

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAURA MARIA ANDRADE DE OLIVEIRA

**Diversidade bacteriana e determinação da carga de *Gardnerella vaginalis*,
Atopobium vaginae, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis* e *Lactobacillus*
spp. em amostras de secreção vaginal de mulheres com e sem diagnóstico
clínico de vaginose bacteriana**

JUIZ DE FORA

2014

LAURA MARIA ANDRADE DE OLIVEIRA

**Diversidade bacteriana e determinação da carga de *Gardnerella vaginalis*,
Atopobium vaginae, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis* e *Lactobacillus*
spp. em amostras de secreção vaginal de mulheres com e sem diagnóstico
clínico de vaginose bacteriana**

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

ORIENTAÇÃO

Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia da Silva (Orientadora)

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (Co-orientador)

Dr^a. Alessandra Barbosa Ferreira Machado (Co-orientadora)

JUIZ DE FORA

2014

Oliveira, Laura Maria Andrade de.

Diversidade bacteriana e determinação da carga de *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis* e *Lactobacillus* spp. em amostras de secreção vaginal de mulheres com e sem diagnóstico clínico de vaginose bacteriana / Laura Maria Andrade de Oliveira. -- 2014.

107 p. : il.

Orientadora: Vânia Lúcia da Silva

Coorientador: Cláudio Galuppo Diniz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Vaginose bacteriana. 2. Microbiota vaginal. 3. PCR quantitativa em tempo real. 4. DGGE. 5. FISH. I. Silva, Vânia Lúcia da, orient. II. Diniz, Cláudio Galuppo, coorient. III. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Antônio Carlos e Maria Augusta, pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando minhas decisões, sem eles não teria sido possível chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

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

À Deus, por estar sempre ao meu lado, me abençoando e guiando meus passos, permitindo que eu realize meus sonhos.

À minha orientadora, prof^a. Vânia, pela oportunidade de poder fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em meu trabalho, pelo apoio e incentivo durante esses dois anos e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao prof. Cláudio, meu co-orientador, pelo apoio e confiança em meu trabalho durante esses dois anos.

À minha co-orientadora Alessandra pelo apoio e confiança em meu trabalho, e por compartilhar comigo seu conhecimento. Você fez parte diretamente da minha evolução e amadurecimento científico nesses dois anos.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Maria Augusta, por serem meu porto seguro, pelo amor sem medidas e por todo o apoio e incentivo para que eu pudesse alcançar o objetivo de me tornar Mestre.

Aos meus irmãos, Thomás e Thaís, pela amizade, carinho e apoio nos momentos difíceis.

À toda minha família pelas orações e por torcerem pelo meu sucesso.

Às queridas amigas que o mestrado colocou em minha vida, Michele, Carol, Claudinha e Aline, pelo convívio harmonioso, por compartilharem os problemas enfrentados durante o desenvolvimento desse trabalho e também por vibrar junto comigo com as vitórias alcançadas.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Imunologia e Microbiologia do ICB/UFJF, Thiago, Michele, Carol, Claudinha, Ju e Dani, pelo convívio harmonioso e pelo apoio e companheirismo.

Às minhas estagiárias, Aline e Luciana, por toda dedicação, esforço e comprometimento para que todos os experimentos dessem certo. Vocês são meninas muito competentes e dedicadas, com certeza terão muito sucesso na profissão.

A todos os alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Imunologia e Microbiologia

do ICB/UFJF, que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução desse trabalho.

A todos os professores da Microbiologia do ICB/UFJF pela acolhida, amizade e incentivo.

À prof^a. Dionéia, pelo apoio e colaboração com os experimentos de FISH.

Ao prof. Marcelo Nagem pela disponibilidade e ajuda na realização dos experimentos de DGGE.

Ao prof. Luiz Cláudio pela contribuição com a análise estatística desse trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Felipe e Thaís, por toda a ajuda.

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

A todos os meus amigos, pelo apoio nos momentos difíceis e também por estarem ao meu lado nos momentos de felicidade, pelos conselhos valiosos e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Muito obrigada!

**"Nós não somos o que gostaríamos de ser.
Nós não somos o que ainda iremos ser.
Mas, graças a Deus,
Não somos mais quem nós éramos."**

Martin Luther King

RESUMO

A microbiota vaginal é considerada um ambiente complexo, onde várias espécies bacterianas coexistem e desenvolvem complexas relações. Vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome caracterizada por uma depleção de espécies de *Lactobacillus* predominantes na microbiota vaginal saudável e um aumento de outras espécies, principalmente *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a microbiota vaginal de pacientes com e sem VB, atendidas no serviço de ginecologia do SUS e da rede privada de Juiz de Fora/MG, quanto a sua diversidade bacteriana e quantificar os principais gêneros e espécies envolvidos na patogênese da doença. Secreção vaginal de pacientes com e sem VB foram coletadas e transportadas para o laboratório, em meio específico. Lâminas foram coradas pelo método de Gram, a fim de estabelecer o escore de Nugent para avaliação das pacientes entre saudáveis e doentes. O DNA total das secreções foi extraído e PCR quantitativa (qPCR) em tempo real foi realizada, utilizando *primers* específicos para *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma hominis*. A partir do DNA total extraído também foi realizada PCR convencional utilizando *primers* específicos para Domínio Bacteria e os filos Actinobacteria e Firmicutes, e em seguida foi realizada técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE). Foi realizada também a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), para identificação e quantificação de bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria, Firmicutes, α -Proteobactéria, β -Proteobactéria e γ -Proteobactéria. Entre os grupos saudável e doente (VB) foi observada diferença estatisticamente significativa na quantificação de *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. e *M. hominis*. *Lactobacillus* spp. esteve presente em maior concentração no grupo saudável enquanto que *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. e *M. hominis* estiveram presentes em maior concentração no grupo doente (VB). De um modo geral, a concentração de *G. vaginalis* e *Mobiluncus* spp. elevou-se com o aumento do escore de Nugent; em contrapartida, a concentração de *Lactobacillus* spp., decresceu com o aumento do escore de Nugent. A análise de agrupamento mostrou que, com algumas exceções, os perfis de pacientes apresentando o mesmo *status* de saúde tenderam a se agrupar juntos, porém em *clusters* separados e que os agrupamentos parecem ser regidos pelo *status* de saúde das pacientes. As variáveis riqueza e diversidade revelaram perfis complexos entre as amostras e a análise de componente principal (PCA) mostrou que as amostras dentro do grupo VB tenderam a se agrupar na análise dos filos Actinobacteria e Firmicutes. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos saudável e doente (VB) em relação a quantificação dos filos Actinobacteria, Firmicutes, α -Proteobactéria, β -Proteobactéria e γ -Proteobactéria. O uso combinado das técnicas DGGE, FISH e PCR quantitativa em tempo real representam uma estratégia bem sucedida para o monitoramento qualitativo e quantitativo de alterações na microbiota vaginal relacionadas a doenças infecciosas, como a vaginose bacteriana. Tal fato pode contribuir tanto para o desenvolvimento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico de mulheres acometidas pela VB, especialmente as pacientes assintomáticas, e também pode contribuir com a melhoria e otimização dos regimes terapêuticos adotados na prática clínica para o tratamento da VB.

Palavras-chave: Vaginose bacteriana. Microbiota vaginal. *Gardnerella vaginalis*. *Atopobium vaginae*. PCR quantitativa em tempo real. DGGE. FISH.

ABSTRACT

The vaginal microbiota is considered a complex environment where several bacterial species coexist and develop complex relationships. Bacterial vaginosis (BV) is a syndrome characterized by a depletion of *Lactobacillus* species prevalent in healthy vaginal microbiota and an increase in other species, especially *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*. The aim of this study was to evaluate the vaginal microbiota of patients with and without BV, attended at the gynecology service of the SUS and the private service of health of Juiz de Fora/MG, as its bacterial diversity and quantify the major genera and species involved in the disease pathogenesis. Vaginal secretions of patients with and without BV were collected and transported to the laboratory in a specific medium. Slides were stained by the Gram method in order to establish the Nugent Score for evaluation of patients between healthy and sick. The total DNA of secretions was extracted and Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) was performed using specific primers for *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. and *Mycoplasma hominis*. From the total DNA extracted from conventional PCR also was performed using specific primers to Bacteria domain and Actinobacteria and Firmicutes phyla, and then Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was performed. The identification and quantification of bacteria belonging to the phyla Actinobacteria, Firmicutes, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria and γ -Proteobacteria were performed by the technique of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Among the healthy and diseased (VB) groups statistically significant difference was observed in the quantification of *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. and *M. hominis*. *Lactobacillus* spp. was present in higher concentration in the healthy group while *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. and *M. hominis* were present in higher concentrations in the patient group (VB). In general, the concentration of *G. vaginalis*, and *Mobiluncus* spp. increased with the increment in the Nugent Score; however, the concentration of *Lactobacillus* spp decreased with the raise of the Nugent score. The cluster analyses showed that, with few exceptions, the profiles from patients with the same health status grouped together in separate clusters and there was a distinct separation based on the health status of the patients. The richness and diversity showed complex profiles and principal component analysis (PCA) showed that the samples within the VB group grouped together on the analysis of the phyla Firmicutes and Actinobacteria. No statistically significant difference was observed between healthy and diseased groups (VB) for quantification of the phyla Actinobacteria, Firmicutes, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria and γ -Proteobacteria. The combined use of techniques DGGE, FISH and real-time quantitative PCR represent a successful strategy for qualitative and quantitative monitoring of changes in vaginal microbiota related to infectious diseases such as Bacterial Vaginosis. This may contribute to both the development of tools that aid in the diagnosis of women affected by BV, especially asymptomatic patients, and may also contribute to the improvement and optimization of therapeutic regimes adopted in clinical practice for the treatment of BV.

Key-words: Bacterial Vaginosis. Vaginal microbiota. *Gardnerella vaginalis*. *Atopobium vaginae*. Real-time Polymerase Chain Reaction. DGGE. FISH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelos concorrentes para a patogênese da vaginose bacteriana.....	31
Figura 2	Diagrama esquemático da técnica de <i>Nested</i> -PCR utilizada para análise da diversidade de Bacteria em amostras de secreção vaginal por PCR-DGGE.....	42
Figura 3	DGGE <i>fingerprinting</i> e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano 16S rDNA específicos para o domínio Bacteria amplificados a partir do DNA genômico extraído de amostras de secreção vaginal.....	50
Figura 4	DGGE <i>fingerprinting</i> e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano 16S rDNA específicos para o filo Actinobacteria amplificados a partir do DNA genômico extraído de amostras de secreção vaginal....	51
Figura 5	DGGE <i>fingerprinting</i> e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano 16S rDNA específicos para o filo Firmicutes amplificados a partir do DNA genômico extraído de amostras de secreção vaginal.....	52
Figura 6	Análise da variável riqueza entre os grupos saudável e doente no domínio Bacteria e nos filios Firmicutes e Actinobacteria. $p < 0,05$	53
Figura 7	Análise de Componente Principal (PCA) entre as comunidades bacterianas determinada pelos genes 16S rRNA para o domínio Bacteria.....	54
Figura 8	Análise de Componente Principal (PCA) entre as comunidades bacterianas determinada pelos genes 16S rRNA para o filo Actinobacteria.....	54
Figura 9	Análise de Componente Principal (PCA) entre as comunidades bacterianas determinada pelos genes 16S rRNA para o filo Firmicutes.....	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 10	Quantificação das células bacterianas entre os grupos de pacientes saudáveis e doentes (VB) nos filos α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria pela técnica de FISH.....	56
Figura 11	Microfotografia de lâmina corada com DAPI para a contagem celular bacteriana total de uma amostra do grupo saudável (a) e outra amostra pertencente ao grupo doente (c), e microfotografia de uma amostra do grupo saudável (b) amostra pertencente ao grupo doente (d) hibridizadas com a sonda específica para o filo β -Proteobactéria.....	57
Gráfico 1	Carga média (log cópias/mL) <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. e de <i>Mycoplasma hominis</i> entre os grupos de pacientes saudáveis e doentes (VB). $p < 0,05$	58
Figura 12	Correlação dos resultados da quantificação realizada por qPCR de <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Mobiluncus</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp. com o escore de Nugent.....	62
Figura 13	Correlação dos resultados da quantificação realizada por qPCR entre <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mobiluncus</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos oligoiniciadores usados para amplificar fragmentos de genes rDNA 16S.....	43
Tabela 2	Sequência das sondas utilizadas para hibridização ao rRNA 16S alvo.....	45
Tabela 3	Proporção de formamida em porcentagem na solução de hibridização de acordo com a sonda de interesse.....	45
Tabela 4	Gene alvo, sequência dos oligoiniciadores e condições da PCR utilizados na quantificação da carga bacteriana de <i>G. vaginalis</i> , <i>A. vaginae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>Mobiluncus</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.....	47
Tabela 5	Estatística descritiva para os resultados da variável riqueza entre as diferentes comunidades bacterianas.....	53
Tabela 6	Estatística descritiva da quantificação de células bacterianas nos filos α -Proteobacteria, β -Proteobacteria e γ -Proteobacteria entre os grupos saudável e doente (VB).....	56
Tabela 7	Estatística descritiva da quantificação de células bacterianas nos filos Firmicutes e Actinobacteria entre os grupos saudável e doente (VB).....	56
Tabela 8	Estatística descritiva dos dados de quantificação de <i>Gardnerella vaginalis</i> entre pacientes saudáveis e doentes (VB).....	58
Tabela 9	Estatística descritiva dos dados de quantificação de <i>Atopobium vaginae</i> entre pacientes saudáveis e doentes (VB).....	59
Tabela 10	Estatística descritiva dos dados de quantificação de <i>Mobiluncus</i> spp. entre pacientes saudáveis e doentes (VB)...	59
Tabela 11	Estatística descritiva dos dados de quantificação de <i>Lactobacillus</i> spp. entre pacientes saudáveis e doentes (VB)..	60
Tabela 12	Estatística descritiva dos dados de quantificação de <i>Micoplasma hominis</i> entre pacientes saudáveis e doentes (VB).....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	MICROBIOTA VAGINAL E SEU PAPEL NA FISIOLOGIA DO HOSPEDEIRO.....	17
2.2	VULVOVAGINITES.....	21
2.3	VAGINOSE BACTERIANA	21
2.3.1	Epidemiologia	22
2.3.2	Microrganismos associados à vaginose bacteriana: aspectos gerais.....	24
2.3.3	Etiologia e patogênese.....	29
2.4	MÉTODOS MOLECULARES INDEPENDENTES DE CULTIVO: ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE), HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR).....	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	POPULAÇÃO AMOSTRADA	39
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE SECREÇÃO VAGINAL.....	39
4.3	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE BACTERIANA VAGINAL.....	40
4.3.1	Amplificação de rDNA 16S de representantes do domínio Bacteria utilizando oligoiniciadores específicos.....	40
4.3.2	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	43
4.4	FISH (HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i>).....	44
4.5	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	46
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS	49
5.1	ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE).....	49

SUMÁRIO

5.2	HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	55
5.3	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR).....	57
6	DISCUSSÃO	63
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
8	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO A - ESCORE DE NUGENT (DIAGNÓSTICO LABORATORIAL)...	95
	APÊNDICE A - QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA DAS AMOSTRAS DA SECREÇÃO VAGINAL DAS PACIENTES PELA TÉCNICA DE FISH DOS FILOS α-PROTEOBACTERIA, β-PROTEOBACTERIA, γ-PROTEOBACTERIA, FIRMICUTES E ACTINOBACTERIA E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COMO ESCORE DE NUGENT.....	96
	APÊNDICE B - QUANTIFICAÇÃO DE <i>GARDNERELLA VAGINALIS</i> E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.....	98
	APÊNDICE C - QUANTIFICAÇÃO DE <i>ATOPOBIUM VAGINAE</i> E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.....	100
	APÊNDICE D - QUANTIFICAÇÃO DE <i>MOBILUNCUS SPP.</i> E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.....	102
	APÊNDICE E - QUANTIFICAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.....	104
	APÊNDICE F - QUANTIFICAÇÃO DE <i>MYCOPLASMA HOMINIS</i> E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.....	106

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ambiente vaginal possui uma população complexa de micro-organismos, incluindo bactérias aeróbias, anaeróbias e anaeróbias facultativas, que convivem em equilíbrio, colonizando a vagina sem ocasionar doença. A microbiota anfiótica vaginal possui patógenos oportunistas que, nas condições de equilíbrio, também não ocasionam doença no hospedeiro. Os *Lactobacillus* spp. correspondem, aproximadamente, 90% das bactérias presentes na microbiota vaginal de uma mulher sadia em idade reprodutiva. Outros micro-organismos diferentes dos lactobacilos, incluindo *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* sp., *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp. e outras bactérias anaeróbias compõem a porcentagem restante do total de bactérias vaginais. O equilíbrio da microbiota vaginal é mantido por interações complexas entre a microbiota saudável, os produtos do metabolismo microbiano, o estado hormonal e a resposta imune do hospedeiro, e é importante para a saúde vaginal bem como para a saúde do organismo como um todo.

Contudo, esse equilíbrio pode ser rompido, e as comunidades microbianas vaginais podem passar por mudanças na representatividade e abundância de espécies chave, as quais podem conduzir a um estado de doença. Tais mudanças são influenciadas por diferentes fatores, como idade, alterações hormonais, atividade sexual, condição de saúde, uso de medicamentos, práticas de lavagem intravaginal e higiene.

A vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome causada primariamente por um desequilíbrio da microbiota vaginal, representado pela depleção de *Lactobacillus* e um supercrescimento dos anaeróbios e anaeróbios facultativos vaginais, acompanhada pela elevação do pH vaginal e aparecimento de corrimento vaginal fétido. Apresenta um conjunto de sinais e sintomas característicos e tem origem polimicrobiana, na qual há um sinergismo entre *G. vaginalis* e outras bactérias anaeróbias, como *Mobiluncus* spp. e *Atopobium vaginae*. O desequilíbrio da microbiota vaginal ocasiona diminuição da capacidade produtora de substâncias bactericidas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que favorece o crescimento de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas. Esta síndrome acomete um grande

número das mulheres em idade reprodutiva, e é uma das causas mais comuns de procura nos consultórios ginecológicos.

Embora a VB seja uma síndrome polimicrobiana, ainda não está esclarecido se é originada da ação conjunta de várias espécies ou se existem espécies chave que favorecem a doença. Nesse contexto, *G. vaginalis* destaca-se como uma bactéria presente na grande maioria dos casos da doença, e parece exercer um papel importante na sua patogênese. No entanto, o isolamento de *G. vaginalis* não pode ser usado para o diagnóstico de VB, pois este micro-organismo faz parte da microbiota vaginal de mais de 50% das mulheres saudáveis. Uma alta concentração de *G. vaginalis* pode estar associada com a presença de VB, devido ao desequilíbrio da microbiota vaginal.

Os métodos independentes de cultivo têm auxiliado as pesquisas voltadas para o estudo da microbiota vaginal. Técnicas moleculares baseadas na análise das sequências do gene DNAr 16S são utilizadas no estudo da diversidade filogenética e dinâmica de comunidades microbianas complexas. Um exemplo é a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante acoplada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-DGGE), que permite avaliar a distribuição bacteriana de diferentes comunidades microbianas. A técnica de PCR quantitativa em tempo real é outra ferramenta utilizada para a quantificação de bactérias presentes em comunidades microbianas complexas. Também muito utilizada é a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), uma ferramenta que permite a avaliação direta, por microscopia, da composição de comunidades microbianas.

Dessa forma, dando sequência a linha de pesquisa “Patógenos associados às doenças cérvico-vaginais em mulheres em idade reprodutiva em Juiz de Fora/MG”, o presente trabalho contribuiu com o estudo da diversidade bacteriana da microbiota vaginal em mulheres saudáveis e acometidas pela VB e para a compreensão de mudanças relevantes no desenvolvimento da doença no que se refere à dinâmica populacional dessa comunidade microbiana complexa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROBIOTA VAGINAL E SEU PAPEL NA FISIOLOGIA DO HOSPEDEIRO

A mucosa vaginal pode ser considerada um ambiente complexo, onde várias espécies bacterianas coexistem e estabelecem interações intra e interespecíficas (FILHO; DINIZ; SILVA, 2010). Segundo Martin (2012), a microbiota vaginal foi descrita por Döderlein em 1982. Ele relatou ter observado bacilos imóveis e Gram-positivos nas preparações de secreção vaginal analisadas. Esses bacilos foram primeiramente nomeados como bacilos de Döderlein e posteriormente foram renomeados como *Lactobacillus*. O gênero *Lactobacillus* é um dos mais importantes dentro do grupo das Bactérias do Ácido Lático (BAL). As BAL produzem ácido láctico através do metabolismo fermentativo como produto único ou juntamente com outros produtos, como ácidos orgânicos e etanol. Taxonomicamente, elas pertencem ao grupo de bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo guanina/citosina (G+C) (FORSUM et al., 2005; MARTIN, 2012).

As bactérias residentes da vagina são uma importante barreira de defesa do organismo e representam um complexo sistema microbiológico, com cerca de 10^9 unidades formadoras de colônias (UFCs) por grama de secreção e dezenas de diferentes espécies (SCHWIERTZ et al., 2006).

A microbiota vaginal humana saudável passa por várias mudanças ao longo do curso de vida de uma mulher. Acredita-se que a seleção natural das linhagens bacterianas no ambiente vaginal seja modulada por diferentes fatores, incluindo predisposição genética, idade da mulher, atividade sexual, condições de saúde, uso de medicamentos, práticas de higiene pessoal e condições do ambiente, porém o processo como um todo ainda não é totalmente compreendido (FORSUM et al., 2005; LARSSON; FORSUM, 2005; SPIEGEL, 1991). Todavia, sabe-se que os níveis circulantes de estrogênio são capazes de influenciar a ocorrência de mudanças na dinâmica da comunidade bacteriana vaginal (TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011).

O desenvolvimento do feto no útero ocorre em um ambiente estéril, e a exposição inicial do recém-nascido aos micro-organismos ocorre no momento do seu nascimento ao passar pelo canal do parto, através das mãos de cuidadores e pelo contato com o ambiente ao seu redor (ADLERBERTH, 2008; PENDERS et al., 2006; REINHARDT et al., 2009). Dessa forma, durante a vida intra-uterina e até o momento do nascimento, a vagina do recém-nascido é estéril (FORSUM et al., 2005).

Durante as primeiras 24 horas de vida, a vagina do bebê é normalmente colonizada por lactobacilos, os quais dominam a microbiota até os estrogênios maternos serem metabolizados (FARAGE; MAIBECH, 2006). Nas primeiras 4-6 semanas após o nascimento, os estrogênios maternos ainda exercem forte influência nos tecidos vaginais do recém-nascido. Como resultado, a vagina da criança recém-nascida assemelha-se à vagina de uma mulher adulta, tanto morfológica quanto microbiologicamente; a mucosa vaginal é relativamente espessa e as células epiteliais secretam glicogênio em abundância (BRABIN et al., 2005; FARAGE; MAIBACH, 2006; SPIGEL, 1991; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011).

A microbiota vaginal do recém-nascido será composta por outras espécies de micro-organismos encontrados na pele e na microbiota entérica e pequenas quantidades de *Lactobacillus* spp. permanecem. Dentre as espécies aeróbias mais frequentemente identificadas estão *Staphylococcus* coagulase negativo, *Escherichia coli* e *Streptococcus* sp. Dentre os anaeróbios destacam-se *Prevotella melaninogenica*, *Veillonella parvula*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Propionibacterium* spp. Quando a menarca é atingida, ocorre a produção de estrogênio, levando ao espessamento da mucosa vaginal e um aumento nos níveis de glicogênio com o conseqüente aumento da população de *Lactobacillus* spp. (FORSUM et al., 2005; TUROVSKY; NOLL; CHIKINDAS, 2011).

Ao longo da idade reprodutiva da mulher, a microbiota vaginal saudável é dominada por *Lactobacillus* spp. principalmente *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. iners*, seguido pelas espécies *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* em menor proporção, os quais representam 80% a 95% das bactérias (CRIBBY; TAYLOR; REID, 2008; FORSUM et al., 2005; LIVENGOOD, 2009; SRINIVASAN;

FREDRICKS, 2008). Um fato interessante é que a espécie *Lactobacillus iners* é comumente encontrada não somente na microbiota de mulheres saudáveis, mas também na microbiota de mulheres com VB (DATCU et al., 2013; LIVENGOOD, 2009).

Todavia, espécies potencialmente patogênicas, como *G. vaginalis*, também podem ser encontradas na microbiota saudável em baixos números sem causar doença, coexistindo em equilíbrio com as espécies de *Lactobacillus* (TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011).

A composição da microbiota vaginal saudável pode sofrer variações em resposta a fatores endógenos e exógenos, tais como as diferentes fases do ciclo menstrual, gestação, uso de contraceptivos, frequência de intercurso sexual, uso de duchas ou produtos desodorantes, utilização de antibióticos ou outras medicações com propriedades imunossupressoras (ESCHENBACH et al., 2001; PRIESTLY, 1997).

A menopausa é acompanhada por um decréscimo nos níveis de secreção de estrogênio, atrofia do epitélio vaginal e elevação do pH vaginal. A microbiota vaginal típica é substituída por uma microbiota mista, com o declínio dos lactobacilos e um aumento de coliformes, de espécies de *Mycoplasma* e de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas, incluindo *G. vaginalis* (DEVILLARD et al., 2004; FORSUM et al., 2005; HILLIER, LAU, 1997). A terapia de reposição hormonal, da qual muitas mulheres são adeptas, é capaz de promover o restabelecimento da dominância dos lactobacilos na microbiota vaginal de mulheres pós-menopausa, bem como um decréscimo de espécies potencialmente patogênicas (HEINEMANN; HEID, 2005).

De acordo com Forsum et al. (2005), os níveis de estrogênio podem influenciar a composição das espécies de *Lactobacillus* na microbiota vaginal saudável. A vagina quando possui estrogênio em abundância é um ambiente favorável à colonização por

as espécies *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. iners*. No entanto, uma queda no nível de estrogênio poderá permitir o estabelecimento de outras espécies, como *L. rhamnosus* e *L. reuteri* (FORSUM et al., 2005).

Os lactobacilos possuem algumas propriedades, como adesão específica à superfície de células epiteliais, produção de substâncias com atividade antimicrobiana, como H₂O₂, ácidos orgânicos e bacteriocinas, e competição com organismos patogênicos por espaço, receptores e nutrientes (LIVENGOOD, 2009;

MARTIN et al., 2008), que dificultam o estabelecimento ou proliferação excessiva de micro-organismos patogênicos (FILHO; DINIZ; SILVA, 2010).

A proteção da mucosa vaginal depende do reconhecimento específico de estruturas na superfície dos lactobacilos, as adesinas, pelos seus receptores específicos no epitélio vaginal. Esta interação adesina-receptor resulta na formação de um biofilme, que exerce uma ação protetora local contra a colonização por micro-organismos indesejáveis (BORIS et al., 1998; SZOKE et al., 1996).

O H₂O₂ inibe o crescimento de micro-organismos que não produzem a enzima catalase e, dessa forma, oferece uma grande vantagem aos lactobacilos. O H₂O₂ exerce seu efeito bactericida através de sua atividade oxidante, com a geração de espécies reativas de oxigênio, tais como radicais hidroxila (OH[•]), que causam dano ao DNA celular (MARTIN et al., 2008; LIVENGOOD, 2009).

O pH fisiológico vaginal varia de 3,8 a 4,5. O uso de glicogênio do epitélio vaginal pelos lactobacilos leva à produção de ácidos orgânicos por essas bactérias, mantendo o pH vaginal abaixo de 4,5. A acidificação do meio inibe o desenvolvimento de muitas bactérias, sendo, portanto um mecanismo eficiente de proteção da mucosa vaginal (HAY; FAHEY, 2002; LIVENGOOD, 2009; MARTIN et al., 2008; WATTS et al., 2005).

Além dos *Lactobacillus*, a microbiota vaginal de uma mulher adulta saudável contém patógenos oportunistas que, em condições de equilíbrio, não causam doença ao hospedeiro. Esses patógenos compõem cerca de 10% da microbiota vaginal residente e entre eles pode-se citar *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp., *Atopobium vaginae*, *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *G. vaginalis*, *Mobiluncus* spp., dentre outros. Fungos, como *Candida albicans*, também estão presentes, compondo uma pequena parcela da microbiota vaginal (LIVENGOOD, 2009; PRIESTLY et al., 1997; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

Quando a concentração de lactobacilos decresce para abaixo de um nível crítico, os demais componentes da microbiota vaginal podem apresentar um crescimento exacerbado tornando-se dominantes na microbiota vaginal, podendo atuar como patógenos oportunistas (FILHO; DINIZ; SILVA, 2010). Todavia, todas as

propriedades acima mencionadas dos lactobacilos criam um ambiente inóspito para os patógenos oportunistas e inibem seu crescimento e, dessa forma, os *Lactobacillus* mantêm o domínio sobre a microbiota vaginal.

