



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER E DA CRIANÇA

MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA

**MICROBIOTA VAGINAL, HEPATITES B E C, SÍFILIS E HIV EM
MULHERES ATENDIDAS EM SERVIÇO DE INFERTILIDADE EM UMA
MATERNIDADE DE FORTALEZA**

FORTALEZA

2019

MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA

MICROBIOTA VAGINAL, HEPATITES B E C, SÍFILIS E HIV EM MULHERES
ATENDIDAS EM SERVIÇO DE INFERTILIDADE EM UMA MATERNIDADE
DE FORTALEZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher e da Criança.

Área de concentração: Atenção Integrada e Multidisciplinar à Saúde Materno-Infantil.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior

FORTALEZA- CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D32m de Oliveira, Muse Santiago.
Microbiota vaginal, hepatites B e C, sífilis e HIV em mulheres atendidas em serviço de infertilidade em uma maternidade de Fortaleza / Muse Santiago de Oliveira. – 2019.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Saúde da Mulher e da Criança, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros.
Coorientação: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.
1. Infertilidade. 2. Microbiota. 3. Infecções sexualmente transmissíveis. I. Título.

CDD 610

MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA

MICROBIOTA VAGINAL, HEPATITES B E C, SÍFILIS E HIV EM MULHERES
ATENDIDAS EM SERVIÇO DE INFERTILIDADE EM UMA MATERNIDADE
DE FORTALEZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher e da Criança.

Área de concentração: Atenção Integrada e Multidisciplinar à Saúde Materno-Infantil.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Eleutério Júnior (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha irmã Sara... por me ensinar a cada dia
a grandeza da simplicidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Galeno e Fátima pelo exemplo de honestidade e caráter e pelo amor incondicional.

Ao meu marido Júnior pela dedicação, companheirismo e paciência.

Aos meus irmãos Iole e Crasso pelo apoio de sempre. À tia Zezé pela torcida e à minha avó Rosa por uma vida de orações.

Ao professor Dr. Francisco das Chagas Medeiros pela confiança e incansável dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao professor Dr. José Eleutério Júnior pela inestimável contribuição, ensinamentos e pelo exemplo de sabedoria e humildade.

Ao professor Dr. Ivo Castelo Branco Coelho por me despertar o interesse no complexo campo das infecções sexualmente transmissíveis.

Às professoras Dra. Zenilda Vieira Bruno e Dra. Raquel Autran Coelho Peixoto pelo incentivo e compreensão.

À amiga enfermeira Eclésia Fragoso Nogueira pela participação imprescindível na realização desta pesquisa.

À técnica de enfermagem Luciane Nunes Batista pela dedicação e profissionalismo.

À farmacêutica Elizabeth Ribeiro Yokobatake Souza e a Pedro Vieira Câncio Júnior pela disponibilidade e contribuições com os laudos laboratoriais.

À Maternidade-Escola Assis Chateaubriand e a todos os que fazem o Mestrado Profissional em Saúde da Mulher e da Criança, por me permitirem os primeiros passos no admirável mundo da pesquisa científica.

“Eis o meu segredo. Ele é muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.” (Antoine de Saint-Exupéri).

