



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

LEONARDO ARRUDA MARTINS

**O SIGNIFICADO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA EM CITOLOGIA EM MEIO
LIQUIDO (SURE-PATH).**

FORTALEZA

2015

LEONARDO ARRUDA MARTINS

O SIGNIFICADO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM
DIAGNOSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA EM CITOLOGIA EM MEIO LIQUIDO
(SURE-PATH)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia Tropical.

Orientador: Prof. José Eleutério Junior

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M344s Martins, Leonardo Arruda.
 O significado do infiltrado inflamatório em pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana em citologia em meio líquido (SURE-PATH)/ Leonardo Arruda Martins. – 2014.
 49 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2014.
 Orientação: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.
1. Vaginose Bacteriana. 2. Biologia Celular. 3. Vulvovaginite. 4. Leucócitos. 5. Imunidade. 6. Candidíase Vulvovaginal. I. Título.

CDD 616.951

LEONARDO ARRUDA MARTINS

O SIGNIFICADO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM
DIAGNOSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA EM CITOLOGIA EM MEIO LIQUIDO
(SURE-PATH)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia Tropical.

Aprovada em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eleutério Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Margarida
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Margarida
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.
Ao meu pai (*in memoriam*), mãe, esposa e
família

AGRADECIMENTOS

À Deus por dar-me o dom da vida e por iluminar meus caminhos, dando-me saúde, paciência e sabedoria.

Ao Prof. Dr. José Eleutério Junior, pela excelente orientação, companheirismo e não só pelo conhecimento técnico e científico mais também pelos ensinamentos para minha vida como homem e profissional.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dr. Manoel e Dra. Margarida pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores do departamento, funcionários e colegas de curso.

A Dra. Maria Eliane Ponte Gonçalves e Dra. Socorro Rosado pelo incentivo inicial.

Lourdes e Caio pela ajuda preciosa.

RESUMO

As vulvovaginites (VV) são referidas desde o século V a.C. como importantes agravos à saúde da mulher. Os agentes infecciosos estão entre as principais causas. As VV mais comuns são a vaginose bacteriana (VB) e a candidíase vulvovaginal (CV). A VB é a principal causa de VV, caracterizada por mudança de população bacteriana vaginal com predomínio de cepas anaeróbias. Tem sido observado na VB, que por definição é um quadro não inflamatório, alguns casos com presença de células inflamatórias. No entanto, este achado ainda não está bem definido. A associação entre microrganismos seria apontada como um quadro de vaginite mista, cujas características citológicas estão pouco definidas e talvez influenciassem no quadro inflamatório. Ao mesmo tempo tem sido sugerido que a VB, pode desempenhar um papel na carcinogênese do colo do útero uma vez que tem sido observado que atipias citológicas são encontrados mais em mulheres com uma flora vaginal alterada, questiona-se se o achado inflamatório deveria chamar a atenção do citopatologista. O objetivo do trabalho foi avaliar achados da citologia em meio líquido (SurePath®) em casos com diagnóstico de VB segundo a presença de infiltrado inflamatório. Foi realizado um estudo observacional, analítico e em corte transversal, em 1132 mulheres com diagnóstico de VB, no período de Outubro de 2012 a Junho de 2013. Para o diagnóstico de VB foi utilizado critério de mais de 20% de *clue cells* no esfregaço de citologia de base líquida (SurePath®). Os esfregaços foram avaliados para identificação de morfotipos de patógenos, infiltrado inflamatório e atipias celulares epiteliais. Foram pesquisados *Trichomonas vaginalis*., *Cândida* sp., *Mobiluncus* sp., *Actinomyces* sp., citopatia sugestiva de *Herpes Vírus Simplex*. Foi considerado infiltrado inflamatório a presença de mais de cinco leucócitos polimorfonucleados por célula epitelial em campo de imersão (1.000x). A idade das pacientes variou de 14 a 73 anos (média = 34,3; dp =10,9). O número de gestações ficou entre 0 e 11 (média =1,5; dp=2,08). Duzentos e nove (34,%) pacientes referiam fazer uso de método contraceptivo e 830 (73,1%) estavam realizando exame de rotina. Quando havia uma queixa clínica a mais freqüente foi corrimento em 130 casos (11,5%). A avaliação macroscópica do conteúdo vaginal revelou que o de cor branco/leitoso 115 (46,7%) prevaleceu. No exame especular foi anotado que 994 (87,8%) dos casos descritos tinha achado de mucosa normal e 50(4,4%) de colpíte. Os morfotipos de patógenos associados ao quadro de vaginose bacteriana foram principalmente *Mobiluncus* sp. em 208 casos (66%) e *Cândida* sp. em 86 casos (27,3%). As atipias celulares foram encontradas em 84 casos (7,5%) e dentre estas, prevaleceram ASC-US em 43 casos (51,2%),

LSIL em 31(37%) e HSIL em 03 (3,6%). Observou-se na presença de infiltrado inflamatório 55 (4,9%) casos com *Mobiluncus* sp. ($p < 0,001$; RR=0,61 (0,55-0,68)] e *Cândida* sp 81(7,2%) casos ($p < 0,001$; RR=5,47 (2,93-10,19). Com relação às atipias citológicas observou-se na presença de infiltrado leucocitário atipias em 51 casos (4,5%) (RR=1,27 ([1,05-1,52])). Dentre estas a mais frequente foi ASC-US com 24 (2,1%) casos com infiltrado leucocitário e 19(1,7%) casos sem infiltrado ($p = 0,2729$; RR=0,87 ([0,63-1,18])). Já para casos de LSIL observou-se 20 casos (1,8%) com infiltrado e 11 casos (1,0%) no grupo sem infiltrado inflamatório ($p = 0,0298$; RR=1,35 ([1,02-1,76])). Nos casos de vaginose bacteriana, por sua definição atual, a presença de infiltrado inflamatório sugere a possibilidade de vaginite mista (com *Cândida* sp) ou atipia epitelial.

Palavras-chave: Vaginose Bacteriana. Biologia Celular. Vulvovaginite. Leucócitos. Imunidade. Candidíase Vulvovaginal.

ABSTRACT

Vulvovaginitis (VV) are reported since the fifth century BC as a major health problem in women. Infectious agents are the main causes . The most commons are bacterial vaginosis (BV) and vulvovaginal candidiasis (VC) . BV is the leading cause of VV, characterized by a change in bacterial vaginal population with a prevalence of anaerobes strains. It is been observed in BV , which by definition is a non-inflammatory condition, some cases with the presence of inflammatory cells. However, this finding is not yet well defined. In the presence of two simultaneous microorganisms the pictures would be defined as mixed vaginitis, in which cytological features are poorly defined and perhaps to influence the inflammatory infiltration presence. At the same time, it has been suggested that BV may play a role in carcinogenesis of the cervix since it has been observed that cytologic atypia is more frequent in women with shift of the vaginal flora, it is questionable whether the inflammatory finding deserve the attention of the cytopathologist . Objective: to evaluate findings of liquid-based cytology (SurePath ®) in patients diagnosed with BV according to the presence of inflammatory cells. It was an observational , analytical and cross-sectional study conducted in 1132 women diagnosed with BV , in the period of October 2012 to June 2013. For the diagnosis of BV was used criteria of more than 20 % of clue cells in the smear (SurePath ®). The smears were evaluated for identification of morphotypes of pathogens, inflammatory infiltration and epithelial cell atypia . *Trichomonas vaginalis* , *Candida* sp ., *Mobiluncus* sp ., *Actinomyces* sp ., Cytopathy suggestive of Herpes Simplex Virus were searched . The presence of more than five polymorphonuclear leukocytes per epithelial cell in high power field (1000 x) was considered inflammatory infiltrate . The age of patients ranged from 14 to 73 years (mean = 34.3, SD = 10.9) . The number of pregnancies was between 0 and 11 (mean = 1.5, SD = 2.08) . Two hundred and nine (34 %) patients reported use of contraception and 828 (73.1 %) were conducting a routine examination. The most frequent clinical complaint was discharge in 130 cases (11.5 %) . Macroscopic evaluation of vaginal discharge revealed that the white / milky color 115 (46,7 %) prevailed. On speculum examination was noted that 994 (87.8 %) cases had described finding of normal mucosa and 50 (4.4%) of vaginal mucosa inflammation. The morphotypes associated with bacterial vaginosis were mostly *Mobiluncus* sp. in 208 cases (66 %) and *Candida* sp. in 86 cases (27.3%) . The atypical cells were found in 84 cases (7.5%) and among these, ASC -US in 43 cases (51.2 %) , LSIL in 31 (37 %) and HSIL in 03 (3.6%) . It was observed in the presence of inflammatory infiltrate 55 (4.9%) cases with *Mobiluncus* sp ($p < 00.1$, RR = 0.61 [0.55 to 0.68]) . *Candida* sp and

81 (7.2%) cases ($p < 0.001$, $RR = 5.47 [2.93-10.19]$) . regarding cytological atypia was observed in the presence of leukocyte infiltrate atypia in 51 cases (4.5 %) . $RR = 1.27 [1.05$ to 1.52]) Among these the most frequent atypia was ASC -US with 24 (2.1%) cases with leukocyte infiltration and 19 (1.7 %) cases without infiltrate ($p = 0.2729$, $RR = 0 , 86 [0.63$ to 1.18]) . For cases of LSIL observed 11 cases (1.0 %) in the group without infiltrate and 20 cases (1.8 %) with inflammatory infiltrate ($p = 0.0298$, $RR = 1.346 [1.02$ to 1.76]). In cases of bacterial vaginosis, by its current definition, the presence of inflammatory infiltration suggests the possibility of mixed vaginitis (with *Candida* sp) or epithelial atypia .