2.2 VULVOVAGINITES

As vulvovaginites ou vaginites constituem uma variedade de desordens inflamatórias do trato genital inferior, que podem ser secundárias à infecção, irritação, alergia ou doença sistêmica. São muito diagnosticadas nas consultas ginecológicas e em mais de 90% dos casos as causas infecciosas de vulvovaginites incluem candidíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (EGAN; LIPSKY, 2000; ANGOTTI et al., 2007; CHONG et al., 2007; AKINBIYI et al., 2008).

As vaginites se desenvolvem quando a microbiota vaginal é alterada pela presença de um patógeno ou quando ocorrem mudanças no ambiente vaginal, que favorecem a proliferação microbiana (EGAN; LIPSKY, 2000; GROSS et al., 2007). Vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal são as duas causas mais comuns de vaginite (LING et al., 2010; VITALI et al., 2007).

2.3 VAGINOSE BACTERIANA

A vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome multifatorial em que ocorre a depleção da população de *Lactobacillus* e proliferação excessiva de micro-organismos anaeróbios vaginais, acompanhada pela elevação do pH vaginal e aparecimento de corrimento vaginal fétido. Caracteriza-se por um conjunto de sinais e sintomas de etiologia polimicrobiana, no qual há um sinergismo entre *G. vaginalis* e outras bactérias, como *Mobiluncus* spp. e *Atopobium vaginae* (CDC, 2010; FACHINI, 2005; GIRALDO, 2007; HAY, 2010).

Micro-organismos anaeróbios associados com a VB incluem principalmente espécies de *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus*

spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Ureaplasma urealyticum* entre outros anaeróbios. Os micro-organismos envolvidos diferem consideravelmente entre os indivíduos com VB (CDC, 2010; KOUMANS; KENDRICK, 2001).

Embora a VB seja uma síndrome polimicrobiana, ainda não está bem esclarecido se é originada da ação conjunta de várias espécies ou se existem espécies chave em cada caso. Nesse contexto, *G. vaginalis* destaca-se como uma bactéria presente na grande maioria dos casos da doença e parece exercer um papel importante na sua patogênese. Apresenta capacidade de formar um biofilme aderente ao epitélio vaginal, o que pode favorecer a colonização por outras bactérias anaeróbias. Outra característica é a produção da toxina citolítica vaginolisina (VLY), que é uma toxina formadora de poros pertencente à família das citolisinas dependentes de colesterol (CDC), que lisam seletivamente hemácias e células epiteliais vaginais humanas (GELBER et al., 2008; PATTERSON et al., 2010; PLECKAITYTE, 2012).

2.3.1 Epidemiologia

Ao longo da vida, quase 75% das mulheres apresentarão pelo menos um episódio de infecção do trato genital inferior, e 40 a 50% duas ou mais ocorrências (KENT, 1991; EGAN; LIPSKY, 2000; MITCHELL, 2004). Estes quadros podem ter consequências importantes, em termos de desconforto e dor, absenteísmo na escola ou trabalho, reflexos sociais e emocionais negativos e ainda problemas sexuais e reprodutivos (DUARTE; LANDERS, 1998).

A vaginose bacteriana é uma condição prevalente, ocorrendo em até 30% da população e uma das condições mais comumente associadas com o aparecimento de corrimento vaginal anormal em mulheres em idade reprodutiva (CDC, 2010; LIVENGOOD, 2009; ZIMMERMANN et al., 2009). Atualmente, é a principal causa de descarga vaginal infecciosa na menacme e, por afetar mulheres em idade reprodutiva, sugere-se a possibilidade dos hormônios sexuais estarem envolvidos na sua patogênese. Embora de forma menos frequente, a VB também pode ser diagnosticada em crianças e em mulheres pós-menopausa. Em gestantes e não gestantes, a prevalência de VB parece ser bastante semelhante (GIRALDO et al.,

2007; LEITE et al., 2010). No Brasil, a VB mostra-se muito frequente, atingindo cerca de 40 a 50% das mulheres com queixa de corrimento vaginal (GIRALDO et al., 2007; LEITE et al., 2010). Até 50% das mulheres acometidas pela doença não apresentam os sintomas característicos (CDC, 2010; WOODROW; LAMONT, 1998).

O número de parceiros sexuais e a utilização do dispositivo intrauterino (DIU) como método contraceptivo têm sido associados ao aumento do risco de VB. O uso de contraceptivos hormonais, por sua vez, parece estabelecer um efeito protetor para o desenvolvimento de VB, por promover uma microbiota predominantemente lactobacilar. A utilização de preservativo também auxilia na proteção contra a VB (CDC, 2010; ESCHENBACH et al., 1988; HAY, 2010; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS et al., 2011). Outros fatores de risco para a VB incluem etnia africana, *status* socioeconômico, tabagismo, utilização de duchas vaginais, tratamento com antibióticos, novo parceiro sexual e histórico recente de múltiplos parceiros sexuais, masculinos ou femininos (CDC, 2010; CHERPES et al., 2008; FETHERS et al., 2009; HAY, 2010; MERCHANT; OH; KLERMAN, 1999; VERSTRAELEN, 2008; VERSTRAELEN et al., 2010; YEN et al., 2003).

Pelo fato de que muitos desses comportamentos de alto risco são também fatores de risco bem estabelecidos para a aquisição de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), foi sugerido que a VB poderia ser transmitida sexualmente (GARDNER; DUKES, 1955; CRISWELL, 1969; GARDNER, 1980; VERSTRAELEN, 2008). Todavia, o debate sobre se a VB é uma DST ainda permanece (HAY, 2010). O que se sabe é que mulheres com VB possuem um maior risco de aquisição de algumas DSTs (p. ex., HIV - vírus da imunodeficiência humana -, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e HSV-2 – vírus herpes simples genital) (CDC, 2010). Mulheres de países com elevada frequência de HIV-AIDS, como Uganda, apresentam prevalência de VB superior a 50% (ATASHILI et al., 2008; CDC, 2010; SEWANKAMBO et al., 1997).

Ao contrário de uma típica DST com um único agente etiológico e rotas bem definidas de infecção, a VB envolve múltiplos patógenos, a grande maioria dos quais são também encontrados na microbiota vaginal de mulheres saudáveis e sexualmente inexperientes (CDC, 2010; LIVENGOOD, 2009; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS et al., 2011). Não existem evidências de um decréscimo nas taxas de VB recorrente após o tratamento com antibióticos dos parceiros sexuais das

mulheres afetadas, o que distingue a VB das DSTs comuns (LIVENGOOD, 2009; VERSTRAELEN et al., 2010).

Outro fato interessante nesse contexto é que embora VB seja mais frequentemente diagnosticada em mulheres sexualmente ativas, ela também já foi identificada em mulheres virgens (HAY, 2010; PRIESTLY, KINGORN, 1996; YEN et al., 2003).

A vaginose bacteriana frequentemente coincide com mudanças no ecossistema vaginal induzidas por relações sexuais com um novo parceiro (NILSON et al., 1997). A alta frequência de relações sexuais predispõe a VB tanto pela deposição de sêmen que alcaliniza o meio, quanto pelo estímulo local da mucosa ou mesmo pela introdução de bactérias estranhas ao ambiente vaginal (GIRALDO et al., 2005).

O uso indiscriminado e frequente de duchas vaginais higiênicas é outro fator de risco (CDC, 2010). Tal prática higiênica poderia levar à perda do equilíbrio entre os micro-organismos residentes do ecossistema vaginal, facilitando o aparecimento e manutenção de vulvovaginites, como a vaginose bacteriana. As duchas higiênicas promovem a limpeza mecânica das bactérias próprias da microbiota local e, ao mesmo tempo, introduzem substâncias exógenas que poderiam alterar o pH vaginal e causar reações alérgicas locais (GIRALDO et al., 1999; NESS et al., 2003).

A VB pode ser responsável por muitas sequelas adversas em mulheres grávidas acometidas pela doença (CDC, 2010) e em seus bebês, como ruptura prematura de membranas fetais, corioamnionite, infecção do fluido amniótico, trabalho de parto e parto prematuros, endometrite pós-cesárea e complicações pós-parto do recém-nascido (HAMILTON; MARTIN; VENTURA, 2011).

2.3.2 Micro-organismos associados à Vaginose Bacteriana: aspectos gerais

Gardnerella vaginalis é uma bactéria anaeróbia facultativa, fastidiosa, β -hemolítica, oxidase e catalase negativa, imóvel, apresenta-se sob a forma de cocobacilos pleomórficos, não possui cápsula, não forma esporos e é Gram-variável (varia do Gram-negativo ao Gram-positivo fraco) (CATLIN, 1992; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011). Não possui membrana externa, e apresenta baixo

conteúdo de peptidoglicano (20%), porcentagem pequena para um micro-organismo Gram-positivo, porém semelhante aos 23% característicos dos Gram-negativos (SILVEIRA; SOUZA; ALBINI, 2010; SADU et al., 1989; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011). Sadhu e colaboradores (1989) concluíram que os isolados de *G. vaginalis* possuem essa variação em relação a sua reatividade à coloração de Gram devido ao fato da sua parede celular ter uma ultraestrutura organizada como a dos Gram-positivos. Todavia, essa estrutura é muito delgada, levando ao equívoco de que possa ser Gram-negativa.

Este micro-organismo foi o primeiro associado como possível agente etiológico da VB e, desde então, tem sido exaustivamente estudado. *Gardnerella vaginalis* foi descrita pela primeira vez em relação à VB em 1955, por Herman Gardner e Charles Dukes, e nomeada inicialmente como *Haemophilus vaginalis*, e somente mais tarde recebeu a nomenclatura atual. Garner e Dukes a descreveram na época como agente etiológico único causador da VB. Entretanto, atualmente sabe-se que *G. vaginalis* não é a única bactéria envolvida na patogênese da VB e que existem outros fatores importantes envolvidos na doença (GARDNER, DUKES, 1955; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008; TUROVSKIY, NOLL, CHIKINDAS, 2011).

O nome *Haemophilus vaginalis* foi primeiramente proposto devido à morfologia da parece celular bacteriana, aparentemente Gram-negativa, e à inabilidade de crescimento em meio de cultura sem sangue. Ocasionalmente, a *H. vaginalis* apresentava reação positiva à coloração de Gram e não requeria hemina nem NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) para seu crescimento, como as outras espécies do gênero, e então foi temporariamente nomeada como *Corynebacterium vaginale*. Contudo, como a bactéria é catalase negativa e não possui arabinose na parede celular ela não se encaixava no gênero *Corynebacterium* (DEANE et al., 1972; DUNKELBERG; SKAGGS; KELLOGG, 1970). Finalmente, após estudos taxonômicos, chegou-se a um consenso com a criação de um novo gênero, *Gardnerella*, por Greenwood e Pickett (1980), sendo a espécie *Gardnerella vaginalis* a única representante desse grupo (GREENWOOD; PICKETT, 1980; PIOT et al., 1980).

Sua importância clínica e científica decorre do fato de ser encontrada em praticamente 100% das mulheres com diagnóstico clínico de VB, exercendo um importante papel na sua patogênese (ESCHENBACH, 1993b; HILL, 1993;

SCHWEBKE, 2009; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011). A associação entre VB e *G. vaginalis* sugere que a colonização vaginal por esse micro-organismo é essencial para o desenvolvimento da doença (SCHWEBKE, 2009). Todavia, *G. vaginalis* foi detectada na microbiota vaginal de 30-50% (por cultura) e 70% (por métodos independentes de cultivo) em mulheres clinicamente saudáveis (FREDRICKS et al., 2007; LIVENGOOD, 2009). No entanto, em termos quantitativos, é encontrada em concentrações maiores em mulheres com vaginose bacteriana (BIAGI et al., 2009; DE BACKER et al., 2007; FREDRICKS et al., 2009; LING et al., 2010; ZARIFFARD et al., 2002; VITALI et al., 2007; ZOZAYA-HINCHLIFFE et al., 2010).

Microscopia eletrônica revelou a presença de fímbrias e exopolissacarídeos, os quais provavelmente estão envolvidos na adesão da *G. vaginalis* às células epiteliais vaginais escamosas formando as chamadas “*clue-cells*”, ou células-guia, importantes para o diagnóstico da VB (SCOTT; CURRAN; SMYTH, 1989; CATLIN, 1992).

Até 2010 pouco era conhecido sobre a genética da *G. vaginalis*. A técnica de AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) para genotipagem entre amostras de *G. vaginalis* recuperados de pacientes com e sem VB revelou que há uma grande diversidade entre os genomas dos diferentes isolados (SOUZA, 2013). Recentemente, o genoma de várias linhagens de *G. vaginalis* foi sequenciado, com tamanho de 1.62 a 1.67 Mb e baixo conteúdo G+C (41-42%). Análises da sequência do gene DNAr 16S de *G. vaginalis* indicaram relação próxima com as bactérias *Bifidobacterium coryneforme* e *Bifidobacterium minimum* (micro-organismos Gram-positivos) (YEOMAN et al., 2010). A análise do genoma de *G. vaginalis* também revelou a ausência de alguns genes que codificam enzimas essenciais a vias bioquímicas importantes, como a via de síntese de aminoácidos, glicólise e ciclo do ácido cítrico, o que interfere diretamente na sua fisiologia e explica, pelo menos em parte, as necessidades nutricionais complexas para o cultivo da bactéria *in vitro* (HARWICH et al., 2010; YEOMAN et al., 2010).

A atividade hemolítica da *G. vaginalis*, um importante fator de virulência da espécie, é devido à produção de uma toxina formadora de poros, a vaginolisina (VLY), pertencente à família das citolisinas dependentes de colesterol (CDC). A vaginolisina lisa seletivamente hemácias e células epiteliais humanas e é capaz de

reconhecer a molécula regulatória CD59 do sistema complemento na superfície das suas células-alvo, o que explica sua especificidade aos eritrócitos humanos (PATTERSON et al., , 2010; PLECKAITYTE, 2012; YEOMAN et al., 2010). *Gardnerella vaginalis* também é capaz de produzir enzimas hidrolíticas, como sialidase e prolina peptidase, que degradam a mucina produzida pelo epitélio vaginal causando danos à mucosa protetora (CAUCI et al., 1998; OLMSTED et al., 2003). A camada de muco cervical exerce um importante papel como barreira contra a invasão de patógenos e infecção dos epitélios cervical e vaginal (SANTIAGO et al., 2011) e, segundo Yeoman et al. (2010), a capacidade de *G. vaginalis* em degradar mucinas pode ser um fator de virulência decisivo na determinação do curso da doença.

Gardnerella vaginalis também é capaz de formar um biofilme aderente ao epitélio vaginal que facilita a adesão (PATTERSON et al., 2010; PLECKAITYTE, 2012). A adesão é um passo fundamental na patogênese, pois permite que a bactéria colonize a mucosa vaginal, minimizando o contato com enzimas extracelulares e anticorpos locais, reduzindo as chances da mesma ser eliminada junto com o fluxo de urina e de secreções vaginais, além de aumentar da tolerância aos antibióticos e resistência às defesas do sistema imune do hospedeiro, levando a falhas no tratamento e recidivas (PATTERSON et al., 2010). Segundo Harwich et al. (2010), a capacidade de aderir ao epitélio vaginal e formar biofilmes pode ser uma diferença chave entre linhagens de *G. vaginalis* em mulheres saudáveis e acometidas pela VB.

Devido ao fato da *G. vaginalis* apresentar alguns fatores de virulência, e ser encontrada em mulheres saudáveis e em doentes, existe a questão entre muitos pesquisadores se poderia haver linhagens comensais e patogênicas dentro da espécie (SANTIAGO et al., 2011). O sequenciamento total do genoma de *G. vaginalis* parece indicar que, na verdade, podem existir linhagens com diferentes graus de virulência (HARWICH et al., 2010; YEOMAN et al., 2010), e esforços têm sido realizados no intuito de aperfeiçoar o conhecimento sobre a patogênese da VB através da divisão da espécie em grupos fenotípicos e genotípicos. Até o momento, foram identificados oito biotipos e três genótipos para *G. vaginalis* (SANTIAGO et al., 2011).

Além da *G. vaginalis*, espécies do gênero *Mobiluncus* têm sido associadas à VB. *Mobiluncus* tem sido identificado em cerca de 50% dos casos de VB, sendo que *M. mulieris* já foi isolado também da microbiota de mulheres saudáveis, enquanto que *M. curtisii* parece ser mais específico para VB (FORSUM et al., 2005; LIVENGOOD, 2009).

Mobiluncus curtisii e *M. mulieris* são organismos fastidiosos, e requerem um tempo de incubação prolongado, pois seu crescimento é lento. Apresentam-se sob a forma de bacilos curvos, altamente móveis e Gram-variáveis e, assim como *G. vaginalis*, são indol, catalase, oxidase e H₂S (ácido sulfídrico) negativos, não formam esporos e possuem flagelos (HILLIER et al., 1991; NUGENT; HROHN; HILLIER, 1991; SPIEGEL, 1991). Ambas as espécies produzem os ácidos succínico, acético e láctico como principais produtos metabólicos. *Mobiluncus curtisii* geralmente cora-se como Gram-variável ou Gram-positivo, ao passo que *M. mulieris* cora-se quase que invariavelmente como Gram-negativo. Apesar de apresentar reatividade variada à coloração de Gram, estudos com base em microscopia eletrônica revelaram que *Mobiluncus* spp. possui parede celular com características estruturais compatíveis a de Gram-positivos, com ausência de lipopolissacarídeo (SPIEGEL, 1991).

Pouco é sabido ainda sobre os fatores de virulência das espécies de *Mobiluncus*. Até o momento, sabe-se que as espécies do gênero são capazes de produzir a enzima prolina dipeptidase, uma enzima hidrolítica que degrada mucina, além de uma citotoxina, já identificada e parcialmente caracterizada, embora o seu papel na patogênese da VB ainda não tenha sido completamente elucidado (FORSUM et al., 2005; TAYLOR-ROBINSON; BORRIELLO; TAYLOR-ROBINSON, 1993).

Atopobium vaginae é um anaeróbio Gram-positivo, fastidioso, não cultivável, produtor de ácido láctico. É encontrado em mais de 95% dos casos de VB e também na microbiota vaginal saudável. Altas concentrações dessa bactéria na microbiota vaginal têm sido associadas à VB. Ambos *A. vaginae* e *Mobiluncus* spp. apresentam alto nível de resistência ao metronidazol, droga comumente empregada no tratamento da VB, e têm sido implicados como os possíveis agentes causadores de falhas no tratamento dessa síndrome (BRADSHAW et al., 2006; FERRIS; MASZTAL; MARTIN, 2004; FREDRICKS et al., 2007; FREDRICKS; FIEDLER; MARAZZO, 2005; LING et al., 2010; LIVENGOOD, 2009).

Alguns estudos têm sugerido a hipótese de que *A. vaginae* possa exercer um papel mais preponderante na patogênese da doença do que *G. vaginalis*, devido ao fato da última ser mais comumente detectada na microbiota vaginal saudável do que *A. vaginae* (BRADSHAW et al., 2006; DATCU et al., 2013; DE BACKER et al., 2007).

Mycoplasma hominis é outro anaeróbio, Gram-negativo, comumente encontrado na VB e tem sido associado à patogênese da doença. É um patógeno oportunista, que reside como comensal no trato urogenital inferior feminino, sendo considerado agente causal da doença inflamatória pélvica e responsável por infecções durante a gravidez. É uma bactéria fastidiosa, de crescimento lento, que requer meios de cultura especializados (FÉRANDON et al., 2011; SCHNEE et al., 2012; THORSEN et al., 1998). As espécies de *Mycoplasma* possuem características únicas, como ausência de parede celular rígida, tamanho pequeno do genoma e número limitado de vias metabólicas funcionais, entretanto são patógenos potenciais (RAZIN, 1997; SCHNEE et al., 2012).

Um fato interessante, contrapondo muito do que foi dito a respeito da patogênese da VB, é que a espécie *Lactobacillus iners*, não produtora de peróxido de hidrogênio, é comumente encontrada na microbiota de mulheres com VB (DATCU et al., 2013; LIVENGOOD, 2009). Muitas são as bactérias potencialmente envolvidas na patogênese da VB, contudo, cada caso de VB tem o seu conjunto único e próprio de espécies (FERRIS et al., 2007).

2.3.3 Etiologia e patogênese

Quando a vaginose bacteriana se desenvolve, os lactobacilos reduzem em concentração, e são substituídos por bacilos Gram-negativos e cocos Gram-variáveis (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991). As culturas dessas amostras de secreção vaginal tipicamente revelam a presença de *G. vaginalis* e uma mistura de outras bactérias, que podem incluir *Prevotella* sp., *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma* sp. (SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008; HAY, 2010).

Algumas mudanças metabólicas podem afetar o balanço microbiológico da VB. A glicose proveniente do glicogênio vaginal não é mais degradada em ácido láctico

pelos lactobacilos produtores de H₂O₂, sendo em contrapartida transformada em ácidos graxos pelas bactérias anaeróbias. Os ácidos graxos aumentam o pH vaginal para acima de 4,5, e criam um ambiente desfavorável ao crescimento dos lactobacilos, ao mesmo tempo que favorecem o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, favorecendo um ciclo que propicia o desenvolvimento da VB (ESCHENBACH, 1989).

Os mecanismos enzimáticos relacionados às bactérias anaeróbias para a degradação de aminoácidos levam à produção de diversos compostos, como as aminas biogênicas ou poliaminas. Altos níveis de aminas biogênicas, tais como putrescina, cadaverina e trimetilamina, têm sido encontrados nas secreções vaginais de mulheres com VB. Todavia, esses mesmos compostos estão ausentes nas secreções vaginais de mulheres saudáveis, o que sugere uma forte relação entre a presença dessas aminas no conteúdo vaginal e VB (WOLRATH et al., 2001).

A VB não é causada apenas pela alteração da diversidade da microbiota vaginal e presença de patógenos potenciais, mas também pelo aumento em número desses micro-organismos, que frequentemente atingem contagens celulares que estão cerca de 100-1000 vezes acima dos níveis bacterianos normais na vagina (ESCHENBACH, 1993a, 1994; FORSUM et al., 2005; ST JOHN; MARES; SPEAR, 2007).

O início do desenvolvimento da VB é decorrente provavelmente de múltiplos fatores, e ainda não está bem compreendido principalmente pela falta de um modelo animal que reproduza a doença (CDC, 2010; HAY, 2010; TUROVSKIY; NOLL; CHIKINDAS, 2011). As mudanças hormonais e a presença de organismos provenientes do parceiro também podem ser importantes. No entanto, ainda não está esclarecido se o evento primário para o início da VB é a perda de espécies de *Lactobacillus* chave ou a aquisição das complexas comunidades microbianas encontradas nessa síndrome, ou ainda se esses são processos simultâneos (Figura 1). É também possível que outros fatores propiciem o desenvolvimento da VB e que as mudanças da microbiota vaginal reflitam um evento posterior na patogênese da VB (HAY, 2010; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

A secreção vaginal é uma resposta fisiológica do organismo feminino que independe de qualquer processo patológico. Porém, quando algum processo infeccioso ou inflamatório está presente, essa secreção modifica-se, resultando no

corrimento vaginal, que é a principal queixa ginecológica das pacientes que procuram a atenção médica. Quando a VB instala-se, ocorre o desequilíbrio da microbiota, com irritação vaginal de origem bacteriana e dispareunia, acompanhadas por um corrimento homogêneo e fétido e alteração no pH vaginal, com concomitante ausência de inflamação e pequeno número de leucócitos (CATLIN, 1992; MARTIN, 2012).

Tal corrimento vaginal é típico da VB sintomática, e caracteriza-se por ser uma secreção abundante, fina, homogênea e leitosa, de odor desagradável que é exacerbada após a prática de relações sexuais sem o uso de preservativo e durante a menstruação (DICKEY; NAILOR; SOBEL, 2009; FILHO; DINIZ; SILVA, 2010). O odor fétido exalado pelo corrimento é causado pela produção das amins cadaverina, putrescina e trimetilamina pelas bactérias anaeróbias. Essas amins volatilizam-se rapidamente em pH elevado, de modo que tal cheiro é frequentemente notado pelas mulheres doentes quando a alcalinidade vaginal está ainda mais elevada após a prática de relações sexuais, pelo depósito de sêmen, e durante a menstruação, devido à presença de sangue (LIVENGOOD, 2009).

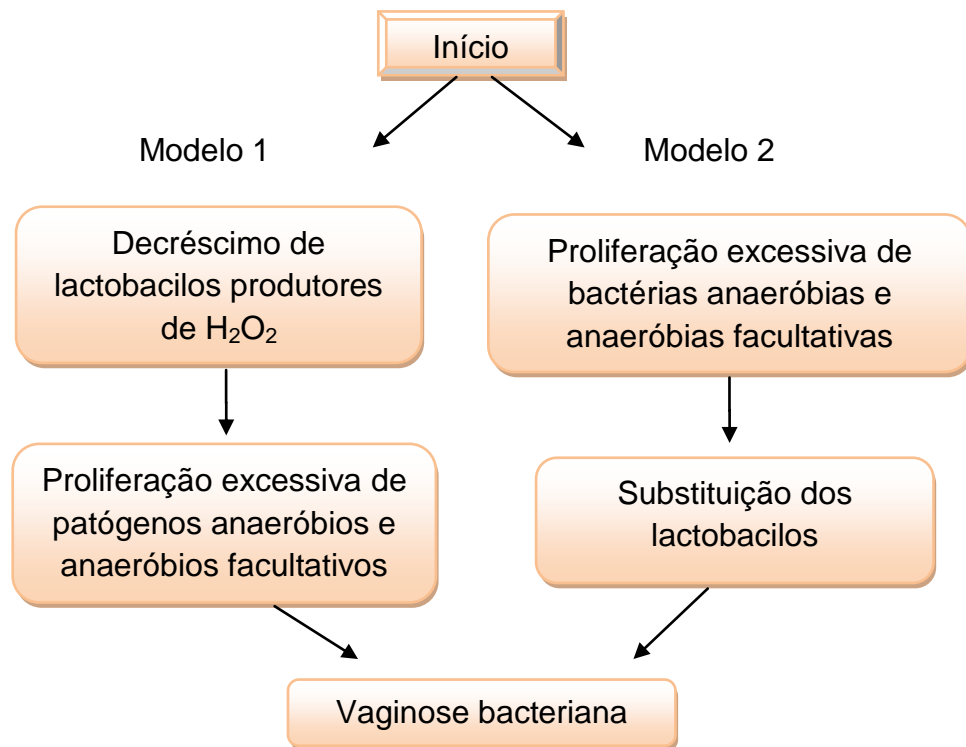


Figura 1 – Modelos concorrentes para a patogênese da vaginose bacteriana. FONTE: Adaptado de Srinivasan e Fredricks (2008).

Durante a VB, sintomas inflamatórios e prurido não são comuns devido à quase completa ausência de neutrófilos polimorfonucleares, sugerindo que os micro-organismos envolvidos nessa doença não invadem a camada subepitelial. A inibição da quimiotaxia na VB é uma consequência da presença dos ácidos acético e succínico, os quais são produtos finais do metabolismo das bactérias anaeróbias e capazes de inibir a migração leucocitária. Essas razões explicam por que tal síndrome é nomeada “vaginose” e não “vaginite” (DICKY; NAILOR; SOBEL, 2009; KONEMAN et al., 2008).

De acordo com Kalra et al. (2007), a VB sintomática contabiliza cerca de 60% dos casos. Não obstante, as mulheres com VB apresentam corrimento vaginal fétido ou irritação local e quase metade das mulheres com diagnóstico de VB não apresentam sintomas claros da doença (AMSEL, et al., 1983). Algumas mulheres relatam não ter corrimento vaginal anormal, mas ao realizar o exame clínico dessas pacientes o médico muitas vezes detecta a presença de secreção, o que evidencia que muitas pacientes não estão cientes do seu diagnóstico ou consideram que o seu corrimento está dentro das condições normais de saúde (SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008). Em cerca de 40% dos casos a VB é assintomática (KALRA, et al., 2007).

A alta prevalência de VB e a falta de sintomas em uma parcela substancial das mulheres afetadas levaram ao questionamento se a VB deveria ser considerada uma variante normal da microbiota vaginal ou uma doença por si só. Para mulheres afetadas por VB sintomática manifestada pela presença do corrimento vaginal característico e menos frequentemente por inflamação e coceira locais, não se questiona a presença da doença. Já no caso das pacientes com evidência laboratorial de VB, mas sem sintomas, a designação de doença pode ser inapropriada, embora essa condição ainda signifique risco aumentado de eventos adversos para a saúde causados pela VB (SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

Os micro-organismos associados à VB e seus produtos metabólicos diferem consideravelmente entre os indivíduos com VB, o que torna também diferente o risco entre as mulheres afetadas de desenvolver as sequelas adversas causadas pela doença (KOUUMANS; KENDRICK, 2001).

