a associação entre a presença de vaginose pelo método de Gram e citológico e alterações no exame citológico;
- Verificar, em uma sub-amostra, a capacidade de detecção das espécies não comensais como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e HPV pela PCR e a sua associação com a presença de vaginose.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Microbiota vaginal normal

A microbiota vaginal sofre influência da ação dos hormônios femininos, principalmente o estrogênio. No útero, a vagina do feto é microbiologicamente estéril. Os primeiros microrganismos a habitarem o ambiente vaginal da criança são provenientes das mãos dos cuidadores e das fezes da criança. Nas primeiras seis semanas de vida, o estrogênio proveniente da mãe está presente no epitélio vaginal da criança, proporcionando a microbiologia e morfologia da flora vaginal adulta, caracterizada pela presença predominante de lactobacilos facultativos. Após o estrogênio ser metabolizado, a flora vaginal da criança passa a ser composta por microrganismos habitantes da pele, como estafilococos coagulase negativa e microrganismos fecais, como *Escherichia coli* (SPIEGEL, 1991).

Após a menarca, o ambiente vaginal saudável passa a ser composto principalmente por bacilos Gram positivos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, sendo *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* e *L. jensenii* as principais espécies (RAVEL *et al.*, 2011). Outros microrganismos também estão presentes em menor quantidade, como os difteróides, *Gardnerella vaginalis*, estafilococos coagulase negativa, estreptococos alfa e não-hemolíticos e outros bacilos Gram negativos. A vagina da maioria das mulheres também é colonizada por organismos anaeróbios obrigatórios, como peptostreptococos, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Porphyromonas* spp., *Mycoplasma* spp. entre outros (SPIEGEL, 1991; FILHO *et al.*, 2010).

A presença predominante de *Lactobacillus* spp. no ambiente vaginal saudável inibe o crescimento das demais espécies bacterianas nocivas à mucosa vaginal por manter o pH vaginal ácido (3,8 a 4,5) (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O uso do glicogênio do epitélio vaginal como substrato pelos lactobacilos permite que sejam produzidos ácidos orgânicos, responsáveis por manter o pH vaginal abaixo de 4,5 (MARTIN *et al.*, 2008).

A microbiota lactobacilar possui propriedades que dificultam a proliferação de patógenos como a adesão específica à superfície das células epiteliais e a produção de substâncias com propriedades antimicrobianas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os ácidos orgânicos e as bacteriocinas, entre outras substâncias (FILHO *et al.*, 2010).

A proteção da mucosa vaginal depende do reconhecimento de estruturas específicas da superfície dos lactobacilos (adesinas) ao epitélio vaginal (receptores). Esta interação adesina-receptor resulta na formação de um biofilme que exerce a ação protetora no local contra a colonização de microrganismos indesejáveis (BORIS *et al.*, 1998).

O peróxido de hidrogênio oferece grande vantagem aos lactobacilos, pela inibição do crescimento de microrganismos que não produzem catalase. O efeito bactericida do H_2O_2 é determinado pela sua atividade oxidante e pela geração de espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila ($OH\cdot$) (MARTIN., *et al.* 2008).

4.2 Vaginose bacteriana

4.2.1 Conceito

A vaginose bacteriana (VB) é a desordem mais comum do trato genital feminino caracterizada pela substituição da microbiota comensal lactobacilar por outros microrganismos anaeróbios obrigatórios ou facultativos (EADE *et al.*, 2012; MALAGUTI *et al.*, 2015).

Gardnerella vaginalis é um microrganismo anaeróbio facultativo, fastidioso, beta hemolítico, oxidase e catalase negativos, imóvel, encapsulado, pleomórfico e Gram positiva, ou seja, podendo se apresentar negativo ou fracamente positivo. O interesse científico na *G. vaginalis* está no fato desta bactéria ser encontrada em praticamente 100% das mulheres que apresentam sintomatologia clínica para VB (FILHO *et al.*, 2010).

Inicialmente isolado por Leopold em 1953 a partir de mulheres com cervicite e de homens com prostatite, sugeriu-se que o microrganismo encontrado fosse pertencente ao gênero *Haemophilus*. Entretanto, dois anos depois, Gardner e Dukes isolaram-a de paciente que apresentava vaginite inespecífica, e então essa bactéria passou a ser denominada de *Haemophilus vaginalis*.

Em 1963 foi proposta uma mudança de nome de *H. vaginalis* para *Corynebacterium vaginale*, devido à semelhança morfológica da bactéria as do gênero *Corynebacterium*. Em 1980, os cientistas Greenwood e Pickett, utilizando técnicas como hibridação do DNA, análises bioquímicas da parede celular e microscopia eletrônica demonstraram que a bactéria inicialmente descrita como pertencente ao gênero *Haemophilus* não pertencia a este gênero, e então propuseram que fosse então renomeada como *Gardnerella vaginalis*, em homenagem à Gardner, que foi o primeiro cientista a reportar a associação entre vaginite inespecífica e esta bactéria (BAUTISTA *et al.*, 2016).

4.2.2 Causas e mecanismo de patogenicidade da vaginose bacteriana

As causas da vaginose bacteriana ainda não foram completamente elucidadas, no entanto, a teoria que diz que a vaginose também pode ser sexualmente transmissível é sustentada pelo fato da *G. vaginalis* ser encontrada na uretra e sobre a pele do pênis de parceiros sexuais de mulheres com vaginose bacteriana. Mulheres que apresentam vaginose recorrente frequentemente possuem o mesmo parceiro sexual antes e após o tratamento, podendo assim, ser reinfectada por *G. vaginalis* (BAGNALL *et al.*, 2017).

Na vaginose bacteriana, há liberação de aminas devido à descarboxilação de aminoácidos presentes no meio, responsáveis pela formação de fluidos vaginais com odor semelhante a peixe. Entre essas aminas aromáticas são: putrescina, isobutilamina, cadaverina, histamina e trimetilamina. A cadaverina, fenilamina e metilamina podem irritar a pele, a isobutilamina causa eritemas e bolhas e a histamina possui ação na dilatação e aumento da microcirculação. Durante a vaginose bacteriana também são produzidos ácidos orgânicos como propiônico,

isobutírico, isovalérico e succínico, que pela sua ação citotóxica produzem esfoliação das células epiteliais da vagina. A descamação das células epiteliais, juntamente com a presença do pH básico, faz com que a *G. vaginalis* possa se aderir a estas células, formando as células-guia ou *clue-cells* (FERRADA, 2012).

4.2.3 Características, fatores de risco e consequências

Ao exame físico, a vaginose bacteriana se caracteriza pela presença de um corrimento branco-acinzentado, homogêneo e com um odor que nos remete ao cheiro de peixe. Dentre os principais fatores de risco já descritos para o surgimento da vaginose estão: uso regular de ducha vaginal; tabagismo; múltiplos parceiros sexuais; relação sexual sem o uso de preservativos e relação sexual entre mulheres. Há uma predominância nas populações de origem africana e hispânicos (BAGNALL *et al.*, 2017).

Dentre as principais consequências associadas à vaginose estão: infertilidade, parto prematuro ou recém-nascido de baixo peso, aborto, endometrite pós-cesárea, aumento do risco de contrair doenças de transmissão sexual, como a AIDS, gonorréia, tricomoníase, entre outras (AMARAL, 2012).

4.2.4 Tratamento

O tratamento e controle da vaginose têm como finalidade restaurar o equilíbrio da microflora vaginal, através da diminuição do número de bactérias anaeróbias obrigatórias e um possível aumento dos lactobacilos (FERREIRA, 2014). O tratamento é baseado no uso de antibióticos para mulheres sintomáticas e também nos casos assintomáticos em que as mulheres estejam com risco de aborto ou histerectomia.

Os derivados imidazólicos, como o metronidazol, são agentes antimicrobianos geralmente considerados como a primeira opção terapêutica para tratar VB. Descoberto em 1957, o metronidazol é ativo contra *G. vaginalis* e bastante eficaz

contra as bactérias anaeróbias que atuam sinergicamente com esta espécie na VB. Ambas as formulações oral e intravaginal estão disponíveis e, embora apresentem eficácias similares, com taxas de cura entre 70-80% após quatro semanas, a forma intravaginal apresenta menores efeitos adversos (SCHWEBKE *et al.*, 2004). Alternativamente ao metronidazol, a vaginose bacteriana pode ser tratada com clindamicina ou tinidazol (BAGNALL *et al.*, 2017).

O metronidazol atravessa a barreira placentária e é excretado no leite materno, sendo por isso contraindicado para mulheres grávidas e em período de aleitamento. A administração de clindamicina é uma alternativa segura para o controle da VB, pois apresenta boa atividade contra bactérias anaeróbias, apresentando resultados semelhantes ao do metronidazol. A desvantagem da utilização da clindamicina está no fato de eliminar a flora bacteriana normal lactobacilar, o que não ocorre com o uso do metronidazol (FERREIRA, 2014).

Os probióticos são uma alternativa para o uso de antibióticos na reposição da flora vaginal. Estudos tem mostrado que o tratamento com probióticos orais e tópicos são eficazes como auxiliares no tratamento da VB, podendo reduzir ainda mais a sua recorrência (BAGNALL *et al.*, 2017).

4.2.5 Epidemiologia

A VB é a causa mais comum de corrimento vaginal, afetando cerca de 30% das mulheres em todo o mundo (BAGNALL *et al.*, 2017). A prevalência de mulheres com vaginose pode chegar entre 50-60% em algumas populações que apresentam comportamento sexual de risco (BAUTISTA *et al.*, 2016). As maiores taxas de vaginose no mundo estão localizadas em países do sul e do leste da África (68% em Moçambique, 51% em Lesoto, 44% no Quênia e 37% em Gâmbia). No oeste da África, no entanto, as taxas de vaginose são mais baixas, como em Burkina Faso (7%) (NUGENT *et al.*, 1991).

Na Europa, as taxas de vaginose são moderadamente elevadas, como na Polônia (19%), Turquia (23%) e Noruega (24%). Mulheres do sudeste da Ásia, Austrália, Nova Zelândia e Indonésia possuem taxas de vaginose tipicamente

superiores a 30%. Mulheres da América Latina e Caribe possuem as menores taxas de vaginose, com exceção de países como a Jamaica e Peru (cerca de 40%) (BAUTISTA *et al.*, 2016).

Nos Estados Unidos da América, a vaginose é uma condição comum entre as mulheres, com as taxas de prevalência variando entre as etnias: afro-americanos (51%), hispânicos (32%) e brancos (23%). Dados similares foram obtidos na população do Canadá, onde tanto as mulheres de origem indígena, quanto às de origem aborígina, possuem elevadas taxas de prevalência (33%) (BAUTISTA *et al.*, 2016).

No Brasil, estudos realizados por Bonfati e Gonçalves (2010) detectaram a presença de VB pelo exame citológico em 38,24% das mulheres atendidas no Hospital Universitário de Santa Maria (RS). Vasconcelos e colaboradores (2010) realizaram pesquisa documental e retrospectiva que envolveu mulheres atendidas no centro de saúde da família na cidade de Fortaleza, Ceará, e identificaram nos exames colpocitológicos que as infecções vaginais sugestivas eram causadas por *G. vaginalis* em 25,3% dos casos.

4.3 Métodos de diagnóstico de vaginose bacteriana

4.3.1 Avaliação clínica

Na prática clínica, a vaginose é tipicamente diagnosticada através do critério de Amsel, onde devem ser observados pelo menos três dos seguintes achados clínicos (AMSEL *et al.*, 1983):

- presença de corrimento vaginal homogêneo
- pH vaginal superior a 4,5
- odor de “peixe” após a adição de hidróxido de potássio ao fluido vaginal (teste de *whiff* positivo)
- Presença de *clue-cells* em microscopia de esfregaço de material a fresco

4.3.2 Avaliação microscópica pós-coloração pelo método de Gram

Atualmente, o padrão-ouro para o diagnóstico de vaginose bacteriana é através da avaliação microscópica pós-coloração pelo método de Gram e escore de Nugent (ANUKAM *et al.*, 2014).

- Escore de Nugent

Este método envolve a identificação e quantificação de *Lactobacillus* spp., bem como de outras espécies como *G. vaginalis*, *Mobiluncus* spp. e *Bacterioides* spp. Neste método, uma pontuação numérica é calculada pela identificação e quantificação das espécies bacterianas descritas em cada campo microscópico. Pontuação entre 0-3 é considerada como microbiota normal; entre 4-6 é considerada microbiota intermediária e entre 7-10 é considerada como VB (BAGNALL *et al.*, 2017).

Entre os métodos laboratoriais empregados no diagnóstico de VB, a bacterioscopia em esfregaço corado de fluido vaginal apresenta como vantagens: o baixo custo, menor tempo para ser realizado e também o fato de estar mais disponível nos laboratórios do que outros métodos. No entanto, este é um método interpretativo, sendo uma limitação (NUGENT, 1991). Outra limitação do escore de Nugent está no fato deste sistema de pontuação gerar confusão na presença de uma flora vaginal mais complexa, classificando-a em uma categoria. A partir de então foram criadas outras versões de escore que permitem a classificação qualitativa de forma mais eficaz (VERHELST *et al.*, 2005).

- Sistema de Spiegel

É considerada flora vaginal normal quando há o predomínio na amostra do morfotipo lactobacilar com ou sem a presença de cocobacilos Gram variáveis. VB por este sistema de classificação passa a ser considerada quando for observada uma quantidade de *Lactobacillus* spp. inferior a 5 morfotipos por campo aliada à observação de uma quantidade maior ou igual a 5 morfotipos das seguintes bactérias: cocobacilos Gram variável ou Gram negativo, bacilos curvos Gram variável, bacilos Gram negativos fusiformes e cocos Gram positivo (MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

- Sistema de Ison/Hay

Sistema de classificação criado em 2002, onde a bacterioscopia dos esfregaços previamente corados pelo método de Gram são classificados em cinco categorias: **I** (flora normal), caracterizada pela presença de *Lactobacillus* spp. somente; **II** (flora intermediária), caracterizada pela presença de diferentes tipos morfológicos de bactérias e uma quantidade reduzida de *Lactobacillus* spp.; **III** (vaginose bacteriana), caracterizada pela presença de diferentes tipos de bactérias e por poucos ou nenhum morfotipo lactobacilar; **IV** caracterizada pela presença de células epiteliais cobertas somente com cocos Gram positivo e; **V** quando há presença de células epiteliais sem a presença de bactérias (ISON, HAY; 2002).

4.3.3 Avaliação citológica

Outro método que tem sido utilizado para o diagnóstico de VB é a avaliação citológica pelos esfregaços corados pelo método de Papanicolaou (ERIKSSON *et al.*, 2007). Em casos sugestivos de vaginose, os patologistas relatam a presença de *clue-cells* na amostra (INCA, 2006).

A técnica de Papanicolaou possui 50% de sensibilidade e 95% de especificidade quando comparado ao padrão-ouro (microscopia pós-coloração pelo método de Gram). Isso significa que um caso de vaginose detectado pelo método citológico possui uma forte evidência de que a doença está presente, mas que a ausência de bacilos supracitoplasmáticos não descarta a presença de vaginose (FILHO *et al.*, 2010).

