

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Glauciane da Silva Teixeira

ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL DE MULHERES COM E SEM VAGINOSE BACTERIANA, COM ÊNFASE EM *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp.

Belo Horizonte

2010

Glauciane da Silva Teixeira

ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL DE MULHERES COM E SEM VAGINOSE BACTERIANA, COM ÊNFASE EM *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp.

Tese apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador: Prof. Jacques Robert Nicoli

Co-orientadores: Prof^a. Maria
Auxiliadora Roque de Carvalho
Prof. Marcos Mendonça

Belo Horizonte

2010

043

Teixeira, Glauciane da Silva.

Estudo da microbiota vaginal de mulheres com e sem vaginose bacteriana, com ênfase em *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp. [manuscrito] / Glauciane da Silva Teixeira. – 2010.

201 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Jacques Robert Nicoli. Co-orientadores: Prof^a. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho; Prof. Marcos Mendonça.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vaginose Bacteriana. 3. *Lactobacillus*. 4. *Gardnerella vaginalis*. 5. Probióticos. 6. Vida Livre de Germes. I. Nicoli, Jacques Robert. II. Carvalho, Maria Auxiliadora Roque de. III. Mendonça, Marcos. IV. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientadora: Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho
Relatora e Suplente: Profa. Simone Gonçalves dos Santos

Às 14:00 horas do dia 08 de setembro de 2010, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelas Dras. Suzana Maria Pires do Rio (Faculdade de Medicina de Barbacena), Vânia Lúcia da Silva (UFJF), Soraya Zhouri Costa e Silva (Faculdade de Medicina/UFMG), Elisabeth Neumann (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e o Prof. Jacques Robert Nicoli - Orientador, para julgar o trabalho final "Estudo da microbiota vaginal de mulheres com e sem vaginose bacteriana, com ênfase em Gardnerella vaginalis e Lactobacillus spp", da aluna **Glauciane da Silva Teixeira**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 08 de setembro de 2010.

Dra. Suzana Maria Pires do Rio

Suzana Maria Pires do Rio

Dra. Vânia Lúcia da Silva

Vânia Lúcia da Silva

Dra. Soraya Zhouri Costa e Silva

Soraya Zhouri Costa e Silva

Dra. Elisabeth Neumann

Elisabeth Neumann

Prof. Jacques Robert Nicoli (Orientador)

JR Nicoli

Cláudio Antônio Bonjardim
Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

Equipe Envolvida

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- UFMG

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Prof. Carlos Rosa

Prof^a Maria Aparecida de Resende

Prof. Luiz de Macedo Farias

MSc. Fábio Pereira de Carvalho

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL

Prof. Álvaro Cantini Nunes

MSc. João Luiz S. Moreira

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Rosa Maria Esteves Arantes

FACULDADE DE MEDICINA, UFMG

DEPARTAMENTO DE PROPEDEÚTICA COMPLEMENTAR

Prof. Rodolfo Braga Almeida

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Prof^a Edna Maria Lopes de Castro

Ao Flávio, meu grande amor, pelo incentivo, paciência, carinho e amor.

Agradeço a Deus por sempre tê-lo ao meu lado!

**Aos meus pais, pelo exemplo, pelas lições de vida e por sempre
acreditarem em mim.**

AGRADECIMENTOS

Ao supremo e onipotente: **Deus**, agradeço pela serenidade que tu me destes e por sempre estar junto a mim em todos os momentos da minha vida, compartilho contigo meu Pai e protetor, mais esta Vitória!

Ao **Flávio**, meu amor, pela enorme paciência, por acreditar, apoiar e não me deixar desanimar e ainda por sua enorme ajuda com o processamento de dados. Agradeço muito por fazer parte da minha vida e ter sido tão importante na concretização deste trabalho.

Aos grandes amores de minha vida: **Pai, Mãe, Giuliano e Gleuber**, obrigada pelo apoio, carinho e amor incondicional, não há palavras para expressar a felicidade que tenho em poder fazer parte de uma família tão linda como a nossa. Amo muito vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Jacques** Robert Nicoli, por me receber em seu laboratório, lhe agradeço pela transmissão de conhecimento e por ter me conduzido neste trabalho. Muito obrigada Professor!

Meu agradecimento à professora e co-orientadora **Maria Auxiliadora** Roque de Carvalho, pela oportunidade de aprender cada vez mais e pelo seu empenho profissional e pessoal na colaboração com mais esta conquista em minha vida.

Ao Professor e co-orientador Dr. Marcos **Mendonça**, pelo profissionalismo, dedicação, e amizade. Obrigada por seu apoio neste projeto.

Aos Professores e colaboradores, **Luiz Macêdo, Carlos Rosa, Maria Aparecida e Álvaro Cantini**, pela contribuição em minha formação, pelo estímulo e pelas críticas relevantes e construtivas.

As Prof^{as}. **Regina e Silvia**, pelas sugestões durante diversas etapas desta pesquisa e pela convivência agradável.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, pelo empenho em aprimorar nossos conhecimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos formados ao longo destes anos: **Tássia, Fabiana, Ariane,**

Sílvia, Flaviano, Quésia, Samir, Flávio, “Flávias”, Fábio, Aline, Cristiane, Bianca, pelo período de convivência e pela ajuda com a parte experimental em muitos momentos, pelo companheirismo e amizade que foram sempre constantes.

Aos Professores **Rodolfo** Braga e **Edna** Maria Lopes de Castro, pela amizade e apoio profissional.

Aos professores participantes desta banca examinadora, Prof. Dr^a. **Elisabeth** Neumann, Prof Dr^a **Soraya** Zouri, Prof^a **Vânia** Silva e Prof^a Dr^a. **Suzana** Rios e Prof. Dr. **Alexandre** Barros. Obrigada por aceitarem o convite e contribuírem tão valorosamente.

À Prof^a. Dr^a **Simone** Santos, pela disposição na leitura desta tese, sendo a relatora da mesma e pelo carinho constante.

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, pelo companheirismo e disponibilidade.

Aos técnicos do Laboratório **Gorete, Bernardo, Clélia, Luzia e Sérgio**, pela disponibilidade em atender às solicitações, pelo carinho e amizade. Vocês são muito preciosos. Muito obrigada por tudo!

Ao secretário do curso de Pós-graduação em Microbiologia, **Douglas Nunes**, por sempre nos atender tão prontamente, pelo carinho e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB/UFMG, na pessoa da Prof. **Cláudio Bonjardim**, pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

Aos **funcionários** e **colegas** de todo o Departamento de Microbiologia, que de alguma forma, colaboraram para minha formação, ficam meus agradecimentos.

À todos os professores da UNIVALE, especialmente, Prof^a **Lúcia** Alves de Oliveira Fraga e **Cármem** Helena Barbosa do Vale pela enorme contribuição em minha formação acadêmica inicial. Também à Elaine, na época, técnica do laboratório, que me auxiliou nos primeiros passos no mundo da microbiologia, meus sinceros agradecimentos.

Meu honroso agradecimento **às pacientes** do ambulatório Carlos Chagas HC/UFMG, sem as quais a realização deste trabalho, não seria possível.

A Universidade Federal de Minas Gerais (**UFMG**), Instituto de Ciências Biológicas (**ICB**), Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela infra-estrutura e recursos financeiros disponibilizados, fundamentais para a concretização.

A empresa farmacêutica MEDLEY/AS pela disponibilização das drogas antimicrobianas testadas.

Ao **CNPq**, pela contribuição e suporte financeiro.

As amigas-irmãs Ana Cecília e Larissa, minhas grandes amigas que muito contribuíram para minha formação intelectual. Muito Obrigada!

A **Kátia** Brandão e sua família, que muito me ajudou nesta conquista, sempre me apoiando e dando forças, que mesmo na distância, sempre se mostrou presente.

Ao **Rafael**, por ter sua amizade e carinho e, sobretudo por eu ter merecido ser adotada como sua irmã aqui em BH e à **Danúbia**, pelo carinho e amizade, pela demonstração de força e coragem, que me impulsiona a lutar sempre.

Aos todos os meus **amigos**, pela companhia e por poder compartilhar com vocês esta alegria.

E ainda a **todos** que contribuíram para que eu concretizasse mais esta etapa. Em especial, agradeço pelo apreço e satisfação em poder contar sempre com vocês!

RESUMO

A vaginose bacteriana (VB) é uma condição associada a alterações na microbiota vaginal, normalmente dominada por espécies de *Lactobacillus* spp., que passam a ser substituídas principalmente por *Gardnerella vaginalis*. A compreensão da ecologia microbiana vaginal é fundamental para o aprimoramento das estratégias terapêuticas, uma vez que os tratamentos convencionais podem comprometer a microbiota autóctone, favorecer reinfecções, selecionar microrganismos resistentes e causar efeitos adversos. Nesse contexto, o uso de microrganismos probióticos surge como uma alternativa terapêutica promissora, pois esses agentes podem colonizar o trato vaginal, inibir patógenos urogenitais, apresentar baixo risco de seleção de resistência e contribuir para a restauração da microbiota vaginal. Este estudo teve como objetivos caracterizar a microbiota vaginal de mulheres saudáveis e com VB, com ênfase em *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp.; determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de linhagens de *G. vaginalis*; e selecionar linhagens de lactobacilos com potencial probiótico avaliado *in vitro* e *in vivo*, utilizando animais gnotobióticos. Participaram da pesquisa 70 mulheres, sendo 30 com VB e 40 sem VB, atendidas no Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Os espécimes vaginais foram cultivados em meios seletivos, e as espécies bacterianas foram identificadas por metodologias previamente padronizadas. As linhagens de *G. vaginalis* foram submetidas a testes de suscetibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica. As linhagens de *Lactobacillus* spp. foram avaliadas quanto ao potencial probiótico por meio da produção de substâncias antagonistas, pela técnica da sobrecamada, e pela produção de peróxido de hidrogênio *in vitro*. A linhagem selecionada, *Lactobacillus johnsonii*, isolada de paciente saudável, foi inoculada em camundongos gnotobióticos, posteriormente desafiados com *G. vaginalis*, com ou sem indução hormonal. Os resultados demonstraram maior frequência de *G. vaginalis* em mulheres com VB, enquanto *Lactobacillus* spp. predominaram em mulheres saudáveis, especialmente *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. johnsonii*. As linhagens de lactobacilos isoladas de pacientes sem VB apresentaram produção significativamente maior de substâncias antagonistas e peróxido de hidrogênio. A linhagem de *L. johnsonii* selecionada mostrou capacidade de colonizar animais gnotobióticos e oferecer proteção parcial contra a infecção experimental por *G. vaginalis*, evidenciada por contagens bacterianas e análises histopatológicas. A administração hormonal não influenciou significativamente a colonização por *G. vaginalis*, mas afetou a colonização por *L. johnsonii*. Conclui-se que determinadas espécies de *Lactobacillus* spp. são essenciais para a manutenção da saúde do ecossistema vaginal, enquanto *G. vaginalis* desempenha papel central na etiologia da VB. Além disso, foi possível identificar uma linhagem de *Lactobacillus johnsonii* com características probióticas promissoras, demonstradas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Vaginose bacteriana, *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, probiótico, gnotobiótico.

ABSTRACT

Bacterial vaginosis (BV) is a condition associated with alterations in the vaginal microbiota, which is normally dominated by *Lactobacillus spp.* and becomes mainly replaced by *Gardnerella vaginalis*. Understanding vaginal microbial ecology is essential for improving therapeutic strategies, since conventional treatments may disrupt the autochthonous microbiota, promote reinfections, select resistant microorganisms, and cause adverse effects. In this context, the use of probiotic microorganisms emerges as a promising therapeutic alternative, as these agents can colonize the vaginal tract, inhibit urogenital pathogens, present a low risk of resistance selection, and contribute to the restoration of the vaginal microbiota. This study aimed to characterize the vaginal microbiota of healthy women and women with BV, with emphasis on *Gardnerella vaginalis* and *Lactobacillus spp.*; to determine the antimicrobial susceptibility profile of *G. vaginalis* strains; and to select *Lactobacillus* strains with probiotic potential evaluated *in vitro* and *in vivo*, using gnotobiotic animals. Seventy women participated in the study, 30 with BV and 40 without BV, assisted at the Gynecology Service of the Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais (UFMG). Vaginal specimens were cultured on selective media, and bacterial species were identified using previously standardized methodologies. *G. vaginalis* strains were subjected to susceptibility testing against the antimicrobials most commonly used in clinical practice. *Lactobacillus spp.* strains were evaluated for probiotic potential through the production of antagonistic substances using the overlay technique and by hydrogen peroxide production *in vitro*. The selected strain, *Lactobacillus johnsonii*, isolated from a healthy patient, was inoculated into gnotobiotic mice, which were subsequently challenged with *G. vaginalis*, with or without hormonal induction. The results demonstrated a higher frequency of *G. vaginalis* in women with BV, whereas *Lactobacillus spp.* predominated in healthy women, especially *L. crispatus*, *L. jensenii*, and *L. johnsonii*. *Lactobacillus* strains isolated from women without BV showed significantly higher production of antagonistic substances and hydrogen peroxide. The selected *L. johnsonii* strain was able to colonize gnotobiotic animals and provided partial protection against experimental infection with *G. vaginalis*, as evidenced by bacterial counts and histopathological analyses. Hormonal administration did not significantly influence colonization by *G. vaginalis* but affected colonization by *L. johnsonii*. It is concluded that certain *Lactobacillus spp.* species are essential for maintaining the health of the vaginal ecosystem, whereas *G. vaginalis* plays a central role in the etiology of BV. In addition, a *Lactobacillus johnsonii* strain with promising probiotic characteristics was identified, as demonstrated *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Bacterial vaginosis; *Lactobacillus spp.*; *Gardnerella vaginalis*; probiotic; gnotobiotic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluido vaginal em pacientes com sintomas de vaginose bacteriana.....	24
FIGURA 2 - (A) Vaginose bacteriana, (B) Condição Normal.....	25
FIGURA 3 - Introdução do espéculo vaginal em paciente apresentando quadro clínico de vaginose bacteriana com corrimento branco acinzentado.....	60
FIGURA 4 - Paciente apresentando quadro clínico de vaginose bacteriana.....	61
FIGURA 5 - Coleta de material utilizando alça calibrada	62
FIGURA 6 – Teste de antagonismo microbiano <i>in vitro</i>	75
FIGURA 7 - Técnica de administração intravaginal de microrganismos crescidos em caldo.....	80
FIGURA 8 – Anatomia do trato urogenital da fêmea do camundongo de laboratório.....	84
FIGURA 9 - Aspecto <i>in vivo</i> do trato urogenital da fêmea do camundongo NIH.....	66
FIGURA 10 - Macerador e pistilo utilizados para homogeneização dos tecidos vaginais de camundongos NIH isentos de germes.....	85
FIGURA 11 - Distribuição dos valores de pH do fluido vaginal de mulheres VB.....	85
FIGURA 12 - Perfil clínico das pacientes em relação à presença de leucócitos no exame à fresco.....	89
FIGURA 13 - Perfil clínico das pacientes em relação à presença de leucócitos na coloração de Gram.....	92
FIGURA 14 - Relação da faixa etária com o quadro clínico da paciente	93
FIGURA 15 - Relação da raça com o quadro clínico da paciente.....	94
FIGURA 16 . Colônias sugestivas de <i>G. vaginalis</i> com β -hemólise difusa, no meio agar vaginalis, provenientes de paciente sintomática para vaginose bacteriana.....	106
FIGURA 17 . Identificação presuntiva, em CHROMágar® <i>Candida</i> , de leveduras isoladas de espécimes de pacientes com e sem vaginose bacteriana	107
FIGURA 18 . Perfil eletroforético dos espaçadores longo, médio e curto amplificados, correspondentes à região intergênica 16S-23-S do rDNA de <i>Lactobacillus</i>	111
FIGURA 19 - Espécies de <i>Lactobacillus</i> recuperadas de pacientes com e sem VB.....	114
FIGURA 20 . Expressão da atividade antagonista de <i>Lactobacillus johnsonii</i> (P12) revelada com <i>Gardnerella vaginalis</i> ATTC 14018.....	127
FIGURA 21 . Expressão da atividade antagonista de <i>Lactobacillus johnsonii</i> (P12) revelada com <i>L. monocytogenes</i> ATTC 15313.....	127
FIGURA 22 - (a) Placa de TMB-plus, com amostras de <i>Lactobacillus</i> spp. submetidas a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio. (b) As setas indicam forte produção de H ₂ O ₂ pela linhagem de <i>Lactobacillus johnsonii</i> isolada de paciente saudável.....	131
FIGURA 23 - Proporção de amostras sensíveis e resistentes aos imidazólicos para amostras de <i>G. vaginalis</i> isoladas de pacientes com e sem vaginose bacteriana	131
FIGURA 24 - Contagem de <i>L. johnsonii</i> em camundongos gnotobióticos.....	141
FIGURA 25 - Contagem de <i>G.vaginalis</i> em camundongos gnotobióticos.....	142
FIGURA 26 - Contagem de <i>L. johnsonii</i> em camundongos gnotobióticos, no grupo controle e no grupo desafiado, com e sem hormônio.....	143
FIGURA 27 - Contagem de <i>G. vaginalis</i> em camundongos gnotobióticos do grupo controle e no grupo tratado, com e sem hormônio.....	145
FIGURA 28 - Corte histológico (4X) da mucosa vaginal de camundongos <i>germ free</i>	146

FIGURA 29- Corte histológico (4X) da mucosa vaginal de camundongos <i>germ free</i>	146
FIGURA 30- Corte histológico (40X) da mucosa vaginal de camundongos gnotobióticos, infectados com <i>G. vaginalis</i> , tratados com hormônio.....	147
FIGURA 31- Corte histológico (40X) da mucosa vaginal de camundongos gnotobióticos, infectados com <i>G. vaginalis</i> , tratados com hormônio.....	148
FIGURA 32- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos gnotobióticos, infectados com <i>G. vaginalis</i> , sem tratamento hormonal.....	149
FIGURA 33- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos gnotobióticos, que receberam <i>L. johnsonii</i> , com tratamento hormonal.....	150
FIGURA 34- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos gnotobióticos, que receberam <i>L. johnsonii</i> , sem tratamento hormonal.....	150
FIGURA 35- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos gnotobióticos, que receberam <i>L. johnsonii</i> + <i>G. vaginalis</i> , com tratamento hormonal.....	151
FIGURA 36- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos gnotobióticos, que receberam <i>L. johnsonii</i> + <i>G. vaginalis</i> , sem tratamento hormonal.....	152

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Relação do estado civil com o quadro clínico da paciente	96
TABELA 2. Comparação do número de relações sexuais com o quadro clínico da paciente....	97
TABELA 3. Comparação do tipo de vestuário com o quadro clínico da paciente	98
TABELA 4. Relação do método contraceptivo utilizado com o quadro clínico da paciente.....	99
TABELA 5. Frequência (%) e níveis populacionais de componentes microbianos	102
TABELA 6. Frequência (%) e níveis populacionais de <i>Candida</i> spp.no fluido vaginal.....	108
TABELA 7. Frequência (%) e níveis populacionais de <i>Lactobacillus</i> spp. no fluido vaginal.....	112
TABELA 8- Espécies de <i>Lactobacillus</i> isolados de espécimes clínicos em pacientes com ou sem vaginose bacteriana.....	115
TABELA 9- Relação de heteroantagonismo por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes sem vaginose bacteriana	117
TABELA 10- Relação de heteroantagonismo por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes com vaginose bacteriana	118
TABELA 11- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes sem vaginose bacteriana, contra isolados clínicos de <i>G. vaginalis</i> oriundos de pacientes com vaginose bacteriana	119
TABELA 12- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes sem vaginose bacteriana, contra isolados clínicos de <i>G. vaginalis</i> oriundas de pacientes sem vaginose bacteriana	120
TABELA 13- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes com vaginose bacteriana, contra isolados clínicos de <i>G. vaginalis</i> oriundas de pacientes com vaginose bacteriana	121
TABELA 14- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes com vaginose bacteriana, contra isolados clínicos de <i>G. vaginalis</i> oriundas de pacientes sem vaginose bacteriana	122
TABELA 15- Média da frequência de produção de substâncias antagonistas por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes sem vaginose bacteriana, contra isolados clínicos de <i>G. vaginalis</i> oriundas de pacientes com e sem vaginose bacteriana	123
TABELA 16 - Média da frequência de produção de substâncias antagonistas por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes Com vaginose bacteriana, contra isolados clínicos de <i>G. vaginalis</i> oriundas de pacientes Com e Sem vaginose bacteriana	123
TABELA 17- Relação de auto e isoantagonismo produzida por linhagens de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de pacientes com e sem vaginose bacteriana	124
TABELA 18- Produção de peróxido de hidrogênio pelas espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas de pacientes sem vaginose bacteriana	130
TABELA 19- Produção de peróxido de hidrogênio pelas espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas de pacientes com vaginose bacteriana	130
TABELA 20- Concentrações inibitórias mínimas de agentes antimicrobianos para amostras de <i>G. vaginalis</i> isoladas de pacientes com e sem vaginose bacteriana	135
TABELA 21 – Níveis vaginais médios (\log_{10} UFC/g de tecido vaginal) de <i>L johnsonii</i> e <i>G. vaginalis</i> nos diferentes grupos de animais gnotobióticos.....	145

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Diagnóstico de VB segundo os critérios de Nugent.....	26
QUADRO 2 – Perfil de digestão dos espaçadores por PCR de espécies de <i>Lactobacillus</i>	73
QUADRO 3 - Sequência de eventos realizados com animais <i>germ free</i>	82
QUADRO 4 - Resumo dos dados histopatológicos encontrados na condição estudada.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

Agar BHI: *Brain Heart Infusion Agar*

MRS: Mann, Rogosa & Sharp

ATCC: *American Type Culture Collection*

AV: Agar Vaginalis

BBE: Bacteroides Bile Esculina

BGP: Bastonete Gram Positivo

CBGLPL: Cocobacilo Gram Lábil Pleomórfico

DIP: Doença Inflamatória Pélvica

DIU: Dispositivo Intra Uterino

DST: Doença Sexualmente Transmissível

F6 PPK: Frutose-6-Fosfato Fosfocetolase

GN: Gnotobiótico

HPV: *Human Papiloma Virus*

LTB: Laqueadura Tubária Bilateral

MIC: Concentração Inibitória Mínima MRS:

Man, Rogosa and Sharp

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

PCR-ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

VAM: Agar Vaginalis Modificado

VB: Vaginose Bacteriana

TMB: *Tetramethyl - Benzidine* (ICN, USA)

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	17
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Microbiota vaginal	19
2.2 Vaginose Bacteriana: Aspectos Gerais e Etiologia.....	25
2.3 Aspectos epidemiológicos de VB no Brasil	27
2.4 Fatores de Risco para Vaginose Bacteriana	31
2.5 Microrganismos envolvidos na Vaginose Bacteriana	37
2.6 Substâncias Envolvidas no Fenômeno do Antagonismo Bacteriano	46
2.7 Utilização de <i>Lactobacillus</i> spp. como Probiótico no Tratamento	55
2.8 O modelo animal gnotobiótico.....	54
3.0 OBJETIVOS	57
4.0 PACIENTES E MÉTODOS	58
4.1 Aspectos Gerais.....	58
4.2 Exame Físico e Dados Laboratoriais	60
4.3 Metodologia – Coleta e Processamento	61
4.4 Identificação presuntiva e manutenção das amostras	64
4.5 Identificação de espécies do gênero <i>Candida</i>	68
4.6 Identificação das amostras do gênero <i>Lactobacillus</i>	69
4.7 Produção de substâncias antagonistas	74
4.8 Função de Proteção Ecológica.....	78
4.9 Análise Estatística dos Dados – Aspecto Epidemiológico.....	86
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1 Dados clínico-laboratoriais das 70 pacientes	87
5.2 Fatores analisados relativos às pacientes	92
5.3 Microbiota do ecossistema vaginal	101
5.4 Produção de Substâncias Antagonistas por <i>Lactobacillus</i> spp.....	118

5.5 Produção de Peróxido de Hidrogênio.....	129
5.6 Determinação das concentrações inibitórias mínimas	131
5.7 Teste de colonização e antagonismo <i>in vivo</i>139
5.8 Anatomopatologia.....	145
6.0 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
ANEXOS	190

1.0 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

A vagina humana é um ecossistema dinâmico em sua estrutura e composição microbiana, cujo equilíbrio está sob a influência de fatores internos, fisiológicos, particularmente hormonais e externos, que incluem uma variedade de hábitos e comportamentos individuais, bem como drogas utilizadas na terapêutica de processos infecciosos diversos que ocorrem neste sítio.

A Vaginose Bacteriana (VB) é considerada por alguns autores como uma doença polimicrobiana, representada por um desequilíbrio da microbiota normal da vagina, predominantemente aeróbia (*Lactobacillus* spp.) com o aumento de outros microrganismos, sendo *Gardnerella vaginalis* considerada o microrganismo “chave” na infecção. As razões para seu grande potencial patogênico, comparadas ao de outras bactérias têm sido objeto de muitas pesquisas e controvérsias. Os mecanismos de patogenicidade relativos à *G. vaginalis* ainda não estão totalmente elucidados.

Apesar de o corrimento o sintoma mais frequente nas práticas ginecológicas, tem sido dada, ainda hoje, pouca importância a este fato, uma vez que as próprias pacientes não têm consciência dos eventuais riscos e, muitas vezes, se automedicam, prejudicando o diagnóstico do quadro e o tratamento.

VB representa o distúrbio mais comum do trato genital de mulheres em idade reprodutiva, sendo o corrimento vaginal, o motivo principal das consultas ginecológicas. Esta condição clínica tem sido também observada em mulheres grávidas e virgens, motivo pelo qual não é considerada como de transmissão sexual exclusiva. Em mulheres na menopausa, nas quais há elevação natural do pH vaginal devido a alterações hormonais, os dados sobre a prevalência de VB são ainda muito controversos.

Estudos sobre as infecções vaginais no Brasil são muito raros, sendo que, em Minas Gerais, estes estudos são incipientes. Desta forma, pouco se conhece sobre a real ocorrência destas infecções em nosso meio, assim como sobre os agentes envolvidos nestas afecções.

Uma vez que a causa de VB não é completamente entendida, acredita-se ser este estudo de grande interesse para a Saúde Pública, principalmente para a saúde

da mulher, não apenas por sua elevada frequência, mas também por suas implicações de ordem obstétrica.

A proposta deste trabalho foi dar continuidade a um estudo desenvolvido como linha de pesquisa em nosso laboratório, como um desdobramento do projeto do nosso grupo de pesquisa “Ocorrência e etiologia de infecções cérvico-vaginais: aspectos clínicos e microbiológicos”, de interesse básico e para a saúde pública. Dentro deste projeto já foram defendidas três dissertações de Mestrado (SOARESBRANDÃO, 2004; TEIXEIRA, 2005; CARVALHO, 2007) e uma tese de Doutorado (RIBEIRO-BRANCO, 2005).

O trabalho aborda aspectos clínicos, microbiológicos e epidemiológicos das infecções vaginais que acometem pacientes que utilizam os serviços de saúde, particularmente o Hospital das Clínicas - UFMG (HC-UFMG), em Belo Horizonte. As infecções vaginais foram investigadas quanto à sua etiologia, assim como quanto aos fatores predisponentes e causais relacionados às mesmas. Foi realizado paralelamente a este, um estudo com pacientes saudáveis com o objetivo de se traçar um perfil correlacionando os dados clínicos e microbiológicos.

Além disso, ousamos propor um modelo animal gnotobiótico, para estudar a colonização por *G. vaginalis*, bem como verificar as propriedades probióticas de uma linhagem de *Lactobacillus* spp. isolada de paciente saudável, visto que, na literatura disponível, não foi encontrado nenhum estudo em modelo animal com *G. vaginalis*. Com isso, esperamos colaborar para o desenvolvimento de novos estudos que possam trazer benefícios diretos à saúde da mulher, buscando probióticos com potencial para ajudar na prevenção e tratamento das infecções vaginais.

Assim, considerando a nosologia regional e a carência de dados quanto a aspectos etiológicos da vaginose bacteriana e a importância de se dispor de um modelo animal que permita selecionar probióticos vaginais, esperamos que este trabalho represente, de fato, uma contribuição relevante, tanto para a Microbiologia como para a Clínica Médica. O campo de trabalho é amplo e rico, e os estudos são promissores.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota vaginal

A camada mucosa que reveste o trato genital normal é colonizada por várias espécies de bactérias comensais, que não causam danos ao hospedeiro, exceto sob circunstâncias de desequilíbrio. No trato genital feminino esta microbiota residente é chamada de microbiota vaginal indígena.

Segundo Paavonen (1983), o fluido vaginal normal apresenta vários componentes, incluindo água, eletrólitos, células epiteliais, microrganismos, ácidos graxos, proteínas e carboidratos. O maior volume deste fluido vaginal tem origem no transudato seroso dos capilares da parede vaginal, enquanto a menor porção é proveniente da glândula de Bartholin, da cérvice, da cavidade endometrial e das trompas ovarianas.

A vagina e sua microbiota compõem um ecossistema finamente balanceado, com o meio vaginal controlando os tipos de microrganismos presentes e, em contrapartida, o ambiente vaginal é influenciado pela microbiota presente (PYBUS & ONDERDONK, 1998). Este ecossistema é dinâmico e complexo, as mudanças são influenciadas, na sua estrutura e composição, pela idade, menarca, duração do ciclo menstrual, gravidez, infecções, métodos contraceptivos, frequência de relações sexuais, número de parceiros sexuais, conduta sexual, bem como uma variedade de hábitos e práticas, como o uso de ducha vaginal (BURTON *et al.*, 2003).

O sítio vaginal funciona como um ecossistema decorrente do interrelacionamento dos microrganismos com produtos metabólicos deste sítio, pH do meio e concentração de hormônios da mucosa (estrógenos) dependentes da idade. O desequilíbrio da microbiota normal leva à predisposição a infecções e possíveis inflamações. Esta modificação pode ser causada por fatores externos, internos ou ambos, a saber:

Fatores Internos:

Balanceamento dos níveis hormonais: O balanço de hormônios influencia a microbiota vaginal, sendo que, a vagina é bem protegida durante a ovulação

(aproximadamente duas semanas antes da menstruação) e menos protegida quando os níveis hormonais são baixos (na fase de pré-puberdade e menopausa). As mulheres possuem hormônios, que controlam o ciclo menstrual, sendo o estrogênio e a progesterona, que são responsáveis pela harmonia do organismo feminino (LEPARGNEUR E ROUSSEAU, 2002).

Uso de medicamentos e drogas: O uso de antimicrobianos para o tratamento de infecções pode alterar o ambiente vaginal e podem influenciar na constituição do tecido vaginal.

Estado de saúde da mulher (estado psicológico, estresse, cansaço): Dependendo do estado de saúde da mulher, microrganismos patogênicos têm apresentando condições para invasão do tecido vaginal. Dodson e Friedrich, (1978) foram os primeiros a considerar a infecção vaginal como uma questão psicossomática, que na maioria dos casos respondia à psicoterapia. A partir desses trabalhos, começou-se a evidenciar as possíveis relações entre fatores psicológicos e infecções genitais.

Woodward, (1981), procurou determinar os motivos que levariam ao sintoma e à manutenção do quadro psicossomático, assim como qual seria o melhor tratamento. Quatro categorias foram reconhecidas como determinantes da presente condição, embora algumas pacientes fossem incluídas em mais de uma: a) atitude parental causando culpa; b) ressentimento frente ao parceiro; c) nervosismo e ansiedade e d) reação a problemas atuais. O tratamento embasava-se no reconhecimento e aceitação dos sentimentos reprimidos. A maior parte delas (92%) obteve melhora e supressão dos sintomas.

Fatores Externos:

Mecânicos: fatores que causam dano ao tecido vaginal, como a intervenção médica, ato sexual, introdução de objetos estranhos, entre outros.

Químicos: uso de alguns tipos de produtos para anticoncepção ou produto cosmético que podem causar alergias

Higiene pessoal: Negligência na higiene vaginal ou hábitos inadequados como duchas e sabonetes inapropriados, que alteram o equilíbrio natural entre os microrganismos.

Intercurso sexual: O esperma é alcalino e altera o pH da vagina. A capacidade de reparar o ambiente vaginal varia de mulher para mulher e algumas podem apresentar dificuldade na recuperação do equilíbrio vaginal.

Todos os fatores citados anteriormente, podem levar a um desequilíbrio da microbiota e, conseqüentemente, a uma alteração do ecossistema vaginal normal, com quadros de irritação vaginal, normalmente associados com corrimento vaginal característico. Dentre as condições clínicas encontradas neste sítio, tem-se a “vaginite específica” de origem inflamatória, com leucorreia e prurido, que pode ser causada geralmente, por *Candida* spp. ou *Trichomonas vaginalis* e a “vaginite inespecífica” de origem bacteriana, acompanhada, em geral, de um conjunto de sintomas como: corrimento homogêneo e fétido, alteração no valor do pH vaginal, ausência de inflamação da parede vaginal e pequeno número de leucócitos.

Usa-se o termo vaginose para diferenciá-lo da vaginite, na qual ocorre uma verdadeira infecção dos tecidos vaginais. Na vaginose, por outro lado, as lesões dos tecidos não existem ou são muito discretas, caracterizando-se apenas pelo rompimento do equilíbrio microbiano vaginal normal (VERHELST, 2006).

Assim, são três os principais tipos de vaginites infecciosas: vaginose bacteriana, candidíase e tricomoníase, sendo estes processos infecciosos os que mais acometem os órgãos genitais femininos atingindo entre 15% e 20% as mulheres americanas (EUA) (SOBEL, 1998). A vaginose bacteriana é considerada, atualmente, a infecção vaginal de maior prevalência em mulheres em idade reprodutiva e sexualmente ativas, correspondendo a 90% dos casos de infecções vaginais neste país. Sendo que a VB ocorre em 35-50% dos casos, enquanto a candidíase em 20-40% e a tricomoníase em 10-30%. Em 1955, foi originalmente descrita por Gardner e Dukes uma vaginite não específica caracterizada por secreção vaginal acinzentada, de odor fétido, com pH mais elevado que o normal, e com mínima inflamação local, tendo como agente principal a *Gardnerella vaginalis*.

2.2 Vaginose Bacteriana: Aspectos gerais, manifestações e diagnóstico clínico - microbiológico.

Atualmente, a “vaginite inespecífica” tem sido denominada Vaginose Bacteriana (VB), sendo de natureza não inflamatória, sem etiologia definida, representada, microbiologicamente, por uma alteração da microbiota vaginal, na qual a microbiota dominante, composta por *Lactobacillus* spp. é substituída por outra, mista, constituída, na maioria dos casos, por bactérias anaeróbias obrigatórias. Nesta condição, podem ser encontrados *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. e anaeróbios facultativos, destacando-se, entre esses, *Gardnerella vaginalis*, microrganismo que tem prevalecido como o mais frequentemente isolado (DONDERS, 1999; CALZOLARI *et al.*, 2000; DELANEY & ONDERDONK, 2001; BRANDÃO, *et al.*, 2004).

A Vaginose Bacteriana, usualmente não é acompanhada por uma resposta inflamatória, razão da utilização do sufixo “ose”, distinguindo este quadro daqueles causados por *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*, classicamente denominados de vaginites (SPIEGEL, 1991; CATLIN, 1992). A possível razão para a ausência de leucócitos na secreção parece estar relacionada com a inibição da quimiotaxia destas células em consequência da produção de ácido succínico pelas bactérias normalmente presentes nesta condição, como *Prevotella* spp. e *Mobiluncus* spp. (AL-MUSHRIF *et al.*, 2000). Alguns autores, entretanto, detectaram um número aumentado de leucócitos em quadros de VB, enquanto outros sugerem que a presença de leucócitos polimorfonucleares em abundância não é compatível com esta síndrome, gerando controvérsias em relação ao seu diagnóstico e à utilização do termo vaginose para definir esta patologia (DEMIREZEN, 2003; JUNIOR & CAVALCANTE, 2004).

Esta infecção é um processo polimicrobiano e parece depender do sinergismo entre *G. vaginalis* e bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas da vagina (JOSEY & SCHWEBECK, 2008; GIRALDO *et al.*, 2008; GARDNER, 1980; MENDEL & HABERMAN, 1965). Esses microrganismos podem ser recuperados do sítio em questão de mulheres saudáveis, em baixas concentrações, aparecendo, com

crescimento elevado, dado sugestivo de sua participação na agressão no ecossistema vaginal alterado.

No entanto, a frequência com que esses microrganismos são encontrados varia de acordo com cada estudo feito, devido às diferenças na população estudada, no modo de coleta do material, nos métodos de cultura e nos critérios de identificação dos isolados (SILVINO *et al.*, 2006).

A VB apresenta aspectos peculiares, tais como: descarga vaginal homogênea, corrimento com odor de peixe, com ou sem adição de KOH, pH vaginal acima de 4,5, com a presença de “clue cells” ou células indicadoras, que representam células vaginais ou ectocervicais descamadas intensamente e parasitadas em sua superfície, devido à aderência de, predominantemente, *G. vaginalis*, mas podendo observar, também, *Bacteroides* spp. e *Mobiluncus* spp. (AMSEL *et al.*, 1983, VILLEGAS *et al.*, 1995, DONDEERS, 1999).

Além dos danos causados à saúde das mulheres, VB está associada a muitas complicações relacionadas à saúde reprodutiva da mulher. Em mulheres grávidas, há risco aumentado de infecções do líquido amniótico, ruptura prematura de membranas, abortamentos, sépsis neonatal, partos prematuros e endometrite pós-cesárea, havendo também a possibilidade da concepção de bebês com baixo peso.

A ênfase em *Gardnerella vaginalis* se fundamenta nos dados prévios da literatura, também por sua participação em outras infecções, entre as quais do trato urinário, endometrites, salpingites, infecções pós-operatórias e até mesmo, neoplasia cervical.

Como mencionado, a VB está associada a alterações da microbiota vaginal indígena, admitindo-se tal relação com o uso de duchas vaginais higiênicas, de dispositivos intra-uterinos (DIU), aumento do número de parceiros sexuais e fatores hormonais, além de outros, como nível sócio econômico e hábitos de higiene das pacientes.

O diagnóstico das infecções vaginais é, na maioria das vezes, realizado apenas baseado nas queixas relatadas pela paciente (ALLEN-DAVIS *et al.*, 2002). Alguns profissionais julgam ser suficiente apenas a observação do corrimento pelo exame

especular, desconhecendo que este procedimento pode induzi-lo a erro em mais de 50% das vezes (GIRALDO *et al.*, 1994).

Talvez estes fatos justifiquem os habituais erros médicos nesta área, e os freqüentes insucessos terapêuticos que levam a mulher a uma constante troca de profissional, passando a fazer uso abusivo de medicamentos. Existe, portanto, uma necessidade de implementar a forma diagnóstica dos processos inflamatórios e infecciosos das mucosas genitais femininas, unindo-se a anamnese detalhada ao exame especular, à mensuração do pH vaginal, à realização do teste das aminas e principalmente ao estudo microscópico do conteúdo vaginal (PORTO *et al.*, 1991).

O fluido vaginal em mulheres normais e em portadoras de VB (Figura 1) apresenta algumas características peculiares, das quais se destacam:

***Odor:** o cheiro de peixe no resíduo vaginal é causado pela presença de diaminas que se volatilizam pela alcalinização; putrescina e cadaverina são as diaminas encontradas em maior concentração, segundo Chen *et al.* (1979). Entre as mulheres com VB, essas diaminas não resultam do metabolismo da *G. vaginalis*, mas estão presentes como resultado do metabolismo de microrganismos anaeróbios, como afirmaram Chen *et al.* (1982). Este cheiro fétido é menos evidente em mulheres com tricomoníase, não sendo percebido naquelas sem sintomas (VONTVER & ESCHENBACH, 1981; ERKKOLS *et al.*, 1983; ISON *et al.*, 1983).

Sobel (1997) destaca que o maciço crescimento de anaeróbios na vagina está associado com o aumento da produção de enzimas carboxilases, peptídeos e uma variedade de aminas, que são voláteis em elevado pH e produzem odor, especialmente trimetilamina.



FIGURA 1 – Fluido vaginal característico em pacientes com sintomas de Vaginose Bacteriana.

Fonte: www.phac-aspc.gc.ca

***pH:** o pH do fluido vaginal de pacientes com VB é maior que 4,5, usualmente entre 5,0 e 5,5. Gardner & Dukes (1955) relataram que todas as pacientes com VB apresentavam pH maior que 4,5 e, destas, 91% maior que 5,0. Em contraste, 92% das mulheres com fluido vaginal normal apresentavam pH entre 4,0 e 4,5.

***Clue cells:** “clue cells”, “células guia” ou “células indicadoras”, observadas pelo método da coloração de Gram, descritas por Gardner & Dukes (1955) são células do epitélio vaginal que apresentam um grande número de células de *G. vaginalis* aderidas à sua superfície, o que lhes confere um aspecto granular nas porções citoplasmáticas, nuclear e nas bordas.

A coloração de Gram tem sido considerada como um seguro e fundamental método para diagnóstico, tendo a vantagem de fornecer um permanente registro, por ser uma técnica rápida e simples (Figuras 2A e 2B).

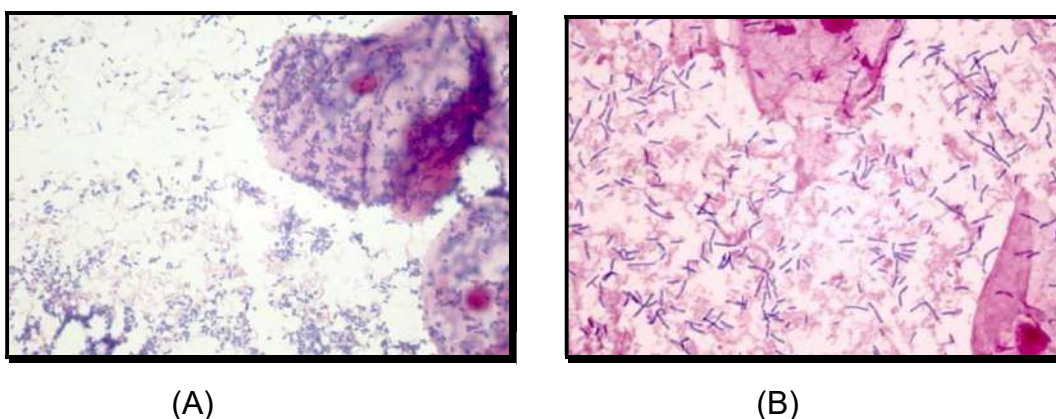


FIGURA 2 - (A) Vaginose Bacteriana - Células indicadoras intensamente parasitadas por cocobacilos pleomórficos Gram lábeis (B) Condição Normal - Abundância de morfotipos típicos de Lactobacilos

O critério de padronização do método de Gram foi desenvolvido por Spigel *et al* (1983). Hillier *et al.* (1993) demonstraram que este método apresenta uma sensibilidade e especificidade em torno de 62–100% e 79-100%, respectivamente. Nugent *et al.* (1991), obtiveram excelentes resultados, com reprodutibilidade da coloração de Gram, pelas modificações dos critérios de Spigel, utilizando um sistema de contagem, no qual a microbiota vaginal foi classificada como: normal, intermediária ou representativa de VB (Quadro 1).

QUADRO 1 – Diagnóstico de VB segundo os critérios de Nugent, 1991.

Gram – Diagnóstico de Vaginose Bacteriana		
Tipo morfológico	Número de organismos/campo de imersão	Pontuação
<i>Lactobacillus</i> spp ou Bacilos Doderlein (Bacilos Gram positivos em cadeias ou isolados, com lados paralelos e extremidades retas).	> 30	0
	5 - 30	1
	1 - 4	2
	1	3
	0	4
<i>Mobiluncus</i> (bacilos Gram negativos curvos).	0	0
	1 – 4	1
	5	2
<i>Gardnerella/Bacteroides</i> (cocobacilos Gram variáveis, delicados, pleomórficos) (Bacilos Gram negativos com vacúolos).	> 30	4
	5 – 30	3
	1 - 4	2
	1	1
	0	0
Some os pontos obtidos e verifique a interpretação:		
Pontuação	Interpretação	
0 – 3	Normal	
4 – 6	Intermediário	
7 – 10	Vaginose Bacteriana	

Ao exame microscópico do fluido vaginal de pacientes com VB, usualmente os lactobacilos e leucócitos estão ausentes, e as células epiteliais de 2 % a 50% são patognomônicas de “clue cells” (SPIEGEL, 1983).

Gardnerella vaginalis possui adesinas, de natureza protéica, expressas pelas fimbrias, estruturas filamentosas observadas em microscópio eletrônico, como descrito por Jhonson & Davies, (1984), e responsáveis pelo fenômeno das “clue

cells”, segundo Scott *et al.* (1987) e Ison & Easmon (1985). É evidente que outras bactérias podem, também, cobrir células do epitélio vaginal, originando falsas “clue cells” (VONTVER & ESCHENBACH, 1981 e BLACKWELL & BARLOW, 1982).

Vários autores têm encontrado uma boa correlação entre a presença de “clue cells” e o isolamento de *G.vaginalis*.

***Leucócitos**: a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) é, em geral, pequena, demonstrando que a infecção por *G.vaginalis* é de caráter superficial, não havendo como resposta a produção intensa de PMN (GARDNER & DUKES, 1955).

Segundo Mims *et al.* (1995) o diagnóstico clínico da VB pode ser feito tendo por base pelo menos três dos seguintes sinais e sintomas: descarga vaginal homogênea, excessiva e fétida; pH vaginal superior a 4,5; presença de células-guia e odor de amina, no teste do KOH.

Considerando o diagnóstico microbiológico, os primeiros isolamentos da *G.vaginalis* em meios de cultura foram efetuados nos meios de Casman – agar e Proteose peptona agar, ambos com 10 % de sangue desfibrinado de carneiro, usados, respectivamente, por Leopold (1953) e Gardner & Dukes (1955). Destacam-se as exigências nutricionais do microrganismo, cujo cultivo é realizado em meios contendo proteose peptona e sangue humano.

A identificação de *G. vaginalis* é feita através do estudo de suas propriedades bioquímicas, tais como fermentação de açúcares, hidrólise de diferentes substratos, inibição de crescimento por antimicrobianos ou outras substâncias e presença ou ausência de diferentes enzimas.

Simões *et al.* (2001) identificaram *G. vaginalis* por métodos clássicos e verificaram um perfil semelhante, quando se utilizava a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), amplificando o fragmento 16S RNA, justificando, portanto que por ser uma única espécie do gênero, métodos convencionais de identificação podem ser utilizados para este microrganismo.

2.3 Aspectos epidemiológicos de VB no Brasil

Em 1990, Francisco (USP-SP) estudou aspectos epidemiológicos e de diagnóstico laboratorial de *G. vaginalis* no trato geniturinário de homens e mulheres, e verificou que a frequência deste microrganismo em (2,3%) dos pacientes do sexo

masculino e (31,1%) das mulheres sintomáticas para VB e de (10,5%), para mulheres assintomáticas, concluindo que *G. vaginalis* estaria envolvida no processo infeccioso.

Em Belo Horizonte, Lara *et al.* (1999), examinando amostras de fluido vaginal para análise por citologia colhidas em laboratório privado, notaram que a frequência da infecção foi muito baixa, encontrando *G. vaginalis* em 14,1%, *Candida* spp. em 6,9% e *T. vaginalis* em 1,1% das mulheres. Estes resultados podem estar relacionados à melhor condição sócio-econômica das pacientes. Adicionalmente, pode-se constatar que a maioria dos pesquisadores baseia seu diagnóstico apenas em exames citológicos, sendo estas observações, portanto, de caráter superficial.

Murta *et al.* (2000) estudaram, em Uberaba, Minas Gerais, um grupo de mulheres com diagnóstico citológico de HPV para verificar a frequência de outros agentes, como *Candida* spp., *G. vaginalis* e *Trichomonas vaginalis* e concluíram que *G. vaginalis* foi o microrganismo mais comumente isolado nas portadoras de HPV.

Em relação ao parto prematuro espontâneo, Carvalho *et al.* (2001) verificaram, em São Paulo, que VB diagnosticada pelo Gram do conteúdo vaginal representa um fator de risco. De 541 pacientes estudadas, a vaginose foi diagnosticada em 19% dos casos. No grupo das gestantes com vaginose, 9,7% (10/103) evoluíram com parto prematuro, contra apenas 3,2% (14/438) no grupo negativo. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

Ainda em 2001, Adad *et al.*, em Uberaba, compararam a frequência de alguns microrganismos em amostras cérvico-vaginais em quatro diferentes décadas, de 1968 a 1998. Em 1988, 19,8% das mulheres tinham testes positivos para *G. vaginalis*, e foi a maior frequência diagnosticada naquele período. Entretanto, uma significativa redução foi observada nas duas décadas seguintes em que foram realizadas as avaliações (1988 e 1998). Em 2004, estes mesmos autores compararam a frequência de *G. vaginalis*, *T. vaginalis* e *Candida* spp. em amostras cérvico-vaginais observadas nas décadas mencionadas com a avaliação realizada em 2003 e constataram uma redução na frequência de *G. vaginalis* para 14%, sendo que as infecções estavam presentes em mulheres de idade reprodutiva, o que corrobora os dados também verificados por Catlin em 1992.

Em Brasília-DF, Simões-Barbosa *et al.* (2002), estudaram algumas Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) em 142.158 pacientes e encontraram

uma predominância de infecção por *G. vaginalis* de 17,2% , embora ainda se discuta se a VB é uma DST (NOGUEIRA *et al.*, 1997).

O Brasil é um país que apresenta profundas disparidades sócioeconômicas. Há uma grande divergência na prevalência destas infecções em diferentes regiões do país. Sabe-se que o norte do Brasil é caracterizado por sua alta pobreza, sendo, nesta região, muito precária a infra-estrutura para dar suporte à saúde da mulher, em comparação com outros locais do país. Reconhecendo que a zona rural raramente recebe cuidados relacionados à saúde, Soares *et al.* (2003) propuseram determinar quais eram as DSTs mais prevalentes em mulheres de idade reprodutiva em uma região rural, em Alagoas. A condição de descarga vaginal foi a mais encontrada nas pacientes (55,8%), estando significativamente associada com VB, onde a prevalência foi de 10%.

Lago *et al.* (2003) verificaram a prevalência de VB e outras infecções vaginais, bem como a incidência de complicações pelo uso de dispositivo intrauterino (DIU) em Campinas – SP. A presença de infecções cérvico-vaginais foi de 29,1%, sendo VB a mais freqüente. A influência do DIU na ocorrência de vaginose tem permanecido um fator controverso e, neste trabalho, não foram encontradas diferenças significativas.