Keywords: Bacterial Vaginosis. Cell Biology. Vulvovaginitis. Leucocytes. Immunity. Vulvovaginal Candidiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Morfotipo de <i>Gardnerella vaginalis</i> sem infiltrado inflamatório (SurePath 1000x).....	17
Figura 2 - Morfotipo de <i>Actinomyces</i> sp em caso de vaginose bacteriana com infiltrado inflamatório (SurePath 1000x.....	18
Figura 3- Morfotipo de <i>Mobiluncus</i> em caso de vaginose bacteriana com infiltrado inflamatório(SurePath1000x).....	19
Figura 4- Pseudomicélios (<i>Cândida</i> sp e células indicadores de vaginose bacteriana (SurePath 1000x).	19
Figura 5- Pseudomicélios (<i>Cândida</i> sp) e células indicadoras de vaginose bacteriana (SurePath 400x).....	20
Figura 6- Célula escamosa atípica de significado indeterminado (ASC-US) em caso de vaginose bacteriana sem infiltrado inflamatório (SurePath 1000x).	38
Figura 7- Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) em caso de vaginose bacteriana (SurePath 1000x).....	39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1- Distribuição 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido por SurePath® segundo a faixa etária.....	28
Tabela 2- Características clínicas de 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®.....	28
Tabela 3- Queixa principal referida na consulta de 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®.....	29
Tabela 4- Característica macroscópica do conteúdo vaginal pelo médico solicitante do exame de 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®.....	29
Tabela 5- Achados ginecológico em exame especular de vagina e colo uterino em 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®.....	30
Tabela 6- Morfotipos de patógenos associados a quadro de vaginose bacteriana (diagnosticado com presença de mais de 20% de <i>clue cells</i>) em citologia em meio líquido SurePath®.....	30
Tabela 7- Correlação entre infiltrado inflamatório (mais que 5 leucócitos em campo de grande aumento para cada célula escamosa) e morfotipos associados em pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana (>20% de <i>clue cells</i>) em citologia em meio líquido SurePath®.....	3 1
Tabela 8- Diagnóstico de atipias celulares (84 [7,5%]) entre 1132 casos diagnosticados como vaginose bacteriana em citologia em meio líquido por SurePath®.	
Tabela 9- Correlação entre infiltrado inflamatório (mais que 5 leucócitos por campo de grande aumento para cada célula escamosa) e atipias citológicas associados entre pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana (>20% de <i>clue cells</i>) em citologia em meio líquido por SurePath®.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	Atypical glandular cell
ASC-US	Atypica squamous cells of undetermined significance.
ASC-H	Atypical squamous cells, can not rule out HSIL
CV	Candidiase vaginal
DIU	Dispositivo intra-uterino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSTs	Doenças sexualmentes transmissíveis
EUA	Estados Unidos da America.
HIV	Virus da imunodeficiência humana
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion.
HPV	Virus Papiloma Humano
IL	Interleucina
LABPEC	Laboratório Professor Eleutério da Costa
LPS	Lipopolissacarídeos.
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion.
LTA	Ácido lipotecóico
NK	<i>Natural Killer</i>
NIC	Neoplasia intra epithelial
OR	Odds ratio.
PCR	<i>Cadeia de reação polymerase</i>
PGN	Peptideoglicano
SIL	Squamous intraepithelial lesion.
TLR	<i>Toll Like receptor</i>
VB	Vaginose bacteriana.
VV	Vulvovaginite
RR	Risco relativo.
UNICAMP	Universidade de Campinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Vulvovagnites	14
1.2 Vaginose Bacteriana	15
<i>1.2.1 Diagnósticos de Vaginose bacteriana</i>	17
1.3 Vaginite mista	18
1.4 Associação entre vaginose bacteriana e atipias celulares	21
1.5 Métodos de identificação	22
1.6 Aspectos imunológicos	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Tipo de estudo	25
3.2 População do estudo	25
3.3 Critérios de exclusão	25
3.4 Coleta das Amostras biológicas	25
3.5 Critérios de diagnósticos	25
3.6 Estatística	26
4 ASPECTOS ÉTICOS	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Dados sócio-demográficos	28
5.2 Queixa principal referida na consulta	28
5.3 Avaliação macroscópica do conteúdo vaginal	28
5.4 Achados de exame ginecológico em exame especular de vagina e colo uterino	28
5.5 Mofotipos de patógenos associados a quadro de vaginose bacteriana	28
5.7 Diagnóstico de atipias celulares nos casos diagnosticados como vaginose bacteriana	28
5.8 Correlação entre infiltrado inflamatório e atipias citológicas associados entre pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana	29

6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

O corrimento vaginal é uma das mais frequentes queixas em serviços de ginecologia. Apesar de haver métodos de diagnóstico de morfotipos associados, a sensibilidade dos métodos é variável e a complexidade do quadro, por vezes, torna difícil ao clínico seu entendimento. O microbioma vaginal se constitui de elementos epiteliais, imunológicos e microbianos, que em condições saudáveis estão em equilíbrio. Tal situação, no entanto pode ser perturbada por fatores endógenos ou exógenos, criando uma condição que pode culminar com queixa de corrimento, prurido e/ou odor que clinicamente caracterizam as vulvovaginites.

1.1 Vulvovaginites

As vulvovaginites são referidas desde o século V a.C. como importantes agravos à saúde da mulher, entretanto, somente a partir da década de 90, após sua associação com aumento da transmissibilidade do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vêm recebendo a devida atenção por parte da comunidade científica (TENKIN 1956, 1991; DUARTE; LANDERS, 1998). Além dos consideráveis gastos econômicos, as vulvovaginites (VV) causam danos emocionais, reprodutivos e sociais como: desconforto físico, estresse psicológico, transtornos da sexualidade, problemas conjugais e reprodutivos, além de embarços sociais (DUARTE; LANDERS, 1998).

Inúmeras são as causas que propiciam inflamação do epitélio vaginal gerando diferentes tipos de VV. Os agentes infecciosos estão entre as principais causas, porém as VV podem ser decorrentes de processos alérgicos, irritativos, traumáticos, manifestações clínicas de doenças dermatológicas e/ou autoimunes, além de alterações fisiológicas do trato genital feminino (SOBEL, 1999; FARAGE; MILLER; LEDGER, 2008). Considerando-se as diversas etiologias, provavelmente, toda mulher terá durante sua vida reprodutiva, um ou mais episódios de descarga vaginal que a levará ao consultório médico, o que torna o corrimento vaginal a queixa mais comum nos consultórios de ginecologia e obstetrícia (ACO, 1996; EGAN; LIPSKU, 2000).

Apesar da alta frequência do problema, o diagnóstico do corrimento genital pelo ginecologista, quer na rede pública de saúde ou na clínica privada, não é fácil. Muitos aspectos podem modificar a sintomatologia e o quadro de corrimento vaginal, fazendo com que o diagnóstico, na maioria das vezes, torne-se um procedimento complexo. Apesar destes

conhecimentos, a hipótese diagnóstica é freqüentemente elaborada por uma anamnese superficial acompanhada de exame especular desprezioso. Não se pode confiar apenas em sinais e sintomas clínicos para fazer o diagnóstico das VV, pois em um número muito grande de casos, os sinais e sintomas não são característicos (SOBEL, 1999; OWEN; 2004; LEDGER; MONIF, 2004).

Sabe-se também que as queixas e as informações fornecidas pelas pacientes têm baixíssimos valores preditivos positivo para fazer o diagnóstico correto da causa do corrimento vaginal. Da mesma forma, a observação pura e simples do conteúdo vaginal por meio do exame especular, quando usada isoladamente, não determina adequadamente o agente etiológico. Um estudo avaliou 123 mulheres com queixa de corrimento vaginal e mostrou que a hipótese diagnóstica fundamentada no exame especular, para identificar a causa do corrimento, tem uma sensibilidade diagnóstica inferior a 50%. Os valores preditivos positivos e negativos encontrados foram respectivamente 18,2% e 88,8% para candidíase e de 37,9% e 80,8% para vaginose bacteriana (GOMES, 2003).

Portanto, para evitar tratamentos empíricos e desnecessários, deve-se fazer um diagnóstico do corrimento vaginal levando-se em conta fatores como: a história clínica adequada, exame físico completo, busca de manifestações de doenças que levam a sintomas genitais, exame ginecológico detalhado, e obrigatoriamente, complementação com mensuração do pH vaginal, teste das aminas e estudo da microbiota vaginal, o que na prática clínica não se realiza rotineiramente (EGAN; LIPSKY, 2000).

As VV mais comuns que acometem as mulheres em idade reprodutiva são a vaginose bacteriana (VB) e a candidíase vulvovaginal (CV) respondendo respectivamente por 22% a 50% e 17% a 39% das mulheres sintomática. Apesar de haver uma tendência a se pensar em um agente único como causa das vulvovaginites, há se conjecturar sobre a possibilidade de associações, mesmo que paradoxais. (NYIRJESY, 2008).

1.2 Vaginose Bacteriana

A Vaginose bacteriana é a principal causa de VV, sendo definida como uma síndrome polimicrobiana caracterizada pelo crescimento abundante de bactérias anaeróbias, em particular a *Gardnerella vaginalis*. Outros microrganismos que causam a VB são o *Mycoplasma hominis* e anaeróbios: *Prevotella* sp, *Bacteroides* sp, *Porphyromonas* sp,

Peptostreptococcus sp, *Mobiluncus* sp e *Atopobium* vaginae em substituição aos *Lactobacillus* sp presentes na flora vaginal normal (SOBEL, 2000; VERSTRAELEN et al., 2004).

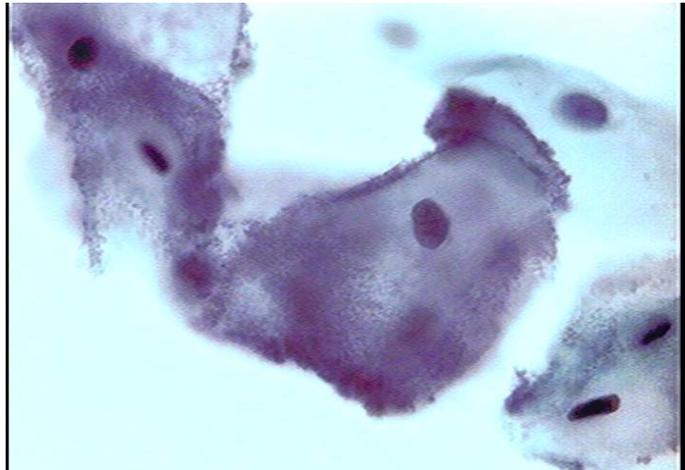
Ainda não foi esclarecido se a diminuição dos lactobacilos predispõe à VB ou se a VB leva à depleção dos lactobacilos, conseqüentemente, as causas do desequilíbrio da flora vaginal permanecem em investigação (LINHARES et al., 2011). Sabe-se que vários fatores estão fortemente associados à VB (atividade sexual com novo parceiro, multiplicidade de parceiros, mulheres que têm parceira com VB, raça negra, uso de dispositivo intrauterino (DIU), duchas vaginais, tabagismo) sem, contudo serem considerados causas do problema. Existem também associações entre VB e parto prematuro, ruptura prematura de membranas, corioamnionite, recém-nascido com baixo peso, abortamento espontâneo, endometrite pós-abortamento e pós-parto, infecções pélvicas e pós-cirúrgicas. O aumento da susceptibilidade à aquisição de doenças sexualmente transmissíveis, em especial o HIV, é outro ponto considerado (NATIONAL GUIDELINE, 2006; CDC, 2010; FETHERS et al., 2008).

A VB apresenta-se clinicamente como uma descarga vaginal anormal com odor desagradável, entretanto, aproximadamente 50% das mulheres são assintomáticas. Ao exame clínico observa-se pouca ou nenhuma reação inflamatória (SOBEL, 2000; DONDERS, 2010). Em sendo este quadro, a principal causa de descarga vaginal infecciosa no menacme, sugere-se a possibilidade dos hormônios sexuais estarem envolvidos na sua patogênese. Embora de forma menos freqüente, ela pode ser também encontrada em crianças e na pós-menopausa. Em gestantes e não gestantes, a prevalência da VB parece ser semelhante (HOLMES; HILLIER, 1999). Muito embora não seja aceita como uma infecção de transmissão sexual parece estar intimamente ligada à esta atividade. O uso de contraceptivos hormonais, por promover uma microbiota predominantemente de lactobacilos, parece ter um efeito contra o desenvolvimento da VB (ESCHENBACH et al., 1988). Nos Estados Unidos (EUA) tem sido diagnosticada em 17% a 19% das mulheres de clínicas de planejamento familiar (SOBEL, 1990; SOBEL, 1996), porém recentemente, Landers et al. (2004), relataram que dentre 589 mulheres com alguma queixa genital, 46% tinham VB. No Brasil mostra-se muito frequente, atingindo também cerca de 45% das mulheres com queixa de corrimento vaginal. (BAGNOLI et al., 1990; LANDERS et al., 2004).