A realização da técnica de Papanicolaou para a avaliação citológica das células escamativas do colo do útero tem contribuído para o diagnóstico de VB por ser um procedimento fácil de ser realizado e abranger grande parte da população de mulheres no Brasil, pois faz parte do programa nacional de prevenção ao câncer de colo do útero. Dessa forma, é considerada uma ferramenta útil para diagnosticar VB, principalmente quando um resultado positivo é obtido (FILHO *et al.*, 2010).

4.3.4 Outros métodos de diagnóstico

A cultura e o uso de métodos moleculares, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizados somente na área de pesquisa, sendo pouco utilizados na rotina laboratorial (LIVENGOOD, 2009). A cultura não é muito utilizada porque a *G. vaginalis* é um microrganismo que pode ser detectado em mulheres assintomáticas com vaginose e também em mulheres saudáveis que possuem esta bactéria na composição da flora vaginal normal (ERIKSSON *et al.*, 2007). Além disso, a cultura para *G. vaginalis* não é específica, é um procedimento incômodo e inviável financeiramente para a prática clínica (LIVENGOOD, 2009).

A PCR multiplex é um método que se mostrou capaz de identificar 13 bactérias associadas com o surgimento de vaginose em um estudo realizado por Malaguti e colaboradores (2015), fornecendo informações que podem contribuir para um melhor entendimento da doença, podendo ser útil no gerenciamento do tratamento médico das mulheres que são acometidas por esta doença.

A avaliação microscópica do material à fresco é um método que pode ser utilizado para o diagnóstico de VB através da detecção da presença de *clue-cells*, sendo um dos critérios descritos por Amsel. Também permite a identificação adicional de *Trichomonas* spp. e estruturas leveduriformes em brotamento e pseudo-hifas. Esse método permite o início rápido do tratamento (BAGNALL *et al.*, 2017).

4.4 Doenças sexualmente transmissíveis

Embora a vaginose bacteriana não seja considerada uma doença sexualmente transmissível (DST), há estudos que mostram uma relação entre o comportamento sexual e o desequilíbrio da flora vaginal normal, causando a vaginose (MASCARENHAS *et al.*, 2012). Além disso, a VB tem sido associada com o aumento à susceptibilidade ao desenvolvimento de DSTs, como AIDS e outras (MORRIS *et al.*, 2001).

4.4.1 Tricomoníase

A tricomoníase é uma DST, cujo agente etiológico é o protozoário móvel *Trichomonas vaginalis*. Esta é a DST não viral de maior prevalência no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde de 2008 estimam 276,4 milhões de novos casos por ano em pessoas com idade entre 15 e 49 anos, fazendo desta doença a DST mais comum curável em jovens e em homens e mulheres sexualmente ativas (GAYDOS *et al.*, 2017).

Os clássicos sintomas da tricomoníase estão associados a presença de corrimento bolhoso amarelo-esverdeado, prurido, disúria e lesões pontuais hemorrágicas na cérvix (MASCARENHAS *et al.*, 2012).

Vários estudos têm mostrado que pelo menos 80% das infecções por *Trichomonas vaginalis* são assintomáticas. No entanto, até mesmo as infecções assintomáticas, tem despertado preocupação na saúde pública. Além do risco de transmissão ao parceiro sexual, esta doença está associada ao aumento do risco de aquisição de HIV (2,7 vezes), trabalho de parto prematuro (1,3 vezes) e aumento de risco de desenvolvimento de doença pélvica inflamatória (4,7 vezes) (LAGA *et al.*, 1993; VAN DER POL *et al.*, 2008; POOLE *et al.*, 2013).

Os métodos convencionais utilizados para a detecção de *Trichomonas vaginalis* em *swabs* de secreções vaginais são a análise microscópica utilizando o material à fresco e técnicas de cultura. A análise microscópica à fresco é o método mais comum para a detecção de *T. vaginalis*, e embora esta técnica seja rápida e barata, apresenta sensibilidade de apenas 36-75% comparada com a cultura, mesmo quando as lâminas são analisadas por microscopistas experientes (NYE *et al.*, 2009).

A sensibilidade da cultura é menor quando comparada à métodos de amplificação de ácidos nucleicos (PCR). Dessa forma, o uso de técnicas moleculares mais sensíveis é recomendado para a detecção de *T. vaginalis* em homens e mulheres (GAYDOS *et al.*, 2017). Entre mulheres, os testes de amplificação de ácidos nucleicos podem detectar a prevalência de 3 a 5 vezes maior do que em preparações microscópicas à fresco (SCHWEBKE *et al.*, 2004).

Há ainda a detecção de infecções genitais por *Trichomonas vaginalis* utilizando o método citológico com a coloração de Papanicolaou. O protozoário pode ser identificado por seus aspectos morfológicos (arredondado, estruturas piriformes ou irregulares, medindo entre 10 e 20 μm , com citoplasma cianofílico e pequeno núcleo excêntrico) (MACARENHAS *et al.*, 2012).

Já está estabelecido que a maior incidência de tricomoníase nas mulheres é influenciada por variações de classe social e pela multiplicidade de parceiros sexuais, dentre outros fatores (PETRIN *et al.*, 1998). Além disso, a presença de vaginose é um fator de risco para a aquisição de tricomoníase (ALLSWORTH *et al.*, 2011).

4.4.2 Gonorréia

A gonorréia é uma DST curável e muito contagiosa, sendo adquirida principalmente por relação sexual genital e anal e menos frequentemente pelo sexo oral (BAUTISTA *et al.*, 2016). *Neisseria gonorrhoeae* é o agente etiológico desta doença, uma bactéria Gram negativa, observada na forma de diplococos que medem entre 0,6 e 1,0 μm . A estrutura celular é caracterizada pela presença de fímbrias, endotoxina, membrana externa contendo lipooligossacarídeos (LOS), IgA protease e cápsula. Estas estruturas conferem virulência a esta bactéria podendo se fixar às células do hospedeiro, impedem a fagocitose por neutrófilos polimorfonucleares e inibem a atividade bactericida do soro humano normal (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A gonorréia é a segunda DST mais comum no mundo representando 106 milhões dos estimados 498 milhões de novos casos de DSTs curáveis que ocorrem no mundo todos os anos. A ocorrência de diminuição da sensibilidade e aumento da resistência à vários fármacos, como cefalosporinas, penicilinas, sulfonamidas, tetraciclina e, mais recentemente, à quinolonas e macrolídeos é motivo de preocupação (WHO, 2012).

Em homens, a doença pode se manifestar como uretrite aguda, porém grande parte das infecções (até 75%) são assintomáticas. Em mulheres, inicialmente a

bactéria infecta o canal endocervical causando cervicite gonocócica. No entanto, a gonorréia pode ser assintomática em 70-90% dos casos nas mulheres, sendo um importante reservatório da infecção (WALKER *et al.*, 2011).

Em mulheres sintomáticas, os sinais e sintomas são a presença de corrimento vaginal amarelo ou esverdeado, com odor desagradável, presença de sangue durante a relação sexual e dor ou prurido ao urinar (BAUTISTA *et al.*, 2016). No entanto, sinais e sintomas desta doença podem estar ausentes ou indistinguíveis das infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* (VERMA *et al.*, 2016).

Os métodos laboratoriais mais utilizados para o diagnóstico de gonorréia são a microscopia e a cultura, sendo este último considerado padrão-ouro. O diagnóstico pela microscopia utilizando o método de coloração de Gram é rápido e barato, e baseia-se na observação de diplococos Gram negativo intracelulares nos neutrófilos. A sensibilidade e especificidade desta técnica para homens com uretrite são comparáveis com a cultura, sendo de 95% de sensibilidade e 99% de especificidade (VERMA *et al.*, 2016). Para o diagnóstico em mulheres e homens assintomáticos, a sensibilidade da microscopia cai para 37-70% e especificidade para 40-60% respectivamente (KOUUMANS *et al.*, 1998). A realização da bacterioscopia pós-coloração de Gram de espécimes endocervical, faringeal ou retal não é recomendada (PAPP *et al.*, 2014).

A cultura ainda é considerada padrão-ouro para o diagnóstico definitivo de gonorréia. Os gonococos são muito exigentes a respeito da composição do meio de cultura e a atmosfera que deve conter pelo menos 3% de CO₂ (VERMA *et al.*, 2016). O isolamento primário de gonococos requer a presença de meios de cultura contendo antibióticos que inibem o crescimento de outras bactérias e fungos indesejáveis. A sensibilidade da cultura pode chegar a 80-95% (NG *et al.*, 2005).

Além da microscopia e cultura, a detecção direta de componentes celulares de *N.gonorrhoeae* também pode ser realizada. Estes métodos podem ter grande impacto na saúde pública, pois permite que sejam aplicados em populações que atualmente escapam da vigilância epidemiológica. Além disso, podem ser utilizados quando os microrganismos estão mortos, sendo sua utilização viável mesmo quando o transporte das amostras biológicas não é adequado. Entre estes testes disponíveis estão a hibridação e a amplificação de ácidos nucleicos (PCR), possuindo elevadas

taxas de sensibilidade e especificidade (90 e 99%) respectivamente (VERMA *et al.*, 2016).

Para ambos os sexos, os fatores de risco para a infecção por *Neisseria gonorrhoeae* são: baixa idade (15 a 24 anos), população de descendência africana e hispânica, uso de drogas ilícitas, múltiplos parceiros sexuais, presença de outros patógenos causadores de DSTs e não uso de preservativo. A presença de vaginose constitui um fator de risco para a aquisição de gonorréia (BAUTISTA *et al.*, 2016).

4.4.3 Clamídia

As DSTs causadas pela bactéria *Chlamydia trachomatis* são comuns em todo o mundo, podendo ser transmitidas através do sexo anal, oral e vaginal em ambos os sexos (BAUTISTA *et al.*, 2016). *C. trachomatis* é uma bactéria desprovida da camada de peptidoglicano na parede celular e parasita intracelular obrigatório. Em função do seu parasitismo intracelular, foi considerado como vírus durante muito tempo (FREITAS, 2007).

A bactéria possui um ciclo de desenvolvimento bifásico e replicação dentro de vacúolos na célula hospedeira, formando inclusões citoplasmáticas características (BRUNHAM, REY-LADINO, 2005). O ciclo de desenvolvimento da clamídia ocorre dentro da célula hospedeira, garantindo com isso um meio ambiente livre da competição com outros microrganismos e preservação da ação do sistema imune (SILVA, LONGATTO, 2000).

A infecção por *Chlamydia trachomatis* é caracterizada por ser assintomática em grande parte das mulheres (75%) e homens (50%) (DIELISSEN *et al.*, 2013). Em mulheres, os sintomas da infecção por esta bactéria incluem dor abdominal, corrimento vaginal anormal, sangramento intermenstrual, dor durante a relação sexual, ardência ao urinar, sangramento após a relação sexual e corrimento amarelado com forte dor. Se não tratada, a clamídia pode causar cervicite, uretrite e endometrite. A cervicite não tratada pode levar a doença pélvica inflamatória, gravidez ectópica, infertilidade e dor pélvica crônica (BAUTISTA *et al.*, 2016).

Em homens, o sintoma mais comum é a uretrite, seguido por ardência ao urinar e prurido sobre o pênis. A infecção não tratada em homens pode causar inchaço nos testículos e declínio da concentração e motilidade dos espermatozoides, levando a infertilidade (BAUTISTA *et al.*, 2016)

Há uma variedade de testes laboratoriais desenvolvidos para o diagnóstico da *C. trachomatis* como a microscopia pós-coloração pela técnica de Giemsa, citologia pela técnica de Papanicolaou, histopatologia, cultura de células, técnicas moleculares (PCR e hibridação com sondas de DNA), testes de imunodeteção através da imunofluorescência direta e enzimaensaio.

Microscopia pós-coloração pela técnica de Giemsa detecta as densas inclusões citoplasmáticas granulosas causadas pela presença de *C. trachomatis* (MICHELON *et al.*, 2005).

A citopatologia pela técnica de Papanicolaou mostra as mesmas inclusões encontradas na coloração pela microscopia pós-coloração pela técnica de Giemsa. O exame de Papanicolaou é considerado de baixa sensibilidade e não deve ser utilizado como método de rastreio para a presença de clamídia. Na histopatologia, a presença de lesões inflamatórias crônicas e fibrocísticas com granulações e formação de folículos são consideradas suspeitas de infecção por clamídia (FREITAS, 2007).

Até alguns anos, por apresentar alta especificidade, a cultura em células McCoy era considerada o teste padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* (FREITAS, 2007). Este teste possui sensibilidade de 70% a 85% e especificidade de 100% (MICHELON *et al.*, 2005). Apesar de sua alta especificidade, a cultura apresenta algumas restrições, como o longo tempo para obtenção do resultado (48 a 72 horas após a inoculação) e o fato de detectar apenas bactérias vivas. Além disso, requer uma estrutura laboratorial onerosa (MICHELON *et al.*, 2005; FREITAS, 2007)

A pesquisa de ácidos nucleicos é considerada o teste mais promissor para o diagnóstico das infecções por clamídia, possuindo sensibilidade em torno de 75% e especificidade entre 95% e 99% (MICHELON *et al.*, 2005).

Além da baixa idade, outros fatores de risco estão associados com a infecção: tabagismo, infecção prévia por HPV, múltiplos parceiros sexuais, não uso de preservativo, relações sexuais com parceiros com cervicite, infectados ou com histórico de infecção por *Chlamydia trachomatis* ou outras DSTs (BAUTISTA *et al.*, 2016). A presença de vaginose bacteriana tem se mostrado como um fator de risco para a infecção por *C. trachomatis* (BAUTISTA *et al.*, 2016).

4.4.4 HPV

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é transmitido pelo contato direto ou indireto com o indivíduo que tem a lesão. Disfunções na barreira epitelial por traumatismos, pequenas agressões ou macerações provocam perda de solução de continuidade na pele, possibilitando a infecção viral. Após a inoculação, o período de incubação varia de três semanas a oito meses. Observa-se regressão espontânea na maioria dos casos (LETO *et al.*, 2011). A forma mais comum de transmissão é através de relações sexuais, durante a penetração, embora o contato genital na ausência da mesma também possa levar à contaminação (GAVILLON *et al.*, 2010; MOSCICKI *et al.*, 2012).

O HPV é um vírus não envelopado com aproximadamente 55nm de diâmetro. Seu genoma é composto por uma molécula de DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8000pb (HUMANS, 1995; BURD, 2003; ZUR HAUSEN, 2002).

As verrugas são as manifestações clínicas mais comuns e características da infecção pelo HPV. São tumores induzidos por vírus pleomórficos, que acometem diversas localizações, principalmente a pele de extremidades, pele genital e mucosas oral e laríngea (LETO *et al.*, 2011). Estudos têm mostrado elevadas taxas de detecção de HPV em alguns tipos de câncer como o vulvar (30 a 70%), o peniano (40-70%) e o anal (80-96%) (DE VUYST *et al.*, 2009; HEIDEMAN *et al.*, 2007). Além disso, um grande número de lesões da região cervical está associado à presença do HPV, desde anormalidades citológicas incipientes, displasias de diferentes graus, até o câncer cervical. Observa-se relação causal de HPV e câncer de colo do útero em cerca de 90% a 100% dos casos (MUÑOZ *et al.*, 2003). A infecção cervical por

alguns tipos de HPV é um fator precursor na gênese da neoplasia cervical, embora outros cofatores atuem para que ocorra o desenvolvimento da neoplasia (LETO et al., 2011).