Estudos brasileiros mostram que VB é prevalente em 20% das mulheres grávidas e que, além disso, um significativo aumento do risco de complicações neonatais está presente nesta população (CAMARGO *et al.*, 2005).

Oliveira *et al.*, (2005), no estado do Pará, estudaram a prevalência de VB associada a condições sócio-econômico-culturais de mulheres atendidas no hospital de tomé-açu (Amazonas) e perceberam que das 156 mulheres avaliadas, 57 apresentavam VB (36,54%), com as maiores prevalências destes casos associados a *G. vaginalis* (48,15%), em mulheres nas faixas etárias entre 21 e 30 anos, ou pela associação *G. vaginalis* e *Mobiluncus* spp. (36,36%). Em relação ao grau de escolaridade e ocupação, a maior prevalência de VB ocorreu em mulheres com 1º grau incompleto (47,37%) e com atividades do lar (21,05%) e comércio (22,81%).

Em um estudo transversal descritivo com 658 mulheres, Tanaka, *et al.*, (2007), encontraram em São Paulo uma prevalência de 29% para VB. Com relação ao perfil das mulheres que apresentavam VB, observou-se maior ocorrência em

jovens entre 10 e 19 anos (40%), negras (37,1%), viúvas (62,5%), com segundo grau incompleto (39,5%), heterossexuais (29,5%), com dois ou mais parceiros sexuais nos últimos 30 dias (50%) e nos últimos cinco anos (32,3%). A associação com outras doenças sexualmente transmissíveis, concomitante, foi encontrada em 31,9% dos casos.

Barcelos *et al.* (2008), descreveram a prevalência e o perfil comportamental para infecções genitais em 299 mulheres atendidas em uma Unidade Básica de Saúde em Vitória, Espírito Santo, por um estudo em corte transversal, realizado em mulheres de 15 a 49 anos, atendidas pelo Programa Saúde da Família (PSF). As taxas de prevalência foram: VB (21,3%), seguida de 9,3% com presença de *Candida spp.* *Chlamydia trachomatis* foi constatada em 7,4%; gonorréia e tricomoníase com 2% cada; e alterações citológicas sugestivas de vírus 3,3%. Os resultados mostraram alta frequência de infecções genitais e a necessidade de medidas de prevenção.

A predominância dos lactobacilos tem sido reconhecida como responsável pela manutenção do equilíbrio do ecossistema vaginal, por isso, Brolazo *et al.* (2009) estudaram, em São Paulo, a prevalência e caracterizaram espécies de lactobacilos vaginais em mulheres em idade reprodutiva sem vulvovaginites e verificaram maior prevalência de *L. crispatus* (30,1%), *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%). Após caracterização destas cepas, foi sugerido que os lactobacilos vaginais são verdadeiramente importantes para proteção contra várias infecções, principalmente a VB.

Zimmermann *et al.* (2009) em Juíz de Fora-MG estudaram a frequência de VB entre usuárias do serviço público e da rede privada de saúde, por estudos citológicos e verificaram que a avaliação macroscópica do fluxo genital, representada pela coloração, quantidade, aspecto e odor do fluxo genital foi considerada um bom parâmetro para o diagnóstico de VB e concluíram ainda que a frequência de VB não foi diferente entre pacientes da rede pública e privada, o que sugere que fatores sócio-econômicos não estão associados a esta.

À semelhança do Brasil, pouco se conhece a respeito da prevalência de *G. vaginalis* e em outros países da América do Sul. Pajaro *et al.* (1985), Diaz *et al.* (1985), e Onetto & Vargas (1985) obtiveram índices de positividade para *G. vaginalis*, em pacientes sintomáticos, com valores de 47,9%, 22,9% e 16,7%, respectivamente

(FRANCISCO, 1990). Bartolomeu *et al.* (2002), na Argentina, verificaram a prevalência de microrganismos associados à secreção genital feminina e encontraram 23,8% das pacientes estudadas com diagnóstico clínico para VB.

2.4 Fatores de Risco para Vaginose Bacteriana

A identificação de grupos de risco para VB pode contribuir para a prevenção da doença (SCHWEBKE & DESMOND, 2005; BARCELOS *et al.*, 2008).

2.4.1 Raça

Stevens - Simon *et al.* (1994) avaliaram as diferenças no pH vaginal de 273 adolescentes sexualmente ativas, sem VB e observaram que o pH era menor em adolescentes brancas.

Em estudo retrospectivo, Fiscella & Klebanoff, (2004) avaliaram 13.917 mulheres entre 1984 e 1989, durante a rotina pré-natal entre a 23ª e 26ª semana de gestação. Neste estudo, foi encontrada uma prevalência maior de VB entre mulheres negras do que em mulheres brancas. A causa para esta diferença não é conhecida, mas estudos prévios têm demonstrado que o pH vaginal das mulheres negras é maior do que o pH vaginal de mulheres brancas. Assim, haveria uma predisposição à VB entre as mulheres negras (STEVENS – SIMON *et al.*, 1994; ROYCE *et al.*, 1999). Hillier *et al.* (1992) observaram que estas diferenças de pH vaginal entre raças poderia ser explicada pela diferença na microbiota vaginal.

Alguns estudos demonstraram que há um menor número de *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio entre as mulheres negras, o que levaria a um aumento de bactérias anaeróbias associadas à VB (HAWES *et al.*; 1996 e ANTONIO *et al.* 1999). Royce *et al.* (1999), estudando mulheres brancas e negras entre a 24ª e 29ª semana de gravidez, também encontraram um valor de pH maior entre as mulheres negras.

Em um trabalho realizado com mulheres africanas atendidas em clínicas de DST, revelaram uma taxa de 47,6% de VB (DEMBA *et al.* 2005). Estes dados foram

comparados a outros trabalhos realizados em outras localidades, como em Burkina Faso, onde 20 a 23 % das mulheres atendidas exibiram VB; (COSTELLO *et al.* 2001) e na Tanzânia, com prevalência de VB em 37% das mulheres (MAYAUD *et al.*, 1998).

Em estudo recente de Paul *et al.*, (2008), foi constatado que 17% das mulheres brancas americanas foram positivas para vaginose bacteriana, comparado com uma positividade de 45% para mulheres negras.

As razões para estas taxas elevadas em pacientes negras, ainda não são bem compreendidas, embora seja sugerido que fatores sócio-econômicos e níveis educacionais possam estar associados, como mencionado (ROYCE *et al.*, 1999; HOLZMAN *et al.*, 2001; PAUL *et al.*, 2008).

2.4.2 Práticas Contraceptivas

Estudos realizados por Shoubnikova *et al.* (1997) e Avonts *et al.* (1999), demonstram uma associação entre o uso de DIU e aumento do risco de VB em relação às mulheres que utilizavam contraceptivos orais. As mulheres usuárias de DIU apresentaram pelo menos um episódio de VB durante 24 meses de seguimento. Esses autores sugeriram que a modificação na microbiota vaginal causada pela presença do DIU poderia promover o crescimento de microrganismos relacionados à VB.

A associação do uso de DIU com a presença de VB também foi citada por Aleixo Neto *et al.* (1987); Doria, (2003); Ferraz *et al.*, (2003) e Silva *et al.*, (2006). Por outro lado, Meirik (2007), não verificou associação do uso de DIU com VB.

Quanto ao uso de preservativos, em 2005, Schwebke & Desmond, verificaram que o uso de camisinha nas relações sexuais exerceu efeito protetor contra o desenvolvimento de VB, levando a crer que esta síndrome poderia ser sexualmente transmissível. Isso foi percebido também nos trabalhos de Hutchinson *et al.*, (2007) e Fethers *et al.*, (2008). Recentemente, Schwebke (2009), discorreu sobre alguns novos conceitos em VB e afirma que muitos questionamentos permanecem por ser esclarecidos, como por exemplo, a hipótese de VB ser ou não uma DST.

De acordo com Baeten *et al.* (2001), ao se comparar mulheres que não utilizam método contraceptivo hormonal oral; as usuárias de pílulas estavam associadas ao aumento do risco para aquisição de clamídia e *Candida spp.*, ocorrendo o contrário para VB, onde o uso de anticoncepcional oral mostrou-se eficaz como protetor para a ocorrência de infecção. Este dados foram ainda mencionados por Calzolari *et al.* (2000), Riggs *et al.* (2007) e Fonseca *et al.* (2008), mas nenhum mecanismo satisfatório foi descrito.

2.4.3 Outros fatores de risco

Fatores extrínsecos podem alterar o ecossistema vaginal. O uso de certos antibióticos, principalmente os de amplo espectro podem interferir na manutenção da microbiota residente.

Chiaffarino *et al.*, (2004) sugerem que alguns hábitos podem aumentar o risco para aquisição de VB, tais como: número de parceiros sexuais, o uso de calças e o uso de duchas vaginais. Brotman *et al.*, (2008) também relacionam uso de ducha com VB, porém, Giraldo *et al.* (2005) não perceberam esta associação em seu estudo.

A literatura pertinente indica que, o uso indiscriminado e frequente de duchas vaginais higiênicas poderia levar à perda do equilíbrio entre os vários microrganismos residentes na cavidade vaginal, facilitando o aparecimento e manutenção de infecções vaginais (GIRALDO *et al.*, 1999). Tal suposição seria justificada pelo fato de as duchas vaginais promoverem limpeza mecânica das bactérias próprias da flora local e ao mesmo tempo introduzir substâncias exógenas que poderiam alterar o pH vaginal e causar reações alérgicas locais (NESS *et al.*, 2003).

Outro fator importante que teoricamente poderia levar a alteração da microbiota vaginal, seja pela deposição de sêmen (meio alcalino) no epitélio vaginal, seja pelo estímulo local da mucosa ou mesmo pela introdução de bactérias estranhas ao ambiente vaginal, seria a alta frequência de coitos vaginais (JEREMIAS *et al.*, 1998).

2.4.4 Associação de VB com outras infecções

Segundo estudos de Pál *et al.*, (2005), pode haver a presença simultânea em pacientes com VB, de outros microrganismos tais como *Candida spp.*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *S. agalactiae*, *Enterococcus spp.*

Alterações da microbiota vaginal sugestivas de VB ocorrem com frequência significativamente maior entre as mulheres com anormalidades citológicas cervicais em comparação com aquelas cuja citologia cervical é normal (NARDUCCI *et al.*, 2000; KHARSANY *et al.*, 1993). Há, também, associação significativa entre HPV e microbiota indicativa de VB (MCNICOL *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 2007).

Assim, vem sendo sugerido que a VB também poderia ter papel importante no desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical devido às nitrosaminas oncogênicas produzidas pelas bactérias anaeróbicas e, ainda, devido ao estímulo para a produção de citocinas, como a interleucina 1 beta1 (BEHBAKHT *et al.*, 2002; HOUFFLIN-DEBARGE *et al.*, 2003;).

Embora os mecanismos virais e celulares que estão envolvidos na transmissão do HIV através do trato genital feminino ainda sejam pouco conhecidos, estudos epidemiológicos recentes mostram que VB está claramente associado com altas taxas de infecção pelo vírus HIV (ATASHILI *et al.*, 2008; SPEAR *et al.*, 2007) e o fato de ocorrer uma mudança do pH local, levando a uma diminuição da acidez, faz com que a vaginose bacteriana possa predispor a mulher a contrair o vírus.

2.4.5 Complicações relacionada à Vaginose Bacteriana

Vários estudos associam VB à importantes complicações, sendo que mulheres com este diagnóstico exibem maior risco de doença inflamatória pélvica (DIP), DIP pós aborto, infecções pós operatórias da cúpula vaginal após histerectomia, citologia cervical anormal, parto prematuro (PIATO, 2002) e aquisição de HIV (MARRAZO *et al.*, 2002).

A VB, se não tratada, pode ocasionar sérias complicações obstétricoginecológicas. Muitos estudos têm mostrado um aumento no risco de aborto no primeiro trimestre de gravidez, ruptura prematura de membranas corioamnióticas e parto prematuro (ESCHENBACH, 1989; HAY *et al.*, 1994; MCGREGOR *et al.*, 1995; OLEEN-BURKET & HILLIER, 1995; RALPH *et al.*, 1999).

Relação causal também foi observada entre VB e endometrites pós-parto, doença inflamatória pélvica e celulite vaginal após procedimentos invasivos, tais como biopsia endometrial, histerectomia, histerosalpingografia, instalação de dispositivo intra-uterino e curetagem uterina (MACDERMOTT, 1995; OLEENBURKET & HILLIER, 1995).

Muitos mecanismos foram propostos para explicar o surgimento destas complicações como:

- a) a infecção e os processos inflamatórios devidos a produtos microbianos e respostas maternas e/ou fetais, com produção de prostaglandinas e citocinas;
- b) um baixo potencial redox no tecido vaginal e um elevado pH vaginal, ambos contribuindo para um aumento dos patógenos;
- c) a presença de poliaminas e, possivelmente, outros produtos metabólicos além de enzimas liberadas pela microbiota vaginal, as quais reduzem a habilidade do hospedeiro em produzir uma resposta imune efetiva, como a produção de fosfolipase A₂ pelos microrganismos dominantes em VB, que pode precipitar a liberação de prostaglandinas, que aumentam a contractilidade uterina, levando ao risco de um parto prematuro (MARTIUS & ESCHENBACH, 1990; PLATZ-CHRISTENSEN *et al.*, 1992; HOLZMAN *et al.*, 2001; CAUCI *et al.*, 2003; ESPINOSA *et al.*, 2003).

2.4.6 Hormônios na vaginose bacteriana

Além da influência da comunidade microbiana do trato gastrintestinal, outros fatores desempenham papel relevante na complexidade da microbiota vaginal. O estrogênio parece representar um fator fundamental na colonização microbiana da

vagina. Antes da puberdade, quando os níveis desse hormônio estão baixos, a microbiota vaginal é constituída por poucas espécies de microrganismos, ausência de lactobacilos, predomínio de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e algumas bactérias anaeróbias obrigatórias (JAQUIERY *et al.*, 1999).

Em mulheres em idade reprodutiva, o estrogênio estimula a proliferação de células epiteliais, que produzem altos níveis de glicogênio, o que favorece a multiplicação dos lactobacilos, que se tornam as bactérias predominantes no canal vaginal. O metabolismo do glicogênio pelos lactobacilos resulta no aumento de ácido láctico e outros ácidos orgânicos no meio, que diminuem o pH vaginal, o que constitui um fator limitante para o crescimento de muitos microrganismos (BOSKEY *et al.*, 1999).

Quando a mulher inicia o período da menopausa, ocorre diminuição de estrogênio, o epitélio vaginal torna-se extremamente delgado, ocasionando diminuição ou até ausência de glicogênio. Acredita-se que a redução do glicogênio seja responsável, pelo menos parcialmente, pela diminuição de lactobacilos e elevação do pH evidenciadas na vagina destas mulheres. Esta mudança do ambiente permite que a vagina seja colonizada por bactérias patogênicas e, teoricamente, predispõe estas mulheres às infecções genitais (HILLIER & LAU, 1997; CARDOSO *et al.*, 2000; HALBE *et al.*, 2000; GALHARDO *et al.*, 2001).

Taylor- Robinson (2007) fez algumas considerações sobre a influência hormonal na microbiota vaginal em humanos e camundongos fêmeas. Este autor discute que o aumento nos níveis de estrogênio está associado com proliferação de células epiteliais escamosas estratificadas e as células superficiais se encontram grandes e achatadas com núcleos pequenos ou ausentes, em mulheres. Em murinos, a concentração de hormônios na secreção vaginal, seguido de administração experimental é insuficiente para inibir ou estimular a presença de microrganismos em testes *in vitro*. Já, em alguns trabalhos, os hormônios estão associados com mudanças no epitélio vaginal sem ter um efeito direto nos microrganismos, embora Ruiz *et al.*, (2000) questionem que não há muito conhecimento sobre as implicações do efeito hormonal sobre a microbiota vaginal.

Em modelo animal murino, a fase estrogênica é definida por células do epitélio escamoso, algumas nucleadas (fase estral precoce) ou exclusivamente não nucleadas (fase estral) (TAYLOR- ROBINSON, 2007). A maioria dos estudos em

vaginites têm empregado modelo animal murino para os experimentos *in vivo*. Estes modelos requerem que os animais estejam no estágio pseudo-estrus no período da inoculação vaginal para obter uma infecção intravaginal persistente (FIDEL, Jr *et al.*, 1993a). A condição pseudo-estrus pode ser obtida através de injeções subcutâneas de estradiol. O estrogênio converte o epitélio colunar para uma camada de epitélio escamoso estratificado espesso e aumenta o conteúdo de glicogênio e substratos para a multiplicação microbiana (FIDEL, Jr *et al.*, 2002).

2.5 Microrganismos envolvidos na Vaginose Bacteriana

A VB é uma condição clínica caracterizada por um desequilíbrio da microbiota vaginal normal, devido ao decréscimo ou ausência de lactobacilos, pertencentes à microbiota indígena vaginal, implicando, assim, em um aumento exagerado de bactérias, como: *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.* (HELTAI & TALENGHANY, 1959; SOBEL, 1997; DONDEERS, 1999; CALZOLARI *et al.*, 2000; DELANEY & ONDERDONK, 2001).

Dentre as espécies presentes em espécimes de fluido vaginal de mulheres com VB, a maior prevalência é de cocos (*Peptostreptococcus spp.* e *Peptococcus spp.*), e de espécies do gênero *Eubacterium* e *Bacteroides*. *Candida albicans* é a mais comum das leveduras isoladas de 5-10% de mulheres assintomáticas, segundo McComarck *et al.* (1972).

Existem inúmeros trabalhos que demonstraram que, VB é uma síndrome polimicrobiana, com o predomínio de *G. vaginalis* e que diferentes morfotipos podem coexistir entre as pacientes nesta situação (MIKAMO *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2005).

Eschenback (1983) relatou que, na VB, os lactobacilos estão ausentes ou presentes em pequeno número. As razões para este desequilíbrio são desconhecidas, embora a perda dos lactobacilos produtores de peróxido de hidrogênio, que é tóxico para numerosos anaeróbios, deva ser o elemento essencial (ELEUTÉRIO & CAVALCANTE, 2004).

Segundo Burmeister & Gardner (1970), Kaufman (1980) e Leighton (1982), um fator que causa discrepância e confusão na discussão da etiologia da VB é a presença concomitante de outros microrganismos, caracterizando infecção mista. Um grande número de microrganismos está presente no fluido vaginal. A concentração desses microrganismos varia de 10^5 até $10^8 - 10^9$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de fluido, segundo Levison *et al.* (1979) e Masfari *et al.* (1986). A concentração de microrganismos anaeróbios obrigatórios é, usualmente, cinco vezes maior que a concentração de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, em pacientes com vaginite, como relatam Holst *et al.*, (1983) e Masfari *et al.* (1986). Dos microrganismos anaeróbios facultativos prevalentes, destacam-se espécies de lactobacilos, corinebactérias, estreptococos, *Staphylococcus epidermidis* e *G.vaginalis*, segundo o estudo de Levison *et al.* (1979).

Estima-se em cerca de 50 o número de espécies microbianas que constituem a microbiota do trato urogenital feminino (REID, 2001), apesar de sua proximidade com a abertura do intestino, no qual podem ser encontradas mais de 700 espécies microbianas (KAPER & SPERANDIO, 2005). Devillard *et al.* (2004) sugerem que “várias centenas de espécies podem colonizar a vagina, mas diretamente do intestino, há apenas algumas em um dado momento”.

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

Este microrganismo foi primeiramente descrito por Leopold (1953), que o descreveu como um bacilo pequeno, imóvel, não capsulado, pleomórfico, Gram negativo e que formava colônias pequenas, circundadas por zona de hemólise, quando cultivado em agar sangue (5% de sangue humano), incubado a 37°C, em atmosfera de 10% de CO₂. Este mesmo autor, em 1956, sugeriu que este microrganismo estaria relacionado ao gênero *Haemophilus*, por causa de sua morfologia e requerimentos nutricionais, mas não procurou aprofundar a sua sistemática.

Gardner & Dukes, (1955), nos EUA e Lutz *et al.*, (1956), na França, relataram o isolamento frequente de um microrganismo em quadros de vaginite. Os dois grupos de trabalho consideraram que o pequeno bacilo deveria ser do gênero *Haemophilus*,

tanto por sua aparência microscópica como pela exigência de, pelo menos, 5% de sangue nos meios de cultura para que houvesse crescimento.

Gardner & Duker (1955), propuseram o nome de *Haemophilus vaginalis* para esta bactéria, e virtualmente atribuíram a *H. vaginalis* a etiologia de todas as vaginites inespecíficas. A evidência de que *H. vaginalis* causava vaginite foi obtida da observação de que, das 311 pacientes com corrimento vaginal, foi isolada de 92%, não tendo sido isolada de 78 pacientes controle.

Edmunds, (1962) e Pease & Laughton, (1965), estudaram a morfologia, características culturais, bioquímicas e sorológicas do *H. vaginalis*, constatando que este microrganismo, originalmente descrito como pertencente ao gênero *Haemophilus*, por ser um pequeno bacilo com estrutura da parede celular de Gram negativo, deveria constituir um novo gênero por conter arabinose na parede celular, ser catalase e oxidase negativas, não requer os fatores X (hemina) e V (nicotinamida adenina nucleotídeo) para seu crescimento, características estas peculiares àquele gênero, além de degradar o amido, habilidade que os demais do gênero não apresentam.

Por causa desta discrepância entre *H. vaginalis* e outros membros do gênero *Haemophilus* e, ainda, por certas características de *Corynebacterium* como a Gram labilidade e a presença de granulações características desse gênero, Amies & Garabedian, (1963) sugeriram enquadrá-lo no gênero *Corynebacterium*. O microrganismo foi, então, denominado de *Corynebacterium vaginale* por Zinnerman & Turner, (1963).

À semelhança dos demais membros do gênero *Corynebacterium*, *C. vaginale* não requer os fatores X e V para seu crescimento, como mencionado. Entretanto, esta bactéria não estava perfeitamente integrada ao gênero, pois os demais membros são catalase positiva, enquanto *C. vaginale* é negativa. Além disso, a parede celular de *C. vaginale* não contém arabinose, ao contrário dos outros membros do gênero, como relatado por Dunkelberg *et al.* (1970).

Brewer *et al.*, (1957), acrescentaram que *C. vaginale* pode assumir a Gram positividade ou negatividade, sendo, portanto, uma bactéria Gram lábil. No estudo da estrutura fina do *C. vaginale*, através da microscopia eletrônica e composição bioquímica da parede celular, Reyn & Andersen (1966) relataram que o microrganismo se apresenta como Gram positivo. Por outro lado, Criswell *et al.*

(1972), Harper & Davis (1982) e Boustouller *et al.* (1987), relataram que a estrutura fina da parede celular da bactéria apresentava características mais comumente associadas às bactérias do grupo das Gram negativo.

Segundo Greenwood (1983), por causa dessa posição taxonômica incerta, as denominações *H.vaginalis* e *C.vaginale* foram amplamente utilizadas na identificação do mesmo microrganismo. Contudo, no Manual Bergey's of Determinative Bacteriology (LAPAGE, 1974) mesmo sendo reconhecida esta posição incerta, a bactéria foi enquadrada como *H.vaginalis*.

Estudos baseados na composição da parede celular e nas diferenças de conteúdo em guanina-citosina e estudos de hibridização de DNA mostraram não haver relação genética com o gênero *Corynebacterium* e mostraram, também, não haver relação genética com o gênero *Haemophilus*. O microrganismo foi, então, reclassificado como único membro de um novo gênero, *Gardnerella*, e denominado *G. vaginalis* por Greenwood & Pickett (1980), tendo sido catalogado como tal na 9ª edição do Manual de Bergey (1984), onde consta como bactéria anaeróbia facultativa, pleomórfica, Gram lábil, que pode fazer parte da microbiota vaginal normal.

O interesse científico pela *G. vaginalis* decorre da estreita relação fisiopatológica que este microrganismo parece exercer no desenvolvimento da VB (VILLEGAS *et al.* 1995).

2.5.2 Prevalência de *G. vaginalis* em relação aos sintomas clínicos

A prevalência de *G. vaginalis* e sua relação com sintomas clínicos têm sido objeto de estudo de muitos pesquisadores (DAVIDSON & LAYTON, 1968; DEMING, 1955; BRET & DEBRAY *et al.*, 1959; BRAY, 1963; DELAHA *et al.*, 1964; BARCHET, 1972; DATTANI *et al.* 1982; DAWSON & HARRIS, 1983; SPIEGEL *et al.*, 1983; CHOWDHURY *et al.*, 1985; CHOWDHURY, 1986 *et al.*; FRANCISCO, 1990; MURTA *et.al.*, 2000; BRANDÃO, 2004 ; BIAGI *et. al.*, 2008) levando ao questionamento se *G. vaginalis* seria patogênica ou comensal (REILLY & HUMAN,1983) .

Bump *et al.*, (1988), acompanharam, durante 3 meses, 68 meninas adolescentes sexualmente ativas e 52 adolescentes virgens, todas assintomáticas. Concluíram que não havia diferença significativa na prevalência de *G.vaginalis* nos

dois grupos estudados, pois 12 % das adolescentes virgens e 15 % das sexualmente ativas desenvolveram a doença.

Guerreiro *et al.* (1987) estudaram 97 pacientes das quais 93,6 % apresentavam um quadro de VB, tendo sido isolada *G. vaginalis*.

Apesar de, atualmente, a VB não ser considerada exclusivamente de transmissão sexual, alguns autores a consideram mais frequente entre indivíduos sexualmente ativos. Assim, Shafer *et al.* (1985), em seu estudo microbiológico em meninas adolescentes, relataram maior frequência de *G. vaginalis* naquelas sexualmente ativas que naquelas sem experiência sexual.

Svidzinski *et al.* (1989), estudaram o fluido vaginal de 145 pacientes, das quais 65 apresentavam sintomas clínicos. Foi isolada *G. vaginalis* de espécimes de 29% das pacientes sintomáticas. Do grupo das assintomáticas, não houve isolamento.

Em estudo clínico-microbiológico sobre a etiologia de infecções vaginais, González *et al.* (2001) estudaram 700 espécimes vaginais obtidas de pacientes atendidas em um laboratório clínico no México, durante um período de seis meses. Foram realizados exames microscópicos com observação a fresco e utilizando coloração de Gram. De 700 espécimes, 160 (22,86%) foram positivas para *C. albicans*, 150 para *G. vaginalis* (21,43%) e 14 amostras (2%) eram positivas para *T. vaginalis*. A associação mais frequente ocorreu entre *C. albicans* e *G. vaginalis*, em 14 mulheres, das quais 12 estavam em período gestacional.

A VB ocorre com muita frequência entre as mulheres, estimando-se em 20% das grávidas, 35% das pacientes atendidas em clínicas de DST, e 15% das mulheres atendidas em clínicas ginecológicas (ESCHEMBACH, 1993; MEAD, 1993).

Muitas mulheres com VB são excessivamente colonizadas por *G. vaginalis*; entretanto, o exato papel desta bactéria no desenvolvimento de VB não é completamente entendido. A atual teoria é que, tanto qualitativamente, quanto quantitativamente, as alterações na população microbiana são responsáveis pelo estabelecimento de VB. Em relação à *G. vaginalis*, o fato de que a bactéria pode ser encontrada em até 69 % das mulheres que não apresentam sinais ou sintomas de uma microbiota vaginal alterada corrobora esta teoria (SIMÕES *et al.*, 2001). Dados na literatura confirmam que linhagens de *G. vaginalis* nem sempre causam VB e o organismo pode estar presente em mulheres saudáveis (FREDERICKS *et al.*, 2007).

Entretanto, recentes estudos indicam que *G. vaginalis* possuem um grande número de fatores de virulência e conseqüentemente, a idéia de que este microrganismo não é o agente etiológico de VB permanece por esclarecer (SWIDSINSKI *et al.*, 2005; GELBER *et al.*, 2008).

2.5.3 *Lactobacillus* spp.

O gênero *Lactobacillus* é ubíquo em sua distribuição na natureza, sendo usualmente encontrado como componente da microbiota indígena do homem e de animais e, também, em plantas. No trato vaginal de mulheres saudáveis, os *Lactobacillus* fazem parte da microbiota indígena dominante, sendo sua presença marcadamente influenciada pela produção de estrógeno, cujas mudanças são dependentes do ciclo menstrual (KEANE *et al.*, 1997).

Este gênero desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio do ecossistema vaginal, pela produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas, que são capazes de inibir microrganismos potencialmente patogênicos (BAERHEIM *et al.*, 1994; HAWES *et al.*, 1996; OCAÑA *et al.* 1999).

A microbiota vaginal normal é colonizada por bacilos de Döderlein ou lactobacilos, responsáveis pela manutenção do pH vaginal ácido, normalmente entre 4 e 5, através da produção de ácido láctico e peróxido de oxigênio, desfavorecendo assim o desenvolvimento de patógenos (LONGATTO FILHO e SILVA FILHO, 2000).

Em mulheres saudáveis, lactobacilos são normalmente as espécies bacterianas dominantes (SOBEL, 1997). Muitas destas mulheres apresentam com maior freqüência as espécies *L. crispatus*, *L. jensenni* e *L. gasseri*. Algumas podem, também, ser colonizadas por *L. vaginalis*, *L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (PAVLOVA, 2002).

Anukam *et al.* (2006), em estudos por métodos convencionais baseados em cultivo, encontraram *L. acidophilus*, sendo predominante no ecossistema vaginal saudável, seguida por outras, como *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrückii*, *L. vaginalis* e *L. salivarius*. Ao contrário, pela técnica molecular,

utilizando sondas de DNA, foi indicada a colonização, primariamente, por *L. crispatus* e *L. jensenii*.

Recentemente, Ribeiro - Branco *et al.*, (2010) utilizou PCR - ARDRA para identificação de 147 amostras do gênero *Lactobacillus*, estando esta técnica bem definida do ponto de vista metodológico. Neste trabalho, os autores verificaram *L. crispatus* como sendo a espécie mais frequentemente encontrada em pacientes assintomáticas para VB ($p < 0,05$), sendo que esta mesma espécie foi considerada a melhor produtora de substância antagonista e de H_2O_2 *in vitro*.

2.6 Substâncias envolvidas no fenômeno do antagonismo bacteriano no ecossistema vaginal.

2.6.1 Substâncias antagonistas tipo bacteriocinas

Vários microrganismos produzem substâncias com atividade inibitória sobre o crescimento de outros microrganismos presentes em um nicho ecológico.

Os lactobacilos formam um biofilme na superfície da mucosa vaginal e assim, conferem proteção por uma serie de fatores como: secreção de ácido láctico, produção de peróxido de hidrogênio, produção de bacteriocinas, competição por nutrientes, exclusão competitiva, coagregação e estímulo da resposta imunológica (LEPARGNEUR & ROSSEAU, 2002; REID & BURTON, 2002).

Várias alternativas têm sido pesquisadas no sentido de prevenir a recidiva da VB após o tratamento habitual. A alternativa mais promissora seria o uso de lactobacilos probióticos para recolonização vaginal. Infelizmente, nenhuma tentativa neste sentido obteve sucesso. A maior dificuldade parece estar no encontro da "linhagem ideal" de lactobacilos, capaz de recompor a microbiota vaginal, visto que a grande maioria das cepas experimentadas nem sempre conseguem aderir ao epitélio vaginal (OCANA *et al.*, 1999; HILLIER *et al.*, 2001).

A primeira descrição de antagonismo bacteriano foi feita por Pasteur e Joubert (1877), quando observaram que bactérias presentes na urina (*Escherichia coli*) poderiam interferir com o crescimento de *Bacillus anthracis*.

O termo mais geral “bacteriocina” foi introduzido por Jacob *et al.* (1953), para as várias proteínas antibacterianas produzidas por bactérias não coliformes. Não há, contudo, uma definição precisa do termo bacteriocina. Os critérios clássicos utilizados são baseados nas características das colicinas, sendo que a presença de uma porção protéica essencial e um amplo espectro de atividade inibitória (com ação bactericida, centrada nas espécies homólogas), com ligação a receptores específicos, determinantes genéticos de produção da bacteriocina e imunidade da célula hospedeira plasmidiais, têm sido aplicados às bacteriocinas bem caracterizadas de microrganismos Gram positivos e Gram negativos (TAGG *et al.*, 1976).

O termo bacteriocina é apenas utilizado para substâncias já razoavelmente caracterizadas, que se enquadrem, pelo menos, em um número mínimo de critérios para a classificação de uma substância como tal. As substâncias antagonistas incompletamente caracterizadas, mas, que parecem ser bacteriocinas, são mais apropriadamente denominadas “tipo – bacteriocina” (JACK *et al.* 1995).

A pesquisa de substâncias antagonistas tipo bacteriocinas e bacteriocinas propriamente ditas têm recebido grande impulso desde a década de 70, sendo que a partir da década de 90 maior ênfase foi dada aos microrganismos Gram positivos “ácido-láticos”, envolvidos na indústria alimentícia (JACK *et al.*, 1995).

Bactérias Gram positivas, especialmente os gêneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium*, tidas como bactérias “ácido-láticas”, produzem bacteriocinas que são classificadas em quatro classes, baseando-se na estrutura primária e mecanismo de ação de suas bacteriocinas. A primeira classe consiste de pequenos peptídeos “membrana- ativos” ou lantibióticos, que contém um aminoácido lantionina modificado, β -metillantionina e precursores de di- hidroalanina e di-hidrobutirina. A segunda classe é formada por pequenas bacteriocinas sem modificação nos aminoácidos. As terceira e quarta classes são, respectivamente, grandes proteínas termo-lábeis e bacteriocinas contendo lipídeos ou carboidratos em suas estruturas (ALI *et al.*, 1995).

A produção de bacteriocinas por lactobacilos vaginais tem sido descrita como um dos mecanismos responsáveis pela manutenção do ecossistema vaginal em equilíbrio. Recentemente, uma proteína biologicamente ativa foi isolada e

parcialmente purificada de diferentes lactobacilos vaginais. Contudo, é possível que nem todas as espécies de lactobacilos tenham habilidade de produzir bacteriocina e a atividade bactericida não ser homogênea entre aquelas produzidas (LEPARGNEUR, 2002).

Os estudos de Simões *et al.* (2001) lhes permitiram concluir que existe uma associação entre o biotipo e o aumento da resistência de *G. vaginalis* às bacteriocinas produzidas pelos lactobacilos. Esta habilidade de resistir à ação bactericida de bacteriocinas produzidas por lactobacilos pode ser um fator crítico na participação da *G. vaginalis* na vaginose bacteriana.

Em um trabalho recente de nosso grupo (TEIXEIRA *et al.*, 2010), foi estudada a habilidade de *G. vaginalis* em produzir substância antagonista *in vitro*. Interessantemente, além de antagonismo, foi observado sinergismo entre *G. vaginalis* e *P. anaerobius*. Este foi o primeiro trabalho descrito, que se tem conhecimento, sobre a habilidade de *G. vaginalis* em produzir substância antagonista tipo bacteriocina *in vitro*, além de sinergismo observado. Além da habilidade de resistir a ação das bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp, segundo descrito por Simões *et al.*, (2001), pode-se inferir que *G. vaginalis* produz compostos que auxiliam na sua colonização no ecossistema vaginal.

Assim, considerando que as atividades cooperativas e competitivas entre as bactérias no ecossistema vaginal, são fatores essenciais, embora, não necessariamente determinantes, para a instalação da vaginose bacteriana e considerando que linhagens de *Lactobacillus* spp. são capazes de expressar o antagonismo neste sítio, este trabalho colabora para o entendimento da patogênese da vaginose bacteriana.

2.6.2 Produção de peróxido de hidrogênio

Os *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio da microbiota vaginal, exercendo um efeito protetor contra espécies patogênicas, tais como as relacionadas com VB. Mulheres colonizadas por espécies de *Lactobacillus* produtores de H₂O₂ têm um índice aproximado 50% menor de desenvolvimento de

VB do que mulheres colonizadas por *Lactobacillus* não produtores (HAWES *et al.*, 1996). A presença de linhagens produtoras de peróxido de hidrogênio na microbiota vaginal está fortemente associada ao decréscimo do número de casos de gonorréia (MARRAZZO *et al.*, 2002).

A inibição de espécies bacterianas pela presença de H_2O_2 também é um mecanismo de antagonismo bastante importante. Os lactobacilos são capazes de oxidar os carboidratos por uma via metabólica, cujo produto final é o H_2O_2 e este na ausência de peroxidase, se acumula. O excesso desse metabólito pode inibir ou matar outros micro-organismos, principalmente os grupos com carência ou baixa produção de peroxidase, como os anaeróbios (REDDY *et al.*, 2008). Por isso, a ausência de lactobacilos produtores de H_2O_2 permite o crescimento dos microorganismos catalase-negativos, sendo considerado um importante fator na fisiopatologia da VB (ESCHENBACH *et al.*, 1989).

Os *Lactobacillus* não utilizam o sistema citocromo, no qual o oxigênio é reduzido a água, para realizar a fosforilação oxidativa, mas utilizam flavoproteínas para oxidação terminal (McGROARTY, 1993).

Três oxidases podem ser detectadas nos *Lactobacillus*: NADH oxidase de *L. casei* e *L. plantarum*; piruvato oxidase de *L. bulgaricus* e *L. plantarum* e flavoproteínas α -glicerofosfato oxidase de *L. casei*. Estas enzimas combinam-se a uma NADH peroxidase, que transforma H_2O_2 e evita a auto-inibição da bactéria (LEPARGNEUR & ROSSEAU, 2002).

Um outro mecanismo de síntese de peróxido de hidrogênio pelos *Lactobacillus* é a transformação de O_2^- e H^+ em H_2O_2 e O_2 , por um complexo enzimático com manganês. A toxicidade do peróxido de hidrogênio é devida a um efeito oxidativo exercida pela molécula (H_2O_2) ou por seus metabólitos (OH^- e O_2^-). A conversão de H_2O_2 em seus compostos citotóxicos pode ser devida à presença de agentes redutores e de peroxidases no fluido vaginal (KLEBANOFF, 1967).

Estes produtos podem inibir ou levar à morte membros da microbiota por sua ação sobre os ácidos nucléicos, proteínas e outras moléculas biológicas (OCAÑA *et al.*, 1999a).

Estudos realizados por Ocaña *et al.*, (1999b) com cepas de *Lactobacillus crispatus* F117, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F2 e F28, *Lactobacillus delbrueckii* F86 e *Lactobacillus agilis* F54, demonstraram que a maior produção de

peróxido de hidrogênio por estas amostras ocorre em 15 horas de incubação e estas amostras estariam na fase estacionária do crescimento.

Brolazo *et al.*, (2009) analisando 83 linhagens de lactobacilos, constataram que apenas 20 não apresentaram produção de H₂O₂ detectável pela técnica de crescimento em ágar MRS com tetrametyl-benzidine (TMB) (ICN, USA) e peroxidase horseradish (ICN, USA). Neste trabalho, foi ainda utilizada a técnica de detecção de H₂O₂ pelo sistema Meckoquant strip test que apresentou menor sensibilidade, com 40 linhagens consideradas negativas para produção de H₂O₂.

As melhores produtoras de H₂O₂ foram as espécies *L. jensenii*, *L. crispatus* e *L. gasseri*. Alguns autores acreditam que deve haver relação entre a espécie e a capacidade de produção de H₂O₂ e que não há relação entre a origem da linhagem (proveniente de mulheres com ou sem VB) e a produção de H₂O₂ (SONG *et al.*, 1999).

Lactobacilos produtores de H₂O₂ são isolados da vagina da maioria das mulheres saudáveis em idade reprodutiva. Seu efeito tóxico e inibitório contra o crescimento de patógenos na vagina é bem documentado por estudos *in vitro* (MIJAC *et al.*, 2005; ASLIM *et al.*, 2006; MARTINEZ, 2008; O'HANLON *et al.*, 2010; MARTIN *et al.*, 2010; BRANCO *et al.*, 2010).

2.6.3 Tratamento de VB e aspectos de susceptibilidade a antimicrobianos

Para ser utilizável na terapia de doenças infecciosas humanas, um antimicrobiano deve satisfazer a alguns critérios: ter espectro de ação satisfatório; ser direcionado a alvos peculiares de bactérias, o que minimiza sua toxicidade a células do hospedeiro; ser capaz de atingir o sítio do organismo onde a infecção esteja ocorrendo e não induzir pronta resistência bacteriana (MURRAY, 1999).

Os antimicrobianos mais frequentemente utilizados agem na célula bacteriana interrompendo a síntese da parede celular, interferindo na síntese de proteínas, agindo sobre a síntese ou diretamente na molécula dos ácidos nucleicos e funcionando como inibidores competitivos de enzimas essenciais ao metabolismo celular e interferência nas funções da membrana celular (SALYERS & WHITT, 1994; TENOVER, 2006).

Por parte das bactérias, estas podem resistir à presença de antimicrobianos por quatro mecanismos básicos: alteração ou substituição do alvo de ação da droga na célula, inativação enzimática do antimicrobiano, efluxo ativo do antimicrobiano, e dificultando a sua penetração, pela barreira oferecida pela membrana externa de bactérias Gram negativas a alguns antimicrobianos, acrescida ou não por modificações nas porinas (SALYERS & WHITT, 1994).

O uso, e, muitas vezes, abuso, destes agentes antimicrobianos, estimulam a evolução bacteriana em direção à aquisição de resistência devida a novos mecanismos e à transmissão dos mesmos para as novas gerações. Este fato vem sendo relatado desde o início da última década de 50 (BAUER *et al.*, 1960). A problemática da resistência aos agentes antimicrobianos, tem se tornado um assunto “hot topic” entre pesquisadores e comunidades leigas, admitindo-se, desde há muito, que os antibióticos perderiam rapidamente sua eficácia e que estaríamos entrando numa era pós-antibiótica (COHEN, 1992; CHIN *et al.*, 1994; WALKER *et al.*, 1998; HANCOCK, 2006). O uso de drogas antimicrobianas desencadeia uma complexa interação envolvendo muitos determinantes biológicos, sociológicos e psicológicos. A resistência aos antibióticos é um sério problema mundial que está crescendo, e tem implicações na morbidade, mortalidade e atendimento à saúde, tanto nos hospitais como na comunidade (FRANCO *et al.*, 2010).

A terapia das vaginoses bacterianas era bastante controversa, não só porque não se conhecia bem a causa e as técnicas diagnósticas, mas, também, porque era necessário adotar um critério de cura (FRANCISCO, 1990). Assim, Gardner & Dukes (1955) definiram a cura como a diminuição dos sintomas e ausência de secreção típica de vaginose bacteriana e das “clue cells” e, para o tratamento, recomendavam um creme vaginal à base de sulfa. Jones & Bhattacharyya (1981) e Jones, *et al.* (1982) relataram a eficácia de preparações à base de sulfa, em altas concentrações, para o tratamento de VB. Contudo, Heltai & Taleghany (1959), Pfeifer *et al.* (1978) e Piot *et al.* (1982) reconheceram que 33,85% das mulheres tratadas desta maneira não respondiam a esta terapia.

Hubrechts *et al.* (1984) testando o Tianfenicol “*in vitro*” e “*in vivo*”, demonstraram a sensibilidade de *G. vaginalis* ao antibiótico, como também a capacidade de cura do processo com uma única dose.

Lee & Schamale (1973) e Ralph *et al.* (1979) relataram que a ampicilina era a droga de escolha mais ativa “in vitro” contra *G.vaginalis* e, quando administrada ao paciente, promoveria a cura em 90% dos casos.

Mccarthy *et al.* (1979), Rauph *et al.* (1979) e Skarin *et al.* (1983) mostraram que *G. vaginalis* era resistente às drogas ácido nalidíxico, colistina, neomicina, polimixina B e tobramicina, e sensível aos antimicrobianos penicilina, ampicilina, cefalosporina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, estreptomicina, tianfenicol e vancomicina.

Atualmente, vários esquemas terapêuticos, têm sido propostos, utilizando o metronidazol e outros imidazólicos para o tratamento da VB, como nos trabalhos de Jones *et al.* (1989); Hillier *et al.* (2006); Nagaraja (2008) e Sobel *et al.* (2009).

Segundo Murray *et al.* (1999), o metronidazol, derivado do 5-nitroimidazol, introduzido em 1959 para tratamento de infecção por *Trichomonas vaginalis*, tem hoje um importante papel terapêutico no tratamento de infecções por bactérias anaeróbias e certos protozoários. Tinidazol e ornidazol são outros imidazóis derivados do 5-nitroimidazol. Tinidazol possui um espectro de atividade antianaeróbica similar ao metronidazol, mas com níveis séricos terapêuticos mais prolongados (BARDI *et al.*, 1980). O tinidazol apresentou elevado grau de eficácia, exibindo cura clínica em cerca de 90-100% dos casos de vaginites, segundo Carmona *et al.* (1983), Peixoto *et al.* (1984) e Kharsany *et al.* (1993). Nestes estudos, foi também observada significativa atividade “in vitro” da clindamicina, sendo, portanto, uma boa opção para a terapia de infecções invasivas extravaginais. O espectro de atividade de outros agentes antimicrobianos testados foi variável, sugerindo potencial terapêutico limitado.

O metronidazol tem sido relatado como um medicamento que exibe bons resultados clínicos no tratamento da vaginose e por isso vem sendo a primeira droga de escolha na terapêutica. Metronidazol é considerada uma droga efetiva, de baixo custo, que tem boa atividade, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e menores efeitos adversos (LOFMARK, *et al.* 2010); porém, tem sido relatado insucesso terapêutico associado à resistência de *G. vaginalis* a esta droga (BANNATYNE *et al.*, 1998). Segundo Aroutcheva *et al.* (2001), certos biotipos tendem a ser mais resistentes ao metronidazol que outros.

Devido resistência ao metronidazol, outros esquemas terapêuticos têm sido propostos na clínica médica, como por exemplo, o uso de clindamicina, secnidazol ou tinidazol (LINHARES *et al.*, 2004).

Seria importante salientar que a cura clínica, habitualmente menos confiável que a cura microbiológica, não é 100% segura, mesmo quando a paciente usa corretamente os medicamentos prescritos. Assim, pode-se observar em vários estudos, usando dose única (2g via oral) ou tratamento prolongado (400mg 2 x/d, por sete dias, via oral) de metronidazol, que os percentuais de cura são quase sempre inferiores a 90%, e que as doses únicas são menos efetivas que o tratamento em doses prolongadas (GIRALDO *et al.*, 2007).

Segundo estudo de Ugwumadu *et al.*, (2003), o tratamento realizado mais precocemente com clindamicina em mulheres assintomáticas com microbiota vaginal alterada ou com VB, reduz o risco de aborto espontâneo ou parto prematuro em 66%.

Atualmente, utilizam-se o metronidazol e, também, a clindamicina no tratamento de VB, tanto por via oral como por via vaginal. O esquema terapêutico preconizado pelo CDC admite como opções igualmente efetivas tanto o gel de metronidazol a 0,75% (5g/dia/5 dias) como o metronidazol oral (500mg/2x dia/7 dias), sendo a clindamicina vaginal a 2% (5g/dia/7dias) menos eficaz que os esquemas com metronidazol. Os regimes alternativos com metronidazol oral em dose única (2g) ou clindamicina oral (300 mg/2x dia/7 dias) apresentam menor eficácia (CDC, 2002).

Austin *et al.* (2006) estudaram a susceptibilidade de bactérias vaginais ao metronidazol e tinidazol, utilizando o método de diluição em ágar. Foram testados 470 amostras, provenientes de pacientes com VB, incluindo *Prevotella bivia*, não pigmentada, *Prevotella spp.*, *Prevotella spp.* pigmentada, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides spp.*, *Gardnerella vaginalis* e cocos anaerobios Gram-positivos. Neste estudo, foi encontrada maior efetividade do tinidazol contra espécies de *G. vaginalis* que aquela do metronidazol; porém, não houve diferença significativa entre os outros grupos microbianos testados.

Como comentaram McDonald *et al.* (1997) há necessidade urgente de estudos sobre a patogênese das vaginoses bacterianas e dos fatores que influenciam a susceptibilidade do hospedeiro e que representam risco para a mulher, como partos prematuros e abortos. O reconhecimento destes fatores e sua identificação durante a gravidez podem permitir um tratamento seguro.

O tratamento para VB deve ser controlado tanto clínica como citologicamente. A escolha do tratamento sistêmico ou tópico é algo muito discutido. Em geral, o sistêmico é mais seguro e preferido pela paciente; porém, exige atenção em relação aos efeitos colaterais. Combinar as duas formas seria uma boa opção, mas torna o tratamento bem mais oneroso e dificulta a adesão ao mesmo (ZAMITH *et al.*, 1997). Considerando-se que a origem do corrimento vaginal é multifatorial, e que as associações de diferentes infecções são frequentes, o diagnóstico e o tratamento deverão ser individualizados, sendo inadmissível aceitar um tratamento sindrômico e/ou universalmente padronizado, pois a possibilidade de se prescrever uma terapêutica inadequada é muito grande (HILLIER, 1998; ALLEN-DAVIS *et al.*, 2002).

Recentemente, alguns autores (GIRALDO *et al.*, 2007 e WITKIN *et al.*, 2007) sugeriram que mulheres com vaginose recorrente poderiam ter expressões de genes polimórficos para *mannose-binding lectin* e de *toll-like receptor* alterados. Estas mulheres, expressando quantidades menores destas proteínas e receptores, facilitariam a proliferação de alguns microorganismos prejudiciais à manutenção do equilíbrio do ecossistema vaginal. Talvez isto explique porque muitas mulheres continuam manifestando a VB, independentemente do antimicrobiano utilizado, mesmo que este seja usado por tempos prolongados.

Pouco se conhece sobre a recorrência de VB utilizando-se diferentes esquemas terapêuticos; porém, são relatadas candidíase vulvo-vaginal (CVV) e ainda, recorrência de vaginose após tratamento. Chen e colaboradores (2009) fizeram algumas considerações sobre tratamento de VB e demonstraram que as mulheres com dose única de creme vaginal de clindamicina (2%) têm um risco para recorrência de VB similar ao das mulheres tratadas com metronidazol, sendo esta correlação estatisticamente comprovada. Os autores sugerem, porém, que clindamicina em dose única seria uma melhor opção terapêutica, dada sua longa duração. Contudo, ressaltam que novos estudos são necessários para investigar os efeitos microbiológicos de clindamicina em dose única sobre a colonização de leveduras e as taxas de infecção.