1.2.1 Diagnósticos de Vaginose Bacteriana

Amsel et al. (1983) criaram critérios que passaram a ser adotados para o diagnóstico de VB, levando-se em conta não um único teste, mas um conjunto de achados que associados, confirmariam o diagnóstico de uma doença caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas. Assim, a relação exclusiva de *Gardnerella vaginalis* como agente causal da vaginose foi abandonada, uma vez que a palavra bacteriana especifica a multiplicidade de bactérias envolvidas. Posteriormente, Nugent, Krohn e Hillier (1991) propuseram um sistema de escores, conhecido também como gradiente de Nugent, o qual é resultante da soma de valores diferenciados para a observação quantitativa de determinados morfotipos na bacterioscopia ao Gram. A utilização do gradiente de Nugent é amplamente difundida e é o método mais bem aceito no diagnóstico da VB. Temos também o diagnóstico feito pela presença de mais que 20% de *clue cells* (células epiteliais superficiais recobertas por cocobacilos Gram lábeis) (AMSEL et al., 1983) (figura 01) em esfregaços cervicais utilizando o Papanicolaou sendo defendida para casos que se utilizam deste exame (DISCACCIATI et al., 2006).

Figura- 1. Clue cells sugerindo *Gardnerella vaginalis* sem infiltrado inflamatório (SurePath 1000x)



Fonte: arquivo pessoal

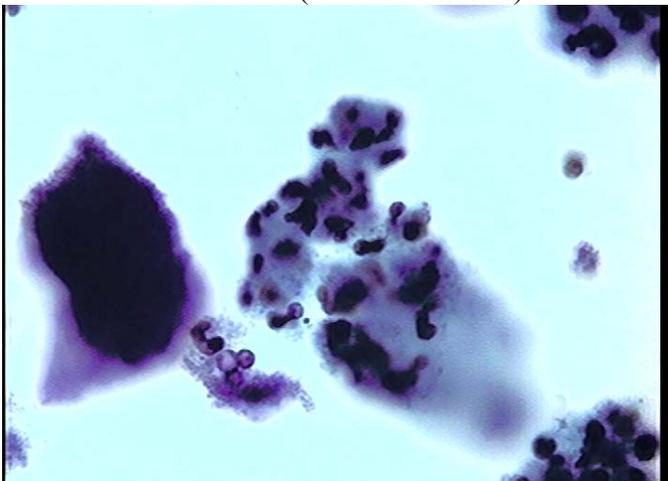
Já está demonstrado que o diagnóstico da VB nem sempre pode ser estabelecido a partir de manifestações clínicas sozinhas (LANDERS, 1988; BLACKWELL, 1987). O laboratório de apoio é necessário para um diagnóstico diferencial ou para confirmar o

diagnóstico clínico. No entanto, a identificação precisa do microorganismo causador é tecnicamente difícil, devido fatores inerentes a estudos microbiológicos e a complexidade do microbioma vaginal (LANDERS, 1988; MARDH et al., 1998). Uma pesquisa realizada nos EUA em que diagnósticos de consultório e laboratório foram comparados, mostrou que o diagnóstico do consultório encontrou candidíase em apenas 39,6% da casos de infecção por *Cândida* sp que foram diagnosticados no laboratório. Para tricomoníase e vaginose bacteriana os números eram de 75 e 76,5%, respectivamente (FERRIS et al., 1995).

1.3 Vaginite Mista

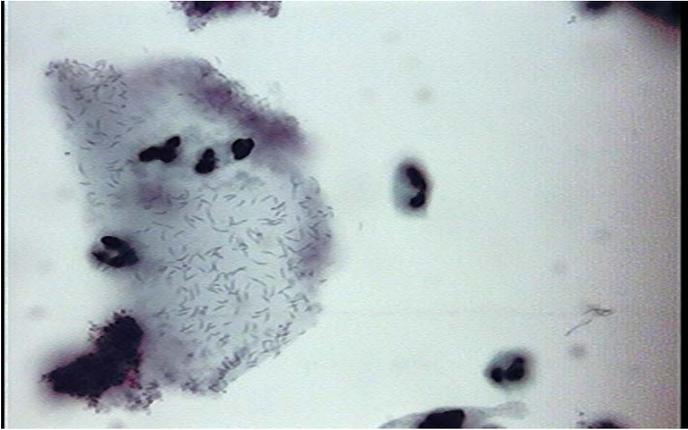
A identificação de quadros de associação entre microrganismos tem ocorrido com alguma frequência entre vaginose bacteriana e *Trichomonas vaginalis*, bem como entre vaginose bacteriana e *Actinomyces* sp (figura 02) (DI BARTOLOMEO et al., 2002). Eleutério Jr e Cavalcante (2004) demonstraram a possibilidade da identificação simultânea de *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus* sp (figura 03) em estudos microscópicos, o que não surpreende por estarem associados a VB. No entanto, a possibilidade de achado de agentes aparentemente paradoxais é possível e poucos têm se preocupado com a possibilidade de observar a associação entre a presença de *Gardnerella vaginalis* e *Cândida* sp,(figuras 04 e 05) que é real (WEI et al., 2012). No entanto, muito embora se considere a diferença de pH como um fator a impedir a coexistência de candidíase e vaginose bacteriana, não se sabe ao certo qual a frequência desta associação. (SOBEL et al., 2013).

Figura - 2. Morfotipo de *Actinomyces* sp (seta preta) em caso de vaginose bacteriana com infiltrado inflamatório (SurePath 1000x)



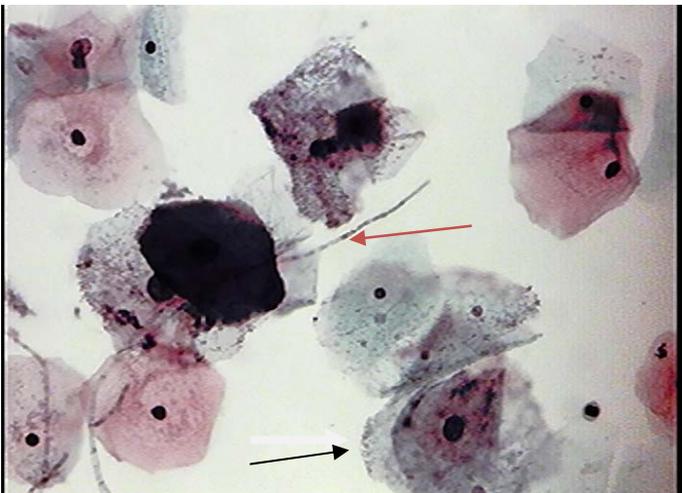
Fonte: arquivo pessoal

Figura 3. Morfotipo de Mobiluncus no citoplasma de célula escamosa em caso de vaginose bacteriana com infiltrado inflamatório (SurePath 1000x)



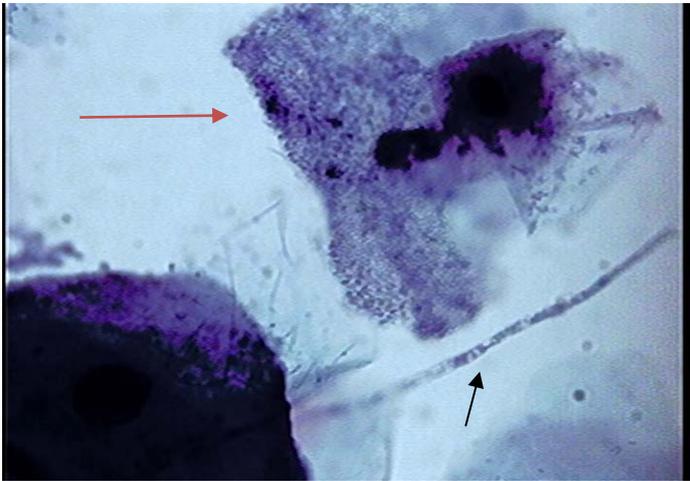
Fonte: arquivo pessoal

Figura - 4. Pseudomicélios (*Cândida* sp) (seta vermelha) e células indicadoras de vaginose bacteriana (SurePath 400x) (seta preta).



Fonte: arquivo pessoal

Figura - 5. Pseudomicélios (*Cândida* sp) (seta preta) e células indicadores de vaginose bacteriana (SurePath 1000x) (seta vermelha).



Fonte: arquivo pessoal

Na sua forma mais simples, vaginite mista refere-se a presença simultânea de dois ou mais agentes patogênicos potenciais no trato genital, independentemente do significado clínico destes individualmente. Ou seja implica que, pelo menos, dois ou mais processos patogênicos, em vez de dois agentes patogênicos, por si só, coexistem na vagina, contribuindo cada um para os sintomas e sinais (MARDH et al., 1998). O processo pode ser contemporâneo independentes ou dependentes. Por outro lado, se apenas um patógeno é responsável por sintomas, o outro pode ser ignorado, estamos assim diante de uma caso de co-infecção (BROTMAN et al., 2010).

O conceito de vaginite mista tornou-se relevante por causa de considerações terapêuticas na escolha antimicrobiana de agentes para tratar a vaginite sintomática. Para esta problemática deve-se pensar inicialmente que para infecção mista ocorrer, antes já exista a co-infecção, com apenas um agente patogênico que causa os sintomas. No entanto, com a terapêutica erradicando o patógeno predominante, o quadro clínico altera, devido ao surgimento seqüencial do segundo patógeno. Os dois quadros clínicos são muitas vezes consecutivos, distintos e facilmente diagnosticados, sendo frequentemente separados por dias ou semanas da ausência de sintomas e sinais. Este fenômeno de infecção mista consecutiva é melhor descrito com VB e candidíase. Durante a apresentação inicial, sintomas e sinais da VB sozinha são evidentes, apesar da culturas positivas de *Cândida* sp, no entanto, após a terapia antibacteriana e desaparecimento das manifestações da VB, as mulheres retornam com novos sintomas devido à CV, muitas vezes diagnosticada como uma VB recidiva, conseqüentemente

ocorrendo um tratamento incorreto (SOBEL et al., 2013). Estes casos de vaginite mista tendem a ser, portanto, subdiagnosticados, pois faltam parâmetros morfológicos nos exames do cotidiano da clínica ginecológica para apontar que quadro potencialmente teria uma associação de *cândida* sp. e VB.

1.4 Associação entre Vaginose bacteriana e atípias celulares

Tem sido sugerido que a VB, sendo a principal causa dos distúrbios vaginais, comum entre as mulheres em idade reprodutiva, pode desempenhar um papel na carcinogênese do colo do útero. Tem-se observado que anormalidades citológicas cervicais são encontrados significativamente mais em mulheres com uma flora vaginal alterada, sugerindo uma possível associação entre VB e o desenvolvimento de câncer cervical (BARRINGTON et al., 1997; SCHIFF et al., 2000). As evidências sobre esta associação tem sido até agora conflitante e ainda é uma questão de debate. Os resultados de estudos anteriores que examinaram a relação entre VB e neoplasia intraepitelial cervical (NIC) variou de uma associação muito forte, conforme descrito em um estudo retrospectivo por Platz – Christensen, Sundstrom e Larsson (1994) que calculou um risco relativo de 5,0 para NIC III entre mulheres com VB, até para nenhuma associação como no estudo de Peters et al. (1995).

Foi sugerido que cofatores adicionais participam na carcinogênese cervical. Podemos citar como fatores, que podem ter um papel nesta progressão, o tabagismo, uso de contraceptivos, dieta e DSTs. (UTHAYAKUMAR et al., 1998; BOYLE; SMITH, 1999). Porém outros mostram que a flora vaginal anormal pode produzir nitrosaminas cancerígenas, supondo que VB pode ter um importante papel no desenvolvimento de NIC (PAVIC, 1984).