Tem-se assumido que a bactéria *G. vaginalis*, reconhecidamente associada à VB, produz toxinas que tornam as mulheres afetadas mais susceptíveis à produção

de citocinas e prostaglandinas, que podem desencadear o trabalho de parto prematuro (FACHINI et al., 2005; MORRIS et al., 2001). Adicionalmente, a colonização microbiana em direção ao cérvix, placenta e fluido amniótico e a produção de protease podem estar relacionados à ruptura de membranas (FACHINI et al., 2005). Do mesmo modo, foi sugerido que a produção de enzimas mucolíticas, como sialidases e mucinases, no ambiente vaginal, é mais alta em mulheres com VB. Essas enzimas podem interferir com a fisiologia local e, por conseguinte, favorecer o desenvolvimento da doença inflamatória pélvica, infertilidade, dor pélvica crônica e nascimento prematuro (FACHINI et al., 2005; RIGGS; KLEBANOFF, 2004).

De acordo com Koumans e Kendrick (2001), a relação entre nascimento prematuro e VB foi demonstrada em pelo menos 12 estudos epidemiológicos conduzidos nos cinco continentes com mulheres grávidas, em diferentes estágios de gravidez.

Os micro-organismos associados à VB, especialmente *G. vaginalis* e *Prevotella* spp., são considerados fatores de alto risco para infecções intra-amnióticas (GOLDENBERG; HAUTH; ANDREWS, 2000; HASHEMI et al., 2000). As toxinas produzidas por esses micro-organismos são capazes de atravessar a placenta e estão entre as principais causas de injúria cerebral em fetos. VB também é tradicionalmente considerada um fator de risco para consequências neurológicas em longo prazo em crianças, tais como hiperatividade, dificuldades acadêmicas e deficiências graves, como paralisia cerebral (ESCHENBACH, 1997; GREYER; NELSON, 2000; LING et al., 2004). Altas concentrações de lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina típica de bactérias Gram-negativas, foram encontradas em amostras vaginais de mulheres com VB. O LPS é capaz de induzir dano no sistema dopaminérgico em neonatos (LING et al., 2004).

Embora todas essas associações já tenham sido provadas, vários estudos são conflitantes a respeito do benefício do tratamento da VB em mulheres grávidas com VB assintomática, consideradas pacientes de alto risco (WORKOWSKY; BERMAN, 2006; KOUMANS; KENDRICK, 2001). Conforme as diretrizes do *United States Preventive Services Task Force* (USPSTF) revisado em 2008, não há evidências consistentes que corroboram qualquer benefício de saúde no tratamento da VB gestacional em pacientes assintomáticas consideradas de alto risco para o parto prematuro (NYGREN et al., 2008).

Em contrapartida, a VB parece aumentar o risco de aquisição, transmissão ou reativação de alguns vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), herpes vírus tipo 2 e papilomavírus humano (CHERPES et al., 2003; MARTIN, 2012; WATTS et al., 2005).

Outro fator que emerge como crítico para a patogênese da VB é a formação de biofilmes (SWIDSINSKI et al., 2005). Os biofilmes estão intimamente associados com infecções humanas e até com 65% das infecções tratadas por médicos em países desenvolvidos (COSTERTON et al., 2003; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). A presença de um biofilme polimicrobiano denso e estruturado, aderente ao epitélio vaginal e primariamente composto por *G. vaginalis*, tem sido relatada em pacientes com VB (SWIDSINSKI et al., 2005). Os biofilmes aderentes foram definidos como camadas de bactérias fortemente unidas na superfície do epitélio vaginal e que contém grupos bacterianos específicos. Estudos realizados com pacientes acometidas pela VB detectaram a presença de biofilme aderente, composto por três grupos principais, sendo que *G. vaginalis* compõe a maioria da massa de biofilme, seguida por *A. vaginae* e lactobacilos, presentes na minoria das amostras (SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

Todavia, a etiologia da VB não foi totalmente elucidada até o momento e por isso, abordagens visando à prevenção primária e secundária da VB são difíceis de serem estabelecidas. Uma compreensão mais profunda da etiologia, epidemiologia e história natural da doença é necessária para o melhor estabelecimento de políticas de saúde pública (KOUMANS; KENDRICK, 2001).

2.4 MÉTODOS MOLECULARES INDEPENDENTES DE CULTIVO: ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE), HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

A caracterização da composição e ecologia do ecossistema microbiano vaginal em mulheres saudáveis e com sintomas de VB é importante para a compreensão da

etiologia da doença e para o desenvolvimento de terapias eficazes (VITALI et al., 2007).

Grande parte do conhecimento atual sobre a microbiota vaginal é baseado em bactérias cultivadas e identificadas por métodos convencionais, dependentes de cultivo, e métodos de identificação bioquímica. As técnicas microbiológicas convencionais são úteis como ferramentas de triagem na identificação de mulheres com VB, no entanto, não permitem a determinação da carga clínica associada à doença. Dessa forma, para uma melhor compreensão da composição e dinâmica da microbiota vaginal juntamente com os fatores associados à patologia da vaginose bacteriana, é necessária a utilização de outras metodologias (MORRIS et al., 2001).

Devido à impossibilidade em cultivar muitas espécies microbianas residentes na vagina, não havia uma compreensão completa da composição taxonômica da comunidade microbiana vaginal, sua estrutura e função (LING et al., 2010).

Os métodos dependentes de cultivo e de identificação bioquímica tradicionais não permitem a identificação de bactérias não cultiváveis, o que prejudica o estudo de comunidades bacterianas complexas. Tal fato é verdadeiro especialmente para a VB. Até pouco tempo, espécies importantes, como *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* eram agrupadas dentro do complexo *L. acidophilus*, ao passo que as técnicas moleculares atuais tornaram possível a diferenciação entre essas espécies filogeneticamente relacionadas (ANTONIO; HAWES; HILLIER, 1999; BAELE et al., 2002; BURTON; REID, 2002; PAVLOVA et al., 2002; TARNBERG et al., 2002; VÁSQUEZ et al., 2002). Avanços recentes nas técnicas moleculares têm contribuído para o aumento do conhecimento sobre a microbiota vaginal, e tem permitido a associação de algumas bactérias à VB pela primeira vez, como *A. vaginae* (BRADSHAW et al., 2006; DE BACKER et al., 2007; FREDRICKS et al., 2007).

Técnicas moleculares independentes de cultivo têm se revelado ferramentas eficazes no estudo da diversidade filogenética de micro-organismos encontrados em ecossistemas complexos e na compreensão da dinâmica dessas comunidades (COOLEN et al., 2005; HYMAN et al., 2005; ZHOU et al., 2004). Atualmente, é possível investigar a diversidade bacteriana em diferentes micro *habitats* utilizando métodos moleculares de *fingerprinting* genético e análise da sequência do gene DNAr 16S (LING et al., 2010). Análises das sequências do gene DNAr 16S

provenientes de comunidades microbianas sugerem que somente uma pequena porcentagem das bactérias presentes na natureza foram identificadas, mesmo nos ambientes mais estudados (WARD; WELLER; BATESON, 1990).

Dentre os métodos moleculares de *fingerprinting* genético, a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante acoplada à Reação em Cadeia da Polimrase (PCR-DGGE) representa uma técnica rápida e confiável para caracterizar a microbiota e espécies predominantes em várias comunidades microbianas, incluindo a comunidade microbiana vaginal (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993; VITALI et al., 2007). O DGGE pode ser utilizado com o intuito de estimar qualitativamente a diversidade da microbiota vaginal de mulheres saudáveis e sintomáticas para a VB, bem como para identificar mudanças populacionais chave relevantes ao desenvolvimento da doença (LING et al., 2010).

Todavia, deve-se considerar que a técnica de PCR-DGGE não é sensível para a detecção de espécies pouco abundantes em uma comunidade bacteriana. A ausência da sequência do gene DNAr 16S de determinadas espécies não indica a ausência das mesmas (FREDRICKS et al., 2007).

A Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) é um método molecular utilizado para identificar e quantificar micro-organismos em uma ampla variedade de ambientes. A técnica combina a simplicidade da observação microscópica e a especificidade da hibridização da sonda com sequências nucleotídicas de DNA ou RNAr, permitindo a detecção de espécies ou táxons e sua visualização morfológica. Dessa forma, permite verificar a presença dos micro-organismos em um determinado tecido e localizá-los em *habitats* específicos (FREDRICKS, 2011; MACHADO et al., 2013).

A técnica de FISH é de fácil execução e permite a detecção dos organismos-alvo tanto em amostras ambientais quanto em amostras clínicas em poucas horas (AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H., 1995; WAGNER, M.; HAIDER, S., 2012). Todavia, a técnica de FISH possui baixa sensibilidade para a detecção de bactérias presentes em baixas concentrações nas amostras analisadas. O uso da FISH em conjunto a PCR quantitativa em tempo real contrapõe esse viés (SWIDSINSKI et al., 2011).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. É uma técnica altamente sensível e que permite a amplificação e quantificação de sequências específicas de ácidos

nucleicos pela detecção do produto da PCR em tempo real (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; QIAGEN, 2009).

A PCR quantitativa em tempo real é adequada a diversas aplicações, dentre elas a determinação da carga microbiana (QIAGEN, 2009). Por meio da qPCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para gêneros e espécies, é possível quantificar bactérias previamente selecionadas presentes em comunidades microbianas complexas, pela medida da quantidade de produtos da PCR formados a cada ciclo sob a forma de fluorescência (BARTOSCH et al., 2004; CONVERT et al., 2005; MALINEN et al., 2005; MATSUKI et al., 2004; SAKAMOTO et al., 2001). Dessa forma, uma vez que é possível desenvolver metodologias de qPCR para várias espécies específicas da microbiota vaginal, essa técnica poderia ser utilizada como um meio menos subjetivo de diagnóstico da VB em comparação aos métodos disponíveis atualmente (ZARIFFARD et al., 2002). Ensaio de qPCR tem revelado que bactérias como *A. vaginae* e *G. vaginalis*, dentre outras, apresentam-se em número elevado na VB, enquanto que a concentração de *Lactobacillus* spp. está reduzida (BIAGI et al., 2009; FREDRICKS et al., 2009; VITALI et al., 2007). Tais estudos sobre a abundância de espécies na VB são essenciais para descrever a ecologia das comunidades microbianas e compreender os seus papéis na saúde e na doença (ZOZAYA-HININCHLIFFE et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a diversidade bacteriana em amostras de secreção vaginal e determinar qualitativamente e quantitativamente grupos de bactérias de relevância clínica e epidemiológica na microbiota vaginal, em mulheres saudáveis e com vaginose bacteriana (VB), em pacientes atendidas no serviço de ginecologia da rede pública (SUS) e privada de Juiz de Fora, MG, por técnicas independentes de cultura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a estrutura da comunidade bacteriana, comparativamente, em secreção vaginal de mulheres saudáveis e com diagnóstico clínico de VB, pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE), direcionada à pesquisa do domínio Bacteria, e dos filos Firmicutes e Actinobacteria
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a ocorrência de filos Actinobacteria, Firmicutes, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria e γ -Proteobacteria pela técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) nas amostras de secreção vaginal de pacientes saudáveis e com VB.
- Determinar a carga bacteriana de *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis* e *Lactobacillus* spp. em amostras de secreção vaginal de pacientes saudáveis e com VB pela técnica de PCR quantitativa em tempo real.
- Correlacionar os dados sobre a quantificação de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., e *Lactobacillus* spp. nas amostras de secreção vaginal das pacientes saudáveis e com VB, com o escore de Nugent utilizado como ferramenta para o diagnóstico clínico de VB.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO AMOSTRADA

As amostras utilizadas são provenientes de pacientes do sexo feminino, atendidas em consultório ginecológico particular da cidade de Juiz de Fora/MG e no Serviço de Ginecologia do HU-CAS/UFJF. As amostras foram coletadas durante o período de abril de 2011 a abril de 2012. Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: todas as pacientes que realizaram o exame de Papanicolau, que não fizeram uso de drogas antibacterianas e antifúngicas sistêmicas nos últimos 30 dias, que não mantiveram relação sexual nos cinco dias que antecederam ao exame, que não utilizaram produtos tópicos vaginais e que aceitaram participar do estudo, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde). Foram considerados critérios de exclusão: pacientes grávidas, pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de infecções cérvico-vaginais por outras causas, além daquelas que não consentiram em participar do estudo.

Todas as pacientes, sintomáticas e assintomáticas, forneceram amostras de secreção vaginal através da coleta por *swabs* vaginais. No total foram analisadas secreções de 81 pacientes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob parecer número 152/2011. As amostras foram previamente submetidas ao exame microscópico direto após coloração de Gram para a determinação do escore de Nugent (Anexo A) e visualização de células epiteliais recobertas por bactérias (*clue cells*).

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE SECREÇÃO VAGINAL

O DNA total das amostras de secreção vaginal foi extraído utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante, com pequenas

modificações. No Apêndice D: Protocolos para Bactérias, tópico Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram positivas, após a adição de 20 µL de proteinase K (QIAGEN) e 200µL de tampão AL (QIAGEN) as amostras foram incubadas a 56°C por 30 min, porém a incubação adicional das mesmas a 95°C por 15 min foi eliminada. Os passos posteriores da extração foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA genômico foram armazenadas a -20°C para posterior análise.

4.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE BACTERIANA VAGINAL

O perfil genético das diferentes populações bacterianas presentes nas amostras de secreção vaginal foi avaliado pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN,1993).

4.3.1 Amplificação de DNAr 16S de representantes do domínio Bacteria utilizando oligoiniciadores específicos

Fragments do gene codificador dos RNAr 16S de grupos microbianos específicos representantes do domínio Bacteria foram amplificados por PCR. O molde utilizado para as reações de amplificação foi o DNA total bacteriano extraído das amostras de secreção vaginal.

Para amplificar a região dos genes DNAr 16S de Bacteria e avaliar as possíveis diferenças entre as amostras classificadas de acordo com o escore de Nugent, foi utilizada a técnica de *Nested-PCR* (HEUER et al., 1997 e GOMES et al., 2001) com os pares de oligoiniciadores F984GC/R1492 e F984GC/R1378 (Tabela 1). Essa técnica consiste na realização de uma primeira reação de amplificação seguida de um posterior amplificação utilizando como DNA molde os amplicons da primeira reação. A reações de PCR continham aproximadamente 90 ng/µL de DNA total, 0,5

μL de cada primer (10 μM) e como mistura da reação foi utilizado o PCR *Master Mix*[®] (Promega) que contém Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento dos oligoiniciadores e 72°C por 1 minuto para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para amplificar fragmentos dos DNAr 16S de grupos específicos de Bacteria também foi utilizada a técnica de *Nested-PCR* (HEUER et al., 1997 e GOMES et al., 2001) com os oligoiniciadores específicos BLS342F/R1392 para Firmicutes e F243HGC/R1492 para Actinobacteria (Tabela 1). A primeira reação de amplificação fornece os fragmentos específicos para cada um dos grupos estudados, que servem como molde para uma segunda etapa de amplificação, a partir de oligoiniciadores específicos e universais para Bacteria (Figura 2).

Os filos Firmicutes e Actinobacteria foram selecionados por abrangerem espécies e gêneros pesquisados na qPCR e que estão relacionados à vaginose bacteriana. O gênero *Lactobacillus* e a espécie *M. hominis* pertencem ao filo Firmicutes e o gênero *Mobiluncus* e as espécies *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* pertencem ao filo Actinobacteria.

A amplificação de fragmentos dos DNAr 16S de Bacteria do filo Firmicutes continha aproximadamente 90 ng/μL de DNA total proveniente da primeira reação, 0,5 μL de cada primer (10 μM) e como mistura da reação foi utilizado o PCR *Master Mix*[®] (Promega). A PCR foi realizada sob as seguintes condições (BLACKWOOD et al., 2005): temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 57°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 90 segundos para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

A amplificação de fragmentos dos DNAr 16S de Bacteria do filo Actinobacteria continha aproximadamente 90 ng/μL de DNA total proveniente da primeira reação, 0,5 μL de cada primer (10 μM) e como mistura da reação foi utilizado o PCR *Master Mix*[®] (Promega). A PCR foi realizada sob as seguintes condições (HEUER et al., 1997): temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 63°C por 1 minuto para

anelamento e 72°C por 2 minutos para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

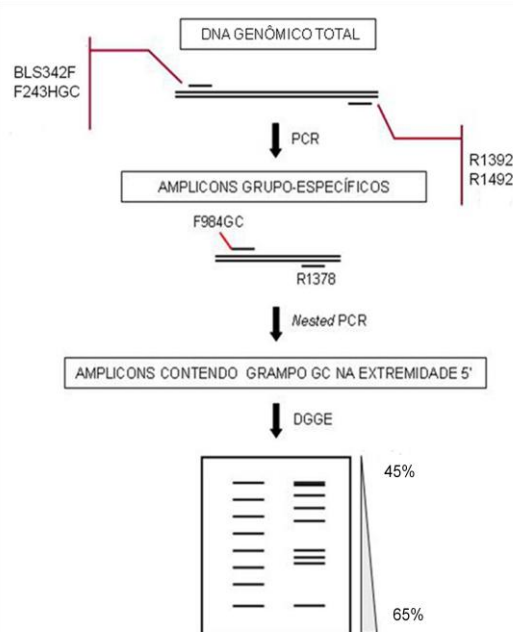


Figura 2 - Diagrama esquemático da técnica de *Nested-PCR* utilizada para análise da diversidade do domínio Bacteria em amostras de secreção vaginal por PCR-DGGE.

Os produtos de PCR obtidos nas reações para os dois grupos de Bacteria estudados, a partir dos diferentes grupos de oligoiniciadores específicos para cada grupo, foram usados como molde de DNA para uma segunda reação de PCR, *Nested-PCR* (HEUER et al., 1997 e GOMES et al., 2001). Nesta reação foram utilizados os oligoiniciadores universais para bactérias F984GC/R1378 (HEUER et al., 1997) (Tabela 1). As reações de PCR continham 0,5 µL de cada primer (10 µM) e como mistura da reação foi utilizado o PCR *Master Mix*[®] (Promega). A PCR foi realizada sob as seguintes condições (GELSOMINO; CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Em todas as reações para os diferentes grupos foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Techne[®] TC-412. Os *amplicons* obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose (Pronadisa) 1,2% em TBE (Tris-base, ácido bórico e EDTA), e brometo de etídio.

Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de *100bp plus DNA ladder ready-to-use* (Bioron) para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

Tabela 1 – Sequência dos oligoiniciadores usados para amplificar fragmentos de genes DNAr 16S.

<i>Primer</i>	DNAr 16S alvo	Sequência (5' → 3')	Referência
F984GC	Bacteria	gc.- AACGCGAAGAACCTTAC	HEUER et al., 1997
R1492	Bacteria	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	HEUER et al., 1997
R1378	Bacteria	ACGGGCGGTGTGTACA	BLACKWOOD et al., 2006
F243HGC	Actinomycetales	GGATGAGCCC GCGGCCTA	HEUER et al., 1997
R1392	Bacteria	ACGGGCGGTGTGTACA	BLACKWOOD et al., 2006
BLS342F	Gram-positivas de baixo conteúdo G+C	CAGCAGTAGGGAATCTTC	BLACKWOOD et al., 2006
¹ gc.		CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGG	MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993

4.3.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento “*DCode™ Universal Mutation Detection System*” (BioRad – Califórnia, USA).

Foram aplicados 20 µL dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X. O gradiente desnaturante variou linearmente de 45% a 65% para a análise dos fragmentos. O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 *Gradient Delivery System* – BIO-Rad Califórnia, USA), uma com 45% e a outra com 65% dos agentes desnaturantes (uréia 7 M e formamida desionizada 40% (v/v)). Além das soluções estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio (polimerizador), 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-

¹ gc.: sequência rica em G+C (Grampo-GC) ligada à extremidade 5' (MUYZER et al., 1993).

tetrametiletileno diamino) (catalisador) e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel, antes da aplicação das amostras, foi de três horas.

Uma mistura de fragmentos de DNAr 16S amplificados das seguintes espécies e gênero bacterianos foram utilizadas como marcadores: *Garnerella vaginalis* ATCC 49145, *Staphylococcus aureus* ATCC 35591, *Bacteroides fragilis* ATCC 43859, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 35667, *Lactobacillus johnsonii*, *Mobiluncus* spp. e *Atopobium vaginae*.

A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60°C e voltagem constante de 50V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBER® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no transluminador ultravioleta *ImageQuant 100* (GE Healthcare) e capturada com o auxílio da câmera ED LENS SP-500 UZ (Olympus).

4.4 FISH (HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU*)

A técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) foi utilizada para identificação de grupos bacterianos e enumeração de bactérias presentes na secreção vaginal de mulheres saudáveis e com vaginose bacteriana. Foram utilizadas cinco sondas de oligonucleotídeos específicas ao RNAr 16S dos diferentes filos pesquisados (*Operon Technologies Inc.* Alameda, CA, USA), marcadas com o fluoróforo Cy3 (Tabela 2).

As amostras de secreção vaginal foram fixadas em paraformaldeído 2% na proporção de 1:10 por uma noite e depois filtradas em filtro policarbonato 0.2 µm. Após a filtração, os filtros foram divididos em seis pedaços, uma para cada sonda filo-específica e outra para a sonda negativa (Tabela 2). Cada pedaço de filtro foi colocado em uma lâmina de vidro revestida com parafilme e foi coberto com 40 µL da solução de hibridização na concentração final de 2,5 ng/µL da sonda de oligonucleotídeo de interesse. A solução de hibridização é composta por NaCl 0,9 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), dodecil sulfato de sódio a 0,01% e a concentração de formamida específica para cada sonda (Tabela 3). As lâminas contendo os filtros embebidos na solução de hibridização contendo a sonda de interesse foram

incubadas em estufa a 42°C por 4h. Após o período de hibridização, os filtros foram transferidos para uma solução de lavagem contendo Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, dodecil sulfato de sódio a 0,01% e NaCl a uma concentração específica para cada sonda, e então os filtros foram incubados a 48°C por 15 min. Após a segunda incubação as células bacterianas foram coradas com uma solução de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) na concentração de 2 µg/mL para a contagem bacteriana total. Cada pedaço de filtro foi imerso em etanol 80% por três vezes e deixado secar. Ao final, os filtros contendo as células bacterianas hibridizadas foram fixados em uma segunda lâmina de vidro utilizando uma mistura de glicerol e *Vectashield* (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA*) na proporção de 4:1 e recobertos com lâminula para posterior análise microscópica.

Tabela 2 – Sequência das sondas utilizadas para hibridização ao RNAr 16S alvo.

Sonda	Taxon	Sequência (5' → 3')	Referência
Alf986	α-Proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	MANZ et al., 1996
Bet42a	β-Proteobacteria	GCCTTCCCACCTTCGTTT	MANZ et al., 1992
Gam42a	γ-Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	MANZ et al., 1992
LGC354b	Firmicutes	CGGAAGATTCCCTACTGC	MEIER et al., 1999
HGC69a	Actinobacteria	TATAGTTACCACCGCCGT	MANZ et al., 1992
Non	Controle Negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	WALLNER; AMANN; BEISKER, 1993

Tabela 3 – Proporção de formamida em porcentagem na solução de hibridização de acordo com a sonda de interesse.

Sonda	Proporção de formamida (%) (solução de hibridização)
α – Proteobacteria	30%
β – Proteobacteria	30%
γ – Proteobacteria	30%
Firmicutes	35%
Actinobacteria	30%

A contagem das células bacterianas totais e a contagem de células pertencentes a cada um dos filos foram realizadas utilizando o microscópio *Olympus BX60* equipado com os filtros DAPI 31000 e Cy3 41007a (*Chroma, Bellows Falls, VT, USA*), respectivamente. A contagem foi realizada em 10 campos aleatórios por um único pesquisador treinado. O número final de bactérias foi calculado levando-se em

consideração as diluições realizadas durante o tratamento das amostras. Os resultados foram expressos em células/mL.

Para a documentação das imagens foram realizadas microfotografias com o auxílio da câmera *Evolution VF Color Cooled* (Media Cybernetics Inc., MD, USA), acoplada ao microscópio.

4.5 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

A determinação da carga bacteriana de *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Lactobacillus* spp. e *M. hominis* em pacientes assintomáticas e sintomáticas para VB foi realizada por PCR quantitativa em tempo real. As análises quantitativas foram realizadas no termociclador *Rotor-Gene Q* (QIAGEN), utilizando o *Rotor-Gene Syber Green PCR Master Mix* (QIAGEN) para monitorar a síntese de DNA fita dupla. As reações foram montadas em volume final de 25 µL, conforme instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em duplicata e padronizadas na concentração de 10 ng/µL.

Para a amplificação do gene *cpn60* de *Gardnerella vaginalis*, e DNAr 16S de *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma hominis*, oligoiniciadores específicos foram utilizados (Tabela 4). A qPCR foi realizada sob as seguintes condições (QIAGEN, 2009): desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 seg e anelamento a 60°C por 10 seg. A qualidade dos oligoiniciadores foi verificada pelo programa *OligoAnalyzer 3.1* (<http://www.idtdna.com>).

As curvas padrão das bactérias *G. vaginalis* e *M. hominis* foram construídas a partir de diluições seriadas ($10^7 - 10^1$ cópias/µL) do DNA genômico de *G. vaginalis* ATCC 14019, *M. hominis* ATCC 15488 e utilizadas para determinação da concentração de *G. vaginalis* e *M. hominis* em cópias/µL das amostras. Para a montagem da curva padrão de *Lactobacillus* spp. foi utilizado DNA genômico de *Lactobacillus johnsonii* gentilmente cedido pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia Microbiana (LEFM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Tabela 4 – Gene alvo, sequência dos oligoiniciadores e condições da PCR utilizados na quantificação da carga bacteriana de *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *M. hominis*, *Mobiluncus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Gene	Sequência dos primers (5'- 3')	Tamanho do amplicon (pb ²)	Referência
<i>cnp 60 (G. vaginalis)</i>	F – CGCATCTGCTAAGGATGTTG R – CGCATCTGCTAAGGATGTTG	91	MENARD et al., 2008.
DNAr 16S (<i>A. vaginae</i>)	F – CCCTATCCGCTCCTGATACC R – CCAAATATCTGCGCATTTC	86	MENARD et al., 2008.
DNAr 16S (<i>Lactobacillus</i> spp.)	F – ATGGAAGAACACCAGTGGCG R – CAGCACTGAGAGGCGGAAAC	151	ZARIFFARD et al., 2002.
DNAr 16S (<i>Mobiluncus</i> spp.)	F – CCACGCTGTAAACGTTGGGAA R – TGGCCCATCTCTGGAACCA	219	SRINIVASAN et al., 2010.
DNAr 16S (<i>Mycoplasma hominis</i>)	F - AGGTTAGCAATAACCTAGCGGCGA R – TTACAGCGCCTTTCACAACGGAAC	138	ZOZAYA-HINCHLIFFE et al., 2010.

As curvas padrão para a quantificação de *A. vaginae* e *Mobiluncus* spp. foram montadas a partir de DNA plasmidial contendo o gene DNAr 16S de interesse. O plasmídeo pGEM[®]-T *Easy* (Promega) contendo o gene DNAr 16S de *A. vaginae* e *Mobiluncus* spp. foi obtido pela clonagem do produto de amplificação da região de interesse no DNA genômico de *A. vaginae* e *Mobiluncus* spp. A linhagem de células competentes JM109 (Promega) foi utilizada para a clonagem. A partir de diluições seriadas ($10^7 - 10^1$ cópias/ μ L) do DNA plasmidial foram construídas curvas padrão para a quantificação do número de cópias de DNAr 16S de cada bactéria presente nas amostras de secreção vaginal.

O resultado obtido em cópias/ μ L foi convertido para cópias/mL levando-se em consideração o volume inicial de secreção vaginal utilizado para a extração de DNA total e o volume do conteúdo extraído.

O DNA genômico de *G. vaginalis* ATCC 14019, *M. hominis* ATCC 15488 e do isolado vaginal sequenciado *L. johnsonii* foi extraído utilizando o kit de extração *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e o DNA plasmidial contendo o gene DNAr 16S de *A. vaginae* e *Mobiluncus* spp. foi extraído com o kit *AxyPrep Plasmid Miniprep Kit* da *Axygen Biosciences*

² pb: pares de bases

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados da PCR quantitativa em tempo real, as médias dos grupos foram avaliadas pelo “teste t de *Student*”. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A avaliação da relação entre o escore de Nugent e a quantificação das espécies e gêneros bacterianos bem como a relação entre as espécies e gêneros bacterianos foi realizada pela análise de regressão linear e correlação de *Pearson*. Todas as comparações foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA*).

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis de DGGE foi realizada utilizando o programa *Bionumerics 7.1*. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente “*Dice*” de similaridade e no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos. Análise de componente principal (PCA) também foi realizada para avaliar o grau de similaridade entre as amostras. Os dados obtidos com o auxílio do programa *Bionumerics 7.1* foram utilizados para calcular a riqueza com o auxílio do programa *PAST 3.0*. A variável riqueza foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como “1” e ausência como “0”. Para a análise dos resultados de riqueza as médias dos grupos foram avaliadas pelo “teste t de *Student*”. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo e as comparações foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA*).

Para analisar os resultados da quantificação bacteriana por FISH as médias dos grupos saudável e doente em cada filo pesquisado foram avaliadas também pelo “teste t de *Student*”. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as comparações foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA*).