RESUMO

A infertilidade constitui um importante problema de saúde pública, acometendo mundialmente mais de 186 milhões de pessoas. Existem lacunas nas pesquisas e no desenvolvimento de políticas de prevenção e manejo da infertilidade, sendo necessária uma abordagem ampla para compreender os fatores de risco preveníveis nos variados contextos populacionais. Uma complexa associação entre infecções sexualmente transmissíveis (IST), microbiota vaginal e infertilidade tem sido descrita. Este estudo observacional, descritivo, de corte transversal tem como objetivo identificar a prevalência de sífilis, hepatites virais B e C e HIV, além dos tipos de microbiota vaginal e sua associação com sintomas e achados clínicos, em mulheres com infertilidade atendidas em ambulatório especializado da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC) no município de Fortaleza-CE, no período de fevereiro a dezembro de 2018. As pacientes responderam a um formulário constando informações sociodemográficas e história ginecológica e obstétrica para avaliação dos dados epidemiológicos populacionais. Foram realizadas testagens rápidas para sífilis, hepatites virais B e C e HIV, com aconselhamento pré e pós teste e medida do pH do conteúdo vaginal. Foram colhidas amostras do fluido vaginal para avaliação do tipo de microbiota e diagnóstico de vaginose bacteriana, através de bacterioscopia com coloração de Gram para determinação do escore de Nugent. A investigação de *Candida* e *Trichomonas vaginalis* foi realizada através de exame direto do conteúdo vaginal. Foram incluídas no estudo 107 mulheres com infertilidade. A prevalência de vaginose bacteriana avaliada pelo escore de Nugent foi de 42,1%. A microbiota vaginal foi normal em 26,2% e intermediária em 31,8% dos casos. A prevalência de *Candida* e *Trichomonas vaginalis* pelo exame direto foi de 24,3% e 1,9%, respectivamente. O pH vaginal foi maior que 4,5 em 47,7% dos casos. A prevalência de sífilis foi de 4,7%. Não houve casos positivos para Hepatite B e C e HIV na amostra avaliada. **Conclusão:** a prevalência de microbiota vaginal anormal entre pacientes inférteis em nossa amostra foi maior que dados descritos na literatura. São necessários estudos posteriores procurando estabelecer relação de causa e efeito entre alterações da microbiota vaginal e infertilidade para embasar uma rotina de rastreio e tratamento de vaginose bacteriana em mulheres inférteis.

Palavras-chave: Infertilidade. Microbiota. Infecções sexualmente transmissíveis.

ABSTRACT

Infertility is a major public health problem, affecting more than 186 million people worldwide. There are gaps in the research and development of prevention policies, as well as infertility handling, and a wide approach is needed to understand the preventable risk factors in various population contexts. A complex relation between Sexually Transmitted Infections (STIs), vaginal microbiota, and infertility has been described. This observational, descriptive, and cross-sectional study aims at identifying the prevalence of syphilis, viral hepatitis B and C, and HIV, in addition to the types of vaginal microbiota and its association with symptoms and clinical findings in women with infertility assisted at the specialized outpatient clinic of Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC) in the city of Fortaleza, Ceará State, in the period from February to December, 2018.

The patients filled in a form in which socio-demographic information and gynecologic and obstetric history were informed in order to evaluate the epidemiological data. Quick testing was performed for syphilis, viral hepatitis B and C, and HIV, with pre and post test counseling, and vaginal content pH measurement. Vaginal fluid samples were collected to evaluate microbiota type and bacterial vaginosis diagnosis via Gram stain to determine the Nugent score.

The investigation of *Candida* and *Trichomonas vaginalis* was performed through direct examination of vaginal content. The study included 107 women with infertility. The prevalence of bacterial vaginosis evaluated by Nugent score was of 42.1%. The vaginal microbiota was regular in 26.2%, and intermediate in 31.8% of cases. The prevalence of *Candida* and *Trichomonas vaginalis* by direct examination was of 24.3%, and 1.9%, respectively. The vaginal pH was greater than 4.5 in 47.7% of cases. The prevalence of syphilis was of 4.7%. There were no hepatitis B and C and HIV positive cases in the evaluated sample.

Conclusion: the prevalence of abnormal vaginal microbiota between infertile patients in our sample was larger than data described in the literature. Further studies are needed to establish cause-and-effect relationship between changes of vaginal microbiota and infertility to support a routine screening and treatment of bacterial vaginosis in infertile women.