Estudos relatam que as nitrosaminas são substâncias resultantes do nitrosação de aminas, um processo que pode ser catalisado por enzimas bacterianas. Assim, a combinação de aminas, nitrito, nitrato e bactérias, que podem ser encontrado na vagina com VB, levanta a possibilidade de que as nitrosaminas podem ser produzidas e subsequentemente atuar sobre o epitélio do colo do útero, de forma independente ou em conjunto com outro agente, por exemplo um vírus (BOYLE et al., 2003).

A mais refinada teoria quanto ao mecanismo pelo qual VB poder produzir neoplasia cervical foi proposto por Pavic (1982). Neste trabalho, Pavic discutiu possíveis analogias

entre câncer gástrico e cervical. Pois, ambos os sítios são protegido por um meio ácido e em ambos, a elevação de pH estimula a proliferação de bactérias potencialmente capazes de sintetizar as nitrosaminas, em ambos os locais, onde a neoplasia é precedida por metaplasia e displasia. A hipótese de trabalho, portanto, foi flora vaginal anormal, que aumentou tanto a carga de bactérias anaeróbias, como o pH, que produzem aminas e que combinadas com nitritos produzidos por bactérias redutoras de nitrato, as nitrosaminas são formadas. A hipótese de Pavic, relata que as nitrosaminas poderiam agir de forma independente no colo do útero para produzir neoplásia, mas que era mais provável que elas agiriam sinergicamente com outro agente, provavelmente viral.

1.5 Métodos de identificação

Vários estudos têm demonstrado a presença de *Mobiluncus* sp na vaginose bacteriana, associada a *Gardnerella vaginalis*, com variável prevalência (de 65 a 85%) conforme a metodologia usada para a sua identificação (HELLBERG et al., 2001; HELLBERG et al., 2000). Dentre os métodos diagnósticos considera-se ser o método de Papanicolaou o de menor sensibilidade, embora tenha razoável especificidade, para o diagnóstico da vaginose bacteriana, bem como para identificação de morfotipos de *Mobiluncus* sp. Muitos estudos têm observado a freqüente síntese por parte de *Gardnerella vaginalis* e mesmo *Mobiluncus* sp de substâncias inibidoras de quimiotaxia levando a um característico quadro de leucopenia nos esfregaços cérvico-vaginais (ELEUTERIO Jr; CAVALCANTE, 2004). Então, porque alguns quadros diagnosticados como VB têm presença de leucócitos?

Apesar de o exame de Papanicolaou não ter como finalidade o diagnóstico microbiológico, a Nomenclatura Brasileira para Laudos Citológicos (INCA, 2006) e o Sistema Bethesda sugerem que o método pode apontar a presença de morfotipos de bactérias, fungos e parasitas (BOON et al., 2012). Autores já estudaram o método de Papanicolaou, identificando diferentes sensibilidades para diagnóstico, especificamente de vaginose bacteriana, candidíase e tricomoníase, variando entre 30 a 90% (ELEUTERIO Jr; CAVALCANTE, 2004; AUDISI et al., 2001). O que é compreensível pela subjetividade do método, para casos de baixa sensibilidade, por não usar objetiva de imersão, e pelo fato de haver o hábito do uso de Papanicolaou para rastreio, não para diagnóstico microbiológico. Quem trabalha com Papanicolaou é citopatologista, com um foco diferente do

microbiologista. Mais recentemente, com a introdução de métodos de citologia em base líquida, parece ter havido uma melhora significativa nas taxas de detecção de fungos, mas não de vaginose e de *Trichomonas* sp (TAKEI; RUIZ; HICKS, 2006).

1.6 Aspectos imunológicos

Todo e qualquer quadro vaginal deve sofrer influencia do sistema imune de sua mucosa, que possui muitas particularidades, nem todas esclarecidas. As suas células epiteliais além de constituírem uma barreira física impedindo a passagem de patógenos, também ativam a resposta imunológica mediante percepção dos microorganismos agressores. (LEDGER, 2004 WITKIN et al., 2007; WIRA et al., 2005). Os macrófagos percebem a alteração da homeostase tecidual e estimulam o recrutamento de células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos *natural killer* (NK) responsáveis pela imunidade inata (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

A VB surge quando ocorre um aumento entre 100 a 1000 vezes do número das bactérias anaeróbias. Sabe-se que os produtos bacterianos da anaerobiose instalada, lipopolissacarídeos (LPS), ácido lipotécico (LTA) e peptidoglicanas (PGN), são ligantes para *toll-like receptor* (TLR) e estimulam TLR4 e TLR2. Esta ligação resulta na ativação de respostas antimicrobianas e produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, em mulheres com VB, observa-se aumento da citocina pró-inflamatória (IL 1 β), mas não se observa aumento dos níveis de IL8, citocina responsável pela migração de neutrófilos. Além disso, os ácidos graxos de cadeias curtas produzidas pelos anaeróbios podem inibir citocinas pró-inflamatórias afetando a migração das células, motivo pelo qual a VB é considerada uma condição não inflamatória (CAUCI et al., 2003; LEDGER, 2004; WITKIN et al., 2007; JOHN et al., 2007; MIRMONSEF et al., 2011).

Como o microambiente vaginal é dinâmico sofrendo constantes agressões e mudanças na composição da flora, as células imunes atuam invariavelmente na manutenção da homeostase vaginal. Como já salientado, os neutrófilos são células essenciais para combater estas agressões. Mas, especificamente na VB há uma inibição de sua chegada à luz vaginal, o que leva a esfregaços com ausência ou pequeno número de células inflamatórias na maioria, mas não em todos os casos (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010; AKGUT; EDWARDS, 2003; FOX et al., 2010; DELEO, 2004; SONG et al., 2010; DOLGUSHIN; ANDREEVA; PLEKHANOVA, 2008

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar achados citológicos e microbiológico vaginal na citologia em meio líquido (SurePath®) em casos de VB com ou sem infiltrado inflamatório

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a frequência de infiltrado inflamatório em casos de VB.
- Identificar a frequência de morfotipo *Mobiluncus* sp na VB e sua associação com infiltrado inflamatório.
- Identificar a frequência de morfotipo *Cândida* sp na VB e sua associação com infiltrado inflamatório.
- Identificar atipias epiteliais na citologia em base líquida associadas à VB com e sem infiltrado inflamatório.
- Avaliar risco relativo de infecção mista na presença de infiltrado inflamatório.
- Avaliar risco relativo de atipia epitelial na presença de infiltrado inflamatório.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo: Foi realizado um estudo observacional, analítico de corte transversal.

3.2 População de estudo

1132 mulheres com diagnóstico de vaginose bacteriana em citologia cervico-vaginal em meio líquido (SurePath®) atendidas em consultórios de ginecologia e que tiveram seu material enviado ao Laboratório Professor Eleutério da Costa (LabPEC) para análise citopatológica no período de Outubro de 2012 a Junho de 2013.

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do trabalho os esfregaços que não foram diagnosticados com vaginose bacteriana, fora do período do estudo e das pacientes que não assinaram o termo de livre e esclarecidos proposto pela pesquisa.

3.4 Coleta de dados

Os casos foram divididos conforme diagnósticos e dados da ficha clínica das pacientes.

3.5 Critérios de diagnóstico

O diagnóstico de vaginose bacteriana se deu pelo achado de mais de 20% de *clue cells* no esfregaço citológico (SurePath®)(Figura 1). Os esfregaços foram avaliados por experiente citopatologista em lente de imersão, para identificação de morfotipos e infiltrado inflamatório. Foram pesquisados *Trichomonas vaginalis*, *Cândida* sp.,(Figura 03) *Mobiluncus* sp.(Figura 02), *Actinomyces* sp.,(Figura 04), citopatia sugestiva de *Herpes Vírus Simplex*. Foi considerado infiltrado inflamatório a presença de mais de cinco leucócitos polimorfonucleados por célula epitelial em campo de imersão (1.000x).

3.6 Estatística

Para estudo de associação foi utilizado o teste exato de Fisher e Risco relativo com intervalo de confiança de 95% utilizando o software Graphpad Prism 5.0.

4 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa faz parte de trabalhos realizados desde o ano de 2008 na Universidade de Campinas (UNICAMP), sendo submetido à avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa desta referida universidade. Foi seguida as normas preconizadas pela “Declaração de Helsink” e suas modificações (DECLARAÇÃO DE HELSINKI, 1990) e pela Resolução 496 do ministério da saúde (INCA, 2014). Com protocolo número: 643/2008.

5 RESULTADOS

A idade das mulheres estudadas variou de 14 a 73 anos (média = $34,3 \pm 10,9$) (**TABELA 1**) e com um número de gestações referido entre 0 e 11 (média = $1,5 \pm 2,08$). Apenas 209 (35,2%) referiam fazer uso de método contraceptivo, sendo o mais freqüente o de contracepção hormonal, oral e injetável, com 115 casos (19,3%). No entanto em 539 casos não havia dados referentes ao uso de algum método (**TABELA 2**).

Tabela 1. Distribuição 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido por SurePath® segundo a faixa etária.

Variáveis	
Idade (média \pm dp)	34,3 (10,9)
Idade (N[%])	
Até 20	67(6,0)
21- 30	340(30,0)
31-40	296(26,1)
41-50	183(16,2)
51-60	58(5,1)
60-70	19(1,7)
>70	01(0,1)
Total	964

Obs: em 168 casos não tinha a idade da paciente.

Tabela 2. Características clínicas de 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®

Variáveis	
Número de gestações (média \pm dp)	1,5 (2,08)
Método contraceptivo (N[%])	209 (35,2)
Hormonal (oral e injetável)	115(19,3)
Laqueadura tubária	38 (6,4)
DIU(cobre e medicamentoso)	28 (4,7)
Cóndon	19 (3,2)
Histerectomia	04(0,7)
Sem coitarca	04(0,7)
Em uso de terapia hormonal	01(0,2)
Sem contracepção	384(64,7)
Total	593

Obs: em 539 casos não havia nenhum dado com relação a contracepção.

Dentre as pacientes estudadas, 830 (73,3%) não referiam sintoma. Dentre as que referiam queixa, a mais frequente foi corrimento isolado, em 130 (11,5%) (TABELA 3). Em 886 casos não havia dados sobre o aspecto macroscópico do conteúdo vaginal e que quando da presença de conteúdo vaginal aumentado o aspecto que mais prevaleceu foi o de cor branco/leitoso com 115 casos (46,7%) (TABELA 4). No estudo dos achados de exame ginecológico em exame especular de vagina e colo uterino observou-se que em 994 (87,8%) dos casos foram classificados como normal e em 50 (4,4%) foi sugerido colpíte (TABELA 5).

Tabela 3. Queixa principal referida na consulta de 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®

Queixa	N	%
Sem queixa (exame de rotina de prevenção de câncer)	830	73,3
Corrimento	130	11,5
Odor	108	9,6
Prurido	36	3,2
Dor pélvica	15	1,4
Odor e prurido	05	0,4
Histórico de HPV	04	0,3
Ardor	03	0,3
Sangramento transvaginal	01	0,1
Total	1132	100

Tabela 4. Característica macroscópica do conteúdo vaginal pelo médico solicitante do exame de 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®

Características	N	%
Branco / leitoso	115	46,7
Amarelo	95	38,6
Cinza	20	8,1
Bolhoso	11	4,4
Incolor / aquoso	03	1,2
Esverdeado	01	0,4
Sanguinolento	01	0,4
Total	246	100

Obs.: em 886 casos não havia nenhum dado com relação a aspecto macroscópico do conteúdo vaginal.