5 RESULTADOS

5.1 ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

O estudo do perfil da diversidade bacteriana utilizando *nested* PCR-DGGE revelou diferenças na estrutura das comunidades bacterianas de todas as amostras (Figuras 3, 4 e 5). O *fingerprint* obtido a partir dos géis para o domínio Bacteria e os filos Actinobacteria e Firmicutes foi usado para comparar a diversidade bacteriana entre as amostras de secreção vaginal provenientes de pacientes saudáveis, intermediárias e com VB, classificadas pelo escore de Nugent. A análise dos agrupamentos dos três dendogramas mostrou que, com algumas exceções, os perfis de pacientes apresentando o mesmo *status* de saúde (i. e. pacientes saudáveis ou acometidas pela VB) tenderam a se agrupar, porém em *clusters* separados. Nos três dendogramas analisados, os agrupamentos por PCR-DGGE parecem ser regidos pelo *status* de saúde das pacientes. Em todos os casos, os agrupamentos foram sustentados pelos altos coeficientes de correlação cofenética. A correlação cofenética é a correlação entre as similaridades derivadas de um dendograma e a matriz de similaridade, sendo considerada um parâmetro que expressa a consistência de um *cluster*.

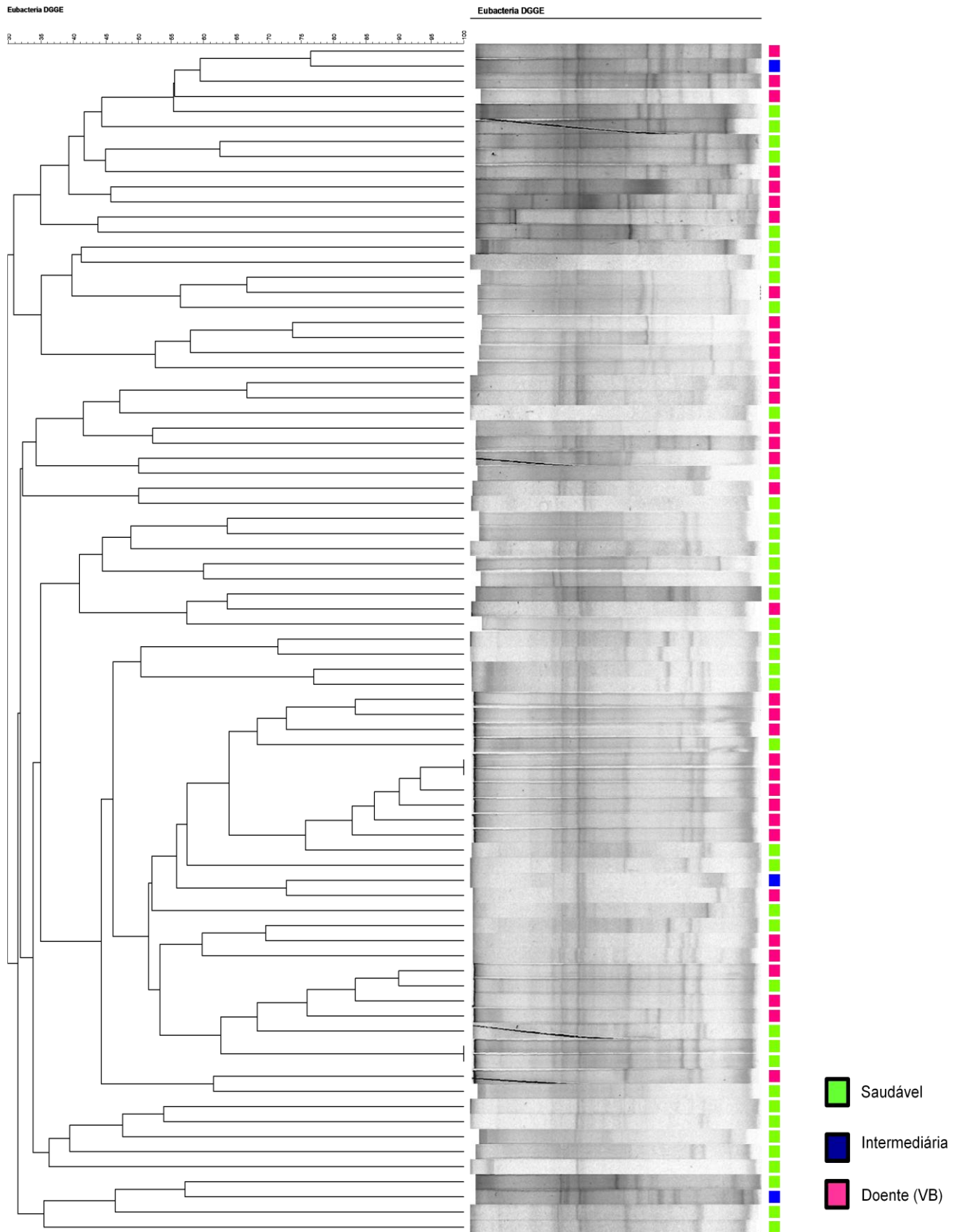


Figura 3 – DGGE *fingerprinting* e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano DNAr 16S específicos para o domínio Bacteria amplificados a partir do DNA genômico extraído de amostras de secreção vaginal.

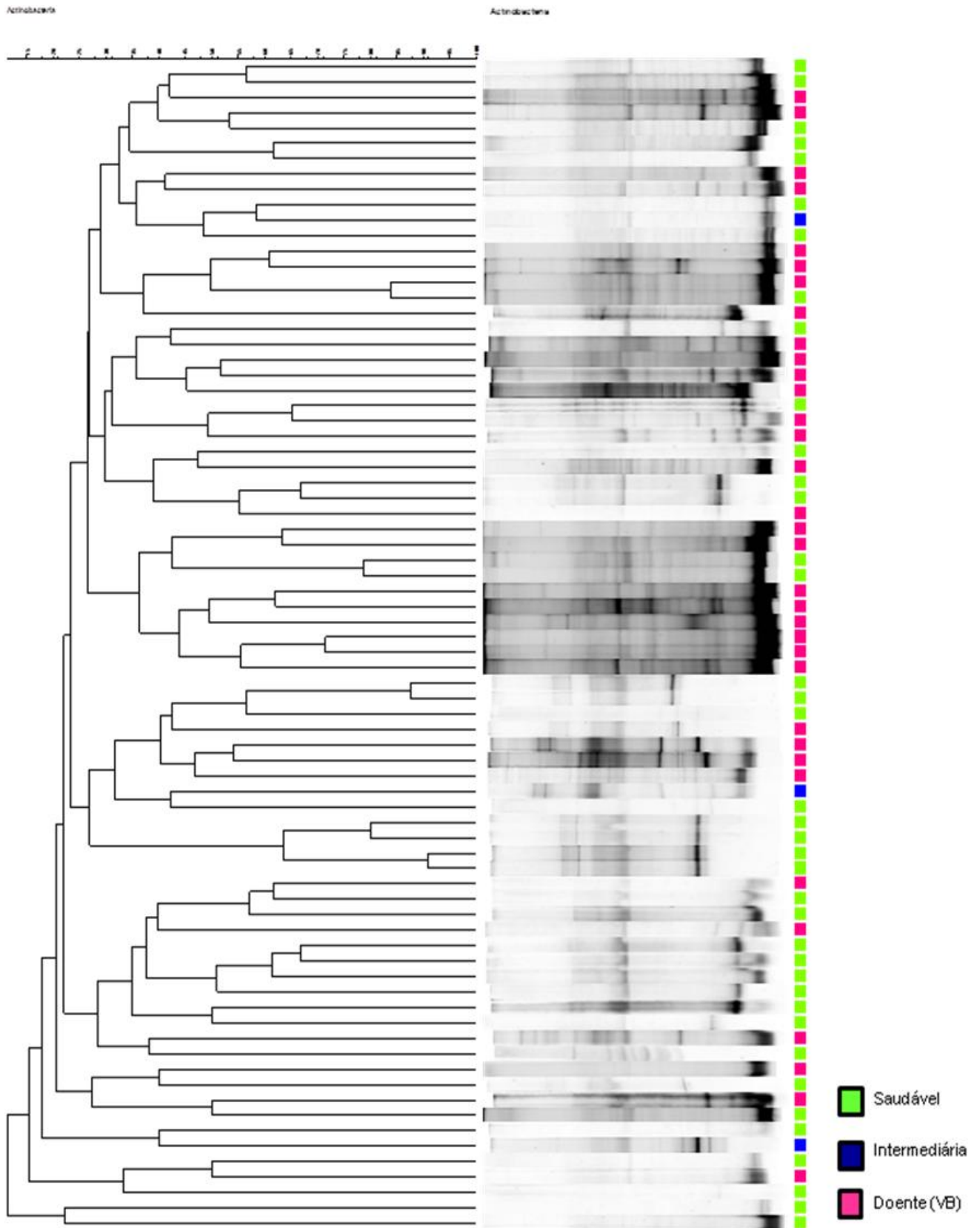


Figura 4 – DGGE *fingerprinting* e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano DNAr 16S específicos para o filo Actinobacteria amplificados a partir do DNA genômico extraído de amostras de secreção vaginal.

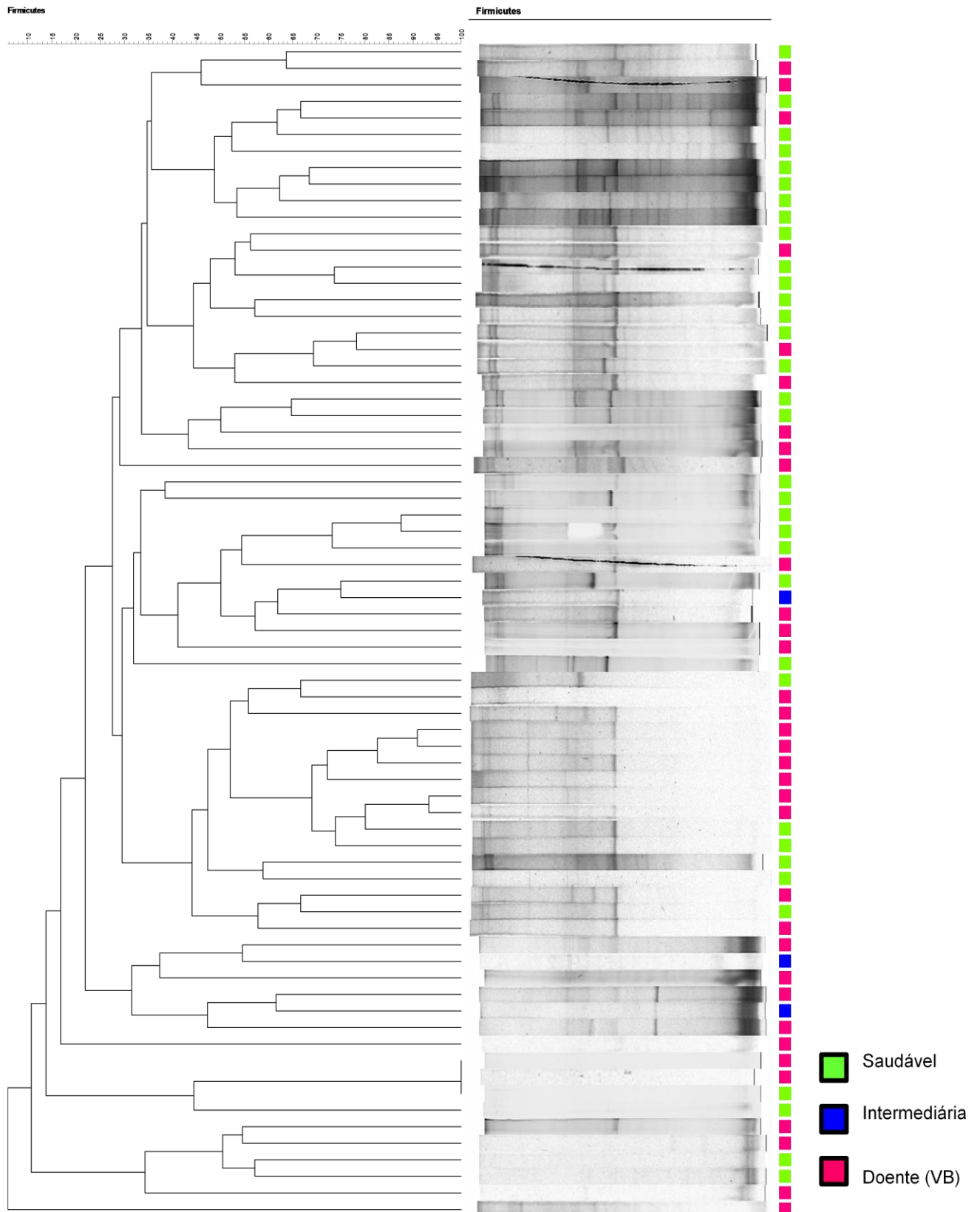


Figura 5 – DGGE *fingerprinting* e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano DNAr 16S específicos para o filo Firmicutes amplificados a partir do DNA genômico extraído de amostras de secreção vaginal.

O número de bandas (i. e., Unidades Taxonômicas Operacionais, OTUs) nos géis, que é um indicativo aproximado de riqueza, revelou perfis complexos (Tabela 5). Entre os grupos saudável e doente (VB) não houve diferença estatisticamente significativa para a variável riqueza com relação ao domínio Bacteria. Em relação aos filios Actinobacteria e Firmicutes, os grupos saudável e doente (VB) mostraram-se estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 6). O grupo de pacientes classificadas como intermediária pelo escore de Nugent não foi incluído na análise estatística devido ao pequeno número de observações. Para as análises do domínio Bacteria e dos filios Firmicutes e Actinobacteria foi considerado um número amostral igual a 76, 68 e 73, respectivamente.

Tabela 5 – Estatística descritiva para os resultados da variável riqueza entre as diferentes comunidades bacterianas.

Estatística descritiva	Domínio Bacteria		Filo Firmicutes		Filo Actinobacteria	
	Saudável	Doente	Saudável	Doente	Saudável	Doente
Nº de observações	41	35	34	34	39	34
Mínimo	5	5	1	1	3	5
Máximo	23	20	20	18	22	25
Média	12,02	10,54	11,21	8,353	11,03	14,94
Desvio Padrão	4,216	4,527	5,180	4,327	5,329	5,297

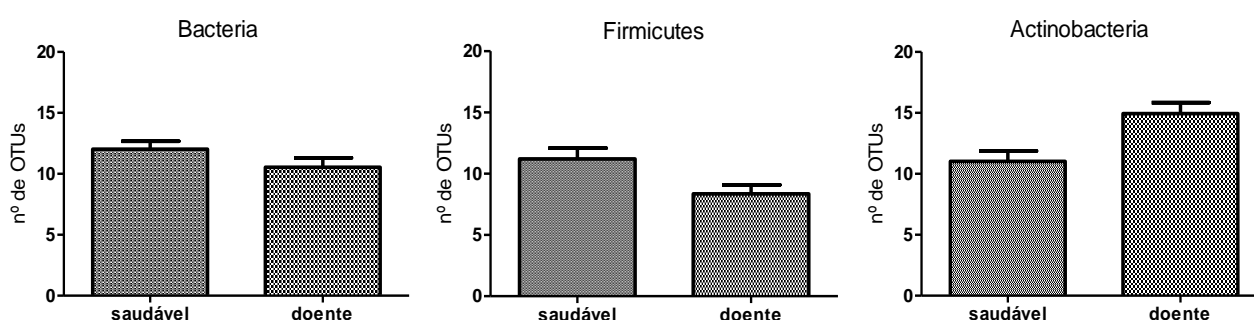


Figura 6 – Análise da variável riqueza entre os grupos saudável e doente no domínio Bacteria e nos filios Firmicutes e Actinobacteria. $p < 0,05$.

A Análise de Componente Principal (PCA) mostrou que amostras provenientes de pacientes com mesmo *status* de saúde apresentaram comunidades bacterianas diversas e complexas (Figuras 7, 8 e 9). Não foi possível o agrupamento das amostras de um mesmo *status* de saúde para nenhum dos filios e domínio analisados, o que reafirma a natureza complexa da microbiota vaginal tanto no

estado de saúde quanto no estado de doença em que cada indivíduo apresenta uma população carterística de microrganismos.

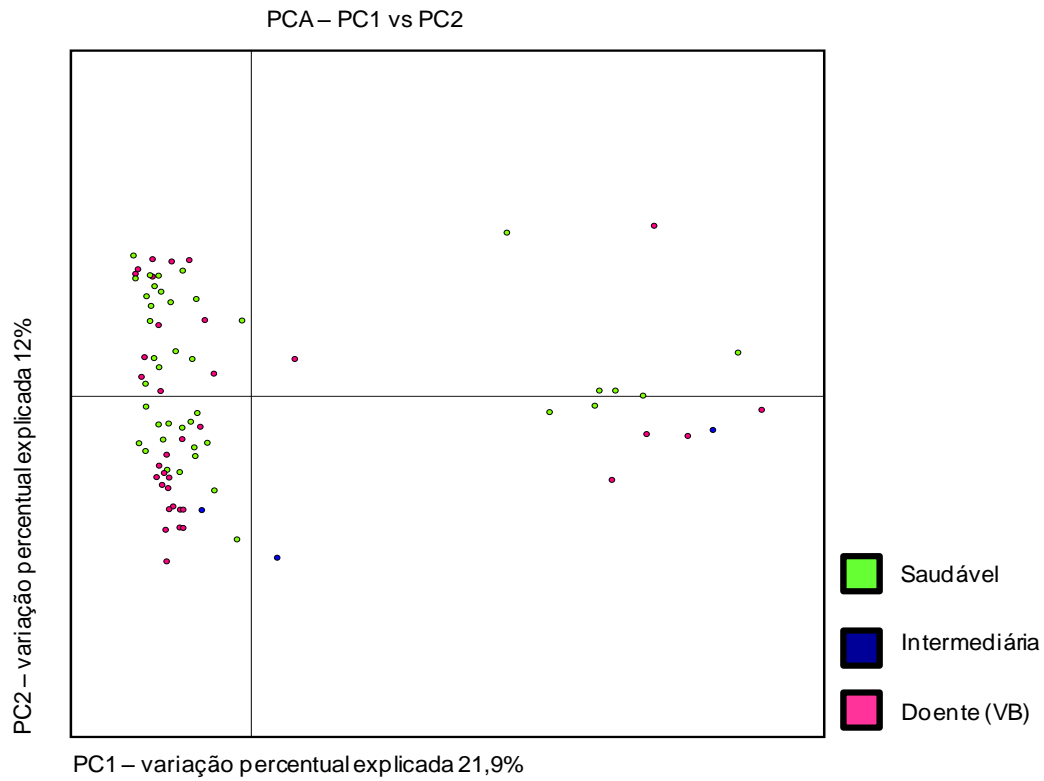


Figura 7 – Análise de Componente Principal (PCA) entre as comunidades bacterianas determinada pelos genes RNAr 16S para o domínio Bacteria.

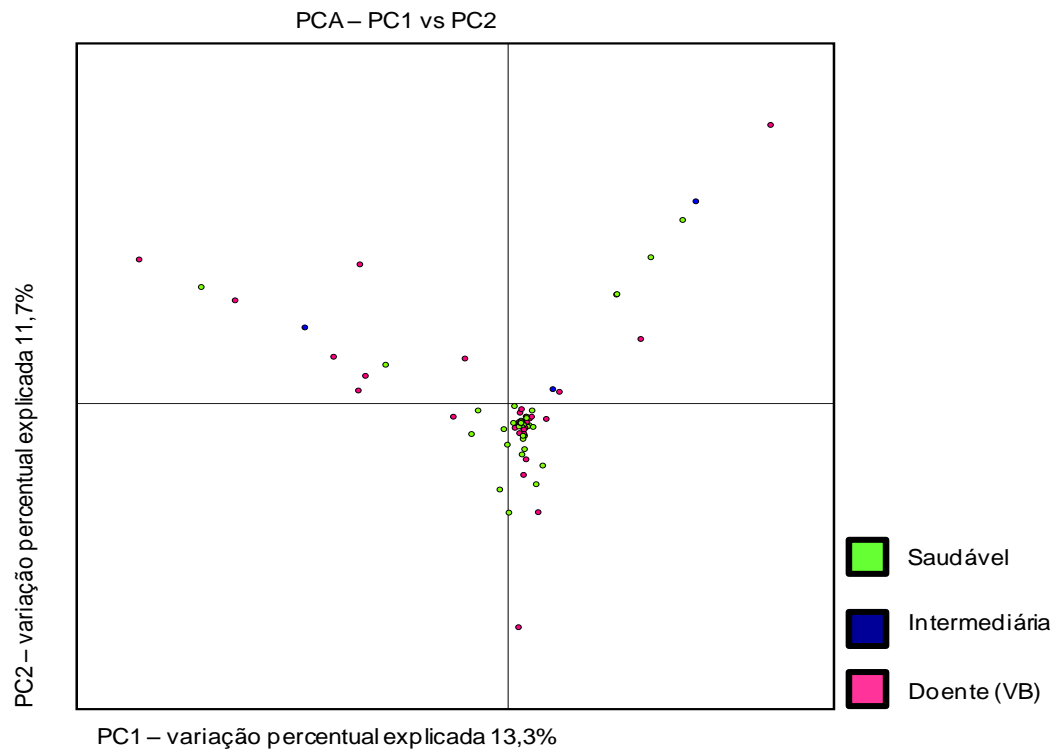


Figura 8 - Análise de Componente Principal (PCA) entre as comunidades bacterianas determinada pelos genes RNAr 16S para o filo Actinobacteria.

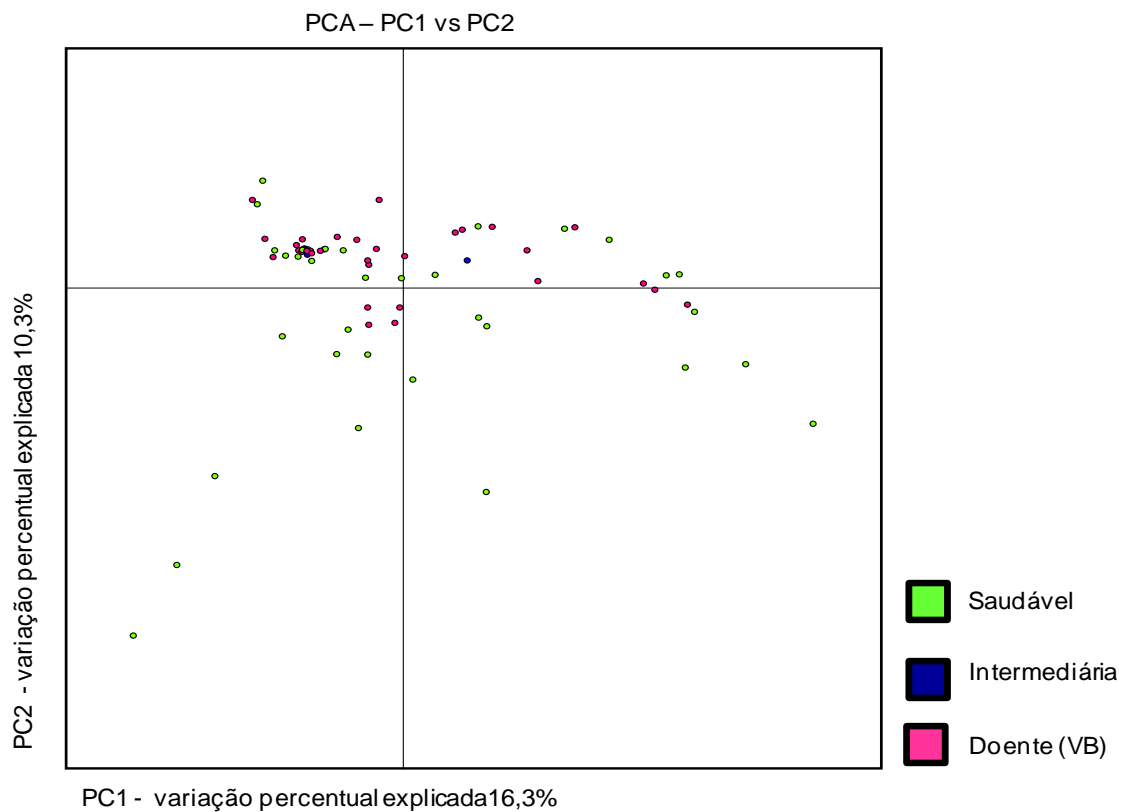


Figura 9 - Análise de Componente Principal (PCA) entre as comunidades bacterianas determinada pelos genes RNAr 16S para o filo Firmicutes.

5.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

Os resultados da quantificação bacteriana pela técnica de FISH estão apresentados no Apêndice A. Para as análises de FISH dos cinco filos estudados foram utilizadas 72 amostras. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos saudável e doente (VB) em nenhum dos cinco filos analisados (Figura 10). Os resultados da estatística descritiva estão demonstrados nas tabelas 6 e 7. O grupo de pacientes classificadas como intermediária pelo score de Nugent não foi incluído na análise estatística devido ao pequeno número de observações.

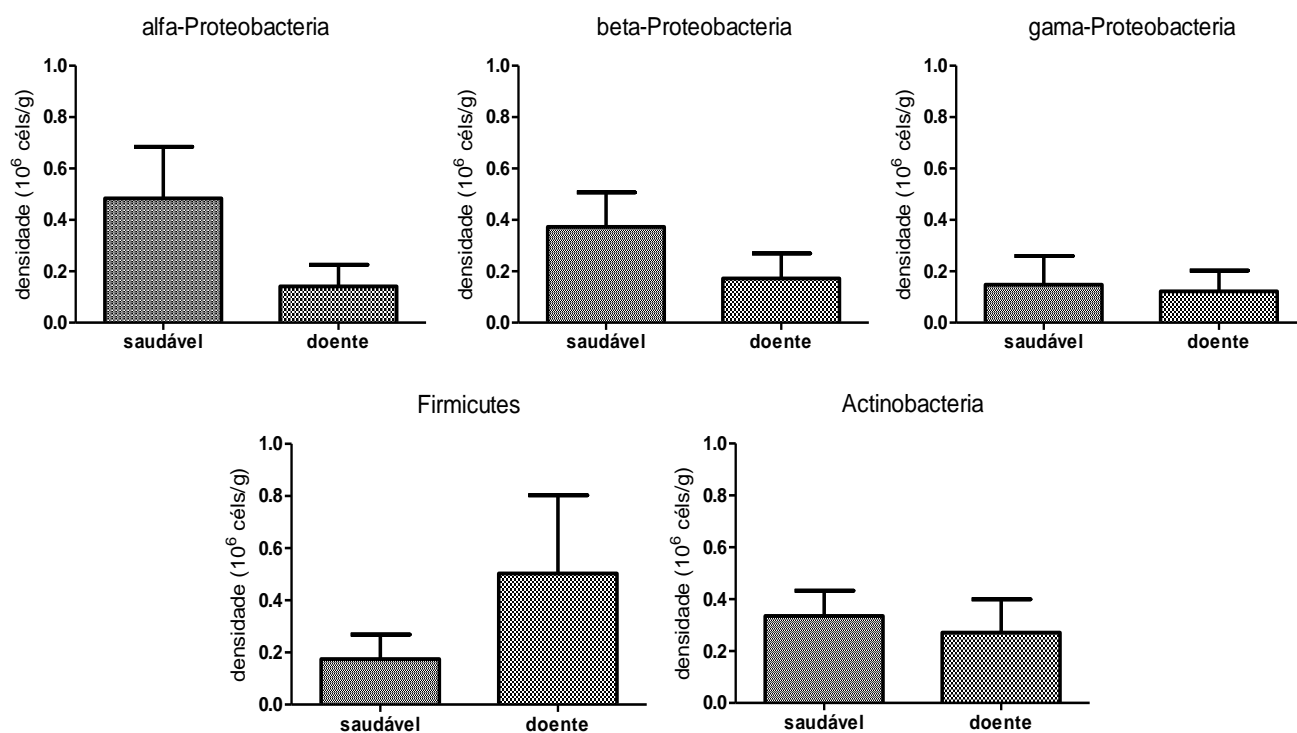


Figura 10 – Quantificação das células bacterianas entre os grupos de pacientes saudáveis e doentes (VB) nos filos α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria pela técnica de FISH.

Tabela 6 - Estatística descritiva da quantificação de células bacterianas nos filos α -Proteobacteria, β -Proteobacteria e γ -Proteobacteria entre os grupos saudável e doente (VB).

Estatística descritiva	α -Proteobacteria		β -Proteobacteria		γ -Proteobacteria	
	Saudável	Doente	Saudável	Doente	Saudável	Doente
Nº de observações	41	31	41	31	41	31
Mínimo (10^6 cels/mL)	0	0	0	0	0	0
Máximo (10^6 cels/mL)	5,7	2,41	4,91	2,8	4,6	1,83
Média	0,4841	0,1410	0,3727	0,1719	0,1476	0,1223
Desvio Padrão	1,281	0,4706	0,8604	0,5434	0,7181	0,4501

Tabela 7 - Estatística descritiva da quantificação de células bacterianas nos filos Firmicutes e Actinobacteria entre os grupos saudável e doente (VB).