Key words: Infertility. Microbiota. Sexually Transmitted Infections

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação de grupos comunitários bacterianos vaginais por grupo étnico.....	17
Figura 2	Esfregaços do conteúdo vaginal de mulheres com microbiota normal, intermediária ou vaginose bacteriana corados pelo Gram.....	20
Gráfico 1	Distribuição dos casos de infertilidade por faixa etária.....	34
Gráfico 2	Idade na primeira relação sexual.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de escore (0 a 10) para esfregaços vaginais corados por Gram.....	19
Tabela 2	Distribuição de pacientes por nível de escolaridade.....	35
Tabela 3	Distribuição de pacientes por renda familiar.....	35
Tabela 4	Associação entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e tipos de infertilidade.....	36
Tabela 5	Associação entre idade na primeira relação sexual e tipos de microbiota vaginal.....	36
Tabela 6	Associação entre número de parceiros sexuais e tipos de microbiota vaginal.....	37
Tabela 7	Frequência de infecções sexualmente transmissíveis (IST) prévias.....	37
Tabela 8	Distribuição de IST na amostra populacional avaliada.....	37
Tabela 9	Análise da associação entre história de IST e tipos de microbiota vaginal.....	38
Tabela 10	Aspecto do conteúdo vaginal ao exame especular.....	38
Tabela 11	Análise da associação entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e queixas de corrimento vaginal e achados no exame especular.....	39
Tabela 12	Análise da associação entre a presença de lactobacilos (Gram) e achados do conteúdo vaginal ao exame especular.....	39
Tabela 13	Distribuição dos valores de pH na amostra populacional estudada.....	40
Tabela 14	Associação do diagnóstico de VB por escore de Nugent e valores de pH.....	40
Tabela 15	Prevalência de VB pelo escore de Nugent.....	40
Tabela 16	Distribuição das prevalências dos tipos de microbiota vaginal.....	41
Tabela 17	Prevalência de <i>Candida sp</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i> no exame a fresco.....	41
Tabela 18	Prevalência de pacientes com testes rápidos reagentes para sífilis.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC- *Centers for Disease Control and Prevention*

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa

CST- *Community State Types*

DIAHV- Departamento de Vigilância Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais

FIV- Fertilização *in vitro*

HBV- *Hepatitis B Virus* (Vírus da Hepatite B)

HCV- *Hepatitis C Virus* (Vírus da Hepatite C)

HIV- *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV- *Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano)

HSV- *Herpes simplex Virus* (Vírus do Herpes simples)

ISCA- Infertilidade sem causa aparente

IST- Infecções Sexualmente Transmissíveis

LEE- Laboratório de Epidemiologia e Estatística

MALT- Tecido Linfoide Associado à Mucosa

MEAC- Maternidade-Escola Assis Chateaubriand

MS- Ministério da Saúde

PAMPS- Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR- *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VB- Vaginose Bacteriana

WHO- *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

pH- Potencial de Hidrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Revisão de literatura	15
1.1.1	<i>Infertilidade: aspectos gerais</i>	15
1.1.2	<i>Microbiota vaginal e vaginose bacteriana</i>	16
1.1.3	<i>Vaginose bacteriana: métodos diagnósticos</i>	18
1.1.4	<i>Microbiota vaginal e a influência de bactérias, fungos e vírus nas respostas imunológicas</i>	21
1.1.5	<i>Infecções sexualmente transmissíveis (IST)</i>	22
1.1.6	<i>Microbiota vaginal, infecções sexualmente transmissíveis e infertilidade: uma complexa associação</i>	23
1.2	Justificativa da pesquisa	26
2	HIPÓTESE	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Tipo de estudo e população alvo	29
4.2	Tipo de amostra e cálculo do tamanho amostral	29
4.3	Período e local de estudo	29
4.4	Elegibilidade	30
4.4.1	<i>Critérios de inclusão</i>	30
4.4.2	<i>Critérios de exclusão</i>	30
4.5	Coleta de dados	30
4.5.1	<i>Instrumento de coleta de dados</i>	30
4.5.2	<i>Testagem rápida</i>	31
4.5.3	<i>Coleta do conteúdo vaginal</i>	31
4.6	Aspectos éticos	32
4.7	Processamento e análise dos dados	32
5	RESULTADOS	34
5.1	Características sociodemográficas	34
5.2	Antecedentes ginecológicos e obstétricos	35

5.3	Sintomas e achados clínicos.....	38
5.4	Prevalência de vaginose bacteriana e tipos de microbiota vaginal.....	40
5.5	Prevalência de <i>Candida sp</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i>.....	41
5.6	Prevalência de sífilis, hepatites B e C e HIV.....	41
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A.....	54
	APÊNDICE B.....	55
	APÊNDICE C.....	57
	APÊNDICE D.....	60
	ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Infertilidade: aspectos gerais

Infertilidade é caracterizada pela incapacidade de estabelecer uma gravidez clínica após doze meses de relações sexuais regulares e desprotegidas ou devido ao comprometimento da capacidade de reprodução de uma pessoa, seja individualmente ou com seu parceiro ou parceira (ZEGERS-HOCHSCHILD *et al.*, 2017).