Tabela 5. Achados ginecológico em exame especular de vagina e colo uterino em 1132 pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana por citologia em meio líquido SurePath®

Achados do exame	N	%
Normal	994	87,8
Colpite	50	4,4
Ectopia	42	3,7
Zona de transformação atípica (ZTA)	16	1,4
Histerectomia	12	1,1
Colo friável	08	0,7
In Virgo	08	0,7
Bartolinite	01	0,1
Herpes	01	0,1
Total	1132	100

Dentre os morfotipos pesquisados foram encontrados *Mobiluncus* sp. em 208 casos (18,4%), *Cândida* sp. em 86 casos (27,3%), *Actinomyces* sp. 05 casos (1,6%) quadro sugestivo de *Chlamydia trachomatis* 05 casos (1,6%), *Mobiluncus* sp. e *Candida* sp. 04 casos (1,6%), *Mobiluncus* sp. e *Actinomyces* sp. 03 casos (1,0%) *Herpes simplex vírus* (HSV) 01 caso (0,3%), *Trichomonas vaginalis* 01 caso (0,3%) e *Mobiluncus* sp. e *Leptotrix* sp. 01 caso (0,3%) (TABELA 6).

Tabela 6. Morfotipos de patógenos associados a quadro de vaginose bacteriana (diagnosticado com presença de mais de 20% de *clue cells*) em citologia em meio líquido SurePath®.

MICROBIOLOGIA	N	%
Sem associação	817	72,2
Com associação	315	28,2
<i>Mobiluncus</i> sp	208	66,0
<i>Cândida</i> sp	86	27,3
<i>Actinomyces</i> sp	05	1,6
<i>Chlamydia</i>	05	1,6
<i>Mobiluncus</i> sp e <i>Cândida</i> sp	04	1,3
<i>Mobiluncus</i> spe <i>Actinomyces</i>	03	1,0
<i>Trichomonas</i> sp	02	0,6
HSV	01	0,3
<i>Leptotrix</i> sp e <i>Mobiluncus</i> sp	01	0,3
Total	1132	100

HSV: Herpes Simples Vírus

Utilizando-se o infiltrado inflamatório como preditivo de infecção mista, observou-se na presença de infiltrado inflamatório 55 (4,9%) casos com *Mobiluncus* sp.(Figura 02) e com *Cândida* sp 81 (7,2%). Na ausência de infiltrado leucocitário para *Mobiluncus* sp. 160 (14%) casos e para *Cândida* sp 09 (0,8%) casos. Identificou-se uma relação entre a ausência de leucócitos e a presença de *Mobiluncus* sp. (RR =0.61 [(0,55-0,68)], ao passo que na presença de leucócitos houve uma chance maior de presença de morfotipo de *Cândida* sp. (RR =5,47[(2,93-10,19)](Figuras 03 e 04) (**TABELA 7**).

Tabela 7. Correlação entre infiltrado inflamatório (mais que 5 leucócitos em campo de grande aumento para cada célula escamosa) e morfotipos associados em pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana (>20% de *clue cells*) em citologia em meio líquido SurePath®.

Morfotipo associado	Infiltrado inflamatório N(%)	RR (IC 95%)
<i>Mobiluncus</i> sp	Presente 55(4,9) Ausente 161(14)	0.61 (0,55-0,68) p<0,001
<i>Cândida</i> sp	Presente 81(7,2) Ausente 09(0,8)	5,47(2,93-10,19) p<0,001

Obs: Para os outros morfotipos não foi possível realizar Risco Relativo devido ao pequeno número de casos.

Em relação aos achados de atipias celulares encontrados em nosso trabalho tivemos 84 casos (7,5%) e dentre essas atipias, a que mais prevaleceu foi células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) com 43 casos (51,2%) (Figura 05) e lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) com 32 casos (37%) (Figura 06) (**TABELA 8**).

Tabela 8. Diagnóstico de atipias celulares (84 [7,5%]) entre 1132 casos diagnosticados como vaginose bacteriana em citologia em meio líquido por SurePath®.

ATIPIA	N	% (Dentre as atipias)	% (Total)
ASC-US	43	51,2	3,8
LSIL	31	37	2,7
AGC	04	4,8	0,4
ASC-H	03	3,6	0,3
HSIL	03	3,6	0,3
Total	84	100	7,5

ASC-US:Atipias em células escamosas de significado indeterminado.

LSIL:Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau.

AGC: Atipias em células glandulares de significado indeterminado.

ASC-H: Atipias em células escamosas de significado indeterminado que não se pode excluir HSIL.

HSIL: Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.

Fazendo uma relação entre as atipias citológicas e infiltrado inflamatório observou-se ASC-US em 24 (2,1%) casos com infiltrado leucocitário e 19(1,7%) casos sem infiltrado significado um (RR = 0, 86 ([0, 63 - 1,18])). Já LSIL apresentou 20 (1,8%) casos com infiltrado leucocitário e 11 (1,0%) casos sem infiltrado significado (RR = 1, 35([1, 02 - 1, 76])). Estes resultados mostram uma correlação significativa entre a presença de infiltrado leucocitário e achados de LSIL, onde demonstram a tendência de uma frequência importante desta atipia, principalmente quando se detecta infiltrado inflamatório no esfregaço vaginal. **(TABELA 9).**

Tabela 9. Correlação entre infiltrado inflamatório (mais que 5 leucócitos por campo de grande aumento para cade célula escamosa) e atipias citológicas associados entre pacientes com diagnóstico de vaginose bacteriana (>20% de clue cells) em citologia em meio líquido por SurePath®.

Atipia citológica	Infiltrado inflamatório N(%)	RR (IC 95%)
Sem atipia	Presente 500 (44,2)	
	Ausente 547 (48,3)	
Com atipia	Presente 51 (4,5)	1,27 (1,05-1,52)
	Ausente 33 (3,0)	
ASC-US	Presente 24 (2,1)	0,87(0,63-,1,18) p=0,2729
	Ausente 19 (1,7)	
ASC-H	Presente 03 (0,3)	
	Ausente 00 (0,0)	
AGC	Presente 03 (0,3)	
	Ausente 01 (0,09)	
LSIL	Presente 20 (1,8)	1,35(1,02-1,76) p=0,0298
	Ausente 11 (1,0)	
HSIL	Presente 01 (0,09)	
	Ausente 02 (0,2)	

7 DISCUSSÃO

Das 1132 pacientes estudadas com idade entre 14 a 73 anos. Mais de 70% não apresentavam queixas clínicas e apenas 130 citaram como queixa principal o corrimento, correspondendo a 11,5% que é a queixa mais freqüente de mulheres que buscam atendimento ginecológico (EGAN; LIPSKY, 2000). Assim, muitos casos de VB diagnosticados laboratorialmente não se traduzem em queixa para a paciente, portanto, alguns não seriam VB clinicamente pelos critérios de Amsel (AMSEL et al., 1983). O que nos traz mais uma questão, qual a importância clínica de casos com esta mudança de flora vaginal em que a mulher não apresenta sintomas? Com relação à avaliação macroscópica do conteúdo vaginal, o que mais prevaleceu foi o de cor branco/leitoso com 115 casos em 246 (46,7%) esta variável foi avaliada, seguido por cor amarelo com 95 (38,6%). Percebe-se a inespecificidade deste achado com relação ao diagnóstico laboratorial, como já demonstrado em outros estudos. (GOMES, 2003; EGAN; LIPSKY, 2000).

Em relação aos achados ginecológicos, em exame especular de vagina e colo uterino, foram diagnosticados com o normal 994 casos (87,8%) seguido por colpíte (4,4%) com 50 casos, pode-se assim confirmar diante esses dados o que a literatura já nos revela, que a VB é considerada uma condição não inflamatória na maioria das vezes (CAUCI et al., 2003).

Avaliando a associação de morfotipo de *Gardnerella vaginalis* na VB com outros morfotipos, verificamos uma associação mais prevalente com *Mobiluncus* sp e *Cândida* sp, apresentando respectivamente 215 casos (19,1%) e 90 casos (8,0%), Eleutério Jr et al. (2012) utilizando critérios e metodologia semelhante observou associação com *Mobiluncus* sp e *Cândida* sp em (15,8%) e (6,6%) de seus casos, respectivamente. Com relação à presença de *Cândida* sp, nos quadros de VB deve-se considerar a diferença de pH, como um fator a impedir tal associação, daí não se sabe ao certo qual sua freqüência. (ELEUTERIO Jr et al., 2012).

Utilizando os critérios de Amsel e escore de Nugent na avaliação dos esfregaços vaginais corados pelo método de Papanicolau, Eleutério Jr e Cavalcante (2004), avaliou a contagem de morfotipos de *Mobiluncus* sp em esfregaços vaginais de pacientes com vaginose bacteriana, onde encontram em 51,7% dos casos pelo exame de Papanicolau e em 46,8% pelo

método de Gram. Hellberg et al. (2001) pesquisou morfotipos sugestivos de *Mobiluncus* sp, em exame a fresco, encontrou 65,7% dos casos com VB. Já Schwebke e Lawing (2001), usando PCR (*polymerase chain reaction*), observaram *Mobiluncus* sp em 84,5% dos casos de vaginose bacteriana. Nota-se que esta associação variou dependendo da metodologia utilizada em cada pesquisa. Mas, a diferença de população estudada deve também influenciar. Daí a necessidade de estudo em populações locais para se situar melhor com relação às características da VB.

Um estudo avaliou a associação de VB com *Cândida albicans*, realizado por Wei et al. (2012), onde foi utilizada a pontuação de Nugent para VB em esfregaços vaginais (escore \geq 7), observando-se em 22,1% dos casos de associação com os morfotipos de *Cândida albicans*. Portanto, bem superior ao observado no presente estudo. Talvez métodos laboratoriais diferentes e população diferente tenham influenciado os resultados.

Fazendo uma comparação dos métodos e resultados com relação à associação entre VB e CV, pode-se observar que de acordo com Di Bartolomeo et al. (2002) que utilizou o exame direto e cultura, houve uma frequência de 7,9% (16/202), WEI et al. (2012) utilizando citologia oncótica convencional tal associação aconteceu em 22,1% (104/471), Saleh et al. (2012) em Gram., cultura e BD Affirm VPIITM® identificou associação em 11,7% (31/264), e finalmente, Eleutério Jr et al. (2012) avaliando por SurePath observou a associação em 6,7% dos casos.

Diante destes resultados, parece realmente haver uma associação entre VB e CV, apesar da diferença de pH ser um aparente obstáculo biológico. Os trabalhos apresentados nesta discussão utilizam metodologias diferentes com isso apresentam resultados diferentes, onde se pode concluir que os achados desta associação podem apresentar uma variação de aproximadamente de três vezes, mostrando que alguns métodos são mais sensíveis para este tipo de associação. As condições que podem estar associadas ainda são motivo de investigação. Métodos de biologia molecular e de genética bacteriana deverão ajudar a achar muitas das respostas, mas estão ainda muito além das possibilidades de diagnóstico cotidiano de ginecologistas, que deve ainda se ater a necessidade de um diagnóstico morfológico tanto do diagnóstico da vaginite quanto da vaginose.