Estatística descritiva	Firmicutes		Actinobacteria	
	Saudável	Doente	Saudável	Doente
Nº de observações	41	31	41	31
Mínimo (10^6 cels/mL)	0	0	0	0
Máximo (10^6 cels/mL)	3,64	8,78	2,71	3,67
Média	0,1744	0,5032	0,3351	0,2716
Desvio Padrão	0,6059	1,670	0,6285	0,7118

A figura 11 representa a microfotografia da lâmina de uma amostra do grupo saudável e outra do grupo doente coradas com DAPI para a contagem celular bacteriana total e a microfotografia de uma amostra pertencente ao grupo saudável e outra amostra pertencente ao grupo doente hibridizadas com a sonda específica para o filo β -Proteobactéria.

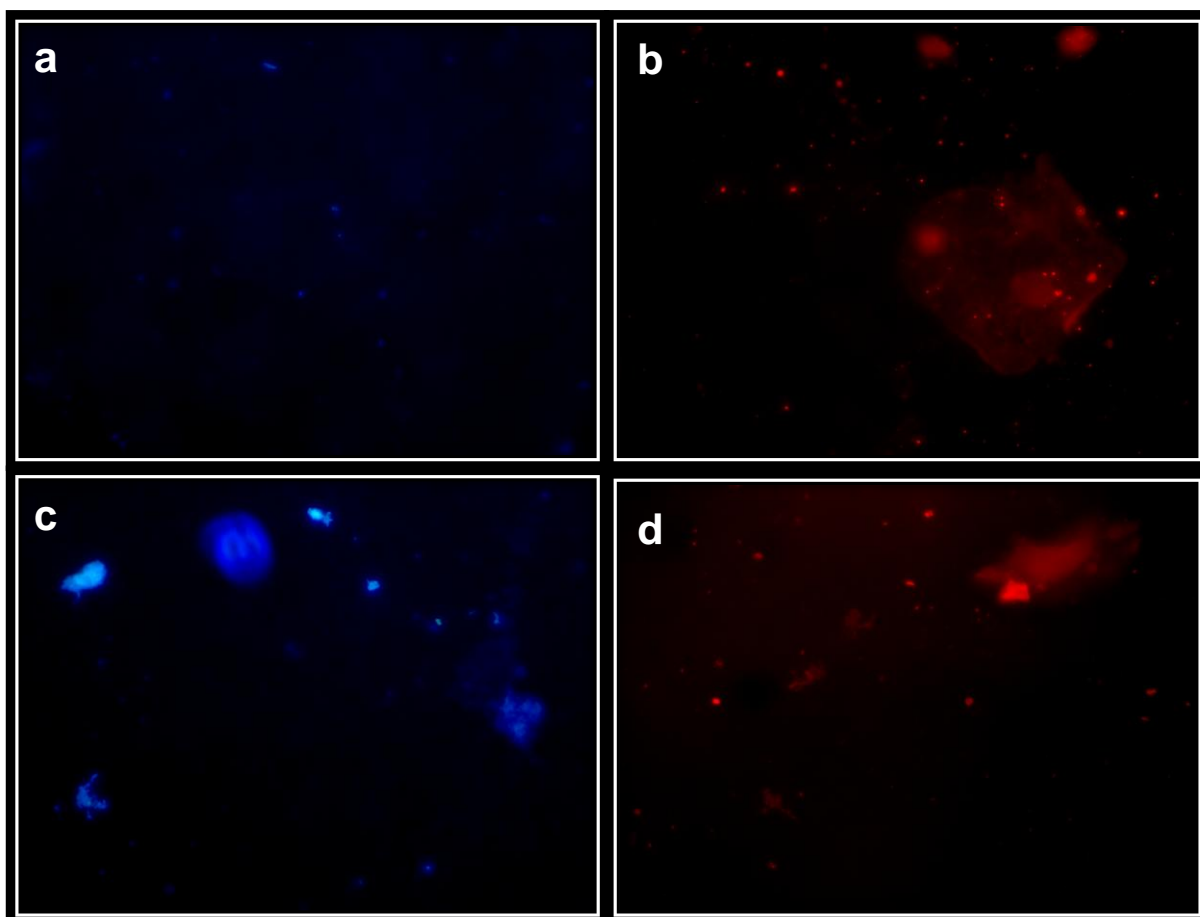


Figura 11 – Microfotografia de lâmina corada com DAPI para a contagem celular bacteriana total de uma amostra do grupo saudável (a) e outra amostra pertencente ao grupo doente (c), e microfotografia de uma amostra do grupo saudável (b) amostra pertencente ao grupo doente (d) hibridizadas com a sonda específica para o filo β -Proteobactéria.

5.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Os dados da quantificação de *Gardnerella vaginalis* realizada por qPCR das amostras de secreção vaginal estão apresentados no Apêndice B. O grupo de pacientes classificadas como intermediária pelo escore de Nugent não foi incluído na

análise estatística para nenhum grupo bacteriano analisado, devido ao pequeno número de observações. Foi observada diferença estatisticamente significativa na quantificação de *G. vaginalis* entre os grupos saudável e doente (VB) ($p < 0,0001$) (Gráfico 1). Os valores da estatística descritiva estão demonstrados na tabela 8. *Gardnerella vaginalis* foi detectada em 33 das 42 (78,6%) amostras de pacientes pertencentes ao grupo saudável e em todas as 36 (100%) amostras de pacientes pertencentes ao grupo doente VB.

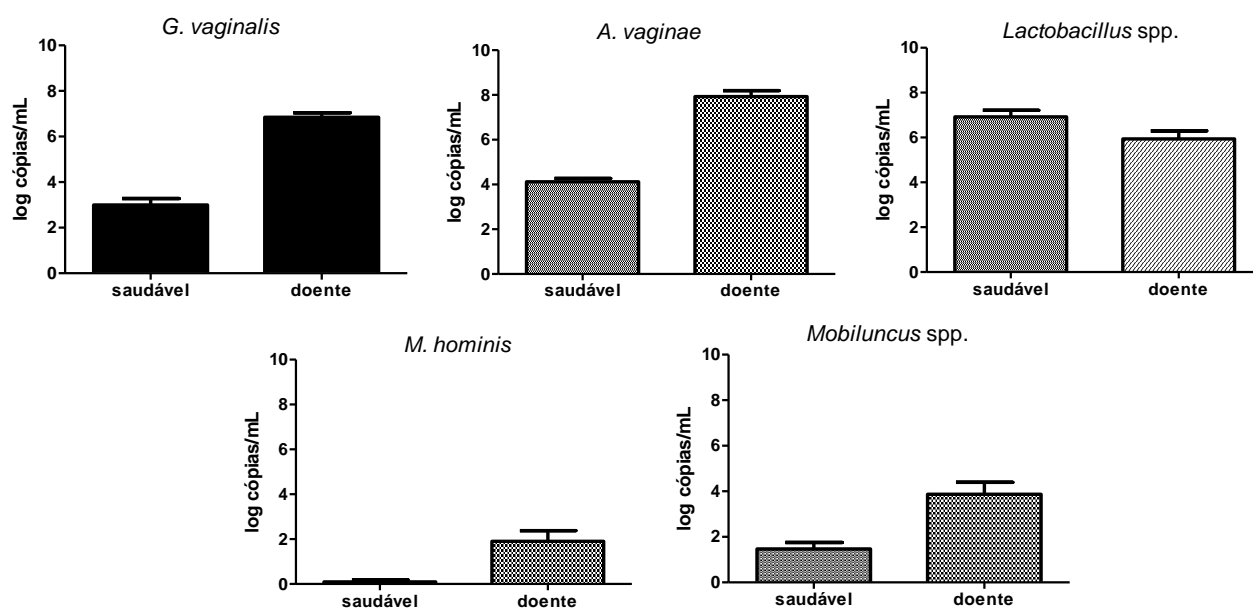


Gráfico 1 – Carga média (log cópias/mL) *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus spp.*, *Lactobacillus spp.* e de *Mycoplasma hominis* entre os grupos de pacientes saudáveis e doentes (VB). $p < 0,05$.

Tabela 8 – Estatística descritiva dos dados de quantificação de *Gardnerella vaginalis* entre pacientes saudáveis e doentes (VB).

Estatística descritiva	Saudável	Doente
Número de observações	42	36
Mínimo (log cópias/mL)	0	3,130
Máximo (log cópias/mL)	6,010	8,710
Média	2,998	6,842
Desvio padrão	1,823	1,246

Os dados da quantificação de *Atopobium vaginae* realizada por qPCR das amostras de secreção vaginal estão apresentados no Apêndice C. Entre os grupos saudável e doente (VB) foi observada diferença estatisticamente significativa na

quantificação de *A. vaginae* ($p < 0,0001$) (Gráfico 1). Os valores da estatística descritiva estão demonstrados na tabela 9.

A frequência de *A. vaginae* entre as amostras do grupo saudável foi de 97,6% (41 das 42 amostras) e de 100% entre o grupo doente VB. Em três amostras (8,3%) do grupo doente VB cuja carga de *A. vaginae* apresentou-se baixa foi observada uma concentração elevada de *G. vaginalis*, o que confirma a classificação dessas amostras pelo escore de Nugent.

Tabela 9 – Estatística descritiva dos dados de quantificação de *Atopobium vaginae* entre pacientes saudáveis e doentes (VB).

Estatística descritiva	Saudável	Doente
Número de observações	42	36
Mínimo (log cópias/mL)	0	3,503
Máximo (log cópias/mL)	7,441	9,709
Média	4,123	7,929
Desvio padrão	0,9820	1,623

Os dados da quantificação de *Mobiluncus* spp. realizada por qPCR das amostras de secreção vaginal estão apresentados no Apêndice D. Os grupos saudável e doente (VB) foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$) em relação à quantificação de *Mobiluncus* spp. (Gráfico 1). Os valores da estatística descritiva estão demonstrados na tabela 10.

Mobiluncus spp. foi detectado em 36 das 42 (85,7%) amostras pertencentes ao grupo saudável e em 34 das 36 (94,4%) amostras do grupo doente VB.

Tabela 10 – Estatística descritiva dos dados de quantificação de *Mobiluncus* spp. entre pacientes saudáveis e doentes (VB).

Estatística descritiva	Saudável	Doente
Número de observações	42	36
Mínimo (log cópias/mL)	0	0
Máximo (log cópias/mL)	4,340	10,240
Média	1,469	3,875
Desvio padrão	1,829	3,132

Os dados da quantificação de *Lactobacillus* spp. realizada por qPCR das amostras de secreção vaginal estão apresentados no Apêndice E. Os grupos

saudável e doente (VB) são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação à quantificação de *Lactobacillus* spp. (Gráfico 1). Os valores da estatística descritiva estão demonstrados na tabela 11.

O gênero *Lactobacillus* apresentou uma frequência de 97,6% (41 das 42 amostras) no grupo saudável e de 97,2% (35 das 36 amostras) no grupo doente VB. *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* foram detectados concomitantemente em 4 das 42 (9,5%) amostras de pacientes do grupo saudável e em 23 das 36 (63,9%) amostras do grupo doente VB, em níveis elevados ($>10^5$ cópias/mL) de concentração.

Os dados da quantificação de *Mycoplasma hominis* realizada por qPCR das amostras de secreção vaginal estão apresentados no Apêndice F. Para a quantificação de *M. hominis* foram consideradas 68 amostras. Os grupos saudável e doente (VB) mostraram-se estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (Gráfico 1) e os valores da estatística descritiva estão demonstrados na tabela 13.

Mycoplasma hominis foi detectado somente em 1 das 35 (2,8%) amostras do grupo saudável e em 12 das 33 (36,4%) amostras pertencentes ao grupo doente VB.

Tabela 11 - Estatística descritiva dos dados de quantificação de *Lactobacillus* spp. entre pacientes saudáveis e doentes (VB).

Estatística descritiva	Saudável	Doente
Número de observações	42	36
Mínimo (log cópias/mL)	0	0
Máximo (log cópias/mL)	8,540	8,580
Média	6,921	5,942
Desvio padrão	1,909	2,107

Tabela 12 - Estatística descritiva dos dados de quantificação de *Mycoplasma hominis* entre pacientes saudáveis e doentes (VB).

Estatística descritiva	Saudável	Doente
Número de observações	35	33
Mínimo (log cópias/mL)	0	0
Máximo (log cópias/mL)	3,232	7,164
Média	0,09234	1,901
Desvio padrão	0,5463	2,734

A carga bacteriana das mulheres com microbiota vaginal classificada como intermediária foi mais similar ao das mulheres com VB do que àquelas com microbiota vaginal sadia. Todas as três amostras (100%) de microbiota vaginal intermediária possuíam cargas elevadas de *Lactobacillus* spp. (Apêndice E). Todavia as mesmas três amostras intermediárias (100%) possuíam também cargas elevadas de *G. vaginalis*, *A. vaginae* e *Mobiluncus* spp. (Apêndices B, C e D, respectivamente). *Mycoplasma hominis* somente foi detectado em uma das três (33,3%) amostras de microbiota vaginal intermediária (Apêndice F).

A correlação da quantificação por qPCR das espécies e gêneros bacterianos contemplados pelo escore de Nugent está apresentada na figura 12 enquanto que a correlação da quantificação por qPCR entre *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp. e *Mobiluncus* spp. está representada na figura 13. De um modo geral, as cargas bacterianas de *G. vaginalis* ($R=0,7144$) e *Mobiluncus* spp. ($R=0,3909$) aumentaram com o aumento do escore de Nugent. Em contrapartida, os resultados da quantificação do gênero *Lactobacillus* spp. ($R= -0,2714$) decresceram com o aumento do escore de Nugent. A carga bacteriana de *G. vaginalis* aumentou concomitantemente com a carga de *Mobiluncus* spp. ($R=0,9129$) ao passo que a carga bacteriana de *Lactobacillus* spp. decresceu com o aumento das cargas de *G. vaginalis* ($R= -0,3356$) e *Mobiluncus* spp. ($R= -0,2349$).

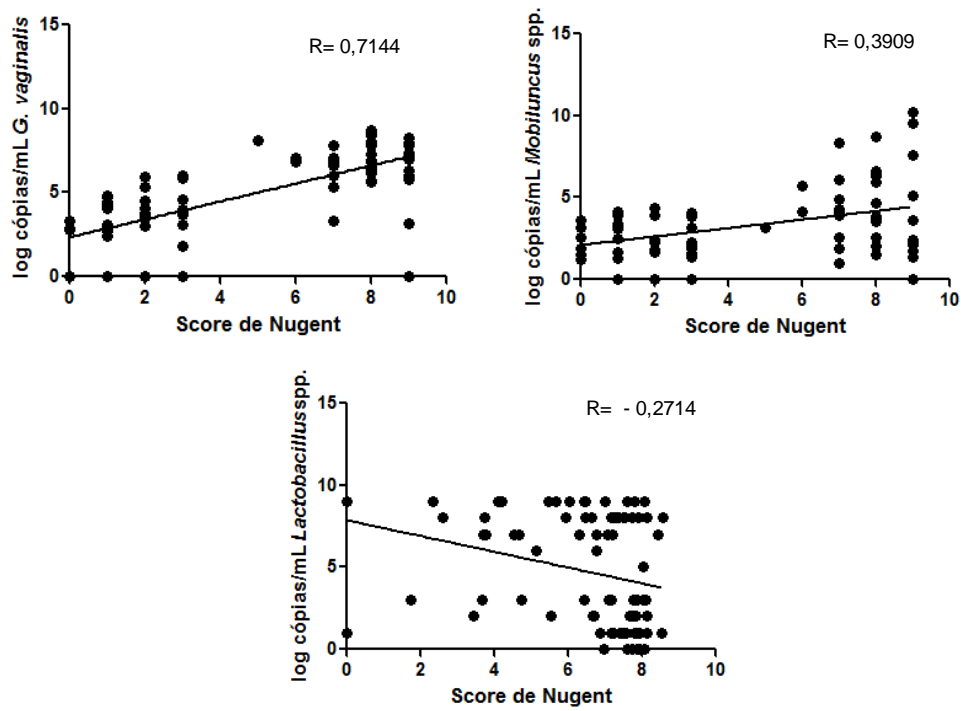


Figura 12 – Correlação dos resultados da quantificação realizada por qPCR de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.* e *Lactobacillus spp.* com o escore de Nugent.

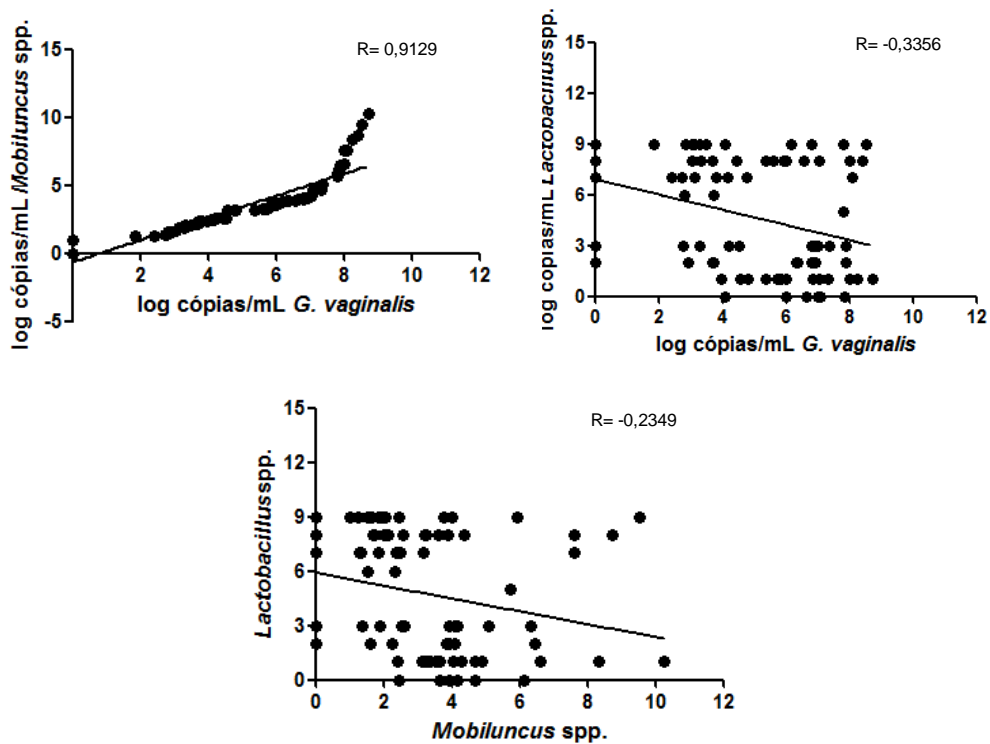


Figura 13 – Correlação dos resultados da quantificação realizada por qPCR entre *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.* e *Lactobacillus spp.*

6 DISCUSSÃO

Os micro-organismos que habitam a cavidade vaginal contribuem para o equilíbrio do ecossistema, em que as pressões seletivas operantes (potencial redox, tensão de oxigênio, pH, disponibilidade nutricional, umidade, salinidade) modulam a distribuição de micro-organismos que compõem a microbiota residente (VITALI, et al., 2007). Sendo assim, pode-se dizer que o *status* de saúde do trato genital feminino é dependente da microbiota vaginal, em função do seu papel biológico nos sítios colonizados dos hospedeiros (LARSEN; MONIF, 2001).

A microbiota vaginal é predominantemente dominada pelo gênero *Lactobacillus*, mas também possui patógenos oportunistas, que em condições de equilíbrio não causam doença ao hospedeiro. Entre esses patógenos podemos citar *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma hominis*. Os lactobacilos possuem algumas propriedades que permitem a colonização da mucosa vaginal e o seu domínio nesse ambiente, como a adesão específica à superfície das células epiteliais e produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (FILHO; DINIZ; SILVA, 2010; LIVENGOOD, 2009; MARTIN et al., 2008; MARTIN, 2012; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

Nesse contexto, os *Lactobacillus* destacam-se por exercer um papel determinante na estrutura das comunidades bacterianas vaginais e na proteção tanto contra a invasão por patógenos como também contra o crescimento exacerbado de espécies potencialmente patogênicas presentes na microbiota vaginal saudável (ESCHENBACH et al., 1989; GRAHN-HAKANSSON, 2006; MCLEAN; ROSENSTEIN, 2000; RONNQVIST; FORSGREN-BRUSK, 2006).

O presente estudo caracterizou a estrutura das comunidades bacterianas vaginais em mulheres saudáveis e com vaginose bacteriana, e investiga mudanças qualitativas e quantitativas em populações bacterianas numericamente dominantes relacionadas tanto à VB quanto à microbiota vaginal saudável. As técnicas moleculares PCR-DGGE, PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e FISH foram utilizadas em conjunto a fim de se obter um panorama geral sobre a ecologia do ambiente vaginal sob as condições de saúde e doença.

Os métodos moleculares têm sido cada vez mais utilizados em comparação à microscopia e métodos dependentes de cultivo, por sofrerem menor interferência tanto do observador quanto do meio de cultura, o que possibilita uma visão mais direta e detalhada da quantificação de determinadas espécies em uma amostra (DE BACKER et al., 2007).

Estudos recentes utilizando métodos independentes de cultivo têm demonstrado que a diversidade na composição bacteriana vaginal entre mulheres saudáveis e afetadas pela vaginose bacteriana é bastante complexa (DIAO et al., 2011; LING et al., 2010; VITALI et al., 2007). No presente estudo, a técnica PCR-DGGE foi utilizada para caracterizar a diversidade bacteriana vaginal de mulheres com diferentes *status* de saúde, a fim de melhor compreender a etiologia da VB.

A análise de agrupamento tanto para o domínio Bacteria quanto para os filos Firmicutes e Actinobacteria mostrou que as amostras provenientes de mulheres com mesmo *status* de saúde tenderam a se agrupar, porém em *clusters* separados. A análise de componente principal (PCA) demonstrou que amostras pertencentes a um mesmo *status* de saúde apresentaram comunidades bacterianas diversas e complexas. Não foi observado nenhum perfil de agrupamento entre as amostras pertencentes a um mesmo *status* de saúde para nenhum dos filos e domínio analisados. Esses resultados podem evidenciar o fato de que mesmo entre as mulheres saudáveis e com VB a composição filogenética das comunidades bacterianas vaginais é diversa e complexa em que cada indivíduo apresenta uma população característica de microrganismos (DIAO et al., 2010; FREDRICKS et al., 2007; HYMAN et al., 2005; LING et al., 2010).

A análise da variável riqueza desse estudo também revelou perfis distintos entre as pacientes saudáveis e doentes. Apenas no filo Actinobacteria, os grupos saudável e doente (VB) divergiram na análise de ambas as variáveis, e em relação ao filo Firmicutes, somente na análise da variável riqueza foi observada discrepância entre os grupos de pacientes.

De acordo com os resultados obtidos nas análises por qPCR, o gênero *Lactobacillus* foi identificado em quase todas as pacientes saudáveis e doentes (VB), enquanto que a espécie *M. hominis* foi pouco encontrada entre as amostras e possuiu frequência maior no grupo doente (VB). Esses resultados poderiam explicar o resultado obtido na análise da variável diversidade para o filo Firmicutes, onde não

foi possível diferenciar os grupos saudável e doente considerando que o gênero *Lactobacillus* e *M. hominis* pertencem a esse filo.

Ainda de acordo com os resultados da qPCR, o gênero *Mobiluncus* e as espécies *G. vaginalis* e *A. vaginae* foram detectados em alta frequência nos grupos saudável e doente (VB). Apesar disso, foi possível a diferenciação dos grupos saudável e doente (VB) no filo Actinobacteria com relação à variável riqueza. Estudos recentes utilizando técnicas de sequenciamento têm demonstrado a presença de uma ampla variedade de espécies não cultiváveis e fastidiosas que até então não haviam sido identificadas em comunidades bacterianas vaginais de pacientes com VB (FERRIS et al., 2004; HYMAN et al., 2005; LING et al., 2010; VERHELST et al., 2004; VITALI et al., 2007). No presente trabalho a técnica PCR-DGGE não foi utilizada em conjunto com nenhuma técnica de sequenciamento e apenas algumas espécies e gêneros foram pesquisados pela qPCR. Dessa forma, nem todas as espécies envolvidas na patogênese da VB foram analisadas.

A técnica de FISH é amplamente utilizada na ecologia microbiana e no diagnóstico clínico de patogenias. Na ecologia, a FISH pode ser utilizada na identificação microscópica e no rastreamento de organismos, diretamente a partir do meio ambiente, e também é um método para a avaliação direta, por microscopia, da composição de comunidades microbianas (MADIGAN et al., 2010).

A FISH permite o estudo da estrutura de comunidades bacterianas de uma maneira tanto qualitativa quanto quantitativa, é uma técnica de fácil execução e uma vez que sondas específicas já validadas estejam disponíveis permite a detecção do micro-organismo alvo em amostras clínicas ou ambientais em poucas horas (WAGNER; HAIDER, 2012).

No presente trabalho, a caracterização filogenética pela técnica de FISH não permitiu diferenciar os grupos saudável e doente (VB) entre os diferentes filos avaliados. Tal fato pode ser devido a grande complexidade da microbiota vaginal em que cada filo está representado por uma ampla gama de espécies (DIAO ET al., 2010; FILHO; DINIZ; SILVA, 2010; FREDRICKS et al., 2007; HYMAN ET al., 2005; LING ET al., 2010). Vários estudos têm demonstrado que além das espécies e gêneros pesquisados nesse trabalho existem muitas outras espécies que podem estar envolvidas na patogênese da VB (FERRIS et al., 2004; HYMAN et al., 2005; LING et al., 2010; VERHELST et al., 2004; VITALI et al., 2007). Nesse estudo, a

técnica de FISH foi utilizada para a pesquisa de cinco grandes grupos dentro do domínio Bacteria. É possível que determinadas espécies bacterianas envolvidas na patogênese da VB façam parte do mesmo filo de bactérias predominantes na microbiota vaginal saudável, o que poderia comprometer a diferenciação dos grupos saudável e doente (VB) em relação aos filios pesquisados.

Deve-se ressaltar também a limitação das sondas utilizadas nesse estudo, especialmente as sondas para os filios β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, as quais possuem especificidade para uma ampla parcela de gêneros e espécies, porém não são capazes de detectar a totalidade dos táxons contemplados por esses filios (MANZ, et al., 1992; MEIER, et al., 1999). Dessa forma, nem todas as espécies e gêneros pertencentes aos filios analisados puderam ser detectadas nas amostras provenientes de pacientes saudáveis e doentes (VB), o que também pode ter comprometido a diferenciação entre os grupos.

A técnica de FISH tem sido utilizada em estudos recentes para a identificação e quantificação de patógenos relacionados com a VB e *Lactobacillus* spp. a fim de avaliar a relação desses micro-organismos entre as pacientes saudáveis e doentes e também para a avaliação da eficácia de tratamentos com antimicrobianos na erradicação do biofilme bacteriano formado durante a VB (MACHADO et al., 2013; SRINIVASAN et al., 2013; SWIDSINSKI et al., 2007; SWIDSINSKI et al., 2011). Swidsinski e colaboradores (2010) descreveram recentemente um método alternativo de diagnóstico para a VB baseado na técnica de FISH, que consiste na visualização da formação de biofilme característico da VB em células epiteliais vaginais descamativas presentes no sedimento urinário.

PCR quantitativa em tempo real foi utilizada com o intuito de estimar alterações quantitativas nas populações de *Lactobacillus* spp. e dos principais patógenos associados à VB em comunidades bacterianas vaginais provenientes de mulheres saudáveis e doentes (VB). Os resultados das quantificações realizadas por qPCR mostraram que *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *M. hominis* e *Mobiluncus* spp. são encontrados em maiores concentrações na microbiota vaginal de mulheres com VB em relação às pacientes saudáveis, enquanto que *Lactobacillus* spp. foram detectado em maiores concentrações na microbiota vaginal de mulheres sadias em relação às pacientes acometidas pela VB. Todavia, elevadas concentrações desse gênero também foram detectadas nas pacientes doentes. Estudos recentes

realizados por Jaspers et al. (2012), Menard e colaboradores (2008) e Zozaya-Hinchliffe et al. (2010) corroboram esses resultados. Sha et al. (2005) obtiveram resultado semelhante ao avaliar a presença de potenciais patógenos envolvidos com a VB e *Lactobacillus* spp. em mulheres com VB e infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Fethers e colaboradores (2012) avaliaram a associação de oito potenciais patógenos descritos na literatura e vaginose bacteriana. *Gardnerella vaginalis* e *A. vaginae* foram detectados em altas concentrações no grupo de pacientes doentes VB e em baixas concentrações no grupo saudável, corroborando os resultados encontrados nesse estudo.