Ainda segundo Chen *et al.* (2009), também se pode hipotetizar que diversos antimicrobianos possuem diferentes propriedades e mecanismos de ação terapêutica (dose oral versus vaginal, de libertação prolongada contra libertação

imediate da droga), podendo interagir com as bactérias e mediadores inflamatórios nas vias ainda não completamente compreendidas, resultando nas diferenças observadas nas taxas de recorrência. Até o momento, os tratamentos preconizados ainda são insatisfatórios, verificando-se altos índices de recorrência, mesmo porque a patogênese do processo envolvendo *G. vaginalis* não está esclarecida.

2.7 Utilização de *Lactobacillus* spp. como probióticos no tratamento de infecções vaginais.

O termo probiótico foi primeiramente usado em 1965, em contraposição a antibiótico, tendo como definição “substância secretada por um microrganismo, que estimula o crescimento de outro”. Deste então, o significado da palavra tem evoluído para a aplicabilidade desta bactéria que “contribui para o balanço intestinal”. A definição oficial, foi recomendada pela Organização Mundial de Saúde, considera probióticos como: microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Quatro mecanismos têm sido usualmente atribuídos para explicar o efeito protetor dos probióticos: (1) antagonismo pela produção de substâncias que inibem ou matam os patógenos; (2) competição com os patógenos pelos sítios de adesão ou por fontes nutricionais; (3) imunomodulação do hospedeiro; (4) inibição da produção ou da ação das toxinas bacterianas (FILHO-LIMA *et al.*, 2000).

Mais de 50 espécies bacterianas colonizam a vagina, formando um biofilme cuja composição muda constantemente. O gênero predominante, nesta mucosa, é *Lactobacillus*. Os microrganismos patogênicos causadores das infecções do trato urogenital são provenientes do cólon e reto e entram em contato com este biofilme, multiplicando-se. Antibióticos, espermicidas e situações de estresse, podem influenciar no equilíbrio da microbiota genital feminina, expondo as pacientes a infecções (KOOP-HOOLIHAN, 2001). Os probióticos têm sido estudados no tratamento dessas infecções, e seu principal efeito é a capacidade de aderir e colonizar o tecido, inibindo a sobrevivência dos agentes patogênicos. O ácido lático e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzido por eles têm a capacidade de suprimir o crescimento de algumas espécies, como *G. vaginalis* (MCLEAN; MCGROARTY, 1996), principal causadora da vaginose bacteriana.

Há um crescente interesse em se produzir probióticos de *Lactobacillus*, para o combate às infecções vaginais (REID, 2001; AROUTCHEVA, 2001; REID & BRUCE, 2001; MATROMARINO *et al.*, 2002; ASLIM *et al.*, 2006; FALAGAS *et al.*, 2007; ZÁRATE *et al.*, 2007; MARTINEZ, 2008), visto que VB é comum também após antibioticoterapia (BANNETYME & SMITH, 1998; CHEN *et al.*, 2009). O uso de probiótico poderia restaurar o ecossistema vaginal, sendo, assim, uma forma de tratamento alternativa (REID & BRUCE, 2003).

No mercado brasileiro, estão disponíveis várias preparações farmacêuticas contendo *Lactobacillus* spp. como probiótico para o tratamento de infecções vaginais. Diversos estudos têm buscado o controle fisiológico desta síndrome por meio da utilização de probióticos. Recentemente, em São Paulo, foi realizado um estudo por Martinez (2008), para verificar o efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas. As pacientes acometidas por infecções vaginais foram tratadas com terapia medicamentosa tradicional e com o probiótico Urex-Cap-5 (Christian Hansen), que contém duas linhagens de lactobacilos (*Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14). Foram determinadas e comparadas as taxas de cura nos dois grupos de pacientes, mostrando sucesso no grupo em que houve tratamento associado com probiótico. Também foram realizados testes *in vitro*, simulando o trato vaginal humano, com diferentes combinações de espécies de microrganismos, para averiguar possíveis interações entre os mesmos.

Devido ao grande interesse na utilização de probióticos hoje em dia e, também, pelo estímulo da Organização Mundial da Saúde na utilização de alternativas ao uso dos antibióticos, grandes laboratórios e centros de pesquisas vem investindo nesta linha de estudo. Recentemente, um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que uma linhagem de *Lactobacillus* spp., isolada de pacientes saudáveis, foi eficaz na proteção de camundongos em desafios com espécies do gênero *Candida* spp. (CARVALHO, 2007).

Existem, também, vários trabalhos (ESCHEMBACH *et al.*, 1989; REDONDO-LOPES *et al.*, 1990; AROUCHEVA *et al.*, 2001; KUCH, 2002; REID E BURTON, 2002; RIBEIRO-BRANCO, 2005; CARVALHO, 2007.; FALAGAS, BETSI E ATHANASIOU 2007; MARTINEZ, R.C.R, 2008; BROLAZO *et al.*, 2009) mostrando a eficácia de bactérias lácticas no combate a infecções vaginais.

2.8 O modelo animal gnotobiótico

Uma importante estratégia experimental para estudar as relações que ocorrem entre os microrganismos e seu hospedeiro é a utilização de um modelo animal isento de germes. Neste caso, deve-se, primeiro, definir as funções celulares na ausência de microrganismos e, depois, avaliar os efeitos da adição de um único microrganismo ou de uma população definida de microrganismos. A criação de animais sob condições isentas de germes desenvolveu um campo científico para este propósito: a gnotobiologia. O termo gnotobiótico foi proposto para designar o campo de investigação interessado na criação de animais e plantas que estão livres de todos os microrganismos ou associados somente a espécie conhecidas (TREXLER, 1978). A palavra gnotobiologia é derivada do grego na qual, “gnotos” significa conhecido e “biota” flora e fauna (GUSTAFSSON & COATES, 1984).

A expressão animais isentos de germes representa, de certo modo, uma extensão do conceito de cultura pura, por permitir o estudo das interações entre o hospedeiro e os microrganismos sem a interferência da microbiota indígena (GORDON & PESTI, 1971; TREXLER, 1978).

A tecnologia da gnotobiologia depende da habilidade de controlar a composição do ambiente no qual o organismo se desenvolve e funciona. O uso combinado de organismos geneticamente manipulados e gnotobióticos tem o potencial de fornecer novas e importantes informações sobre como uma bactéria afeta o desenvolvimento normal, o estabelecimento e a manutenção do sistema imune associado à mucosa e as funções célula-epitélio. Além do mais, a gnotobiologia pode ajudar nos estudos sobre a etiologia de doenças infecciosas, condições inflamatórias agudas e crônicas (FEDORAK, 1995; SARTOR, 1995) e, possivelmente, na gênese de tumores (GORBACH & GOLDIN, 1990). Desde a última década de 50, quando a produção de ratos e camundongos isentos de germes foi estabelecida, o uso desses modelos animais nas ciências biomédicas vem se expandindo. Entretanto, a condição isenta de germes tem implicações nas características fisiológicas, morfológicas e imunológicas desses animais, que mostram diferenças daquelas expressas quando na presença da microbiota normal (GUSTAFSSON *et al.*, 1970).

Além das diferenças na arquitetura geral do trato digestivo, os animais isentos de germes apresentam diferenças na motilidade intestinal, na diferenciação epitelial e na imunologia (SPANGLER, 1992). Estudos em camundongos isentos de germes mostraram que a morfogênese de unidades de vilosidades da cripta pode ser completada na ausência de microrganismos. Entretanto, comparações entre esses animais e os convencionais revelaram que componentes da microbiota podem diferenciar linhagens intestinais epiteliais durante a morfogênese (FALK *et al.*, 1998).

Os camundongos isentos de germes representam um sistema experimental que viabiliza, de maneira mais simples e objetiva, a avaliação do fenômeno de resistência à colonização e dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno, permitindo testar a capacidade de uma terapia à base de probióticos para prevenir ou impedir a colonização por patógenos. Muitos estudos mostram que os animais isentos de germes, quando infectados por patógenos, podem, em alguns casos, se mostrar mais resistentes e, em outros, mais susceptíveis (VIEIRA *et al.*, 1998).

O experimento gnotobiótico oferece considerável potencial como uma ferramenta no estudo das relações hospedeiro-microrganismos porque retrata o hospedeiro quando livre de germes, ou quando modificado por microrganismos conhecidos ou outras associações; permite o estudo da relação inter-microbiana dentro do organismo do hospedeiro; pode ser usado no estudo de algum fator exógeno ou endógeno, cuja ação isolada pode ser afetada ou não pela microbiota associada, no próprio hospedeiro (GORDON & PESTI, 1971).

Como os animais gnotobióticos permitem o estudo e reprodução de mecanismos de interação entre microrganismos e hospedeiro, não observados em experimentos *in vitro* (GORDON & PESTI, 1971), eles constituem um excelente modelo para avaliação do potencial probiótico de microrganismos (FILHO-LIMA *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001; NARDI *et al.*, 1991, NEUMANN *et al.*, 1998; NICOLI & RAIBAUD, 1990; PERET FILHO *et al.*, 1998, RODRIGUES *et al.*, 1996, RODRIGUES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 1999).

Em 1996, Fidel *et al.* desenvolveram um modelo animal murino para vaginite provocada por *Candida glabrata*. Kuch (2002) mostrou a capacidade inibitória de *Lactobacillus* spp. produtores de peróxido de hidrogênio, contra *Neisseria gonorrhoeae* e Zárate *et al.* (2007) estudaram o efeito protetor de *Lactobacillus*

paracasei contra uma infecção de mucosa vaginal provocada por *S.aureus*, também utilizando um modelo animal murino.

Porém, na literatura disponível, nenhum estudo foi encontrado avaliando a capacidade de *G. vaginalis* colonizar o trato vaginal de murinos, o que indica não haver modelo animal conhecido para o desenvolvimento deste tipo de infecção. Assim, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar a capacidade de colonização de *G. vaginalis* em camundongos gnotobióticos e verificar a capacidade de *Lactobacillus* spp. isolados de mulheres saudáveis em inibir *G. vaginalis in vitro* e *in vivo*.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a microbiota vaginal presente no ecossistema vaginal de pacientes com e sem VB, com ênfase em *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp. para seleção de uma linhagem de lactobacilos potencialmente probiótica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar algumas características inerentes à paciente (hábitos) com a presença ou ausência de VB.
- Enumerar, isolar e identificar linhagens de *Lactobacillus* spp., presentes na microbiota vaginal de mulheres saudáveis e com VB.
- Enumerar, isolar, identificar e determinar a susceptibilidade à antimicrobianos de linhagens de *G. vaginalis* presentes na microbiota vaginal de mulheres saudáveis e com VB.
- Avaliar a capacidade antagonista e de produção de peróxido de hidrogênio pelas linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas de mulheres saudáveis e com VB.
- Utilizar uma linhagem de *Lactobacillus* mais eficaz, quanto a produção de substâncias antagonistas e peróxido de hidrogênio *in vitro*, para avaliar sua capacidade probiótica num modelo animal desafiado experimentalmente com *G. vaginalis*.

4.0 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Aspectos Gerais

4.1.1 Local da Pesquisa:

Este estudo foi realizado:

1. Nas dependências do Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da UFMG, dentro da rotina do atendimento das pacientes.
2. Os experimentos laboratoriais utilizando as amostras clínicas foram realizados nos laboratórios do Departamento de Microbiologia da UFMG.

4.1.2 Aspectos éticos

Este trabalho está vinculado ao projeto “Epidemiologia de Infecções vaginais” aprovado pelo COEP da UFMG, parecer ETIC 062/03 (Anexo 1). Termos adicionais foram acrescentados e enviados ao comitê de ética em pesquisa da UFMG (COEP/UFMG), sendo os mesmos aprovados. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação animal (CETEA), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o protocolo 227/09 (Anexo 2).

4.1.3 Pacientes

4.1.3.1 Amostras

As pacientes foram selecionadas no Serviço de Ginecologia do HC/UFMG, seguindo os critérios de inclusão e exclusão determinados para este trabalho. Foram coletados espécimes clínicos de 77 pacientes, porém sete (P4/P8/P15/P18/P23/P56 e P59) apresentavam quadro clínico de candidíase, e por isso, não foram incluídas no estudo. Assim, foram avaliadas 70 pacientes, das quais 30 com VB e 40 saudáveis (grupo controle).

A vaginose bacteriana foi diagnosticada com base na presença de, pelo menos, três dos quatro sinais segundos os critérios de Amsel *et al.* (1983): a) fluxo

vaginal viscoso branco e homogêneo característico; b) fluido vaginal com pH>4,5; c) liberação de odor de peixe vindo do fluído vaginal, quando misturado com KOH 10%; e d) “clue cells” composito, pelo menos, 20% das células epiteliais vaginais, confirmado pelo Gram.

4.1.3.2 Critérios de Inclusão

Mulheres na faixa etária de 18 a 45 anos, eumenorréicas, com níveis glicêmicos normais, portadoras ou não de VB com e sem queixa clínica.

4.1.3.3 Critérios de Exclusão

Recusa em participar da pesquisa, uso de antimicrobianos, por via oral ou tópica, nos últimos 30 dias; pacientes virgens; pacientes grávidas ou no período de puerpério; pacientes sob corticóide-terapia ou terapia imunossupressora.

4.1.3.4 Termo de Consentimento

Foi obtido consentimento informado, por escrito, de todas as participantes, de acordo com as determinações legais no Brasil. Foi oferecido tratamento de acordo com o manual de controle das DST do Ministério da Saúde a todas as mulheres com infecções genitais (Anexo 3).

4.1.3.5 Entrevista

As pacientes foram entrevistadas no HC-UFMG, usando um questionário constituído pelo registro de dados pessoais (nome, idade, peso, profissão, cor e estado civil, roupa íntima de uso frequente), dados clínicos (inventário de sintomas e de uso de medicamentos, histórico de doenças crônicas, infecções sexualmente transmissíveis, uso de drogas), história ginecológica (menarca, data da última menstruação, padrão do ciclo menstrual, algomenorréia, paridade, número de parceiros, frequência da atividade sexual, uso de métodos anticoncepcionais), descrição do exame clínico e dos resultados dos exames laboratoriais. A entrevista

foi seguida de exames físico e pélvico, durante os quais amostras cérvico-vaginais foram coletadas com alça calibrada e swabs, de forma rotineira (Anexo 4).

4.2 Exame Físico e Dados Laboratoriais

4.2.1 Exame Físico

As pacientes foram atendidas seguindo a rotina dos serviços de saúde. O exame físico foi realizado no Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas, pelos médicos professores Dr. Marcos Mendonça e Dr^a. Edna Maria Lopes de Castro, obedecendo ao protocolo e critérios apresentados neste projeto (Figuras 3 e 4).

Após colocação da paciente em posição de litotomia, o exame físico constou de:

- 1) Inspeção da região genital.
- 2) Introdução do espéculo vaginal, sem o uso de lubrificantes.
- 3) Medida do pH do meio vaginal, utilizando-se fita reagente.
- 4) Análise da liberação de aminas pelo teste de Wiff (KOH 10%).
- 5) Colposcopia e teste de Schiller no ectocérvix e vagina (presença de áreas iodo-claras sugestivas de inflamação).



FIGURA 3 - Introdução do espéculo vaginal em paciente apresentando quadro clínico de vaginose bacteriana com corrimento branco acinzentado.

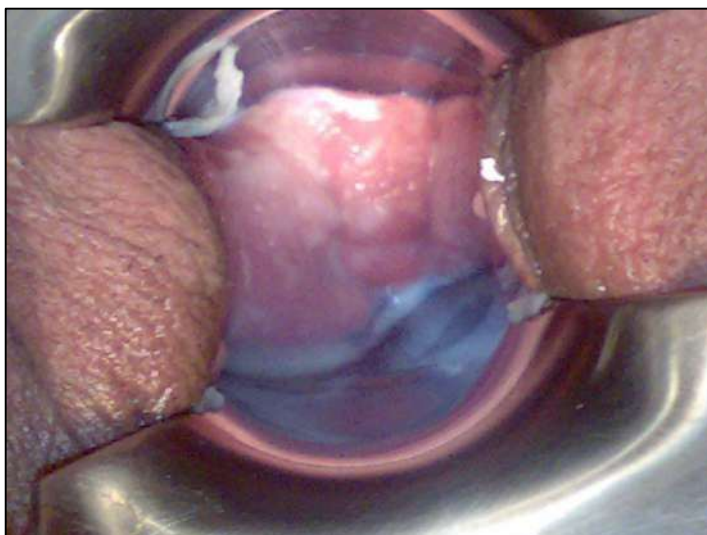


FIGURA 4 - Paciente apresentando quadro clínico de vaginose bacteriana com corrimento branco acinzentado.

4.2.2 Coleta do espécime clínico e exames laboratoriais simplificados

- 1) Exame a fresco do fluido vaginal,
- 2) Esfregaço do fluido vaginal corado pelo Gram,
- 3) Coleta de fluido vaginal para a cultura de *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp. *Lactobacillus* spp. e possíveis anaeróbios presentes.

4.2.3 Aspectos microbiológicos

Para facilitar a compreensão, e tendo em vista a abrangência e peculiaridade dos diferentes grupos de microrganismos envolvidos nas infecções cérvicovaginais, o trabalho foi detalhado em etapas que distinguem os diferentes grupos microbianos que foram alvos do estudo. Os espécimes clínicos coletados das pacientes foram, então, utilizados para os diferentes estudos microbiológicos, observando-se as peculiaridades de cada um deles.

4.3 Metodologia – Coleta e Processamento

4.3.1 Coleta da amostra

A coleta do material foi realizada segundo protocolo dos Laboratórios de

Ecologia e Fisiologia de Microrganismos e de Microbiologia Oral e Anaeróbios do ICB/UFMG, de acordo com Slots *et al.*, (1982), Farias *et al.*, (1986) e Summanen *et al.* (1993), seguindo-se os procedimentos para isolamento e identificação dos microrganismos recuperados.

A amostra do fluido vaginal foi coletada com o auxílio de uma alça calibrada quantitativa, esterilizada (Pleion E 14), que foi introduzida na vagina e retirada com 10 μ l de espécime clínico, depositado em um tubo contendo 1 ml de solução de Ringer - PRAS (pré - reduzida), sob fluxo de CO₂ para ser conduzido ao laboratório (Figura 5).

Uma segunda alça, com espécime similar, foi introduzida também sob fluxo de CO₂ em um tubo contendo 1 ml de meio de transporte TGM (Transporte para *Gardnerella* Modificado), segundo Francisco (1990), específico para *G. vaginalis*.

Além da alça calibrada, foram introduzidos *swabs* de algodão na parede vaginal, e retirados sequencialmente, para obter amostra para os seguintes testes:

- 1- Teste de KOH.
- 2- Confeção de lâminas, para exame a fresco e para coloração de Gram.
- 3- Semeadura em meio Mycosel (Difco Laboratories, Detroit), para isolamento de *Candida* spp.

Na oportunidade, foi, também, coletada amostra utilizando uma escovinha esterilizada, para identificação molecular de clamídia, em um projeto paralelo.



FIGURA 5 - Coleta de material utilizando alça calibrada, sob fluxo de CO₂.

4.3.2 Processamento da amostra

Após a coleta, dentro de um período de 2-4 horas, os espécimes foram conduzidos ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do ICB/UFMG, para seu devido processamento em câmara anaeróbica (Forma Scientific Company, Marietta, USA), em atmosfera de 5% de CO₂, 10 % de H₂ e 85% de N₂. Na câmara anaeróbica, foram realizadas diluições centesimais seriadas até 10⁻⁶ para posterior plaqueamento nos meios selecionados. As diluições foram realizadas para os dois tubos contendo o espécime (Ringer e TGM), sendo semeadas, respectivamente, no meio específico para isolamento de *G. vaginalis* e nos demais meios de cultivo, previamente selecionados.

Das diluições 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e semeadas, com auxílio da alça de Drigalski, nos seguintes meios de cultura: Agar Vaginalis Modificado – VAM (Base Agar Columbia-Difco. Francisco, 1990), para *G. vaginalis*; Agar MRS (Man, Rogosa & Sharpe-Difco), para *Lactobacillus* spp.; “Brain Heart Infusion” agar (Difco), suplementado com 5% de sangue de cavalo, hemina 0,05 mg/ml, menadiona 0,01 mg/ml e extrato de levedura 0,5% (AS), para espécies anaeróbicas eventualmente presentes, e no meio Bacteroides-Bile-Esculina (BBEDifco), seletivo para bactérias do grupo *B. fragilis* e RLK (Base Agar Columbia, Difco., Smith and Moore, 1988), para *Mobiluncus* spp.

As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose, a 37°C, por 48 horas ou por até sete dias. Após este intervalo de tempo, foram observados e anotados os crescimentos, bem como feita a contagem das colônias e descrição dos morfotipos. As colônias com morfologia diferente foram repicadas para se obter cultura pura e, após crescimento, estas passaram por teste respiratório, para determinação dos anaeróbios obrigatórios, após incubação em anaerobiose, microaerofilia e aerobiose, a 37°C, por 24 a 48 horas. A identificação presuntiva teve por base, além das características coloniais e teste respiratório, a produção de catalase e a coloração de Gram, com a caracterização de todos os tipos distintos de colônias que cresceram nos meios de cultivo.

4.4 Identificação presuntiva e manutenção das amostras

4.4.1 Identificação de *G. vaginalis*

Para a identificação presuntiva de *G. vaginalis*, as colônias suspeitas presentes no Agar vaginalis modificado foram submetidas à coloração de Gram, prova da catalase e verificada a produção de hemólise em V.A.M.

Segundo a literatura, a utilização de técnica convencional é suficiente para identificação de cepas de *G. vaginalis*, visto que este microrganismo é o único do gênero. Assim, foram realizados os seguintes testes para confirmar a identificação: hidrólise do amido; hidrólise do hipurato; oxidase e pesquisa das enzimas alfa e beta galactosidase, segundo Piot *et al.* (1982) e de frutose - 6- fosfato - fosfoquetolase (ORBAN & PETERSON, 2000).

4.4.1.1 Prova da catalase

A partir da cultura em meio sólido, com auxílio da alça de platina, o microrganismo foi emulsionado em uma gota de H₂O₂ a 3%, depositada em lâmina. O aparecimento imediato de bolhas de gás revela a presença da enzima catalase (MCHARD, 1979), sendo este teste negativo para *G. vaginalis*. Como controle positivo, foi utilizada a amostra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4.4.1.2 Prova da oxidase

A partir da cultura em meio sólido, o microrganismo foi depositado, com auxílio de palito de madeira, em fita de papel de filtro embebida em solução a 1% de nitrato de tetrametil p-fenileno diamina (Laborclin). Neste teste, o desenvolvimento de cor azul intensa é indicativo da presença da enzima citocromo oxidase (Greenwood e Pickett, 1980), teste este negativo para *G. vaginalis*. Como controle positivo, foi utilizada a amostra de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10154.

4.4.1.3 Hidrólise do amido

Para realização deste teste, foi utilizado o replicador de Steers (STEERS *et al.*, 1959), para a obtenção de 'spots' mais homogêneos. O inóculo contendo o microrganismo foi semeado em placas de agar Mueller Hinton (Difco), com 1% de proteose peptona nº. 3 (Difco) e 1% de soro normal de cavalo. Após incubação a 37°C, por 48 horas, em 5% de CO₂, a presença de amilase foi revelada pela adição de lugol a 2% à placa, observando-se a formação de halo claro ao redor das colônias, segundo Piot *et al.* (1982). Como controle positivo, foi utilizada a amostra de *G. vaginalis* ATCC 14018.

4.4.1.4 Hidrólise do hipurato (N - benzoilglicina)

Uma solução estoque de hipurato de sódio (Sigma) a 1%, em água destilada, foi distribuída em alíquotas de 0,5 ml em tubos pequenos e conservados a -20°C. No momento do teste, uma alçada da bactéria foi emulsionada na solução de hipurato e incubada por duas horas, a 37°C, em banho Maria. Após este período, foram adicionados 0,2 ml de solução a 3,5% de ninhidrina P.A (Vetec), seguindo-se reincubação por, no máximo, 15 minutos.

Uma reação positiva, detectada pela formação do ácido benzóico ou glicina, observada para *G. vaginalis*, foi indicada pelo desenvolvimento da cor púrpura, segundo Piot *et al.* (1982). Foi utilizada como controle a amostra de *G. vaginalis* ATCC 14018.

4.4.1.5 Alfa e beta glicosidase

A presença de α e β glicosidase foi verificada em uma solução a 0,1% de p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo (Sigma) e de p-nitrofenil-beta-D-glicopiranosídeo (Sigma), respectivamente, em solução tampão fosfato 0,067 M, pH 8,0. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a -20°C, em alíquotas de 0,5 ml. No momento do teste, uma alçada da bactéria foi inoculada nos tubos e incubados a 37°C, em banho Maria, e a leitura foi efetuada após 2 horas.

Para interpretação do teste, um resultado positivo se confirma pelo desenvolvimento de cor amarela, representando 100% positivo para alfa-glicosidase, pois *G. vaginalis* apresenta atividade para esta enzima e 100% negativo para beta-glicosidase, condição na qual a coloração do tubo teste permanece inalterada, ou seja, incolor. Foi utilizada como controle a amostra de *G. vaginalis* ATCC 14018 (FRANCISCO, 1990).

4.4.1.6 Teste da Frutose-6-Fosfato Fosfoacetolase (F6PPK)

Este teste consistiu em cultivar em câmara anaeróbica, a 37°C, por 48 horas, as amostras isoladas em 10 ml de caldo Brucella (Difco), suplementado com extrato de carne, Proteose Peptona nº3 (Difco), Tween 80 a 10% e soro inativado de cavalo. Após este período, a cultura foi centrifugada a 10.000 g, a 4°C, por 15 minutos, sendo o precipitado lavado duas vezes com solução tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 6,5, acrescido de cisteína, HCl 500 mg/l. As células foram suspensas em 1 ml da mesma solução.

Em seguida, foram acrescentados 0,4 ml da solução de Cetrimonium bromide (CTAB-450 µg/ml solução estoque), incubando-se os tubos por 5 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram acrescentados, 250 µl de solução de fluoreto de sódio (NaF) 3 mg/ml + iodoacetato de sódio 5 mg/ml e 250 µl da solução de frutose-6-fosfato (Sigma), na concentração de 80 mg/ml. A mistura foi agitada em vórtex e os tubos foram incubados por 30 minutos, a 37°C. Após a incubação, foram acrescentados 1,5 ml da solução HCl hidroxilamina 135, pH 6,5, seguindo-se homogeneização e incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente e, logo após, adição de 1,0 ml de cada uma das soluções de ácido tricloroacético (TCA) 15% p/v, HCl 4N e cloreto férrico 5% p/v. O aparecimento de uma cor violeta avermelhada, que se desenvolve imediatamente, indica uma reação positiva. Tubos controle, sem a solução de frutose-6-fosfato, foram também incluídos (ORBAN *et al.*, 2000).

4.5 Identificação de espécies do gênero *Candida*.

Devido ao grande número de linhagens de leveduras isoladas, procurou-se identificá-las por métodos bioquímico-fisiológicos convencionais e confirmar a identificação utilizando método molecular de PCR- *fingerprint*, com a colaboração do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do ICB/UFMG, onde a técnica se encontra estabelecida.

O isolamento das amostras foi realizado utilizando-se o meio ágar Sabouraud modificado (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0.5%, ágar 2%), acrescido de cloranfenicol (100 mg/L). O material foi semeado em placas de Petri contendo o meio citado e incubadas a 37°C, por 48 horas. A identificação presuntiva foi realizada no meio CHROMágar® *Candida*. Após semeadura da amostra nesse meio, há alteração da coloração da colônia, dependente da espécie isolada. Assim, após 48 horas de incubação a 30-37°C, é possível distinguir *Candida albicans*, que se torna esverdeada, *Candida krusei*, rósea, *Candida glabrata*, lilás, *Candida tropicalis*, azul-acinzentada, e as demais espécies, róseoesbranquiçadas.

Os representantes selecionados de cada morfotipo foram purificados e armazenados para posterior confirmação na identificação molecular. Todas as leveduras foram identificadas por metodologia padrão e chaves taxonômicas presentes em Kurtzman & Fell (1998).

A relação genética entre as amostras do mesmo ribotipo e a diferenciação entre os ribotipos foram comprovadas pela técnica de DNA-*fingerprinting* usando o iniciador (GTG) 5. Um ou dois representantes de cada ribotipo foi, posteriormente, identificado por seqüenciamento da região D1/D2 do DNA ribossomal.

4.5.1 Identificação molecular das amostras sugestivas de *Candida* spp.

Para a extração de DNA, as leveduras foram crescidas em agar sabouraud modificado, por 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina, uma ou duas colônias de cada levedura foi colocada em “Eppendorfs” estéreis contendo 100 µl de água mili-q estéril. Em seguida, os tubos foram colocados em nitrogênio líquido, por 5 minutos. Após este período, os tubos foram retirados do nitrogênio e fervidos em

um banho com água, por 10 minutos (de Barros Lopes *et al.* 1996). Os tubos foram armazenados em “freezer” para posterior utilização.

Para a identificação presuntiva e diferenciação molecular das linhagens foi utilizado o iniciador EI1 (5'-CTGGCTTGGTGTATGT-3'), que tem complementaridade aos sítios de processamento de íntrons (de Barros Lopes *et al.*, 1996). Segundo de Barros Lopes *et al.* (1998), linhagens da mesma espécie apresentam perfis de amplificação semelhantes. Este iniciador já foi utilizado em vários trabalhos para a identificação de linhagens e espécies de leveduras (PATARO *et al.*, 2000; GUERRA *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2002; ARAÚJO, 2003; CARREIRO *et al.* 2004; PIMENTA *et al.* 2005; ROSA *et al.* 2007). As condições de PCR foram aquelas descritas por Pataro *et al.* (2000). Linhagens de referência de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram utilizadas para efeito de comparação. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os resultados da amplificação foram comparados com as amostras de referência que foram dispostas nas canaletas iniciais de cada gel.

4.5.2 Caracterização molecular pela técnica ISSR com o primer GTG₅

O iniciador GTG₅ foi utilizado para amplificar seguimentos de DNA de amostras de levedura de pacientes com e sem VB.

A reação de amplificação do DNA da região ISSR com o iniciador GTG₅ (GTGGTGGTGGTGGTG), descrita por Silva e Filho *et al.* (2005), foi realizada no volume de 25µl, nas seguintes condições: tampão de PCR 10X (Tris-HCL 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM) MgCl₂ 0,75 mM, BSA (soro albumina bovina) 0,25 µg/µl, dNTP 0,25 mM, 0,25 µM do iniciador, Taq DNA polimerase 0,1U e 50 ng de DNA, utilizando-se termociclador.

A amplificação para GTG₅ foi programada para um ciclo de desnaturação de 5 minutos, a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por 15 segundos; anelamento a 55°C, por 45 segundos; extensão a 72°C, por 90 segundos e, finalmente, 6 minutos, a 72°C, para extensão final.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3% a 7,5 volts/cm, por 2 horas e 30 minutos em tampão TBE 0,5%, utilizando como marcador uma levedura padrão, corados em solução de brometo de etídio (TBE 1X/ Etbr 0,5 µg/ml – SAMBROOK *et al.*, 1989), visualizados em transluminador de luz U.V e fotografados.

4.5.3 Sequenciamento da região D1D2 da subunidade maior do DNA ribossomal

Linhagens que apresentaram perfis de PCR diferentes das espécies mais comuns presentes em infecções por *Candida* spp. foram sequenciadas para confirmar a identificação. O sequenciamento foi feito da região D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal, utilizando-se os iniciadores NL1 (5´GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3´) e NL4 (5´-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3´). Todos os procedimentos foram feitos de acordo com os protocolos descritos por Lachance *et al.* (1999). Os produtos de PCR foram sequenciados em um sequenciador automático MegaBace™ (Amersham Biosciences, USA). As sequências foram editadas usando o programa DNAMAN (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Québec). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências já depositadas no GenBank, e as sequências similares foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). O poder discriminatório das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA é considerado suficiente para diferenciar espécies de leveduras, pois amostras da mesma espécie apresentam, no máximo, duas a três bases diferentes em uma região de, aproximadamente, 600 nucleotídeos (KURTZMAN & ROBNETT 1998).

4.6 Identificação das amostras do gênero *Lactobacillus*

4.6.1 Identificação molecular pela técnica PCR-ARDRA

Para a identificação molecular das amostras do gênero *Lactobacillus*, foi utilizada a técnica PCR- ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis), que consiste na amplificação por PCR do segmento intergênico compreendido entre rRNA 16S e 23S e análise por digestão enzimática dos fragmentos amplificados segundo Moreira *et al.*, (2005).

4.6.2 Extração de DNA

O DNA cromossômico foi obtido utilizando-se o Kit de extração de DNA, *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), acrescentando-se à metodologia a preparação das células com cloreto de lítio, para uma melhor digestão da parede celular pela lisozima. As amostras foram crescidas em caldo MRS (Difco) (5,0 ml), por 18 horas, em anaerobiose. Cerca de 2,0 ml da suspensão de cada amostra foram transferidos para tubo de microcentrifuga e submetidos a 14.000 rpm x g, a 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram suspensos em 200 µl de cloreto de lítio (LiCl) 5 M. Os tubos foram incubados durante 1 hora, sob agitação. As suspensões foram centrifugadas a 14.000 rpm x g, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram suspensos com 480 µl de EDTA 50 mM, acrescidos com 120 µl de solução de lisozima (10mg/ml) e agitados delicadamente. As misturas foram incubadas a 37°C, por 1 hora, centrifugadas a 14.000 x g, a 4°C, por 4 minutos e os sobrenadantes descartados.

Em seguida, foram adicionados 300 µl de tampão de lise. Cada mistura foi suspensa e incubada a 37°C, por 10 minutos. Após este período, o conteúdo dos tubos foi transferido para as microcolunas (tubos de coleta).

As microcolunas foram levadas à microcentrifuga por 50 minutos, a 14.000 rpm, para que o líquido fosse coletado no tubo e o DNA retido na resina da microcoluna. Após este período, o líquido foi descartado e foram feitas lavagens sucessivas (5X) com 650 µl da solução de lavagem.

Após as lavagens, os tubos foram centrifugados por mais um minuto a 14.000 rpm, para secar.

As microcolunas foram transferidas para tubos “ependorf” de 2 ml, permanecendo a tampa aberta. Foram adicionados 150 µl de água morna (65°C),

livre de nucleases, para eluir o DNA na resina e o conjunto deixado em repouso, por 2 minutos.

Após este período, os tubos foram centrifugados por 7 minutos. O líquido que passou pelo tubo é o DNA extraído. A cada amostra foi adicionado 1 µl de solução de RNase.

As amostras foram mantidas em freezer a – 20°C, para utilização nas etapas seguintes de identificação molecular.

4.6.3 Quantificação do DNA

A quantidade e a integridade do DNA foram determinadas visualmente, após eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com 6 µl de brometo de etídio (10mg/ml) e, ainda, pela utilização de NanoDrop 2000, que revela a quantidade em µg de DNA por µl da amostra extraída, com comprimento de onda de 260nm ($\lambda = 260\text{nm}$). No gel de agarose, para comparação, foi utilizado um padrão de peso molecular de 1 Kb DNA plus (Invitrogen). Em um eppendorf foram colocados 5 µl da suspensão da amostra a ser analisada e 1 µl de azul de bromofenol. Os 6 µl de cada amostra e o padrão foram, então, aplicados no gel de agarose, 1,4%, com brometo de etídio, e submetidos à eletroforese, empregando-se tampão TAE, por cerca de 40 minutos, a 100v. Após este período, foi observado em transluminador de luz ultravioleta (Cole – Parmer, Vernon Hilles, Illinois, USA). Quando necessário, as amostras foram diluídas em água quimicamente pura (Sigma).

4.6.4 Amplificação da região intergênica 16S-23S pela reação em cadeia da polimerase

Após a extração do DNA bacteriano, este foi usado como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação dos genes que codificam a região intergênica do rRNA 16S-23S.

Foram utilizados os iniciadores 16 - 1A 5' – GAATCGCTAGTAATCG – 3' correspondentes aos nucleotídeos 1361 ao 1380 do gene 16S rRNA de

Lactobacillus casei e 23 – 1B 5' - GGGTTCCCCCATTCGGA– 3', correspondentes aos nucleotídeos 123 A 113 DO GENE 23S rRNA de *L. casei* (TILSALA – TIMISJARVI E ALATOSSAVA, 1997; MOREIRA *et al.*, 2005).

As reações de PCR foram realizadas no aparelho PCR Express Thermo Hybaid e foram preparadas com PCR Master Mix (Promega) na seguinte proporção: 5 µl da preparação do DNA alvo, 30 µl de PCR Master Mix, 6 µl de cada iniciador na concentração de 10X, 13 µl de água quimicamente pura (Promega) em um volume final de 50 µl.

As amplificações foram feitas de acordo com o seguinte esquema: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C, por 30 segundos; 55°C, por 1 minuto; 72°C, por 1 minuto e, finalmente, 4°C, por 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta, em gel de agarose, a 1,4%, corado com brometo de etídio.

A identificação do gênero foi confirmada pela presença de 3 regiões intergênicas 16S-23S (espaçadores grande, médio e pequeno).

4.6.5 Digestão com enzimas de restrição

Os fragmentos amplificados e purificados foram digeridos com as seguintes endonucleases específicas para *Lactobacillus*: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *Hind III* e *Avr II* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A escolha das enzimas de restrição foi baseada na metodologia em sequências depositadas no Genbank.

Os produtos de PCR digeridos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose, 1,4% com brometo de etídio. As espécies de *Lactobacillus* foram identificadas comparando-se o padrão de digestão das enzimas, com o padrão de digestão dos espaçadores (QUADRO 2).

QUADRO 2 – Perfil de digestão dos espaçadores amplificados por PCR da região intergênica 16S23S de diferentes espécies de *Lactobacillus*.

SphI	NcoI	NheI	SspI	SfuI	EcoRV	DraI	Vsp I	HincII	EcoRI	HindIII	AvrII	IDENTIFICAÇÃO
---	+++	---	---	+-	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	++	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
+++	---	---	---	+-	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
---	+++	---	---	+-	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
+++	+-	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. farciminis</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. ferintoshensis</i>
+++	---	+-	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	+++	<i>L. gasserii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. hilgardii B</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	---	<i>L. johnsonii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. mucosae</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. murinus</i>
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. nagelli</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+-	+++	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	<i>L. pantheris</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+-	---	+++	---	<i>L. perolens</i>
+++	---	---	+++	+-	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum B</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. pontis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. reuteri A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri B</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. rhamnosus</i>
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+-	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. vaginalis A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. vaginalis B</i>

4.6.6 Identificação das demais amostras

Os espécimes clínicos foram semeados em Agar seletivo como já descrito, incubados a 37°C, em atmosfera e tempo adequados.

Após isolamento, todos os morfotipos foram submetidos à coloração de Gram, teste da catalase e teste respiratório. Para as colônias suspeitas do gênero *Staphylococcus* foi realizado o cultivo em Meio Baird Baker com gema de ovo, que facilita a identificação, além do teste da coagulase. Os demais microrganismos isolados foram identificados presuntivamente por crescimento característico em meio seletivo e bacterioscopia, e se encontram conservados em freezer -86°C, para trabalhos posteriores.

4.7 Produção de substâncias antagonistas

4.7.1 Teste do antagonismo *in vitro*

4.7.1.1 Amostras produtoras

Para o teste do antagonismo *in vitro*, foram utilizadas todas as amostras recuperadas e identificadas pela técnica de PCR-ARDRA, no total de 83 isolados.

4.7.1.2 Amostras reveladoras

Para a detecção do antagonismo, foram utilizadas como reveladoras, as amostras de *G. vaginalis* isoladas de pacientes com e sem VB, recuperadas neste trabalho, além da amostra de referência ATCC *G. vaginalis* 14018, perfazendo um total de 25 linhagens de *G. vaginalis*. Além disso, foram utilizadas amostras de referência conhecidas, para se testar o perfil de heteroantagonismo das amostras de *Lactobacillus* spp, sendo: *E. faecalis* ATCC 19433, *C. albicans* ATCC 18804, *C. difficile* ATCC 9689, *C. perfringens* Tipo 3624, *L. monocytogenes* ATCC 1531, *G. vaginalis* ATCC 14018, *F. nucleatum* ATCC 10953, *B. vulgatus* ATCC 8482, *P. anaerobius* ATCC 27337, *B. fragilis* ATCC 25923, *F. necrophorum* ATCC 25286, *S. aureus* ATCC 33591, *P. nigrescens* ATCC 33569, *P. gingivalis* FDC 381, *P.*

melaninogenica ATCC 24845, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. longum* ATCC 15707, além das amostras clínicas de *Lactobacillus* (auto e isoantagonismo).

4.7.1.3 Determinação de atividade antagonista *in vitro*

A atividade bacteriocinogênica foi avaliada pelo método da sobrecamada (BOOTH *et al.*, 1977 e FARIAS *et al.*, 1992). Alíquotas de culturas de *Lactobacillus* spp. crescidas em caldo MRS por 18 horas, em anaerobiose, contendo, aproximadamente, 10^5 células/spot, foram inoculadas nas placas de petri contendo Agar MRS.

Após incubação a 37°C, por 48 horas, em câmara anaeróbica, as amostras teste foram mortas pela exposição ao clorofórmio por 30 minutos. Após evaporação do clorofórmio residual por mais 30 minutos, as amostras teste foram recobertas com 3,5 mL de meio semi-sólido (caldo brucella acrescido de 0,75% de agar bacteriológico, 0,1% de proteose peptona, 0,5% de extrato de carne e 5% de soro de cavalo inativado), contendo 0,2 mL da amostra bacteriana reveladora (*G. vaginalis*) previamente crescida em meio líquido adequado. As placas com as culturas foram levadas a 37 °C, por 24 a 48 horas, em anaerobiose. A leitura do experimento foi realizada pela análise da formação de halos de inibição de crescimento das amostras reveladoras (Figura 6).



FIGURA 6 – Teste de antagonismo microbiano *in vitro* pelo método da difusão em camada dupla de ágar: a) 5 μ L de cultura contendo *Lactobacillus* spp. (10^9 UFC/mL) são semeados em ágar MRS. b) Um dos passos da inativação por vapor de clorofórmio. c) Sobrecamada de ágar brucella semi-sólido, contendo *Gardnerella vaginalis* (10^8 UFC/mL).

4.7.1.4 Teste para excluir a inibição do crescimento devido à ação do clorofórmio

Resíduos de clorofórmio nas amostras teste podem eventualmente inibir o crescimento das amostras reveladoras. Para eliminar esta possibilidade, foram inoculadas as amostras produtoras (em “spots”) em meio MRS, incubando-se a 37°C, em anaerobiose, por 48 horas. Após o crescimento, inóculo de cada amostra reveladora foi estriado (em cruz) próximo às amostras produtoras, sem tocá-las. As placas foram incubadas e examinadas após 48 horas, para observação de halo de inibição (FARIAS *et al.*, 1992)

4.7.2 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

O teste semiquantitativo da produção do peróxido de hidrogênio foi realizado como descrito por Rabe & Hillier (2003). As amostras de *Lactobacillus* spp. foram crescidas em caldo MRS, por 18 horas, a 37°C, em anaerobiose e semeadas em meio TMB-plus, utilizando-se o replicador de Steers. Após incubação a 37°C, por 48 horas em anaerobiose, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e foram expostas ao oxigênio por cerca de 30 minutos. O aparecimento de uma coloração azul nas colônias indica teste positivo, produção de peróxido de hidrogênio. Como controle positivo, foi utilizada a amostra de referência *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

4.7.3 Susceptibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade antimicrobianos foram realizados pelo método de diluição em agar, recomendado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” – CLSI (2007).

Esta metodologia consiste em adicionar antibióticos, a partir das soluções estoque, de modo a atingir concentrações de drogas variando entre 0,0625 a 512 µg/ml, no meio de cultura Brucella (Acumedia) suplementado com proteose peptona n°3 (Difco) e sangue humano desfibrinado. Os inóculos bacterianos foram

preparados em caldo Brucella (Acumedia), suplementado com extrato de carne (Difco), proteose peptona nº3, Tween 80 a 10% e soro inativado de cavalo, padronizados em densidade, para corresponder a 0,5 da escala de McFarland. As placas foram, então, inoculadas, em duplicata, com a utilização do replicador de Steers (STEERS *et al.*, 1959) e incubadas em câmara anaeróbica, a 37°C, por 48 horas.

As amostras foram consideradas sensíveis ou resistentes, conforme comparação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) detectadas com as CIMs interpretativas fornecidas pelas tabelas padrão do CLSI (2007) para anaeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos.

Foram utilizadas neste trabalho 20 amostras de *G.vaginalis*. Como controles para os testes, foram incluídas duas amostras de referência (“American Type Culture Collection” – ATCC), *G.vaginalis* ATCC 14018 e *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, esta como parâmetro de comparação, por se tratar de uma amostra com perfil de susceptibilidade conhecido, segundo o CSLI (2007), uma vez que testes de susceptibilidade para *G.vaginalis*, não são especificados no CSLI.

As amostras originais, após isolamento, foram mantidas em agar Columbia (Difco), suplementado com sangue humano, durante os testes de susceptibilidade e estão sendo conservadas em “freezer” a -86°C, em caldo Brucella suplementado, acrescidos de 15% de glicerol, para eventual recuperação.

4.7.4 Drogas antimicrobianas testadas

A seleção dos antimicrobianos teve por base o seu uso terapêutico na medicina humana. Foram utilizados quatro antimicrobianos de uso rotineiro nos regimes terapêuticos para tratamento de VB: Clindamicina (Purifarma) Metronidazol (SIGMA), Secnidazol e Tinidazol, sendo os dois últimos fornecidos pela empresa farmacêutica MEDLEY/AS.

Os antimicrobianos (pó) eram armazenados e as soluções estoque concentradas dos antimicrobianos foram preparadas previamente, em água destilada ou em outro solvente ou diluente, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7.5 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura era realizada considerando-se a concentração inibitória mínima (CIM) como a menor concentração do antimicrobiano (expressa em microgramas por mililitro), que inibisse o crescimento do microrganismo testado. Para cada amostra, com cada um dos antibióticos, os resultados se referem aos dados obtidos em, no mínimo, dois experimentos realizados em duplicata.

4.8 Função de Proteção Ecológica

4.8.1 - Animais Isentos de Germes (Ig)

Foram utilizadas 36 fêmeas de camundongos isentos de germes (IG) da linhagem NIH (Taconic, Germantown, NY, USA), de 28 dias de idade, como grupo controle e grupos experimentais nos experimentos de associação. Os animais foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG. Foram mantidos em isoladores flexíveis (Standard Safety Company, McHenry, USA), de acordo com as normas técnicas estabelecidas por PLEASANTS (1974), adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986). Para os experimentos, os animais foram retirados dos isoladores e mantidos em microisoladores (UNO Roestvaststaal B. V., Zevenar, Holanda) no biotério do Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG.

Para o presente estudo, os camundongos receberam ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água esterilizada, por calor úmido, *ad libitum*.

4.8.2 – Manejo dos animais

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando o “Guide for the care and use of experimental animal”, CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, vol 1, (1993), e o “Curso de Manipulação de animais de Laboratório” (Fundação Oswaldo Cruz, 2005).

4.8.3 - Microrganismos

As linhagens bacterianas utilizadas para associação com os animais IG foram isoladas da microbiota vaginal de mulheres com e sem VB. Até a sua utilização, foram mantidas em freezer -86°C, com 10% de glicerol.

4.8.4 - Obtenção dos Animais Gnotoxênicos (Gn)

Em câmara anaeróbica, foram preparadas, nos caldos Brucella e MRS, suspensões das linhagens bacterianas isoladas de duas mulheres. As bactérias foram previamente cultivadas em caldo Brucella suplementado (*G. vaginalis*) e caldo MRS (*Lactobacillus* spp.) por 24-48h, a 37°C, em anaerobiose. A suspensão foi levada para um fluxo laminar (VECO, Campinas, SP) no tempo determinado para inoculação, e cada animal em microisolador recebeu imediatamente 20µl da suspensão de bactérias intravaginalmente. A concentração média aproximada de cada bactéria foi de 10^7 - 10^8 UFC/ml.

4.8.5 Tratamento dos camundongos IG com estrogênio

Neste estudo, foi avaliado o efeito de animais tratados ou não com o hormônio estrogênio, para se verificar a influência do mesmo na colonização e no desafio com as amostras bacterianas utilizadas. Os camundongos não tratados com hormônio foram considerados como do grupo controle, enquanto os que receberam tratamento hormonal foram considerados do grupo teste.

Foram utilizadas duas doses de 500µl de benzoato de estradiol (0,5 mg), dissolvido em 0,1 ml de óleo de amendoim (Estrogin-FARMAVET). O hormônio foi administrado no tecido subcutâneo do ventre dos animais, por meio de uma seringa esterilizada, 72 horas antes do desafio, e a segunda dose, com a mesma quantidade, 72 horas após o desafio (FIDEL *et al.*, 1993a; HAMAD *et al.*, 2004).

4.8.6 Testes de inibição “in vivo”

De acordo com o espectro de atividade “in vitro”, uma linhagem de *Lactobacillus johnsonii*, isolada de paciente saudável (P12), foi selecionada para o teste “in vivo”. Foi utilizada, para o desafio, uma amostra de *Gardnerella vaginalis* proveniente de paciente com VB, que mostrou sensibilidade à atividade antagonista nos testes “in vitro”. Os microrganismos foram crescidos em tubos de ensaio, em caldo específico, por 18-48 horas, dependendo da amostra a ser inoculada, em câmara de anaerobiose, a 37°C.

Os camundongos dos grupos teste e controle receberam intravaginalmente, 10µl da cultura de *L. johnsonii* (10^9 UFC/ml) previamente homogeneizada. Ambos os inóculos foram realizados 72 horas antes do desafio com *G. vaginalis*. O inóculo foi realizado utilizando-se uma micropipeta esterilizada (Eurotips Scientific, USA) acoplada a uma pipeta (Pipetman, Gilson, USA) (Figura 7).



FIGURA 7 - Técnica de administração intravaginal de microrganismos crescidos em caldo, em camundongos NIH.

4.8.7 Desafio

O inóculo de *G. vaginalis* foi preparado a partir do cultivo em meio líquido brucella com suplementos, mantido em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Os camundongos, tanto do grupo teste, quanto do controle, receberam 10µl dessa cultura, previamente homogeneizada, contendo 10⁷ UFC/ml.