O diagnóstico da infecção por HPV é realizado por meio da histopatologia das lesões ou da detecção do DNA viral nas células infectadas. Técnicas sorológicas apresentam precisão limitada e, além disso, o HPV não cresce em meio de cultura convencional (LETO et al., 2011). As técnicas de biologia molecular tornaram possível a pesquisa do DNA do HPV nas amostras cervicais, sendo a captura híbrida de segunda geração (HC2) e a reação em cadeia de polimerase (PCR), as técnicas mais utilizadas (POLJAK *et al.*, 2012; GIBSON, 2014). A HC2 possui alta sensibilidade e permite a detecção de 13 tipos diferentes de HPV (GIBSON, 2014). Essa técnica se baseia na hibridação de sondas complementares de RNA a sequências do DNA viral, sendo possível diferenciar a infecção por HPV de alto risco oncogênico de infecções por tipos virais de baixo risco, fornecendo uma medida semi-quantitativa da carga viral. Entretanto, há a possibilidade de reações cruzadas acontecerem, o que diminui a especificidade da HC2 (PEYTON *et al.*, 1998). A PCR é o método mais sensível e mais largamente utilizado para detecção viral e encontra sua principal aplicação em situações em que a quantidade de DNA disponível é reduzida (LETO et al., 2011). Esta técnica consiste na amplificação *in vitro* no DNA do HPV, utilizando-se conjuntos de iniciadores genéricos, que amplificam regiões altamente conservadas do gene L1 do HPV, permitindo a amplificação de basicamente todos os tipos virais (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995; KLETER *et al.*, 1998; GRAVITT *et al.*, 2000). Os pares de iniciadores genéricos mais utilizados são: a) MY09/11 e sua versão modificada PGMY09/11 (GRAVITT *et al.*, 2000) e b) GP5/GP6 e sua versão estendida GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995). Testes de genotipagem do HPV também são amplamente utilizados, por meio da técnica de hibridização reversa. Nesta técnica, primeiramente um fragmento do genoma do HPV é amplificado utilizando a PCR. Os fragmentos amplificados desse processo são então desnaturados e detectados utilizando sondas HPV específicas imobilizadas em tira, filtro ou poço de microtitulação (POLJAK *et al.*, 2012). Além dos métodos moleculares, o HPV pode ser detectado utilizando a imuno-histoquímica, através de anticorpos específicos para a proteína L1 do vírus. Esta metodologia

permite não só a detecção viral, como também a diferenciação do momento da infecção (RAUBER *et al.*, 2008).

Maiores taxas de prevalência da infecção pelo HPV foram observadas em mulheres com idade inferior a 25 anos, diminuindo com o aumento da faixa etária em algumas populações. No entanto, em alguns casos, verificou-se um pico secundário da infecção viral, antecedendo a menopausa e no início desta fase. Por outro lado, alguns estudos mostraram que a prevalência do HPV entre as mulheres independe da faixa etária (BOSCH *et al.*, 2013).

Os fatores de risco para a aquisição do HPV e desenvolvimento do câncer cervical são: idade da mulher, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, tabagismo, uso de anticoncepcionais hormonais e co-infecção com outras DSTs (OBIRI-YEBOAH *et al.*, 2017).

Tendo em vista o grande número de mulheres acometidas pela vaginose bacteriana no mundo e as principais consequências deste distúrbio, é necessária a realização de estudos que buscam os principais fatores de risco que levam à vaginose, para que medidas educativas possam ser tomadas a fim de reduzir o número de casos desta enfermidade.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em 03 de Fevereiro de 2017, conforme Anexo 1, sob protocolo número 1.907.198.

5.1 Análise epidemiológica

5.1.1 Delineamento e área de estudo

Foi realizado um estudo transversal na área sede do município de Ouro Preto, Minas Gerais, onde foram avaliados casos de vaginose em mulheres com idade ≥ 18 anos. O município de Ouro Preto tem uma população de 70.281 habitantes, sendo aproximadamente 20.000 mulheres com idade igual ou superior a 18 anos (IBGE, censo 2010). O município é dividido em 20 Estratégias Saúde da Família (ESFs), sendo 11 em distritos e áreas rurais e nove localizadas na sede do município. Para o presente estudo foram avaliadas três delas, todas localizadas na sede de Ouro Preto: ESF Bauxita (localizada no bairro Bauxita); ESF Andorinhas (localizada no bairro Morro Santana) e ESF Alvorada (localizada no bairro São Cristóvão). A escolha das ESFs que fizeram parte deste estudo foi baseada nas condições socioeconômicas das diferentes regiões da cidade, proporcionando um grupo amostral mais representativo da sede do município, o número de mulheres atendidas em cada unidade de saúde e a facilidade de deslocamento até estes locais. As ESFs localizadas em distritos não fizeram parte do estudo devido à distância e dificuldade de locomoção. Desta forma, este estudo foi composto por um grupo amostral de conveniência. O estudo foi realizado no período de fevereiro de 2017 a dezembro de 2017 e contou com a colaboração da Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto, que foi apresentada ao projeto através de reuniões com os enfermeiros e médicos responsáveis por cada ESF que fizeram parte deste trabalho.

Mulheres que foram às diferentes ESFs para a realização do exame preventivo do colo do útero foram convidadas a participar deste estudo. Antes da

realização da coleta das amostras para o preventivo, as mulheres foram convidadas individualmente a participar de uma entrevista onde foi exposto o objetivo do projeto. As mulheres que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) e preencheram um questionário (Anexo 3).

Antes da realização deste estudo, foi realizada uma validação do questionário e das coletas das amostras vaginais através de um estudo piloto realizado durante o mês de Fevereiro de 2017 na ESF Bauxita, onde foram selecionadas mulheres que foram realizar o exame preventivo do colo do útero nesta unidade de saúde. Para a elaboração do questionário deste estudo, foram utilizados como modelo os questionários dos estudos realizados por Mascarenhas e colaboradores, 2012 e Bradshaw e colaboradores, 2013.

5.1.2 Cálculo da amostra

O cálculo amostral foi realizado baseado em uma população de 6.200 mulheres com idade ≥ 18 anos nas três ESF avaliadas. Esta estimativa populacional foi obtida com dados da Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto. A prevalência de vaginose estimada utilizada no cálculo amostral foi de 20% (OLIVEIRA *et al.*, 2007), nível de confiança de 95% e precisão estimada de 4%. Através destes parâmetros foi estabelecido que o tamanho amostral seria de aproximadamente 362 mulheres. Os cálculos foram realizados utilizando o programa OpenEpi.

5.1.3 Critérios de inclusão e exclusão

Como requisitos para a participação do presente estudo, os seguintes critérios de inclusão foram definidos:

- Mulheres residentes em Ouro Preto-MG, usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS), que foram às ESFs para a realização do exame preventivo do colo do útero.

Foram estabelecidos os seguintes critérios de exclusão:

- Mulheres com idade inferior a 18 anos de idade.
- Mulheres que estavam em uso ou fizeram uso de antibióticos orais ou tópicos nas 4 semanas anteriores à coleta.
- Mulheres submetidas à histerectomia total.
- Mulheres que apresentassem resultado do Gram de secreção vaginal “indeterminado”.

O uso de antibiótico foi considerado um critério de exclusão devido à possibilidade de alteração da flora vaginal com o uso destes medicamentos, podendo ocasionar resultados falso-negativos para vaginose bacteriana.

5.1.4 População de estudo

Foram coletadas informações e amostras biológicas de 406 mulheres usuárias do SUS atendidas nas três ESFs participantes do estudo. Dessas, foram excluídas do estudo 65 mulheres, sendo 31 devido ao uso de antibiótico nas quatro semanas anteriores ao dia da coleta de amostras, uma por ser menor de 18 anos, uma por ter sido submetida à histerectomia total, e 32 por apresentarem resultado do Gram de secreção vaginal “indeterminado”, totalizando um número amostral de 341 mulheres.

5.1.5 Procedimento e obtenção das amostras

Após a assinatura do TCLE e preenchimento do questionário, as participantes foram encaminhadas para a sala de coleta, onde a enfermeira realizou a coleta das amostras para o exame preventivo do colo do útero e também de dois *swabs* vaginais. Este procedimento foi realizado conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Um dos *swabs* vaginais foi utilizado para a confecção de uma lâmina que foi corada pelo método de Gram. O outro *swab* vaginal foi

armazenado em um tubo (Eppendorf, Brasil) contendo 500 µL de solução NaCl 0,9% estéril para estudos moleculares.

5.2 Detecção de vaginose por bacterioscopia pós-coloração de Gram

As lâminas contendo material vaginal confeccionadas pelas enfermeiras foram encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da UFOP onde foram coradas pelo método de Gram (CLAUS,1992). Inicialmente, as lâminas foram fixadas em calor utilizando bico de Bunsen. Posteriormente, foi adicionado violeta de genciana por um minuto até cobrir o esfregaço completamente. Em seguida, foi aplicado lugol por um minuto. As lâminas foram então descoradas com álcool-acetona por cerca de 15 segundos e, por fim, foi adicionado fucsina básica por 30 segundos. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e deixadas secar ao ambiente. A leitura ocorreu em microscópio óptico utilizando aumento de 100X (BX41, Olympus).

A flora vaginal foi avaliada utilizando o escore de Nugent (NUGENT *et al*, 1991). Assim, cada morfotipo bacteriano foi classificado e quantificado. Os seguintes critérios foram utilizados para classificação: 1) bacilos grandes Gram positivos como *Lactobacillus* sp; 2) bacilos pequenos Gram variáveis como *Gardnerella vaginalis*; 3) pequenos bacilos Gram negativos como *Bacterioides spp*; 4) bacilos curvos Gram variáveis como *Mobiluncus spp* e 5) cocos Gram positivos também foram levados em consideração. Após a identificação de cada morfotipo bacteriano, estes foram quantificados em cada campo microscópico em uma escala de 0 a 4+, sendo 0: nenhum morfotipo encontrado; 1+: menos de 1 morfotipo; 2+: 1 a 4 morfotipos; 3+: 5 a 30 morfotipos e 4+: 30 ou mais morfotipos. Foi então realizado o somatório das pontuações, onde se classificou como vaginose bacteriana um escore igual ou maior que 7. Escores entre 4 e 6 foram considerados como intermediários e escores igual ou inferiores a 3 foram considerados normais. A presença de flora lactobacilar foi sempre pontuada com escore igual a zero, independentemente da quantidade observada, pois se trata da flora vaginal normal.

5.3 Detecção de vaginose e alterações cervicais pelo método citológico

As lâminas confeccionadas com as amostras cervicais foram mantidas em solução de álcool 70% (fixador) e posteriormente encaminhadas ao setor de Citologia Esfoliativa do Colo do Útero do Laboratório Piloto de Análises Clínicas/UFOP (Lapac), onde foram coradas pelo método de Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942) e analisadas por cinco citologistas.

A coloração de Papanicolaou foi realizada conforme descrito por Copetti, 2004: 1) 10 imersões em solução de álcool etílico absoluto; 2) 10 imersões em solução de álcool etílico (95%); 3) 10 imersões em solução de álcool etílico (70%); 4) 10 imersões em água deionizada; 5) um minuto em Hematoxilina de Harris; 6) 20-30 imersões em água deionizada; 7) cinco imersões em água amoniacal; 8) lavar a lâmina em água corrente até que a mesma não desprenda mais resíduos de corante; 9) 10 imersões em solução de álcool etílico (70%); 10) 10 imersões em solução de álcool etílico (95%); 11) 10 imersões em solução de álcool etílico absoluto; 12) 40 imersões no corante Orange G; 13) 10 imersões em solução de álcool etílico absoluto; 14) 10 imersões em solução de álcool etílico absoluto; 15) dois minutos no corante hematoxilina-eosina 36; 16) 10 imersões em solução de álcool etílico absoluto; 17) 10 imersões em solução de álcool etílico absoluto; 18) 10 imersões em solução de xilol fenicado; 19) 10 imersões em solução de xilol; 20) um minuto na solução de xilol.

Os laudos do exame citológico foram analisados quanto a presença de alterações cervicais e a detecção de vaginose. Para as alterações cervicais, foram considerados positivos: ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas), ASC-H (células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau), LSIL (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) e AGC-SOE (células glandulares atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas). A presença de vaginose foi considerada positiva quando foi detectada a presença de Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella / Mobiluncus*) (INCA, 2006).

5.4 PCR para detecção de *Trichomonas vaginalis* (TV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT) e Papiloma Vírus Humano (HPV)

Os tubos (Eppendorf, Brasil) contendo os *swabs* vaginais foram encaminhados ao Laboratório de Pesquisas Cínicas (LPC) da UFOP logo após a coleta e foram armazenados em freezer a -20°C.

A extração do DNA foi realizada em 80 amostras, sendo 40 de mulheres que apresentavam a flora bacteriana normal e 40 que apresentavam vaginose bacteriana, de acordo com as análises das lâminas coradas pelo método de Gram. A seleção foi composta pelas mulheres positivas para os patógenos não comensais detectados pelo Gram e/ou citológico somadas aos casos negativos selecionados aleatoriamente até compor dois grupos (com e sem vaginose). Essas amostras foram selecionadas a fim de se avaliar a detecção de CT, NG, TV e HPV pela PCR. Primeiramente, os tubos contendo o *swab* vaginal foram descongelados em temperatura ambiente. A extração de DNA foi feita utilizando o Kit de extração Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações descritas pelo fabricante.

5.4.1 Amplificação do gene β globina

A amplificação do gene constitutivo β globina foi realizada para a checagem da qualidade da extração de DNA. A PCR foi realizada em termociclador (Techne, Inglaterra) utilizando os iniciadores PCO₃ (ACACAAACTGTGTTCACTAGC) e PCO₄ (CAACTTCATCCACGTTCCACC). A reação teve o produto final de 12 μ L, contendo 0,84 μ M de cada iniciador (Invitrogen, Brasil), 6,25 μ L de 2x *Taq* PCR MasterMix (Tiangen, Beijing Shi, China), 1,75 μ L de água e 2 μ L de DNA genômico. O ciclo de amplificação iniciou-se com quatro minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30s; 51,5°C por 30s; 72°C por 30seg e um ciclo final de 72°C por 7 minutos. Utilizou-se água como controle negativo da reação. O produto amplificado de 123pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%.

5.4.2 PCR para detecção da *Trichomonas vaginalis* (TV)

A amplificação do fragmento de 84pb foi realizada em termociclador (Techne, Inglaterra) utilizando os iniciadores 5'-AAGATGGGTGTTTTAAGCTAGATAAGGT-3' e 5'-CGTCTTCAAGTATGCCCCAGTAC-3' descritos por (TAYOUN *et al.*, 2015). A reação teve o produto final de 12µL, contendo 0,84µM de cada iniciador (Invitrogen, Brasil), 6,25µL de 2x *Taq* PCR MasterMix (Tiangen, Beijing Shi, China), 1,75µL de água e 2µL de DNA genômico. O ciclo de amplificação iniciou-se com 10 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30s; 60°C por 30s; 72°C por 30seg e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Amostra de DNA de TV obtida em urina foi usada como controle positivo. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%.