Gardnerella vaginalis há longo tempo tem sido implicada no desenvolvimento da VB e publicações recentes têm demonstrado que os biofilmes produzidos por *G. vaginalis* podem ser críticos para a patogênese e sintomatologia dessa doença (JOSEY; SCHWEBKE, 2008; SWIDSINSKI et al. 2005). Estudos utilizando ensaios enzimáticos para a identificação de biotipos de *G. vaginalis* e comparações genômicas entre isolados de *G. vaginalis* sugerem que linhagens de *G. vaginalis* podem ter diferentes graus de virulência, sendo que a formação de biofilme destaca-se como um importante fator de virulência nessa espécie (EREN et al., 2011). Os resultados apresentados nesse trabalho, em que *G. vaginalis* foi detectada em alta frequência no grupo saudável e em 100% das pacientes pertencentes ao grupo doente, corroboram os resultados de outros estudos (MENARD et al., 2008; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

De Backer et al. (2007) desenvolveram um estudo comparativo em que as espécies *G. vaginalis* e *A. vaginae* foram quantificadas por qPCR a partir de amostras de secreção vaginal. *Gardnerella vaginalis* foi encontrada em todas as amostras, porém em concentrações muito mais elevadas naquelas em que a microbiota vaginal encontrava-se alterada. *Atopobium vaginae* foi encontrado com menor frequência em comparação à *G. vaginalis*, mas em altas concentrações nas amostras de pacientes doentes, sugerindo, com base também em outros estudos, que sua presença possa ser um marcador diagnóstico para VB (FERRIS; MASZTAL; MARTIN, 2004; THIES; KONIG; KONIG, 2007; BURTON et al., 2005; VERHELST et al., 2004;). Em estudo realizado por Bradshaw et al. (2006) avaliando-se mulheres com VB recorrente após terapia com metronidazol, *G. vaginalis* foi detectada em alta

frequência em mulheres com microbiota vaginal saudável, enquanto que *A. vaginae* apresentou-se escasso nesse mesmo grupo.

No presente estudo, *A. vaginae*, assim como *G. vaginalis* e *Mobiluncus* spp., foi encontrada tanto em pacientes saudáveis quanto em pacientes com VB com frequência semelhante, diferenciando-se entre os dois grupos apenas com relação à sua concentração, e dessa forma não foi possível relacionar a presença de *A. vaginae* como marcador diagnóstico para VB. Estudos realizados por Fethers e colaboradores (2012), Menard e colaboradores (2008) e Zozaya-Hinchliffe e colaboradores (2010) corroboram esses resultados.

De acordo com Menard et al. (2008), a quantificação de *A. vaginae* pode ser considerada um bom preditor para a VB ao invés de sua simples presença. Características epidemiológicas e diferenças entre os ensaios de PCR podem explicar essa discrepância (MENARD et al., 2008). Sabe-se que uma redução em tamanho de uma sequência alvo de DNA pode aumentar a sensibilidade de um ensaio de PCR em torno de 24% a 39% (CHAKRAVORTY et al., 2006; HONMA et al., 1993). Ao utilizar uma sequência do alvo DNAr 16S de tamanho reduzido, como no presente estudo em que o alvo DNAr 16S *A. vaginae* possuía 86 pares de bases (MENARD et al., 2008), podemos inferir que a qPCR será mais sensível. Ainda de acordo com Menard e colaboradores (2008), a quantificação de vários micro-organismos, especialmente *A. vaginae* e *G. vaginalis*, permite o diagnóstico molecular da VB.

Atopobium vaginae foi detectado nas amostras do grupo doente VB sempre na presença de *G. vaginalis*. Tal fato corrobora a sugestão de um sinergismo entre ambas as espécies, e que esse fenômeno pode fazer parte da patogênese da VB, tal como já apresentado na literatura (BRADSHAW et al., 2006). A coexistência de *G. vaginalis* e *A. vaginae* tem sido demonstrada em estudos recentes em uma alta frequência entre amostras dentro do grupo VB e em menor frequência dentro o grupo saudável (BRADSHAW et al., 2006; VERHELST et al., 2004; VERHELST et al., 2005).

Apesar da frequência da espécie *Mycoplasma hominis* ter sido menor entre os grupos saudável e doente VB em comparação às outras espécies avaliadas nesse trabalho, sua presença é preocupante, devido aos riscos à saúde que ela pode representar. Além de ser uma das bactérias envolvidas na patogênese da VB, pode

estar relacionada à doença inflamatória pélvica e infecções durante a gravidez (WAITES; TALKINGTON, 2005).

Lactobacillus spp. foi detectado em elevadas concentrações na grande maioria das pacientes dentro do grupo saudável e também em pacientes pertencentes ao grupo doente VB. De acordo com Verhelst et al. (2005) e Zozaya-Hinchliffe et al. (2010), *Lactobacillus iners* é a espécie do gênero *Lactobacillus* mais prevalente na microbiota vaginal e, ao contrário das espécies *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus crispatus*, é comum e abundante em pacientes cuja comunidade microbiana vaginal possui patógenos relacionados à VB em altas concentrações, o que poderia explicar os resultados obtidos nesse trabalho, embora essa espécie não tenha sido avaliada isoladamente.

Em algumas amostras originadas de pacientes saudáveis e também do grupo doente VB foi detectada a presença de *G. vaginalis*, *A. vaginae* e *Lactobacillus* spp. concomitantemente. Esse resultado mostra que a presença de *Lactobacillus* pode não excluir patógenos potenciais da microbiota vaginal, da mesma forma que a simples presença de *G. vaginalis* e *A. vaginae* não está estritamente relacionada às manifestações clínicas da VB (VITALI et al., 2007). Segundo Coolen e colaboradores (2005), na microbiota vaginal saudável, *G. vaginalis* poderia representar o que se chama de “espécie sentinela”, um termo utilizado para se referir a espécies presentes na microbiota residente que são sensíveis às mudanças nas características físicas, químicas ou biológicas do ambiente em que se encontram, e que respondem através de um aumento da sua população. A identificação de potenciais “espécies sentinela” pode ser útil para prever se existe risco aumentado de um indivíduo contrair uma determinada infecção devido a alterações na composição das comunidades microbianas ou mudanças na abundância de populações específicas e também ser utilizada para a prevenção e diagnóstico precoce da VB (BURTON; REID, 2002; DEVILLARD; BURTON; REID, 2005; FREDRICKS; FIEDLER; MARRAZZO, 2005; ZARIFFARD et al., 2002).

A microbiota intermediária pode ser considerada tanto como um estágio de transição entre a microbiota de pacientes saudáveis e a microbiota de pacientes com VB, como também uma microbiota heterogênea, que possui características tanto da microbiota saudável quanto da microbiota de pacientes com VB (ISON; HAY, 2002; LARSSON et al., 2004; LIBMAN; KRAMER; PLATT, 2006; VERHELST et al., 2005).

Bradshaw et al. (2006) sugere que a microbiota intermediária possui um perfil mais semelhante ao da microbiota de pacientes com VB. No presente estudo, as amostras classificadas como intermediárias pelo escore de Nugent apresentaram quantificações de *A. vaginae*, *G. vaginalis* e *Mobiluncus* spp. mais semelhantes aos resultados das amostras do grupo doente VB, o que poderia confirmar o caráter heterogêneo da microbiota vaginal intermediária. Esses dados também podem sugerir menor sensibilidade do escore de Nugent enquanto método diagnóstico para a VB em comparação com a técnica de qPCR, devido ao fato de que *A. vaginae* e *M. hominis* não são detectados pela coloração de Gram no escore de Nugent (MENARD et al., 2008). Embora o diagnóstico da VB pelo escore de Nugent seja considerado padrão ouro, sabe-se que é passível de vieses (JESPERS et al., 2012).

Os resultados para a quantificação de *G. vaginalis*, *Mobiluncus* spp. e *Lactobacillus* spp. por qPCR nesse estudo estão de acordo com a classificação das amostras pelo escore de Nugent para o diagnóstico da VB. Bradshaw et al. (2006) e Sha et al. (2005) demonstraram resultados semelhantes ao comparar a quantificação de *G. vaginalis* e *Lactobacillus* spp. por qPCR com a classificação pelo escore de Nugent no diagnóstico da VB.

A avaliação da correlação entre a concentração das espécies e gêneros estudados nesse trabalho e os valores para o escore de Nugent mostrou que há uma diminuição na concentração de *Lactobacillus* spp. com o aumento do escore de Nugent e que em contrapartida ocorre um aumento da concentração de *G. vaginalis*, e *Mobiluncus* spp. a medida em que há aumento do escore de Nugent. Entre os gêneros e espécie, foi observado que a carga de *Mobiluncus* spp. aumenta à medida que a concentração de *G. vaginalis* eleva-se e que a concentração de *Lactobacillus* spp. diminui com o aumento das cargas de *Mobiluncus* spp. e *G. vaginalis*. Tais resultados podem ser considerados representativos da patogênese da VB e em estudo realizado por Jaspers et al. (2012) foram encontrados resultados semelhantes.

Menard e colaboradores (2008) realizaram um estudo em que a técnica de qPCR foi usada para definir um limiar quantitativo para a determinação da carga de *G. vaginalis* e *A. vaginae* para posterior utilização como ferramenta diagnóstica mais específica para a VB do que a mera presença e ausência desses micro-organismos. Os dados apresentados nesse estudo são consistentes com os do estudo anterior,

ao mostrar que *G. vaginalis* e *A. vaginae* estão presentes em altas concentrações em pacientes com VB e em uma alta frequência dentro do grupo de pacientes saudáveis.

No presente estudo, métodos moleculares foram utilizados para a caracterização de comunidades bacterianas vaginais a partir da quantificação de quatro patógenos de interesse na patogênese da VB e *Lactobacillus* spp., e através da avaliação da ocorrência dos filos Firmicutes, Actinobacteria, α -Proteobactéria, β -Proteobactéria e γ -Proteobactéria. Cada vez mais um número crescente de patógenos envolvidos na etiologia e patogênese da VB vem sendo citados na literatura, o que evidencia a importância do estudo da vaginose bacteriana para que a etiologia e patogênese dessa doença sejam melhor compreendidas, e para que novas ferramentas diagnósticas sejam implantadas, bem como regimes terapêuticos mais eficazes sejam adotados (HUMMELEN et al., 2010; SCHELLENBERG et al., 2009).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso combinado das técnicas PCR-DGGE, FISH e PCR quantitativa em tempo real representa uma estratégia bem sucedida para o monitoramento qualitativo e quantitativo de alterações na microbiota vaginal relacionadas a doenças infecciosas, como a vaginose bacteriana. O presente estudo foi capaz de mostrar que a qPCR pode ser utilizada para a detecção e quantificação de micro-organismos relacionados à VB, e que a PCR-DGGE e a FISH podem ser úteis para o estudo da diversidade de comunidades microbianas.

A utilização das técnicas de PCR-DGGE e FISH forneceram uma abordagem geral para a caracterização das comunidades microbianas vaginais. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que as comunidades microbianas vaginais tanto de pacientes saudáveis quanto pacientes doentes são bastante diversas, tanto na comparação dentro do mesmo grupo quanto entre os dois grupos de pacientes, e que sua composição tende a modificar-se de acordo com o *status* de saúde das pacientes.

De acordo com os resultados da qPCR, os *Lactobacillus* spp. destacaram-se como sendo o grupo predominante não só na microbiota vaginal saudável mas também na microbiota doente (VB). Contudo, embora nenhuma bactéria tenha sido associada unicamente à VB, os dados apresentados nesse estudo indicam que as comunidades vaginais incluindo *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Mobiluncus* spp. e *M. hominis* estiveram claramente associadas à VB. Essas espécies e gênero podem ser utilizados como marcadores para essa doença e poderiam atuar como alvos para as abordagens de diagnóstico molecular da VB.

Técnicas moleculares representam uma excelente ferramenta para identificação de micro-organismos envolvidos na patogênese da VB. Os dados obtidos nesse estudo contribuem para uma melhor compreensão sobre quais micro-organismos estão relacionados à VB e qual o seu papel na patogênese da doença.

A utilização de métodos moleculares permite o acompanhamento de alterações na composição das comunidades microbianas vaginais de uma maneira contínua. Tal fato pode contribuir tanto para o desenvolvimento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico de mulheres acometidas pela VB como também contribuir com a

melhoria e otimização dos regimes terapêuticos adotados na prática clínica para o tratamento da VB.

8 CONCLUSÕES

- O estudo da estrutura da comunidade bacteriana vaginal pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) demonstrou que a microbiota vaginal é bastante diversa e complexa, e que as amostras provenientes de pacientes doentes são mais similares entre si do que as amostras pertencentes ao grupo saudável entre os filos Firmicutes e Actinobacteria.
- A caracterização filogenética das comunidades bacterianas vaginais pela técnica de FISH evidenciou a grande complexidade e diversidade da microbiota vaginal. Cada um dos filos pesquisados esteve representado por uma ampla gama de espécies e todos os filos estiveram presentes em alta frequência, tanto entre as amostras provenientes de pacientes doentes quanto em amostras pertencentes ao grupo saudável.
- Os resultados da análise de qPCR para as espécies *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae*, sugerem que a elevada concentração dessas espécies na microbiota vaginal de pacientes doentes, e não a simples presença desses patógenos, pode estar relacionada às manifestações clínicas da VB.
- *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* foram identificadas em todas as amostras pertencentes ao grupo doente, sugerindo que um sinergismo entre *G. vaginalis* e *A. vaginae* possa contribuir com a patogênese da VB.
- *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma hominis* foram detectados em maior frequência e elevadas concentrações entre as amostras provenientes de pacientes do grupo doente em relação ao grupo saudável. Tais resultados sugerem que *Mobiluncus* spp. e *M. hominis* podem estar envolvidos na patogênese da VB.

- *Lactobacillus* spp. esteve amplamente frequente entre as amostras provenientes de pacientes doentes e presente em todas as amostras do grupo saudável em concentrações mais elevadas, sugerindo que as espécies desse gênero são parte integrante da microbiota vaginal.
- Nas pacientes doentes, *Lactobacillus* spp. foram detectados concomitantemente com elevadas concentrações de bactérias patogênicas relacionadas à VB, sugerindo que a presença de *Lactobacillus* não exclui patógenos potenciais da microbiota vaginal.
- A avaliação da correlação entre *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus* spp. e o escore de Nugent mostrou que os resultados encontrados pela técnica de qPCR estão de acordo com o diagnóstico das pacientes obtido pelo escore de Nugent.

REFERÊNCIAS

ADLERBERTH, I. Factors influencing the establishment of the intestinal microbiota in infancy. **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program**, Helsinki, Finlândia, v. 62, p. 13–33, 2008.

AKINBIYI, A.A.; WATSON, R.; WABOSO, P. Prevalence of *Candida albicans* and bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women in South Yorkshire, United Kingdom. **Am J Med**, v. 278, n. 5, p. 463-466, 2008.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, mar. 1995. Disponível em: <http://mmbr.asm.org/content/59/1/143.full.pdf+html>. Acesso em: 16 jan. 2014.

AMSEL, R.; TOTTEN, P. A.; SPIEGEL, C. A.; CHEN, K. C. S.; ESCHENBACH, D.; HOLMES, K. K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **American Journal of Medicine**, v. 74, n. 1, p. 14-22, jan. 1983. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934383911129#>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

ANGOTTI, L.B.; LAMBERT, L.C.; SOPER, D.E.; Vaginitis: making sense of over-the-counter treatment options. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2007, p. 1-4, mai. 2007. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/idog/2007/097424/abs/>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

ANTONIO, M. A.; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. **J Infect Dis**, v. 180, n. 6, p. 1950-1956, dez. 1999. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/180/6/1950.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

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**, v. 22, n. 12, p. 493-501, jul. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2788489/pdf/nihms158296.pdf>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

BAELE, M.; VANECHOUTTE, M.; VERHELST, R.; VANCANNEYT, M.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. **J Microbiol Methods**, v. 50, n. 3, p. 263-271, ago. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701202000350#>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

BARTOSCH, S.; ALEMU, F.; MACFARLANE, G. T.; MCMURDO, M. E. T. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 6, p. 3575–3581, jun. 2004. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/70/6/3575.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

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**, v. 28, n. 3, p. 281-285, mar. 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10096-008-0617-0>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

BLACKWOOD, C.B.; OAKS, A.; BUYER, J.S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n. 10, p.6193-6198, out. 2005.

BORIS, S.; SUÁREZ, J. E.; VÁZQUEZ, F.; BARBÉS, C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. **Infection and Immunity**, Oviedo, Espanha, v. 66, n. 5, p. 1985-1989, mai. 1998. Disponível em: <http://iai.asm.org/content/66/5/1985.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

BRABIN, L., ROBERTS, S.A., FAIRBROTHER, E., MANDAL, D., HIGGINS, S.P., CHANDIOK, S., WOOD, P., BARNARD, G.; KITCHENER, H. C. Factors affecting vaginal pH levels among female adolescents attending genitourinary medicine clinics. **Sex Transm Infect**, Manchester, v. 81, p. 483–487, mar. 2005. Disponível em: <http://sti.bmj.com/content/81/6/483.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N.; FAIRLEY, C. K.; MORTON, A. N.; RUDLAND, E.; GARLAND, S. M. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. **J Infect Dis**, v. 194, n. 6, p. 828–836, set. 2006. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/194/6/828.full.pdf+html>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

BURTON, J. P.; REID, G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. **J Infect Dis**, v. 186, n. 12, p. 1770-1780, dez. 2002. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/186/12/1770.full.pdf+html>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

BURTON, J. P.; CHILCOTT, C. N.; AL-QUMBER, M.; BROOKS, H. J.; WILSON, D.; TAGG, J. R.; DEVENISH, C. A preliminary survey of *Atopobium vaginae* in women attending the Dunedin gynaecology out-patients clinic: is the contribution of the hard-to-culture microbiota overlooked in gynaecological disorders? **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 45, n. 5, p. 450-452, out. 2005.

CATLIN, B. W. *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 5, n. 3, p. 213-137, jul. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358241/pdf/cmr00040-0007.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

CAUCI, S.; DRIUSSI, S.; MONTE, R.; LANZAFAME, P.; PIZUS, E.; QUADRIFOGLIO, F. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. **AmJ Obstet Gynecol**, v. 178, n. 3, p. 511–515, mar. 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually Transmitted Diseases (STDs). **Diseases Characterized by Vaginal Discharge**. Atlanta, USA, 2010.

CHAKRAVORTY, S.; PATHAK, D.; DUDEJA, M.; HALDAR, S.; HANIF, M.; TYAGI, J. S. PCR amplification of shorter fragments from the devR (Rv3133c) gene significantly increases the sensitivity of tuberculosis diagnosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 257, n. 2, p.306–311, abr. 2006.

CHERPES, T. L.; HILLIER, S. L.; MEYN, L. A.; BUSCH, J. L.; KROHN, M. A. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sex Transm Dis**, v. 35, n. 1, p. 78–83, jan. 2008. Disponível em: http://journals.lww.com/stdjournal/Abstract/2008/01000/A_Delicate_Balance__Risk_Factors_for_Acquisition.18.aspx. Acesso em: 15 Jan. 2013.

CHERPES, T. L.; MEYN, L. A.; KROHN, M. A.; LURIE, J. G.; HILLIER, S. L. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. 319-325, ago. 2003. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/37/3/319.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

CHONG, P.P.; HADI, S.R.A.; LEAN, L.E.E Y.L.; PHAN C.L.; TAN, B.C.; NG, K.P.; SEOW, H.F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. In recurrent and one-off vaginitis, and high association of non – albicans species with non-pregnant status. **Infection, Genectis and Evolution**, v. 7, n.4, p. 449-456, jul. 2007.

COOLEN, M. J. L.; POST, E.; DAVIS, C. C.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 8729–8737, dez. 2005. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/71/12/8729.full.pdf+html>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

CONVERT, M.; MARTINETTI LUCCHINI, G.; DOLINA, M.; PIFFARETTI. J. C. Comparison of LightCycler PCR and culture for detection of group B streptococci from vaginal swabs. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 12, p. 1022–1026, dez. 2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14690691.2005.01275.x/pdf>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

COSTERTON, J. H.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, mai. 1999. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/284/5418/1318.full.pdf>. acesso em: 15 Jan. 2013.

COSTERTON, W.; VEEH, R.; SHIRTLIFF, M.; PASMORE, M.; POST, C.; EHRlich, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, p. 1466–1477, nov. 2003. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/20365/pdf/render>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

CRIBBY, S.; TAYLOR, M.; REID, G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. **Interdisciplinary Perspective Infectious Disease**, Nova York, v. 8, n. 4, p. 256-264, nov. 2008. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2008/256490/abs/>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

CRISWELL, B.S., LADWIG, C.L., GARDNER, H.L.; DUKES, C.D. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture. **Obstet Gynecol**, v. 33, n. 2, p. 195–199, 1969. Disponível em: http://journals.lww.com/greenjournal/Citation/1969/02000/Haemophilus_vaginalis__Vaginitis_by_Inoculation.9.aspx. Acesso em: 15 Jan. 2013.

DATCU, R.; GESINK, D.; MULVAD, G.; MONTGOMERY-ANDERSEN, G.; RINK, E.; KOCH, A.; AHRENS, P.; JENSEN, J. S. Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 480, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-13-480.pdf>. Acesso em: 21 mai 2014.

DEANE, C.; SMITH, C.D.; FYKES, T.; SAMPSON, C.C. *Corynebacterium vaginale*. An analysis of 68 isolations. **Med Ann Dist Columbia**, v. 41, n. 1, p. 4–5, jan. 1972.

DE BACKER, E.; VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; ALQUMBER, M.A.; BURTON, J.P.; TAGG, J.R.; TEMMERMAN, M.; VANEECHOUTTE, M. Quantitative Determination by Real-Time PCR of Four Vaginal *Lactobacillus* Species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Indicates an Inverse Relationship Between *L. gasseri* and *L. iners*. **BMC Microbiol**, v. 7, n. 115, dez. 2007. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-7-115.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

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**, Londres, v. 117, n.1, p. 76–81, nov. 2004.

DEVILLARD, E.; BURTON, J. P.; REID, G. Complexity of vaginal microflora as analyzed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with recurrent bacterial vaginosis. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 13, n. 1, p. 25–31, mar. 2005.

DIAO, Y.; FANG, X.; XIA, Q.; CHEN, S.; LI, H.; YANG, Y.; WANG, Y.; LI, H.; CUI, J.; SUN, X.; ZHAO, Z. Organism diversity between women with and without bacterial vaginosis as determined by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequence. **J Obstet Gynaecol**, v. 37, n. 10, p. 1438-1446, out. 2011.

DICKEY, L.; NAILOR, M. D.; SOBEL, J. D. Guidelines for the treatment of bacterial vaginosis: focus on tinidazole. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, p. 485-489, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2710380/pdf/tcrm-5-485.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

DUARTE, G.; LANDERS, D. V. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. **J Bras Doenças Sex Transm**, São Paulo, v.10, n. 5, p.4-14, 1998.

DUNKELBERG, W. E. JR; SKAGGS, R.; KELLOGG, D.S. JR. A study and new description of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). **Am J Clin Pathol**, v. 53, p. 370–377, 1970.

EGAN, M.E.; LIPSKY, M.S. Diagnosis of Vaginitis. **Rev American Family Physician**, v. 62, n. 5, p.1095-1100, 2000.

EREN, A. M.; ZOZAYA, M.; TAYLOR, C. M.; DOWD, S. E.; MARTIN, D. H.; ERRIS, M. J. Exploring the Diversity of *Gardnerella vaginalis* in the Genitourinary Tract Microbiota of Monogamous Couples Through Subtle Nucleotide Variation. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 1-8, out. 2011.

ESCHENBACH, D.A. Bacterial vaginosis and anaerobes in obstetric-gynecologic infection. **Clin Infect Dis**, v. 16 p. 282–287, 1993a.

ESCHENBACH, D. A. History and review of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 2, p. 441-445, ago. 1993b. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/8357040>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

ESCHENBACH, D.A. Vaginitis including bacterial vaginosis. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 6, n. 4, p. 389–391, 1994.

ESCHENBACH, D.A. Amniotic fluid infection and cerebral palsy. Focus on the fetus. **JAMA**, v. 278, n. 3, p. 247–248, jul. 1997. Disponível em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=417658>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

ESCHENBACH, D.A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, S. J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C. M.; HOLMES, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 251-256, fev. 1989. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/27/2/251.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

ESCHENBACH, D. A.; HILLIER, S.; CRITCHLOW, C.; STEVENS, C.; DE ROUEN, T.; HOLMES, K. K. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 158, n. 4, p. 819-828, 1988.

ESCHENBACH, D. A.; PATTON, D. L.; HOOTEN, T. M.; MEIER, A. S.; STAPLETON, A.; AURA, J.; AGNEW, K. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. **J Infect Dis**, v. 183, n. 6, p. 913-918, mar. 2001. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/183/6/913.full.pdf+html>. Acesso em: 29 Nov. 2012.

FACHINI, A. M.; GIRALDO, P.; ELEUTÉRIO JR, J.; JACINTHO, C.; GONÇALVES, A. K.; LINHARES I. Bacterial vaginosis and preterm labor: an association not very well understood. **DST – Jornal Bras Doenças Sex Transm**, v. 17, n. 2, p. 149-152, jun. 2005. Disponível em: <http://www.dst.uff.br/revista17-2-2005/11vaginose%20bacteriana.pdf>. Acesso em: 29 Nov. 2012.

FARAGE, M.; MAIBACH, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Arch Gynecol Obstet**, v. 273, n. 4, p. 195–202, jan. 2006.

FÉRANDON, C.; PEUCHANT, O.; JANIS, C.; BENARD, A.; RENAUDIN, H.; PEREYRE, S.; BÉBÉAR, C. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative Culture. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 155-159, fev. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2010.03217.x/pdf>. Acesso em: 29 Nov. 2012.

FERRIS, M. J.; MASZTAL, A.; MARTIN, D. H. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n.12, p. 5892-5894, dez. 2004.

FERRIS, M. J.; NORORI, J.; ZOZAYA-HINCHLIFFE, M.; MARTIN, D., H. Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 1016-1018, mar. 2007. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/45/3/1016.full.pdf+html>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

FETHERS, K. A.; FAIRLEY, C. K.; MORTON, A.; HOCKING, J. S.; HOPKINS, C.; KENNEDY, L. J.; FEHLER, G.; BRADSHAW, C. S. Early sexual experiences and risk factors for bacterial vaginosis. **J Infect Dis**, v. 200, n. 1, p. 1662–1670, dez. 2009. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/200/11/1662.full.pdf+html>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

FETHERS, K.; TWIN, J.; FAIRLEY, C. K.; FOWKES, F. J. I.; GARLAND, S. M.; FEHLER, G.; MORTON, A. M.; HOCKING, J. S.; TABRIZI, S. N.; BRADSHAW, C. S. Bacterial Vaginosis (BV) Candidate Bacteria: Associations with BV and Behavioural Practices in Sexually-Experienced and Inexperienced Women. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-7, fev. 2012.

FILHO, D. S. C.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L. Bacterial vaginosis: clinical, epidemiologic and microbiological features. **HU Revista**, Juiz de Fora, MG, v. 36, n. 3, p. 223-230, jul./set. 2010. Disponível em: <http://ojs.hurevista.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/1107/405>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

FORSUM, U.; HOLST, E.; LARSSON, P. G.; VASQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; MATTSBY-BALTZER, I. Bacterial vaginosis: a microbiological and immunological enigma. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 2, p. 81-90, dec. 2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.16000463.2005.apm1130201.x/pdf>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

FREDRICKS, D. N. Molecular Methods to Describe the Spectrum and Dynamics of the Vaginal Microbiota. **Anaerobe**, v. 17, n. 4, p. 191-195, ago. 2011. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411000205. Acesso em: 16 jan. 2014.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; MARRAZZO, J. M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. **N Engl J Med**, v. 353, n. 18, p.1899–1911, nov. 2005. Disponível em:<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa043802>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

FREDRICKS, D.N.; FIEDLER, T.L.; THOMAS, K.K.; MITCHELL, C.M.; MARRAZZO, J.M. Changes in Vaginal Bacterial Concentrations with Intravaginal Metronidazole Therapy for Bacterial Vaginosis as Assessed by Quantitative PCR. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 3, p. 721-726, mar. 2009. Disponível em:<http://jcm.asm.org/content/47/3/721.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; THOMAS, K. K.; OAKLEY, B. B.; MARRAZZO, J. M. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3270–3276, out. 2007. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/45/10/3270.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

GARDNER, H.L. *Haemophilus vaginalis* vaginitis after twenty-five years. **Am J Obstet Gynecol**, v. 137, n. 3, p. 385–391, 1980.

GARDNER, H.L.; DUKES, C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 69, n. 5, p. 962–976, 1955.

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**, v. 190, n. 11, p. 3896–3903, jun. 2008. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/190/11/3896.full.pdf+html>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.91-102, jan. 2006.

GIRALDO, P. C.; AMARAL, R. L. G.; GONÇALVES, A. K.; VICENTINI, R.; MARTINS, 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**, v. 27, n. 5, p. 257-262, jun. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v27n5/25641.pdf>. Acesso em: 20 Nov. 2012.

GREENWOOD, J.R. AND PICKETT, M.J. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 30, n. 1, p. 170–178, jan. 1980. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/30/1/170.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Nov. 2012.

GIRALDO, P.; NEUER, A.; RIBEIRO-FILHO, A.; 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**, v. 7, n. 1-2, p. 23-5, 1999. Disponível em:<http://www.hindawi.com/journals/ido/1999/670520/abs/>. Acesso em: 29 Nov. 2012.