Para fins de se verificar a colonização pelos microrganismos em estudo, foi realizado um experimento paralelo com os seguintes grupos de animais: Grupos A e B, inoculados com *L. jhonsonii*, com tratamento hormonal; Grupos D e E, animais inoculados com *L. jhonsonii*, que não receberam tratamento hormonal; Grupo C, animais inoculados com *G.vaginalis* com tratamento hormonal e Grupo F, sem tratamento hormonal. Os Grupos A, C, D e F não passaram pelo desafio, mas, foram sacrificados no mesmo período de dias dos animais desafiados. Para o desafio, consideramos o Grupo B, que recebeu hormônio e o Grupo E, que não recebeu hormônio, sendo que foram analisados três animais por grupo.


Para os testes realizados com camundongos isentos de germes foi seguida a sequência de eventos mostrada no QUADRO 3:

Quadro 3 - Sequência de eventos realizados com animais germ free.


Animais COM Hormônio

DIA -2 - Inóculo Hormônio


DIA 1 LACTO  GRUPO A

DIA 1 LACTO  GRUPO B

DIA 3 - Inóculo Hormônio


DIA 5  GRUPO B


LACTO + inóculo GV (**DESAFIO**)


DIA 5  GRUPO C

Inóculo GV


Animais SEM Hormônio

DIA 1 LACTO  GRUPO D

DIA 1 LACTO  GRUPO E

DIA 5  GRUPO E

LACTO + inóculo GV (**DESAFIO**)

DIA 5  GRUPO F

Inóculo GV

DIA 10 sacrifício dos animais/ pesagem do tecido vaginal/diluição e **DIA 10** **sac**rifício dos animais/ pesagem do tecido vaginal/diluição e plaqueamento
DIAS 12 -15 **Leitura das** placas plaqueamento **DIAS 12 -15** Leitura das placas

4.8.8 Determinação do efeito das linhagens de *Lactobacillus* spp. na colonização vaginal por *Gardnerella vaginalis* em camundongos gnotoxênicos

Os testes realizados nesta fase se basearam nas metodologias descritas por Hamad *et al.* (2004); Martins (2004) e Carvalho (2007).

Uma semana após o desafio, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical (FIOCRUZ (2004). Os níveis populacionais bacterianos (UFC/g de tecido vaginal) foram determinados a partir da remoção dos tecidos vaginais (Figuras 8 e 9) dos camundongos (todos os grupos estudados), que foram homogeneizados em alíquotas correspondentes de salina tamponada esterilizada, de forma a se obter a primeira diluição (10^{-1}) (Figura 10). Diluições seriadas foram feitas no mesmo diluente. Uma alíquota de 0,1 ml das diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} foi semeada em placas de Petri contendo ágar vaginalis (*G. vaginalis*) e agar MRS (*Lactobacillus*). As placas foram incubadas durante 24-48 h, a 37°C, em anaerobiose. Todos os testes foram feitos em triplicata. Após o crescimento das colônias nos meios de cultura, foi realizada contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Foram feitos esfregaços em lâminas, corados pelo Gram e visualizados em microscópio, para se excluir a possibilidade de contaminantes.

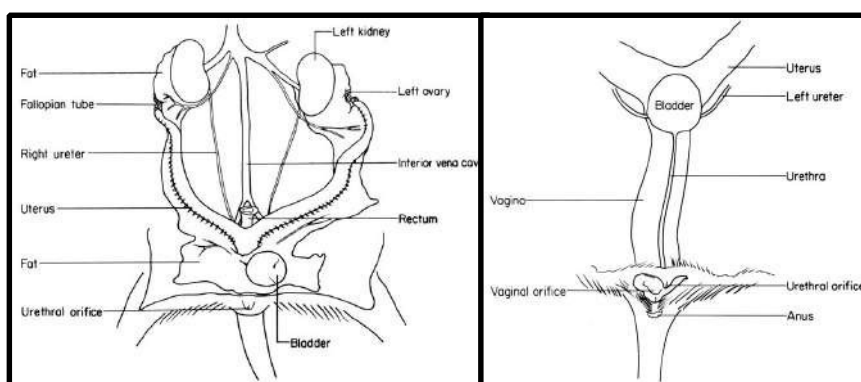


FIGURA 8 – Anatomia do trato urogenital da fêmea do camundongo de Ilaboratório. Fonte: COOK, 1965, p. 78-80.

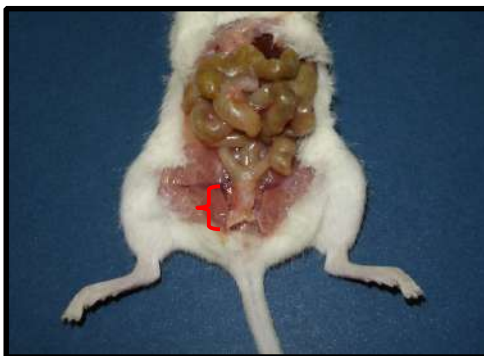


FIGURA 9 - Aspecto do trato urogenital da fêmea de camundongo NIH. a) Chave vermelha: porção de tecido removida para análises microbiológicas e histopatológicas (cerca de 5mm).



FIGURA 10 - Macerador e pistilo utilizados para homogeneização dos tecidos vaginais de camundongos NIH isentos de germes.

4.8.9 Exame histopatológico

Amostras dos tecidos vaginais dos camundongos de todos os grupos testados, foram submetidas ao exame anatomopatológico. As amostras foram fixadas em formaldeído a 4% e processadas para a inclusão e microtomia em parafina. Foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura, posteriormente corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Os fragmentos das amostras codificadas foram observados sequencialmente por uma mesma patologista Prof. Rosa M. E. Arantes, Departamento de Patologia Geral/ICB/UFMG, que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista.

4.8.9.1 Manutenção das amostras

Todas as amostras estão catalogadas e preservadas em caldo específico para o microrganismo, acrescido de 15% de glicerol estéril em criotubos (1.5 ml). Os tubos estão armazenados em ultrafreezer a -86°C no laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

4.9 Análise Estatística dos Dados – Aspecto Epidemiológico

Quanto à análise, primeiramente uma breve descritiva para traçar um perfil da amostra e ter alguma noção visual do comportamento da presença e número de bactérias nas pacientes, além de relacionar os fatores inerentes das pacientes ao quadro clínico.

Em função das variáveis em estudo, foi utilizado o teste t de student para comparação de médias e o teste de Qui - Quadrado para ajuste e independência (ambos paramétricos).

Para garantir uma análise quantitativa mais precisa, foi utilizado o teste exato de Fisher (EPISTAT, Gustafson, Round Rock, TX, USA) dependendo dos dados, considerando o nível de significância fixado em 0,05.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dados clínico-laboratoriais das 70 pacientes

A primeira técnica padronizada para diagnosticar VB foi proposta por Amsel *et al.*, (1983) e é baseada em um conjunto de critérios clínicos. O fato de se ter utilizado neste trabalho a associação de métodos diagnósticos para VB, conforme proposição de Amsel *et al.*, (1983), e não um único método isolado, afasta a possibilidade de subdiagnóstico e reforça a acurácia dos resultados.

5.1.1 Determinação do pH vaginal

Quanto à faixa de pH vaginal, medida com papel indicador (Macherey Nagel), as participantes foram divididas em dois grupos: aquelas apresentando pH até 4,5 e aquelas com pH acima de 4,5.

A figura 11 mostra a comparação do número de pacientes quanto aos valores de pH vaginal, considerando-se o perfil clínico com e sem VB. Observase um número maior de mulheres com pH vaginal menor ou igual a 4,5 no grupo das pacientes assintomáticas (36/40), correspondendo a 90%, sendo $p=10^{-8}$. Os estudos da literatura indicam que um pH vaginal menor que 4,5 é boa indicação de que a paciente não tem VB e que mantém bons níveis estrogênicos (PLATZ-CHRISTENSEN *et al.*, 1992; CAILLOUETTE *et al.*, 1997).

O pH do fluido vaginal de pacientes com VB é maior que 4,5, usualmente entre 5,0 e 5,5. Gardner & Dukes (1955) relataram que todas as pacientes com VB apresentavam pH maior que 4,5 e, destas, 91% maior que 5,0. Em contraste, 92% das mulheres com fluido vaginal normal apresentavam pH entre 4,0 e 4,5.

Entre as pacientes com VB, o número de mulheres com pH vaginal acima de 4,5 foi de 27/30 (90%), sendo estaticamente significativo, com $p=10^{-8}$. Isto confirma a literatura, que mostra ser o pH vaginal elevado (5,0-6,5), em pacientes normalmente estrogenizadas, quase sempre associado à VB (HILLIER *et al.*, 1995). Das 30 pacientes que apresentavam VB, apenas 3 possuíam um pH

abaixo de 4,5, porém Amsel *et al.* (1983) indicam que para ser considerado VB, deve ser observado pelo menos 3 dos 4 critérios adotados, já mencionados, assim, podemos afirmar que mesmo não se constatando o pH característico de VB nestas 3 pacientes, as mesmas apresentavam este quadro clínico, devido aos outros parâmetros avaliados como presença de amins voláteis (teste KOH-Whiff test), descarga vaginal homogênea e presença de clue cells no exame a fresco. Porém, foi notório que a medida do pH se faz importante no diagnóstico de VB, pois 90% das pacientes com este quadro, apresentavam pH acima de 4,5. Isso reforça a utilidade da medida do pH vaginal como parâmetro diagnóstico, além de ser simples e barato, concordando com diversos trabalhos na literatura (GARDNER & DUKES, 1955; DONDERS, 1999; CARVALHO *et al.*, 2001; GIRALDO *et al.*, 2007).

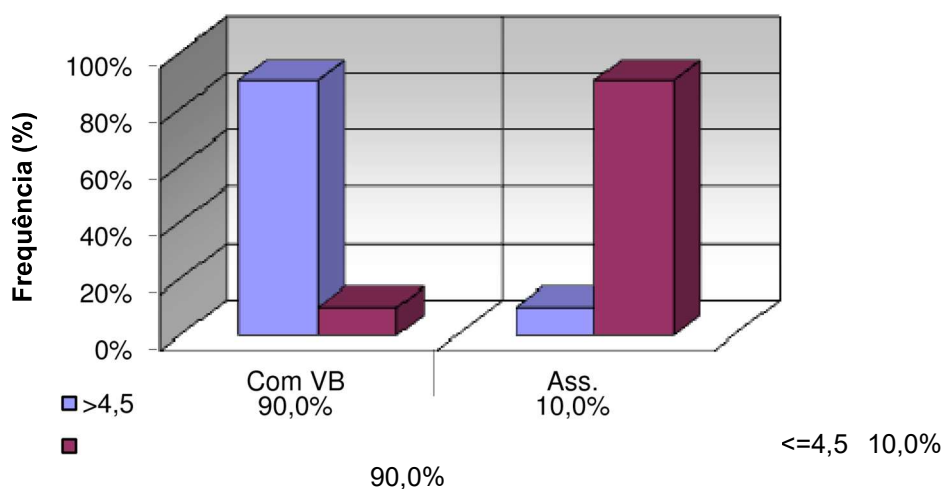


FIGURA 11- Distribuição dos valores de pH do fluido vaginal de mulheres com e sem VB

5.1.2 Presença de “clue cells”

A presença de “clue cells” (células epiteliais escamosas, cariopícnóticas com citoplasma recoberto por diminutos cocobacilos (CATLIN, 1992) no fluido vaginal, visualizadas em esfregaços corados pelo Gram e no exame a fresco, foi observada em 26 das 30 pacientes com vaginose bacteriana (86,7%), sendo

$p=10^{-8}$, e não foi observada em nenhuma das 40 participantes assintomáticas (sem VB).

No presente trabalho, considerando pacientes portadoras de VB e que tiveram cultura sugestiva de *G. vaginalis* (17/30), foi verificada a presença dessas células indicadoras em 14/17 (82,3%), constatando-se uma forte correlação entre presença de “clue cells” e *G. vaginalis*. Um fator importante na virulência dessa bactéria pode ser a sua forte capacidade de aderência a células epiteliais (BOUSTOULLER *et al.*, 1987; SCOTT *et al.*, 1987). Esta hipótese, avaliada à luz dos resultados obtidos neste trabalho em relação às participantes sem VB, é pertinente, uma vez que em nenhuma em nenhuma destas últimas o fenômeno foi observado.

A presença de “clue-cells” e a ausência de lactobacilos são parâmetros sugestivos de vaginose bacteriana, quer estejam associados ou não.

5.1.3 Prova do KOH

Nas pacientes com VB, o teste do cheiro (*whiff test*), foi positivo em 25/30 casos (83,4%) e, nas sem VB, foi negativo em todas as participantes, sendo este achado significativo, com valor de $p=10^{-8}$ (Anexo 4.4).

Um conceito amplamente divulgado é que a vaginose é uma condição bastante comum, que causa um corrimento vaginal com típico odor de peixe (HAY, 1998). Sendo assim, seria de se esperar que todas as pacientes apresentassem essas características clínicas ao exame; porém, cinco (16,6%) pacientes com diagnóstico clínico para VB foram negativas para este teste. Segundo Blackwell *et al.* (1983), parece que o componente anaeróbico, pode ser o responsável pela positividade do teste das aminas, teste este que depende do volume da secreção vaginal e da concentração das aminas nesta secreção (O.DOWD, 1996). Assim, estes resultados falso-negativos observados poderiam ser explicados pela presença de um corrimento profuso, com baixa concentração de aminas, ou vice-versa.

5.1.4 Presença de leucócitos

No fluido vaginal das 30 pacientes com VB, de acordo com o exame a fresco, 12 pacientes (40%) apresentaram contagem de raros leucócitos, uma paciente (3,4%) apresentou número moderado, três pacientes (10%) apresentaram numerosos leucócitos; em sete pacientes (23,3%) não foi observada a presença de leucócitos, e dos espécimes de sete pacientes (23,3%) não foi realizado o exame a fresco. Em relação à coloração de Gram, 16 pacientes com VB (53,4%) apresentaram raros leucócitos, duas (6,6%) apresentaram números moderados e duas (6,6%) apresentaram numerosos leucócitos. Em 10 pacientes (33,4%) não foi observada a presença de leucócitos.

Nas 40 participantes assintomáticas, o exame a fresco mostrou raros leucócitos em 12 (30%), números moderados em três (7,5%) e numerosos leucócitos em três (7,5%). Em 11 participantes (27,5%) não foi observada a presença de leucócitos e, de outras 11 (27,5%), o exame a fresco não foi realizado. Neste mesmo grupo, os esfregaços corados pelo Gram mostraram a presença de raros leucócitos nos espécimes de 24 participantes (60%), números moderados em cinco (12,5%), numerosos leucócitos em três (7,5%), e não evidenciaram sua presença em 12 delas (30%).

Segundo Sobel (2000), numerosos estudos têm mostrado uma associação de VB com endocervicite mucopurulenta. Destaca o autor que mais de 50% das mulheres atendidas em clínicas de DST são diagnosticadas com endocervicite mucopurulenta, que coexiste com VB. Geisler *et al.*, (2004) analisaram as relações das contagens de leucócitos vaginais com infecções vaginais e cervicais diagnosticadas com VB em uma clínica de (DST) e verificaram que as contagens elevadas de leucócitos vaginais foram associadas com sinais objetivos de VB. No presente estudo, os dados percentuais não indicaram diferenças importantes com relação à presença de leucócitos em qualquer um dos quatro grupos de valores considerados (ausência, raros, moderados e abundantes). Os dados se encontram nas figuras 12 e 13.

O termo “vaginose bacteriana” ao invés de “vaginite inespecífica” foi proposto pelo sueco Westrom em 1984, considerando que as bactérias

supostamente envolvidas nesta síndrome já estavam, na época, definidas e porque, usualmente, nenhuma reação inflamatória é detectada neste quadro (CUNHA, 1996). No nosso estudo, a presença de leucócitos na bacterioscopia foi verificada, em esfregaços vaginais das mulheres com e sem VB. Apesar de as diferenças das porcentagens nos dois grupos não ter sido significativa, seus valores são bastante elevados, considerando o conceito original de que esta síndrome infecciosa não é acompanhada por uma inflamação local importante. Junior e Cavalcante (2004) também detectaram leucocitose em uma porcentagem significativa de esfregaços de pacientes com VB corados pelo método de Gram.

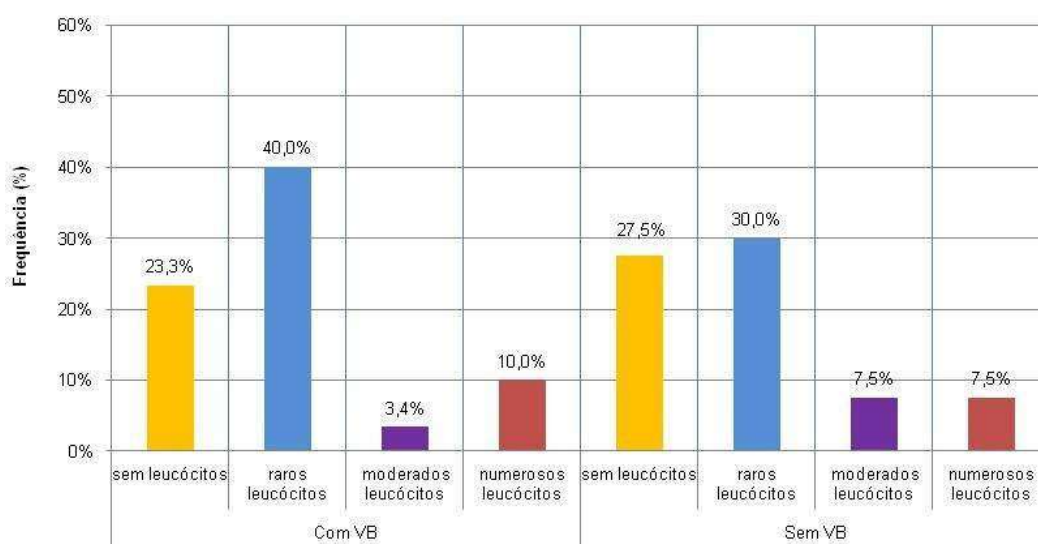


FIGURA 12- Perfil clínico das pacientes em relação à presença de leucócitos no exame à fresco.

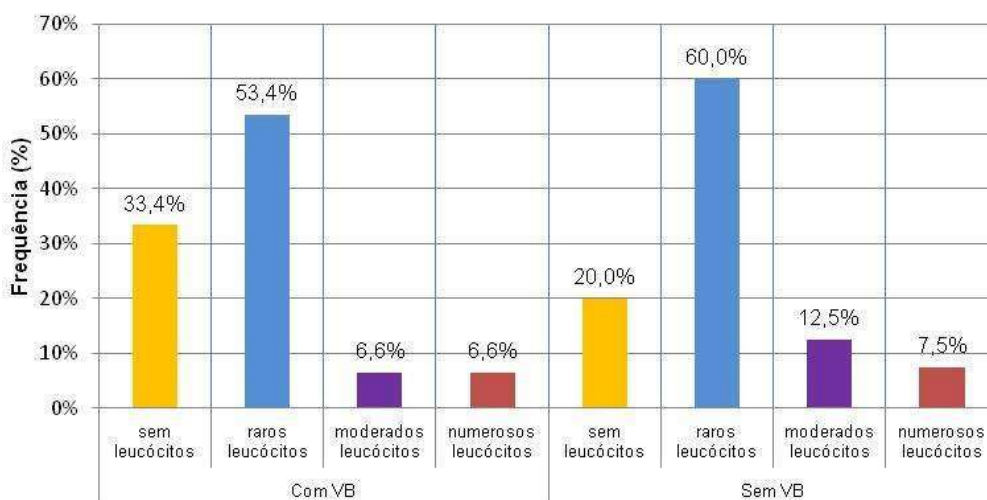


FIGURA 13- Perfil clínico das pacientes em relação à presença de leucócitos na coloração de Gram.

5.2 Fatores analisados relativos às pacientes

5.2.1 Idade

Em relação à idade, os resultados mostraram que, entre as mulheres com diagnóstico para VB, a maioria se enquadrava nas faixas de 39-45 anos, com 36,7% (Figura 14). Nai *et al.* (2007) pesquisando *G. vaginalis* em pacientes histerectomizadas, encontrou maior incidência deste microrganismo na faixa etária entre 41 e 50 anos. Oliveira *et al.* (2007) verificaram que das 156 mulheres pesquisadas, a maior prevalência estava associada à *G. vaginalis* (48,15%), na faixa etária de 21 a 30 anos. Leite *et al.*, (2010) também verificou que quase metade das pacientes com VB tinha de 25 a 34 anos (49,5%), seguida daquelas com 35 anos ou mais (35,7%).

Como mencionado, uma das causas mais comuns de infecção vaginal, em mulheres em idade fértil, é a VB (TANAKA *et al.*, 2007), que resulta de mudanças na microbiota vaginal normal, causando um aumento dos organismos anaeróbios e uma diminuição dos *Lactobacillus spp.*, sendo muito comum nas mulheres em idade reprodutiva (DEMBA *et al.*, 2005). Em resumo, maior prevalência de agentes microbianos na faixa etária de 21 a 40 anos pode refletir

o fato de que estes microorganismos utilizam como substrato o glicogênio, cujo acúmulo celular poder estar relacionado à estimulação hormonal (RIBEIRO *et al.*, 2007).

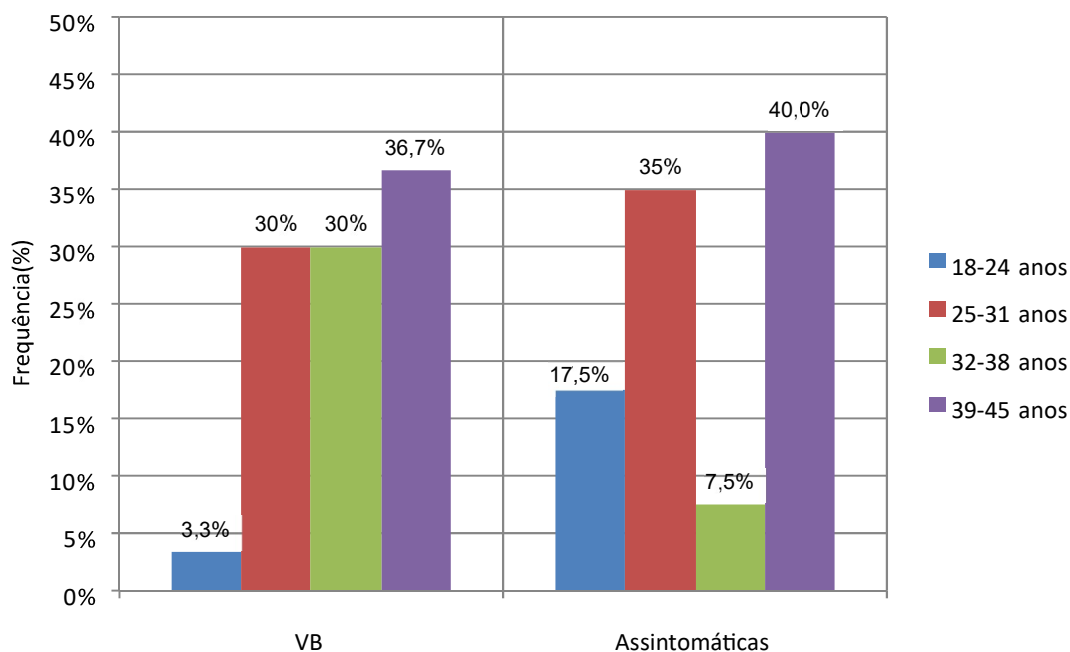


FIGURA 14- Relação da faixa etária com o quadro clínico da paciente

5.2.2 Etnia

Quanto às relações do processo em estudo com a etnia, observou-se maior frequência de VB entre as mulheres negras, representando 40%, valor este significativo, com $p=0,0343$ (Figura 15).

Estes dados corroboram dados da literatura, que mostra maior prevalência de casos entre mulheres negras, sugerindo um fator de risco para VB (TANAKA *et al.*, 2007 e PAUL *et al.*, 2008).

Em um trabalho recente de Bodnar *et al.* (2009) relacionando presença de VB e vitamina B, os autores perceberam que mulheres com baixas concentrações de vitamina D no sangue têm mais chances de terem VB, devido ao aumento exagerado de bactérias. A vitamina D é produzida pelo organismo com a exposição ao sol, e pode ser encontrada na gema de ovo, fígado, alguns

peixes e alimentos enriquecidos. Neste trabalho com 469 gestantes, os pesquisadores notaram que aquelas que tinham deficiência de vitamina D eram mais propensas a desenvolverem VB e as mulheres negras, que absorvem menos luz do sol, seriam mais propensas à infecção.

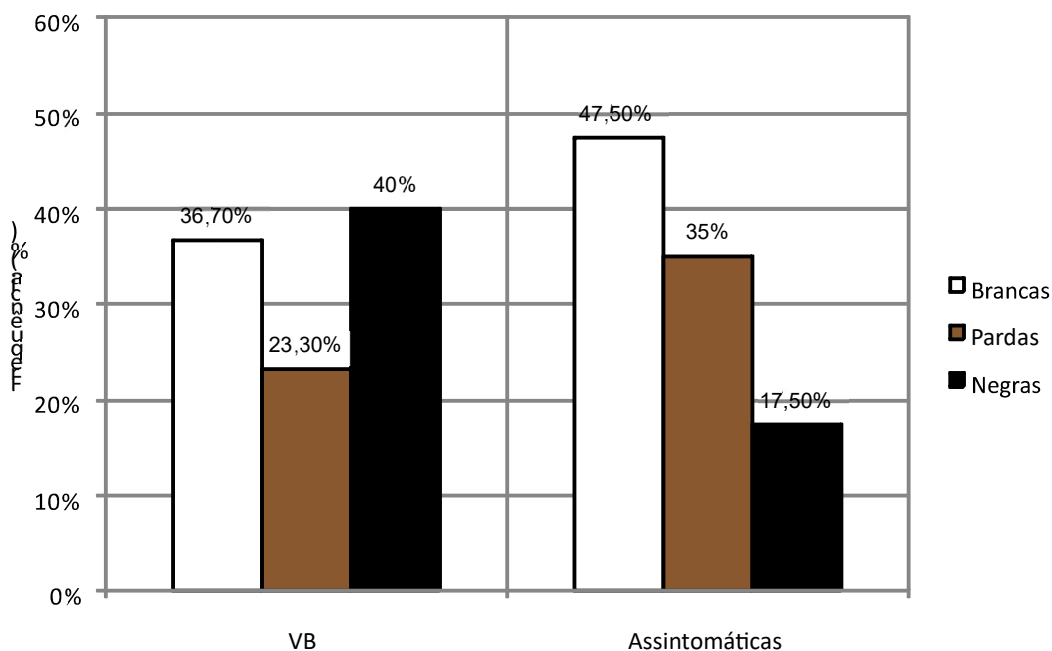


FIGURA 15- Relação da raça com o quadro clínico da paciente

5.2.3 Uso de duchas

Em relação ao uso de ducha vaginal, observou-se que 32,8% (23/70) das pacientes avaliadas fazem uso desta prática, sendo que, destas, 11/30 eram portadoras de VB (36,7%) e 10/40 (25%) consideradas sadias ($p=0,2142$) e ainda, duas pacientes eram portadoras de candidíase.

O uso indiscriminado e frequente de duchas vaginais higiênicas poderia levar à perda do equilíbrio entre os vários microrganismos residentes na cavidade vaginal, proporcionando o aparecimento e manutenção de vaginites (NESS *et al.*, 2003). É interessante notar que, embora a prática de duchas vaginais seja frequentemente associada à VB (SCHWEBKE & DESMOND, 2004), neste trabalho não foi constatado qualquer efeito significativo na microbiota vaginal em

decorrência desta prática. Talvez as diferenças estejam muito mais relacionadas ao perfil das pacientes analisadas nos estudos e ao número de coitos semanais que propriamente ao fato de se usar ou não a ducha higiênica. Há muita controvérsia quanto à relação desta prática com VB, pois nenhum dado permitiu demonstrar sua relação direta com o quadro clínico. É possível que o uso das duchas vaginais não represente maiores riscos para a mulher, como muitos autores querem fazer crer, merecendo o tema maior aprofundamento (GIRALDO *et al.*, 2005; AMARAL, 2007).

5.2.4 Outras variáveis analisadas

Com relação ao estado civil, observou-se uma proporção de casos para VB em 50% entre as mulheres casadas, 23,4% entre as solteiras, 20% entre as que viviam maritalmente, e 6,6% entre as divorciadas. Um fator referido como associado ao aumento do risco de aquisição de VB é o fato de a mulher ser solteira, possivelmente devido a uma maior possibilidade de troca de parceiros. Não há, neste trabalho, diferença estatística e, portanto, associação entre estado civil e presença de VB, daquela de mulheres sem VB, visto que, entre as participantes sadias, vale ressaltar que, grande parte (67,5%) também eram mulheres casadas (Tabela 1). Leite *et al.*, (2010) analisando o perfil clínico e microbiológico de mulheres com e sem VB, também encontrou uma frequência de VB de 58,1% entre as mulheres casadas. Vale ainda, ressaltar que neste trabalho, das 70 pacientes avaliadas, independente do estado clínico, 42/70 (60%) declararam serem casadas e apenas 15/70 (21,5%), solteiras. Portanto, não há um grupo de comparação que permita fazer uma avaliação se essa frequência é diferente daquela de mulheres sem VB.

TABELA 1. Relação do estado civil com o quadro clínico da paciente

<u>Est.Civil/Quadro clínico</u>	<u>Com VB (30)</u>	<u>Sem VB (40)</u>	<u>Valor de p</u>
Casada	15/30 (50%)	27/40 (67,5%)	0,1089
Solteira	7/30 (23,4)%	8/40 (20%)	0,48
Amasiada	6/30 (20%)	4/40 (10%)	0,2005
Separada	2/30 (6,6%)	0,0%	ND
Viúva	0,0%	1/40 (2,5%)	ND

Com relação à atividade profissional exercida, segundo a classificação do IBGE, das 70 pacientes estudadas, 34 mulheres foram enquadradas nos grupos de trabalhadores dos serviços, vendedores e prestadores de serviços do comércio, 23 mulheres se ocupavam das tarefas do lar, cinco eram profissionais das ciências e das artes, três eram estudantes, uma trabalhadora de serviço administrativo e quatro não informaram a ocupação.

Chama a atenção o fato de que 23 mulheres se auto-identificaram como sendo do lar (32,8%), quantidade esta significativa. Tais dados podem sugerir que prevalece a baixa escolaridade entre essas mulheres, e o desemprego ou emprego ocasional (diaristas, empregadas domésticas), sem vínculos trabalhistas, apontando prováveis dificuldades socioeconômicas vivenciadas por este grupo.

Em relação à análise das características da atividade sexual, encontrou-se, no grupo-controle, início mais tardio de atividade sexual (a partir dos 19 anos), enquanto que a média de idade para início de atividade sexual entre as mulheres portadoras de VB foi de 17,7 anos. É de se supor que o início precoce da atividade sexual predisponha a um maior risco de infecções genitais e DST, em especial pela maior chance de exposição e devido aos níveis hormonais altos, que estariam relacionados à etiopatogenia da doença. É provável que a maior frequência de VB nessa faixa etária se deva à coexistência de fatores de risco, como o início precoce da atividade sexual, uso de dispositivo intra-uterino (DIU)

e de anticoncepcional oral, bem como maior número de parceiros sexuais (BELDA, 1999).

Em relação ao número de parceiros sexuais, 86,7% das mulheres com VB informaram ter parceiros estáveis e 13,4% relataram ter tido dois ou mais parceiros sexuais nos últimos 90 dias.

Com relação à preferência sexual, das 70 pacientes avaliadas, apenas uma relatou ser homossexual, sendo esta portadora de VB, e nenhuma mulher referiu ser bissexual. Saliente-se que a investigação da preferência sexual dos pacientes durante a consulta médica, frequentemente, causa constrangimento, dificultando, assim, a obtenção de informações fidedignas.

O número de relações sexuais por semana foi avaliado da seguinte forma: <1 vez/semana (esporadicamente), 1X, 2X, 3X e >3 vezes/semana. Para a população de mulheres portadoras de VB, 8/30 (26,7%) informaram ter relação sexual mais de 3x/semana, enquanto a minoria (2/30) relatou ter relações sexuais esporadicamente (Tabela 2).

TABELA 2. Comparação do número de relações sexuais com o quadro clínico da paciente.

Idade/Quadro clínico	Com VB (30)	Sem VB (40)	Valor de p
Esporadicamente	2/30 (6,7%)	3/40 (7,5%)	0,6359
1 vezes/semana	6/30 (20%)	9/40 (22,5%)	0,5199
2 vezes/semana	5/30 (16,6%)	10/40 (25%)	0,2949
3vezes/semana	7/30 (23,3%)	8/40 (20%)	0,48
> 3vezes/semana	8/30 (26,7%)	6/40 (15%)	0,1823
Não relataram	2/30 (6,7%)	4/40 (10%)	0,483

Múltiplos parceiros, práticas de sexo oral e anal, frequência de relações igual ou superior a três intercursos sexuais por semana e a utilização de duchas foram fatores também associados aos distúrbios na microbiota vaginal de mulheres americanas (SCHWEBKE *et al.*, 2004). No presente estudo, a alta frequência de coito vaginal (três ou mais vezes por semana) esteve associada

aos distúrbios da microbiota vaginal, mas não o uso de duchas higiênicas. Acredita-se que o intercuro sexual, por expor as mulheres aos microtraumas, às soluções de continuidade e às escoriações vulvares, pode constituir fator importante para a manutenção do desequilíbrio entre os diversos microrganismos do sítio. Saliente-se, ainda, que a deposição de sêmen alcalino no epitélio vaginal e a introdução de substâncias e bactérias durante o ato sexual favoreceriam as alterações da microbiota vaginal (JEREMIAS *et al.*, 1998).

Quanto ao vestuário, foram analisados, uso frequente de roupa íntima e uso de calças ou saias. Foi verificado que, das 70 pacientes avaliadas, 34 (48,5%) utilizam roupa íntima de algodão e 36 (51,4%) de material sintético. Entre as pacientes sem VB, 25/40 (62,5%) utilizam mais frequentemente roupa íntima de algodão, enquanto 15/40 (37,5%) têm preferência por roupa íntima de material sintético. Para as pacientes portadoras de VB, 21/30 (70%) utilizavam roupa íntima de material sintético e 9/30 (30%) mulheres preferiam roupa íntima de algodão, sendo a diferença estatisticamente significativa, com $p=0,014$. O uso de roupas íntimas justas e/ou sintéticas, determinando pouca aeração nos órgãos genitais e aumentando a umidade, pode também predispor à VB; assim, neste trabalho, este fator poderia ser considerado determinante.

Em relação ao uso de calças/saias, das 70 pacientes avaliadas, 10/70 (14,2%) pacientes preferiam saias e 60/70 (85,7%) usavam mais frequentemente calças. Para as pacientes portadoras de VB, 27/30 (90%) utilizavam calças e 3/30 (10%) mulheres preferiam saias. Entre as pacientes sem VB, 33/40 (82,5%) preferiam calças, enquanto 7/40 (17,5%) pacientes utilizavam mais frequentemente saias (Tabela 3). Neste estudo, não foi verificada associação entre o uso de calças/ saias e a ocorrência de VB.

TABELA 3. Comparação do tipo de vestuário com o quadro clínico da paciente

Vestuário/Quadro clínico	VB (30)	Assintomáticas (40)
Calças	27/30 (90%)	33/40 (82,5%)
Saias	3/30 (10%)	7/40 (17,5%)
Roupa íntima algodão	9/30 (30%)	25/40 (62,5%)

Roupa íntima sintética	21/30 (70%)	15/40 (37,5%)
------------------------	-------------	---------------

Quanto ao método contraceptivo adotado, grande parte das mulheres 35,7% (25/70) mencionou o uso de anticoncepcionais orais (pílula), independentemente do quadro clínico. A literatura disponível é controversa quanto à associação do uso de anticoncepcionais orais com a ocorrência de infecções vaginais. De acordo com alguns trabalhos, há uma diminuição do risco para aquisição dessas infecções (SMART *et al.*, 2004 e RIGGS *et al.*, 2007), enquanto outros autores demonstram o contrário (BAETEN *et al.*, 2001 e TANAKA *et al.*, 2007).

Em um grande estudo com 890 mulheres com VB e 890 do grupo controle, Smart *et al.*, (2004) acharam como fatores associados o fumo, a não utilização do preservativo e o uso de contraceptivos orais.

Para as pacientes com quadro clínico de VB, o segundo método mais frequentemente associado foi a Laqueadura Tubária Bilateral (LTB) com (8/30) 26,7% (Tabela 4). A esterilização cirúrgica, realizada por muitas mulheres, principalmente as mais pobres, é, em geral, apresentada como única alternativa de método “contraceptivo”. Porém, LTB não é sinônimo de método contraceptivo, mas é apresentada como parte do leque de alternativas entre os métodos propriamente contraceptivos, por tratar-se de uma intervenção cirúrgica de caráter “definitivo”, como a vasectomia. Para a grande maioria que relatou não fazer uso de nenhum método contraceptivo, o parceiro havia realizado vasectomia. Neste sentido, podemos afirmar que as pacientes que passam por LTB e usuárias de pílulas, quando não usam preservativos, são vulneráveis à exposição a outras DST e à re-exposição ao HIV.

TABELA 4. Relação do método contraceptivo utilizado com o quadro clínico da paciente

Métodos contraceptivos/Quadro clínico	Com VB (30)	Sem VB (40)	Valor de p
Pílula	10/30 (33,4%)	15/40 (37,5%)	0,4584
Condom	3/30 (10%)	3/40 (7,5%)	0,5169

DIU	4/30 (13,3%)	6/40 (15%)	0,5631
LTB	8/30 (26,7%)	7/40 (17,5%)	0,263
Ausente	5/30 (16,7%)	8/40 (20%)	0,4862
Não informado	0,00%	1/40 (2,5%)	ND

Uma observação que chamou bastante a atenção foi em relação ao baixo uso de preservativos nas relações sexuais. Embora o preservativo usado como método anticoncepcional, sempre durante as relações sexuais, seja considerado a forma adequada de dupla proteção (anticoncepção e infecção), a população do grupo em estudo que usava irregularmente os preservativos era de, apenas, 8,6% (6/70), o que, certamente, induziria a se pensar em uma baixa proteção contra as DST e, conseqüentemente, no aumento da ocorrência de VB, o que não ocorreu. Desta forma, pode-se inferir que, para estas mulheres, o uso do preservativo estaria mais relacionado à contracepção do que à sua proteção, uma vez que estas mantinham relacionamento estável, com parceiro fixo, sem promiscuidade sexual, não sendo o preservativo visto como necessário. Constata-se, assim, que a maioria da população estudada (91,4%), usuária de outros métodos, não estaria se prevenindo contra DSTs.

A VB tem sido associada, frequentemente, a fatores socioculturais, como idade, falta de educação sexual adequada, grau de escolaridade e ocupação, que acabam por se refletir em atitudes associadas a maus hábitos de higiene (como grande número de parceiros), início precoce da vida sexual ativa, principalmente associada à falta de uso de preservativos (BRENNA *et al.*, 2001).

Com relação às queixas clínicas apresentadas pelas pacientes no momento do diagnóstico de VB, foram prevalentes as clássicas de corrimento genital branco ou acinzentado e de odor de peixe do conteúdo vaginal. Estudos recentes mostram que apenas uma minoria das portadoras de VB refere queixas de corrimento (42%) e odor fétido (25%) (KLEBANOFF *et al.*, 2004). O relato de corrimento genital, entre as portadoras ou não de VB, não mostrou diferença significativa em pesquisa anterior (KLEBANOFF *et al.*, 2004). As diferenças nas frequências das queixas referidas no estudo atual e naqueles que o antecederam se devem, provavelmente, ao fato de as pacientes terem sido indagadas quanto

ao sintoma, o que deve ter determinado a frequência aumentada de resposta afirmativa. As queixas de ardor e prurido vaginais referidas pelas mulheres foram consideradas inesperadas, em virtude de estes sintomas, em geral, não estarem presentes na VB, sendo frequentes nos casos de candidíase, a qual não pode ser identificada nos esfregaços vaginais destas pacientes, realizados naquele momento. Já foi observada alta incidência de queixas vaginais como prurido, queimação, corrimento, odor e vermelhidão, que não puderam ser associadas com a presença de nenhum organismo específico (SCHWIERTZ *et al.*, 2006). Também não foi possível relacionar as queixas de dispareunia, tanto a superficial como a profunda, com o quadro de VB.

5.3 Microbiota do ecossistema vaginal

Para o transporte do material coletado, procurou-se garantir as melhores condições, tendo-se utilizado a solução de Ringer-Pras (SUMMANEN, 1993) e o meio TGM (meio de transporte para *Gardnerella* Modificado, FRANCISCO, 1990). A solução de Ringer pré-reduzida foi utilizada para possibilitar a recuperação de anaeróbios, além de favorecer a viabilidade de *G.vaginalis*. Quanto ao meio de transporte para *Gardnerella*, modificado em 1990, o acréscimo de 10% de glicerina funciona como fator de proteção para a bactéria. No trabalho de Francisco (1990), mesmo após 14 horas à temperatura ambiente, a recuperação de *G. vaginalis* foi muito satisfatória.

A microbiota isolada e presuntivamente identificada dos espécimes das 70 pacientes avaliadas apresentou dominância de microrganismos anaeróbios facultativos e alguns anaeróbios obrigatórios. Após o primo isolamento, as amostras sugestivas de *Lactobacillus* spp. e de *G. vaginalis*, foram identificadas por metodologia já padronizada e as demais amostras foram identificadas presuntivamente por metodologia convencional.

A tabela 5 mostra a comparação da quantidade média dos microrganismos isolados (Log/UFC/ml) com relação ao quadro clínico das pacientes (com e sem VB).

O grupo dos bastonetes Gram positivos, catalase positiva, sugerindo bactérias do gênero *Corynebacterium* spp. foi observado em 9 das 40 pacientes sem VB (22,5%) e em cinco das 30 com VB (16,6%). Mesmo não havendo diferença marcante nas contagens populacionais, a frequência, mostrou diferença significativa ($p=0,04$).

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, foram identificadas presuntivamente pela coloração de Gram, catalase e coagulase. Espécies sugestivas de *Staphylococcus* spp. foram observadas em 25 das 70 (35,7%) pacientes avaliadas, sendo 13/30 com VB (43,4%) e 13/40 sem VB (32,5%).

Quanto ao gênero *Streptococcus*, identificado presuntivamente pelos testes de Gram e catalase, foi verificada sua presença em 5/40 das pacientes sem VB (12,5%) e em 7/30 das pacientes com VB (23,4%).

TABELA 5. Frequência (%) e níveis populacionais de componentes microbianos (Log UFC/mL \pm SD) no fluido vaginal de 70 pacientes com e sem VB.

Microrganismos	Com VB (n=30)	Sem VB (n=40)	Valor de p*
<i>G.vaginalis</i>	56,7 7,9 \pm 1,38	17,6 8,04 \pm 1,25	0,0007 ^a 0,8344 ^b
<i>Staphylococcus</i> spp.	43,4 6,73 \pm 0,84	32,5 6,3 \pm 1,34	0,1839 ^a 0,3771 ^b
<i>Streptococcus</i> spp.	23,4 7,05 \pm 1,18	12,5 6,49 \pm 1,07	0,1918 ^a 0,4904 ^b
<i>Candida</i> spp.	46,7 6,53 \pm 1,34	60 6,52 \pm 1,35	0,1933 ^a 0,9908 ^b
<i>Corynebacterium</i> spp.	16,6 6,54 \pm 0,69	22,5 8,08 \pm 0,94	0,3849 ^a 0,0460 ^b
Anaeróbios obrigatórios	10 5,57 \pm 0,38	5 5,64 \pm 0,035	0,3640 ^a 0,3333 ^c
<i>Lactobacillus</i> spp.	76,7 5,76 \pm 1,21	97,5 6,92 \pm 1,42	0,0092 ^a 0,6438 ^b

a) Teste Exato de Fisher, b) Teste t de student e c) Mann-Whitney

A identificação presuntiva sugeriu a presença de anaeróbios obrigatórios em cinco isolamentos, sugerindo tratar-se de duas amostras do grupo *Bacteroides fragilis* e uma de *Mobiluncus* spp. recuperados de com VB (10%), além de *Bifidobacterium* spp. e uma amostra de *B. fragilis* recuperados de pacientes sem VB (5%). Foi isolado um microrganismo produtor de pigmento negro, sugestivo de *Prevotella* spp. ou *Porphromonas* spp. de uma paciente com candidíase; porém, este grupo de estudo foi retirado da análise, como já mencionado.

Apesar de o microrganismo sugestivo *B. fragilis* ter sido recuperado de apenas três pacientes, deve-se ressaltar que foi utilizado o meio seletivo para bactérias desse grupo (BBE). Apesar de a presença desses anaeróbios nos espécimes de pacientes com VB ter sido relatada por vários autores, Josey & Schwebke (2008) comentam que a causa de VB permanecesse controversa, havendo duas hipóteses principais: na primeira, *G. vaginalis* seria o agente etiológico específico; na outra, a hipótese polimicrobiana, *G. vaginalis* atuaria em conjunto com outros microrganismos, principalmente anaeróbios, para produzir a doença. Estes autores sugerem que o processo teria um agente específico, com ativação anaeróbica secundária, resultando em produção de amina.

Segundo Pybus *et al.*, (1998) estudos mostraram uma relação simbiótica entre *P. bivia* e *G.vaginalis*, na qual este anaeróbio Gram negativo parece influenciar positivamente o crescimento de *G. vaginalis*, e de *Prevotella* spp., constatando-se que as condições que promovem o crescimento de *P. bivia* poderiam resultar em aumento do pH vaginal. Shah *et al.*, (1990) e Hill *et al.* (1993), relataram que espécies de *Bacteroides* e de *Prevotella* são mais frequentemente, mas não exclusivamente, envolvidas em infecções pélvicas femininas, como em infecções pós-cirúrgicas, pós-parto e doença inflamatória pélvica. De acordo com Krohn *et al.* (1991), esses microrganismos estão associados com eventos adversos na gravidez. Em outro estudo de Krohn *et al.* (1995), mulheres entre 23^o e 26^o semanas de gravidez com cultura positiva para espécies de *Bacteroides* e *G. vaginalis* apresentaram um aumento de infecções intra-amnióticas. O estudo mostrou, também, que, na VB, espécies de

Bacteroides estavam presentes em casos de parto prematuro e em crianças com baixo peso no nascimento. Com relação às espécies de *Fusobacterium*, as mais frequentemente isoladas do trato genital são *F. naviforme* e *F. gonidiaformans*, esta última associada à VB (HILL, 1993 e 1998). Contudo, *F. gonidiaformans*, que está raramente associado com parto prematuro, isolado do fluido vaginal, não invade células epiteliais ou endoteliais e não adere às células endoteliais (HAN, *et al.*, 2004).

Para Schwebke (2009), dados na literatura reforçam que a VB está associada a uma comunidade que forma um biofilme, composto de *G. vaginalis* e uma menor quantidade de anaeróbios, tal como o gênero *Atopobium*. Em recente estudo, Swidsinski *et al.*, (2005) examinando biópsias vaginais de mulheres com e sem VB, demonstrou, por hibridização sob fluorescência *in situ*, aderência com formação de um biofilme, no qual predominava *G. vaginalis* em pacientes com VB, além disso, a proporção de todos os outros grupos bacterianos detectados no biofilme, incluindo o *Atopobium*, foi significativamente mais baixa.

Como a participação dessas bactérias em infecções mistas é cada vez mais enfatizada e seu potencial agressor irrefutável (BROOK, 2002 a,b; SANTOS *et al.*, 2003), mesmo a casuística não sendo numerosa, no presente trabalho, o seu isolamento reforça a relevância clínica destes anaeróbios obrigatórios.

Ainda, em um relevante trabalho recente, Srinivasan *et al.* (2010) analisaram a microbiota de mulheres com e sem vaginose bacteriana diariamente, por um período de até 4 semanas, utilizando técnicas de biologia molecular (qPCR), avaliando-se o perfil para a presença de 11 agentes bacterianos conhecidos. Foi constatado que a microbiota vaginal humana é altamente dinâmica durante o ciclo tanto em mulheres saudáveis quanto com VB. *Lactobacillus* spp. ocorre predominantemente em mulheres saudáveis, sendo que os níveis populacionais e o perfil de espécies podem mudar drasticamente dentro de um mês. Ainda, um aumento considerável de *G. vaginalis* e *L. iners* pode ser evidenciado durante o ciclo, principalmente no período menstrual (81% dos ciclos menstruais monitorados), acompanhado de um decréscimo de espécies do gênero *Lactobacillus*, principalmente, *L. jensenii* e *L. crispatus*.

Ainda, segundo Srinivasan *et al.*, (2010), para mulheres com VB, existem inúmeros microrganismos fastidiosos, que não podem ser isolados facilmente pelos métodos de cultivo convencionais. Os autores acreditam que as concentrações, bem como os tipos de microrganismos presentes na microbiota vaginal, podem passar por “flutuações” consideráveis rapidamente. Este estudo reforça, ainda, o papel de *G.vaginalis* como um microrganismo chave no desenvolvimento da VB, visto que em mulheres saudáveis, os níveis populacionais foram um pouco menores que em mulheres com VB.

Neste trabalho, vale ressaltar que as pacientes que apresentavam anaeróbios em sua microbiota apresentavam, concomitantemente, microrganismos sugestivos de *G. vaginalis* e que microrganismos anaeróbios, embora sejam de difícil cultivo, podem ter um papel importante no desenvolvimento da infecção.

Para o grupo das leveduras, o gênero *Candida* spp. foi isolado de 38/70 pacientes (54,2%), sendo 14/30 (46,7%) com VB e 24/40 (60%) sem VB. Giraldo *et al.*, (2000) identificaram espécies de *Candida* por cultura e PCR em mulheres assintomáticas, nas taxas de 14,7% e 30%, respectivamente.