5.4.3 PCR para detecção de *Neisseria gonorrhoeae* (NG)

A amplificação do fragmento de 102pb foi realizada em termociclador (Techne, Inglaterra) utilizando os iniciadores 5'-CCGGAAGTGGTTTCATCTGATT-3' e 5'-GTTTCAGCGGCAGCATTCA-3' descritos por (TAYOUN *et al.*, 2015). A reação teve o produto final de 12µL, contendo 0,84 µM de cada iniciador (Invitrogen, Brasil), 6,25µL de 2x *Taq* PCR MasterMix (Tiangen, Beijing Shi, China), 1,75µL de água e 2µL de DNA genômico. O ciclo de amplificação iniciou-se com 10 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30s; 65°C por 30s; 72°C por 30seg e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Utilizou-se água como controle negativo e amostra de DNA de NG obtida em urina como controle positivo. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%.

5.4.4 PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* (CT)

A amplificação do fragmento de 150pb foi realizada em termociclador (Techne, Inglaterra) utilizando os iniciadores 5'-TCTGAGCACCCCTAGGCGTTT-3' e

5'-CGTAACTCGCTCCGGAAAAA-3' descritos por (TAYOUN *et al.*, 2015). A reação teve o produto final de 12 μ L, contendo 0,84 μ M de cada iniciador (Invitrogen, Brasil), 6,25 μ L de 2x *Taq* PCR MasterMix (Tiangen, Beijing Shi, China), 1,75 μ L de água e 2 μ L de DNA genômico. O ciclo de amplificação iniciou-se com 10 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30s; 57°C por 30s; 72°C por 30seg e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Amostras de DNA de CT obtidas em cultivo de células infectadas com a bactéria foram utilizadas como controle positivo. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%.

5.4.5 PCR para detecção do Papiloma Vírus Humano (HPV)

A amplificação do fragmento de 160pb foi realizada em termociclador (Techne, Inglaterra) utilizando os iniciadores GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC -3') e GP6+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') descritos por (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995). A reação teve o produto final de 52 μ L, contendo 0,19 μ M de cada iniciador (IGT, Brasil), 45 μ L de 1,5x *Taq* PCR MasterMix (Ludwig, Brasil) e 5 μ L de DNA genômico. O ciclo de amplificação iniciou-se com 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 40 ciclos de 94°C por 1min; 45°C por 1min; 72°C por 45seg e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Amostras de DNA de HPV obtidas em amostras de mulheres sabidamente positivas foram utilizadas como controle positivo. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%.

5.4.6 Eletroforese em gel de agarose a 2%

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. A eletroforese foi realizada em 100 Volts com duração aproximada de uma hora. Os fragmentos foram visualizados em transluminador.

5.5 Avaliação estatística e epidemiológica

As informações coletadas foram codificadas e duplamente digitadas utilizando o programa EpiData (versão 3.2). Os arquivos foram posteriormente comparados e as divergências de digitação corrigidas. Para a análise dos dados foi utilizado o pacote estatístico STATA versão 10.0.

Para a determinação da classe social da população estudada foi realizado um escore socioeconômico de cada participante deste estudo de acordo com o Critério Brasil de Classificação Econômica 2015 (ABEP, 2016). Para isso, foram realizadas perguntas relacionadas à quantidade de itens domésticos (geladeira, freezer, máquina de lavar roupa, entre outros), bem como a escolaridade da participante e a presença de serviços públicos (água encanada e rua asfaltada) no local onde reside a família. Para cada pergunta respondida foi gerada uma pontuação. Ao final, estes pontos foram somados e a classe social determinada.

Para os cálculos de prevalência de vaginose na população estudada foram utilizados os resultados obtidos pelos métodos de Gram e exame citopatológico do colo do útero. Foi avaliada a concordância entre estes métodos através do *kappa*. A interpretação do resultado foi de acordo com a seguinte escala: 1,00-0,81 excelente; 0,80-0,61 bom; 0,61-0,40 moderado; 0,40-0,21 fraco; 0,20-0,0 ausência de concordância (SZKLO, NIETO, 2000).

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos dados coletados por meio do questionário utilizando medidas resumo (média, mediana, frequência relativa). As questões não respondidas em cada questionário foram transformadas em dados “*missing*”.

Para a busca dos fatores de risco associados à vaginose foi realizado previamente uma análise univariada, utilizando o modelo estatístico de Poisson com variação robusta. A variável resposta avaliada foi a presença de vaginose pelo Gram e foram testadas todas as variáveis do questionário. Foram selecionadas para a análise multivariada, as variáveis que apresentaram um valor de $p < 0,25$.

Na análise multivariada partiu-se de um modelo completo, com todas as variáveis selecionadas na univariada, e foi realizado o descarte sucessivo (passo a

passo) das variáveis não significativas. Nesta etapa, utilizou-se o nível de significância de 0,05, isto é, as variáveis que apresentaram $p > 0,05$ foram retiradas do modelo passo a passo. O modelo final foi constituído apenas por variáveis com nível de significância $< 0,05$.

Foi realizado o teste de correlação de *Spearman* para avaliar a presença correlação entre vaginose pelo Gram e a presença de alterações citológicas, além disso, entre a vaginose e a presença de outros patógenos (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e HPV).

Os resultados das análises moleculares para CT, NG, TV e HPV foram apresentados de forma descritiva onde foi calculada a frequência de cada patógeno em mulheres com e sem vaginose, onde procurou-se associar a presença destes microrganismos com a presença de vaginose.

6. RESULTADOS

6.1 Análise epidemiológica

6.1.1 Características da população avaliada

O estudo foi composto por 341 mulheres sendo a média de idade desta população de 40,1 anos, com idade mínima de 18 e máxima de 83 anos (dados não mostrados). A maior parte da população (50,1%) apresentou idade superior a 40 anos. A maioria das mulheres (53,4%) era casada ou vivia com parceiro, 48,7% declarou possuir ensino médio completo ou incompleto, 39,4% se declaravam pardas ou de origem asiático-indígena e a maior parte (34,2%) eram pertencentes à classe social C2 (**Tabela 1**).

Tabela 1: Perfil socioeconômico da população de estudo, Ouro Preto-MG, 2017

Variável	N	%
Idade (anos)		
18 a 30	95	27,9
>30 e ≤ 40	75	22,0
>40 e ≤ 50	82	24,0
>50	89	26,1
ESF		
Bauxita	44	12,9
Alvorada	118	34,6
Andorinhas	179	52,5
Nível educacional		
Analfabeto/Fundamental	118	34,6
Médio	166	48,7
Superior	57	16,7
Estado civil		
Casada/vive com parceiro	182	53,4
Viúva/ Separada/divorciada	42	12,3
Solteira	117	34,3
Origem étnica*		
Branco	83	25,8
Afro-descendente	112	34,8
Asiático-indígena + Parda	127	39,4
Classe social**/**		
A; B1 e B2	72	21,6
C1	76	22,8
C2	114	34,2
D e E	71	21,4

* excluindo "Não Respondeu"

** de acordo com Critério Brasil de Classificação Econômica 2015

A **Tabela 2** mostra os hábitos de vida mais comuns entre as mulheres entrevistadas. A maioria não fuma (83,0%) ou nunca fumou (74,3%) e não fazem uso de drogas ilícitas (98,5%). A maioria das mulheres relatou que faz uso de bebida alcoólica (55,6%), não faz uso de anticoncepcional oral (51,6%), não faz uso de anticoncepcional injetável (67,6%), não faz uso de DIU (72,7%) e não utilizam camisinha durante as relações sexuais (72,6%).

Tabela 2: Hábitos de vida da população de estudo, Ouro Preto-MG, 2017

Variável	N	%
Fumantes*		
Não	279	83,0
Sim	57	17,0
Ex fumantes*		
Não	208	74,3
Sim	72	25,7
Uso de bebida alcoólica*		
Não	149	44,4
Sim	187	55,6
Consumo de bebida alcoólica*		
Não bebe	149	44,7
< 1 vez por semana	78	23,4
1 vez por semana	59	17,7
2 vezes por semana ou mais	47	14,2
Uso de drogas ilícitas*		
Não	330	98,5
Sim	5	1,5
Fazem uso de anticoncepcional oral		
Não	176	51,6
Não se aplica**	90	26,4
Sim	75	22,0
Fazem uso de anticoncepcional injetável*		
Não	230	67,6
Não se aplica**	90	26,5
Sim	20	5,9
Usam DIU		
Não	248	72,7
Não se aplica**	90	26,4
Sim	3	0,9
Usam preservativo*		
Não	212	72,6
Sim	80	27,4

* excluindo "Não Respondeu"

** Não se aplica: refere-se a mulheres na menopausa

Como mostrado na **Tabela 3**, a maioria das mulheres entrevistadas não estavam grávidas (96,8%) no dia da entrevista, nunca tiveram aborto (79,2%) ou DSTs (92,0%) e já tiveram vaginose (50,8%). A maior parte delas não estava na menopausa (73,3%), já tiveram pelo menos uma gestação na vida (72,9%) e possuíam ciclo menstrual regular (67,4%). A média de idade da primeira menstruação foi de 12,8 anos (DP: 3,5) e a média de idade da primeira relação sexual foi de 18,3 anos (DP: 1,8) (dados não mostrados). Além disso, a maior parte das mulheres relatou que possuía vida sexual ativa (77,6%), possuía parceiro sexual fixo (96,0%) e nunca tiveram relação sexual com mulheres (97,9%).

Tabela 3: Comportamento sexual da população de estudo, Ouro Preto-MG, 2017

Variável	N	%
Grávidas*		
Não	328	96,8
Sim	11	3,2
Já tiveram aborto		
Não	270	79,2
Sim	71	20,8
Já tiveram DST*		
Não	310	92,0
Sim	27	8,0
Já tiveram vaginose*		
Não	163	49,2
Sim	168	50,8
Estão na menopausa*		
Não	247	73,3
Sim	90	26,7
Já tiveram alguma gestação*		
Não	92	27,1
Sim	247	72,9
Idade da 1ª menstruação*		
≤ 13 anos	221	67,8
> 13 anos	105	32,2
Ciclo menstrual regular*		
Não	78	32,6
Sim	161	67,4
Idade da 1ª relação sexual*		
≤18 anos	202	62,0
>18 anos	124	38,0
Possuem vida sexual ativa*		
Não	76	22,4
Sim	264	77,6
Possuem mais que um parceiro (a) sexual*		
Não	316	96,0
Sim	13	4,0
Tem ou tiveram relação sexual com mulheres		
Não	334	97,9
Sim	7	2,1

* excluindo "Não Respondeu"

6.1.2 Prevalência e recorrência de vaginose utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram

Os resultados do estudo mostraram prevalência de vaginose de 32,5% dentro da população estudada, utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram associada ao escore de Nugent (padrão-ouro). A análise de prevalência separada por região apresentou resultados semelhantes, sendo a região contemplada pela ESF Alvorada com a maior prevalência de vaginose (33,9%), seguida pela ESF Andorinhas (32,4%) e ESFs Bauxita (29,5%), conforme apresentado na **Tabela 4**. A taxa de recorrência de vaginose na população estudada foi de 50,8% de acordo com o questionário.

Tabela 4: Prevalência de vaginose por região de Ouro Preto-MG utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram

ESF	Prevalência (%)	Intervalo de confiança (IC 95%)
Bauxita	29,5	17,5 – 44,2
Andorinhas	32,4	25,8 – 39,5
Alvorada	33,9	25,8 – 42,8
Total	32,5	27,7 – 37,7

6.1.3 Prevalência de vaginose utilizando método citológico

Utilizando o método citológico (coloração de Papanicolaou), a prevalência de vaginose foi de 27,7% na população estudada. A análise de prevalência separada por região apresentou resultados semelhantes, sendo a população cuidada pela ESF Alvorada com a maior prevalência de vaginose (29,4%) seguida pela ESF Andorinhas (27,0%) e ESF Bauxita (26,2%), conforme apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5: Prevalência de vaginose por região de Ouro Preto-MG utilizando método citológico

ESF	Prevalência (%)	Intervalo de confiança (IC 95%)
Bauxita	26,2	14,6 – 41,0
Andorinhas	27,0	20,6 – 34,2
Alvorada	29,4	21,4 – 38,4
Total	27,7	23,0 – 32,8

Foi observada uma boa concordância entre os métodos bacterioscopia pós-coloração de Gram e citológico para a detecção de vaginose, sendo encontrada uma concordância de 90,1% entre os métodos e $kappa=0,77$.

6.1.4 Fatores de risco associados à vaginose

Para a identificação dos fatores de risco associados à vaginose foram comparadas mulheres com vaginose e sem vaginose, de acordo com o método bacterioscopia pós-coloração de Gram. A análise univariada empregando o modelo de Poisson está descrita nas **Tabelas 6, 7 e 8**. As variáveis com nível de significância $<0,25$ foram selecionadas para o modelo multivariado.

Tabela 6: Análise univariada correlacionando a presença de vaginose e o perfil socioeconômico da população estudada

Variável	Vaginose		RP*** (IC95%)	p
	Positivo n(%)	Negativo n(%)		
Idade (anos)				
18 a 30	30 (27,0)	65 (28,3)		
>30 e ≤ 40	26 (23,4)	49 (21,3)	1,1 (0,7-1,6)	0,671
>40 e ≤ 50	27 (24,3)	55 (23,9)	1,0 (0,7-1,6)	0,848
>50	28 (25,2)	61 (26,5)	1,0 (0,6-1,5)	0,986
Nível educacional				
Superior	17 (15,3)	40 (17,4)		
Médio	44 (39,6)	122 (53,0)	0,9 (0,5-1,4)	0,625
Analfabeto/Fundamental	50 (45,1)	68 (29,6)	1,4 (0,9-2,2)	0,127
Estado civil				
Casada/vive com parceiro	52 (46,9)	130 (56,5)		
Viúva/ Separada/divorciada	19 (17,1)	23 (10,0)	1,6 (1,0-2,4)	0,026
Solteira	40 (36,0)	77 (33,5)	1,2 (0,8-1,7)	0,302
Origem étnica*				
Branco	24 (23,1)	59 (27,1)		
Afro-descendente	38 (36,5)	74 (33,9)	1,2 (0,8-1,8)	0,462
Asiático-indígena + Parda	42 (40,4)	85 (39,0)	1,1 (0,7-1,7)	0,530
Classe social*/**				
A; B1 e B2	21 (19,4)	51 (22,7)		
C1	19 (17,6)	57 (25,3)	0,8 (0,5-1,4)	0,569
C2	41 (38,0)	73 (32,4)	1,2 (0,8-1,9)	0,346
D e E	27 (25,0)	44 (19,6)	1,3 (0,8-2,1)	0,266

* excluindo "Não Respondeu"

** de acordo com Critério Brasil de Classificação Econômica 2015

*** RP: razão de prevalência

Tabela 7: Análise univariada correlacionando a presença de vaginose e os hábitos de vida da população estudada