GIRALDO, P. C.; PASSOS, M. R. L.; BRAVO, R.; VARELLA, R. Q.; CAMPOS, W. N. A.; AMARAL, R. L.; MARUSSI, E. O Frequente Desafio do Entendimento e do Manuseio da Vaginose Bacteriana. **DST – Jornal Bras Doenças Sex Transm**, v. 19, n. 2, p. 84-91, set. 2007. Disponível em: <http://www.dst.uff.br//revista19-2-2007/5.pdf>. Acesso em: 29 Nov. 2012.

GREETHER, J.K.; NELSON, K.B. Possible decrease in prevalence of cerebral palsy in premature infants. **J Pediatr**, v. 136, n. 1, p. 133, jan. 2000. Disponível em: <http://www.jpeds.com/article/S0022-3476%2800%2990071-4/fulltext>. Acesso em: 29 Nov. 2012.

GOLDENBERG, R.L.; HAUTH, J.C.; ANDREWS, W.W. Intrauterine infection and preterm delivery. **N Engl J Med**, v. 342, p. 1500–1507, mai. 2000. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm200005183422007>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

GOMES, N.C.; HEUR, H.; SCHOLFED, J.; COSTA, R.; MENDOÇA-HANGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v.232, p.167-180, mai. 2001.

GROSS, N.T.; ARIAS, M.L.; MORAGA, M.; BADDASAROW, Y.; JARSTRAND, C. Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2007, p. 1-5, mai. 2007. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/idog/2007/082412/abs/>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

HAMILTON. B.; MARTIN, J.; VENTURA. S. Births: Preliminary data for 2010. **Natl Vital Stat Rep**, v. 60, p. 1–36, 2011.

HARWICH, M.D. JR; ALVES, J.M.; BUCK, G.A.; STRAUSS, J.F. III; PATTERSON, J.L.; OKI, A.T.; GIRERD, P.H.; JEFFERSON, K.K. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. **BMC Genomics**, v. 11, n. 375, p. 1-12, jun. 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-11-375.pdf>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

HASHEMI, F.B.; GHASSEMI, M.; FARO, S.; AROUTCHEVA, A.; SPEAR, G.T. Induction of human immunodeficiencyvirus type 1 expression by anaerobes associated with bacterial vaginosis. **J Infect Dis**, v. 181, p. 1574–1580, mai. 2000. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/181/5/1574.full.pdf+html>. Acesso em: 26 fev. 2013.

HAY, A. D.; FAHEY, T. Clinical diagnosis of urinary tract infection. **JAMA-The Journal Of the American Medical Association**, Chicago, v. 288, n. 10, p. 1229-1231, sep. 2002.

HAY, P. Bacterial vaginosis. **Medicine**, v. 38, n. 6, p. 281-285, jun 2010. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357_303910000757. Acesso em: 29 Nov. 2012.

HEINEMANN, C.; REID, G. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. **Can J Microbiol**, v. 51, n. 9, 777–781, 2005.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n. 8, p. 3233-3241, ago. 1997.

HILL, G. B. The microbiology of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 2, p. 450-454, ago. 1993. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/8357043>. Acesso em: 26 fev. 2013.

HILLIER, S. L.; CRITCHLOW, C. W.; STEVENS, C. E.; ROBERTS, M. C.; WOLNER-HANSEN, P.; ESCHENBACH, D. A.; HOLMES, K. K. Microbiological, epidemiological and clinical correlates of vaginal colonisation by *Mobiluncus* species. **Genitourin Med**, v. 67, p. 26-31, 1991. Disponível em:<http://sti.bmj.com/content/67/1/26.full.pdf+html>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

HILLIER, S. L.; LAU, R.J. Vaginal microflora in post-menopausal women who have not received estrogenreplacement therapy. **Clin Infect Dis**, v. 25, supl 2, p. S123–S126, 1997. Disponível em:http://cid.oxfordjournals.org/content/25/Supplement_2/S123.full.pdf+html. Acesso em: 5 Dez. 2012.

HONMA, M.; OHARA, Y.; MURAYAMA, H.; SAKO, K.; IWASAKI, Y. Effects of fixation and varying target length on the sensitivity of polymerase chain reaction for detection of human T-cell leukemia virus type I proviral DNA in formalin-fixed tissue sections. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 7, p. 1799–803, jul. 1993.

HUMMELEN, R.; FERNANDES, A. D.; MACKLAIM, J. M.; DICKSON, R. J.; CHANGALUCHA, J.; GLOOR, G. B.; REID, G. Deep Sequencing of the Vaginal Microbiota of Women with HIV. **Plos One**, v. 5, n. 8, ago. 2010.

HYMAN, R. W.; FUKUSHIMA, M.; DIAMOND, L.; KUMM, J.; GIUDICE, L. C.; DAVIS, R. W. Microbes of human vaginal epithelium. **PNAS**, v. 102, n. 22, p. 7952–7957, mai. 2005. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/102/22/7952.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

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

JESPERS, V.; MENTEN, J.; SMET, H.; PORADOSÚ, S.; ABDELLATI, S.; VERHELST, R.; HARDY, L.; BUVÉ, A.; CRUCITTI, T. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 83, p. 1-10, 2012.

JOSEY, W. E.; SCHWEBKE, J. R. The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment. **Int J STD AIDS**, v. 19, n. 3, p. 152–154, mar. 2008.

KALRA, A.; PALCU, C. T.; SOBEL, J. D.; AKINS, R. A. Bacterial vaginosis: Culture- and PCR-based Characterizations of a Complex Polymicrobial Disease's Pathobiology. **Curr Infect Dis Rep**, v. 9, p. 485-500, 2007. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11908-007-0074-4?LI=true>. Acesso em: 5 Dez. 2012.

KENT, H.L. Epidemiology of vaginitis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 165, p. 1168-76, 1991.

KONEMAN, E. W.; JR WINN, W. ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOUMANS, E. H.; KENDRICK, J. S. Preventing Adverse Sequelae of Bacterial Vaginosis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 28, n. 5, p. 292-297, mai. 2001. Disponível em: http://journals.lww.com/stdjournal/Abstract/2001/05000/Preventing_Adverse_Sequelae_of_Bacterial.11.aspx. Acesso em 5 Dez. 2012.

LARSEN, B.; G. R. MONIF. Understanding the bacterial flora of female genital tract. **Clin Infect Dis**. v. 32, n. 4, p. 69–77, fev. 2001.

LARSSON, P. G.; CARLSSON, B.; FAHRAEUS, L.; JAKOBSSON, T.; FORSUM, U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. **Sex Transm Infect**, v. 80, p. 63–67, 2004.

LARSSON, P.G.; FORSUM, U. Bacterial vaginosis – a disturbed bacterial flora and treatment enigma. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 5, p. 305–316, mai. 2005. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.16000463.2005.apm_113501.x/full. Acesso em 26 Fev. 2013.

LEITE, S. R. R. F.; AMORIM, M. M. R.; CALÁBRIA, W. B.; LEITE, T. N. F.; OLIVEIRA, V. S.; FERREIRA JUNIOR, J. A. A.; XIMENES, R. A. A. Perfil clínico e microbiológico de mulheres com vaginose bacteriana. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 2, p. 82-87, jan. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v32n2/v32n2a06.pdf>. Acesso em 26 Fev. 2013.

LIBMAN, M. D.; KRAMER, M.; PLATT, R. Comparison of Gram and Kopeloff stains in the diagnosis of bacterial vaginosis in pregnancy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 54, n. 3, p. 197–201, mar. 2006.

LING, Z.D.; CHANG, Q.; LIPTON, J.W.; TONG, C.W.; LANDERS, T.M.; CARVEY, P.M. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. **Neuroscience**, v. 124, n. 3, p. 619–628, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452203009436#>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

LING, Z.; KONG, J.; LIU, F.; ZHU, H.; CHEN, X.; WANG, Y.; LI, L.; NELSON, K. E.; XIA, Y.; XIANG, C. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. **BMC Genomics**, v. 11, n. 488, p. 1-16, set, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-11-488.pdf>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

LIVENGOOD, C. H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. **Rev Obstet Gynecol**, Durham, Inglaterra, v. 2, n. 1, p. 28-37, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672999/pdf/RIOG0020010028.pdf>. Acesso em: 6 dez 2012.

MACHADO, A.; ALMEIDA, C.; SALGUEIRO, D.; HENRIQUES, A.; VANEECHOUTTE, M.; HAESBROUCK, F.; VIEIRA, M. J.; RODRIGUES, L.; AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. Fluorescence in situ Hybridization method using Peptide Nucleic Acid probes for rapid detection of *Lactobacillus* and *Gardnerella* spp. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 82, p. 1-12, 2013. Disponível em: www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-13-82.pdf. Acesso em: 16 jan. 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. Evolução e Sistemática Microbianas. In: _____. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição. Porto Alegre, Artmed, 2010. Cap. 14, p. 367-393.

MALINEN, E.; RINTTILA, T.; KAJANDER, K.; MATTO, J.; KASSINEN, A.; KROGIUS, L.; SAARELA, M.; KORPELA, R.; PALVA, A. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. **Am J Gastroenterol**, v. 100, p. 373–382, fev. 2005.

MANZ W.; AMANN R.; LUDWIG W.; VANCANNEYT M.; SCHLEIFER K.H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga–flavobacter–bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v. 142, p. 1097–1106, mai. 1996.

MANZ W.; AMANN R.; LUDWIG W.; WAGNER M.; SCHLEIFER K.H. Phylogenic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, p. 593–600, dez. 1992.

MARTIN, D. H. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 343, n. 1, p. 2-9, jan. 2012. Disponível em: http://journals.lww.com/amjmedsci/Abstract/2012/01000/The_Microbiota_of_the_Vagina_and_Its_Influence_on.2.aspx. Acesso em: 26 Fev. 2013.

MARTIN, R.; SOBERÓN, N.; VÁZQUEZ, F.; SUÁREZ, J. E. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 26, n. 3, p. 160-167, mar. 2008.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; KADO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 1, p. 167–173, jan. 2004. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/70/1/167.full.pdf+html>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

MCLEAN, N. W.; ROSENSTEIN, I. J. Characterization and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. **J Med Microbiol**. v. 49, p. 543–552, 2000.

MEIER, H.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content. **Syst Appl Microbiol**, v. 22, p. 186–196, mai. 1999.

MENARD, J.; FENOLLAR, F.; HENRY, M.; BRETTELL, F.; RAOULT, D. Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to predict Bacterial Vaginosis. **Clinical Infections Diseases**, v. 47, n. 1, p. 33-43, jul. 2008. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/47/1/33.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jul. 2012.

MERCHANT, J. S.; OH, K.; KLERMAN, L. V. Douching: a problem for adolescent girls and young women. **Arch Pediatr Adolesc Med**, 153, 834–837, 1999.

MITCHELL, H. Vaginal discharge – causes, diagnosis, and treatment. **BMJ**; London, v. 328, p. 1306-1308, mai. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC420177/pdf/bmj32801306.pdf>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

MORRIS, M.; NICOLL, A.; SIMMS, I.; WILSON, J.; CATCHPOLE, M. Bacterial vaginosis: a public health review. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 108, p. 439-450, mai. 2001. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14710528.2001.00124.x/pdf>. Acesso em: 26 Fev. 2013.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 695-700, mar. 1993. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/59/3/695.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

NESS, R. B.; HILLIER, S. L.; RICHTER, H. E.; SOPER, D. E.; STAMM, C.; BASS, D. C.; SWEET, R. L.; RICE, P.; DOWNS, J.; ARAL, S. Why women douche and why they may or may not stop. **Sex Transm Dis**, v. 30, n. 1, p. 71-4, jan. 2003. Disponível em: http://journals.lww.com/stdjournal/Abstract/2003/01000/Why_Women_Douche_and_Why_They_May_or_May_Not_Stop.14.aspx. Acesso em: 20 Nov. 2012.

NYGREN, P.; FU, R.; FREEMAN, M.; BOUGATSOS, C.; KLEBANOFF, M.; GUISE, J. M. Evidence on the benefits and harms of screening and treating pregnant women who are asymptomatic for bacterial vaginosis: an update review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 3, p. 220-233, fev. 2008. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/18252684>. Acesso em: 20 Nov. 2012.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, jul./dez. 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>. Acesso em 14 Jan. 2013.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 297–301, fev. 1991. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/29/2/297.full.pdf+html>. Acesso em: 26 fev. 2013.

OLMSTED, S. S.; MEYN, L. A.; ROHAN, L. C.; HILLIER, S. L. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. **Sex Transm Dis**, v. 30, n. 3, p. 257-261, mar. 2003. Disponível em: http://journals.lww.com/stdjournal/Abstract/2003/03000/Glycosidase_and_Proteinase_Activity_of_Anaerobic.16.aspx. Acesso em: 15 Jan. 2013.

PATTERSON, J. L.; STULL-LANE, A.; GIRERD, P. H.; JEFFERSON K. K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial vaginosis-associated anaerobes. **Microbiology**, v. 156, p. 392–399, 2010. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/content/156/2/392.full.pdf+html>. Acesso em: 5 dez 2012.

PAVLOVA, S. I.; KILIC, A. O.; KILIC, S. S.; SO, J. S.; NADER-MACIAS, M. E.; SIMOES, J. A.; TAO, L. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. **J Appl Microbiol**, v. 92, n. 3, p. 451-459, mar. 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01547.x/pdf>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, Maastricht, Netherlands, v. 118, n. 2, 511–521, ago. 2006. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/content/118/2/511.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

PIOT, P.; VAN DYCK, E.; GOODFELLOW, M.; FALKOW, S. A taxonomic study of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) Gardner and Dukes 1955. **J Gen Microbiol**, v. 119, n. 2, p. 373–396, ago. 1980. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/content/119/2/373.full.pdf+html>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

PLECKAITYTE, M. JANULAITIENE, M.; LASICKIENE, R.; ZVIRBLIENE, A. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 65, n. 1, p. 69-77, mar. 2012.

PRIESTLY, C. J. F.; JONES, B. M.; DHAR, J.; GOODWIN, L. What is normal vagina flora? **Genitourin Med**, v. 73, p. 23-28, 1997. Disponível em: <http://sti.bmj.com/content/73/1/23.full.pdf+html>. Acesso em: 6 Dez 2012.

PRIESTLY, C. J. F.; KINGHORN, G. R. Bacterial vaginosis. **Br J Clin Pract**, v. 50, n. 6, p. 331-334, 1996.

QIAGEN. **Critical Factors for Successful Real-Time PCR**. Hilden, Alemanha, 2009.

RAZIN, S. The minimal cellular genome of mycoplasma. **J Biochem Biophys**, v. 34, p. 124–130, fev./abr. 1997.

REINHARDT, C.; REIGSTAD, C.S.; BACKHED, F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Gothenburg, Suécia, v. 48, n. 3, p. 249–256, mar. 2009. Disponível em: http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/2009/03000/IntestinalMicrobiota_During_Infancy_and_Its.4.aspx. Acesso em: 15 jan. 2013.

RIGGS, M. A.; KLEBANOFF, M. A. Treatment of Vaginal Infections to Prevent Preterm Birth: A Meta-Analysis. **Clin Obst Gynecol**, v. 47, n. 4, p. 796-807, dez. 2004. Disponível em: http://journals.lww.com/clinicalobgyn/Citation/2004/12000/Treatment_of_Vaginal_Infections_to_Prevent_Preterm.8.aspx. Acesso em: 15 Jan. 2013.

RONNQVIST, P. D.; FORSGREN-BRUSK, U. B.; GRAHN-HAKANSSON, E. E. Lactobacilli in the female genital tract in relation to other genital microbes and vaginal pH. **Acta Obstet Gynecol Scand**, 85, n. 6, p. 726–735, jun. 2006.

SADHU, K.; DOMINGUE, P.A.; CHOW, A.W.; NELLIGAN, J.; CHENG, N.; COSTERTON, J.W. *Gardnerella vaginalis* has a Gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. **J Med Microbiol**, v. 29, n. 3, p. 229–235, 1989. Disponível em: <http://jmm.sgmjournals.org/content/29/3/229.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Nov. 2012.

SANTIAGO, G. L. S; DESCHAGHT, P.; EL AILA, N.; KIAMA, T. N.; VERSTRAELEN, H.; JEFFERSON, K. K.; TEMMERMAN, M.; VANECHOUTTE, M. *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 204, n. 450, p. 1-7, mai. 2011.

SAKAMOTO, M.; TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. **Microbiol Immunol**, v. 45, n. 1, p. 39–44, 2001.

SCHNEE, C.; SCHULSSE, S.; HOTZEL, H.; AYLING, R. D.; NICHOLAS, R. A. J.; SCHUBERT, E.; HELLER, M.; EHRLICH, R.; SACHSE, K. A Novel Rapid DNA Microarray Assay Enables Identification of 37 *Mycoplasma* Species and Highlights Multiple *Mycoplasma* Infections. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, mar. 2012. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033237>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

SCOTT, T.G.; CURRAN, B.; SMYTH, C.J. Electronmicroscopy of adhesive interactions between *Gardnerella vaginalis* and vaginal epithelial cells, McCoy cells and human red blood cells. **J Gen Microbiol**, v. 135, n. 3, p. 475–480, mar. 1989. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/content/135/3/475.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Nov. 2012.

SILVEIRA, A. C. O.; SOUZA, H. A. P. H. M.; ALBINI, C. A. The *Gardnerella vaginalis* and the urinary tract infections. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 4, p. 295-300, AGO. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v46n4/06.pdf>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

SCHELLENBERG, J.; LINKS, M. G.; HILL, J. E.; DUMONCEAUX, T. J.; PETERS, G. A.; TYLER, S.; BALL, T. B.; SEVERINI, A.; PLUMMER, F. A. Pyrosequencing of the Chaperonin-60 Universal Target as a Tool for Determining Microbial Community Composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 0, p. 2889-2898, mai. 2009.

SCHWEBKE, J. R. New concepts in the etiology of bacterial vaginosis. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 2, p. 143-147, mar. 2009.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; RUSCH, K.; RUSCH, V. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 5, n. 4, p. 1-7, fev. 2006. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/pdf/1476-0711-5-4.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

SEWANKAMBO, N.; GRAY, R. H.; WAWER, M. J.; PAXTON, L.; MCNAIRN, D.; WABWIRE-MANGEN, F.; SERWADDA, D.; LI, C.; KIWANUKA, N.; HILLIER, S. L.; RABE, L.; GAYDOS, C. A.; QUINN, T. C.; KONDE-LULE, J. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. **Lancet**, v. 350, n. 9077, p. 546-50, ago. 1997.

SHA, B. E.; CHEN, H. Y.; WANG, Q. J.; ZARIFFARD, M. R.; COHEN, M. H.; SPEAR, G. T. Utility of Amsel Criteria, Nugent Score, and Quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for Diagnosis of Bacterial Vaginosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4607-4612, set. 2005.

SOUZA, D. M. K. **Aspectos diagnósticos, epidemiológicos, microbiológicos e moleculares de *Gardnerella vaginalis* em mulheres atendidas na rede pública e particular de Juiz de Fora, MG**. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Imunologia e DIP) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

SPIEGEL, C.A. Bacterial vaginosis. **Clin Microbiol Ver**, v. 4, n. 4, p. 485–502, out. 1991. Disponível em: <http://cmr.asm.org/content/4/4/485.full.pdf+html>. Acesso em: 6 Dez. 2012.

SRINIVASAN, S.; FREDRICKS, D. N. The Human Vaginal bacterial Biota and Bacterial Vaginosis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 1-22, nov. 2008. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2008/750479/>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

SRINIVASAN, S.; LIU, C.; MITCHELL, C. M.; FIEDLER, T. L.; THOMAS, K. K.; AGNEW, K. J.; MARAZZO, J. M.; FREDRICKS, D. N. Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. 1-8, abr. 2010.

SRINIVASAN, S.; MORGAN, M. T.; LIU, C.; MATSEN, F. A.; HOFFMAN, N. G.; FIEDLER, T. L.; AGNEW, K. J.; MARRAZZO, J. M.; FREDRICKSD. N. More Than Meets the Eye: Associations of Vaginal Bacteria with Gram Stain Morphotypes Using Molecular Phylogenetic Analysis. **Plos One**, v. 8, n. 10, out. 2013. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0078633&representation=PDF>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ST JOHN, E.; MARES, D.; SPEAR, G. T. Bacterial vaginosis and host immunity. **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 4, p. 22–28, 2007. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11904-007-0004-y?LI=true>. Acesso em: 20 jan. 2013.

SWIDSINSKI, A.; DOERFFEL, Y.; LOENING-BAUCKE, V.; SWIDSINSKI, S.; VERSTRAELEN, H.; VANEECHOUTTE, M.; LEMM, V.; SCHILLING, J.; MENDLING, W. *Gardnerella* Biofilm Involves Females and Males and Is Transmitted Sexually. **Gynecol Obstet Invest**, v. 70, p. 256-263, out. 2010.

SWIDSINSKI, A.; RFFEL, Y.; LOENING-BAUCKE, V.; SCHILLING, J.; MENDLING, W. Response of *Gardnerellavaginalis* biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. **FEMS**, v. 61, p. 41-46, fev. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.2010.00743.x/pdf>. Acesso em: 16 jan. 2014.

SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W.; LOENING-BAUCKE, V.; LADHOFF, A.; SWIDSINSKI, S.; HALE, L. P.; LOCHS, H. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 106, n. 5, p. 1013–1023, nov. 2005. Disponível em: http://journals.lww.com/greenjournal/Abstract/2005/11000/Adherent_Biofilms_in_Bacterial_Vaginosis.19.aspx. Acesso em: 20 jan. 2013.

SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W.; LOENING-BAUCKE, V.; SWIDSINSKI, S.; DÖRFFEL, Y.; SCHOLZE, J.; LOCHS, H.; VERSTRAELEN, H. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. **AJOG**, jun. 2007.

SZOKE, I.; PASCU, C.; NAGY, E.; LJUNG, A.; WADSTROM, T. Binding of extracellular matrix proteins to the surface of anaerobic bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 338-343, Nov. 1996. Disponível em: <http://jmm.sgmjournals.org/content/45/5/338.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

TARNBERG, M.; JAKOBSSON, T.; JONASSON, J.; FORSUM, U. Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. **APMIS**, v. 110, p. 802-810, 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0463.2002.1101106.x/pdf>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; BORRIELLO, S. P.; TAYLOR-ROBINSON, D. Identification and preliminary characterization of a cytotoxin isolated from *Mobiluncus* spp. **Int J Exp Pathol**, v. 74, p. 357–66, abr. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2001857/pdf/ijexpath00016-0037.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.

THIES, F. L.; KONIG, W.; KONIG, B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. **J Med Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 755-761, jun. 2007.

THORSEN, P.; JENSEN, I. P.; JEUNE, B.; EBBESEN, N.; ARPI, M.; BREMMELGAARD, A.; MOLLER, B.R. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 178, n. 3, p. 580-587, mar. 1998.

TUROVSKY, Y.; SUTYAK NOLL, K.; CHIKINDAS, M. L. The aetiology of bacterial vaginosis. **Journal of Applied Microbiology**, New Brunswick, Nova Jersey, v. 110, p. 1105-1128, fev. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2011.04977.x/pdf>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

VÁSQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNÉ, S.; FORSUM, U.; MOLIN, G. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2746–2749, mai. 2002. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/40/8/2746.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G.; DELANGHE, J.; VAN SIMAEY, L.; DE GANCK, C.; TEMMERMAN, M.; VANEECHOUTTE, M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. **BMC Microbiol** 2004, v. 4, n. 16, p. 1-11, abr. 2004.

VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H. CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G.; SIMAEY, L. V.; GANCK, C.; BACKER, E.; TEMMERMAN, M.; VANEECHOUTTE, M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. **BMC Microbiol**, v. 5, n. 61, p. 1-11, out. 2005.

VERSTRAELEN, H. Bacterial vaginosis: a sexually enhance disease. **Int J STD AIDS**, v. 19, p. 575–576, ago. 2008.

VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; VANECHOUTTE, M.; TEMMERMAN, M. The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. **BMC Infect Dis**, v. 10, n. 81, p. 1-11, mar. 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-10-81.pdf>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

VITALI, B.; PUGLIES, E. C.; BIAGI, E.; CANDELA, M.; TURRONI, S.; BELLEN, G.; DONDERS, G. G. G.; BRIGIDI, P. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. **APPL ENVIRON MICROBIOL**, v. 73, n. 18, p. 5731-5741, set. 2007. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/73/18/5731.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Jan. 2013

WAGNER, M.; HAIDER, S. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 96-102, 2012.

WAITES, K.; TALKINGTON, D. New developments in human diseases due to mycoplasmas. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. F. **Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control**. Wymondham: Horizon Bioscience, 2005, cap. 9, p. 289–354.

WALLNER, G., AMANN, R. and BEISKER, W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. **Cytometry**, vol. 14, p. 136-143, 1993.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 344, p. 63-65, mai. 1990.

WATTS, D. H.; FAZARRI, M.; MINKOFF, H.; HILLIER, S. L.; SHA, B.; GLESBY, M.; LEVINE, A. M.; BURK, R.; PALEFSKY, J. M.; MOXLEY, M.; AHDIEH-GRANT, L.; STRICKLER, H. D. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 7, p. 1129-1139, abr. 2005. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/191/7/1129.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

WOLRATH, H.; FORSUM, U.; LARSSON, P. G.; BORÉN, H. Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 4026-4031, nov. 2001. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/39/11/4026.full.pdf+html>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

WOODROW, N.; LAMONT, R. F. Bacterial vaginosis: its importance in obstetrics. **Hospital Medicine**, v. 59, n. 6, p. 447-450, 1998.

YEN, S.; SHAFER, M.; MONCADA, J.; CAMPBELL, C. J.; FLINN, S. D.; BOYER, C. B. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. **Obstet Gynecol**, v. 102, n. 5, p. 927-933, nov. 2003. Disponível em: http://journals.lww.com/greenjournal/abstract/2003/11000/bacterial_vaginosis_in_sexually_experienced_and.9.aspx. Acesso em: 20 Jan. 2013.

YEOMAN, C.J.; YILDIRIM, S.; THOMAS, S.M.; DURKIN, A.S.; TORRALBA, M.; SUTTON, G.; BUHAY, C.J.; DING, Y.; DUGAN-ROCHA, S. P.; MUZNY, D. M.; QIN, X.; GIBBS, R. A.; LEIGH, S. R; STUMPF, R.; WHITE, B. A.; HIGHLANDER, S. K.; NELSON, K. E.; WILSON, B. A. Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, ago. 2010. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0012411>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

ZARIFFARD, M.R.; SAIFUDDIN, M.; SHA, B.E.; SPEAR, G.T. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by Real-Time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 34, n. 4, p. 277-281, out. 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00634.x/pdf>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

ZHOU, X.; BENT, S. J.; SCHNEIDER, M. G.; DAVIS, C. C.; ISLAM, M. R.; FORNEY, L. J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2565–2573, ago. 2004. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/content/150/8/2565.full.pdf+html>, Acesso em: 26 Fev. 2013.

ZIMMERMANN, J. B.; PEREIRA, L. A.; CARDOSO, B. S.; ALMEIDA, P. L.; CALDEIRA, R. M.; REZENDE, D. F. Vaginose bacteriana: frequência entre usuárias do serviço público e da rede privada de saúde. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 35, n. 2, p. 97-104, abr./jun. 2009. Disponível em: <http://ojs.hurevista.ufjf.br/index.php/hurevista/article/viewArticle/461>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

ZOZAYA-HINCHLIFFE, M.; LILLIS, R.; MARTIN, D.H.; FERRIS, M.J. Quantitative PCR assessments of Bacterial Species in Women with and without Bacterial Vaginosis. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1812-1819, mai. 2010. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/48/5/1812.full.pdf+html>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

ANEXO A – ESCORE DE NUGENT (DIAGNÓSTICO LABORATORIAL).

Escore de Nugent		
Tipo Morfológico	Número de micro-organismos/Campo de imersão	Pontuação
	>30	0
<i>Lactobacillus</i> spp. ou Bacilos de Doderlein (bacilos Gram-positivos)	5 – 30 1 – 4 1 0	1 2 3 4
<i>Mobiluncus</i> spp. (bacilos Gram-negativos curvos)	0 1 – 4 5	0 1 2
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Bacteroides</i> sp. (bacilos Gram-variáveis e Gram-negativos pequenos)	>30 5 – 30 1 – 4 1 0	4 3 2 1 0
Some os pontos obtidos e verifique a interpretação		
Pontuação	Interpretação	
0-3	Normal	
4-6	Intermediário	
7-10	Vaginose Bacteriana	

Fonte: Adaptado de Nugent, Krohn e Hillier (1991).

APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA DAS AMOSTRAS DA SECREÇÃO VAGINAL DAS PACIENTES PELA TÉCNICA DE FISH DOS FILOS A-PROTEOBACTERIA, B-PROTEOBACTERIA, Γ-PROTEOBACTERIA, FIRMICUTES E ACTINOBACTERIA E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COMO ESCORE DE NUGENT.