5.3.1 Isolamento e Identificação de *G.vaginalis*

Neste trabalho, o meio seletivo para isolamento de *G. vaginalis*, agar vaginalis (GREENWOOD *et al.*, 1977), modificado por Francisco (1990) pela adição dos antibióticos gentamicina, ácido nalidíxico e anfotericina B, mostrou-se altamente seletivo e diferencial, permitindo ótima visualização da β -hemólise difusa, parâmetro importante para identificação (Figura 16). As colônias com características de *G. vaginalis* foram visualizadas a partir de 24 horas, mas apresentaram, frequentemente, um melhor crescimento com 48 horas de incubação, em anaerobiose. A presença de β -hemólise foi visualizada em 100% das amostras isoladas. Na identificação presuntiva de *G. vaginalis*, as provas de catalase e oxidase foram sempre negativas para todas as amostras, concordando com dados da literatura (FRANCISCO, 1990).



FIGURA 16. Colônias sugestivas de *G. vaginalis* com β hemólise difusa, no meio Agar vaginalis, provenientes de paciente sintomática para VB.

Greenwood *et al.* (1977) sugeriram que a habilidade de *G.vaginalis* em produzir β -hemólise difusa em Agar sangue humano, mas não em Agar sangue de carneiro ou de cavalo, pode ser usada para sua identificação presuntiva. Após isolamento, este meio vem sendo utilizado sem os antibióticos, para manutenção das amostras de *G.vaginalis*.

Das 70 coletas realizadas, foram recuperadas amostras compatíveis com *G.vaginalis*, sendo 17/30 (56,7%) de pacientes sintomáticas e 7/40 (17,6%) de pacientes assintomáticas para VB, com o valor de $p=0,0007$ (Tabela 5). Pode-se destacar a diferença significativa em relação à recuperação de *G. vaginalis* (considerando o diagnóstico presuntivo), ficando evidente, pelos dados da tabela 5, a relação deste microrganismo com o quadro clínico em estudo.

A presença concomitante de *G. vaginalis* e *Candida* spp. foi verificada em 7/30 (23,4%) das pacientes sintomáticas e em 3/40 (7,5%) das pacientes assintomáticas, sendo este valor estatisticamente relevante com $p=0,0063$. Bastos *et al.* (2003) também encontraram associação de *G. vaginalis* e *Candida* spp. Cavalcante *et al.* em 2005, verificaram, em uma porcentagem significativa das pacientes com corrimento, uma associação de leveduras com outros agentes, destacando a presença de *Candida* spp. concomitante à de

Trichomonas vaginalis e/ou à presença de *clue cells* (células indicadoras de *Gardnerella vaginalis*). Segundo Giraldo *et al.* (2007), a associação com outros patógenos não pode ser esquecida. Também consideram que, frequentemente, além de *G. vaginalis*, outros agentes (*Candida* spp., *T. vaginalis*) causadores de processos inflamatórios podem estar associados aos quadros de vaginose bacteriana.

As amostras se encontram congeladas em freezer -86°C e tiveram sua identificação confirmada pelos seguintes testes: hidrólise do amido e do hipurato, testes enzimáticos de α e β glicosidase e teste da frutose-6-fosfato fosfoacetolase (F6PPK).

5.3.2 Identificação de microrganismos do gênero *Candida*

A identificação presuntiva das espécies de *Candida* foi realizada no meio CHROMágar®, conforme ilustrado na Figura 17: *C. albicans* (esverdeada), *C. krusei* (rósea), *C. tropicalis* (azul-acinzentada) e *C. glabrata* (lilás). As colônias das demais espécies se apresentam neste meio com coloração róseo-esbranquiçada. Após 48 horas de incubação a 30-37°C, a observação da cor das colônias permitiu a identificação presuntiva das espécies, como descrito na Tabela 6. A confirmação desta identificação foi feita utilizando PCR- fingerprint (anexo 7).

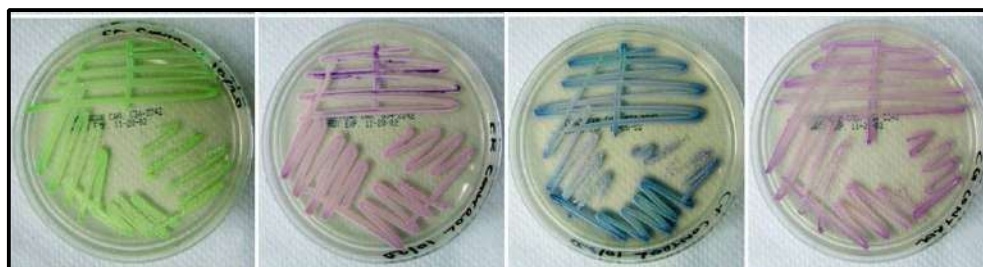


FIGURA 17. Identificação presuntiva, em CHROMágar® *Candida*, de leveduras isoladas de espécimes de pacientes com e sem VB.

Foi observada associação de VB com espécies de *Candida* spp. em 14/30 (46,7%) dos casos. A espécie *C. albicans* foi a mais frequentemente isolada (11/14), correspondendo a 78,5% daquelas isoladas de pacientes com VB, seguida de *C. glabrata* (2/14), ou 14,3%, e *C. guilliermondii* (1/14), ou 7,14%.

O gênero *Candida* também foi encontrado em 24 das 40 participantes sem sintomas (60%), sendo, também, *C. albicans* o microrganismo mais isolado (15/24), ou 62,5%, seguido de *C. glabrata* (7/24), ou 29,2%, *C. guilliermondii* (1/24), ou 4,2%, e *C. novyensis* (1/24), correspondendo a 4,2% (Tabela 6).

Espécies do gênero *Candida* estão usualmente presentes na secreção vaginal em algumas condições adversas, como a diminuição dos lactobacilos e alteração do pH vaginal, podendo se proliferar e provocar uma vulvovaginite (TANAKA *et al.*, 2007). Esta proliferação está mais relacionada à invasão de microrganismos provenientes do meio externo por hábitos higiênicos inadequados do que propriamente a alterações do pH vaginal (NAI *et al.*, 2007).

Alguns estudos também indicam que, 20% a 25% das mulheres saudáveis e completamente assintomáticas apresentam culturas vaginais positivas para *C. albicans* (SOBEL, 1993) e *Gardnerella vaginalis* em sua mucosa genital, sem qualquer sintoma (EDAGN *et al.*, 2000).

TABELA 6. Frequência (%) e níveis populacionais de *Candida* spp. (Log UFC/mL \pm SD) no fluido vaginal de 70 pacientes com e sem VB.

Microrganismos	Com VB (n=14/30)	Sem VB (n=24/40)	Valor de p*
<i>Candida</i> (total)	46,7 6,53 \pm 1,34	60 6,52 \pm 1,35	0,1933 ^a 0,9908 ^b
<i>C. albicans</i>	78,5 6,39 \pm 1,20	62,5 6,24 \pm 1,05	0,5719 ^a 0,8346
<i>C. glabrata</i>	14,3 6,0 \pm 0,50	29,2 7,2 \pm 0,55	0,2939 ^a 0,8437
<i>C. guilliermondii</i>	7,14 ND	4,2 9,95	0,6770 ^a ND
<i>C. novyensis</i>	0	4,2	ND

ND

ND

ND

^a Teste Exato de Fisher ^b

Teste t de Student

ND = Não detectado

A associação de mais de uma DST à VB ocorreu em 3/30 (10%) dos casos, com presença simultânea de HPV. Segundo Murta *et al.*, (2000), mulheres que possuem *G. vaginalis* na microbiota vaginal, podem apresentar maior predisposição para infecções por HPV, mas, por outro lado, não há dados na literatura indicando que infecções por HPV possam favorecer o crescimento de *G. vaginalis* na microbiota vaginal.

Considerando as 14 pacientes com cultura positiva para *Candida* spp., sete (50%) apresentavam *G. vaginalis* concomitantemente, o mesmo ocorrendo para três das 24 (12,5%) assintomáticas, sendo $p= 0,0016$. Este valor foi significativo, sugerindo ação sinérgica.

Ainda, em uma paciente com candidíase (P18), foi verificada a presença de *Chlamydia* spp., identificada por técnica de PCR em uma pesquisa paralela, também inserida no projeto maior.

Ribeiro *et al.* (2001) demonstraram que 25% de mulheres assintomáticas apresentam cultura vaginal positiva para fungos, sendo *C. albicans* a espécie isolada com maior frequência. Monif, (1978) afirmou que *Candida* spp. está usualmente presente na vagina, ocorrendo, na maioria das portadoras, como saprófita. Variações locais e sistêmicas na suscetibilidade feminina são necessárias para que o fungo possa agir como patógeno oportunista e, então, causar doença inflamatória. Acredita-se que a microbiota residente frustra o crescimento da levedura, por interferir na nutrição e, provavelmente, por produzir fatores inibitórios. Há um equilíbrio entre espécies de *Candida* e fatores de defesa vaginal controlando e limitando o crescimento de fungos (FERRER, 2000).

De acordo com Monif (1978), alguns pesquisadores sugerem que a presença de um grande número de lactobacilos (bacilos de Döderlein) resulta na produção de um meio ácido, que favorece o crescimento de *Candida*. A simples detecção do microrganismo não autoriza o diagnóstico de candidíase. Para que

ocorra infecção e conseqüente sintomatologia, é necessária a presença da levedura em proporções acima de 1.000.000 UFC/mL no fluido vaginal. De outra parte, é necessária, também, a capacidade de aderência da *Candida* spp. às células da mucosa vaginal para a instalação do processo infeccioso e a *C. albicans* é a que possui maior índice de aderência às células epiteliais.

A maioria dos relatos de vaginite por *Candida* contém uma referência à composição da microbiota vaginal associada, definida pela classificação original de Schroder (Grau I, apenas bacilos de Döderlein; Grau II, bacilos de Döderlein mais outros microorganismos; Grau III, outros microorganismos diferentes do bacilo de Döderlein) (ESCHENBACH, 1993).

Os anexos 5 e 6 ilustram o perfil eletroforético das leveduras isoladas e identificadas pela técnica de PCR *fingerprint*. As espécies de *C. guilliermondii* e *C. novogorgensis* não tiveram o padrão revelado e por isso foram sequenciadas.

5.3.3 Identificação das amostras de *Lactobacillus*

O perfil de digestão enzimática dos espaçadores permitiu a identificação, no nível de espécie de 83 amostras, de 12 diferentes espécies de *Lactobacillus*. A figura 18 ilustra produtos amplificados por PCR correspondentes às três regiões intergênicas 16S-23S do genoma de *Lactobacillus*, além de uma amostra, que não pertence ao gênero *Lactobacillus*. Esta amostra não apresentou o perfil de 3 bandas, característico do grupo dos *Lactobacillus*. Para três espécies (P1, P29 e P30), o perfil de restrição gerado não correspondeu a nenhum dos já conhecidos utilizando PCR-ARDRA com 12 enzimas de restrição, necessitando ainda, serem sequenciadas. Assim, foram consideradas, para análise dos dados, as linhagens identificadas, em nível de espécie, pelo PCR-ARDRA neste estudo.

As figuras de A-M, localizadas no anexo 7 mostram o perfil de digestão dos espaçadores das amostras do gênero *Lactobacillus* identificadas no estudo em questão.

PM (pb) 1 2 3 4 5

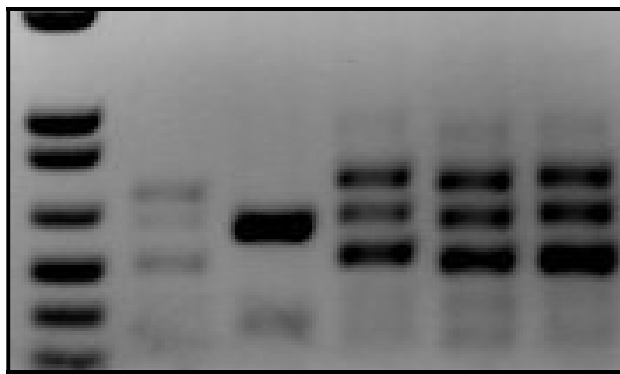


FIGURA 18. Perfil eletroforético dos espaçadores longo, médio e curto amplificados, correspondentes à região intergênica 16S-23-S do rDNA de *Lactobacillus*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). As canaletas 1, 3, 4 e 5 são amostras de *Lactobacillus*, e a canaleta 2 corresponde a uma amostra não pertencente a este gênero.

Considerando-se, primeiramente, o número total de pacientes com e sem VB de cujos espécimes clínicos foram recuperados *Lactobacillus* spp. em relação ao número de pacientes com VB, observa-se que, embora a prevalência destes microrganismos nestas pacientes seja alta (23/30, ou 76,7%), nas participantes sem VB são encontrados em, praticamente, todas elas (39/40, ou 97,5%). Além do crescimento no meio seletivo MRS, foi verificado, na maioria dos casos, crescimento abundante de lactobacilos também nos outros meios utilizados. A identificação presuntiva deste grupo bacteriano foi realizada com base nas características morfotintoriais à coloração de Gram, como bastonetes Gram positivos, e reação de catalase, **ERRATA** com prova negativa, com posterior confirmação pela técnica de biologia molecular PCR-ARDRA.

Na tabela 7 pode ser verificada a frequência e contagem populacional das linhagens de lactobacilos isoladas e identificadas neste estudo. Foram identificadas 12 diferentes espécies, nas quais 8 foram encontradas nas pacientes com VB e 10 naquelas sem VB, sendo que, de algumas pacientes, foi isolada mais de uma espécie do gênero. A Tabela 8 e a Figura 19 reúnem os 86 amostras recuperadas do total de 62 pacientes. Dos espécimes de 8 pacientes, nenhuma espécie de *Lactobacillus* foi isolada neste estudo.

TABELA 7. Frequência (%) e níveis populacionais de *Lactobacillus* spp. (Log UFC/mL \pm SD) no fluido vaginal de 70 pacientes com e sem VB.

Microrganismos	Com VB (n=30)	Sem VB (n=40)	Valor de p*
Lactobacilos totais	(23/30) 76,7 6,76 \pm 1,21	39/40 (97,5) 6,92 \pm 1,42	0,0092 ^a 0,6438 ^b
<i>L.crispatus</i>	23,4 7,37 \pm 0,43	55 6,23 \pm 1,54	0,0072 ^a 0,0989 ^b
<i>L.jensenii</i>	6,8 7,71 \pm 2,00	22,5 8,05 \pm 1,37	0,0674 ^a 0,7976 ^b
<i>L.gasseri</i>	16,6 6,06 \pm 0,76	12,5 7,14 \pm 1,34	0,4368 ^a 0,1976 ^b
<i>L.johnsonii</i>	10 6,77	22,5 7,06 \pm 1,33	0,2979 ^a ND
<i>L.vaginalis</i>	13,3 7,94	5 7,69	ND ND
<i>L.fermentum</i>	10 6,07	ND ND	ND ND
<i>L.salivarius</i>	6,8 5	5 6,62	ND ND
<i>L.reuteri</i>	ND ND	5 7,06	ND ND
<i>L.acidophilus</i>	ND ND	7,5 6,68	ND ND
<i>L. delbrueckii</i>	3,4 5	ND ND	ND ND
<i>L.colehominis</i>	ND ND	2,5 6,55	ND ND
<i>L.hilgardii</i>	ND ND	2,5 7	ND ND

^a Teste Exato de Fisher

^b Teste t de Student

ND= not detected

Das 86 amostras recuperadas, 28 foram provenientes de pacientes com VB e 58 de pacientes sem VB, sendo este dado significativo. A espécie *L. crispatus* (29) foi a mais frequentemente isolada dos dois grupos de participantes, sendo 7 amostras de pacientes com VB e 22 do grupo sem VB.

Neste último grupo (assintomáticas), seguiram-se as espécies *L. jensenii*, *L. johnsonii* e *L. gasseri*, nas pacientes saudáveis, que corrobora estudos prévios

utilizando técnicas moleculares para identificação de lactobacilos isolados de mulheres aparentemente saudáveis (PAVLOVA, 2002; RIBEIRO-BRANCO, 2005). Para as pacientes com VB, foram, ainda, isoladas *L. gasseri*, *L. vaginalis* e *L. fermentum*.

Os *Lactobacillus* exercem um papel crítico na manutenção do ecossistema vaginal, prevenindo o desenvolvimento de patógenos e de microrganismos oportunistas pela produção de substâncias antagonistas, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocina e outras substâncias antimicrobianas (HILLIER *et al.*, 1998). Este dado é de grande importância, pois, com o advento da biologia molecular, verificou-se que *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* e *L. jensenii* são as espécies mais comumente encontradas na vagina, em condições normais (GIORGI *et al.*, 1987; ANTONIO *et al.*, 1999). As espécies menos encontradas incluem *L. ruminis*, *L. oris* e *L. vaginalis* (FALSEN, 1999).

Branco *et al.*, (2010) verificaram que *L. crispatus* foi a espécie mais comumente isolada de pacientes com e sem VB. Houve uma forte tendência de uma maior presença de *L. johnsonii* em pacientes sem VB do que sintomáticas para VB. Srinivasan *et al.*, (2010) verificaram a presença marcante de *Lactobacillus crispatus* e *L. jensenii* em mulheres saudáveis e presença concomitante de *L. iners* com *G. vaginalis* aumentados durante uma fase específica do ciclo menstrual (menstruação, aumento da disponibilidade de sangue na mucosa vaginal).

Srinivasan *et al.*, (2010) ainda constataram, estudando o ciclo de uma mulher com VB, diariamente, que esta nunca foi colonizada por *L. crispatus* ou *L. jensenii*, sugerindo mecanismo protetor. Estes pesquisadores perceberam que após a introdução de antibiótico, mais especificamente, o metronidazol, ocorre um declínio de microrganismos envolvidos na VB e um aumento considerável de *L. jensenii* e *L. crispatus* pode ser notado.

TABELA 8- Espécies de *Lactobacillus* isolados de espécimes clínicos de 62 pacientes com (23) ou sem VB (39).

Espécies de <i>Lactobacillus</i>	Com VB	Sem VB	Total
<i>L.crispatus</i>	7	22	29
<i>L.jhensenii</i>	2	9	11
<i>L.gasseri</i>	5	5	10
<i>L.jhonsonii</i>	3	9	12
<i>L.vaginalis</i>	4	2	6
<i>L.fermentum</i>	3	0	3
<i>L.salivarius</i>	2	2	4
<i>L.reuteri</i>	0	2	2
<i>L.acidophilus</i>	0	3	3
<i>L. delbrueckii</i>	1	0	1
<i>L.colehominis</i>	0	1	1
<i>L.hilgardii</i>	0	1	1
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	2	3

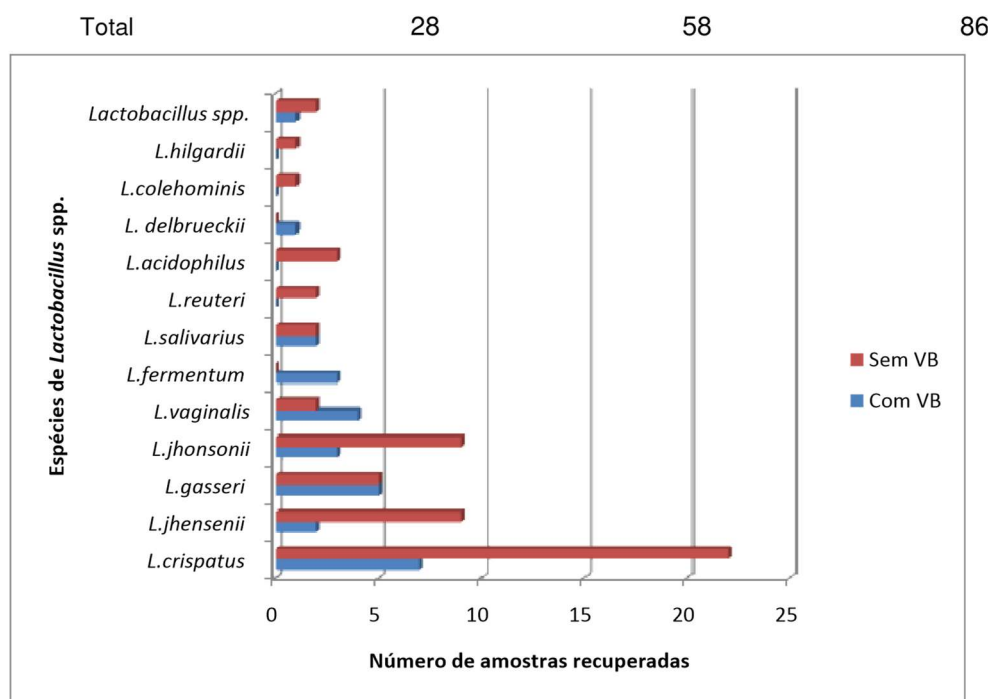


FIGURA 19- Espécies de *Lactobacillus* recuperadas de pacientes com e sem VB.

5.4 Produção de substâncias antagonistas por *Lactobacillus* spp.

Foram realizados, testes de atividade antagonista com todas as espécies de lactobacilos identificadas, provenientes de pacientes com e sem VB. As Tabelas 9 e 10 mostram a produção de substância antagonista pelas amostras de lactobacilos recuperadas dos dois grupos de pacientes, contra as 17 amostras de referência. Independentemente da amostra reveladora utilizada, uma maior frequência de antagonismo foi notado para as espécies de *Lactobacillus* spp. isoladas de mulheres saudáveis, quando comparados aos *Lactobacillus* spp. provenientes de pacientes com VB.

As linhagens de *L. crispatus* e *L. johnsonii* isoladas de pacientes sem VB, demonstraram melhor produção da atividade antagonista em relação ao número de espécies de referência testadas. Das 17 ATCCs utilizadas neste estudo, como reveladoras da atividade antagonista, 15 foram susceptíveis a (s) substância(s) produzida (s) *in vitro* por linhagens de *L. crispatus* e 13 por *L. johnsonii*. Além disso, quando utilizou-se *G.vaginalis* ATCC 14018 como reveladora, pelo menos uma representante de cada espécie de *Lactobacillus* spp., proveniente de paciente saudável, demonstrou atividade antagonista.

A análise dos resultados obtidos mostra uma maior e melhor atividade antagonista quando foi utilizada uma cepa de *L. johnsonii* proveniente de uma participante assintomática (P12) (Figuras 20 e 21). Constatou-se uma evidente expressão da atividade antagonista quando foram utilizadas as amostras de referência de *G. vaginalis* ATCC 14018 e *L. monocytogenes* ATCC 15313.

Foi verificada, ainda, atividade antagonista contra a espécie de *Candida albicans* ATCC 18804, porém, em taxas menores, tanto contra aquelas de pacientes com VB como sem VB, o que é coerente com o elevado número de amostras de *Candida* spp. isoladas neste trabalho, sugerindo que estes microrganismos podem se estabelecer em conjunto no sítio vaginal.

A produção de substância antagonista por *Lactobacillus* spp. é objeto de estudo por vários pesquisadores (LEPARGNEUR, 2002; REID e BURTON, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2008; BROLAZO *et al.*, 2009). Trabalhos recentes têm

demonstrado que a colonização do epitélio vaginal por *Lactobacillus* spp., especialmente *L. crispatus*, contribui para a manutenção do ecossistema vaginal saudável (ANTONIO *et al.*, 2005; BRANCO *et al.*, 2010).

As tabelas 11 -14 mostram a produção de substância antagonista, por *Lactobacillus* spp. isolados dos dois grupos de pacientes, contra amostras clínicas de *G. vaginalis*, também oriundas de pacientes com e sem VB.

Nas tabelas 11 e 12, pode-se notar a diferença de perfil de susceptibilidade por *G. vaginalis*, quando a substância antagônica é advinda de *Lactobacillus* spp. oriundos de participante saudáveis, em relação às pacientes com VB (tabelas 13 e 14).

Nas Tabelas 11 a 14, podemos perceber ainda, que as espécies de *Lactobacillus* mais frequentemente isolados produzem substância antagonista contra pelo menos uma amostra reveladora (*G. vaginalis*) oriunda do sítio vaginal com e sem VB, sendo este dado mais fortemente evidenciado, quando se trata de pacientes saudáveis, indicando que os *Lactobacillus* podem produzir alguma (s) substância (s) que auxilie na colonização do sítio em questão.

As Tabelas 15 e 16 mostram as médias das frequências de produção de substância antagonista por linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas de pacientes sem e com VB respectivamente contra isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundos dos dois grupos analisados. A alta frequência de produção de substâncias antagonistas contra *G. vaginalis* pelas amostras de *Lactobacillus* recuperadas de pacientes sem VB é um dado sugestivo de que poderiam estar contribuindo para proteção do ecossistema vaginal, considerando o usual envolvimento de *G. vaginalis* no quadro de VB.

Foi verificado auto e isoantagonismo por *Lactobacillus* spp. neste estudo, segundo demonstrado na tabela 17. De acordo com os conceitos clássicos de bacteriocina, acreditava-se que todas as células produtoras eram imunes ao seu produto (REEVES, 1965). Entretanto, o autoantagonismo é relatado para diversos microrganismos Gram positivos e Gram negativos (KONISKY, 1978; JAMES *et al.*, 1996).

TABELA 9- Relação (número de linhagens positivas e frequência (%)) de heteroantagonismo por linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas de pacientes sem VB.

Produtoras	Amostras		Reveladoras		Amostras												
	E.f	C.a	C. d	C.p	L.m	G.v	F.n	B.v	P.a	B.f	F.n	S.a	P.n	P.g	P.m	B.b	B.l
<i>L.crispatus</i> (22)	3	3	1	1	17	15	2	10	15	12	1	5	1	0	1	5	0
%	13,6	13,6	4,5	4,5	77	68,2	9,1	45,4	68	54,5	4,5	22,7	4,5	0	4,5	22,7	0
<i>L.jensenii</i> (9)	2	1	0	0	5	5	0	1	2	4	0	4	0	0	0	2	0
%	22,3	11,1	0	0	55,6	55,6	0	11,1	22,3	44,5	0	44,5	0	0	0	22,3	0
<i>L.gasseri</i> (5)	2	2	0	0	4	4	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0
%	40	40	0	0	80	40	40	0	40	0	0	0	0	0	0	40	0
<i>L.johnsonii</i> (9)	3	2	0	0	6	6	0	3	3	4	6	3	3	3	3	0	1
%	33,4	22	0	0	66,7	66,7	0	33,4	33,4	44,5	66,7	33,4	33,4	33,4	33	0	11,1
<i>L.vaginalis</i> (2)	0	2	0	0	1	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
%	0	100	0	0	50	50	0	50	0	100	0	50	0	0	0	0	0
<i>L.salivarius</i> (2)	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
%	50	50	0	0	100	50	0	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0
<i>L.reuteri</i> (2)	0	2	1	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
%	0	100	50	0	100	50	0	0	50	0	0	50	0	0	0	0	0
<i>L.acidophilus</i> (3)	0	2	0	1	2	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
%	0	66,8	0	33	66,8	33,4	33,4	0	33,4	0	66,8	0	0	0	0	0	0

E.f= *E.faecalis* ATCC 19433 C.a= *C.albicans* ATCC 18804, C.d= *C.difficile* ATCC 9689, C.p= *C.perfringens* Tipo 3624, L.m= *L.monocytogenes* ATCC 1531,

G.v= *G.vaginalis* ATCC 14018, F.n= *F.nucleatum* ATCC 10953, B.v= *B.vulgatus* ATCC 8482, P.a= *Panaerobius* ATCC 27337, B.f= *B.fragilis* ATCC 25923, F.n= *F.necrophorum*

ATCC 25286, S.a= *S.aureus* ATCC 33591, P.n= *P.nigrescens* ATCC 33569, P.g= *P.gingivalis* FDC 381, P.m= *P.melaninogenica* ATCC 24845,

B.b= *B.bifidum* ATCC 29521, B.l= *B.longum* ATCC 15707.

TABELA 10- Relação (número de linhagens positivas e frequência (%)) de heteroantagonismo por linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas de pacientes com VB.

	Amostras Reveladoras Amostras Produtoras																
	<i>E.f</i>	<i>C.a</i>	<i>C. d</i>	<i>C.p</i>	<i>L.m</i>	<i>G.v</i>	<i>F.n</i>	<i>B.v</i>	<i>P.a</i>	<i>B.f</i>	<i>F.n</i>	<i>S.a</i>	<i>P.n</i>	<i>P.g</i>	<i>P.m</i>	<i>B.b</i>	<i>B.l</i>
<i>L.crispatus</i> (7) (%)	2 28,5	2 28,5	0 0	2 28,5	2 28,5	1 14,3	0 0	1 0	1 0	1 14	0 0	2 28,5	1 14,3	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.jensenii</i> (2) (%)	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.gasseri</i> (5) (%)	1 20	1 20	1 20	0 0	3 60	0 0	0 0	0 0	3 60	1 20	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.johnsonii</i> (3) (%)	1 33,4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 0	1 33	0 0	1 33,4	1 33,4	1 33,4	0 0	1 33,4	1 33
<i>L.vaginalis</i> (4) (%)	2 50	2 50	0 0	0 0	2 50	2 50	0 0	0 0	0 0	2 50	0 0	2 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.fermentum</i> (3) (%)	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 33,4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 33,4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

E.f = *E. faecalis* ATCC 19433 *C.a*= *C. albicans* ATCC 18804, *C.d*= *C. difficile* ATCC 9689, *C.p*= *C. perfringens* Tipo 3624,

L.m= *L. monocytogenes* ATCC 1531, *G.v*= *G. vaginalis* ATCC 14018, *F.n*= *F. nucleatum* ATCC 10953, *B.v*= *B. vulgatus* ATCC 8482,

P.a= *P. anaerobius* ATCC 27337, *B.f*= *B. fragilis* ATCC 25923, *F.n*= *F. necrophorum* ATCC 25286, *S.a*=*S. aureus* ATCC 33591, *P.n*= *P. nigrescens* ATCC 33569,

P.g= *P. gingivalis* FDC 381, *P.m*= *P. melaninogenica* ATCC 24845, *B.b*= *B. bifidum* ATCC 29521, *B.l*= *B. longum* ATCC 15707.

TABELA 11- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **sem VB**, contra isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundas de pacientes **com VB**

Amostras Produtoras	Amostras Reveladoras																
	GVP17	GVP21	GVP36	GVP43	GVP46	GVP49	GVP50	GVP52	GVP57	GVP62	GVP64	GVP69	GVP72	GVP73	GVP74	GVP76	GVP77
<i>L.crispatus</i> (22) (%)	2 9,1	0 0	15 68,1	4 18,2	4 18,2	15 68,1	18 81,8	11 50	6 27,2	2 18,2	9 40,9	2 18,1	0 0	5 22,7	9 40,9	5 22,7	15 68,1
<i>L.jensenii</i> (9) (%)	1 11,1	1 11,1	6 66,7	4 44,4	2 22,2	6 66,7	1 11,1	1 11,1	0 0	1 11,1	4 44,4	4 44,4	1 11,1	1 11,1	7 63,6	0 0	7 63,6
<i>L.gasseri</i> (5) (%)	0 0	0 0	4 80	4 80	1 20	1 20	0 0	0 0	2 40	2 40	4 80	1 20	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.johnsonii</i> (9) (%)	5 55,5	4 44,4	8 88,9	1 11,1	5 55,5	4 44,4	3 25	4 44,4	0 0	1 11,1	5 55,5	4 44,4	1 11,1	0 0	0 0	1 11,1	2 22,2

TABELA 12- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **sem VB**, contra isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundas de pacientes **sem VB**

Amostras Produtoras	Amostras Reveladoras						
	GV P3	GV P13	GV P19	GV P27	GV P39	GV P55	GV P58
<i>L.crispatus</i> (22) (%)	5 22,7	18 81,8	14 63,6	14 63,6	10 45,4	14 63,6	14 63,6
<i>L.jensenii</i> (9) (%)	2 22,2	5 55,5	7 77,8	7 77,8	0 0	0 0	7 77,8
<i>L.gasseri</i> (5) (%)	1 20	4 80	4 80	2 40	0 0	4 80	4 80
<i>L.johnsonii</i> (9) (%)	7 77,8	9 100	5 55,5	9 100	0 0	7 77,8	7 77,8

TABELA 13- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **com VB**, contra isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundas de pacientes **com VB**

Produtoras	Amostras		Reveladoras		Amostras													
	GVP17	GVP21	GVP36	GVP43	GVP46	GVP49	GVP50	GVP52	GVP57	GVP62	GVP64	GVP69	GVP72	GVP73	GVP74	GVP76	GVP77	
<i>L.crispatus</i> (7) (%)	1 14,3	0 0	0 0	0 0	2 28,5	0 0	0 0	0 0	0 0	2 28,5	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 28,5	2 28,5
<i>L.jensenii</i> (2) (%)	0 0	0 0	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.gasseri</i> (5) (%)	1 20	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 40	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 20	0 0
<i>L.johnsonii</i> (3) (%)	0 0	0 0	1 33,4	0 0	1 33,4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.vaginalis</i> (4) (%)	1 0	0 0	3 75	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

TABELA 14- Produção de substâncias antagonistas por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **com VB**, contra isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundas de pacientes **sem VB**

Amostras Produtoras	Amostras Reveladoras						
	GV P3	GV P13	GV P19	GV P27	GV P39	GV P55	GV P58
<i>L.crispatus</i> (7) (%)	1 14,3	0 0	0 0	2 28,6	0 0	5 71,4	0 0
<i>L.jensenii</i> (2) (%)	1 50	0 0	0 0	1 50	0 0	1 50	0 0
<i>L.gasseri</i> (5) (%)	1 20	0 0	0 0	1 20	0 0	1 20	0 0
<i>L.johnsonii</i> (3) (%)	1 33,4	0 0	1 33,4	1 33,4	0 0	1 33,4	0 0
<i>L.vaginalis</i> (4) (%)	2 50	0 0	0 0	1 25	0 0	2 50	0 0

ERRATA

	<i>G. vaginalis</i>		Valor de p
	Com VB	Sem VB	
<i>L. crispatus</i> (%)	33,67	57,76	0,0005
<i>L. jensenii</i> (%)	29,04	44,44	0,063
<i>L. gasseri</i> (%)	22,35	54,29	10 ⁻⁷

TABELA

Média da

	<i>G. vaginalis</i>		Valor de p
	Com VB	Sem VB	
<i>L. crispatus</i> (%)	7,54	16,33	0,06
<i>L. jensenii</i> (%)	5,88	21,42	0,0016
<i>L. gasseri</i> (%)	4,71	8,57	0,28
<i>L. johnsonii</i> (%)	3,92	19,08	0,0007

15 -

frequência de produção de substâncias antagonistas **TABELA 16** - Média da frequência de produção

de substâncias antagonistas por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **sem VB**, contra por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **Com VB** contra isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundas de pacientes **Com e Sem VB** isolados clínicos de *G. vaginalis* oriundas de pacientes **Com e Sem VB**

L. johnsonii (%) 30,86 69,84 10⁻⁸ *L. vaginalis* (%) 4,41 17,86 0,0013

TABELA 17- Relação de auto e isoantagonismo produzida por linhagens de *Lactobacillus* spp. isolados de pacientes **com e sem VB**

Amostras Produtoras	Amostras Reveladoras								
	L. crisp. (29)	L. jens (11)	L. gas (10)	L. john (12)	L. vag. (6)	L. ferm.(3)	L. saliv. (4)	L. reut. (2)	L. acidoph. (3)
<i>L.crispatus</i> (29) (%)	[24] 82,7	18 62,1	2 6,9	0 0	15 51,7	3 10,3	15 10,3	11 37,9	2 6,9
<i>L.jensenii</i> (11) (%)	2 18,2	[6] 54,5	0 0	2 18,2	2 18,2	0 0	0 0	2 18,2	0 0
<i>L.gasseri</i> (10) (%)	6 60	0 0	[5] 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>L.johnsonii</i> (12) (%)	5 41,7	2 16,7	2 16,7	[9] 75	0 0	5 41,7	5 41,7	2 16,7	0 0
<i>L.vaginalis</i> (6) (%)	4 66,7	2 33,4	1 16,67	0 0	[5] 83,3	2 33,4	0 0	1 16,7	1 16,7
<i>L.fermentum</i> (3) (%)	2 66,7	0 0	1 33,4	0 0	0 0	[1] 33,4	1 33,4	0 0	0 0
<i>L.salivarius</i> (4) (%)	2 50	2 50	3 0	0 0	0 0	1 33,4	[1] 33,4	1 33,4	0 0
<i>L.reuteri</i> (2) (%)	0 0	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	[0] 0	1 50

<i>L.acidophilus</i> (3)	0	0	1	0	0	0	0	0	[2]
(%)	0	0	33,4	0	0	0	0	0	66,6

A avaliação feita permite a observação do fenômeno de inibição, mas não permite determinar a distinção da natureza da substância que estaria envolvida no antagonismo. O teste de antagonismo *in vitro*, pela técnica de sobrecamada, é amplamente utilizado para selecionar amostras produtoras de substâncias tipo bacteriocina, mas apresenta algumas limitações. Segundo Linton (1953), o halo de inibição pode variar em função da quantidade de produção e difusão do composto antimicrobiano. Trabalhos realizados por Hoover & Harlander (1993), mostram que o tamanho do halo de inibição pode variar de acordo com a concentração, a massa molecular e a carga iônica da substância, além da composição e concentração do Agar do meio e temperatura de incubação (LIMA *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos podem representar a atividade antagonista de várias substâncias, atuando separadamente ou em conjunto. Há que se admitir que, dentre estas substâncias, estejam alguma ou algumas bacteriocinas que poderiam atuar como linhagens da mesma espécie, como observado (Figuras 20 e 21). A verificação da habilidade de produção de substâncias antagonistas produzidas por *Lactobacillus* spp. especialmente, quando isolados de pacientes saudáveis contra *G. vaginalis*, isolados de pacientes com VB é um dado importante e que merece aprofundamento, na tentativa de se caracterizar, isolar e purificar a (s) substância (s) envolvida (s) no antagonismo.

Um teste específico descrito na metodologia permitiu descartar o clorofórmio utilizado no ensaio como possível responsável pelo antagonismo. A presença de oxigênio sendo necessária para a produção de peróxido de hidrogênio, este outro possível responsável pela inibição pode ser também descartado, já que o ensaio de antagonismo foi feito numa câmara anaeróbica. Contudo, no ambiente vaginal o peróxido de hidrogênio poderia ser produzido.

Assim, estudos envolvendo a busca por probióticos são realizados por numerosos pesquisadores, objetivando encontrar um microrganismo capaz de colonizar com sucesso e que seja eficaz no tratamento das infecções vaginais. Um exemplo disso seria o trabalho de REID *et al.* (2003a) que avaliaram a eficácia da administração de cápsulas contendo *Lactobacillus rhamnosus* GR-1

e *L. fermentum* RC-14, por dois meses, em 64 mulheres e verificaram redução nas taxas de infecção.

É importante enfatizar que as interações entre bactérias são essenciais para a colonização microbiana no ambiente vaginal, como em outros sítios. Dentre os diversos fatores que influenciam a sucessão ecológica estão as diversas relações de sinergismo e antagonismo que ocorrem entre os componentes de uma dada microbiota. Considerando-se a complexidade da microbiota presente no ecossistema vaginal, a produção in vivo de substâncias antagonistas pelas amostras de *Lactobacillus* spp. testadas conferiria uma vantagem ecológica para as mesmas, uma vez que poderiam usar esta habilidade para a colonização do epitélio vaginal, o que, para as mulheres, representaria proteção.



FIGURA 20. Expressão da atividade antagonista de *Lactobacillus johnsonii* (P12) revelada contra *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018.

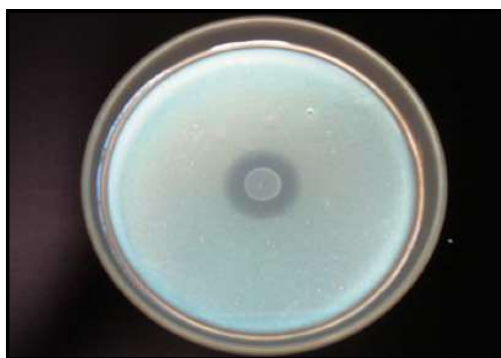


FIGURA 21. Expressão da atividade antagonista de *Lactobacillus johnsonii* (P12) revelada contra *L. monocytogenes* ATCC 15313

5.5 Produção de peróxido de hidrogênio.

A avaliação da produção de peróxido de hidrogênio é comumente realizada por método semiquantitativo em placa, com a utilização da peroxidase incorporada em meio contendo Agar e o reagente tetrametilbenzidina (ESCHEMBACK *et al.*, 1989; HAWES *et al.*, 1996, MARTIN *et al.*, 1999; MIJAC *et al.*, 2006; MARTINEZ, 2008).

As tabelas 18 e 19 mostram a produção de peróxido de hidrogênio pelas espécies isoladas e identificadas em função do quadro clínico. As Figuras 22 a e b, ilustram a detecção da produção de H₂O₂ em placas de TMB-plus.

Considerando-se amostras recuperadas dos espécimes das participantes assintomáticas e daquelas com VB, a proporção de produtoras do peróxido entre as de pacientes sem VB foi de 60%, significativamente maior que a proporção das amostras do outro grupo (40,7%), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,008$). Esta produção maior pelas amostras das pacientes assintomáticas pode estar relacionada com o papel protetor destas substâncias produzidas pelos *Lactobacillus* spp. Estes dados são coerentes com as maiores concentrações encontradas por outros autores (59 a 96%) (ESCHEMBACK *et al.*, 1989; PASCUAL *et al.*, 2006; STRUS *et al.*, 2006, MARTINEZ, 2008).

Neste trabalho, a avaliação da produção de peróxido foi realizada em meio TMB-plus, como descrito por Rabe & Hillier (2003). Estes autores testaram meios de cultura diferentes para avaliação da produção de peróxido e conseguiram otimizar o meio TMB. Os meios de Rogosa e MRS contêm magnésio em quantidade menor do que TMB-plus. Barnard e Stinson (1999) observaram que a adição de magnésio ao meio de cultura elevava a produção de peróxido por *S. gordonii* e que este efeito poderia ser revertido pela adição de citrato de potássio, um quelante de magnésio. Por este motivo, Rogosa e MRS não devem ser utilizados, pois apresentam na sua constituição citrato de amônio, que exerce o mesmo efeito inibidor.

Entretanto, estudos realizados por Sharpe (1960) e Tiez (1987) demonstraram que a produção de peróxido por *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, que são homofermentadores normalmente recuperados do trato vaginal de mulheres sadias, não é afetada pelo magnésio.

Eschembach *et al.*, (1989b) encontraram um número maior de *Lactobacillus* produtores de peróxido (96%) em mulheres sadias do que em mulheres com VB (6%). A presença de linhagens produtoras de H₂O₂ na vagina associada fortemente com o decréscimo no número dos casos de gonorréia (MARRAZO *et al.*, 2002).

Lactobacillus spp. produzem peróxido de hidrogênio, que reage com mieloperoxidases para formar moléculas que são tóxicas para outros patógenos (KLEBANOFF & COOMBS, 1991; KLEBANOFF *et al.*, 1991).

A produção de H₂O₂ é diferente entre as espécies de *Lactobacillus*. No trabalho realizado por Antonio *et al.* (1999), a quase totalidade das amostras (94%) de *L. crispatus* e *L. jensenii* se mostrou produtora de H₂O₂, enquanto que somente 7 a 9% das amostras de *L. gasseri* produziram este tipo de substância e as amostras de *L. iners* foram incapazes de produzi-la.

Redondo-Lopes *et al.*, (1990) concluíram que a produção de H₂O₂ parece representar um mecanismo de defesa não específico do ecossistema vaginal sadio e seria um fator responsável pelo domínio de *Lactobacillus* no trato genital.

Antonio *et al.*, (1999), avaliando amostras provenientes de 215 mulheres, encontraram 95% das amostras de *L. crispatus* e *L. jensenii* e 71% daquelas de *L. gasseri* produtoras de H₂O₂. As amostras de *L. jensenii* isoladas do trato vaginal por McGroarty *et al.* (1992) e Eschembach *et al.* (1989) mostraram-se também, produtoras de H₂O₂. Nagy *et al.* (1991), entretanto, encontraram somente 56% das amostras recuperadas do trato vaginal pertencentes a espécie *L. jensenii* como produtora de peróxido.

O fenômeno da produção de peróxido de hidrogênio *in vivo* no trato vaginal, onde a concentração de oxigênio é mais baixa, não é bem conhecido. Entretanto, numerosos estudos têm mostrado que os *Lactobacillus* que

produzem peróxido *in vitro* são aqueles encontrados em maior proporção em mulheres sadias (ESCHENBACH *et al.*, 1989b).

TABELA 18- Produção de peróxido de hidrogênio pelas espécies de *Lactobacillus* isoladas de pacientes sem VB.

Espécies de <i>Lactobacillus</i> (Número de linhagens testadas)	-	+	++	+++	++++	Total Posit.
<i>L.crispatus</i> (22)	9	1	9	3	0	13
<i>L.jhonsonii</i> (9)	4	0	1	2	2	5
<i>L.vaginalis</i> (2)	0	2	0	0	0	2
<i>L.delbrueckii</i> (0)	0	0	0	0	0	0
<i>L.reuteri</i> (2)	0	1	0	1	0	2
<i>L.acidophilus</i> (3)	0	1	2	0	0	3
<i>L.gasseri</i> (5)	3	1	1	0	0	2
<i>L.hilgardii</i> (1)	0	0	0	1	0	1
<i>L.fermentum</i> (0)	0	0	0	0	0	0
<i>L.salivarius</i> (2)	1	1	0	0	2	1
<i>L.jensenii</i> (8)	4	0	1	1	0	4
<i>L.colehominis</i> (1)	1	0	0	0		0
TOTAL (55)	22	7	14	8	4	33

– indica que não houve produção de H₂O₂ e a quantidade do sinal + indica a intensidade de produção do H₂O₂

TABELA 19- Produção de peróxido de hidrogênio pelas espécies de *Lactobacillus* isoladas de pacientes com VB.

Espécies de <i>Lactobacillus</i> (Número de linhagens testadas)	-	+	++	+++	++++	Total Posit.
<i>L.crispatus</i> (7)	1	3	2	10		6
<i>L.jhonsonii</i> (3)	2	0	0	10		1
<i>L.vaginalis</i> (4)	4	0	0	0 ⁰		0
<i>L.delbrueckii</i> (1)	1	0	0	0 ⁰		0
<i>L.reuteri</i> (0)	0	0	0	0 ⁰		0
<i>L.acidophilus</i> (0)	0	0	0	0 ⁰	0 ⁰	0
<i>L.gasseri</i> (5)	3	1	1	0 ¹	0	2
<i>L.hilgardii</i> (0)	0	0	0	0		0
<i>L.fermentum</i> (3)	3	0	0	0		0
<i>L.salivarius</i> (2)	2	0	0	0		0
<i>L.jensenii</i> (2) 0	0	0	0			2
1 <i>L.colehominis</i> (0)	0	0				0
0 0						
TOTAL (27)	16	4	3	3	1	11

– indica que não houve produção de H₂O₂ e a quantidade do sinal + indica a intensidade de produção do H₂O₂

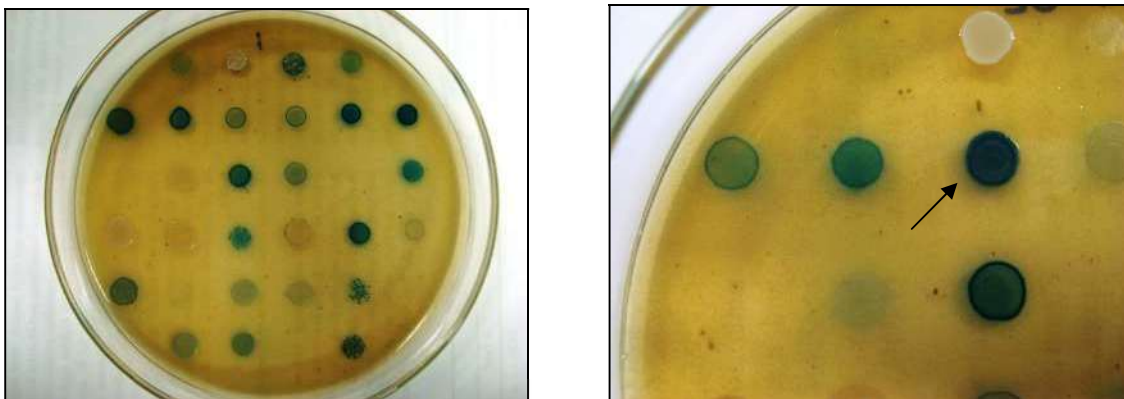


FIGURA 22 - (a) Placa de TMB-plus, com amostras de *Lactobacillus* spp. submetidas à avaliação da produção de peróxido de hidrogênio. (b) A seta indica forte produção de H₂O₂ pela linhagem de *L. johnsonii* isolada de uma participante saudável.

5.6 Determinação das concentrações inibitórias mínimas

Para realização do teste de diluição em Agar, foi utilizado o meio Müller Hinton (DIFCO), suplementado com 1% de proteose peptona nº3 (DIFCO) e adicionado 1% de sangue de cavalo hemolisado e inativado, também utilizado em uma tese de doutorado (Francisco, 1990). Os testes foram realizados em duplicata, em câmara anaeróbica e apresentaram excelente crescimento nestas condições, como já observado por Goldstein *et al.*, (1993).

A tabela 20 e a figura 23 mostram as concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos para 20 amostras clínicas de *G. vaginalis*, oriundas de pacientes sintomáticas e assintomáticas para VB, além de uma amostra de referência de *G. vaginalis* (ATCC 14018) e uma amostra de referência de *B.fragilis* (ATCC 25285), utilizadas como controle.

Para a maioria dos agentes antimicrobianos testados, Metronidazol (MZOL), Tinidazol (TZOL), Secnidazol (SZOL) e Clindamicina (CLIND), as amostras foram sensíveis, com exceção do MZOL, para o qual foi observada uma alta taxa de resistência.

Na figura 23, com base na tabela 20, compararam-se os percentuais de amostras sensíveis e resistentes aos imidazólicos testados (metronidazol, tinidazol e secnidazol). Verifica-se que a proporção de amostras de *G. vaginalis* resistentes ao metronidazol (14/20) é significativamente maior que a observada

para as sensíveis (6/20). Entre essas amostras clínicas, cinco foram resistentes ao secnidazol.

TABELA 20- Concentrações inibitórias mínimas de agentes antimicrobianos para amostras de *G. vaginalis* isoladas de pacientes com e sem VB.