Variável	Vaginose		RP*** (IC95%)	p
	Positivo n(%)	Negativo n(%)		
Fumantes*				
Não	85 (78,0)	194 (85,5)		
Sim	24 (22,0)	33 (14,5)	1,4 (1,0-2,0)	0,072
Ex fumantes*				
Não	65 (76,5)	143 (73,3)		
Sim	20 (23,5)	52 (26,7)	0,9 (0,6-1,3)	0,586
Uso de bebida alcoólica*				
Não	47 (43,1)	102 (44,9)		
Sim	62 (56,9)	125 (55,1)	1,0 (0,8-1,4)	0,755
Consumo de bebida alcoólica*				
Não bebe	47 (43,0)	102 (45,6)		
< 1 vez por semana	26 (23,9)	52 (23,2)	1,0 (0,7-1,6)	0,783
1 vez por semana	15 (13,8)	44 (19,6)	0,8 (0,5-1,3)	0,396
2 vezes por semana ou mais	21 (19,3)	26 (11,6)	1,4 (0,9-2,1)	0,086
Uso de drogas ilícitas*				
Não	107 (98,2)	223 (98,7)		
Sim	2 (1,8)	3 (1,3)	1,2 (0,4-3,6)	0,705
Fazem uso de anticoncepcional oral				
Não	62 (55,9)	114 (49,6)		
Não se aplica**	26 (23,4)	64 (27,8)	0,8 (0,6-1,2)	0,308
Sim	23 (20,7)	52 (22,6)	0,9 (0,6-1,3)	0,492
Fazem uso de anticoncepcional injetável*				
Não	75 (68,2)	155 (67,4)		
Não se aplica**	26 (23,6)	64 (23,8)	0,9 (0,6-1,3)	0,526
Sim	9 (8,2)	11 (4,8)	1,4 (0,8-2,3)	0,224
Usam DIU				
Não	83 (74,8)	165 (71,7)		
Não se aplica**	26 (23,4)	64 (27,8)	0,9 (0,6-1,2)	0,435
Sim	2 (1,8)	1 (0,5)	2,0 (0,9-4,5)	0,100
Usam preservativo*				
Não	76 (78,4)	136 (69,7)		
Sim	21 (21,6)	59 (30,3)	0,7 (0,5-1,1)	0,136

* excluindo "Não Respondeu"

** Não se aplica: refere-se a mulheres na menopausa

*** RP: razão de prevalência

Tabela 8: Análise univariada correlacionando a presença de vaginose e o comportamento sexual da população estudada

Variável	Vaginose		RP** (IC95%)	p
	Positivo n(%)	Negativo n(%)		
Grávidas*				
Não	107 (96,4)	221 (96,9)		
Sim	4 (3,6)	7 (3,1)	1,1 (0,5-2,5)	0,790
Já tiveram aborto				
Não	90 (81,1)	180 (78,3)		
Sim	21 (18,9)	50 (21,7)	0,9 (0,6-1,3)	0,555
Já tiveram DST*				
Não	98 (89,9)	212 (93,0)		
Sim	11 (10,1)	16 (7,0)	1,28 (0,8-2,0)	0,305
Já tiveram vaginose*				
Não	43 (40,6)	120 (53,3)		
Sim	63 (59,4)	105 (46,7)	1,4 (1,0-1,9)	0,033
Estão na menopausa*				
Não	84 (76,4)	163 (71,8)		
Sim	26 (23,6)	64 (28,2)	0,8 (0,5-1,3)	0,376
Já tiveram alguma gestação*				
Não	30 (27,3)	62 (27,1)		
Sim	80 (72,7)	167 (72,9)	1,0 (0,7-1,4)	0,969
Idade da 1ª menstruação*				
≤ 13 anos	32 (29,9)	73 (33,3)		
> 13 anos	75 (70,1)	146 (66,7)	1,1 (0,8-1,6)	0,539
Ciclo menstrual regular*				
Não	25 (30,1)	53 (34,0)		
Sim	58 (69,9)	103 (66,0)	1,2 (0,7-2,1)	0,545
Idade da 1ª relação sexual*				
≤18 anos	37 (34,6)	87 (39,7)		
>18 anos	70 (65,4)	132 (60,3)	1,2 (0,8-1,6)	0,375
Possuem vida sexual ativa*				
Não	27 (24,6)	49 (21,3)		
Sim	83 (75,4)	181 (78,7)	0,9 (0,6-1,2)	0,496
Possuem mais que um parceiro (a) sexual*				
Não	103 (95,4)	213 (96,4)		
Sim	5 (4,6)	8 (3,6)	1,2 (0,6-2,4)	0,646
Tem ou tiveram relação sexual com mulheres				
Não	108 (97,3)	226 (98,3)		
Sim	3 (2,7)	4 (1,7)	1,3 (0,5-3,1)	0,526

* excluindo "Não Respondeu" / ** RP: razão de prevalência

Após a realização do modelo multivariado de *Poisson*, foi observado que mulheres que fumavam, usavam DIU e que possuíam histórico de vaginose apresentavam aumento do risco de desenvolvimento de vaginose em 1,5; 3,0 e 1,5 vezes respectivamente, conforme mostrado na **Tabela 9**.

Tabela 9: Fatores de risco para o desenvolvimento de vaginose bacteriana

Variável	RP Bruto (95% CI)	RP Ajustado (95% CI)
Tabagismo		
Não <i>versus</i> Sim	1,4 (1,0–2,0)	1,5 (1,1–2,1)
Uso de DIU		
Não <i>versus</i> Sim	2,0 (0,9–4,5)	2,8 (1,2–6,5)
Histórico de vaginose		
Não <i>versus</i> Sim	1,4 (1,0–1,9)	1,5 (1,1–2,1)

Legenda: RP: razão de prevalência

6.1.5 Associação entre vaginose bacteriana e alterações citológicas

Foi observado que 7,2% (n=24) da população avaliada apresentou algum tipo de alteração no exame citopatológico. A frequência destas alterações em relação à população total avaliada foi de 3,6% (n=12) com ASC-US, 0,6% (n=2) com ASC-H, 2,1% (n=7) com LSIL e 0,9% (n= 3) apresentando células glandulares atípicas (AGC-SOE). Entretanto, não foi observada correlação entre a presença de vaginose pelos métodos de Gram e citológico e alterações citológicas.

6.2 Detecção de patógenos não comensais

6.2.1 Detecção de *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram

Utilizando a bacterioscopia pós-coloração de Gram, casos de infecção por *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis* não foram detectados nas amostras avaliadas. No entanto, foi detectada a presença de *Neisseria gonorrhoeae* em uma mulher que não apresentava vaginose, conforme mostrado na **Tabela 10** e **Figura 1**.

Tabela 10: Detecção de *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* utilizando bacterioscopia pós-coloração de Gram

Agente patológico	CASOS/TOTAL	%
<i>Trichomonas vaginalis</i>		
com vaginose	0/111	0,0
sem vaginose	0/230	0,0
Total	0/341	0,0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
com vaginose	0/111	0,0
sem vaginose	1/230	0,4
Total	1/341	0,3
<i>Chlamydia trachomatis</i>		
com vaginose	0/111	0,0
sem vaginose	0/230	0,0
Total	0/341	0,0

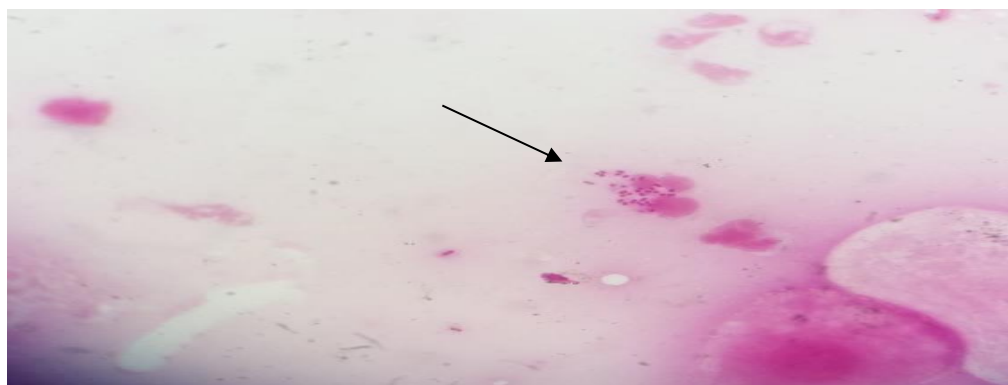


Figura 1: Foto da bacterioscopia pós-coloração de Gram de uma mulher infectada por diplococos Gram negativos sugestivos de *Neisseria gonorrhoea*.

6.2.2 Detecção de *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* utilizando o método citológico

Utilizando o método citológico, não foram detectados casos de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* nas amostras avaliadas. No entanto, a presença de

Trichomonas vaginalis foi detectada em 20 casos, sendo 19 em mulheres com vaginose e um caso em mulher sem vaginose. Além disso, *Chlamydia trachomatis* foi detectado em somente um caso, sendo em uma mulher que não apresentava vaginose, conforme mostrado na **Tabela 11**.

Tabela 11: Detecção de *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* utilizando método citológico

Agente patológico	CASOS/TOTAL	%
<i>Trichomonas vaginalis</i>		
com vaginose	19/111	17,1
sem vaginose	1/230	0,4
Total	20/341	5,9
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
com vaginose	0/111	0,0
sem vaginose	0/230	0,0
Total	0/341	0,0
<i>Chlamydia trachomatis</i>		
com vaginose	0/111	0,0
sem vaginose	1/230	0,4
Total	1/341	0,3

6.2.3 Detecção de *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e HPV em uma sub-amostra utilizando PCR

A técnica de PCR foi realizada em uma sub-amostra (n=80) das pacientes avaliadas pelos outros dois métodos. Nesse caso, a casuística foi composta pelas mulheres positivas pela técnica de Gram e/ou citológico para os patógenos *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) somadas aos casos negativos selecionados aleatoriamente até compor dois grupos (com e sem vaginose) de 40 pacientes cada. Além de CT, NG e TV foi realizada a pesquisa do Papiloma Vírus Humano (HPV) nestas amostras.

A presença dos 4 patógenos foi detectada utilizando o método PCR. A infecção por TV esteve mais presente em mulheres que apresentavam vaginose (25,0%), assim como o HPV (30,0%). Foram detectados somente dois casos de

infecção por NG, sendo ambos em mulheres que não apresentavam vaginose. O patógeno mais encontrado utilizando a PCR foi CT (25,0%), sendo nove dos casos (22,5%) em mulheres que apresentavam vaginose e 11 casos em mulheres sem vaginose (27,5%), conforme mostrado na **Tabela 12** e **Figura 2**. Foi observada correlação entre a presença de vaginose e a detecção de *Trichomonas vaginalis* através do teste de correlação de *Spearman* ($r=0,24$; $p=0,03$). Para os outros patógenos pesquisados, essa correlação não foi observada.

Tabela 12: Detecção de *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e HPV utilizando PCR

Agente patológico	CASOS/TOTAL	%
<i>Trichomonas vaginalis</i>		
com vaginose	10/40	25,0
sem vaginose	3/40	7,5
Total	13/80	16,3
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
com vaginose	0/40	0,0
sem vaginose	2/40	5,0
Total	2/80	2,5
<i>Chlamydia trachomatis</i>		
com vaginose	9/40	22,5
sem vaginose	11/40	27,5
Total	20/80	25,0
HPV		
com vaginose	12/40	30,0
sem vaginose	5/40	12,5
Total	17/80	21,3

Utilizando a PCR, foram detectados 15% (12/80) de casos de co-infecção entre os patógenos pesquisados. Dentre estes, a co-infecção entre CT e HPV foi a mais frequente [41,7% (5/12)] seguida por CT e TV [25,0% (3/12)], TV e HPV [16,7% (2/12)], NG e CT [8,3% (1/12)] e CT, HPV e TV [8,3% (1/12)]. Dos casos que apresentaram co-infecção, metade era de mulheres com vaginose.

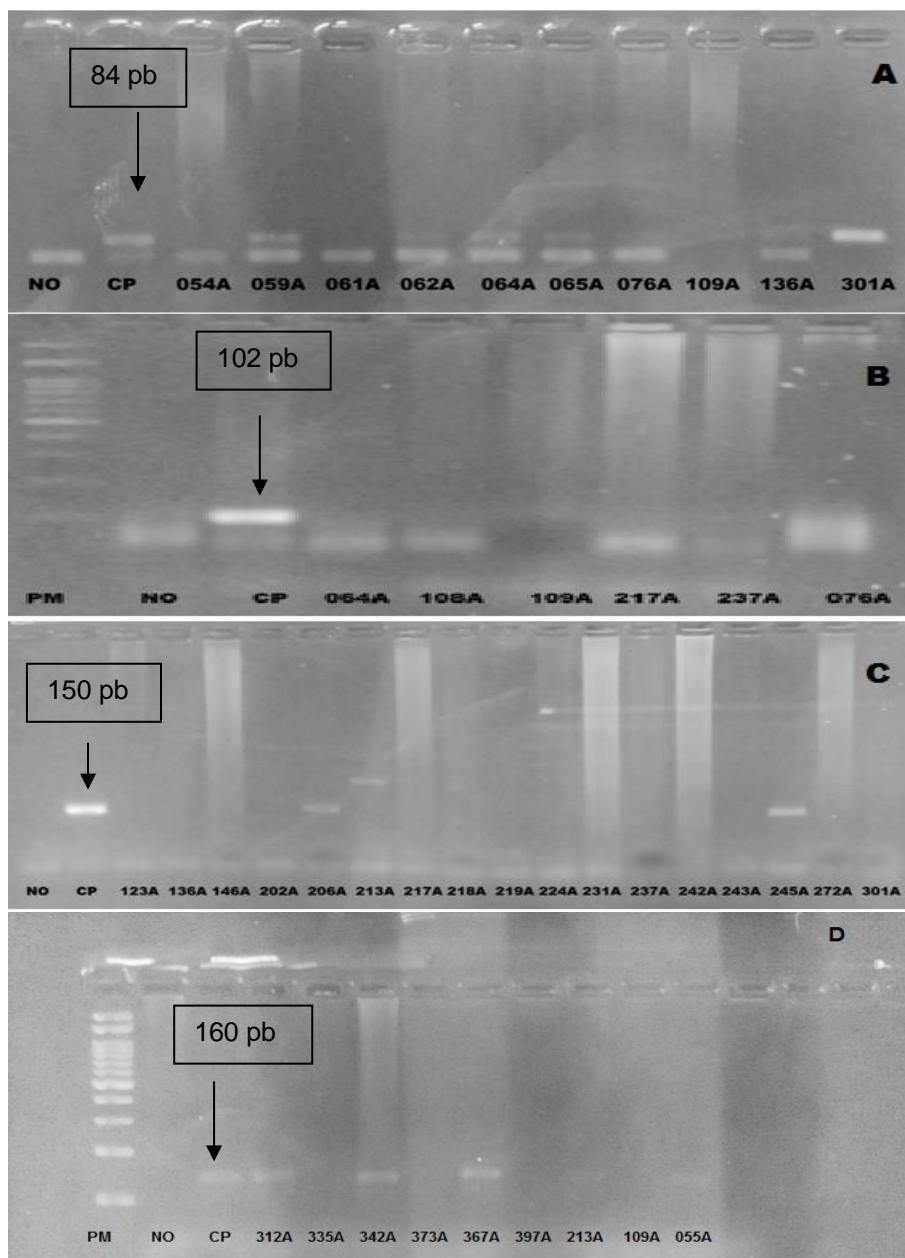


Figura 2: Gel de agarose (2%) para **(A)** *Trichomonas vaginalis*. Legenda: NO (controle negativo); CP (controle positivo); amostras positivas: (059A, 062A, 064A, 065A, 136A, 301A), amostras negativas (054A, 061A, 076A, 109A). **(B)** *Neisseria gonorrhoeae*. Legenda: PM (peso molecular) NO (controle negativo); CP (controle positivo); amostra positiva: (076A), amostras negativas (064A, 108A, 109A, 217A, 237A). **(C)** *Chlamydia trachomatis*. Legenda: NO (controle negativo); CP (controle positivo); amostras positivas: (206A, 245A), amostras negativas (123A, 136A, 146A, 202A, 213A, 217A, 218A, 219A, 224A, 231A, 237A, 242A, 243A, 272A, 301A). **(D)** HPV. Legenda: NO (controle negativo); CP (controle positivo); amostras positivas: (312A, 342A, 367A, 213A, 055A); amostras negativas (335A, 373A, 397A, 109A)

7. DISCUSSÃO

A vaginose bacteriana (VB) é a principal causa de corrimento vaginal, afetando cerca de 30% das mulheres em todo o mundo e, se não tratada, pode levar a sérias complicações (BAGNALL *et al.*, 2017). Além disso, grande parte das mulheres apresentam episódios recorrentes da doença, mesmo com a realização do tratamento de forma adequada. Sendo assim, faz-se necessária a realização de estudos nesta área, visto que os hábitos de vida estão diretamente relacionados com o surgimento dessa enfermidade.