Utilizando-se o infiltrado inflamatório como preditivo de infecção mista, foi observado que na presença de infiltrado inflamatório, houve uma associação importante com a

presença de morfotipo de *Cândida* sp (RR=5,4). Entrementes a identificação de *Mobiluncus* sp na VB teve uma maior associação com um menor número de células inflamatórias (RR=0,6). Parecendo haver uma relação entre a ausência de infiltrado e a presença de *Mobiluncus* sp, e a presença de *Cândida* sp com infiltrado inflamatório.

Trabalho realizado por Eleutério Jr. et al. (2012), utilizando-se a mesma metodologia, apresentou resultados próximos do nosso, onde parece haver uma relação entre a ausência de leucócitos e a presença de *Mobiluncus* sp. (OR= 0,2409), ao passo que na presença de leucócitos houve uma chance maior de *Cândida* sp. (OR= 175,1). Embora com uma razão de chance grande o menor número de casos estudados enfraqueceu os resultados deste estudo ampliando o intervalo de confiança, diferente da presente pesquisa que, embora com um risco relativo menor, foi um achado mais consistente.

Estudo de Geisler et al. (2004) avaliou a contagem de leucócitos vaginais em mulheres com vaginose bacteriana em relação a infecções vaginais e do colo do útero, onde estudou 296 mulheres com VB, a idade média de 24 anos e 81 % eram Afo-Americana. Os leucócitos vaginais elevados foram associados com sinais de vaginite, onde previu a candidíase (OR= 7,9, IC 95 % 2,2-28,9). Mostrado que na presença de CV ocorre uma frequência maior da presença de leucócitos.

Eleutério Jr. (2005), realizou trabalho onde avaliou 290 esfregaços cervicais, sendo corados pelos métodos de Papanicolaou e Gram, pesquisou o infiltrado inflamatório nestes esfregaços. Utilizou o escore de Nugent como critério de diagnóstico para confirmação diagnóstica de vaginose bacteriana e identificação de bacilos curvos Gram negativo sugestivos de *Mobiluncus* sp. Na avaliação pelo método de Gram, observou a presença de bacilos curvos, sugestivos de *Mobiluncus* sp. em 54% dos casos de vaginose bacteriana. Avaliando a presença de leucócitos, esta foi observada em 45,4% dos casos com ausência de leucócitos, bem como poucos leucócitos. Entretanto em um número substancial de casos a leucopenia vaginal esteve ausente. Quando a contabilização de leucócitos foi realizada, levando-se em conta separadamente os casos, a presença de bacilo curvo Gram negativo (*Mobiluncus* sp) na bacterioscopia, foi associada aos casos em que a leucopenia predominou, com 45% dos casos, contra uma distribuição mais paritária nos casos com morfotipos de *Mobiluncus*, com discreto maior número de casos associados à leucocitose em 55% dos casos.

Outra pesquisa realizada por Eleutério Jr. e Cavalcante (2004), pesquisando a contagem de morfotipos de *Mobiluncus* sp e concentração de leucócitos em esfregaços vaginais de pacientes com VB, utilizando Papanicolaou e Gram, obteve resultados que mostram que na presença de *Mobiluncus* sp (bacilos curvos), casos com leucocitose predominaram (70,9%) ao passo que na ausência de bacilos curvos predominaram casos sem leucocitose (62,2%), portanto com diferença significativa ($p < 0,05$). A esperada leucopenia nos casos de vaginose bacteriana não foi constante, principalmente quando se observou a presença de *Mobiluncus* sp nos espécimes; nesta situação houve leucocitose em maior número de casos. Assim, a visualização morfológica de *Mobiluncus* sp, quer no Gram, quer no Papanicolaou, esteve associada, com mais frequência, à leucocitose. Tal fato traz uma controvérsia levantada por Demirezen (2003) de que os casos com leucocitose, portanto, citologicamente uma vaginite, não deveriam ser considerados realmente uma vaginose. Esta hipótese pode ser discordante, uma vez que nem os critérios de Amsel et al. (1983), nem o escore de Nugent, Krohn e Hillier (1991), são adotados para o diagnóstico da condição, pois não leva em conta a concentração de leucócitos nos esfregaços vaginais. Tais achados demonstram a complexidade que caracteriza essa condição, que está longe de estar inteiramente esclarecida em sua gênese e sua fisiopatologia.

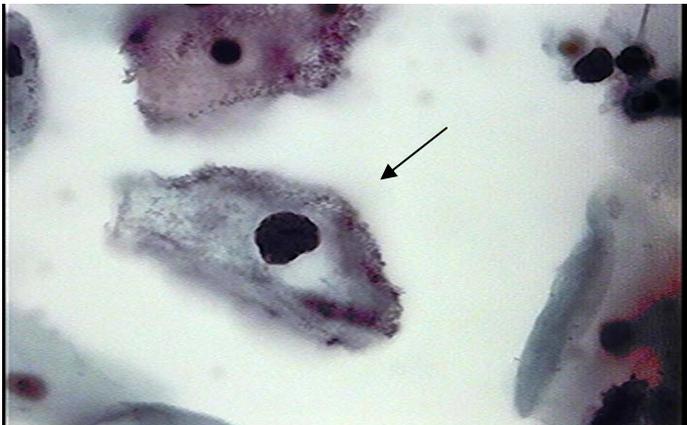
Boyle et al. (2003) realizou estudo para investigar se a VB está associada a neoplasia cervical intraepitelial, porém apresentou resultados, onde mostra esfregaços de citologia cervical apresentando células inflamatórias no grupo de pacientes com VB, sugerindo que a VB pode produzir alterações inflamatórias nas células do colo do útero, uma constatação que não concorda com a opinião da maioria, que VB é uma condição não inflamatória. Mesmo quando na presença de *Cândida albicans*, uma condição conhecida como associada à inflamação, sendo controlada, ainda permaneceu uma associação entre VB e células inflamatórias. As alterações inflamatórias podem ocorrer como um resultado de infecção com *C. trachomatis* que foi vista no trabalho também e o método utilizado para seu diagnóstico neste estudo é menos sensível do que ensaios de DNA que estão agora mais amplamente utilizadas. Isso garante uma investigação mais aprofundada.

A capacidade de algumas bactérias anaeróbias associadas a vaginose bacteriana, sintetizarem ácidos capazes de inibirem a quimiotaxia (AL-MUSHRIF; ELEY; JONES, 2000) leva a um quadro que citomorfologicamente pode não se apresentar como um processo

inflamatório, com infiltrado de células inflamatórias, muito embora tenha evidente alteração da microbiota vaginal. Uma das bactérias que tem esta capacidade mais bem estudada é a *Gardnerella vaginalis* e, secundariamente, o *Mobiluncus* sp., que agem como agentes morfológicos sinalizadores de um quadro de anaerobiose bem mais complexo (AL-MUSHRIF; ELEY; JONES, 2000; ELEUTÉRIO Jr, 1995). O fenômeno da leucopenia (poucos leucócitos) vaginal tornou-se tão característico da condição de vaginose bacteriana, que quadros que preenchem critérios clínicos e laboratoriais desta situação seriam considerados confusos quando o aspecto citomorfológico de um esfregaço denuncia uma evidente infiltração inflamatória, as custas primariamente de polimorfonucleares. (AL-MUSHRIF; ELEY; JONES, 2000; CALZOLARI et al., 2000; DONDERS et al., 2000; FAN; KE; LI, 1996; MOTA et al., 2000).

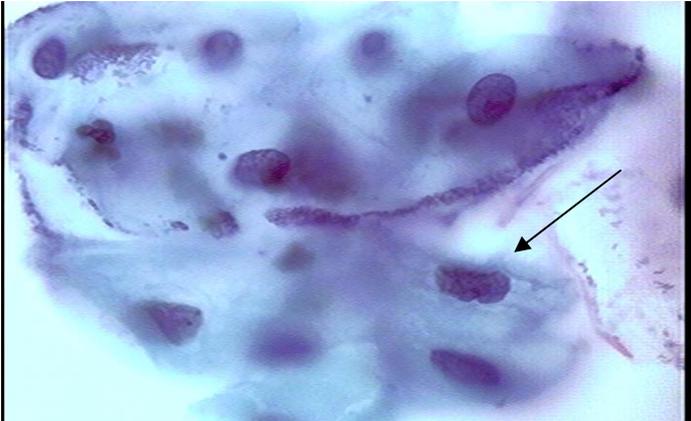
Avaliando a presença de atipias citológicas entre os 1132 casos diagnosticados como vaginose bacteriana nosso estudo, apresentou um total de 84 casos de atipias (7,5%) e dentre estas, prevaleceu ASC-US com 43 casos (51,2%) e LSIL com 32 casos (37%). (Figuras 6 e 7).

Figura - 6. Célula escamosa atípica de significado indeterminado (ASC-US) (seta) em caso de vaginose bacteriana sem infiltrado inflamatório (SurePath 1000x)



Fonte: arquivo pessoal

Figura - 7. Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) em caso de vaginose bacteriana (SurePath 1000x) (seta)



Fonte: arquivo pessoal

Já em trabalho realizado por Discacciat et al. (2006), que teve como objetivo analisar a associação entre VB e SIL utilizando o método de Papanicolau, mostrou que a VB foi igualmente presente em mulheres de ambos os grupos: 18% de mulheres com SIL e 12% de mulheres sem lesão escamosa. Os resultados também foram semelhantes, quando o grau de SIL foi levado em consideração. A VB foi detectada em 16% das mulheres com LSIL e em 12% das mulheres no grupo controle, enquanto que uma maior taxa de VB (33%) foi encontrada entre as mulheres com Lesão de Alto Grau (HSIL) em comparação com os controles (12 %). Essa diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa.

Outra pesquisa que relacionou a presença de lesão intraepitelial escamosa com VB, foi realizada por Nam et al. (2006), onde foram selecionadas um total de 588 mulheres que tiveram resultados de exame de Papanicolau apresentando alguma atipia citológica e utilizando como diagnóstico de VB (critérios de Amsel), observou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as pacientes do grupo VB presente e ausente.

Nam et al. (2006), estudou 510 pacientes e observou que entre 454 pacientes sem VB, SIL foi diagnosticada em 384 pacientes (81,8%) já entre as 56 pacientes com VB, SIL foi diagnosticada em 53 pacientes (94,6%) ($p = 0,043$), porém a análise não revelou significância estatística ($p = 0,081$). O estudo mostrou que quando foi correlacionado VB e o grau de SIL, os resultados mostram que a presença de VB não estava associada com a gravidade da lesão ($p = 0,777$).

Metanálise realizada por Ewy et al. (2012) analisou estudos que buscaram resultados para associação entre VB e SIL, mostrou que alguns resultados relatam que SIL foi significativamente maior no grupo de mulheres com VB em relação às mulheres sem VB (BARRINGTON et al., 1997) O estudo apresentou prevalência de 1,51 indicando uma associação positiva entre VB e LSIL.

Boyle et al. (2003) estudando 379 mulheres, sendo 117 VB positivo e 256 VB negativo evidenciou que não houve correlação entre a VB e a presença de SIL, independente da presença de HPV de alto risco nas células cervicais.