Nº	Amostras	CIM (µg/ml)				Quadro Clínico
		MZOL (16*)	TZOL (16*)	SZOL (16*)	CLIND (4*)	
1	ATCC Gv	4	2	4	0,03	ATCC
2	ATCC Bf	2	1	1	0,5	ATCC
3	P3	16	16	2	0,06	VB
4	P9	16	2	16	0,06	Ass.
5	P15	32	8	16	0,06	VB
6	P17	> 512	512	4	0,06	VB
7	P19	16	8	16	0,06	Ass.
8	P21	16	2	4	0,06	VB
9	P27	64	128	4	0,06	Ass.
10	P32	16	2	2	0,25	Ass.
11	P36	> 512	128	128	0,25	VB
12	P43	512	8	32	0,06	VB
13	P46	128	2	2	0,125	VB
14	P49	64	2	4	0,06	Ass.
15	P50	32	2	8	0,06	VB
16	P55	64	2	64	0,06	Ass.
17	P58	64	2	2	0,06	Ass.
18	P64	> 512	4	128	0,06	VB
19	P72	16	2	64	0,06	VB
20	P73	> 512	512	128	0,06	VB
21	P74	128	2	16	0,06	VB
22	P77	> 512	2	16	0,06	VB

O guia CLSI (2007) não oferece o *breakpoint* para tinidazol e secnidazol. Devido à similaridade na estrutura e atividade, foi utilizado aquele para o metronidazol (16 mg/mL). ATCC= American Type Culture Collection.

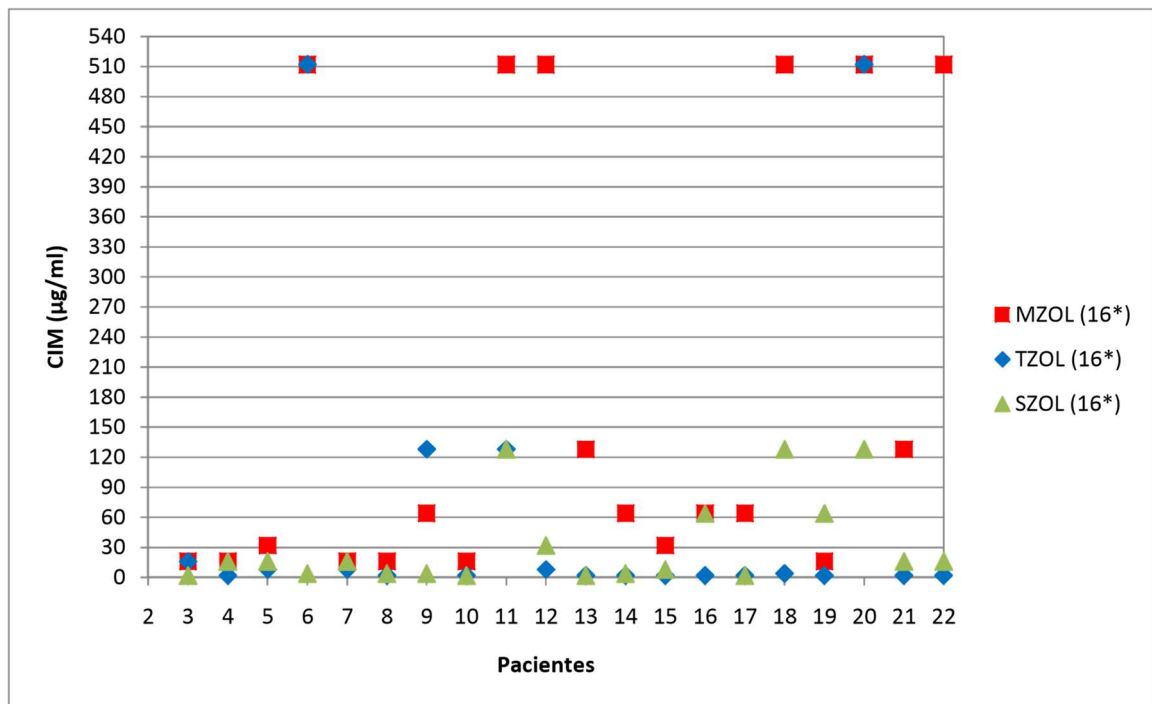


FIGURA 23- Proporção de amostras de *G. vaginalis* isoladas de pacientes com e sem VB sensíveis e resistentes aos imidazólicos.

Todas as amostras foram sensíveis à clindamicina (CIM 90% < 0,06 µg/ml), droga esta que, junto com o metronidazol, completa o esquema terapêutico para VB (CDC, 2002). A clindamicina já se mostrara efetiva nos relatos de Catlin (1992), quando administrada oralmente ou por via intravaginal, como creme a 2%, mesma proporção utilizada atualmente. Nos estudos de Kharsany *et al.* (1993) e Goldstein *et al.* (2002), todas as amostras de *G. vaginalis* foram sensíveis à clindamicina. No estudo de Puapermpoonsiri *et al.* (1997), a clindamicina se mostrou tão eficaz quanto o metronidazol. Koumans *et al.* (2002) constataram que o uso de clindamicina por terapia intravaginal, especialmente durante o segundo semestre de gravidez e após este período, não se mostrou eficaz, aumentando a chance de infecção por VB, durante o período neonatal. Kekki *et al.* (2004) reforçaram este estudo e relataram que esta droga não se mostrou eficiente para reduzir os índices de partos prematuros e infecções pós parto.

A clindamicina oral leva a maior incidência de diarreia, quando comparada ao metronidazol. Não se observam diferenças de eficácia com o uso da clindamicina creme ou óvulo vaginal (CDC, 2002).

Com relação à atividade do metronidazol, usualmente a droga de escolha (CDC, 2002), foi verificado grande índice de resistência das amostras (CIM 90% > 512 µg/ml). Segundo Bannatyne *et al.* (1998) e Goldstein *et al.* (2002), a resistência ao metronidazol contra *G. vaginalis* tem sido cada vez mais relatada. No estudo de Goldstein *et al.* (2002), realizado em Los Angeles, USA, 29% das amostras se mostraram resistentes, com a CIM para 90% > 32 µg/ml (última concentração testada). Em estudo realizado anteriormente, (1993), o mesmo grupo relatou resistência de 20% das amostras de *G. vaginalis* a este antimicrobiano. Este aumento (20 para 29%) levou os autores a sugerir que a susceptibilidade de *G.vaginalis* deveria ser monitorada regularmente e que falhas no tratamento clínico poderiam ocorrer.

Em estudo realizado no início da década de 90, utilizando amostras recuperadas do trato genito-urinário feminino e masculino de pacientes da cidade de São Paulo, nos anos 1987 e 1988, Francisco (1990) já relatava a tendência à resistência ao metronidazol. No presente trabalho, foi verificado um índice de 70% de resistência entre as amostras clínicas de *G. vaginalis* testadas para esta droga.

A resposta ao tratamento nos quadros de VB varia em função do antimicrobiano utilizado, indicando que novas opções devem ser avaliadas. Mulheres tratadas com metronidazol, por cinco dias, respondem bem ao tratamento, sugerindo que estas bactérias são sensíveis ao metronidazol ou dependentes de outra bactéria que é erradicada com o tratamento por este fármaco (SRINIVASAN *et al.*, 2010).

Assim como no estudo de Goldstein *et al.* (2002), neste trabalho, a CIM para 90% das amostras também foi representada pela última concentração testada (512 µg/ml). Contudo, este fato é extremamente preocupante, já que a maior concentração testada no presente estudo representa quatro vezes aquela testada pelos referidos autores, e a droga continua a mais importante opção clínica. Os autores mencionados relataram que a atividade “in vitro” de agentes antimicrobianos contra *G. vaginalis* não necessariamente apresenta correlação

com sua atividade “in vivo” no tratamento da infecção mista, envolvendo a complexa microbiota encontrada em VB. Este fato pode estar relacionado a diferenças no grau de transformação da droga em sua forma ativa nos ambientes “in vitro” e “in vivo”, fenômeno essencial e relacionado à condição de anaerobiose do meio.

Apesar de existirem muitas drogas com atividade contra patógenos bacterianos sexualmente transmitidos, incontáveis problemas permanecem. Entre estes, além do problema crítico da resistência dos patógenos aos antimicrobianos, citam-se a inconsistência da eficácia “in vivo” para alguns esquemas com boa atividade “in vitro”, a inconveniência de administração, a falta de aprovação da droga pelos órgãos competentes, por estudos insuficientes, e o custo (YASIN *et al.*, 2003).

Seria oportuno lembrar que a introdução do metronidazol no tratamento de doenças de etiologia bacteriana decorreu da observação da melhora clínica de lesões periodontais de pacientes que faziam uso da droga para tratamento de infecções vaginais por protozoários (BAINES & MCFAZEDAN, 1981). Como as doenças periodontais são infecções anaeróbias mistas, o uso cada vez mais abusivo deste antimicrobiano nestes processos passou a ser uma realidade de difícil controle, pela eficiência da droga, apesar da disponibilidade de outras efetivas contra os anaeróbios mais frequentemente envolvidos.

O uso indiscriminado de antibióticos pode, ainda, ser uma causa da perda dos lactobacilos, assim como fatores locais, tais como diafragma, espermaticidas, o coito, anel vaginal e outros, que facilitariam a multiplicação indesejável de certas bactérias impróprias, como, por exemplo, a própria *G. vaginalis*. Estes fatores se associam à alteração da microbiota, mas rapidamente os lactobacilos deveriam retornar aos níveis basais, o que não ocorrendo, favorece a VB (PATEL *et al.*, 2004).

Apesar de a resistência das amostras de *G. vaginalis* ao metronidazol ser contundente, percebe-se, neste trabalho, uma variação muito ampla (4,0 - >512 µg/ml). Esta variação também foi observada por Kharsany *et al.* (1993) que relataram a CIM do metronidazol para 93 amostras de *G. vaginalis* variando de 2 a 128 µg/ml.

Evidências epidemiológicas sugerem que a variação no uso terapêutico de metronidazol seria um dos principais fatores responsáveis pela distribuição desigual dos níveis de resistência entre os microrganismos. Foi proposto que os altos níveis de resistência observados nos países em desenvolvimento estão associados ao uso abusivo do metronidazol na terapia contra infecções causadas por protozoários (SOARES-BRANDÃO, 2004).

Além disso, a alta prevalência de microrganismos resistentes isolados de pacientes do sexo feminino pode estar associada com ao uso desta droga no tratamento de vaginoses e de outras infecções do trato genital feminino. Entretanto, muitos destes estudos não conseguem mostrar uma associação direta entre o uso prévio do metronidazol e a presença de amostras microbianas resistentes, provavelmente pela carência de dados das pacientes (DINIZ *et al.* 2001).

Quanto ao tinidazol e ao secnidazol, é importante ressaltar que, pelo menos à época do estudo de Crowell *et al.* (2003), o primeiro não era aprovado pelo FDA ("Food and Drug Administration"). Deve-se registrar que, pelas dificuldades de dados nos manuais próprios (CLSI, 2007) sobre o ponto crítico do tinidazol, e ainda para o secnidazol, optou-se por considerar os mesmos valores utilizados para o metronidazol (16 µg/ml).

Neste trabalho, a taxa de resistência para tinidazol e secnidazol, nas amostras clínicas testadas foi, respectivamente, de 20 e 30%, o que mostra que ambos apresentaram maior atividade contra *G. vaginalis* que o metronidazol. Em trabalho semelhante, Austin *et al.*, (2006), encontraram sensibilidade ao tinidazol em todas as 15 amostras analisadas de *G.vaginalis* resistentes ao metronidazol, enquanto que a única amostra sensível ao metronidazol foi resistente ao tinidazol ($p=0,001$). Estudo recente, mostrou que os regimes de tinidazol de 1g ao dia, por cinco dias e 2g ao dia por dois dias se mostraram eficazes para o tratamento de VB (LIVENGOOD *et al.*, 2007).

Os dados apresentados representam mais um passo, no nosso meio, para a discussão objetiva de aspectos relacionados à etiologia e ao tratamento de vaginoses bacterianas. Apesar da limitação da amostragem, representam, também, um suporte para a discussão dos esquemas terapêuticos vigentes. Na discussão das opções de tratamento com as pacientes, cabe aos clínicos

abordar não apenas o método preferencial das pacientes quanto à administração da droga (oral versus vaginal) e efeitos adversos (ex. sintomas gastrintestinais), mas, também, o risco de recorrência de VB.

Segundo o CDC (2009), geralmente os parceiros de pacientes com VB não precisam ser convocados para tratamento; entretanto, é possível que a VB se espalhe por via sexual, apesar de muitas controvérsias e não haver evidências suficientes. Por isso, os autores se dividem, e a maioria só opta por convocar o(s) parceiro(s) diante de VB recidivante, após várias falhas terapêuticas. A terapêutica de escolha, à unanimidade, é o metronidazol 500mg, oral, 12\12h, por 7 dias ou 2g, em dose única, assim como o tinidazol 2g, em dose única e, no Brasil, também por vasta experiência de mais de 30 anos, o secnidazol 2g, em dose única. Se a opção for tópica vaginal, utiliza-se o metronidazol ou clindamicina creme, a 2% (JACYNTO, C. 2010).

Estudo mais recente de Reichman *et al.* (2009) para VB recorrente associa 7 dias de nitroimidazólico, seguidos de 21 dias de óvulo de ácido bórico intravaginal, 600mg ao dia e, na revisão, o metronidazol gel, duas vezes por semana, por 16 semanas. Parece encorajador esse triplo regime; porém, requer validação com estudo prospectivo randomizado e controlado. O ácido bórico removeria o “biofilme” vaginal, que facilitaria a persistência das bactérias patogênicas.

Segundo Jacynto (2010), é aconselhável que as pacientes com VB sejam tratadas, mesmo que assintomáticas, antes de cirurgias ginecológicas, curetagens e inserção de DIU, apesar de os estudos não mostrarem evidência científica suficiente e haver controvérsias naqueles existentes, porém, insuficientes. A indicação seria profilática, pensando-se numa eventual doença inflamatória pélvica (DIP), já que a DIP se associa à VB. O fato de se tratar a vaginose bacteriana já limita, também, a aquisição de HIV e outros patógenos, gerando uma discussão relevante, que é o tratamento da VB assintomática em pacientes HIV positivas. Ainda, segundo Jacynto (2010), deve-se discutir com as pacientes e oferecer o tratamento, apesar de as recomendações não serem tão claras e o CDC recomendar tratamento igual para as HIV-positivas.

Infelizmente, há maior recorrência de VB quando os antimicrobianos sintéticos são utilizados, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento dos mecanismos de resistência (AUSTIN *et al.* 2004). Assim, os pesquisadores e os clínicos estão à procura de métodos alternativos para o tratamento da VB.

A integração das áreas básica e clínica é, certamente, o caminho para a compreensão desses processos, que definirá a qualidade do diagnóstico, da terapêutica e do prognóstico, e sem o que o empirismo continuará interferindo na patogênese e agravando a problemática da resistência.

5.7 Teste de colonização e antagonismo *in vivo*.

Foi selecionada uma linhagem de *Lactobacillus* spp., tendo por base as habilidades de produção *in vitro* de substância antagonista e de H₂O₂ dentro dos isolados provenientes de uma participante saudável. Nessas bases foi selecionada uma linhagem de *L. johnsonii* (P12) para uso probiótico, e para o desafio, foi utilizada uma amostra de *G. vaginalis* isolada de paciente com VB (P36).

Foi realizado teste t de student para comparar as contagens da população microbiana (log₁₀ UFC/g de tecido vaginal) entre os animais. Os experimentos foram realizados na presença ou ausência de hormônio e foi utilizado também um grupo controle de animais que não foram inoculados com microrganismo e que não apresentaram crescimento em meio de cultura, como esperado por se tratarem de animais isentos de germes.

Segundo vários pesquisadores (SOBEL *et al.*, 1985; RYLEY & MCGREGOR, 1986; OONAGH & COLLARD, 1986; FURR *et al.*, 1989; FIDEL *et al.*, 1993a; HAMAD *et al.*, 2004; TAYLOR-ROBINSON, 2007) a administração de estrogênio a camundongos antes de inoculação poderia garantir uma colonização duradoura. Para testar esta afirmativa controversa, foram realizados experimentos em dois grupos (tratados e não tratados com hormônio), para verificação do efeito do hormônio na colonização do tecido vaginal pelas linhagens testadas.

Em modelo animal murino, a fase estrogênica é definida por células do epitélio escamoso, algumas nucleadas (fase estral precoce) ou exclusivamente não nucleadas (fase estral) (TAYLOR-ROBINSON, 2007). A maioria dos estudos em vaginites tem empregado modelo animal murino para os experimentos *in vivo*, porém não há trabalhos conhecidos sobre a colonização de *G. vaginalis* neste modelo de estudo. Estes modelos requerem que os animais estejam no estágio pseudo-estral no período da inoculação vaginal para obter uma infecção intravaginal persistente (FIDEL Jr *et al.*, 1993a). A condição pseudo-estral pode ser obtida pela injeção subcutânea de estradiol. O estrogênio converte o epitélio colunar para uma camada de epitélio escamoso estratificado espesso e aumenta o conteúdo de glicogênio e outros substratos para a multiplicação microbiana (FIDEL Jr *et al.*, 2002).

O critério adotado para se determinar a concentração bacteriana dos inóculos baseou-se em sua taxa de crescimento em meio líquido Brucella suplementado com proteose peptona e extrato de carne (*G. vaginalis*), por 2448 horas. Com relação aos *Lactobacillus*, é importante destacar que eles são encontrados em quantidades médias de 10^7 a 10^8 UFC/g de fluido vaginal, enquanto *G. vaginalis* de 10^5 a 10^6 (MARRIE *et al.*, 1980, SOBEL & CHAIM, 1996; HOOTON, 1998).

Os intervalos de tempo entre o inóculo do lactobacilo, o inóculo de *G. vaginalis* e o sacrifício, foram determinados com base nos estudos de Ryley & Mcgregor, (1986) e Hamad *et al.*, (2004), com modificações.

Para avaliação da capacidade de sobreviver no trato vaginal de fêmeas de camundongos gnotobióticos NIH, os animais receberam inóculos de *L. johnsonii* com e sem tratamento hormonal, como nos grupos teste (que passaram por desafio com *G. vaginalis*) e foram sacrificados também nos mesmos dias do grupo desafio.

A Figura 24 mostra as contagens (Log_{10} UFC/g de tecido vaginal) de *L. johnsonii*, isolado de tecidos vaginais de fêmeas de camundongos gnotobióticos, com e sem hormônio. Foi observado que o crescimento de lactobacilos em camundongos previamente inoculados com estrogênio foram mais elevado em relação ao grupo sem tratamento hormonal, onde não foi detectada colonização,

quando se encontrava monoinoculado, sendo este dado significativo ($p < 0,05$). Entretanto, percebemos que para um animal inoculado com hormônio, também não houve colonização.

Alguns estudos têm sugerido que modificações na microbiota podem ocorrer após o tratamento hormonal, como mencionado. Herthelius *et al.*, (1989) sugeriram que estrógeno em macacos e em humanos produzem mudanças que poderia favorecer a colonização por *Lactobacillus* spp. no trato vaginal.

Um estudo inovador (GORODESKI, 2005), determinou que os efeitos do estrogênio sobre a ecologia vaginal difere, dependendo da idade dos tecidos vaginais. Isto sugere que o estrogênio possa exercer efeitos diretamente sobre as células vaginais, através do incentivo de colonização pelas bactérias benéficas ou induzindo um pH ácido.

Segundo Ruiz *et al.*, (2000), pouco se conhece a respeito das implicações microbiológicas influenciadas por efeitos hormonais no trato urogenital. Segundo ele, diferentes características deste sítio, tais como renovação celular do epitélio vaginal, maturação e descamação celular podem ser influenciadas pelo envolvimento de hormônios na manutenção do ecossistema microbiano. Além disso, deve-se considerar a complexidade das interações existentes entre hospedeiro e microrganismos e entre espécies indígenas e exógenas, que podem exercer efeito de antagonismo ou sinergismo neste sítio. Assim, Ruiz *et al.*, (2000) perceberam que o número de *Lactobacillus* que colonizaram o trato urogenital aumentou com o tratamento hormonal. Neste trabalho, estes pesquisadores ainda obtiveram e quantificaram células epiteliais obtidas da vagina de camundongos, antes e após o tratamento e compararam com animais não tratados. Foi observado que, nos animais tratados, as células se modificaram completamente, e houve um aumento rápido do número de células epiteliais superficiais, enquanto as células intermediárias decresceram mais lentamente, refletindo o efeito do estradiol na diferenciação de células epiteliais vaginais.

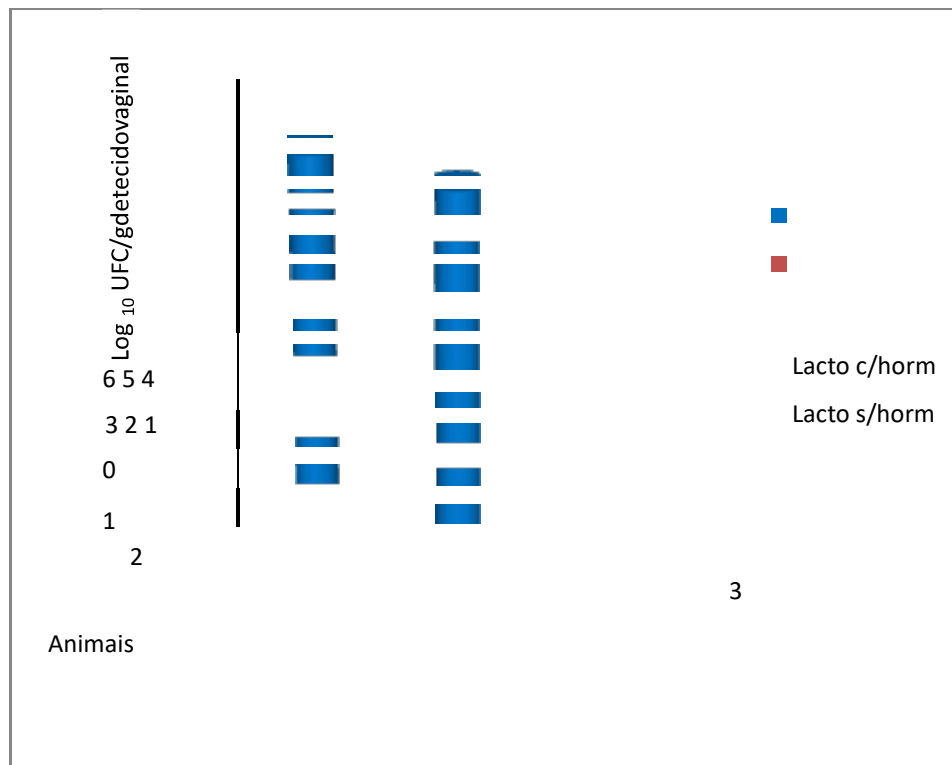


FIGURA 24- Contagem de *L. johnsonii* em camundongos gnotobióticos, com e sem hormônio.

A Figura 25 mostra as contagens (Log_{10} UFC/g de tecido vaginal) de *G. vaginalis*, isolados de tecidos vaginais de fêmeas de camundongos gnotobióticos, com e sem hormônio. Comparando-se estes grupos testados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa que pudesse sugerir que *G. vaginalis* colonize o trato vaginal sob influência hormonal. Contudo, vale ressaltar a importância de se realizar estudos de ampla magnitude, elevando o número de animais (n), para se confirmar a suposta influência hormonal quando se utilizam animais monoxênicos.

A literatura confirma uma situação semelhante descrita por Furr *et al.*, (1989), quando estudaram a colonização de *Mycoplasma hominis* em vagina de camundongos fêmeas isentos de germes. Baseado nos resultados deste estudo, os autores eliminaram qualquer mecanismo possível para indução da susceptibilidade a *M. hominis* devido a presença de estradiol, sugerindo que a susceptibilidade poderia ser devido a outros fatores tais como: diminuição da resposta imune local ou um efeito direto no epitélio vaginal, possivelmente por um aumento na proporção de receptores celulares. No entanto, parece que a

indução de susceptibilidade não é simplesmente uma questão de converter o ciclo reprodutivo para a fase estral, pois animais que não receberam estradiol e se encontravam nesta fase do ciclo, ainda não haviam sido colonizados por *M. hominis*.

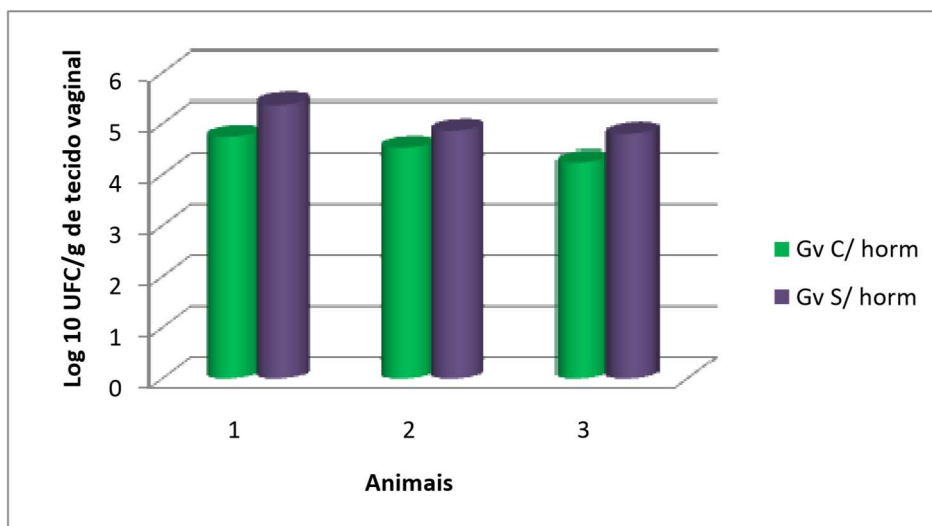


FIGURA 25- Contagem de *G.vaginalis* em camundongos gnotobióticos com e sem hormônio

A figura 26 mostra as contagens (LOG₁₀ UFC/g de tecido vaginal) de *L. johnsonii* isoladas de tecidos vaginais de fêmeas de camundongos gnotobióticos, no grupo desafiado com *G. vaginalis*, com ou sem hormônio.

Um resultado interessante foi obtido na contagem de *L. johnsonii* no grupo desafiado com *G. vaginalis* sem tratamento hormonal onde a colonização com o lactobacilo pode ser obtida ao contrário do grupo controle (Fig. 24), mesmo sendo em níveis mais baixos (3,03 log₁₀ UFC/g de tecido vaginal). Isto sugere que o desafio com *G. vaginalis* favoreceu de alguma maneira a colonização pelo lactobacilos na ausência do tratamento hormonal. Não achamos na literatura uma explicação para este fenômeno, senão na capacidade sinérgica da *G. vaginalis* descrita por nosso grupo numa publicação recente (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Neste artigo, mostramos que *G. vaginalis* é capaz de estimular o crescimento de *Peptostreptococcus anaerobius*, e este efeito poderia talvez existir também para *L. johnsonii*, neste caso.

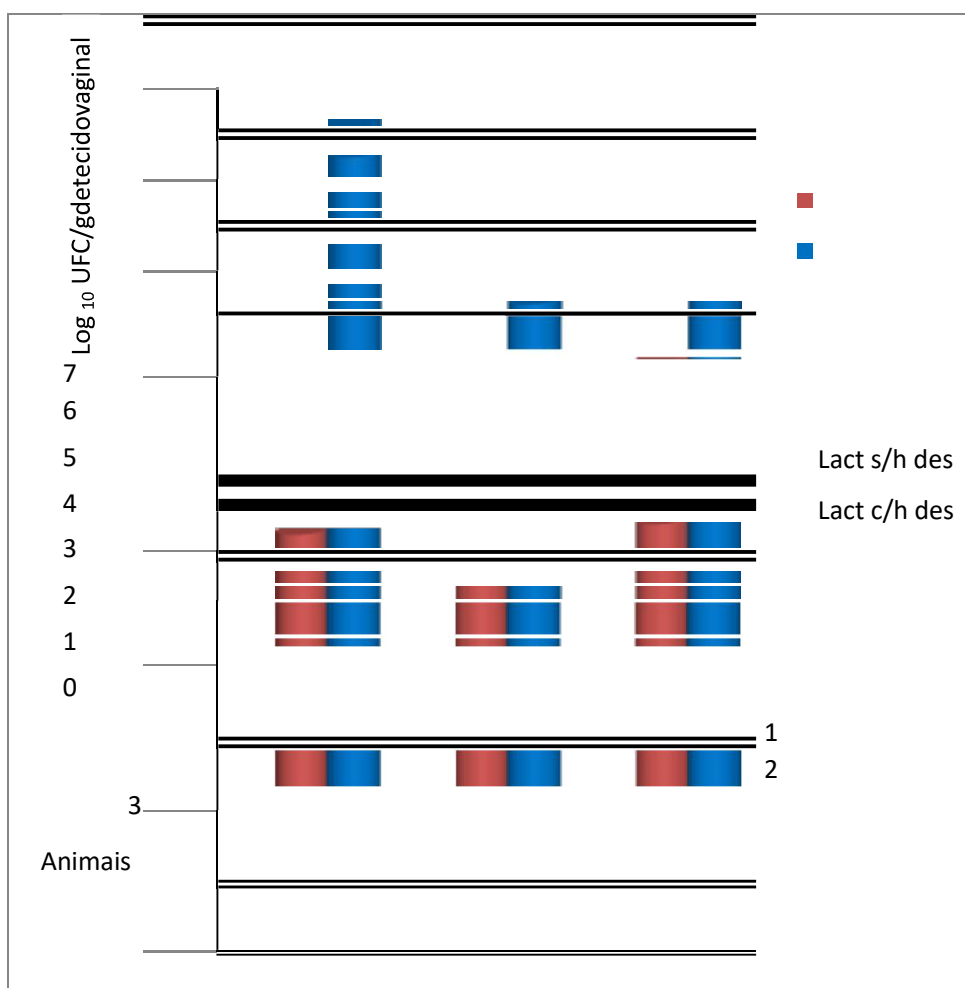


FIGURA 26- Contagem de *L. johnsonii* em camundongos gnotobióticos, no grupo desafiado, com e sem hormônio.

A Figura 27 mostra as contagens (LOG_{10} UFC/g de tecido vaginal) de *G. vaginalis* isolados de tecidos vaginais de fêmeas de camundongos gnotobióticos do grupo tratado com *L. johnsonii*, com e sem hormônio.

Houve uma diminuição na população vaginal de *G. vaginalis* quando este se encontrou associado com *Lactobacillus* spp. pois a média do controle (*G. vaginalis* sob tratamento hormonal) ($4,49 \log_{10}$ UFC/g de tecido vaginal) se encontrava maior do que no grupo tratado com *L. johnsonii* e hormônio ($3,34 \log_{10}$ UFC/g de tecido vaginal), sendo que estes valores não chegam a serem estatisticamente diferentes, mas apresentam uma forte tendência para uma diferença ($p = 0,078$). O mesmo fato ocorreu nos grupos sem tratamento hormonal, sendo que nos animais controle, os níveis vaginais de *G. vaginalis* ($5,01 \log_{10}$ UFC/g de tecido vaginal) foram maiores do que no grupo previamente

tratado com *L. johnsonii* (3,62 log₁₀ UFC/g de tecido vaginal), essa diferença sendo desta vez estatisticamente significativa (p=0,009).

A partir das discussões na literatura, é bastante claro agora que os lactobacilos desempenham um papel importante na inibição do crescimento, adesão e proliferação de microrganismos patogênicos, sendo considerada a sua capacidade de formar biofilmes sobre a camada mucosa da vagina e, assim, concorrer para os nutrientes e receptores com os microrganismos patogênicos (LEPARGNEUR E ROUSSEAU, 2002).

Para Garber *et al* (1991), um dos fatores de virulência do *T.vaginalis*, o fator de descamação celular (*cell detaching factor* – CDF), tem a atividade significativamente reduzida na presença de estradiol, o que sugere que sintomas durante a infecção podem ser regulados pela concentração vaginal de estrogênios.

Podemos questionar, neste trabalho se a presença *Lactobacillus* spp. em maior número compete por nicho com *G. vaginalis*. Estudos de Juarez Tomás *et al.*, (2003) e Zarate *et al.*, (2006, 2007) demonstraram que lactobacilos vaginais selecionados, interferiram com o aumento do crescimento populacional e com aderência nas células no epitélio vaginal de alguns patógenos geniturinários. Herthelius *et al.* (1989) encontrou taxas de *E.coli* (patógeno) maiores quando se encontrava exclusivamente sozinho do que quando associado com *Lactobacillus*.

Os dados aqui apresentados mostram a capacidade de colonização de *L johnsonii* e *G. vaginalis*, quando submetidos ou não ao tratamento hormonal. Podemos inferir que o hormônio atua como co-fator no crescimento populacional de *L johnsonii*, quando monoinoculado ou desafiado com *G. vaginalis*, sendo este dado significativo (p= 0,036), e corroborado por dados histológicos.

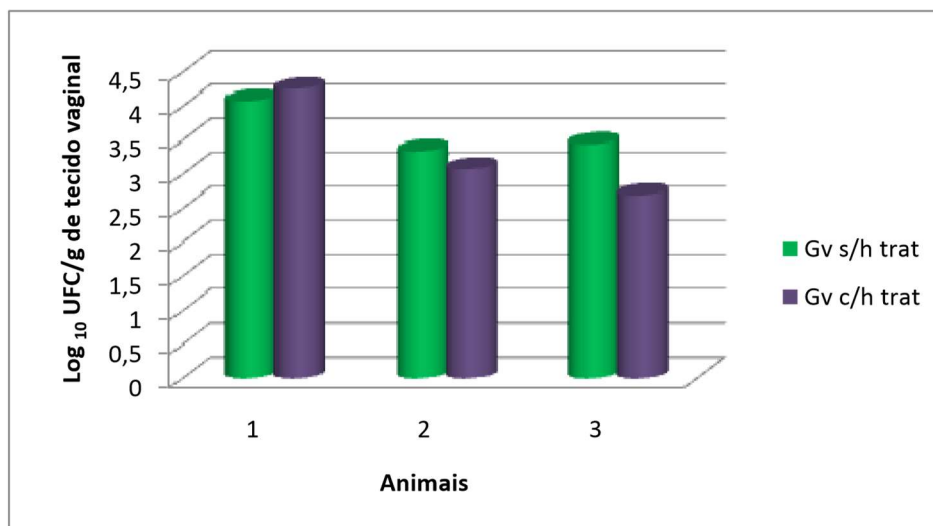


FIGURA 27- Contagem de *G. vaginalis* em camundongos gnotobióticos do grupo controle e no grupo tratado, com e sem hormônio.

Tabela 21 – Níveis vaginais médios (\log_{10} UFC/g de tecido vaginal) de *L. johnsonii* e *G. vaginalis* nos diferentes grupos de animais gnotobióticos.

	<i>L. johnsonii</i>		<i>G. vaginalis</i>	
	Controle	Desafiado	Controle	Tratado
Sem hormônio	0	3,03	5,01	3,62
Com hormônio	3,33	5,08	4,49	3,34

5.8 Anatomopatologia

Foram examinados cortes histológicos de vários níveis da parede vaginal e do colo uterino, incluindo o canal endocervical e a junção escamocolunar de todos os grupos examinados conforme mostrado nas figuras 28 até 36.

O aspecto normal em visão panorâmica da mucosa da ectocervice e do canal endocervical de animais isentos de germes esta representado na figura 28. Este corte foi realizado de um tecido vaginal de um animal controle, que não passou por qualquer teste. Verifica-se que o aspecto do tecido vaginal se encontra com aspecto preservado, não inflamado e não hiperemiado na parede,

com lâmina própria e epitélio de superfície preservados e uma junção escamocolunar (JEC) bem delimitada e sem interposição de área de metaplasia escamosa independentemente da região anatômica observada. Na figura 29, pode ser visualizado um detalhe representativo da JEC.

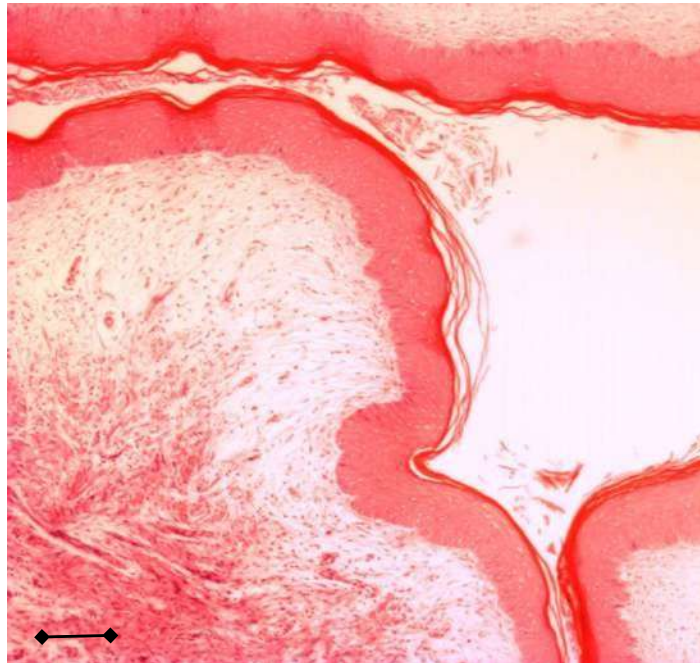


FIGURA 28- Corte histológico (4X) da mucosa vaginal de camundongos *germ free*. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra =100 µm.

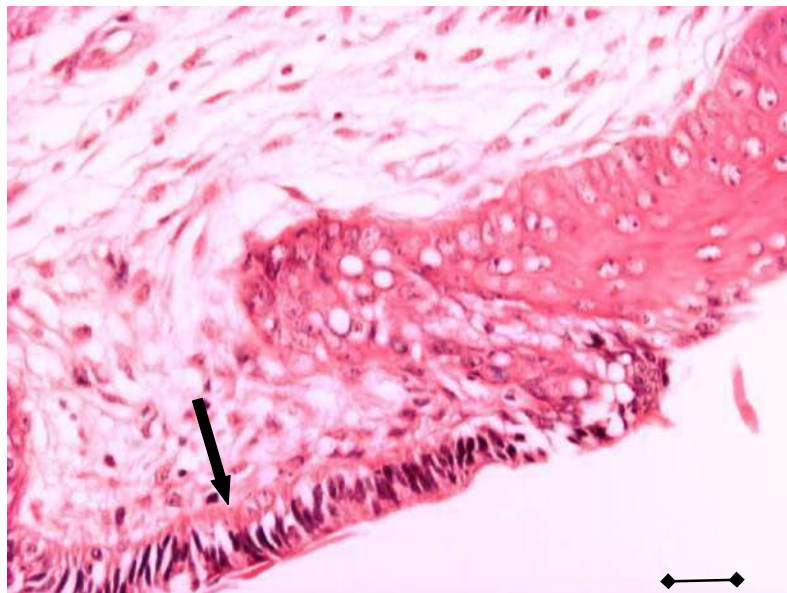


FIGURA 29- Corte histológico (4X) da mucosa vaginal de camundongos *germ free*. Detalhe representativo (seta) da junção escamocolunar (JEC). O epitélio escamoso ceratinizado da ectocervice ou próxima a transicao é bem estratificado, e sem infiltração inflamatória ou alterações degenerativas. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra =100 µm.

Amostras obtidas de animais infectados com *G. vaginalis* e inoculados com hormônios foram comparadas com amostras obtidas de animais infectados e que não receberam hormônio e os aspectos histopatológicos característicos estão representados das figuras 30 e 31.

No grupo inoculado com o hormônio, observam-se alterações histopatológicas do epitélio de superfície da ectocervice e presença de pequenas áreas de epitélio colunar endocervical intensamente reativas e com pseudoestratificação. O epitélio metaplásico e o epitélio escamoso apresentam alterações inflamatórias da lâmina própria e reatividade intensa com infiltração inflamatória mista de granulócitos e mononucleares, sendo os primeiros predominantemente eosinófilos. Os vasos da lâmina própria são reativos, com frequentes figuras de aderência e transmigração inflamatória, além de edema intersticial.

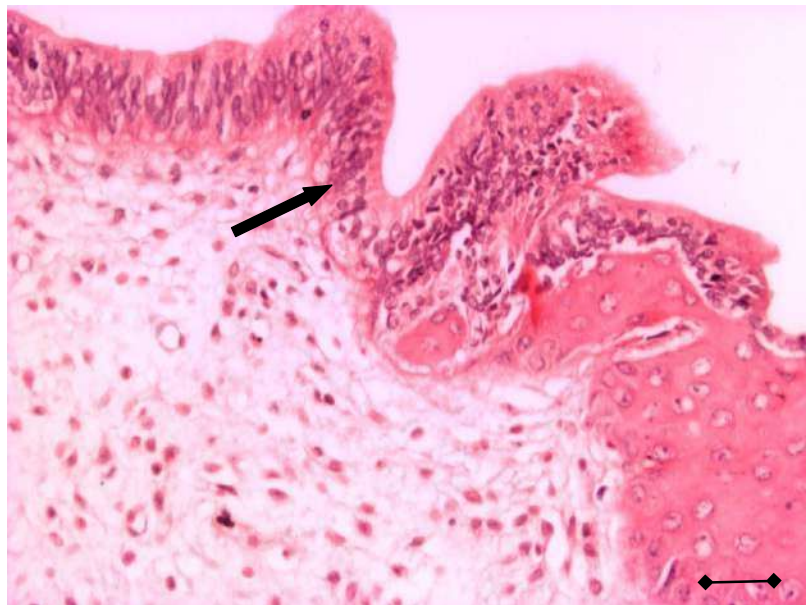


FIGURA 30- Corte histológico (40X) da mucosa vaginal de camundongos *germ free* infectados com *G. vaginalis*, tratados com hormônio. A seta indica alteração histopatológica do epitélio de superfície da ectocervice e presença de pequenas áreas de epitélio colunar endocervical intensamente reativas e com pseudoestratificação. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra =100 µm.

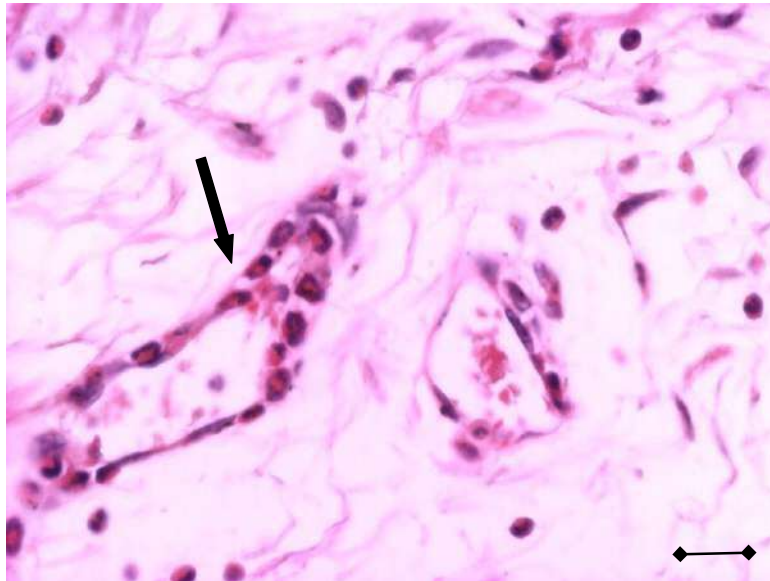


FIGURA 31- Corte histológico (40X) da mucosa vaginal de camundongos *isentos de germes* infectados com *G. vaginalis*, tratados com hormônio. A seta indica infiltração inflamatória de eosinófilos e vasos da lâmina própria reativos. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra = 100 μ m.

No grupo infectado sem o tratamento hormonal, os aspectos acima são intensificados, havendo focos de infiltrado inflamatório do mesmo tipo, com a exuberante presença dos eosinófilos na submucosa da ectocervice e da área subjacente a JEC. Nestes locais o epitélio metaplasico é imaturo e muito vacuolado, além de exocitose intensa (presença de células inflamatórias permeando as células do epitélio) e perda dos limites da membrana basal do epitélio (Figura 32). Há, também, presença de núcleos reativos em células em processo de ceratinização, caracterizando paraceratose. Embora não possa ser quantificado, há, qualitativamente maior intensidade de alterações reacionais do epitélio e inflamatórias da lâmina própria neste grupo, indicando que, o hormônio diminui os efeitos citados, em animais monoinoculados com *G. vaginalis*.

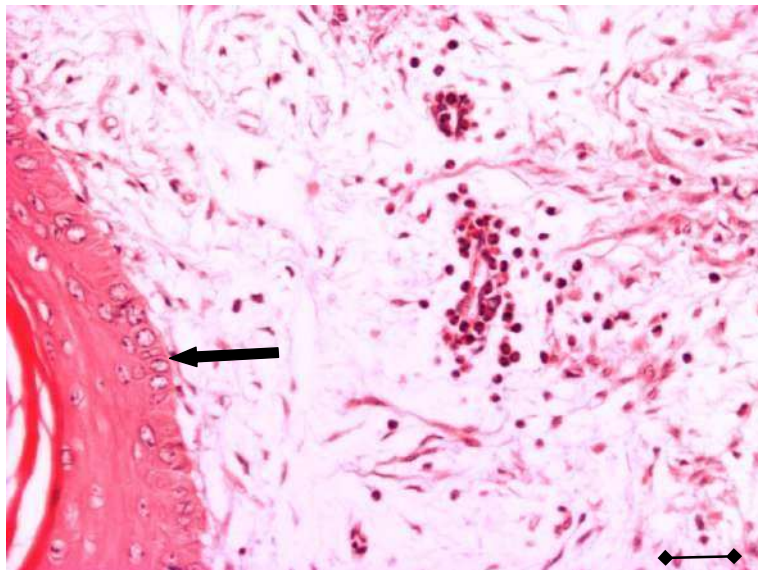


FIGURA 32- Corte histológico (4X) do ectocérnix de camundongos isentos de germes infectados com *G. vaginalis*, sem tratamento hormonal, mostrando a presença de células inflamatórias permeando as células do epitélio (seta). Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra = 100 μ m.

Nas Figuras 33 e 34, estão documentados, respectivamente, os aspectos relevantes dos grupos com e sem hormônio, respectivamente e tratados com *L. johnsonii* (controle). Nota-se que, em relação aos animais-controle não tratados com lactobacilos ambos os grupos aqui representados se caracterizam por presença de infiltrado inflamatório discreto. A região da JEC mostra transição direta de epitélio colunar para epitélio escamoso com ceratinização e maduro. No subgrupo sem hormônio, a JEC se apresenta mais reativa, mostrando epitélio endocervical atípico.

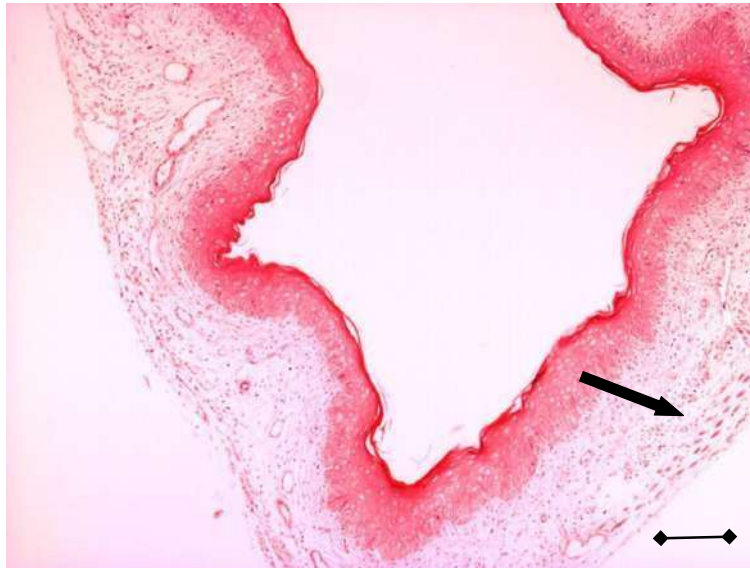


FIGURA 33- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos isentos de germes, que receberam *L. johnsonii*, com tratamento hormonal, mostrando a presença de infiltrado inflamatório discreto (seta). Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra =100 μ m.

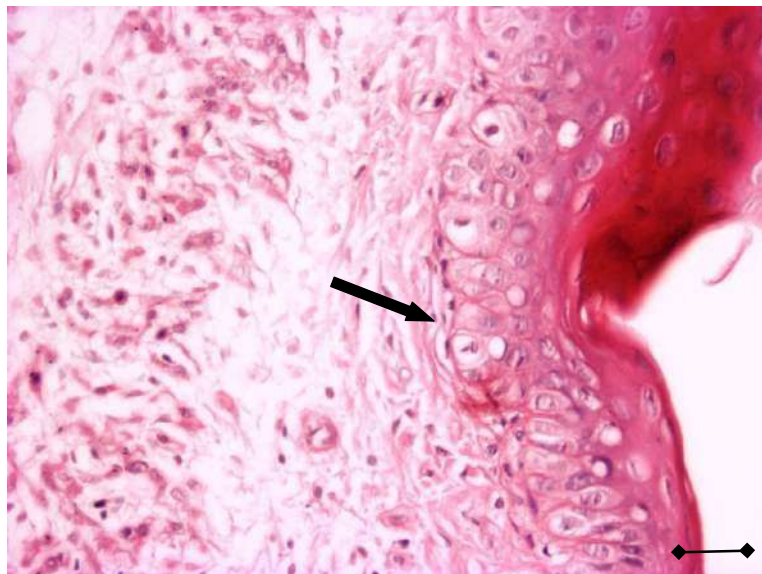


FIGURA 34- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos isentos de germes, que receberam *L. johnsonii*, sem tratamento hormonal, ilustrando a JEC mais reativa mostrando epitélio endocervical atípico (seta). Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra = 100 μ m.

Nas figuras 35 e 36, foram documentados os aspectos relevantes dos grupos tratados com *L.johnsonii* e infectados com *G. vaginalis*, com e sem efeito hormonal, respectivamente.

Nota-se que, em relação aos animais não tratados com lactobacilos, ambos os grupos aqui representados (com e sem hormônio) se caracterizam por presença de infiltrado inflamatório menos pronunciado e sem predominância eosinofílica tão marcante, principalmente no grupo tratado com hormônio. O edema é menos pronunciado. Também se nota que o epitélio escamoso se apresenta maduro, multiestratificado, com diferenciação e ceratinização de aspectos habituais, sem importantes atipias reacionais ou degeneração vacuolar significativa. No entanto, o aspecto da JEC e o epitélio endocervical não mostram diferenças em relação aos grupos não tratados com probióticos. A infecção com *G. vaginalis*, portanto resultou em alterações histológicas que foram menos pronunciadas quando havia a presença de *Lactobacillus*. O Quadro 4 resume as alterações histopatológicas aqui descritas.