As taxas de prevalência de vaginose variam de acordo com a população estudada e o método utilizado para o diagnóstico. No presente estudo realizado em uma população de mulheres com idade ≥ 18 anos, a prevalência de vaginose utilizando a bacterioscopia pós-coloração de Gram foi 32,5%. Em estudos realizados na Lituânia e na Etiópia com mulheres na mesma faixa etária e utilizando o mesmo método diagnóstico, as prevalências de 24,4 e 48,6% foram respectivamente encontradas (JANULAITIENE *et al.*, 2017; BITEW *et al.*, 2017). A desigualdade na composição da flora vaginal tem sido apontada como um fator importante para a diferença de prevalência entre as populações. A maior prevalência de vaginose em mulheres africanas, por exemplo, pode ser explicada pela baixa ocorrência de espécies de *Lactobacillus* produtoras de peróxido de hidrogênio, que são menos frequentes em mulheres de raça negra e que possuem atividade de defesa contra patógenos (LINHARES *et al.*, 2010). A população brasileira é bastante miscigenada, apresentando taxa de prevalência semelhante à países como Canadá (33,0%) e Estados Unidos da América (30,1%) (BAUTISTA *et al.*, 2016; MARCONI *et al.*, 2015).

O exame citológico pós-coloração de Papanicolaou foi o outro método empregado para a avaliação de vaginose. Nesse caso, a prevalência foi de 27,7%. Utilizando uma população semelhante no Brasil, Peres e colaboradores (2015) encontraram prevalência similar (28,1%) ao presente estudo. Embora tenha sido observada diferença na taxa de prevalência entre os métodos citológico e Gram, boa concordância entre eles foi encontrada ($kappa=0,77$). Esse resultado mostra que

tanto o método de Gram quanto o citológico podem ser utilizados para o diagnóstico de vaginose, como já descrito por Martins e colaboradores (2007).

O método de Gram associado ao critério de Nugent é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de vaginose (ANUKAM *et al.*, 2014). Uma limitação está no sistema de pontuação que pode gerar confusão na presença de uma flora vaginal mais complexa, classificando-a em somente uma categoria (VERHELST *et al.*, 2005). Por outro lado, o método citológico possui papel importante no reconhecimento das alterações inflamatórias e infecciosas do trato genital feminino, designadas como alterações celulares reativas (MARTINS *et al.*, 2007). Em casos positivos para VB, bacilos supracitoplasmáticos sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncos* e *clue-cells* são detectados (INCA, 2006). Entretanto, alguns autores (MARTINS *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 1997) mostraram que esse método possui 50% de sensibilidade e 95% de especificidade, em média, quando comparado com o padrão-ouro. Essa baixa sensibilidade pode explicar a menor taxa de prevalência (27,7%) encontrada por este método no presente estudo quando comparada ao método de Gram (32,5%).

Para elucidar o motivo de uma elevada prevalência de vaginose, os fatores de risco correlacionados a esta doença foram investigados. Nesse estudo, tabagismo, uso de DIU e histórico prévio de vaginose foram associados. O hábito de fumar também mostrou estar relacionado com o surgimento de vaginose no estudo realizado por Brotman e colaboradores (2014), já que a redução da flora lactobacilar protetora em mulheres fumantes estava diminuída quando comparada a de não fumantes. Ademais, alguns autores mostraram que o cigarro possui efeito anti-estrogênico, além de permitir o acúmulo de aminas no epitélio vaginal, predispondo a mulher a desenvolver vaginose (HELLBERG *et al.*, 1988; WESTHOFF *et al.*, 1996).

Em relação ao uso de DIU, resultados similares foram encontrados por Chávez e colaboradores (2009) e Li e colaboradores (2014). Acredita-se que o DIU possa modificar a flora vaginal, favorecendo a colonização de bactérias associadas à vaginose (FARLEY *et al.*, 1992). A presença desse dispositivo poderia facilitar a ascensão dos microrganismos cervicovaginais, predispondo as mulheres à vaginose e à doença inflamatória pélvica (JOESOEUF *et al.*, 2001).

A taxa de recorrência de vaginose nesse estudo foi de 50,8%. O histórico prévio de vaginose associado a novos casos de vaginose também foi observado nos

estudos de Marconi e colaboradores (2015), Sobel e colaboradores (1993) e Bradshaw e colaboradores (2013). Episódios de recidivas frequentemente estão associados à falha no tratamento com antibióticos. Isso se deve principalmente à formação do biofilme na mucosa vaginal. Acredita-se que a fraca penetração e difusão das drogas antimicrobianas através da matriz polissacarídica possa explicar a resistência aos antibióticos em células sésseis (POLLATI, 2012).

Há ainda outros fatores de risco que, embora não tenham sido encontrados associados com o surgimento de vaginose no presente estudo, há relatos dessa relação na literatura, como múltiplos parceiros sexuais e relação sexual entre mulheres (KOUMANS *et al.*, 2007, CHÁVES *et al.*, 2009, BAUTISTA *et al.*, 2016). O baixo número de mulheres que relataram possuir mais que um parceiro sexual (n=13) e relação sexual com mulheres (n=7) inviabilizou qualquer associação desses fatores com vaginose.

A presença de vaginose, além de estar associada a sérias complicações como aborto, parto prematuro e infertilidade, também pode estar relacionada ao aumento do risco de aquisição de doenças sexualmente transmissíveis e desenvolvimento de neoplasia cervical (AMARAL, 2012; NAM *et al.*, 2009). Foi realizada uma análise de correlação entre a presença de vaginose detectada pelos métodos de Gram e citológico e a presença de alterações cervicais no exame citopatológico. No presente estudo não foi encontrada correlação entre esses fatores, assim como nos estudos realizados por Discacciati e colaboradores (2006) e Boyle e colaboradores (2003). No entanto, há estudos que sugerem que a presença de vaginose pode ser um importante fator para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas devido à produção de nitrosaminas carcinogênicas pela flora vaginal anormal e estímulo à liberação de algumas citocinas, como a interleucina 1- β (GUIJON *et al.*, 1992; BEHBAKHT *et al.*, 2002). Os resultados de estudos que buscam estabelecer associação entre vaginose e alterações citológicas ainda são controversos. O fato de vários estudos utilizarem diferentes métodos de diagnóstico para vaginose, como critério de Amsel, pesquisa de *clue-cells* no exame citopatológico e método de Gram, pode contribuir para a divergência entre esses resultados, já que estes métodos diferem entre si quanto a sensibilidade e especificidade (NAM *et al.*, 2009). Além disso, estudos que utilizaram o diagnóstico

clínico para vaginose apresentam como limitação a interpretação subjetiva de cada clínico quanto à presença ou a ausência de vaginose (NAM *et al.*, 2009).

Estudos têm mostrado que mulheres com vaginose apresentam maior risco de aquisição de DSTs, principalmente tricomoníase, gonorreia e infecção por *Chlamydia trachomatis* e HPV (BAUTISTA *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2015). Ainda não estão claros os motivos que levam a esse aumento, mas acredita-se que seja devido à elevação do pH vaginal e a presença de mediadores inflamatórios e de enzimas como a mucinase, que proporcionariam um ambiente favorável para a instalação dos patógenos (ALLSWORTH *et al.*, 2011).

O presente estudo avaliou a detecção de quatro patógenos causadores de DSTs. O patógeno *Trichomonas vaginalis* foi detectado pelo método citológico e pela PCR, não sendo detectado pelo método de Gram. Nesse estudo, a frequência desse patógeno foi de 5,9% pelo método citológico. Resultado semelhante (3,5%) foi obtido por Almeida e colaboradores (2010). A frequência de detecção de *Trichomonas vaginalis* foi maior em mulheres que apresentavam vaginose do que naquelas com flora normal, tanto pelo método citológico (17,1%) quanto pela PCR (25,0%). Resultados semelhantes foram encontrados por Moodley e colaboradores (2002) e Allsworth e colaboradores (2011). Alguns autores tentaram explicar essa associação. Brotman e colaboradores (2010) realizando estudos *in vitro* mostraram que o patógeno *Trichomonas vaginalis* cresce melhor em pH elevado, ambiente proporcionado quando a mulher está com vaginose. Entretanto, o presente estudo não é longitudinal e, portanto, não podemos afirmar que todos os casos de infecção por *Trichomonas vaginalis* ocorreram após a mulher apresentar vaginose.

Como pode-se observar, a frequência de detecção de *Trichomonas vaginalis* foi maior pelo método citológico do que pela PCR. Embora a técnica molecular apresente maior sensibilidade que o método citológico (BALKUS *et al.*, 2014), dois fatores poderiam explicar a diferença de resultados: o material analisado e as limitações da técnica de Papanicolaou. Em primeiro lugar, a pesquisa de *Trichomonas vaginalis* pelo método citológico ocorreu em material cervical, enquanto a detecção pela PCR foi realizada em material vaginal. Além disso, a técnica de Papanicolaou para a detecção de *Trichomonas vaginalis* apresenta sensibilidade de 35 a 85% e especificidade de 78 a 100% (BLACK *et al.*, 1999). Somando-se a isso,

Wiese e colaboradores (2000) mostraram uma taxa de erro de 48% quando somente esse método foi utilizado para a detecção de *Trichomonas vaginalis*.

Diplococos gram negativos intra e extracelulares sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae* foram detectados pela bacterioscopia pós-coloração de Gram. A PCR também foi capaz de detectar *Neisseria gonorrhoeae*, porém esta bactéria não foi detectada pelo método citológico. A frequência desse patógeno foi de 0,3% utilizando o método de Gram. Resultado semelhante (0,9%) foi encontrado por Ramos e colaboradores (2003). Utilizando o método de Gram foi detectado somente um caso de infecção por *N. gonorrhoeae* enquanto a PCR foi capaz de detectar dois casos. Devido ao pequeno número de casos de infecção por este patógeno na população estudada, não foi possível estabelecer relação de risco entre vaginose e a presença de *N. gonorrhoeae*.

Outro patógeno pesquisado foi a *Chlamydia trachomatis*. Essa bactéria foi detectada em um caso pelo método citológico e em 20 casos pela PCR. Entretanto, não foi observada relação de risco entre a presença de vaginose e a aquisição de *Chlamydia trachomatis*, visto que sua frequência em mulheres com vaginose foi menor que em mulheres com flora vaginal normal. A citologia pelo método de Papanicolaou é um método capaz de detectar *C. trachomatis* por meio de inclusões citoplasmáticas causadas por esta bactéria. No entanto, por possuir baixa sensibilidade, Freitas (2007) mostrou que esse método não deve ser utilizado para rastreio dessa bactéria. Assim como o método de Papanicolaou, a coloração pelo Gram possui baixa sensibilidade (23%) para a detecção de *C. trachomatis*, como demonstrado no estudo de Orellana e colaboradores (2012), inviabilizando sua utilização para a detecção deste patógeno.

As técnicas de biologia molecular tornaram possível a pesquisa do DNA do HPV nas amostras cervicais e vaginais, sendo a captura híbrida de segunda geração e a reação em cadeia de polimerase (PCR), as técnicas mais utilizadas (POLJAK *et al.*, 2012). No presente estudo, a pesquisa para HPV foi realizada utilizando a PCR como método. Dois pares de *primers* foram avaliados inicialmente em amostras sabidamente positivas para HPV: GP5+/6+ e MY09/11. Como o primeiro apresentou melhor desempenho que o segundo na detecção de HPV em um maior número de amostras, optou-se pela escolha dos *primers* GP5+/6+ para a análise das 80

amostras selecionadas. Estudo realizado por Peres e colaboradores (2015) apresentou resultado semelhante, onde os *primers* GP5+/6+ foram mais eficientes que MY 09/11 para detecção de HPV. Essa diferença de sensibilidade pode ser explicada pelo fato dos *primers* MY09/11 serem degenerados para a região conservada de leitura L1, o que pode reduzir o nível de sensibilidade (MANOS *et al.*, 1989). Além disso, os *primers* GP5+/6+ são capazes de detectar um maior número de genótipos de HPV (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995).

O HPV foi detectado em 17 das 80 sub-amostras utilizadas na análise, sendo 12 casos em mulheres com vaginose. Assim, como no presente estudo, Liu e colaboradores (2015) também encontraram associação entre HPV e vaginose. Essa associação pode ser atribuída a dois fatores: 1) o elevado pH vaginal em mulheres com vaginose pode aumentar a susceptibilidade às DSTs, podendo estar associado ao aumento do risco de aquisição do HPV (HUH, 2009); 2) a infecção por HPV pode causar danos no epitélio vaginal e degradar o muco cervical, facilitando o desenvolvimento de vaginose (WATTS *et al.*, 2005). Apesar da maioria dos estudos apresentarem associação entre vaginose e HPV, há estudos em que essa associação não é observada, como no estudo realizado por Rebouças e colaboradores (2014). No entanto, a divergência entre os resultados pode ocorrer dependendo da população estudada e do método empregado para o diagnóstico de vaginose (REBOUÇAS *et al.*, 2014). A pesquisa de HPV nesse estudo foi realizada em *swabs* vaginais, ao contrário da maioria dos estudos onde são utilizadas amostras cervicais. Coorevits e colaboradores (2018) realizaram a comparação sobre a sensibilidade de detecção do HPV em amostras cervicais e vaginais e foi observado que estas amostras são equivalentes para a detecção do HPV, podendo os *swabs* vaginais serem utilizados para a detecção de HPV em estratégias de triagem para o câncer cervical.