A associação VB e SIL, precisa ser mais estudada para avaliar os resultados de cada estudo e determinar, se possível sua frequência, pois a maioria dos estudos não incide especificamente sobre a associação entre VB e lesões cervicais. A grande questão desta associação são as variáveis estudadas, por exemplo, populacional, pois varia de acordo com a população estudada, heterogeneidade na prevalência de VB entre os estudos que pode ser significativa, variação em critérios de diagnóstico para VB, alguns autores usam escore de Nugent, outros, critérios de Amsel e presença de *clue cells*. Para o diagnóstico de lesões cervicais, alguns usam histologia e outros não e alguns especificam qual tipo de lesão estão estudando para associar com VB. Essas diferenças acabam prejudicando o entendimento dos resultados, podendo causar fatores de confusão. Conceitos técnicos, a subjetividade, a sensibilidade e especificidade do diagnóstico podem também contribuir para a heterogeneidade detectada.

Foi sugerido que um pH vaginal elevado, conforme presente em VB, na maioria dos casos, pode fazer com que uma metaplasia escamosa no colo do útero, permaneça por mais tempo, fazendo com que a zona de transformação fique vulnerável a agentes que promovam a displasia como o HPV (HUDSON et al., 1997). A VB pode influenciar o aparecimento e progressão de lesões pré cancerosas do colo do útero, mas é também plausível que a displasia cervical favorece condições para perturbação do meio vaginal normal e um promove crescimento abundante de anaeróbios. O papel da VB como um cofator na história natural de infecções pelo HPV e doenças relacionadas permanece difícil. É sabido que um número de fatores comportamentais sócio-demográficos e de estilo de vida influencia o risco da VB e lesões pré cancerosas do colo do útero. Apesar de não ser considerada uma DST

(VERSTRAELEN, 2008) a VB está associado com a atividade sexual, portanto, um candidato para uma associação epidemiológica com NIC. Resta saber se existe uma relação causal entre VB e lesões pré cancerosas do colo do útero, ou se ambas as condições podem ocorrer simultaneamente.

Dentre as atipias citológicas encontradas neste estudo, abordando a variável infiltrado inflamatório, observou-se que quando não houve atipias citológicas o infiltrado inflamatório esteve presente em 500 casos (44,2%). Já na presença de atipias citológicas o infiltrado leucocitário foi observado 51 casos (4,5%). Sendo que risco relativo para atipia citológica ASC-US ou mais, foi de 1,3.

Estudo realizado por Jahic et al. (2013), avaliando associação entre vaginite aeróbica, vaginose bacteriana e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, investigou 100 pacientes realizando anamnese, exame ginecológico clínico, estudo do HPV, exame microbiológico de esfregaço vaginal e cervical. Relatou que a VB foi encontrada em 12 % das pacientes com LSIL e em 4 % das pacientes com resultado normal. Apresentou um aumento estatisticamente significativo no número de leucócitos nas respostas com LSIL em relação àqueles com resultado normal. Mostrando que houve uma relação maior entre LSIL e VB na presença de células inflamatórias. Havendo uma concordância com nosso trabalho que mostrou um RR=1,3 para LSIL na presença de infiltrado inflamatório

Os estudos que relatam e estudam a associação entre VB e atipias celulares na presença de infiltrado inflamatórios, precisam verificar além de outros fatores já descritos, a inflamação cervical (que leva a danos genotóxicos através metabólitos oxidativos) possa está associado com NIC, podendo ser um cofator para lesões cervicais de alto grau em mulheres infectadas pelo HPV (CASTLE et al., 2001). Assim a VB como apresentado neste estudo freqüentemente coexiste com uma cervicite (SWEET, 2000), significando uma microflora vaginal alterada onde poderia, portanto, apresentar uma predisposição indireta para a displasia cervical.

8 CONCLUSÃO

- Correlacionando VB e infiltrado inflamatório tivemos uma frequência com infiltrado inflamatório em 551 casos e na ausência em 581 casos.
- A frequência dos casos de *Mobiluncus* na VB apresentou uma diferença significativa, levando-se em conta o infiltrado inflamatório, pois tivemos uma associação maior da ausência do infiltrado inflamatório com a presença de *Mobiluncus*.
- Nos casos de *Cândida* sp na VB, tivemos uma presença significativa deste patógeno correlacionado com a presença do infiltrado inflamatório.
- Não tivemos uma diferença significativa nos casos de atipias epiteliais na citologia em base líquida associadas à VB com infiltrado inflamatório e sem infiltrado inflamatório.
- Utilizando-se o infiltrado inflamatório como preditivo de infecção mista, houve uma chance maior de presença de morfotipo de *Cândida* sp. (RR =5,4702 (2,9360-10,1919). Desta forma, fica evidente a necessidade de um estudo amplo e envolvendo outras comunidades para estimar a real frequência da associação entre vaginose bacteriana e candidíase vaginal, embasando novas perspectivas diagnósticas e terapêuticas.
- Fazendo uma relação entre as atipias citológicas e infiltrado inflamatório tivemos LSIL com um (RR = 1, 35([1, 02 - 1, 76]). Mostrando uma correlação importante entre a presença de infiltrado leucocitário e achados de atipia citológica do tipo LSIL. Ficando assim a sugestão para que na presença de infiltrado inflamatório deve-se pesquisar mais cuidadosamente atipias citológicas, principalmente LSIL.

Concluimos, afirmando haver à necessidade de estudos mais amplos para que se possa determinar a real frequência de casos de *Mobiluncus* sp na VB levando em conta o infiltrado inflamatório. Nos casos com *Cândida* sp, parece haver realmente uma prevalência maior de casos na presença de infiltrado inflamatório e que atipias citológicas precisam ser mais estudadas nestes casos, levando-se em conta o infiltrado inflamatório e outras variáveis para que se possa verificar e avaliar melhor sua frequência.

REFERÊNCIAS

- AKGUT, C.; EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 2402-2408, 2003.
- AL-MUSHRIF, S.; ELEY, A.; JONES, B. M. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobes may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 1023-1030, 2000.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY. Vaginitis. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 53, p. 271-280, 1996.
- AMSEL, R.; TOTTEN, P. A.; SPIEGEL, C. A.; CHEN, K. C.; ESCHENBACH, D.; HOLMES, K. K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial. **Am. J. Med.**, v. 74, p. 14-22, 1983.
- AUDISI, T.; PIGINI, T.; DE RIUTORT, S. V.; SCHINDLER, L.; OZAN, M.; TOCALLI, C. et al. Validity of the Papanicolaou Smear in the Diagnosis of *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis* and Bacterial Vaginosis. **J. Low Genit. Tract. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 223-225, 2001.
- BAGNOLI, V. R.; PEREIRA FILHO, A. S.; MENKE, C. H.; MACHADO, L. E.; BARROS, LEAL, V. W.; OLIVEIRA, W. R. et al. Agentes causadores de vaginite. In: CONGRESSO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA DO NORTE E NORDESTE, 16., 1990, Olinda. **Anais...Olinda**, 1990.
- BARRINGTON, J. W.; LINTON, D.; O'LEARY, A.; BLACKWELL, A.; BRICK, J.; CALVERT, J. P. Anaerobic (bacterial) vaginosis and premalignant disease of the cervix. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 17, p. 383-385, 1997.
- BLACKWELL, A. Infectious causes of abnormal vaginal discharge: part two. **Matern. Child Health**, v. 12, p. 368-375, 1987.
- BOON, M. E.; HOLLOWAY, P. A.; BREIJER, H.; BONTEKOE, T. R. Gardnerella, Trichomonas and Candida in cervical smears of 58,904 immigrants participating in the Dutch national cervical screening program. **Acta Cytol.**, v. 56, n. 3, p. 242-246, 2012.
- BOYLE, D. C. M.; BARTON, S. E.; UTHAYAKUMAR, S.; HAY, P. E.; POLLOCK, J. W.; STEER, P. J.; SMITH, J. R. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 13, p. 159-163, 2003.
- BOYLE, D. C. M.; SMITH, J. R. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 9, p. 177-186, 1999.
- BROTMAN, R. M.; KLEBANOFF, M. A.; NANSEL, T. R.; YU, K. F.; ANDREWS, W. W.; ZHANG, J. et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 1907-1915, 2010.

CALZOLARI, E.; MASCIANGELO, R.; MILITE, V.; VERTERAMO, R. Bacterial vaginosis and contraceptive methods. **J. Gynecol. Obstet.**, v. 70, p. 341-346, 2000.

CASTLE, P. E.; HILLIER, S. L.; RABE, L. K.; HILDESHEIM, A.; HERRERO, R. et al. Na association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer Epidemiol; Biomarkers Pevm.**, v. 10, p. 1021–1027, 2001.

CAUCI, S.; GUACHINO, S.; DE ALOYSIO, D.; DRIUSSI, S.; DE SANTO, D.; PENACCHIONI, P.; QUADRIFOGLIO, F. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 9, n. 1, p. 53-58, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Sexually transmitted diseases treatment guidelines**: diseases characterized by vaginal discharge: bacterial vaginosis. 2010. Disponivel em: < <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/default.htm>>. Acesso em: 22 Feb. 2013.

DELEO, F. R Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis**, v. 9, n. 4, p. 399-413, 2004.

DEMIREZEN, S. Review of cytologic criteria of bacterial vaginosis: examination of Papanicolaou stained vaginal smears. **Diagn. Cytopathol.**, v. 29, p. 156-159, 2003.

DI BARTOLOMEO, S.; RODRIGUEZ FERMEPIN, M.; SAUKA, D. H.; ALBERTO DE TORRES, R. Prevalence of associated microorganisms in genital discharge, Argentina. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 545-552, 2002.

DISCACCIATI, M. G.; SIMOES, J. A.; AMARAL, R. G.; BROLAZO, E.; RABELO-SANTOS, S. H.; WESTIN, M. C.; MONTEMOR, E. B. Presence of 20% or more of clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears. **Diagn. Cytopathol.**, v. 34, n. 4, p. 272-276, 2006.

DOLGUSHIN, I. I; ANDREEVA, I. U. S.; PLEKHANOVA, E. V. Interaction of neutrophils and different bacterial agents. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, v. 5, n. 5, p. 103-105, 2008.

DONDERS, G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 65, n. 7, p. 462-473, 2010.

DONDERS, G.; BOSMANS, E.; DEKEERSMAECKER, A.; VEREECKEN, A.; VAN BULCK, B.; SPITZ, B. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. **J. Obstet. Gynecol.**, v. 182, p. 872-878, 2000.

DUARTE, G.; LANDERS, D. V. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. **J. Bras. Doenças Sexualm. Transm.**, v. 9, p. 4-14, 1998.

EGAN, M. E.; LIPSKY, M. S. Diagnosis of vaginitis. **Am. Fam. Physician**, v. 62, p.1095-1104, 2000.

ELEUTÉRIO Jr, J. Mobiluncus na vaginose bacteriana. **J. Bras. DST**, v. 7, p. 20-21, 1995.

ELEUTÉRIO Jr, J. Vaginose Bacteriana. É a Falta de Infiltrado Inflamatório Vaginal um Fator Importante?. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 37, n. 4, p. 219-221, 2005.

ELEUTÉRIO Jr, J.; CAVALCANTE, D. I. M. Contagem de Morfotipos de Mobiluncus sp e Concentração de Leucócitos em Esfregaços Vaginais de Pacientes com Vaginose Bacteriana. **Rev. Bras. Ginecol. Obstetr.**, v. 26, n. 3, p. 221-225, 2004.