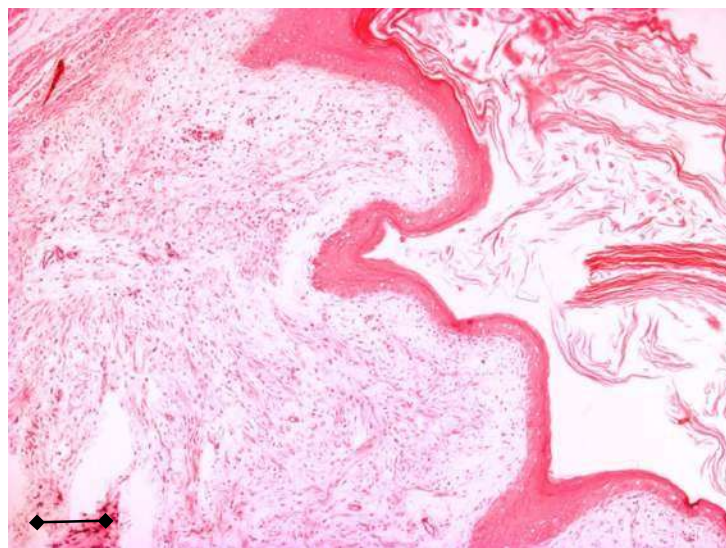


FIGURA 35- Corte histológico (4x) do ectocérnix de camundongos isentos de germes, que receberam *L. johnsonii* + *G. vaginalis*, com tratamento hormonal, ilustrando a presença de infiltrado inflamatório menos pronunciado e sem predominância eosinofílica tão marcada. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra =100 μ m.

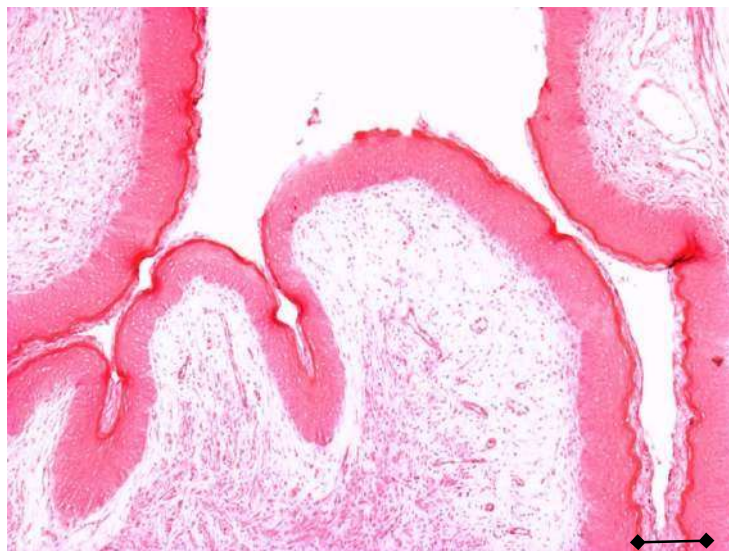


FIGURA 36- Corte histológico (4X) do ectocérvix de camundongos isentos de germes, que receberam *L. johnsonii* + *G. vaginalis*, sem tratamento hormonal, ilustrando a presença de infiltrado inflamatório menos pronunciado e sem predominância eosinofílica tão marcada. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Barra =100 µm.

QUADRO 4- Resumo dos dados histopatológicos (Escore) encontrados em cada grupo estudado.

Aspecto histopatológico	Grupos experimentais					
	Gv c/h	Gv s/h	Lacto c/h	Lacto s/h	Lacto + Gv c/h	Lacto + Gv s/h
Áreas reativas	++	+++				-
Alterações inflamatórias	++	+++	-	++	-	+
Presença de eosinófilos	++	++++	++ - + - - -			+
Edema intertissial	+	++	-	-	+	+

Escore: - ausência de efeitos significativos/ + pouco/ ++ intermediário/+++ Alto/ ++++ Extremamente elevado

6.0 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- No presente estudo, a determinação do pH vaginal acima de 4,5, o teste do KOH positivo, bem como o exame a fresco, forneceram dados importantes para o diagnóstico de VB.
- A VB foi mais frequente em mulheres negras, e que utilizavam roupas íntimas e sintéticas.
- Os dados encontrados indicam que a alta frequência de coitos vaginais pode favorecer o aparecimento de VB ou inverter o padrão normal da microbiota vaginal.
- A presença de microrganismos sugestivos de *G. vaginalis* nos espécimes vaginais da grande maioria das pacientes com sintomas de VB e sua baixa ocorrência nas pacientes assintomáticas sugere relação etiológica.
- *Lactobacillus spp.* foram encontrados com maior frequência na microbiota de mulheres saudáveis, com maior proporção de *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. johnsonii*.
- Os lactobacilos isolados de mulheres saudáveis apresentam maior capacidade antagonista e maior produção de peróxido de hidrogênio
- As diferenças significativas na recuperação de *Candida spp.* junto com *G. vaginalis* das pacientes sintomáticas em relação às participantes assintomáticas para VB sugere interação sinérgica no processo.
- A determinação das concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados para *G. vaginalis* mostrou um perfil de elevada sensibilidade das amostras, quando se avaliou a clindamicina, e de alta resistência ao metronidazol, seguido de tinidazol e secnidazol.
- O uso de uma linhagem de *Lactobacillus johnsonii* isolada de paciente saudável, que melhor expressava antagonismo e produtora de H₂O₂, como probiótico vaginal em animais isentos de germes, permitiu observar indícios de proteção contra a infecção experimental com *G. vaginalis*, evidenciados pelas lesões histopatológicas e pelos níveis populacionais.

- O potencial clínico da utilização de microrganismos probióticos demonstrado neste trabalho pode trazer benefícios reais ao tratamento de infecções vaginais, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer os exatos mecanismos envolvidos.

Em conclusão, os dados resumidos anteriormente, confirmaram a importância de certas espécies de *Lactobacillus* spp. no equilíbrio do ecossistema vaginal assim como de *G. vaginalis* na etiologia da VB, e, ainda permitiram selecionar uma linhagem de *L. johnsonii* com características probióticas promissoras demonstradas *in vitro* e *in vivo*.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAD, S.J.; LIMA, R.V.; SAWAN, Z.T.E.; SILVA, M.L.G.; SOUZA, M.A.H.; SALDANHA, J.C.; FALCO, V.A.A.; CUNHA, A.H.; MURTA, E.F.C.
Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical smears in four different decades. *São Paulo Méd J. Rev Paul Med.* 119, 200-5, 2001.
2. AL-MUSHRIF, S.; ELEY, A. & JONES, B.M. Inhibition of Chemotaxis by Organic Acides from Anaerobes may Prevent a Purulent Response in Bacterial Vaginosis. *J Med Microbiol*, v.49, n.11, p.1023-1030, 2000.
3. ALLEN-DAVIS, J.T.; BECK, A.; PARKER, R.; ELLIS, J.L.; POLLEY, D. Assessment of vulvovaginal complaints: accuracy of telephone triage and inoffice diagnosis. *Obstet Gynecol*, 99:18-22, 2002.
4. ALEIXO NETO, A. *et al.* A comparative study of the incidence of *Gardnerella vaginalis* in users of IUD and oral contraceptives. *J. Bras. Ginecol.*, São Paulo, v. 97, n. 2, 315-316, 1987.
5. ALI, D.; LACROIX, C.; THUAULT, D.; BOURGEOUIS, C. M.; SIMARD, R. E. Characterization of Diacetin B, a Bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *Diacylactis* UL720. *Can J Microbiol*, 41: 832-41, 1995.
6. AMIES, C. R. & GARABEDIAN, M. Bacteriology of human vaginitis. *Can. J. Public Health.* 54, 50-65, 1963.
7. AMSEL, R. *et all* Nonspecific Vaginitis diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations in *The Am. J. of Med.*, 74, 14-22, Janeiro, 1983.
8. ANTÔNIO, M.A.D.; HAWES, S.E.; HILLIER, S.L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *The J. Infect. Dis.*, 180, 1950-1956, 1999.
9. ANTONIO, M.A.; RABE, L.K.; HILLIER, S.L. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J. Infect Dis.*, 192:394-398, 2005.

10. ANUKAM, K.C.; OSAZUWA, E.O.; AHONKHAI, I.; REID, G. *Lactobacillus* vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sex. Transm. Dis.*, 33, 59-62, 2006.
11. ARAÚJO, R. A. C. Caracterização molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas durante a produção da cachaça artesanal mineira. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG. 77, 2003.
12. AROUTCHEVA, A.; GARITI D.; SIMON M.; SHOTT S.; FARO J.; SIMÕES, J. A. Defence factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*, 185: 375-9, 2001.
13. ASLIM, B.; KILIC, E. Some probiotic properties of vaginal Lactobacilli isolated from healthy women. *Jpn. J. Infect. Disease*, 59, 249- 253, 2006.
14. ATASHILI, J.; POOLE, C.; NDUMBE, P.M.; ADIMORA, A.A.; SMITH, J.S. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*, 22, 1493–1501, 2008.
15. AUSTIN, M.N.; MEYN, L.A.; HILLIER, S.L. Susceptibility of vaginal bacteria to metronidazole and tinidazole. *Anaerobe* 12; 227–230, 2006.
16. AVONTS, D.; SERCU, M.; HEYERICK, P.; VANDERMEEREN, I.; MEHEUS, A.; PIOT, P. Incidence of uncomplicated genital infectious in women using oral contraception or an intrauterine device: a prospective study. *Sex. Transm. Dis.*, 17, 23-29, 1999.
17. BAETEN J.M; NYANGE P.M; RICHARDSON B.A; LAVREYS L; CHOCHAN B.; MARTIN H.L, *et al.* Hormonal contraception and risk of sexually transmitted disease acquisition: results from a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 185,380-385, 2001.
18. BAINES, E.J. & MCFAZEDAN, J.A. The action of metronidazole on anaerobic bacilli and similar organisms. *Adv. Pharmacol.Chemother*, 18:223-272, 1981.

19. BANNATYNE, R.M.; SMITH, A.M. Recurrent Bacterial Vaginosis and metronidazole resistance in *Gardnerella vaginalis*. *Sex. Transm. Infect.*, v.74, 455-456, 1998.
20. BARCHET, S. A new look at vaginal discharges. *Obstet. Gynecol.* 40, 615-7, 1972.
21. BARDI, M.; MANENTI, G.; MATTIONI, D.; LASALA, L. Metronidazole for non specific vaginitis, *Lancet*, v.1, 1029,1980.
22. BARTOLOMEU, S.D.; FERMEPIN, M.R.; SAUKA, D.H.; TORRES, R.A. Prevalencia de microorganismos asociados a secreción genital femenina, Argentina. *Rev. Saúde Pública.* 36, 545-52, 2002.
23. BAUER, A.W.; PERRY, D.M.; KIRBY, W.M.M. Drug usage and antibiotic susceptibility of Staphylococci. *J.Amer.Med.Assoc.*, v.173, 475-480, 1960.
24. BEHBAKHT, K.; FRIEDMAN, J.; HEIMLER, I.; AROUTCHEVA, A.; SIMOES, J.; FARO, S. 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.
25. BIAGI, E.; VITALI, B.; PUGLIESE, C.; CANDELA, M.; DONDEERS, G.G.G, BRIGIDI, P. Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections: a real-time polymerase chain reaction study. *Eur J Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008.
26. BLACKWELL, A.L & BARLOW, D. Clinic diagnosis of the anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis). *Br.J.Vener.Dis.*, 58, 387-393, 1982.
27. BLACKWELL A.L.; FOX A.R.; PHILLIPS I.; BARLOW D. Anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis): clinical, microbiological, and therapeutic findings. *Lancet*, 17:1379-82, 1983.
28. BODNAR, L.M.; KROHN, M.A.; SIMHAN, H.N. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr.*139(6):1157-61, 2009.
29. BOOTH, S. J., JOHNSON, J. L., WILKINS, T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these

- strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, p. 718-724, 1977.
30. BOSKEY, E.R.; TELSCH, K.M.; WHALEY, K.J.; MOENCH, T.R.; CONE, R.A. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extend of vaginal acidification. *Infect. Immun.*, v. 67, 5170-5175, 1999.
 31. BOUSTOULLER, Y. L.; JOHNSON, A. P.; ROBINSON, D. T. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. *J. Med. Microbiol.* 23, 327-329, 1987.
 32. BRANCO, K.M.G.R, NARDI, R.M.D., MOREIRA, J.L.S., NUNES, A.C., FARIAS, L.M., NICOLI, J.R., CARVALHO, M.A.R. Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43:338-344, 2010.
 33. BRANDÃO, K.L.K.S. Avaliação clínico-microbiológica do ecossistema vaginal de pacientes assintomáticas e com Vaginose Bacteriana, com ênfase em *Gardnerella vaginalis*. Dissertação de Mestrado. 145, 2004.
 34. BRAY, G. *Haemophilus vaginalis*. *Acta Clin. Belg.* 18: 248-9, 1963.
 35. BRET, A.J & DEBRAY, M.C. Vaginites y *Haemophilus vaginalis*. *Presse Med.* 67, 1611-12, 1959.
 36. BREWER, J. I.; HALPERN, B.; THOMAS, G. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 74, 834-43, 1957.
 37. BROLAZO, E.M.; SIMÕES, J.A.; NADER, M.E.F.; TOMÁS, M.S.J.; GREGORACCI, G.B.; MARCONI, C. Prevalência e caracterização de espécies de lactobacilos vaginais em mulheres em idade reprodutiva sem vulvovaginites. *Rev Bras Ginecol Obstet.*;31(4):189-95, 2009.
 38. BROTMAN R.M.; GHANEM, K.G.; KHALIL G.; KLEBANOFF, M.A.; TAHA, E.T.; SCHARFSTEIN, D.O.; ZENILMAN, J.M. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis: a pilot study. *American J. of Obstetrics & Gynecology*, article in press 1-7, 2008.

39. BUMP, R.C.; ZUSPAN, F.P.; BUESCHING III, W.J. Bacterial vaginosis in virginal and sexually active adolescent females: Evidence against exclusive sexual transmission. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 158: 935-9, 1988.
40. BURMEISTER, R. E. & GARDNER, H. L. Vaginitis; diagnosis and treatment. *Portgard Med.*, 48: 159-63, 1970.
41. BURTON, J.P.; DIXON, J.L.; REID, G. Detection of *Bifidobacterium* species and *Gardnerella vaginalis* in the vagina using PCR and denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE). *Int. J. of Gin. and Obst.*, 81, 61-63, 2003.
42. CAILLOUETTE, J.C; SHARP C.F. JR; ZIMMERMAN G.J; ROY S. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Am J Obstet Gynecol*; 176:1270-7, 1997
43. CALZOLARI E.; MASCIANGELO R.; MILITE, V.; VERTERAMO, R. Bacterial vaginosis and contraceptive methods. *Int. J.Gynaecol. Obstet.* 70, 341346, 2000.
44. CAMARGO, R.P.S.; SIMÕES, J.A.; CECATTI, J.G. Vaginose bacteriana: um fator de risco a ser considerado durante a gravidez. *Go Atual*, Ano XI, 913, 2002.
45. CAMARGO, R.P.S., SIMÕES, J.A.; CECATTI, J.G.; NADER-ALVES, V.M.; FARO, S. Impact of treatment for bacterial vaginosis on prematurity among Brazilian pregnant women: a retrospective cohort study. *São Paulo Med. J.* 123, 108-112, 2005.
46. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals, v.1, 1993.
47. CARDOSO, M.S.R.; RAMOS, E.S.N.; CASTRO, A.D.P. *et al.* Prevalência de vaginites específicas e inespecíficas em mulheres na pós-menopausa. *RBAC*, v.32, n.4, p.275-277, 2000.
48. CARMONA, O.; SILVA, H.; ACOSTA, H. Vaginitis due to Gardnerella vaginalis: treatment with Tinidazole. *Curr.Ther.Res.*, v.33, 898-904, 1983.

49. CARVALHO, F. P. Avaliação in vitro e in vivo do potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus* provenientes do canal vaginal de mulheres saudáveis, contra *Candida* spp. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 8 2f, 2007.
50. CARVALHO, M.H.B.; BITTAR, R.E.; MAGANHA, P.P.A.S.; PEREIRA, S.V.; ZUGAIB, M.; Associação da Vaginose Bacteriana com o Parto Prematuro Espontâneo. *Rev.Bras. Ginecol. Obst.* 23, 529-533, 2001.
51. CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI JR, M.; LACHANCE, M.A.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; RUIVO, C.C.C.; ROSA, C.A. *Sympodiomyces attinorum* sp nov., a yeast speceies associated with nests of the leaf-cutting ant *atta sexdens*. *Int. J. Syst Evol. Microbiol.* n. 55, 497501, 2004.
52. CATLIN, B.W. *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, Clinical, Considerations, and controversies. *Clin. Micr. Rev.* 213-37, 1992.
53. CAUCI, S.; THORSEN, P.; SCHENDEL, E.D; BREMMELGAARD, A.; QUADRIFOGLIO, F.; GUASCHINO, S. Determination of Immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* Hemolysin, Sialidase, and Prolidase Activities in vaginal fluid: Implications for adverse pregnancy outcomes. *J. of Clin. Micr.*, 41, 435-438, 2003.
54. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment Guidelines. *MMWR Recomm Rep.*, 51, 1-78, 2002.
55. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.*, 2009.
56. CHEN, K.C.S.; FORSYTH, P.S.; BUCHANAN, T.M.; HOLMES, K.K. Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginitis. *J.Clin.Invest.* 63: 828-35, 1979.
57. CHEN, J.Y.; TIAN, H.; BEIGI, R.H. Treatment Considerations for Bacterial Vaginosis and the Risk of Recurrence. *Journal of women's health.* 18: 12, 1997-2004, 2009.

58. CHIAFFARINO, F.; PARAZZINI, F.; BESI, P.; LAVEZZARI, M. Risk factors for bacterial vaginosis. *Eur. J. of Obst. & Gynecol. and Reprod. Biol.*, 117, 222–226, 2004.
59. CHIN, G.J.; MARX, J. Resistance to antibiotics. *Science*. V. 264, 359, 1994.
60. CHOWDHURY, M.N.H., JABBAR, F.A.; KAMBAL, A.M. Isolation of *Gardnerella vaginalis* from high vaginal swabs. *Trop. Geogr. Med.*, 37, 328-33, 1985.
61. CHOWDHURY, M.N.H., *Gardnerella vaginalis* associated vaginitis: a Review. *Trop. Geogr. Med.*, 38, 335-43, 1986.
62. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, 7th ed., CLSI document M11-A7. Wayne, PA: CLSI; 2007.
63. COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. *Science*, v.257, p. 1050-1055, 1992.
64. COSTELLO, D.C.; WANGEL, A.M.; HOFFMAN, I.F.; CANNER, J.K.; LULE, G.S.; LMA, V.M.; LIOMBA, N.G.; DALLABERTTA, G.A. Validation of the WHO diagnostic algorithm and development of an alternative scoring system for the management of women presenting with vaginal discharge in Malawi. *Sex. Transm. Infect.*, 74, 550-558, 2001.
65. CRISWELL, B. S.; STENBACK, W. A.; GARDNER, H. I. Fine Structure of *Haemophilus vaginalis*. *J. Bacteriol.* ,109, 930-2, 1972.
66. DATTANNI, I.M.; GERKEN, A.; EVANS, B.A. Etiology and management of non-specific vaginitis. *Br.J.Vener.Dis.*, 58, 32-35. 1982.
67. DAVIDSON, A.J.L & LAYTON, K.B. Vaginitis and *Haemophilus vaginalis*. *Med. J.Agosto*, 1, 757-69, 1968.
68. DAWSON, S.G. & HARRIS, J.R.W. Venereal disease, *Gardnerella vaginalis* and nonspecific vaginitis. *Br .J. Hosp. Med.*, 29, 28-37, 1983.
69. DE BARROS LOPES, M.A.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE,

- P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol.* v. 62, n. 12, 4514-4520, 1996.
70. DE BARROS LOPES, M.A.; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J Syst Bacteriol.* v. 48, n. 1, 279-286, 1998.
71. DELAHA, E.C.; CURTIN, J.A.; STEVENS, G.; OSBORNE, H.J. Incidence and significance of *Haemophilus vaginalis* in nonspecific vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol* 89, 996-9, 1964.
72. DELANEY, M.L; ONDERDONK, A.B. Nugent score related to vaginal culture in pregnant women. *Obstet Gynecol* 98, 79-84, 2001.
73. DEMBA, E.; MORISON, L.; SCHIN; VAN DER LOEF, M.S.; AWASANA, A.A.; GOODING, E.; BAILEY, R.; MAYAUD, P.; WEST, B. Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge in the Gambia, west Africa. *BMC Infect. Dis.*, 5, 1-12, 2005.
74. DEMING, J.E. *Haemophilus influenzae* vaginitis. *Northwest Med.*, vol.54: p. 992-3, 1955.
75. DEMIREZEN, S. Review of Cytologic Criteria of Bacterial Vaginosis: Examination of 2,841 Papanicolaou-stained Vaginal Smears. *Diagn Cytophatol* , v.29, n.3, p.156-159, 2003.
76. DEVILLARD, E.; BURTON, J.P.; HAMMOND, J.A.; LAM, D.; REID, G. Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Eur.J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, v. 117, 76-81, 2004.
77. DIAZ, F.; VASQUEZ, M.E.; ESCOBAR, S.; GALEANO, A.; LONDONO, M.; DELAEZ, M; VILLA, M.; MONTOYA F. Vaginitis por *Gardnerella vaginalis* en un servicio medico universitario. *Acta. Med. Colomb.*10, 197-203, 1985.
78. DINIZ, C.G.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.

Host-bacteria-drug relationships: An overview of metronidazole and the

- Bacteroides fragilis* group. Res. Adv. Antim. Agents & Chem., 2: 1-9, 2001.
79. DODSON, M.G.; FRIEDRICH, JR. E.G. Psychosomatic vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*, 51(Suppl), 1978.
 80. DONDERS, G. G., Bacterial vaginosis during pregnancy: screen and treat? *Eur. J. of Obst. & Gyn. and Repr. Biol.* 83 1-4, 1999.
 81. DORIA, R.F.F.L. Seguimento de usuárias de dispositivo Intra-uterino com e sem vaginose bacteriana. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, 1-45, 2003.
 82. DUERDEN, B.I.; JONES, B.M.; GEARY, I.; LEE, M.E. Comparison of the In Vitro Activities of Fenticonazole, Other Imidazoles, Metronidazole, and Tetracycline against Organisms Associated with Bacterial Vaginosis and Skin Infections. *Antim. Agents and Chem.*, 970-972, 33: 6, 1989.
 83. DUNKELBERG, W. E. Jr.; SKAGGS, R.; KELLOG, D. S. J. Method for isolation and identification of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). *Appl. Microbiol.*, 19, 47-52, 1970.
 84. EDMUNDS, P. N. The biochemical serological and haemagglutinating reactions of *Haemophilus vaginalis*. *J. Pathol. Bacteriol.* 83, 411-22, 1962.
 85. EGAN, M.E.; LIPSKY, M.S. Problem oriented diagnosis: diagnosis of vaginitis. *Am Fam Physician*, 62: 1095-104, 2000.
 86. ELEUTÉRIO, J. J.; CAVALCANTE, D. I. M. Contagem de morfotipos de *Mobiluncus* sp e concentração de leucócitos em esfregaços vaginais de pacientes com vaginose bacteriana. *RBGO.*, 26, 221-225, 2004.
 87. ERKKOLS, R.; JARVINEN, H.; TERHO, P.; MERURMAN, O. Microbial flora in women showing symptoms of nonspecific vaginosis: Applicability of KOH test for diagnosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 40 (Suppl): 59 – 63, 1983.
 88. ESCHEMBACH, D.A. Vaginal infection. *Clin Obst.Gyn.* 26: 186-202 1983.
 89. ESCHEMBACH, D.A. History and review of bacterial vaginosis. *Am. J. Obst. Gyn.*, 169, 441-45, 1993.

90. ESCHEMBACH, D.A.; DAVICK, P.R.; WILLIAMS, B.L.; KLEBANOFF, S.J.; YOUNG- SMITH, K.; CRITCHLOW, C.M.; HOLMES, K.K. Prevalence of hydrogen peroxide- producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. of Clin. Micr.* 27, 251-256, 1989.
91. ESPINOSA, I.; LORENZO, M. RIVÉRON Y.; ÁLVAREZ, E.; VILLOCH, A. Evaluación de diferentes medios líquidos para el cultivo de *Gardnerella vaginalis* y caracterización del perfil de proteína por electroforesis PAGESDS. *Rev.Cubana Méd. Trop.* 55, 69-75, 2003.
92. FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 7, p. 657-664, 2007.
93. FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; DAMACENO, C. A. V.; CISALPINO, E. Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolados de lesões periodontais humanas. *Rev. Microbiol.*, 17, 296-306, 1986.
94. FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; DAMACENO, C. A. V.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA E. C. Bacteriocin like activity of *Bacteroides fragilis* Group isolated from marmosets. *Res. Microbiol.* 143: 151-9, 1992.
95. FEDORAK, R.N. Naturally occurring and experimental models of inflammatory bowel disease, p. 71-95. 1995. In KIRSTNER, J.B.; SHORTER, R.G. (ed.). *Inflammatory Bowel Disease*, 4th, ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
96. FEINBERG A.P.; VOLGESTEIN B. A technique for radiolabeling and side effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. *Analytical Biochemistry.* 132: 6 – 13; 1983.
97. FERRAZ, L.R. *et al.* Follow-up of users of intrauterine device with and without bacterial vaginosis and other cervicovaginal infections. *Contracept.*, New York, v. 68,n. 2, 105-109, 2003.
98. FERRER J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet*; 71 Suppl 1:S21-7, 2000.
99. 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, *Clinical Infectious Diseases* 47:1426–1435, 2008.

100. FIDEL, Jr., P.L.; LYNCH, M.E.; SOBEL, J.D. *Candida*-specific cell intermediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 1990-1995, 1993a.
101. FIDEL, P.L.; CUTRIGHT, J.L.; TAIT, L.; SOBEL, J.D. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *The Journal of Infec. Dises.* 425-431, 1996.
102. FIDEL, P.L.; CUTRIGHT, J.L.; STEELE, C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, 68, 651657, 2000.
103. FIDEL, P. The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal models
International Reviews of Immunology, 1563-5244, 21:515 – 548, 2002.
104. FILHO-LIMA, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteridis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice. *J. of Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 365-370, 2000.
105. FISCELLA, K.; KLEBANOFF, M. A. Are racial differences in pH explained by vaginal flora? *Am. J. Obst. Gynec.*, 191, 747-750, 2004.
106. FONSECA, T.M.V.; CESAR, J.A.; HACKENHAAR, A.A.; ULMI, E.F.; NEUMANN, N.A. Corrimento vaginal referido entre gestantes em localidade urbana no Sul do Brasil: prevalência e fatores associados. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 24 (3), 558-566, 2008.
107. FRANCISCO, W. *Gardnerella vaginalis* no trato Genito-urinário em São Paulo, capital: Aspectos epidemiológicos e de Diagnóstico Laboratorial. 138p. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia), São Paulo, 1990.

108. FRANCO, B.E.; MARTINEZ, M.A.; RODRIGUEZ, M.A.S.; WETHEIRMER, A.I. The determinants of the antibiotic resistance Process. *Infection and Drug Resistance*. 2 1–11, 2009.
109. FREDERICKS, D.N.; FIEDLER, T.L; THOMAS, K.K.; OAKLEY, B.B.; MARRAZZO, J.M. Target PCR for detection of bacteria associated with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* V 45 n 10, 3270-3276, 2007.
110. FREDERICKS, D.N.; FIEDLER, T.L; MARRAZZO, J.M. Molecular Identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med*, 353, 1899-911, 2005.
111. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. FIOCRUZ. CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ. “Curso de Manipulação de Animais de Laboratório”. Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, 2005.
112. GALHARDO, C.L; BARACAT, E.C; HAIDAR, M.A. *et al.* Flora Vaginal e Climatério. *Femina*, v.29, n.4, p.241-244, 2001.
113. GARBER, G.A.; LEMCHUK-FAVEL, L.T.; ROUSSEAU, G. Effect of betaestradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol*; 29: 1847-1849, 1991.
114. GARDNER, H. L. *Haemophilus vaginalis* vaginitis after twenty-five years. *Am. J. Obst. Gyn.* 137, 385-391, 1980.
115. GARDNER, H. L. & DUKES, C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified “nonspecific” vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 69, 962-976, 1955.
116. GEISLER, W.M.; MVENGLARIK S.Y.; SCHWEBKE, J.R. Vaginal leucocyte counts in women with bacterial vaginosis: relation to vaginal and cervical infections. *Sexually Transmitted Infections*, 80, 401-405, 2004.
117. GELBER, S.E.; AGUILAR, J.L.; LEWIS, K.L & RATNER, A.J. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human- specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *J. Bacteriol.* 190, 3896-3903, 2008.
118. GIRALDO, P.C.; RIBEIRO FILHO, A.D.; SIMÕES, J.A.; NOWKONSKY, A.F.;ALMEIDA, V.C.; CAMPAGNARO, A.L. Dificuldades na interpretação clínica das vulvovaginites. *Bol Inf Union*, 19: 12-7, 1994.

119. GIRALDO, P.C.; RIBEIRO FILHO, A.D. LINHARES, I.; WITKIN, S.S. Detection of the human 70-kD and 60- kD heat shock proteins in the vagina: relation to microbial flora, vaginal pH, and method of contraception *Infect Dis Obstet Gynecol.*7(1-2), 23-25,1999.
120. GIRALDO, P.C.; AMARAL, R.L.G; GONÇALVES, A.K.; VICENTINI, N.; MARTINS, C.H.; GIRALDO, H., FACHINI, A.M. Influência da frequência de coitos vaginais e da prática de duchas higiênicas sobre o equilíbrio da microbiota vaginal. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 27 (5), 2005.
121. GIRALDO, P.C.; PASSOS, M.R.L.; BRAVO, R.; VARELLA, R.Q.; CAMPOS, W.N.A.; AMARAL, R. L.G; MARUSSI, E. O freqüente desafio do entendimento e do manuseio da Vaginose Bacteriana. *J. Bras. doenças sex transm.*; 19(2), 84-91, 2007.
122. GOLDSTEIN, E.J.C.; CITROM, D.M.; CHERUBIN, C.E.; HILLIER, S.L. Comparative susceptibility of anaerobic bacteria to meropenem, imipenem, piperacilina, ceftazidime, ampicillin/sulbactam, clindamycin and metronidazole. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31: 363-372, 1993.
123. GOMES, F. C. O.; GUERRA, J. B.; NEVES, M. J.; CORRÊA, S. R.; MOREIRA, E. S. A.; ROSA, C. A. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Can. J. Microbiol.*, v.48, n.5, 399-406, 2002.
124. GORBACH S.L.; GOLDIN B.R. The intestinal microflora and the colon cancer connection. *Rev. Infect. Dis.*, v. 12 (sup.12), p. S252-S261, 1990.
125. GORDON H. A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol. Rev.*, v. 35, p. 390-429, 1971.
126. GORODESKI, G.I.; HOPFER, U.; LIU, C.C.; MARGLES, E.
Estrogen acidifies vaginal pH by up-regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells
Endocrinology, 146: 816 - 824, 2005.
127. GREENWOOD, J. R.; PICKETT, M.J. Transfer of *Haemophilus vaginalis*,

- Gardner and Dukes, to new genus, *Gardnerella*: *G.vaginalis* (Gardner and Dukes). *Int.J.System.Bacteriol.* 30, 170-8, 1980.
128. GREENWOOD, J. R. Current Taxonomic Status of *Gardnerella vaginalis*. *Scand J. Infect. Dis.*, 40 (Suppl): 11-14, 1983.
 129. GUSTAFSSON, B.E. & COATES, M. E. The germ-free animal in biomedical research. *Laboratory animal LTD*, London, p.442, 1984.
 130. GUSTAFSSON, B.E.; MIDTVEDT, T.; STRANDBERG, K. Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germ-free rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 5, p. 309-314, 1970.
 131. GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HANGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 33, n.2, 106-111, 2001.
 132. GUERREIRO, H.M.N.; HAGGE, S.; CONCEICAO F.J.L.; BARBOSA H.S. Vaginite por *Gardnerella vaginalis* – Prevalência e avaliação de metodologia para seu diagnóstico. *Rev.Micr.* , 18, 305 – 310, 1987.
 133. HALBE, H.W.; RAMOS, L. O. & SAAC, R.V.C. Corrimento Vaginal. In: HALBE, H.W. Tratado de Ginecologia, 3a ed. São Paulo: Ed. Rocca, p. 612-618, 2000.
 134. HAMAD, M.; ABUELTEEN, K.H.; GHALEB, M. Estrogen-dependent induction of persistent vaginal candidosis in naïve mice. *Mycoses.*, v.47, 304-309, 2004.
 135. HANCOCK, R.E.W. The end of an era? *Nature Reviews Drug Discovery*. doi:10.1038/nrd2223. Published online, 2006.
 136. HARPER, J. J. & DAVIS, G. H. G. Cell wall analysis of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 48-50, 1982.
 137. HAY PE. Recurrent bacterial vaginosis. *Derm.Clin*, xii-xiii.16:769-73, 1998.
 138. HAY, P.E.; LAMONT, R.F.; TAYLOR-ROBINSON, D.; MORGAN, D.J.; ISON, C.; PEARSON, J. Abnormal bacterial colonization of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *Br. Med. J.*

- 308, 295-298, 1994.
139. HAWES, S.E.; HILLIER, S.L.; BENEDETTI, C.E.; STEVENS, C.E.; KOUSTY, L.A.; WOLNER-HANSEN, P.; HOLMES, K.K. Hydrogen peroxide- producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J. Infect. Dis.*, 174, 1058-1063, 1996.
 140. HELTAI, A. & TALEGHANY, P. Nonspecific vaginal infections. A critical evaluation of *Haemophilus vaginalis*. *Am. J. Obst. Gyn.*, 77, 144-8, 1959.
 141. HILLIER, S.L.; KROHN, M.A.; KLEABANOFF, S.J.; ESCHENBACH, D.A. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet. Gynecol.*, 79, 369-373, 1992.
 142. HILLIER, S.L. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J.Obstet Gynecol.*, 169, 455-9. 1993.
 143. HILLIER S.L; NUGENT R.P; ESCHENBACH D.A *et. al.*; Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *N Engl J Med*, 333:1737-42, 1995.
 144. HILLIER, S.L. Improving the diagnosis of vaginal complaints. *Optimal diagnosis of vaginitis*; 1; 6-11, 1998.
 145. HILLIER, S.L.; AUSTIN, M.N.; MEYN, L.A.; Susceptibility of vaginal bacteria to Metronidazole and Tinidazole. *Anaerobe* 12, 227–230, 2006.
 146. HILLIER, S.L.; LAU, R.J. Vaginal Microflora in Postmenopausal Women Who Have Not Received Estrogen Replacement Therapy. *Clin Infect Dis*, v.25,suppl.2, p.S123-S126, 1997.
 147. HOLZMAN, C.; LEVENTHAL, J.M.; QIU,H.; JONES, N.M.; WANG, J. Factors linked to bacterial vaginosis in non-pregnant women. *Am. J. Public Health*, v. 91, 1664-1670, 2001.
 148. HOOTON, T.M. Vaginal microecology and the pathogenesis of the urinary tract.1998.http://www.old-helborn-university.de/literature/books/OHUni_book_12_article_5.pdf

149. HOUFFLIN-DEBARGE V.; COLLINET P.; VINATIER D, *et al.* Value of human papillomavirus testing after colonization by loop electrosurgical excision for highgrade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol*; 90, 587-592, 2003.
150. HUBRECHTS, J.M.H.; VANHOOF, R.L.; DAEMS, A.; BUTZLER, J.P. Susceptibility of *Gardnerella vaginalis* to thiamphenicol: clinical experience with nonspecific vaginitis. *Sex. Transm. Dis.*, v.11 (Sppl), 456-459, 1984.
151. HUTCHINSON, K.B.; KIP, K.E.; NESS,R.B. Condom Use and its Association With Bacterial Vaginosis and Bacterial Vaginosis Associated Vaginal Microflora. *Epidemiology*, 18(6):702-708, 2007.
152. HYMAN, R.W.; FUKUSHIMA, M.; DIAMOND, L.; KUMM, J.; GIUDICE, L.C.; DAVIS, R.W. Microbes on the human vaginal epithelium *PNAS*. 102, 7952-7957, 2005.
153. ISON, C.A.; EASMON, C.S.F.; DAWSON, S.G.; SOUTHERTON, G.; HARRIS, J. W. R. Non volatile fatty acids in the diagnosis of non – specific vaginitis. *J. Clin. Pathol.* , 36, 1367 - 70, 1983.
154. JACYNTO, C. VULVOVAGINITES. Disponível em http://www.jacyntho.com.br/php/artigos/FEBRASGO_2010.pdf. Acessado em 27/07/2010.
155. JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59(2): 171-200, 1995.
156. JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITH, A.; WOLLMAN, E. Definition de quelques terme relatifs a la lysogénie. *Ann Inst Pasteur*, 84: 222-4 1953.
157. JAQUIERY, A.; STYLIANOPOULOS, A.; HOGG, G.; GROVER, S. Vulvovaginitis: clinical features, aetiology, and microbiology of the genital tract. *Arch. Dis.Child.*, v.81, 64-67, 1999.
158. JEREMIAS, J.; MOCKEL, S.; WITKIN, S.S. Human sêmen induces interleukin 10 and 70 kDa heat shock protein gene transcription and inhibits interferongamma messenger RNA production in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Hum Reprod*. 4(11)1084-1088. 1998;

159. JOHNSON, A.P. & DAVIES, H.A. Demonstration by electron microscopy of pili on *Gardnerella vaginalis*. *Br.J.Vener.Dis.*, 60, 396 - 397, 1984.
160. JONES, B.M.; BHATTACHARYYA, M.N. In vitro Susceptibility of *Gardnerella vaginalis* to high concentrations of sulfonamide compounds. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.19, 666-667, 1981.
161. JONES, B.M.; KINGHORN, G.R.; GEARY, I. In vitro susceptibility of *Gardnerella vaginalis* and Bacteroides organism, associated with nonspecific vaginitis, to sulfonamide preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.21, 870-872, 1982.
162. JOSEY, W.E.; SCHWEBECK, J.E. The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment. *International Journal of STD & AIDS*; 19: 152–154, 2008.
163. JUAREZ TOMÁS, M.S.; OCANA, V.S.; WIESE, B.; NADER-MACIAS. M.E. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journ. Of Med.Microb.*, 52:12, 117-1124, 2003.
164. JUNIOR, J.E. & CAVALCANTE, D.I.M. Contagem de Morfotipos de *Mobiluncus* sp e Concentração de Leucócitos em Esfregaços Vaginais de Pacientes com Vaginose Bacteriana. *RBGO*, v.26, n.3, p.221-225, 2004.
165. PASTEUR L.; JOUBERT J. Charbon et septicemic. *Compt Rend Acad Sci*. 85:101-115. 1877.
166. KAPER, J.B.; SPERANDIO, V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infec. Immn.*, v.73, 3157-3209, 2005.
167. KAUFMAN, R. H. The origin and diagnosis of “nonspecific vaginitis”. *N. Engl .J. Med.*, 303, 637-8, 1980.
168. KEANE, F.E.A.; ISON, C.A.; TAYLOR-ROBSISON, D. A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *Int. J. STD and AIDS*, 8, 489494, 1997.
169. KEKKI, M.; KURKI, T.; KOTOMÄKI, T.; SINTONEN, H.; PAVONEN, J. Cost-effectiveness of screening and treatment for bacterial vaginosis in early

- pregnancy among women at low risk for preterm birth. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 83: 27-36, 2004.
170. KHARSANY AB.; HOOSEN AA.; MOODLEY J.; BAGARATEE J.; GOUWS E. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intraepithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Med.* 69:357-360, 1993.
171. KLEBANOFF, S.J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. *J. Exp. Med.*, v. 126, 1063-1076, 1967.
172. KLEBANOFF, M.A.; SCHWEBKE, J.R.; ZHANG, J.; NANSEL, T.R.; YU, K.F.; ANDREWS, W.W. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 104(2):267-72, 2004.
173. KOUMANS, E.H.; MARKOWITZ, L.E.; HOGAN, V. Indications for therapy and treatment recommendations for bacterial vaginosis in nonpregnant and pregnant women: a synthesis of data. *Clin. Infect. Dis.*, 35 (Suppl 2), 152-172, 2002.
174. KUCH, D.J. The effect of hydrogen peroxide-producing Lactobacilli on wild type and catalase-deficient *Neisseria gonorrhoeae* in a murine model of gonococcal genital tract infection. Dissertação de mestrado. 102 p. 2002
175. KOOP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. of the Am. Diet. Assoc.*, v. 101, n. 2, p. 229-238, 2001.
176. KUCH, D.J. The effect of hydrogen peroxide-producing lactobacilli on wild type and catalase-deficient *Neisseria gonorrhoeae* in a murine model of gonococcal tract infection. Dissertação de Mestrado. Programa de Biologia Celular e Molecular. Uniformed Services University of the Health Sciences. 102p. 2002.
177. KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeast: A taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1035, 1998.
178. LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S.F.

- Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can. J. Microbiol.* v.45, n.2. 172-177, 1999.
179. LAGO, R.F.; SIMOES, J.A.; BAHAMONDES, L.; CAMARGO,R.P.S.; PERROTTI, M.; MONTEIRO, I. Follow-up of users of intrauterine device with and without bacterial vaginosis and other cervicovaginal infectious. *Contraception*, 68, 105-109, 2003.
180. LAPAGE, S. P. *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes 1955, 963. In: BERGEY'S Manual of systematic bacteriology. Eds. N. R. Krieg., J. G. Holt. Baltimore, *Williams & Wilkins*, 1974.
181. LAPAGE, S. P. *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes 1955, 963. In: BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. 8ª ed. Eds. N. R. Krieg., J. G. Holt. Baltimore, *Williams & Wilkins*, 368-70, 1980.
182. LAPAGE, S. P. *Gardnerella vaginalis*. In: BERGEY'S Manual of systematic bacteriology. 9ª ed. Eds. N. R. Krieg., J. G. Holt. Baltimore, *Williams & Wilkins*, 1984.
183. LARA, B.M.R.; FERNANDES, P.A.; MIRANDA, D. Diagnósticos citológicos cérvico vaginais em laboratório de médio porte de Belo Horizonte - MG. *RBAC*, 31: 37-40, 1999.
184. LARSEN, B.; MONIF, G.R. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin. Infect. Dis.*, v.32, 69-77, 2001.
185. LEE, L.; SCHMALE, J.D. Ampicilin theraph for *Corynebacterium vaginale*. (*Haemophilus vaginalis*) vaginitis. *Am.J.Obst.Gyn.*, v.115, 786-788, 1973.
186. LEIGHTON, P. M. *Gardnerella vaginalis*. Laboratory Isolation and Clinical Significance. *Can. J. Public Health.* 73, 335-40, 1982.
187. LEITE, Sonia Regina Ribeiro de Figueiredo *et al* . Perfil clínico e microbiológico de mulheres com vaginose bacteriana. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, 2010.
188. LEPARGNEUR, J.P; ROUSSEAU, V. Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *J. Gynecol.Obstet.Biol.Reprod.*, 31, 485-494, 2002.

189. LEOPOLD, S. Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. *U. S. Armed Forces Med. J.*, 4, 263-6, 1953.
190. LEVISON, M. E. ; TRESTMAN, I. ; QUACH, R.; SLADWSKY, C. ; FLORO, C. N. Quantitative bacteriology of the vaginal flora in vaginitis . *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 133, 139-44, 1979.
191. LIN, H.M.; TSUI, M.S.; TU, F.C. Detection of *Gardnerella vaginalis* in the vagina and amniotic fluid using the polymerase chain reaction. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 71.,221-222, 2000.
192. LINHARES I.M., DUARTE G., GIRALDO P.C., BAGNOLI V.R. DST / AIDS. Manual de orientação. FEBRASGO. S. Paulo: Ponto, 179 p., 2004.
193. LIVENGOOD, C.H.; FERRIS, D.G.; WIESENFELD, H.C.; HILLIER, S.L.; SOPER, D.E; NYIRJESY, P. *et al.* Effectiveness of two tinidazole regimens in treatment of bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. *J Fam Pract.* 56(11): 890, 2007.
194. LÖFMARK, S.; EDLUND, C., NORD, C.E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis.* 1;50 Suppl 1:16-23, 2010.
195. LONGATTO FILHO, A; SILVA FILHO, A.M. Colo uterino e vagina: Processos inflamatórios, aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. 1° ed. Rio de Janeiro: *Revinter*, 2000.
196. LUTZ, A.; WURCH, T.; GROOTTEN, O. Quelques données sur les “petits bacilles gram-négatif” agents d’une leucorrhée individualisée. *Gynecol. Obstet.*, 55, 75-82, 1956.
197. MACDERMOTT, R.I.J. Bacterial vaginosis. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 333, 1732-1736, 1995.
198. MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. *Vet. Microbiol.*, v. 79, p. 183-189, 2001.
199. MAYAUD, P.; KA-GINA, G.; CORNELISSEN, J.; TOOD, J.; KAATANO, G.

- WEST, B.; ULEDI, E.; RWAKATARE, M.; KOPWE, L.; MANOKO, D.; LAGA, M.; GROSSKURTH, H.; HAYES, R.; MABEY, D. Validation of WHO algorithm with risk assessment for the clinical management of vaginal discharge in Mwabza, Tanzania. *Sex. Transm. Infect.*, 74, 77-84, 1998.
200. MARTIN, R.; SUÁREZ, J.E. Biosynthesis and Degradation of H₂O₂ by Vaginal *Lactobacilli*. *App. and Environm. Microb.*, 400–405, 76,2, 2010.
201. MARTINEZ, R.C.R. Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto, 213 p., 2008.
202. MARRAZZO, J.M.; KOUTSKY, L.A.; ESCHENBACH, D.A.; AGNEW, K.; STINE, K.; HILLIER, S.L. Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. *J. Infect. Dis.*, 185, 13071313, 2002.
203. MARRIE, T.J.; SWANTEE, C.A.; HARTLEN, M. Aerobic and anaerobic urethral flora of healthy females in various physiological age groups and of females with urinary tract infections. *J. Clin. Microb.*, 11, 654-659, 1980.
204. MARTIUS, J.; ESCHENBACH, D.A. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamniotitis and prematurity. *A review. Arch. Gynecol. Obstet.*, 247, 1-13, 1990.
205. MASFARI, A. N.; DUERDEN, B. I.; KINGHORN, G. R. Quantitative studies of vaginal bacteria. *Genit.. Med.*, 62, 256-63, 1986.
206. MATROMARINO, P. BRIGIDI, P.; MACCJIA, S.; MAGGI, L.; PIROVANO, F.; TRINCHIERI, V.; CONTE, U.; MATTEUZZI, D. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J. Appl. Microbiol.*, v.93, p. 884-893, 2002.
207. McCOMARCK, W.M.; ALMEIDA, P.C.; BAILEY, P.E.; GRADY, E.M.; LEE, Y.H. Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. *Am. J. Epidemiol.*, 221, 1375-7, 1972.
208. McDONALD, H. M.; LOUGHLIN, J. A. O.; VIGNESWARAN, R.; JOLLEY, P.T.; HARVEY, J. A.; BOF, A. and McDONALD, P. J. Impact of

- Metronidazol on preterm birth in women with bacterial vaginosis flora (*Gardnerella vaginalis*): a randomized, placebo controlled trial. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 104, 1391-97, 1997.
209. MCGREGOR, J.A.; FRENCH, J.I.; PARKER, R. Prevention of premature birth by screening and treatment of genital tract infections: results of a prospective controlled evaluation. *Am. J. Obst. Gyn.*, 173, 157-167, 1995.
 210. MCGROARTY, J.A. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immn. And Med. Microb.*, v.6, p. 251-264, 1993.
 211. MCHARDY, E. The isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) in the laboratory. *Can J. Med. Technol.*, 41, 77-83, 1979.
 212. MCLEAN, N. W.; MCGROARTY, J.A. Growth inhibition of metronidazolesusceptible and metronidazole resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 1089-1092, 1996
 213. MEAD, P.B. Epidemiology of bacterial vaginosis in *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 169, 446-49, 1993.
 214. MEIRIK, O., Intrauterine devices: upper and lower genital tract infections. *Contraception*, 75(6), 41-47, 2007.
 215. MENDEL, E.B.; HABERMAN, S. The vaginal ecology and its relationship of symptoms in vaginitis. *South Med. J.*, 58, 374-378, 1965.
 216. MIKAMO, H.; SATO, Y.; HAYASAKI, Y.; HUA, Y.X.; TAMAYA, T. Vaginal microflora in healthy women With *Gardnerella vaginalis*. *J.Inf.Chem.* 6, 173-177, 2000.
 217. MCNICOL P.; PARASKEVAS M.; GUIJON F. Variability of polymerase chain reaction-based detection of human papillomavirus DNA is associated with the composition of vaginal microbial flora. *J Med Virol.* 43:194-200, 1994.
 218. MONIF, G.R.G. *et al.* *Candida albicans*. Doenças Infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia. RJ: Guanabara Koogan, 210-229, 1978.

219. MOREIRA, J.L.S.; MOTA, R.M.; HORTA, M.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S r RNA restriction profiling. *BMC Microbiol.*, 5:15, 2005.
220. MURRAY, P. R.; JO BARON, E.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C. and YOLKEN, R.H. Manual of clinical Microbiology, 6^a ed., Washington D. C., USA. *American Society for Microbiology, ASM Press*, 1995.
221. MURRAY, P. R.; JO BARON, E.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C. and YOLKEN, R.H. Manual of clinical Microbiology, 7^a ed., Washington D. C., USA. *American Society for Microbiology, ASM Press*, p.1773, 1999.
222. MURTA, E.F.C.; SOUZA, M.A.H.; JUNIOR, E. A.; ADAD, S.J. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological smears. *São Paulo Med. J/Rev Paul. Med.* 118, 105-108, 2000.
223. NAGARAJA, P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginoses. *Ind. Journ. of Med.Microb.* 26,2; 155-157, 2008.
224. NAI, G.A.; MELLO, A.L.P.; FERREIRA, A.D.; BARBOSA, R.L. Frequência de *Gardnerella vaginalis* em esfregaços vaginais de pacientes hysterectomizadas. *Rev Assoc Med Bras.* 53 (2):162-5. 2007.
225. NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CROCCO-AFONSO, L.C.; SILVA, M.E.; BAMBIRRA, E.A.; ANDRADE, A.M.V.; NICOLI, J.R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germ-free mice infected with *Salmonella typhimurium*. *Rev. Latinoam. Microb.*, v. 31, p. 239-243, 1991.
226. NARDUCCI F.; OCCELLI B.; BOMAN F.; VINATIER D.; LEROY, JL. Positive margins after colonization and risk of persistent lesion. *Gynecol Oncol*; 46,311-314. 2000.
227. NESS, R.B.; HILLIER, S.L.; RICHTER, H.E.; SOPER, D.E.; STAMM, C.; BASS, D.C. *et. al.* Why women douche and why they may or may not stop. *Sex Transm Dis.*30 (1)71-74, 2003.
228. NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q.

- Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV- H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, p. 1565-1573, 1998.
229. NICOLI, J.R.; RAIBAUD, P. *In vivo* and *in vitro* antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp. from human intestinal flora in mice. *Microecol. Ther.* v. 20, p. 141-146, 1990.
230. NOGUEIRA, R.C.M.; GOMES, F.; MORO, S. Vigilância aprimorada das DSTs em serviços que atendem pacientes com DST no município de Santos - SP. In: Program and abstracts: XI Latin American Congress on Sexually Transmitted Diseases and V Pan American Conference on AIDS. PCJ 150, Lima: Peru, 1997.
231. NUGENT, R. P.; KROHN, M. A. and HILLIER, S. L. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *J. Clin. Microbiol.*, 29 297-301, 1991.
232. OBATA-YASUOKA, M.; BATHEIN, W.; HAMADA, H.; HAYASHI, H. A. Multiplex polymerase chain reaction-based diagnostic method for bacterial vaginosis. *Am. Coll. Obst. Gyn.* 100, 759-764, 2002.
233. OCAÑA, V.S.; RUIZ HOLGADO, A.A.P.; NADER-MACIAS, M.E. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂ – producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 23, 87-92, 1999b.
234. OCAÑA, V.S.; RUIZ HOLGADO, A.A.P.; NADER-MACIAS, M.E. Selection of vaginal generating *Lactobacillus* for probiotic use. *Curr. Microbiol.*, v.38, 279-284, 1999a.
235. O.DOWD T.C.; WEST R.R; WINTERBURN P.J; HEWLINS M.J. Evaluation of a rapid diagnostic test for bacterial vaginosis. *Br J Obstet Gynaecol*, 103:366-70, 1996.
236. O'HANLON, D.E.; LANIER, B.R, MOENCH, T.R.; CONE, R.A. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infec.Dis.*19;10: 120, 2010.

237. OLLEN-BURKET, M.A.; HILLIER, S.L. Pregnancy complications associated with bacterial vaginosis and their estimated costs. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 3, 149-157, 1995.
238. OLIVEIRA, A.B.; FRANÇA, C.A.S; SANTOS, T.B.; GARCIA, M.A.F; TSUTSUMI, M.Y; JÚNIOR, L.C.B. Prevalência de gardnerella e mobiluncus em exames de colpocitologia em Tome-Açu, Pará. *Rev. Para. Med.* v.21 n.4, 2007.
239. ONETTO, B.S. & VARGAS, B.L. Diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* en poblacion no seleccionade con o sin vaginosis bacteriana. *Rev. Clin. Tecnol. Med.*; 8, 347- 354, 1985.
240. OONAGH, S.K.; COLLARD, A.E. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. *Infect. Immun*, 53, 498-504, 1986.
241. ORBAN, J.I.; PETTERSON, J.A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods.* 221224, 2000.
242. PAAVONEN, J. Physiology and Ecology of the Vagina. *Scand. J. Infect. Dis.*, 40 (Suppl): 31-5, 1983.
243. PAI, J. Treatment of vaginitis: vulvovaginal candidiases, bacterial vaginosis and vaginal tricomoniasis. *Calif. Pharm.*, 10-19, 2000.
244. PAJARO, A.O; SALCEDO, M.C.N.; MORA, L. Incidencia de la *Gardnerella vaginalis* y otros agentes etiológicos en flujos vaginales. *Unimetro*, 1:536,1985.
245. PÁL, Z.; DÓSA, E.; PÁL, A. Bacterial vaginosis and other vaginal infections *Int. J of Gynecol. and Obst*, 89, 278—279, 2005.
246. PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and kariotype polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentations in Brazil. *J. Appl. Microb.* 89:1, 24-31, 2000.

247. PATEL, D.A.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J.D *et al.* Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: Results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.*190: 644- 653, 2004.
248. PAUL, K.; BOUTAIN, D.; MANHART, L.; HITTI, J. Racial disparity in bacterial vaginosis: the role of socioeconomic status, psychosocial stress, and neighborhood characteristics, and possible implications for preterm birth. *Social Science & Medicine*, 67, 824–833, 2008.
249. PAVLOVA, S.I.; KILIC, A.O.;SO, J-S, NADER-MACIAS, M.E.; SIMOES, J.A., TAO,L. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries base don 16 S rRNA gene sequences. *J. App. Microbiol.*, 92, 451-459, 2002.
250. PEASE, P. & LAUGHTON, N. The antigenic structure of *Haemophilus* and *Corynebacterium* species from the human genital tract claimed be associated with or derived from *Mycoplasma hominis*. *J. Gen. Microbiol.*, 41, 293-7, 1965.
251. PEIXOTO, S.C.; CELESTINO, C.; PETTI, C. A.; TOMIOKA, E.; SOUZA, A. Z. Procedimentos de diagnostico e ensaio terapêutico com tinidazol na leucorréia por *Gardnerella vaginalis*. *J. Bras. Gin.*, v.94, 291-294, 1984.
252. PEREIRA, L.; CULHANE, J.; McCOLLUM, K.; AGNEW, K.; NYIRJESY, P. Variation in microbiologic profiles among pregnant women with bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193746-51, 2005.
253. PERET FILHO, L.A.; PENNA, F.J.; BAMBIRRA, E.A.; NICOLI, J.R. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. *J. Med. Microbiol.*,47,111-116, 1998.
254. PHEIFER, T.A.; FORSYTH, P.S.; DURFEE, M.A.; POLLOCK, H.M.; HOLMES, K.K. Nonspecific vaginitis role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. *N.Engl.J.Med.*, v.228, 1429-1434,1978.
255. PIATO, S. Tratado de Ginecologia, 2ª ed. S.P. *Art. Méd.*, 310-313, 2002.

256. PIMENTA, S.P.; ALVES, P.D.D.; CORRÊA JR, A.; LACHANCE, M.A.; PRASAD, G.S.; RAJARAM; SINHA, B.R.R.P.; ROSA, C.A. *Geotrichum silvicola* sp. nov. a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* n. 55, 497-501, 2005.
257. PIOT, P.; DYCK, E. V.; TOTTEN, P.A.; HOMES, K.K. Identification of *Gardnerella vaginalis* (*H. vaginalis*). *J. Clin. Microb.*,15, 19-24, 1982.
258. PLATZ-CHRISTENSEN, J.J.; BRANDBERG A.; WIQVIST, N. Increased prostaglandin concentrations in the cervical mucus of pregnant women with bacterial vaginosis. *Prostaglandins*, 43, 133-141, 1992.
259. PLATZ-CHRISTENSEN J.J; PERNEVI P.; HAGMAR B.; ANDERSSON E.; BRANDBERG A.; WIQVIST N. A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72:99-102, 1993.
260. PORTO, A.G.M.; CUNHA, P.R.; RIVETTI, P.S. Vulvovaginites. *Rev Bras Med*,48:86-8, 1991.
261. PUAPERMPOONSIRI, S.; WATANABE, K.; KATO, N.; UENO, K. In vitro activities of 10 antimicrobial agents against bacterial vaginosis-associated anaerobic isolates from pregnant Japanese and Thai women. *Antimicrob. Agents Chemother*, 41, 2297-2299, 1997.
262. PYBUS, V. ONDERDONK, B. A commensal symbiosis between *Prevotella bivia* and *Peptostreptococcus anaerobius* involves aminoacids: potential significance to the pathogenesis of bacterial vaginosis. *FEMS Imm. And Med. Microb.*, 22, 317- 327, 1998.
263. RABE, L.K.; HILLIER, S.L. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *Journal of Clinical Microbiol.*, v.41, p.3260-3264, 2003.
264. RALPH, E.D.; AUSTIN, T.W.; PATTISON, F.L.M.; SCHIEVEN, B.C. Inhibition of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginalis*) by metronidazole, tetracycline and ampicilin. *Sex. Tran. Dis.*,6,199-202, 1979.

265. RALPH, S.G.; RUTHERFORD, A.J.; WILSON, J.D. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: a cohort study. *Br. Med. J.*, 319, 220-223, 1999.
266. REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B.J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E.V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation: a review. *Biotechnol Adv.*; 26(1):22-34, 2008.
267. REDONDO – LOPEZ, V.; COOK, R.L.; SOBEL, J.D. Emerging role of *Lactobacilli* in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Review of Infectious Diseases*, 12, 856-72, 1990.
268. REICHMAN, O.; AKIN, S.R.; SOBEL, J.D. Boric acid addition to suppressive antimicrobial therapy for recurrent bacterial vaginosis. *Sex transm Dis.* 36 (11): 732 – 4, 2009.
269. REID, G.; ZALAI, C.; GARDINER, G. Urogenital Lactobacilli probiotics, reability and regulatory issues. *J. Dary Sci.*, v.84, p. 164-169, 2001.
270. REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.*, v.4, 319-324, 2002.
271. REID, G.; BRUCE, A. Selection of *Lactobacillus* strains for Urogenital probiotic applications. *J. Infect. Dis.*, v. 183, p. S77-80, 2001.
272. REID, G.; BRUCE, A. A Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgrad. Med.J.*, v. 79, p. 428-432, 2003.
273. REID, G.; CHARBONNEAU, J.D.; ERB, J.; KOCHANOWSKI, B.; BEUERMAN, D. POENHER, R.; BRUCE, A. W. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L.fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo- controlled trial in 64 healthy women. *Immunol. Med. Microbiol.*, 35, 131-134, 2003a.
274. REILLY, S. & HUMAN, R.P. *Gardnerella vaginalis*: Pathogen or commensal? *Lancet*, 9, 111, 1983.
275. REYN, A. & ANDERSEN, A. B. An electron microscope of thin sections of *Haemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) and some possibly related species. *Can. J. Microbiol.*, 12, 1125-36, 1966.

276. RIBEIRO, M.A.; DIETZ, R.; PAULA, C.R.; DA MATTA D.A.; COLOMBO, A. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brasil. *Mycopatologia*, 15(1): 5-10, 2001.
277. RIBEIRO, A.A.; OLIVEIRA, D.F.; SAMPAIO, M.C.N.; CARNEIRO, M.N.A.S.; TAVARES, S.B.N.; SOUZA, N.L.A.; FONSECHI-CARVASAN, G.A.; ALCANFOR, J.D.X.; SANTOS, S.H.R. Agentes microbiológicos em exames citopatológicos: estudo de prevalência. *RBAC*, vol. 39(3): 179-181, 2007.
278. RIBEIRO-BRANCO, K.M.G. Bactérias do gênero *Lactobacillus* recuperadas de pacientes com e sem Vaginose Bacteriana: Identificação molecular e Produção de substâncias antagonistas. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 234p., 2005.
279. RIGGS, M.; KLEBANOFF, M.; NANSEL, T.; ZHANG, J.; SCHWEBKE, J.; ANDREWS, W. Longitudinal Association between Hormonal Contraceptives and Bacterial Vaginosis in Women of Reproductive Age. *Sexually Transmitted Diseases*, 34, (11) 1-6, 2007.
280. RODRIGUES, A.C.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 81, p. 251-256, 1996.
281. RODRIGUES, A.C.; CARA, D.C.; FRETEZ, S.H.G.G.; CUNHA, F.Q.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 1-12, 2000.
282. ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A.; TEIXEIRA, L. C.; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B. *Metschnikowia cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 57, n. 1, p. 161-165, 2007.
283. ROYCE, R.A.; THORP, J.; GRANADOS, J.L.; SAVITZ, D.A. Bacterial vaginosis associated with HIV infection en pregnancy women from North Carolina. *J. AIDS Hum. Retrov.*, 20, 382-386, 1999.

284. RUIZ, C.S.; REY, M.R.; HOLGADO, A.P.R.; NADER-MACIAS.
Experimental administration of estradiol on the colonization of
Lactobacillus fermentum and *Escherichia coli* in the urogenital tract in mice.
Biol.Pharm.Bull, 24(2), 127-134, 2000.
285. RYLEY, J.F.; MCGREGOR, S. Quantification of vaginal *Candida albicans*
infection in rodents. *J. Med. Vet. Mycol*, 24, 455-460, 1986.
286. SAYERS, A.A.; WHITT, D.D. (eds). Bacterial Pathogenesis: A molecular
approach. Washington D.C. 97-110, 1994.
287. SARTOR, R.B. Microbial factors in Crohn's disease, ulcerative colitis and
experimental intestinal inflammation, p. 96-124,.In KIRSTNER, J.B.;
SHORTER, R.G. (ed.). *Inflammatory Bowel Diseases*, 4th. ed. The Williams
& Wilkins Co., Baltimore, Md. 1995.
288. SCHWEBKE, J.R.; DESMOND, R. Risk Factors for Bacterial Vaginosis in
Women at High Risk for Sexually Transmitted Diseases. *Sexually
Transmitted Diseases*. 32, 654-658, 2005.
289. SCHWEBKE, J.R. New concepts in the etiology of bacterial vaginosis.
Curr. Infect. Diseas. Reports. 11:143-147, 2009.
290. SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; RUSCH, K.; RUSCH, V. Throwing the dice
for the diagnosis of vaginal complaints? *Ann Clin Microb. Antim*. 5:4, 2006.
291. SHOUBNIKOVA, M.; HELLBERG, D.; NILLSON, S.; MARDH, P.
Contraceptive use in women with bacterial vaginosis. *Contracep.*, 55, 355-
358, 1997.
292. SHAFER, M. A.; SWEET, R. L.; OHM-SMITH, M. J.; SHALWITZ, J.; BECK,
A.; SCHACHTER, J. Microbiology of the lower genital tract in
postmenarchal adolescent girls: Differences by sexual activity,
contraception, and presence of nonspecific vaginitis. *J. Pediatrics*, 107,
974 –981, 1985.
293. SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES,
D.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the
experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in
conventional and gnotobiotic mice. *J. Appl. Microb.*,86, p. 331-336, 1999.

294. SILVA, F.C.; BOER, C.G.; IRIE, M. M.T.; YOSHIDA, C.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Avaliação da influência do uso de métodos contraceptivos sobre os resultados dos esfregaços de Papanicolaou. *Acta Sci. Health Sci. Maringá*, v. 28, n. 1, 65-70, 2006.
295. SILVINO M.C.M.; GIRALDO, P.C.; VICENTINI, R.M.R.; JÚNIOR, J.E. . Microbiota vaginal no pré e pós-operatório de cirurgias ginecológicas. *J bras Doenças Sex Transm* 18(3): 168-171, 2006.
296. SIMÕES, A.J.; AROUTCHEVA, A.; HEIMLER, I.; SHOTT, S.; FARO, S. Bacteriocin susceptibility of *Gardnerella vaginalis* and its relationship to biotype, genotype, and metronidazole susceptibility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 185, 1186-1190, 2001.
297. SIMÕES - BARBOSA, A.; FEIJÓ, G.C.; SILVA, J.X.; LEAL, I.I.R.; BARBOSA, T.W.P. A Six- Year Follow- up Survey of Sexually Transmitted Diseases in Brasilia, the Capital of Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 6, 110-117, 2002.
298. SKARIN, A.; HOLST, E.; MARDH, P.A Antimicrobial susceptibility of comma-shaped bacteria isolated from the vagina. *Scand.J.Infect. Dis.*, v.40 (Supp.), 81-84,1983.
299. SLOTS, J.; Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Microbiol.*, 131, 60-67, 1982.
300. SMART, S.; SINGAL, A.; MINDEL, A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect*; 80:58–62, 2004.
301. SMITH, H.J.; MOORE, H.B. Isolation of *Mobiluncus* species from clinical specimens by using cold enrichment and selective media. *J. of Clinical Microbiology*. v.26 n.6, 1134-1137, 1988.
302. SOARES-BRANDAO, K.L.K. Avaliação clínico microbiológica do ecossistema vaginal de pacientes assintomáticas e com vaginose bacteriana com ênfase em *Gardnerella vaginalis*. Dissertação de mestrado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG, 2004.
303. SOARES, V.L.; MESQUITA, A.M.T.S.; CAVALCANTE, F.G.T.; SILVA,

- Z.P.; HORA, V.; DIEDRICH, T.; SILVA, P.C.; MELO, P.G.; DACAL, A.R.C.; CARVALHO, E.M.F.; FELDMIEIER, H. Sexually transmitted infectious in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop. Med. and Intern.Health.* 8, 595-603, 2003.
304. SOBEL, J.D.; MULLER, G.; McCORMICK, J.F. Experimental chronic vaginal candidosis in rats. *J. Med. Vet. Mycol.*, 23, 199-206, 1985.
305. SOBEL, J.D. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obst.Gyn.*, 36: 153-651, 1993.
306. SOBEL, J.D.; CHAIM, W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J. Clin. Microb.*, 34, 2497-2499, 1996.
307. SOBEL, J.D. Vaginitis. *New Engl. Journ.of Med.*, 337, 1896-1903, 1997.
308. SOBEL, J.D.; DICKEY, L.J.; NAILOR, M.D. Guidelines for the treatment of bacterial vaginosis: focus on tinidazole. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5, 485–489, 2009.
309. SONG, Y.L.; KATO, N.; MATSUMIYA, Y.; LIU, C.X.; KATO, H.; WATANABE, K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol.* 37(9):3062-4, 1999.
310. SPANGLER , B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microb.Rev.*, 56, p.622-647, 1992.
311. SPEAR, G.T.; ST. JOHN, E.P.; ZARIFFARD, M.R. Bacterial vaginosis and human immunodeficiency virus infection. *AIDS Research and Therapy*, 4:25, 2007.
312. SPIEGEL, C.A. Bacterial Vaginosis. *Clin Microbiol Rev*, v.4, n.4, p.485-502, 1991.
313. SPIEGEL, C. A; AMSEL, R. and HOLMES, K. K. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Direct Gram Stain of Vaginal Fluid. *J. of Clinical Microbiology*, 18, 170-177, 1983.
314. SRINIVASAN, S.; LIU, C.; MITCHELL, C.M.; FIEDLER, T.L.; THOMAS, K.K, AGNEW, K.J.; MARRAZZO, J.M.; FREDRICKS, D.N. Temporal

- variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *Plos One*, 5;4, 1-8, 2010.
315. STEVENS-SIMON, C.; JAMISON, J.; MCGREGOR, J.A.; DOUGLAS, J.M. Racial variation in pH among health sexually active adolescents. *Sex. Transm. Dis.*, 21, 168-172, 1994.
316. SUMMANEN, P.; BARON, E.J.; CITRON, D.M.; STRONG, C.A.; WEXLER, H.H.; FINEGOLD, S.M. Wadsworth Anaerobic Bacteriology. *Manual Publishing Company* Fifth Edition, 138-230, 1993.
317. SUZUKI, L.E.; ALDRIGHIC, J.M.; ALECRIN, I.N.; MARTINS, C.R. Estudo da prevalência da infecção genital por papilomavírus humano em mulheres no climatério. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 39(4), 305-309, 2007.
318. SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W., LOENING-BAUCKE, V. *et al.* Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis. *Obstet. Gynecol.*, 106:1013-1023, 2005.
319. SVIDZINSKI, T.I.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; HERRERO, F. Diagnóstico laboratorial e importância clínica de *G.vaginalis* em pacientes com infecção vaginal. *Rev.Microbiol.*, 20 5-9, 1989.
320. TAAG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMER, L.M. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriology Rev.*40: 722-56, 1976.
321. TANAKA, V.D'A.; FAGUNDES, L.J.; CATAPAN, A.; GOTLIEB, S. L. D.; JUNIOR, W.B.; ARNONE, M.; SOREANO, R.; MORAES, F.R.B. Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo, SP. *An Bras Dermatol*, 82 (1):41-46, 2007.
322. TAYLOR-ROBINSON, D. Hormones in bacterial vaginosis. *Int. Journal of STD & AIDS*, 18: 00 -00, 2007.
323. TAVARES, W. Manual de Antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos, 1ª Ed. *Atheneu*, R.J., 589, 1994.
324. TEIXEIRA, G.S.; SOARES-BRANDÃO, K.L.; BRANCO, K.M.; SAMPAIO, J.L.; NARDI, R.M.; MENDONÇA, M., ALMEIDA, R.B.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.; NICOLI, J.R. Antagonism and synergism in

- Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 59, 891-897, 2010.
325. TENOVER, F.C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine.* Vol 119 (6A), S3–S10, 2006.
326. THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAW W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* v. 22, n. 3, 4673-4680, 1994.
327. TREXLER, P.C. A rationale for the development of gnotobiotics. *Lab. Anim.*, v. 12, p. 257-262, 1978.
328. UGWUMADU, A.; MANYONDA, I.; REID, F.; HAY, P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and Bacterial Vaginosis: a randomised controlled trial. *Lancet*, v. 361, 983-988, 2003.
329. VERHELST, R. Characterization of the vaginal microflora. Tese de Doutorado. Faculty of Medicine, University of Ghent, 1-193, 2006.
330. VIEIRA, L.Q.; OLIVEIRA, M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C. Parasitic infections in germ-free animals. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.31, p. 105-110, 1998.
331. VILLEGAS, C. H.; JIMÉNEZ, G. M. A.; GARCÍA, F. S.; ROMÁN, C. G.; ZÚÑIGA, B. M.; RIVERA, F. E. Infección por *Gardnerella vaginalis* en parejas heterossexuales. Estudio ultraestructural en células de descamación del epitelio estratificado. *Ginecología y Obstetricia de México*, 1995.
332. VONTVER, L.A & ESCHENBACH, D.A. The role of *Gardnerella vaginalis* in nonspecific vaginitis. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 24, 439 – 460, 1981.
333. WODWARD, J. The diagnostic and treatment of psychosomatic vulvovaginitis. *Prat Med*, 225:1673-7, 1981.
334. YASIN, B.; PANG, M.; LEHRER, R.I, WAGAR, E.A. Activity of Novispirin G-10, a novel antimicrobial peptide against *Clamydia trachomatis* and vaginosis associated bacteria. *Experim. Mol. Pathol.*, 74, 190-195, 2003.

335. ZAMITH, R.; BARACAT, E.C, NAZARIO, A.C.P.; NICOLAU, S.M. Corriemnto genital. In: PRADO, F.C.; RAMOS, j.; VALLE, J.R. *Atualização terapêutica*, 18. Ed. São Paulo. *Artes médicas*, 1997.
336. ZARATE, G.; NADER-MACIAS, M.E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microb.* 43:2, 174-180, 2006.
337. ZARATE, G.; SANTOS, V.; NADER-MACIAS, M.E. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital Infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infectious Dis. In Obst. And Gynecol.* 1-6, 2007.
338. ZIMMERMANN, J.B.; PEREIRA, L.A.; CARDOSO, B.A.; ALMEIDA, P.A.; CLADEIRA, R.M.; REZENDE, D.F. Vaginose bacteriana: frequência entre usuárias do serviço público e da rede privada de saúde. *HU Revista*, Juiz de Fora, v. 35, n. 2, p. 97-104, 2009.
339. ZINNERMAN, K. & TURNER, G. C. The taxonomic position of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) *J. Pathol. Bacteriol.* , 85, 213-219, 1963.
340. WITKIN, S.S.; LINHARES, I.M.; GIRALDO, P.; LEDGER, W.J. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*; 44(4): 554-7, 2007.

8.0 ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do COEP para o Projeto “Epidemiologia de Infecções vaginais” **ANEXO 2**- Aprovação do CETEA para experimentação animal.

ANEXO 3 - Consentimento para Participação dos Pacientes**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA**

Prezado (a) paciente,

Você foi selecionada para participar de uma pesquisa por ser paciente da Policlínica Centro-Sul.

O objetivo deste estudo é, em primeiro lugar, conhecer a ocorrência das infecções cérvico-vaginais e os microrganismos responsáveis por estas infecções na região de Belo Horizonte. O conhecimento desses dados nos permitirá direcionar melhor os tratamentos e as campanhas de educação e prevenção, para melhor combater estas infecções.

Sua participação nesse estudo é completamente voluntária. Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que lhe cause nenhum prejuízo. Caso concorde em participar da pesquisa, precisaremos usar amostras da região cérvico-vaginal, além de consultar os dados de seu prontuário. Faremos o máximo para preservar o sigilo dos dados. Você pode perguntar ao pesquisador qualquer dúvida que tiver a respeito desse estudo, assim como qualquer dúvida que surgir no decorrer da pesquisa, além de que será informado de todos os achados pertinentes durante o estudo. Caso você não queira participar do estudo, sinta-se livre para fazê-lo, em qualquer época, e sem nenhum prejuízo para você.

Se você necessitar de mais esclarecimentos a respeito desta pesquisa, por favor, entre em contato com o COEP pelo telefone (031) 3248-9364.

Eu, _____, concordo em participar do estudo acima.

Paciente _____

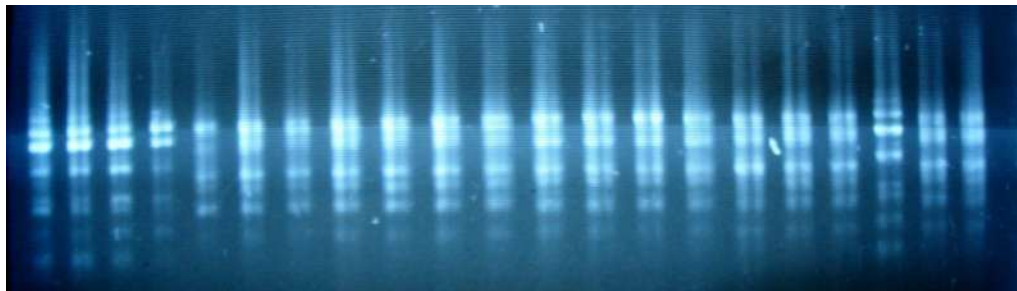
Médico _____

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200_

ANEXO 4- Questionário (Ficha Clínica)

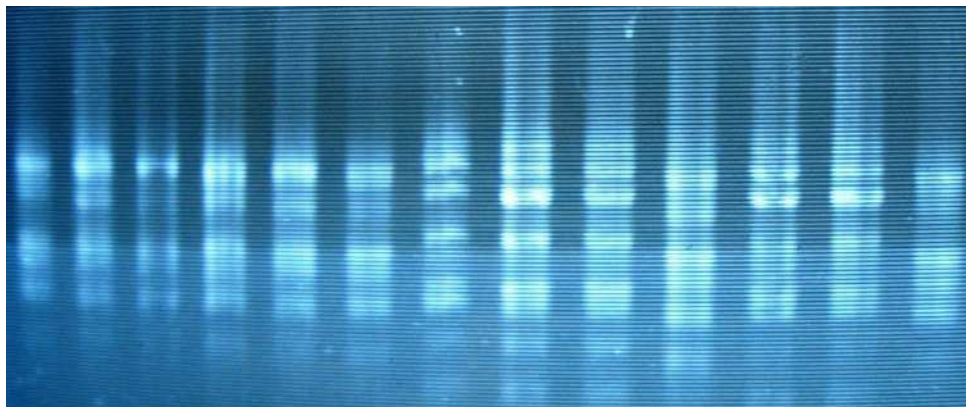
Nº Registro	Perfil Microbiológico vaginal de mulheres com e sem Vaginose Bacteriana, com ênfase em Gardnerella vaginalis: Métodos Convencionais e de Biologia Molecular						
IDENTIFICAÇÃO _____ Data ___/___/___	Prontuário Nº: _____ Idade: _____	Cor () Leuco () Melano () Feo	Peso _____ Ult. Mens. ___/___/___	Vida Conjugal atual () Sim () Não Quanto _____ anos	Profissão _____ Renda familiar: _____ Nº pessoas _____	Uso nos últimos 30 dias () Antimicrobianos () () Corticóides () Imunossupresor	Hábito uso duch. () () Sim () Não Ducha(ult.30d.) () Sim () Não
QUEIXA PRINCIPAL	() Corrimento () Prurido vaginal		() Alteração urinária () Irregularidade menstrual		() Dor pélvica () Dispareunia	() Odor	() Tabagismo () Drogas
HISTÓRIA MENSTRUAL	Menarca _____ anos	Catamenios Intervalo: _____ dias Duração: _____ dias	Algomenorréia () Sim () Não		HISTÓRIA OBSTÉTRICA Gestações G _____ P _____ A _____	Ult. Parto ___/___/___ Natimortos () Sim () Não	Via parto _____ Natural _____ Fórceps _____ Cesárea
ATIVIDADE SEXUAL () Sim () Não () Hetero () Homo () Bissexual	Início da ativ. sexual _____ anos	Frequência () 1x/sem. () 2x/sem. () 3 ou + x	Hábito sexual () Vaginal () Oral () Anal	Anticoncepção () Ausente () Condom () Tabela () Pílula () Diafragma () Coito Interromp. () DIU () STB		Tipo de roupa Íntima () Algodão () Sintético Frequente uso de: () Calças () Saias	GLICEMIA _____
Nº Parceiros (nos últimos 30 dias) _____							
Nº Parceiros (nos últimos 90 dias) _____							
EXAME FÍSICO							
EXAME ESPECULAR	Resíduo vaginal () Ausente () Leitoso () Amarela. () Esverdeado () Sanguinolento		Ectrópio () Ausente () Pequeno (1/3) () Moderado (2/3) () Acentuado (>2/3)		pH Vaginal _____ KOH 10 % _____ Teste de Schiller () Positivo () Negativo	Colpite () Ausente () Difusa () Focal () Difusa e Focal	Coleta p/ cultura de fungos () Sim () Não Coleta p/ cultura de Anaeróbios () Sim () Não
CORPO UTERINO	Mobilidade () Normal () Doloroso () Fixo () Não doloroso		Fossas Iílicas () livres () massa		Massa Palpável () Sim ===== () Direita () Não () Esquerda		
EXAME À FRESCO	Células Predominantes () Superficiais () Intermediárias () Basais		Neutrófilos () Ausente () Raro / Até 10 () Moderado / 10-20 () Abundante / > 20		Código 0 Ausentes 1 Raros Cocobacilos _____ 2 Moderado 3 Abundante	Bastonetes longos _____ Bastonetes curtos _____ Cocos _____ Outros _____	Fungos Leveduras _____ Pseudo-hifas _____ Brotamentos _____ Parasitas () <i>T. vaginalis</i> Clue Cells () () Sim () Não

GRAM DO FLUIDO VAGINAL	Células Predominantes	Neutrófilos	Código	Bastonetes longos gram + ____ gram - ____	Clue Cells () Sim () Não
	() Superficiais	() Ausente	0 Ausentes	Bastonetes curtos gram + ____ gram - ____	
	() Intermediárias	() Raro/ Até 10	1 Raros Cocobacilos gram + ____ gram - ____	Cocos gram + ____ gram - ____	
	() Basais	() Moderado/10-20	2 Moderado	Outros _____	
	() Abundante/ > 20	3 Abundante			



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

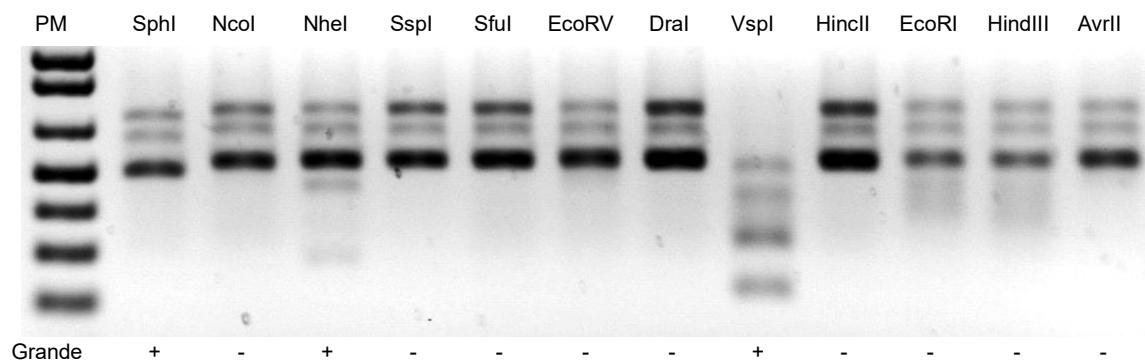
ANEXO 5- Identificação por PCR fingerprinting de leveduras isoladas de espécimes de pacientes com e sem VB, sendo 1-4;19 *C glabrata* e demais canaletas, *C. albicans*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

ANEXO 6- Identificação por PCR fingerprinting de leveduras isoladas de espécimes de pacientes com e sem VB, sendo 1,2,6,9,10,11 e 13 *C. albicans* e demais canaletas *C glabrata*.

ANEXO7- Identificação por PCR- ARDRA do *Lactobacillus* spp. isoladas de espécimes de pacientes com e sem VB.



Médio	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Pequeno	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Figura A. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus fermentum*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

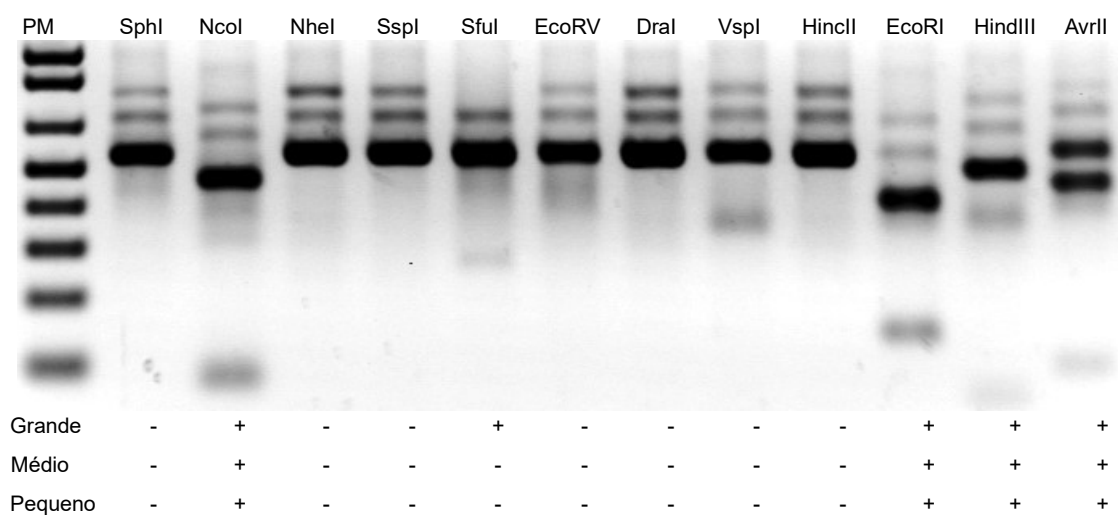


Figura B. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus acidophilus*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.



Figura C. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus reuteri*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

	PM	SphI	NcoI	NheI	SspI	SfuI	EcoRV	DraI	VspI	HincII	EcoRI	HindIII	AvrII
--	----	------	------	------	------	------	-------	------	------	--------	-------	---------	-------

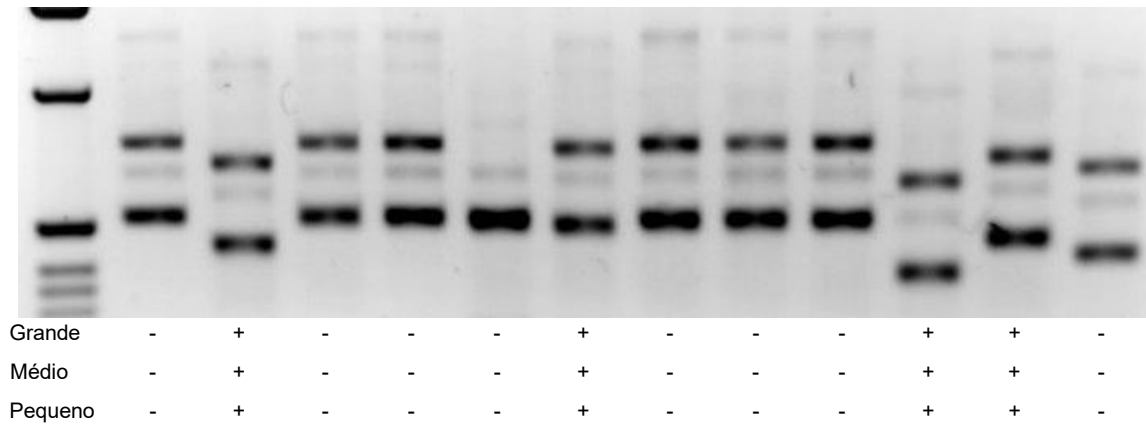


Figura D. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus crispatus*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

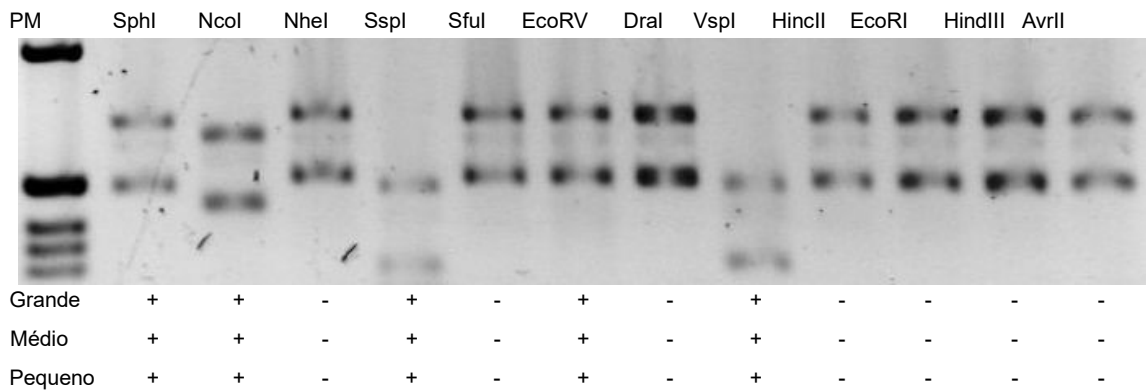


Figura E. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus colehominis*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

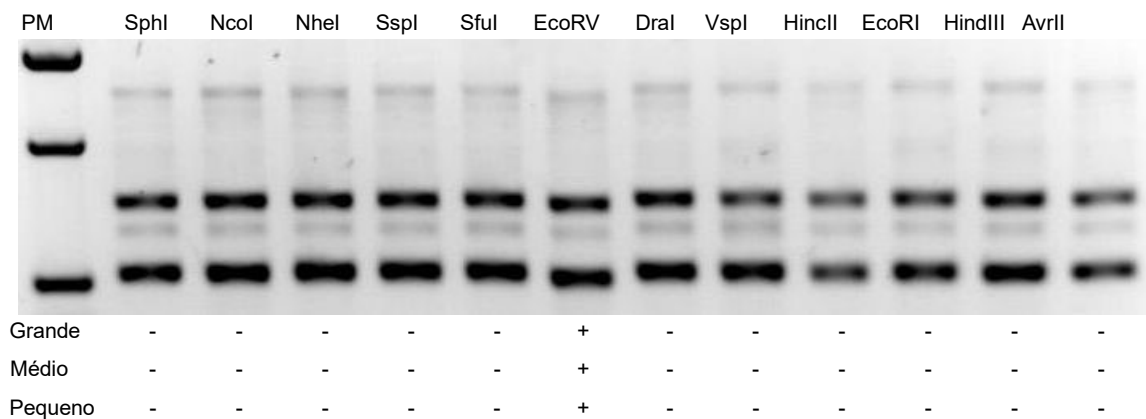


Figura F. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus jensenii*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

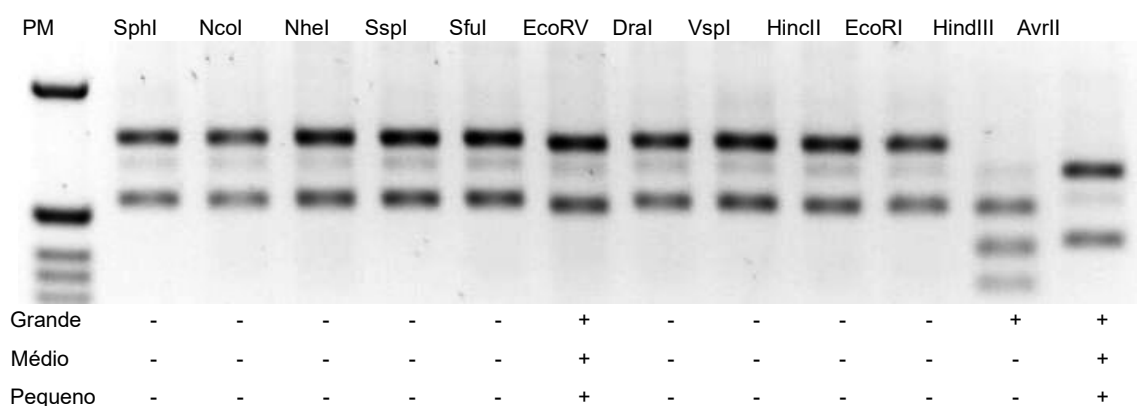


Figura G. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus gasserii*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

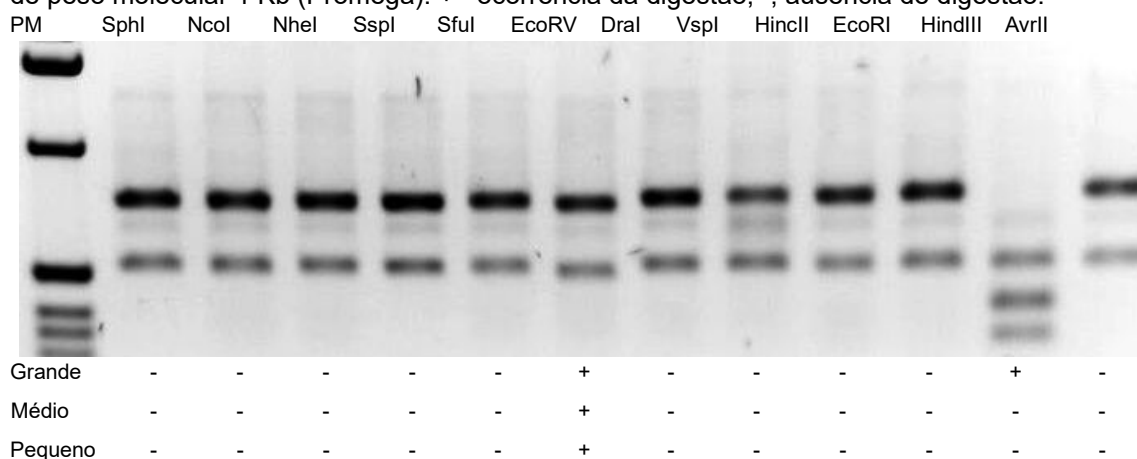


Figura H. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus jhonsonii*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

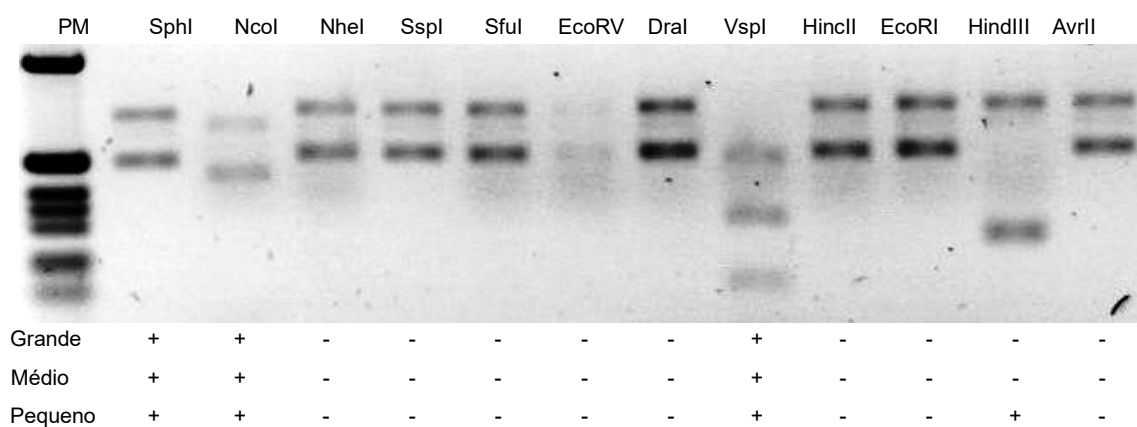


Figura I. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus vaginalis*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

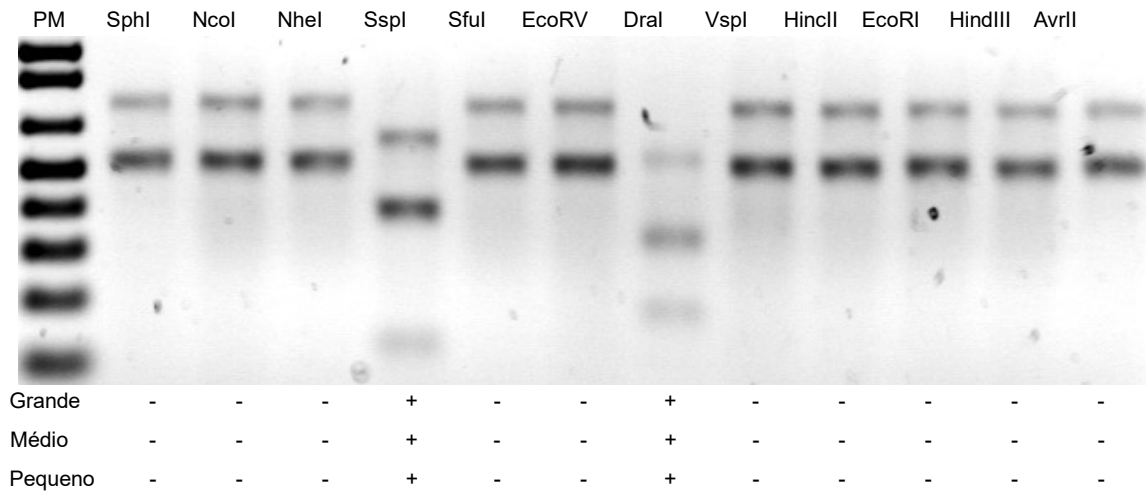


Figura J. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus salivarius*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

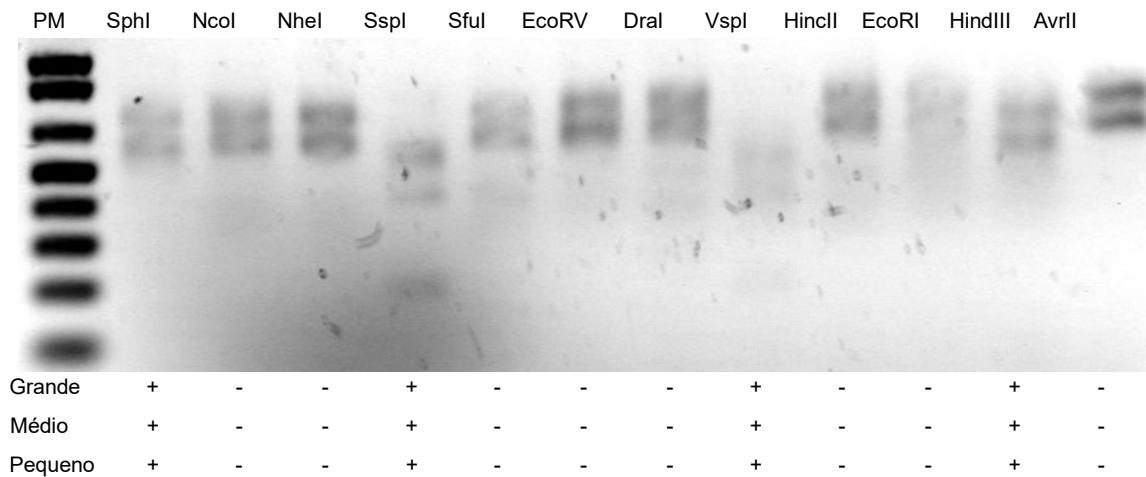


Figura L Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus hilgardii*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.

	PM	SphI	NcoI	NheI	SspI	SfuI	EcoRV	DraI	VspI	HincII	EcoRI	HindIII	AvrII
--	----	------	------	------	------	------	-------	------	------	--------	-------	---------	-------

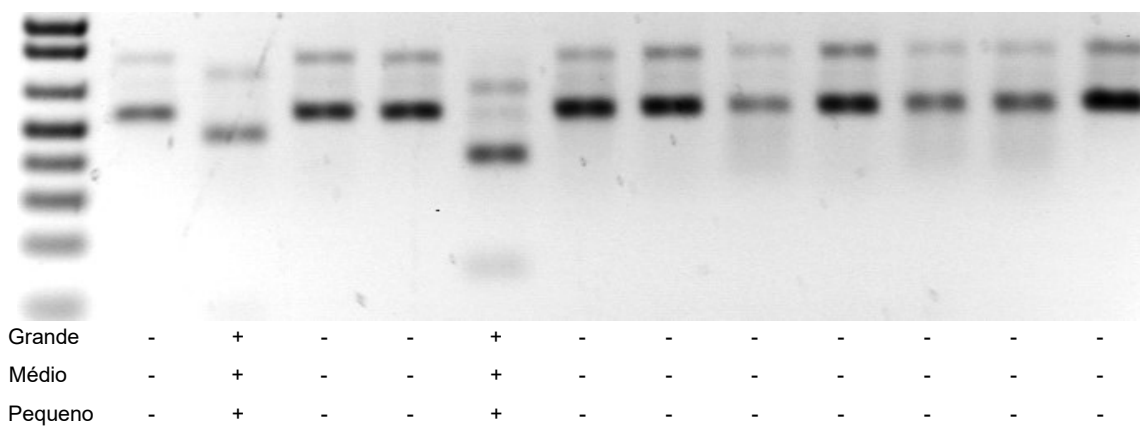


Figura M. Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus delbrueckii*, em gel de agarose 1,4%. PM = padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). += ocorrência da digestão; -, ausência de digestão.