A realização da técnica PCR em somente 80 amostras impôs algumas limitações para um estudo comparativo com os métodos de Gram e citológico. No entanto, a PCR se mostrou eficaz, pois foi a única técnica capaz de detectar os 4 patógenos pesquisados (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* e HPV). Com o advento dos métodos de pesquisa de ácidos nucleicos, alguns métodos antes considerados padrão-ouro deixaram de ser referência para a detecção de patógenos (FREITAS, 2007). A utilização de métodos moleculares em

combinação com os métodos padrão-ouro pode ser importante para a obtenção de resultados mais fidedignos.

O presente estudo apresenta como limitações o fato de não ser longitudinal e de utilizar uma amostra de conveniência, o que não permite que afirmemos que a infecção pelos patógenos *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e HPV ocorreu após as mulheres já estarem com vaginose. Além disso, o número amostral deste estudo representa uma população de mulheres residentes na área urbana de Ouro Preto-MG usuárias do SUS. Foi levado em consideração, para a realização deste estudo, o deslocamento até as unidades de saúde e o número de mulheres atendidas em cada unidade, de forma a se obter um maior número amostral e representativo da área urbana do município.

8. CONCLUSÃO

A prevalência de vaginose observada neste estudo foi similar a outros estudos realizados no Brasil. Os métodos bacterioscopia pós-coloração de Gram e citológico apresentaram boa concordância em relação à detecção de vaginose na população estudada, mostrando que ambas as técnicas são eficazes e aplicáveis para o diagnóstico de vaginose.

É importante que médicos das unidades básicas de saúde tenham mais atenção com mulheres fumantes, usuárias de DIU e com histórico de vaginose, pois apresentam risco maior de vaginose.

Dentre os patógenos causadores de doenças sexualmente transmissíveis estudadas, *Trichomonas vaginalis* e HPV foram detectados com maior frequência em mulheres com vaginose. Além disso, o método de PCR foi eficaz para detectar os quatro patógenos pesquisados (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e HPV), devendo ser avaliado seu emprego na rotina laboratorial, a fim de se obter resultados mais fidedignos no rastreamento de DSTs.

Não foi observada correlação entre vaginose e alterações citológicas na população estudada.

9. REFERÊNCIAS

ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – 2016 – disponível em www.abep.org. Acesso em: 12/11/2016.

ABOUTAYOUN, A. N.; BURCHARD, P. R.; CALIENDO, A. M.; SCHERER, A.; TSONGALIS, G. J. A multiplex pcr assay for the simultaneous detection of *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. **Exp Mol Pathol**, 98, 214-218, 2015

ALLSWORTH, J. E.; PEIPERT, J. F. Prevalence of bacterial vaginosis. **National Healthand Nutrition Examination Survey Obstet Gynecol**, 109(1), 114-120, 2007

ALLSWORTH, J. E.; PEIPERT, J. F. Severity of bacterial vaginosis and the risk of sexually transmitted infection. **Am J Obstet Gynecol**, 205, 1–6, 2011

ALMEIDA, M. S.; ARGÔLO, D. S.; JUNIOR, J. S. A.; PINHEIRO, M. S.; DE BRITO, A. M. G. . Tricomoniase: prevalência no gênero feminino em Sergipe no biênio 2004-2005. **Ciênc. saúde coletiva**, 15 (1),1417-1421, 2010

AMARAL, A. D. Incidência de *Gardnerella vaginalis* nas amostras de secreção vaginal em mulheres atendidas pelo laboratório municipal de Fraiburgo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, 33 (33), 455-458, 2012.

AMSEL, R. P. A.; TOTTEN, C. A.; SPIEGEL, K. C.; CHEN, D.; ESCHENBACH, K. K. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American Journal of Medicine**, 74(1),14–22,1983

ANUKAM, K C.; IDEMOH, C.; OLISE, N. Evaluation of bacterial vaginosis (BV) using Nugent scoring system. **J Med Biomed Res**, 13(1), 25-32, 2014

BACKER, E. D.; VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H. et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus species*, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. **BMC Microbiology**, 7:115, 2007

BAGNALL, P.; RIZZOLO D.; Bacterial vaginosis: A practical review. **Publish ahead-of-print.**, 2017.

BALKUS, J. E.; RICHARDSON, B. A.; RABE, L. K. et al; Bacterial vaginosis and the risk of *Trichomonas vaginalis* acquisition among HIV-1 negative women. **Sex Transm Dis.**, 41(2), 123–128, 2014

BAUTISTA, C. T.; WURAPA, E.; SATEREN, W. B.; MORRIS, S.; HOLLINGSWORTH, B.; SANCHEZ, J. L. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. **Military Medical Research**, 3(1), 4, 2016

- BEHBAKHT, K., FRIEDMAN, J., HEIMLER, I., et al. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. **Infect Dis Obstet Gynecol**, 10, 181-186, 2002
- BITEW, A.; ABEBAW, Y.; BEKELE, D.; MIHRET, A. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Associated Risk Factors among Women Complaining of Genital Tract Infection. **Int J Microbiol**, 2017, 2017
- BLACK, E. R.; BORDLEY, D. R.; TAPE, T. G.; PANZER, R. J. Diagnostic Strategies for Common Medical Problems. 2nd ed. Philadelphia: **American College of Physicians-American Society of Internal Medicine**, 255–268, 1999
- BONFATI, G.; GONÇALVES, T. L. Prevalência de *Gardnerella vaginalis*, *Candida spp* e *Trichomonas vaginalis* em exames citopatológicos de gestantes atendidas no Hospital de Santa Maria, RS. **Revista de Saúde Santa Maria**, 36, (1), 37-46, 2010
- BORIS, S. et al. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. **Infection and Immunity**, 66, 5, 1985-1989, 1998
- BOSCH, F. X. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, 31, 6, G1-31, 2013
- BOYLE, D. C.; BARTON, S. E.; UTHAYAKUMAR, S.; et al. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? **Int J Gynecol Cancer**, 13, 159–163, 2003
- BRADSHAW, C. S.; WALKER, J.; FAIRLEY, C. K.; et al. Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young Australian women. **PLoS One**, 8(3), 2003
- BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Controle dos cânceres do colo do útero e da mama* – Brasília : Ministério da Saúde, 2006.
- BROTMAN, R. M.; HE, X.; GAJER, P.; et al. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. **BMC Infect. Dis.** 14:471, 2014
- BROTMAN, R. M.; KLEBANOFF, M. A.; NANSEL, T. R.; et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. **J Infect Dis**, 202, 1907–1915, 2010
- BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, 5, 149-161, 2005.
- BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, 16, 1-17, 2003.
- CHÁVEZ, N.; MOLINA, H.; SÁNCHEZ, J.; GELAYE, B.; SÁNCHEZ S. Duchas vaginales y otros riesgos de vaginosis bacteriana en Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. 26 (3), 299–306, 2009

CLAUS, D.C. A standardized Gram staining procedure. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8, 451-452, 1992

COOREVITS, L.; TRAEN, A.; BINGÉ, L.; et al. Are vaginal swabs comparable to cervical smears for human papillomavirus DNA testing?. **J Gynecol Oncol**, 29(1), 2018

COPETTI, N. Manual de Técnicas citológicas da Faculdade de Medicina da UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 31 p.

DAVIS, J. D.; CONNOR, E. E.; CLARK, P.; WILKINSON, E. J.; DUFF, P. Correlation between cervical cytologic results and gram stain as diagnostic tests for bacterial vaginosis. **J. Obstet. Gynecol.** 177(3), 532-535, 1997

DE RODA HUSMAN, A. M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol.** 76, 1057-1062, 1995.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. **Int J Cancer.** 124:1626, 2009

DIELISSEN, P. W.; TEUNISSEN, D. A.; LAGRO-JANSSEN, A. L. Chlamydia prevalence in the general population: is there a sex difference? a systematic review. **BMC Infect Dis.** 13:534, 2013

DISCACCIATI, M. G.; SIMOES, J. A.; LOPES, E. S.; et al. Is bacterial vaginosis associated with squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix? **Diagn Cytopathol**, 34 (5), 323-325, 2006

EADE, C. R.; DIAZ, C.; WOOD, M. P.; et al. Identification and Characterization of Bacterial Vaginosis-Associated Pathogens Using a Comprehensive Cervical-Vaginal Epithelial Coculture Assay. **PLoS ONE**, 7(11), 2012

ERIKSSON, K. et al. Validation of the use of Pap-stained vaginal smears for diagnosis of bacterial vaginosis. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, 115(7), 809-813, 2007.

FARLEY, T. M.; ROSENBERG, M. J.; ROWE, P. J, et al. Intrauterine devices and pelvic inflammatory disease: an international perspective. **Lancet**, 339, 785–788, 1992

FERRADA, D. B. Identificación y susceptibilidad antimicrobiana de *Gardnrella vaginalis* em pacientes Del consultóriode salud “Jose Dionisio Astaburuaga”de Talca. Dissertação – Universidad de Talca, Talca, Chile, 2012

FERREIRA, Carla Sofia da Silva. Comparação da microbiota vaginal entre mulheres Portuguesas saudáveis ou com vaginose bacteriana, através de tipagem molecular. 2014. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica Ramo de Engenharia Clínica)- Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2014.

FETHERS, K. A.; FAIRLEY, C. K.; HOCKING, J. S.; GURRIN, L. C.; BRADSHAW, C. S. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. **Clin Infect Dis**; 47 (11), 1426-1435, 2008

FILHO, D. S. C.; DINIZ, C. G.; DASILVA, V. L. Bacterial vaginosis: clinical, epidemiologic and microbiological features. **HU Revista Juiz**, 36, 223–230, 2010

FREITAS N. S. F. Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes, Manaus – Amazonas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007

GAVILLON, N. *et al.* How did I contract human Papillomavirus (HPV)?. **Gynecol Obstet Fertil**, 38 (3), 199-204, 2010.

GAYDOS C. A., KLAUSNER J. D., PAI N. P., KELLY H., COLTART C., PEELING R. W., Rapid and point-of-care tests for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in women and men. **HHS Public Access, Sex Transm Infect.**; 93(Suppl 4), 31–35, 2017

GIBSON, J. S. Nucleic acid-based assays for the detection of high-risk human papillomavirus: a technical review. **Cancer Cytopathol**, 122, 9, 639-645, 2014

GRAVITT, P. E. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol**, 38, 1, 357-361, 2000.

GUIJON F, PARASKEVAS M, RAND F. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. **Inst Obstet Gynecol**, 37, 185–191, 1992

HEIDEMAN, D. A. M.; WATERBOER, T.; PAWLITA M.; *et al.* Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol**, 5, 4550-4556, 2007

HELLBERG, D.; NILSSON, S.; HALEY, N. J.; HOFFMAN, D.; WYNDER, E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. **Am J Obstet Gynecol**, 158 (4), 910–913, 1988

HUH, W. K. Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. **Obstet Gynecol**, 114, 139–143, 2009

HUMANS, I. W. Human papillomaviruses. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, 64, 1-378, 1995.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Conduas Preconizadas: Recomendações para Profissionais de Saúde, **J Bras Patol Med Lab**, 42 (5), 351-373, 2006

ISON, C. A.; HAY, P. E. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. **Sex Transm Infect**, 78, 413-415, 2002

JANULAITIENE, M.; PALIULYTE, V.; GRINCEVICIENE, S.; et al. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* sub groups in women with and without bacterial vaginosis. **BMC Infect Dis**, 17(1), 394, 2017

JOESOEUF, M. R.; KARUNDENG, A.; RUNTUPALIT, C.; et al. High rate of bacterial vaginosis among women with intrauterine devices in Manado, Indonesia. **Contraception**, 64, 169-171, 2001

KLETER, B. *et al.* Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. **Am J Pathol**, 153, 6, 1731-1739, 1998

KOUMANS, E. H.; JOHNSON, R. E.; KNAPP, J. S.; ST LOUIS, M. E. Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nonculture tests: A performance review with clinical and public health considerations. **Clin Infect Dis**, 27, 1171-1180, 1998

KOUMANS, E. H.; STERNBERG, M.; BRUCE C.; et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001–2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. **SexTransmDis**; 34(11), 864–869., 2007

LAGA, M.; MANOKA, A.; KIVUVU, M.; et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. **AIDS**, 7, 95–102, 1993

LETO, M. G. P.; SANTOS JR, G. F.; PORRO, A. M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An Bras Dermatol**, 86(2), 306-317, 2011

LI, X. D.; WANG, C. C.; ZHANG, X. J.; et al. Risk factors for bacterial vaginosis: results from a cross-sectional study having a sample of 53,652 women. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 33, 1525–1532, 2014

LINHARES, I. M.; Giraldo, P. C.; Baracat, E. C. Novos conceitos sobre a flora bacteriana vaginal. **Rev Assoc Med Bras**, 56, (3), 370-374, 2010

LIU, J.; LIU, W.; LIU, Y.; ZHOU, X.; ZHANG, Z.; SUN Z. Prevalence of microorganisms co-infections in human papillomaviruses infected women in Northern China. **Arch Gynecol Obstet**, 293, 595–602, 2015

LIVENGOOD, C. H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, 2(1), 28-37, 2009.

LU, H.; JIANG, P. C.; ZHANG, X. D.; et al. Characteristics of bacterial vaginosis infection in cervical lesions with high risk human papillomavirus infection. **Int J Clin Exp Med**, 8, 21080–21088, 2015

LUCHIARI, H. R.; FERREIRA, C. S. T., GOLIM, M. A.; SILVA, M. G.; MARCONI, C.; Cervicovaginal bacterial count and failure of metronidazole therapy for bacterial vaginosis. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, 132, 297-301, 2016

MACHADO, D.; CASTRO, J.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. M.; CERCA, N.; Bacterial vaginosis biofilm: challenges to current therapies and emerging solutions. **Frontiers in microbiology**, 6, 2016

MALAGUTI, N.; BAHLS, L. D.; UCHIMURA, N. S.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M. E. Sensitive Detection of Thirteen Bacterial Vaginosis-Associated Agents Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Biomed Res Int**, 645853, 2015

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K.; LEWIS, A. J.; ET AL. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**. 28, 209-214, 1989

MARCONI, C.; DUARTE, M. T.; SILVA, D. C.; SILVA, M. G. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil. **Int J Gynaecol Obstet**, 131, 137–141, 2015

MARTIN, R. et al. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 26 (3),160-167, 2008.

MARTÍNEZ, M. A.; OVALLE, A.; GAETE, A. M., et al. Comparación de los criterios de Nugent y Spiegel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana y análisis de los resultados discordantes por el método de Ison y Hay. **Rev Med Chile**, 139, 66-71, 2011.

MARTINS, M. C. L.; BÔER, C. G.; SVIDZINSKI, T. I. E.; et al. Avaliação do método de Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. **RBAC**, 39(3), 217-221, 2007.

MASCARENHAS, R. E.; MACHADO, M. S.; COSTAESILVA BF.; et al. A population of sexually active adolescents from Salvador, Bahia, Brazil. **Infect Dis Obstet Gynecol**; 2012:378640., 2012

MICHELON, J.; BOENO, A.; CUNHA FILHO, E.V.; STEIBEL, G.; BERG, C.; TORRENS, M. C. T. *Diagnóstico da infecção urogenital por Chlamydia trachomatis*. **Scientia Medica**, 15(2),115-120, 2005.