ELEUTÉRIO Jr, J.; PASSOS, M. R. L.; GIRALDO, P. C.; LINHARES, I. M.; CAR, N. S. Estudo em Citologia em Meio Líquido (SurePath) da Associação de Candida sp. em Mulheres com Diagnóstico de Vaginose Bacteriana. **DST J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 24, n. 2, p. 122-123, 2012.

FAN, S.; KE, Y.; LI, Q. Detection of bacterial vaginosis in Gram stained vaginal smears and Papanicolaou stained cervical smears. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 76, n. 4, p. 284-286, 1996.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; LEDGER, W. J. Determining the cause of vulvovaginal symptoms. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 63, p. 445-464, 2008.

FERRIS, D. G.; HENDRICH, J.; PAYNE, P. M.; GETTS, A.; RASSEKH, R.; MATHIS, D.; LITAKER, M. S. Office laboratory diagnosis of vaginitis. Clinician-performed tests compared with a rapid nucleic acid hybridization test. **J. Fam. Pract.**, v. 41, p. 575-581.38, 1995.

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

FOX, S.; LEITCH, A. E.; DUFFIN, R.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **J. Innate Immun.**, v. 2, n. 3, p. 216-227, 2010.

GEISLER, W. M.; YU, S.; VENGLARIK, M.; SCHWEBKE, J. R. Vaginal leucocyte counts in women with bacterial vaginosis: relation to vaginal and cervical infections. **Sex. Transm. Infect.**, v. 80, p. 401-405, 2004.

GILLET, E.; MEYS, J. F.; VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; DE SUTTER, P.; TEMMERMAN, M.; VANDEN BROECK, D. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e405201, 2012.

GOMES, F. A. M. **Valor de o exame clínico especular e da anamnese para o diagnóstico do corrimento vaginal.** 2003. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

HELBERG, D.; NILSSON, S.; MARDH, P. A. Bacterial vaginosis and smoking. **Int. J. STD AIDS**, v. 11, p. 603-606, 2000.

HELBERG, D.; NILSSON, S.; MARDH, P. A. The diagnosis of bacterial vaginosis and vaginal flora changes. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 265, p. 11-15, 2001.

HOLMES, K. K.; HILLIER, S. Bacterial vaginosis. In: _____. **Sexually transmitted diseases**. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill, 1999.

HUDSON, M. M.; TIDY, J. A.; MCCULLOCH, T. A.; ROGSTAD, K. E. When is bacterial vaginosis not bacterial vaginosis?: a case of cervical carcinoma presenting as recurrent vaginal anaerobic infection. **Genitourin. Med.**, v. 73, p. 306-307, 1997.

INCA. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2006.

JAHIC, M.; MULAVDIC, M.; HADZIMEHMEDOVIC, A.; JAHIC, E. Association between aerobic vaginitis, bacterial vaginosis and squamous intra epithelial lesion low grade. **Med. Arch.**, v. 67, n. 2, p. 94-96, 2013.

JOHN, E.; MARES, D.; SPEAR, G. T. Bacterial vaginosis and host immunity. **Curr. HIV/AIDS Rep.**, v. 4, n. 1, p. 22-28, 2007.

KENT, H. L. Epidemiology of vaginitis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 165, p. 1168-1176, 1991.

LANDERS, D. V. The treatment of vaginitis: Trichomonas, yeast, and bacterial vaginosis. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 31, p. 473-479, 1988.

LANDERS, D. V.; WIESENFELD, H. C.; HEINE, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women. **J. Obstet. Gynecol.**, v. 190, p. 1004-1010, 2004.

LEDGER, W. J.; MONIF, G. R. A growing concern: inability to diagnose vulvovaginal infections correctly. **Obstet. Gynecol.**, v. 103, n. 4, p. 782-784, 2004.

LINHARES, I. M.; SUMMERS, P. R.; LARSEN, B.; GIRALDO, P. C.; WITKIN, S. S. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. **J. Obstet. Gynecol.**, v. 204, n. 2, p. 120.e1-5, 2011.

MARDH, P. A.; TCHOUDOMIROVA, K.; ELSHIBLY, S.; HELBERG, D. Symptoms and signs in single and mixed genital infections. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 63, p. 145-152, 1998.

MIRMONSEF, P.; GILBERT, D.; ZARIFARD, M. R.; HAMAKER, B. R.; KAUR, A.; LANDAY, A. L.; SPEAR, G. T. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 65, n. 3, p. 190-195, 2011.

MOTA, A.; PRIETO, E.; CARNALL, V.; EXPOSTO, F. Avaliação de métodos microscópicos para diagnóstico de vaginose bacteriana. **Acta Med. Port.**, v. 13, p. 77-80, 2000.

NAM, K. H.; KIM, Y. T.; KIM, S. R.; KIM, S. W.; KIM, J. W.; LEE, M. Y.; NAM, E. J.; JUNG, Y. W. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **J. Gynecol. Oncol.**, v. 20, n. 1, p. 39-43, 2009.

NAM, K. H.; KIM, Y. T.; KIM, S. R.; KIM, S. W.; KIM, J. W.; LEE, M. K.; NAM, E. J.; JUNG, Y. W. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **J. Gynecol. Oncol.**, v. 34, n. 5, p. 323-325, 2006.

NATIONAL guideline for management of bacterial vaginosis. 2006. Disponível em: <<http://www.guideline.gov/content.aspx?id=11602>>. Acesso em: 2 Apr. 2012.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Realibility of diagnosing bacterial vaginosis in improved by a standardized method of Gram stain interpretation. **J. Clin. Microbiolm.**, v. 29, n. 2, p. 297-301, 1991.

NYIRJESU, P. Vulvovaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 22, p. 637-652, 2008.

OWEN, M. K.; CLENNEY, T. L. Management of vaginitis. **Am. Fam. Physician**, v. 70, n. 11, p. 2125-2132, 2004.

PAVIC, N. Is there a local production of nitrosamines by the vaginal microflora in anaerobic vaginosis/Trichomoniasis? **Med. Hypoth.**, v. 15, p. 433-436, 1982.

PETERS, N.; Van LEEUWEN, A. M.; PIETERS, W. J.; HOLLEMA, H.; QUINT, W. G. et al. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. **Sex. Transm. Dis.**, v. 22, p. 296-302, 1995.

PLATZ-CHRISTENSEN, J. J.; SUNDSTROM, E.; LARSSON, P. G. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 73, p. 586-588, 1994.

SALEH, A. A. M.; ALTOOKY, M. H.; ELKADY, A. A.; HAZAB, H. S.; ELAASER, E. M. The microbiology of vaginal discharge and the prevalence of bacterial vaginosis in a cohort of non-pregnant women in Kuwait. **KMJ**, v. 44, n. 1, p. 20-25, 2012.

SCHIFF, M.; BECKER, T. M.; MASUK, M.; VAN ASSELT-KING, L.; WHEELER, C. M. et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in south western American Indian women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 152, p. 716-726, 2000.

SCHWEBKE, J. R.; LAWING, L. F. Prevalence of Mobiluncus spp among women with and without bacterial vaginosis as detected by polymerase chain reaction. **Sex. Transm. Dis.**, v. 28, p. 195-199, 2001.

SOBEL, J. D. Bacterial vaginosis. **Annu. Rev. Med.**, v. 51, p. 349-356, 2000.

SOBEL, J. D. Vaginal infections in adult women. **Med. Clin. N. Am.**, v. 74, p. 100, 1990.

SOBEL, J. D. Vaginitis and vaginal microbiota: controversies abound. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 9, p. 42-47, 1996.

SOBEL, J. D. Vulvovaginitis in healthy women. **Compr. Ther.**, v. 25, n. 6/7, p. 335-346, 1999.

SOBEL, J. D.; SUBRAMANIAN, C.; FOXMAN, B.; FAIRFAX, M.; GYGAX, S. E. Springer Mixed Vaginitis—More Than Coinfection and With Therapeutic Implications **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 15, n. 2, p. 104-108, 2013.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 427-439, 2010.

SONG, H. O.; LIM, Y. S.; MOON, S. J.; AHN, M. H.; RYU, J. S. Delayed human neutrophil apoptosis by *Trichomonas vaginalis* lysate. **Korean J. Parasitol.**, v. 48, n. 1, p. 1-7, 2010.

SWEET, R. L. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 8, p. 184–190, 2000.

TAKEI, H.; RUIZ, B.; HICKS, J. Cervicovaginal flora. Comparison of conventional pap smears and a liquid-based thin-layer preparation. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 125, n. 6, p. 855-859, 2006.

UTHAYAKUMAR, S.; BOYLE, D. C.; BARTON, S. E.; NAYAGAM, A. T.; SMITH, J. R. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: cause or coincidence. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 18, p. 572-574, 1998.

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

VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; CLAEYS, G.; TEMMERMAN, M.; VANEECHOUTTE, M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 191, p.1130-1132, 2004.

WEI, Q.; FU, B.; LIU, J.; ZHANG, Z.; ZHAO, T. *Candida albicans* and bacterial vaginosis can coexist on Pap smears. **Acta Cytol.**, v. 56, n. 5, p. 515-519, 2012.

WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; SENTMAN, C. L.; PIOLI, P. A.; SHEN, L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 306-335, 2005.

WITKIN, S. S.; LINHARES, I. M.; GIRALDO, P.; LEDGER, W. J. An altered immunity hypothesis for development of symptomatic bacterial vaginosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 4, p. 554-557, 2007.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
**O SIGNIFICADO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM
 DIAGNÓSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA EM CITOLOGIA EM MEIO
 LIQUIDO (SURE-PATH).**

Nº: _____ Data: ____/____/____

Pesquisador Responsável: Prof.Dr.José Eleutério Junior

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, _____ anos, RG _____, End
 ereço: _____, cidade de
 _____.

Estou ciente que o objetivo dessa pesquisa é estudar pacientes com e sem problemas de corrimento vaginal para descobrir o significado do infiltrado inflamatório em diagnóstico de vaginose bacteriana. Com os resultados desse estudo, espera-se conseguir novas maneiras de tratar esse tipo de problema da mulher.

Fui informada que:

1- Serei atendida em consultório de ginecologia com médico de minha escolha e que material coletado durante consulta será enviado ao Laboratório Professor Eleutério da Costa (LABPEC). para realização de análise citopatológica, onde através deste serão coletados dados para esta pesquisa. Tal procedimento poderá causar um leve desconforto momentâneo.

2- Exames coletados serão avaliados pelo pesquisador no LABPEC.

3- A coleta dos exames não vai me trazer nenhum prejuízo e será realizada durante o exame ginecológico.

4- Não irei receber qualquer benefício a mais por participar da pesquisa.

5- Caso não aceite participar da pesquisa, sei que tenho assegurado agora e futuramente o mesmo acompanhamento e tratamento médico

6- Tenho o direito de ser esclarecida sobre qualquer dúvida que eu tenha sobre a pesquisa que estou participando.

7- Todas as informações sobre mim obtidas na pesquisa não serão identificadas com o meu nome. Serei identificada apenas por um número.

8- Qualquer dúvida que venha a surgir, devido a minha participação na pesquisa, poderei entrar em contato, em horário comercial, de segunda à sexta-feira, com Dr. José Eleutério Junior telefone (085) 32530100.

Declaro concordar por minha livre e espontânea vontade, participar desta pesquisa que está sendo realizada com material colhido na consulta e que será avaliado no Laboratório Professor Eleutério da Costa pelo Dr. José Eleutério Junior.

Fortaleza, ____/____/____

Assinatura da paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____