Segundo a última definição da Organização Mundial de Saúde, a infertilidade é considerada uma doença que gera incapacidade como um comprometimento da função reprodutiva (WHO, 2019).

Constitui um importante problema de saúde pública, acometendo mundialmente mais de 186 milhões de pessoas, a maioria residente em países em desenvolvimento. Em localidades como o sul e centro da Ásia, norte da África e alguns países da África subsaariana, Oriente Médio e Europa Oriental, as taxas de infertilidade podem atingir até 30% das mulheres no menacme (INHORN *et al.*, 2015; VANDER BORGHT *et al.*, 2018).

As causas de infertilidade podem ser femininas, masculinas ou mistas. Estima-se que um em cada seis casais apresentarão problemas com fertilidade durante sua vida reprodutiva, sendo observado um aumento mundial na procura por técnicas de reprodução assistida com o objetivo de obter uma gestação viável e, finalmente, dar à luz a um recém-nascido saudável (FARQUHAR *et al.*, 2016).

A infertilidade feminina pode ser atribuída a fatores endócrinos, sistêmicos, vaginais, cervicais, uterinos, tubários e pélvico-peritoneais, e parece apresentar associações com aspectos genéticos, estilo de vida e fatores ambientais (HART, 2016). Aproximadamente 15 a 30% dos casos de infertilidade permanecem com causa desconhecida, denominando-se infertilidade sem causa aparente (ISCA). O fator tubário está entre as causas mais comuns de infertilidade feminina, sendo muitas vezes associado a infecções sexualmente transmissíveis (IST) que foram capazes de causar inflamações, danos e cicatrizes nas tubas uterinas (TSEVAT *et al.*, 2017).

A história clínica define a infertilidade feminina como primária (mulher que nunca engravidou) ou secundária (engravidou uma vez ou mais), sendo a última mais prevalente mundialmente (ZEGERS-HOCHSCHILD *et al.*, 2017; VANDER BORGHT *et al.*, 2018).

A avaliação diagnóstica da infertilidade deve ser conduzida de forma sistemática, rápida e econômica para identificar todos os fatores relevantes, priorizando os métodos menos invasivos para detecção das causas mais comuns. Deve ser baseada em história clínica, familiar e reprodutiva detalhadas, bem como em um exame físico capaz de revelar possíveis causas anatômicas ou distúrbios hormonais. A função ovulatória, a reserva ovariana, o fator cervical, anormalidades uterinas e permeabilidade tubária, são aspectos investigados durante a propedêutica da infertilidade feminina (PFEIFER *et al.*, 2015).

1.1.2 Microbiota vaginal e vaginose bacteriana

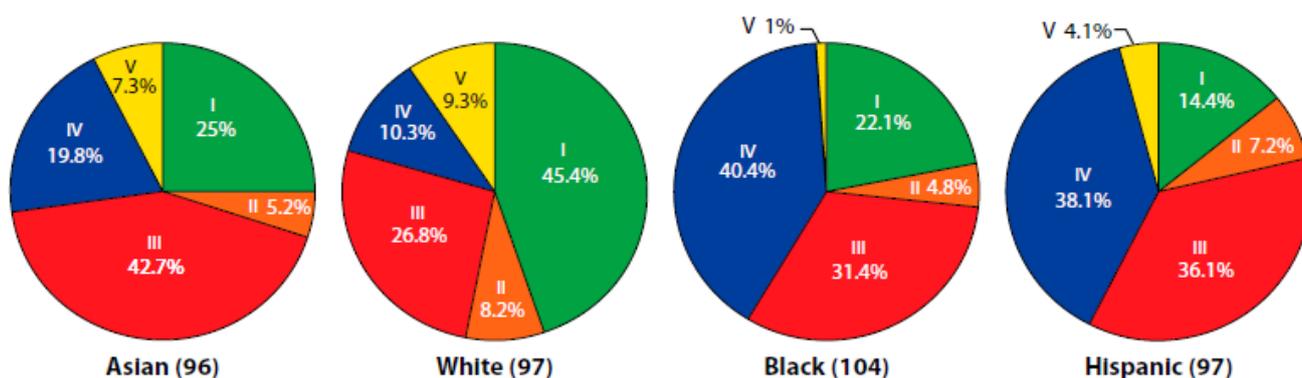
Em mulheres saudáveis na idade reprodutiva, a mucosa que protege a vagina é habitada por um microambiente tipicamente dominado por espécies de *Lactobacillus*, e esta dominância sobre patógenos anaeróbios está positivamente associada com a saúde vaginal (YOUNES *et al.*, 2018; VALENTI *et al.*, 2018).