Amostra	α-Proteo (10 ⁶ céls/mL)	β-Proteo (10 ⁶ céls/mL)	γ-Proteo (10 ⁶ céls/mL)	Firmicutes (10 ⁶ céls/mL)	Actinobacteria (10 ⁶ céls/mL)	DAPI (10 ⁶ céls/mL)	Escore de Nugent
219	0,00	0,00	0,27	2,92	0,00	14,44	INTERMEDIÁRIA
229	0,00	0,71	3,92	0,00	0,80	11,50	INTERMEDIÁRIA
101	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,86	SAUDÁVEL
102	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,79	SAUDÁVEL
111	4,13	0,21	0,00	0,03	0,72	11,59	SAUDÁVEL
112	2,97	0,00	0,17	0,14	0,00	39,11	SAUDÁVEL
114	0,00	0,00	0,28	0,14	0,00	14,85	SAUDÁVEL
120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,70	SAUDÁVEL
121	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,82	SAUDÁVEL
122	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,69	SAUDÁVEL
123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,29	SAUDÁVEL
124	0,00	0,67	0,00	0,00	0,13	5,69	SAUDÁVEL
125	5,70	0,00	0,00	0,00	0,00	17,30	SAUDÁVEL
133	0,00	0,42	0,00	0,13	0,36	22,00	SAUDÁVEL
130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,30	SAUDÁVEL
131	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,16	SAUDÁVEL
132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,79	SAUDÁVEL
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,72	SAUDÁVEL
136	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89	15,67	SAUDÁVEL
137	0,00	0,06	4,60	0,00	0,00	25,00	SAUDÁVEL
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,37	SAUDÁVEL
202	0,00	0,00	0,29	0,00	1,95	14,72	SAUDÁVEL
203	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,37	SAUDÁVEL
204	0,00	0,00	0,00	0,00	0,79	8,70	SAUDÁVEL
207	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,84	SAUDÁVEL
214	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	6,32	SAUDÁVEL
215	0,00	0,54	0,00	1,13	0,44	18,29	SAUDÁVEL
216	0,08	0,94	0,23	0,78	2,71	27,80	SAUDÁVEL
218	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	10,66	SAUDÁVEL
220	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	3,60	SAUDÁVEL
224	0,00	1,33	0,00	0,00	0,00	27,68	SAUDÁVEL
225	0,65	4,91	0,00	0,00	2,10	8,77	SAUDÁVEL
228	0,00	1,85	0,00	0,00	0,00	12,17	SAUDÁVEL
234	0,00	0,65	0,00	0,00	0,00	10,73	SAUDÁVEL
236	3,63	1,62	0,00	3,64	0,40	15,77	SAUDÁVEL
239	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	16,47	SAUDÁVEL
240	0,05	0,00	0,00	0,00	0,06	12,76	SAUDÁVEL
241	0,00	0,29	0,00	0,40	0,59	22,42	SAUDÁVEL

Continua.

Amostra	α -Proteo (10 ⁶ céls/mL)	β -Proteo (10 ⁶ céls/mL)	γ -Proteo (10 ⁶ céls/mL)	Firmicutes (10 ⁶ céls/mL)	Actinobacteria (10 ⁶ céls/mL)	DAPI (10 ⁶ céls/mL)	Escore de Nugent
242	0,00	0,13	0,00	0,76	0,00	8,70	SAUDÁVEL
244	0,75	0,00	0,00	0,00	0,69	12,06	SAUDÁVEL
245	0,00	0,52	0,24	0,00	0,00	35,38	SAUDÁVEL
246	1,62	0,78	0,24	0,00	0,21	8,07	SAUDÁVEL
248	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,81	SAUDÁVEL
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,17	VB
2	0,00	0,00	0,00	0,00	1,05	5,29	VB
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,35	VB
103	0,00	0,00	0,00	1,87	0,00	64,64	VB
104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,27	VB
105	2,41	0,00	0,00	0,00	0,00	16,60	VB
106	0,00	0,00	0,00	0,38	0,03	18,47	VB
107	0,00	1,22	0,03	0,00	0,00	6,69	VB
211	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	14,86	VB
113	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,97	VB
115	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,20	VB
119	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,60	VB
126	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,73	VB
127	0,00	2,80	0,00	0,00	0,00	19,99	VB
128	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	8,84	VB
129	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	25,82	VB
134	0,00	0,00	0,00	3,16	0,08	25,07	VB
138	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	34,79	VB
139	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	12,41	VB
206	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,77	VB
208	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	3,39	VB
209	0,19	0,00	0,00	0,10	0,00	12,83	VB
217	1,13	0,44	0,00	0,15	0,21	28,78	VB
222	0,00	0,00	0,00	0,34	0,00	16,68	VB
226	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,47	VB
230	0,23	0,23	0,00	0,78	0,00	19,20	VB
231	0,17	0,19	0,00	0,00	0,44	10,17	VB
232	0,00	0,00	0,00	0,00	1,15	15,28	VB
237	0,00	0,40	1,83	0,00	1,03	14,30	VB
243	0,00	0,00	1,78	8,78	3,67	48,67	VB
247	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	26,05	VB

Conclusão.

APÊNDICE B - QUANTIFICAÇÃO DE *GARDNERELLA VAGINALIS* E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.

Amostra	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
219	2,78E+04	6,95E+06	6,84	INTERMEDIÁRIA
221	2,14E+04	1,07E+07	7,03	INTERMEDIÁRIA
229	2,47E+05	1,24E+08	8,09	INTERMEDIÁRIA
101	5,115	1,28E+03	3,11	SAUDÁVEL
102	9,68	4,84E+03	3,68	SAUDÁVEL
108	7,16E+01	3,58E+04	4,55	SAUDÁVEL
111	6,63E+01	1,66E+04	4,22	SAUDÁVEL
112	2,29	1,15E+03	3,06	SAUDÁVEL
114	1,16E+02	5,78E+04	4,76	SAUDÁVEL
120	1,85E+01	9,23E+03	3,96	SAUDÁVEL
121	0,509	2,54E+02	2,40	SAUDÁVEL
122	5,42E+01	2,71E+04	4,43	SAUDÁVEL
123	6,23	3,12E+03	3,49	SAUDÁVEL
124	2,18	1,09E+03	3,04	SAUDÁVEL
125	6,27E+01	3,13E+04	4,50	SAUDÁVEL
130	0	0	0	SAUDÁVEL
131	4,38	2,19E+03	3,34	SAUDÁVEL
132	0	0	0	SAUDÁVEL
133	0	0	0	SAUDÁVEL
135	2,03E+03	1,02E+06	6,01	SAUDÁVEL
136	0	0	0,00	SAUDÁVEL
137	1,34	6,70E+02	2,83	SAUDÁVEL
150	0	0	0	SAUDÁVEL
202	1,91E+01	4,76E+03	3,68	SAUDÁVEL
203	0	0	0	SAUDÁVEL
204	2,08	5,20E+02	2,72	SAUDÁVEL
207	1,07E+01	5,35E+03	3,73	SAUDÁVEL
214	0	0	0	SAUDÁVEL
215	2,08E+01	5,19E+03	3,71	SAUDÁVEL
216	9,27E+02	2,32E+05	5,37	SAUDÁVEL
218	2,39	5,98E+02	2,78	SAUDÁVEL
220	5,93E+01	1,48E+04	4,17	SAUDÁVEL
224	2,37E+01	1,18E+04	4,07	SAUDÁVEL
225	1,26	6,30E+02	2,80	SAUDÁVEL
228	0,274	6,85E+01	1,84	SAUDÁVEL
234	0	0	0	SAUDÁVEL
236	3,35	8,38E+02	2,92	SAUDÁVEL
239	2,69E+03	6,73E+05	5,83	SAUDÁVEL
240	4,315	1,08E+03	3,03	SAUDÁVEL
241	3,86	1,93E+03	3,29	SAUDÁVEL
242	1,22E+01	6,10E+03	3,79	SAUDÁVEL

Continua.

Amostra	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
244	0	0	0,00	SAUDÁVEL
245	3,34E+03	8,35E+05	5,92	SAUDÁVEL
246	4,95E+01	1,24E+04	4,09	SAUDÁVEL
248	2,45E+02	6,13E+04	4,79	SAUDÁVEL
1	1,70E+04	8,50E+06	6,93	VB
2	1,13E+03	5,65E+05	5,75	VB
3	1,51E+05	7,55E+07	7,88	VB
103	4,15E+04	2,07E+07	7,32	VB
104	1,98E+04	9,90E+06	7,00	VB
105	1,89E+04	9,45E+06	6,98	VB
106	1,07E+03	5,35E+05	5,73	VB
107	8,06E+02	4,03E+05	5,61	VB
109	2,53E+04	1,26E+07	7,10	VB
110	8,29E+04	2,07E+07	7,32	VB
113	2,29E+04	1,14E+07	7,06	VB
115	1,44E+05	7,18E+07	7,86	VB
116	4,46E+04	2,23E+07	7,35	VB
117	1,28E+04	6,40E+06	6,81	VB
119	1,24E+04	6,18E+06	6,79	VB
126	1,28E+05	6,40E+07	7,81	VB
127	3,50E+05	1,75E+08	8,24	VB
128	1,03E+06	5,13E+08	8,71	VB
129	7,03E+03	3,52E+06	6,55	VB
134	1,94E+05	9,70E+07	7,99	VB
138	1,96E+03	9,80E+05	5,99	VB
139	2,02E+05	1,01E+08	8,00	VB
206	7,81	1,95E+03	3,29	VB
208	5,02E+05	2,51E+08	8,40	VB
209	2,53E+04	6,33E+06	6,80	VB
211	1,24E+05	6,20E+07	7,79	VB
217	4,05E+03	1,01E+06	6,01	VB
222	5,76E+03	1,44E+06	6,16	VB
226	3,15E+04	7,88E+06	6,90	VB
230	1,37E+06	3,41E+08	8,53	VB
231	4,40E+02	2,20E+05	5,34	VB
232	1,43E+05	7,13E+07	7,85	VB
237	8,61E+03	2,15E+06	6,33	VB
238	5,36	1,34E+03	3,13	VB
243	4,66E+03	2,33E+06	6,37	VB
247	1,77E+04	4,41E+06	6,64	VB

Conclusão.

APÊNDICE C - QUANTIFICAÇÃO DE *ATOPOBIUM VAGINAE* E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.

Amostras	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
221	3,98E+01	1,99E+04	4,299	INTERMEDIARIA
229	2,16E+02	1,08E+05	5,032	INTERMEDIARIA
219	1,32E+05	3,29E+07	7,517	INTERMEDIARIA
121	0	0	0	SAUDÁVEL
207	2,94	1,47E+03	3,167	SAUDÁVEL
150	5,95	1,49E+03	3,172	SAUDÁVEL
241	3,99	1,99E+03	3,299	SAUDÁVEL
244	8,54	2,13E+03	3,329	SAUDÁVEL
101	9,70	2,43E+03	3,385	SAUDÁVEL
234	5,20	2,60E+03	3,415	SAUDÁVEL
218	1,14E+01	2,84E+03	3,453	SAUDÁVEL
240	1,93E+01	4,81E+03	3,682	SAUDÁVEL
124	1,02E+01	5,09E+03	3,707	SAUDÁVEL
135	1,56E+01	7,82E+03	3,893	SAUDÁVEL
203	3,56E+01	8,89E+03	3,949	SAUDÁVEL
122	1,81E+01	9,05E+03	3,957	SAUDÁVEL
137	2,02E+01	1,01E+04	4,004	SAUDÁVEL
108	2,04E+01	1,02E+04	4,008	SAUDÁVEL
242	2,06E+01	1,03E+04	4,012	SAUDÁVEL
202	4,42E+01	1,11E+04	4,043	SAUDÁVEL
246	4,71E+01	1,18E+04	4,071	SAUDÁVEL
102	2,47E+01	1,24E+04	4,092	SAUDÁVEL
228	5,11E+01	1,28E+04	4,106	SAUDÁVEL
214	5,38E+01	1,35E+04	4,129	SAUDÁVEL
136	2,86E+01	1,43E+04	4,155	SAUDÁVEL
125	2,91E+01	1,45E+04	4,162	SAUDÁVEL
114	3,10E+01	1,55E+04	4,190	SAUDÁVEL
120	3,28E+01	1,64E+04	4,215	SAUDÁVEL
132	3,32E+01	1,66E+04	4,219	SAUDÁVEL
131	3,47E+01	1,73E+04	4,239	SAUDÁVEL
204	8,52E+01	2,13E+04	4,328	SAUDÁVEL
112	4,74E+01	2,37E+04	4,375	SAUDÁVEL
224	5,04E+01	2,52E+04	4,401	SAUDÁVEL
123	6,44E+01	3,22E+04	4,508	SAUDÁVEL
220	1,32E+02	3,29E+04	4,517	SAUDÁVEL
130	1,33E+02	3,31E+04	4,520	SAUDÁVEL
111	1,34E+02	3,34E+04	4,523	SAUDÁVEL
215	1,57E+02	3,91E+04	4,592	SAUDÁVEL
133	7,98E+01	3,99E+04	4,601	SAUDÁVEL
248	2,03E+02	5,06E+04	4,704	SAUDÁVEL
236	2,38E+02	5,94E+04	4,774	SAUDÁVEL

Continua.

Amostras	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
225	1,49E+02	7,47E+04	4,873	SAUDÁVEL
216	8,75E+02	2,19E+05	5,340	SAUDÁVEL
239	1,73E+03	4,31E+05	5,635	SAUDÁVEL
245	1,10E+05	2,76E+07	7,441	SAUDÁVEL
238	1,28E+01	3,19E+03	3,503	VB
1	2,49E+01	1,24E+04	4,094	VB
103	3,16E+01	1,58E+04	4,198	VB
107	5,04E+01	2,52E+04	4,401	VB
206	1,28E+03	3,19E+05	5,503	VB
243	7,84E+03	3,92E+06	6,593	VB
209	5,54E+04	1,39E+07	7,141	VB
104	6,70E+04	3,35E+07	7,525	VB
231	8,84E+04	4,42E+07	7,645	VB
222	2,83E+05	7,08E+07	7,850	VB
129	1,55E+05	7,75E+07	7,889	VB
217	3,23E+05	8,08E+07	7,907	VB
119	1,92E+05	9,60E+07	7,982	VB
226	4,30E+05	1,07E+08	8,031	VB
2	2,69E+05	1,35E+08	8,129	VB
139	3,64E+05	1,82E+08	8,259	VB
3	5,58E+05	2,79E+08	8,446	VB
230	6,23E+05	3,11E+08	8,493	VB
110	1,29E+06	3,21E+08	8,507	VB
134	6,72E+05	3,36E+08	8,526	VB
128	7,21E+05	3,61E+08	8,557	VB
237	1,90E+06	4,75E+08	8,677	VB
113	1,11E+06	5,56E+08	8,745	VB
105	1,25E+06	6,25E+08	8,796	VB
117	1,52E+06	7,58E+08	8,879	VB
116	1,54E+06	7,68E+08	8,885	VB
106	1,59E+06	7,95E+08	8,900	VB
211	2,20E+06	1,10E+09	9,041	VB
247	4,71E+06	1,18E+09	9,070	VB
138	2,61E+06	1,30E+09	9,115	VB
109	2,94E+06	1,47E+09	9,167	VB
208	3,30E+06	1,65E+09	9,217	VB
126	4,40E+06	2,20E+09	9,342	VB
115	4,43E+06	2,21E+09	9,345	VB
127	4,80E+06	2,40E+09	9,380	VB
232	1,02E+07	5,11E+09	9,709	VB

Conclusão.

APÊNDICE D - QUANTIFICAÇÃO DE *MOBILUNCUS* SPP. E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.

Amostras	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
229	2,77	1,38E+03	3,14	INTERMEDIÁRIA
221	2,93E+01	1,47E+04	4,17	INTERMEDIÁRIA
219	2,04E+03	5,09E+05	5,71	INTERMEDIÁRIA
102	0	0	0	SAUDÁVEL
108	0	0	0	SAUDÁVEL
214	0	0	0	SAUDÁVEL
215	0	0	0	SAUDÁVEL
216	0	0	0	SAUDÁVEL
218	0	0	0	SAUDÁVEL
130	6,97E-02	1,74E+01	1,24	SAUDÁVEL
204	7,45E-02	1,86E+01	1,27	SAUDÁVEL
228	8,90E-02	2,23E+01	1,35	SAUDÁVEL
203	1,39E-01	3,48E+01	1,54	SAUDÁVEL
135	8,08E-02	4,04E+01	1,61	SAUDÁVEL
125	8,52E-02	4,26E+01	1,63	SAUDÁVEL
150	1,87E-01	4,66E+01	1,67	SAUDÁVEL
133	9,99E-02	4,99E+01	1,70	SAUDÁVEL
136	1,32E-01	6,60E+01	1,82	SAUDÁVEL
202	2,86E-01	7,14E+01	1,85	SAUDÁVEL
137	1,47E-01	7,35E+01	1,87	SAUDÁVEL
132	2,08E-01	1,04E+02	2,02	SAUDÁVEL
207	3,41E-01	1,71E+02	2,23	SAUDÁVEL
239	7,28E-01	1,82E+02	2,26	SAUDÁVEL
245	9,14E-01	2,28E+02	2,36	SAUDÁVEL
240	9,85E-01	2,46E+02	2,39	SAUDÁVEL
234	5,66E-01	2,83E+02	2,45	SAUDÁVEL
248	1,16	2,90E+02	2,46	SAUDÁVEL
131	7,45E-01	3,72E+02	2,57	SAUDÁVEL
101	5,25	1,31E+03	3,12	SAUDÁVEL
242	2,78	1,39E+03	3,14	SAUDÁVEL
241	2,87	1,44E+03	3,16	SAUDÁVEL
111	6,49	1,62E+03	3,21	SAUDÁVEL
220	7,30	1,83E+03	3,26	SAUDÁVEL
246	7,76	1,94E+03	3,29	SAUDÁVEL
244	9,46	2,36E+03	3,37	SAUDÁVEL
225	8,80	4,40E+03	3,64	SAUDÁVEL
112	1,46E+01	7,30E+03	3,86	SAUDÁVEL
224	1,55E+01	7,73E+03	3,89	SAUDÁVEL
121	1,65E+01	8,23E+03	3,92	SAUDÁVEL
122	1,67E+01	8,35E+03	3,92	SAUDÁVEL

Continua.

Amostras	cópias/μL	cópias/mL (ajust)	log cópias/mL	Escore de Nugent
114	2,12E+01	1,06E+04	4,02	SAUDÁVEL
124	2,34E+01	1,17E+04	4,07	SAUDÁVEL
120	2,51E+01	1,26E+04	4,10	SAUDÁVEL
236	5,69E+01	1,42E+04	4,15	SAUDÁVEL
123	4,42E+01	2,21E+04	4,34	SAUDÁVEL
110	0	0	0	VB
237	0	0	0	VB
206	3,85E-02	9,61E+00	0,98	VB
134	4,31E-02	2,16E+01	1,33	VB
129	6,98E-02	3,49E+01	1,54	VB
209	3,36E-01	8,39E+01	1,92	VB
126	2,16E-01	1,08E+02	2,03	VB
127	2,66E-01	1,33E+02	2,12	VB
238	8,74E-01	2,19E+02	2,34	VB
138	5,55E-01	2,78E+02	2,44	VB
139	6,83E-01	3,42E+02	2,53	VB
247	1,61	4,02E+02	2,60	VB
226	1,33E+01	3,32E+03	3,52	VB
109	7,85	3,93E+03	3,59	VB
107	7,90	3,95E+03	3,60	VB
106	8,88	4,44E+03	3,65	VB
117	1,21E+01	6,03E+03	3,78	VB
3	1,46E+01	7,30E+03	3,86	VB
1	1,70E+01	8,50E+03	3,93	VB
231	2,16E+01	1,08E+04	4,03	VB
113	3,72E+01	1,86E+04	4,27	VB
115	9,64E+01	4,82E+04	4,68	VB
222	1,93E+02	4,83E+04	4,68	VB
211	1,45E+02	7,23E+04	4,86	VB
2	2,43E+02	1,22E+05	5,08	VB
103	1,63E+03	8,15E+05	5,91	VB
119	2,63E+03	1,32E+06	6,12	VB
128	4,20E+03	2,10E+06	6,32	VB
208	5,34E+03	2,67E+06	6,43	VB
243	7,88E+03	3,94E+06	6,60	VB
105	8,04E+04	4,02E+07	7,60	VB
232	8,08E+04	4,04E+07	7,61	VB
217	8,31E+05	2,08E+08	8,32	VB
230	2,06E+06	5,14E+08	8,71	VB
116	6,36E+06	3,18E+09	9,50	VB
104	3,51E+07	1,76E+10	10,24	VB

Conclusão.

APÊNDICE E – QUANTIFICAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SPP. E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.

Amostra	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
219	5,27E+02	1,32E+05	5,12	INTERMEDIARIA
221	1,14E+04	5,70E+06	6,76	INTERMEDIARIA
229	2,17E+05	1,08E+08	8,03	INTERMEDIARIA
228	2,22E-01	5,55E+01	1,74	SAUDÁVEL
245	1,07E+01	2,66E+03	3,43	SAUDÁVEL
214	1,84E+01	4,60E+03	3,66	SAUDÁVEL
242	1,11E+02	5,55E+04	4,74	SAUDÁVEL
102	6,96E+02	3,48E+05	5,54	SAUDÁVEL
112	5,40E+03	2,70E+06	6,43	SAUDÁVEL
123	8,99E+03	4,50E+06	6,65	SAUDÁVEL
224	9,83E+03	4,92E+06	6,69	SAUDÁVEL
220	3,05E+04	7,63E+06	6,88	SAUDÁVEL
203	3,71E+04	9,28E+06	6,97	SAUDÁVEL
132	2,48E+04	1,24E+07	7,09	SAUDÁVEL
239	5,80E+04	1,45E+07	7,16	SAUDÁVEL
204	5,99E+04	1,50E+07	7,18	SAUDÁVEL
101	6,55E+04	1,64E+07	7,21	SAUDÁVEL
218	6,75E+04	1,69E+07	7,23	SAUDÁVEL
248	1,04E+05	2,60E+07	7,41	SAUDÁVEL
121	5,97E+04	2,99E+07	7,47	SAUDÁVEL
236	1,21E+05	3,03E+07	7,48	SAUDÁVEL
246	1,46E+05	3,64E+07	7,56	SAUDÁVEL
130	1,56E+05	3,90E+07	7,59	SAUDÁVEL
136	8,84E+04	4,42E+07	7,65	SAUDÁVEL
240	1,99E+05	4,98E+07	7,70	SAUDÁVEL
137	1,10E+05	5,49E+07	7,74	SAUDÁVEL
207	1,14E+05	5,70E+07	7,76	SAUDÁVEL
202	2,32E+05	5,79E+07	7,76	SAUDÁVEL
133	1,28E+05	6,38E+07	7,80	SAUDÁVEL
111	2,57E+05	6,41E+07	7,81	SAUDÁVEL
215	2,72E+05	6,80E+07	7,83	SAUDÁVEL
125	1,41E+05	7,03E+07	7,85	SAUDÁVEL
135	1,44E+05	7,19E+07	7,86	SAUDÁVEL
131	1,47E+05	7,35E+07	7,87	SAUDÁVEL
234	1,53E+05	7,65E+07	7,88	SAUDÁVEL
241	1,67E+05	8,35E+07	7,92	SAUDÁVEL
124	1,76E+05	8,78E+07	7,94	SAUDÁVEL
244	3,58E+05	8,94E+07	7,95	SAUDÁVEL
120	2,09E+05	1,04E+08	8,02	SAUDÁVEL
225	2,36E+05	1,18E+08	8,07	SAUDÁVEL
108	2,52E+05	1,26E+08	8,10	SAUDÁVEL

Continua.

Amostra	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
216	5,23E+05	1,31E+08	8,12	SAUDÁVEL
122	2,72E+05	1,36E+08	8,13	SAUDÁVEL
114	6,90E+05	3,45E+08	8,54	SAUDÁVEL
150	0	0	0	SAUDÁVEL
238	8,35E-01	2,09E+02	2,32	VB
230	1,63	4,07E+02	2,61	VB
217	2,07E+01	5,18E+03	3,71	VB
106	1,04E+01	5,20E+03	3,72	VB
209	2,31E+01	5,78E+03	3,76	VB
109	2,54E+01	1,27E+04	4,10	VB
138	3,12E+01	1,56E+04	4,19	VB
119	6,68E+01	3,34E+04	4,52	VB
247	1,84E+02	4,59E+04	4,66	VB
134	6,00E+02	3,00E+05	5,48	VB
105	9,42E+02	4,71E+05	5,67	VB
117	1,70E+03	8,50E+05	5,93	VB
129	1,73E+03	8,67E+05	5,94	VB
116	2,10E+03	1,05E+06	6,02	VB
211	4,13E+03	2,06E+06	6,31	VB
104	5,42E+03	2,71E+06	6,43	VB
128	5,71E+03	2,86E+06	6,46	VB
237	1,16E+04	2,90E+06	6,46	VB
115	8,37E+03	4,18E+06	6,62	VB
113	1,19E+04	5,95E+06	6,77	VB
127	2,06E+04	1,03E+07	7,01	VB
206	4,67E+04	1,17E+07	7,07	VB
208	2,81E+04	1,41E+07	7,15	VB
1	3,21E+04	1,61E+07	7,21	VB
222	7,22E+04	1,81E+07	7,26	VB
3	4,57E+04	2,28E+07	7,36	VB
103	6,28E+04	3,14E+07	7,50	VB
226	1,38E+05	3,45E+07	7,54	VB
232	7,84E+04	3,92E+07	7,59	VB
243	1,07E+05	5,35E+07	7,73	VB
139	1,58E+05	7,88E+07	7,90	VB
2	2,27E+05	1,13E+08	8,05	VB
126	2,81E+05	1,41E+08	8,15	VB
231	5,47E+05	2,74E+08	8,44	VB
107	7,68E+05	3,84E+08	8,58	VB
110	0	0	0	VB

Conclusão.

APÊNDICE F - QUANTIFICAÇÃO DE *MYCOPLASMA HOMINIS* E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O ESCORE DE NUGENT.

Amostras	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
229	0	0	0	INTERMEDIARIA
221	1,51	7,55E+02	2,878	INTERMEDIARIA
101	0	0	0	SAUDÁVEL
102	0	0	0	SAUDÁVEL
108	0	0	0	SAUDÁVEL
114	0	0	0	SAUDÁVEL
120	0	0	0	SAUDÁVEL
121	0	0	0	SAUDÁVEL
122	0	0	0	SAUDÁVEL
123	0	0	0	SAUDÁVEL
124	0	0	0	SAUDÁVEL
125	0	0	0	SAUDÁVEL
130	0	0	0	SAUDÁVEL
131	0	0	0	SAUDÁVEL
132	0	0	0	SAUDÁVEL
133	0	0	0	SAUDÁVEL
135	0	0	0	SAUDÁVEL
136	0	0	0	SAUDÁVEL
203	0	0	0	SAUDÁVEL
204	0	0	0	SAUDÁVEL
207	0	0	0	SAUDÁVEL
214	0	0	0	SAUDÁVEL
218	0	0	0	SAUDÁVEL
224	0	0	0	SAUDÁVEL
225	0	0	0	SAUDÁVEL
228	0	0	0	SAUDÁVEL
234	0	0	0	SAUDÁVEL
236	0	0	0	SAUDÁVEL
239	0	0	0	SAUDÁVEL
240	0	0	0	SAUDÁVEL
241	0	0	0	SAUDÁVEL
242	0	0	0	SAUDÁVEL
244	0	0	0	SAUDÁVEL
245	0	0	0	SAUDÁVEL
246	0	0	0	SAUDÁVEL
248	0	0	0	SAUDÁVEL
112	3,41	1,71E+03	3,232	SAUDÁVEL
1	0	0	0	VB
103	0	0	0	VB
105	0	0	0	VB

Continua.

Amostras	Cópias/μL	Cópias/mL	log cópias/mL	Escore de Nugent
106	0	0	0	VB
107	0	0	0	VB
109	0	0	0	VB
110	0	0	0	VB
113	0	0	0	VB
117	0	0	0	VB
126	0	0	0	VB
127	0	0	0	VB
129	0	0	0	VB
138	0	0	0	VB
139	0	0	0	VB
206	0	0	0	VB
208	0	0	0	VB
217	0	0	0	VB
222	0	0	0	VB
230	0	0	0	VB
237	0	0	0	VB
238	0	0	0	VB
128	1,15	5,75E+02	2,760	VB
116	2,39	1,20E+03	3,077	VB
231	3,05	1,52E+03	3,183	VB
243	4,42	2,21E+03	3,344	VB
226	4,83E+02	1,21E+05	5,081	VB
2	1,24E+03	6,20E+05	5,792	VB
3	3,54E+03	1,77E+06	6,248	VB
134	4,12E+03	2,06E+06	6,313	VB
115	5,83E+03	2,92E+06	6,465	VB
232	6,63E+03	3,32E+06	6,520	VB
104	1,25E+04	6,25E+06	6,796	VB
247	5,84E+04	1,46E+07	7,164	VB

Conclusão.