MOODLEY, P.; CONNOLLY, C.; STURM, A. W.; Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. **J Infect Dis**, 185, 69-73, 2002

MORRIS, M. A.; NICOLL, I.; SIMMS, J.; WILSON, M, CATCHPOLE. Bacterial vaginosis: a public health review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, 108, 5, 439–450, 2001

MOSCICKI, A. B. *et al*. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine**,30 Suppl 5, F24-33, 2012

- MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med.** 348, 518-27, 2003
- NAM, K. H.; KIM, Y. T.; KIM, S. R.; et al: Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **J Gynecol Oncol**, 20, 39-43, 2009
- NG, L. K.; MARTIN, I. E.; The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, 16, 15-25, 2005
- NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. **Journal of clinical microbiology**, 297-30, 1991
- Nye, M. B.; Schwebke, J. R.; Body, B. A.; Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. **Am J Obstet Gynecol**, 200:188.e1–188.e7, 2009
- OBIRI-YEBOAH, D.; AKAKPO, P. K., MUTOCHELUH, M.; et al. Epidemiology of cervical human papillomavirus (HPV) infection and squamous intraepithelial lesions (SIL) among a cohort of HIV-infected and uninfected Ghanaian women. **BMC Cancer**, 17:688, 2017
- OLIVEIRA, A. M. F.; SANTOS, J. E. F.; OLIVEIRA, L. L.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M.; Fatores de virulência de *Neisseria spp.* **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, 8(1) 39-44, 2004
- OLIVEIRA, F. A.; PFLEGER, V.; LANG, K.; et al. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102, 751-756, 2007
- ORELLANA, M. A.; GÓMEZ-LUS, M. L.; LORA, D. Sensitivity of Gram stain in the diagnosis of urethritis in men. **Sex Transm Infect**, 88, 284–287, 2012
- PAPANICOLAOU, G. N. A New Procedure for Staining Vaginal Smear. **Science**, 95, 438-439, 1942.
- PAPP, J. R.; SCHACHTER, J.; GAYDOS, C. A.; POL, B. V.; Recommendations for the laboratory based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **MMWR Recomm Rep**, 63, 1-19, 2014
- PERES, A. L.; CAMAROTTI, J. R. S. L.; CARTAXO M. *et al.* Molecular analysis and conventional cytology: association between HPV and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a Brazilian population. **Genetics and molecular research**, 14, 9497–9505, 2015
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHAPP, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microb. Rev**, 11(2): 300-317, 1998.
- PEYTON, C. L. *et al.* Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. **J Clin Microbiol**, 36, 11, 3248-3254, 1998

POLATTI F. Bacterial vaginosis, *Atopobium vaginae* and nifuratel. **Curr Clin Pharmacol**, 7(1), 36–40, 2012

POLJAK, M. et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. **Vaccine**, 30 (Suppl 5), 100-106, 2012.

POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sex Transm Infect**, **89**, 418-422, 2013

RAMOS, M. C.; BECKER, D.; GERMANY C.; et al. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* por PCR em urina de mulheres residentes em uma vila popular atendida por serviço de saúde comunitária em Porto Alegre, Brasil. **J Bras Doenças Sex Transm**, 15(2), 20-25, 2003

RAUBER, D. et al. Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 140, 2, 258-62, 2008.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 108, 4680–4687, 2011

REBOUÇAS, K.; JUNIOR, J. L.; ELEUTERIO, R. M. N. et al. Influence of human papillomavirus infection on the vaginal microbiome of women with immunocompetency. **DST - J bras Doenças Sex Transm**, 26,(1-4), 5-9, 2014.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clin Microbiol Rev**, 17, 794–803, 2004

SCHWEBKE, J. R.; DESMOND, R. A.; OH, M. K. Predictors of bacterial vaginosis in adolescent women who douche. **Sex Transm Dis**, 31(7), 433-36, 2004

SILVA-FILHO, A. M.; LONGATTO-FILHO, A. Colo Uterino e Vagina. Processos Inflamatórios. Aspectos Histológicos, Citológicos e Colposcópicos. **Revinter**, 209, 2000

SOBEL, J. D.; SCHMITT, C.; MERIWETHER, C. Long-term follow-up of patients with bacterial vaginosis treated with oral metronidazole and topical clindamycin. **J Infect Dis**, 167, 783–784, 1993

SPIEGEL, C. A. Bacterial vaginosis. **Clin Microbiol Rev**, 4, 485–502, 1991

SZKLO, M.; NIETO, F. J.; 2000. *Epidemiology: Beyond the Basics*. 2 ed.

TONINATO, L. G. D.; IRIE, M. M. T.; CONSOLARO, M. E. L, LOPES, M. E.; TEIXEIRA, J. J. V.; BOER, C. G. Vaginose bacteriana diagnosticada em exames citológicos de rotina: prevalência e características dos esfregaços de Papanicolaou. **Bras Anal Clin**, 48(2), 165-169, 2016

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; et al. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **J Infect Dis**, 197, 548–554, 2008

VASCONCELOS, C. T. M.; NETO, J. A. V.; CASTELO, A. R. P.; MEDEIROS, F.C.; PINHEIRO, A. K. B. Analysis of coverage and of the pap test exams not retired of a Basic Health Unit. **Revista de Enfermagem da USP**, 44, 2, 323-328, 2010.

VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; CLAEYS, G.; et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of distinction grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. **BMC Microbiology**, 5, 61, 2005

VERMA, R.; SOOD, S. Gonorrhoea diagnostics: An update. **Indian J Med Microbiol**, 34, 139-45, 2016

WALKER, C. K.; SWEET, R. L. Gonorrhoea infection in women: prevalence, effects, screening, and management. **Int J Womens Health**, 3, 197–206, 2011

WATTS, D. H.; FAZZARI, M.; MINKOFF, H.; et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. **J Infect Dis** 191, 1129–1139, 2005

WESTHOFF, C.; GENTILE, G.; LEE, J.; ZACUR, H.; HELBIG, D. Predictors of ovarian steroid secretion in reproductive-age women. **Am J Epidemiol**, 144(4), 381–388, 1996

WIESE, W.; PATEL, S. R.; PATEL, S. C.; et al. A Meta-Analysis of the Papanicolaou Smear and Wet Mount for the Diagnosis of Vaginal Trichomoniasis. **The American Journal of Medicine**, 108, 301-308, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO Press; 2012

ZUR-HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Ver Cancer**, 2, 5, 342-50, 2002

10. Anexos

Anexo 1

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da etiologia microbiana das vaginoses em mulheres residentes em Ouro Preto/MG

Pesquisador: Glenda Nicioli da Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 62883616.8.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.907.198

Apresentação do Projeto:

Em condições normais, a flora bacteriana vaginal tem sido descrita como sendo composta principalmente por bacilos GRAM positivos do gênero *Lactobacillus*. Fatores como o número elevado de parceiros sexuais, o início precoce da vida sexual e a prática de duchas vaginais podem levar a substituição total ou parcial da flora normal por outras bactérias, principalmente anaeróbias. Esta condição é chamada de vaginose bacteriana (VB). Trata-se da principal desordem vaginal em mulheres em idade fértil e pode ser caracterizada pela presença de fluido vaginal com pH superior a 4,5, odor de peixe após a adição de KOH 10% ao fluido e

presença de clue cells ao exame citológico. O principal agente causador de vaginoses é a *Gardnerella vaginalis*, porém outras espécies bacterianas também podem estar envolvidas, como *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e *Bacterioides* spp, além de *Mobiluncos* spp, *Micoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*. VB é uma desordem que ocorre em mulheres de todo o mundo, estando presente principalmente em países do leste e sul da África, apresentado índices superiores a 50%. Dentre os métodos laboratoriais mais rotineiramente utilizados para o diagnóstico de VB estão a Bacteroscopia pós- coloração de GRAM e a coloração de Papanicolaou (exame colpocitológico). O “método de GRAM” com a utilização do escore de Nugent tem sido considerado como o padrão- ouro, sendo uma técnica de baixo custo, baixo tempo de execução e alta correlação com a cultura bacteriana. O método de Papanicolaou, por sua vez, apresenta sensibilidade de 50% e especificidade de 95% quando comparado ao “método de GRAM”. Devido a sua facilidade de execução, o método de Papanicolaou tem sido utilizado para a caracterização de VB, principalmente nos casos positivos. Isto também tem permitido seu emprego no diagnóstico de VB assintomática. Com o surgimento de novos agentes causadores de VB, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) emergiu como ferramenta útil no diagnóstico de VB, podendo ser utilizada na detecção das várias espécies causadoras de vaginose, assim como na detecção de genes ligados a resistência bacteriana, que levam a vaginoses recorrentes. Sendo assim, os objetivos deste estudo serão: 1) Determinar a prevalência de mulheres com vaginose e a sua recorrência na região de Ouro Preto/MG; 2) Identificar as espécies bacterianas causadoras de vaginose utilizando três diferentes métodos: coloração de Papanicolaou, bacterioscopia pós-coloração de GRAM e PCR; 3) Identificar entre os métodos utilizados, o mais adequado para o diagnóstico de vaginose. Para isso, serão coletados swabs vaginais de mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Ouro Preto/MG. O material coletado será analisado pelos métodos de coloração de Papanicolaou, bacterioscopia pós-coloração de GRAM e PCR. Espera-se que os resultados contribuam para o melhor entendimento desta doença infecciosa tão importante na saúde da mulher.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a prevalência de mulheres com vaginose e a sua recorrência na região de Ouro Preto/MG.

Objetivo Secundário:

- * Identificar as espécies bacterianas causadoras de vaginose utilizando três diferentes métodos: coloração de Papanicolaou, bacterioscopia pós-coloração de GRAM e PCR.
- * Identificar entre os métodos utilizados, o mais adequado para o diagnóstico de vaginose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os procedimentos utilizados apresentam risco habitual, visto serem de rotina clínica e laboratorial. Para diminuir os riscos, todo o material utilizado será descartável, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pelo laboratório.

Benefícios:

As mulheres participantes deste projeto poderão ter seus resultados dos exames preventivo do colo do útero e também do gram de secreção vaginal. Ambos os resultados são de grande importância para a prevenção do câncer de colo do útero e vaginose bacteriana, que acometem grande número de mulheres no Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFOP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos referentes a resolução CNS 466/2012 foram entregues.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_823729.pdf	16/01/2017 15:31:26		Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoGlenda.pdf	16/01/2017 15:30:37	Glenda Nicioli da Silva	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartaComite.doc	16/01/2017 15:29:39	Glenda Nicioli da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPedro16.docx	16/01/2017 15:26:58	Glenda Nicioli da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPedro16.docx	16/01/2017 15:26:14	Glenda Nicioli da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

OURO PRETO, 03 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Núncio Antônio Araújo Sól
(Coordenador)

Anexo 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezada paciente, você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa sobre vaginose bacteriana. Esse projeto será realizado no município de Ouro Preto, MG e terá início em dezembro de 2016 com término previsto para janeiro de 2019. Com este estudo poderemos compreender fatores relacionados com o surgimento de vaginose recorrentes, bem como as técnicas laboratoriais mais adequadas para a sua detecção. Se você quiser participar, deverá responder um questionário e, durante seu exame preventivo (Papanicolaou) de rotina para coleta de material do colo do útero para análise citológica, três *swabs* vaginais (raspados vaginais) serão também coletados para a pesquisa dos agentes causadores de vaginose. As coletas serão realizadas por profissionais habilitados e devidamente treinados. Os procedimentos utilizados apresentam risco habitual, visto serem de rotina clínica e laboratorial. Para diminuir os riscos, todo o material utilizado é descartável, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pelo laboratório. Os materiais coletados serão divididos em pequenas quantidades e armazenados no Laboratório de Pesquisa Clínica e Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ouro Preto (Campus Universitário Morro do Cruzeiro, Bauxita, CEP 35400-000, Ouro Preto, MG) e deverá ser utilizado exclusivamente para as finalidades acima. Sua participação nesse projeto é voluntária. Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause prejuízo, inclusive no seu acompanhamento. Todos os exames serão gratuitos e realizados no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), seguindo rigorosamente os critérios estabelecidos. Todos os dados obtidos serão armazenados e mantidos em sigilo por um período mínimo de 5 anos. Você poderá esclarecer qualquer dúvida sobre o projeto com a Professora Glenda Nicioli da Silva, com o professor Luiz Fernando Teixeira de Medeiros ou com o Farmacêutico Pedro Moregola Teixeira, de segunda a sexta-feira, de 8h as 11h e de 13h às 17h horas, no Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, UFOP, campus universitário ou pelo telefone (31) 3559-1071. Para quaisquer esclarecimentos em relação aos aspectos éticos, você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal

de Ouro Preto no Campus Universitário, Morro do Cruzeiro, ICEB II, sala 29, pelos telefones (31)3559-1368 ou (31)3559-1370 ou pelo e-mail propp@ufop.br.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, _____

após ser esclarecida sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

Assinatura da Paciente

Assinatura do Coordenador(a)

Outro Preto, ____ de _____ de 20 ____

Quantas motos há em sua casa? () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 ou mais 9 () Não respondeu	moto____
Quantas secadoras de roupa há em sua casa? () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 ou mais 9 () Não respondeu	secrou_____
A água utilizada em sua casa é proveniente de: 0 () estação de tratamento 1 () poço 9 () Não respondeu	agua_____
A rua de sua casa é asfaltada? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	rua_____
Vc fuma? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu A quanto tempo?_____anos	fuma_____tfum__
Você já fumou? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Durante quanto tempo? _____anos	fumou_____qtfum_ -
Vc faz uso de bebida alcoólica? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Com qual frequência? 2 () 1x semana 3 () 2x semana 4 () 3 ou maisx semana 5 () menos que 1x semana	alcool_____ freqbalc_____
Vc faz uso de drogas ilícitas? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	drogas_____
Agora eu gostaria de fazer algumas perguntas sobre sua vida sexual.	
Você está grávida? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	gravida_____
Você já teve aborto? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	aborto_____
Você já teve alguma DST? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	dst_____
Vc faz uso de ducha vaginal? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Com qual frequência?_____	ducha_____ fducha_____
Você faz uso de anticoncepcionais orais? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Há quanto tempo?_____meses	antiora_____ tantiara_____
Você faz uso de anticoncepcionais injetáveis? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Há quanto tempo?_____meses	antiinj_____ tantiinj_____
Você faz uso de DIU? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Há quanto tempo?_____meses	diu_____ tdiu_____
Você está fazendo uso de algum antibiótico oral ou tópico? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu Há quanto tempo?_____meses	antibio_____ tantibio_____
Você já teve vaginose? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	vaginose_____
Você está na menopausa? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	menop_____
Você teve alguma gestação? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	gesta_____
Com qual idade vc menstruou pela primeira vez? _____anos 99 () Não respondeu	idamens_____
Seu ciclo menstrual é regular? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	ciclmen_____
Qual idade você tinha quando teve sua primeira relação sexual? _____anos 99 () Não respondeu	idarel_____
Você possui vida sexual ativa? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	vidsex_____
Você ou seu parceiro(a) fazem uso de camisinha? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	camisi_____
Atualmente você possui mais que um parceiro(a) sexual? 0 () não 1 () sim 99 () Não respondeu	parsex_____
Você tem ou já teve relações sexuais com mulheres? 0 () não 1 () sim 9 () Não respondeu	relmulhe_____