Inicialmente identificados como *Lactobacillus acidophilus*, tal conhecimento representou uma visão simplificada destes microrganismos, diante dos estudos posteriores baseados no sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento que observaram uma complexa composição do microambiente vaginal (WITKIN *et al.*, 2007; MOR *et al.*, 2015).

Tais estudos demonstraram a existência de pelo menos cinco tipos principais de microbiota vaginal, denominados de *Community State Types* (CSTs). Quatro destes CSTs são dominados por espécies de *Lactobacilli*: *L. crispatus* (CST-I), *L. gasseri* (CST-II), *L. iners* (CST-III) ou *L. jensenii* (CST-V). O CST-IV não contém um número significativo de *Lactobacillus*, mas uma mistura polimicrobiana de anaeróbios estritos e facultativos, incluindo espécies dos gêneros *Gardnerella*, *Atopobium*, *Mobiluncus*, *Prevotella* e da ordem de *Clostridiales*. A frequência desses CSTs foi diferente nas diversas origens étnicas, com uma parcela de mulheres saudáveis assintomáticas, particularmente negras e hispânicas, com CST-IV mais comum (40%), sugerindo a influência de variações genéticas no microbioma humano (RAVEL *et al.*, 2011; GREEN *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2017).

Os grupos de comunidades bacterianas vaginais e sua distribuição por grupo étnico de mulheres, descritos por Ravel *et al.*, encontram-se representados na Figura 1.

Figura 1. Representação de grupos comunitários bacterianos vaginais por grupo étnico.



Fonte: RAVEL *et al.*, 2011, p.4684

Observa-se o número de mulheres de cada grupo étnico entre parênteses.

Os mecanismos pelos quais os *Lactobacilli* exercem suas funções protetoras contra patógenos exógenos são: (i) competição com outros microrganismos por nutrientes e pela adesão ao epitélio vaginal; (ii) redução do potencial de hidrogênio (pH) vaginal através da produção de ácidos orgânicos, principalmente isômeros do ácido lático, através da degradação do glicogênio produzido pelas células vaginais, exercendo atividade antimicrobiana seletiva contra a microbiota não residente; (iii) produção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), capazes de suprimir o crescimento de vários microrganismos; (iv) modulação do sistema imune local, inibindo a resposta pró-inflamatória aos antígenos microbianos (GREEN *et al.*, 2015; WITKIN *et al.*, 2017; VALENTI *et al.*, 2018).

A microbiota vaginal pode apresentar variações ao longo do ciclo menstrual e durante a menopausa ou sofrer influência de fatores como idade, flutuações hormonais, atividade sexual, uso de medicações e higiene (FRANASIAK *et al.*, 2015; GARCIA-VELASCO *et al.*, 2017; LEWIS *et al.*, 2017).

Distúrbios na composição de comunidades bacterianas têm mostrado contribuir para estados de doença e há um crescente corpo de evidências de que a microbiota vaginal, que é única para cada mulher, desempenha um papel importante na determinação de múltiplas facetas da saúde reprodutiva (GARCÍA-VELASCO *et al.*, 2017; YOUNES *et al.*, 2018).

Quando a microbiota dominante de *Lactobacilli* é afetada e substituída por diferentes anaeróbios, tais como *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Megasphaera* e outros anaeróbios de difícil cultivo, pode ocorrer uma disbiose polimicrobiana denominada vaginose bacteriana (VB) (MASTROMARINO *et al.*, 2014).

A VB é caracterizada por uma modificação do ambiente ácido que normalmente é dominado por *Lactobacillus sp* para um ambiente heterogêneo com aumento do número de anaeróbios restritos e facultativos, com produção de substâncias nocivas como as poliaminas e

outros compostos que induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-8 e (IL)-1 β (SIROTA *et al.*, 2014). Constitui a causa mais comum de corrimento vaginal em mulheres no mundo, mas a condição permanece assintomática em pelo menos metade dos casos. Quando sintomática pode apresentar-se como corrimento vaginal acinzentado com odor de “peixe podre” que representa incômodo para a paciente (ONDERDONK *et al.*, 2016; HAAHR *et al.*, 2016).

1.1.3 Vaginose bacteriana: métodos diagnósticos

Apesar do desenvolvimento da biologia molecular, historicamente, o diagnóstico de VB tem sido feito utilizando-se critérios clínicos ou baseando-se em técnicas de avaliação da morfologia bacteriana pela coloração de Gram (AMSEL *et al.*, 1983; SPIEGEL *et al.*, 1983; NUGENT *et al.*, 1991).

Em 1983, Amsel *et al.*, através da avaliação do conteúdo vaginal de 397 mulheres estudantes universitárias, sugeriram critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico de vaginose bacteriana. Os critérios de Amsel implicam na presença de pelo menos três dos seguintes achados: (i) corrimento vaginal fino e homogêneo; (ii) células epiteliais vaginais revestidas por bacilos (“*clue cells*” ou células-guia) na microscopia; (iii) pH vaginal >4,5; e (iv) teste das aminas positivo (adição de 10% de KOH na amostra produzindo odor de “peixe podre”) (AMSEL *et al.*, 1983).

Embora sejam úteis clinicamente como testes imediatos a serem realizados em consultório, os critérios de Amsel são subjetivos, com baixa reprodutibilidade, consomem tempo e têm desagradável execução (VAN DEN MUNCKHOF *et al.*, 2019).

Posteriormente, Nugent *et al.* (1991), em um estudo multicêntrico, avaliaram a variabilidade na interpretação da coloração de Gram de esfregaços de conteúdo vaginal de mulheres gestantes e propuseram um sistema de pontuação para o diagnóstico de vaginose bacteriana. Esta pontuação, conhecida como score de Nugent, é calculada pela avaliação da proporção de três diferentes morfotipos bacterianos: (i) bacilos Gram-positivos, representando *Lactobacilli*; (ii) cocobacilos Gram-variáveis que representam espécies de *Gardnerella*, *Bacteroides/Prevotella* e (iii) hastes curvas que representam espécies de *Mobiluncus* na coloração pelo Gram. Cada morfotipo foi quantificado de 0 a 4+ com relação ao número de morfotipos por campo de imersão em óleo (0, ausência de morfotipos; 1+, menos que um morfotipo; 2+, 1 a 4 morfotipos; 3+, 5 a 30 morfotipos; 4+, 30 ou mais morfotipos) (NUGENT *et al.*, 1991). O score de Nugent encontra-se descrito na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Sistema de escore (0 a 10) para esfregaços vaginais corados por Gram^a

Escore ^b	Morfotipos de <i>Lactobacillus</i>	Morfotipos de <i>Gardnerella</i> e <i>Bacteroides spp</i>	Bacilos curvos Gram-Negativos e Variáveis
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

^aMorfotipos recebem escore pelo número médio visualizado por campo em imersão com óleo. Note-se que menos peso é dado a bacilos curvos Gram-variáveis. Escore total= *Lactobacilli* + *G. vaginalis* e *Bacteroides spp.* + bacilos curvos.

^b0, sem morfotipos anormais presentes; 1, menos que um morfotipo anormal presente; 2, 1 a 4 morfotipos presentes; 3, 5 a 30 morfotipos presentes; 4, 30 ou mais morfotipos presentes.

Fonte: NUGENT *et al.*, 1991, p.298.

O tipo de microbiota é definido, assim, pelo valor soma da pontuação de cada morfotipo, produzindo um escore de 0 a 10. Um valor ≤ 3 indica microbiota vaginal normal, entre 4 e 6 representa microbiota vaginal intermediária e ≥ 7 é indicativo de vaginose bacteriana/microbiota vaginal anormal. A Figura 2 ilustra os esfregaços corados pelo Gram de cada tipo de microbiota descrito.

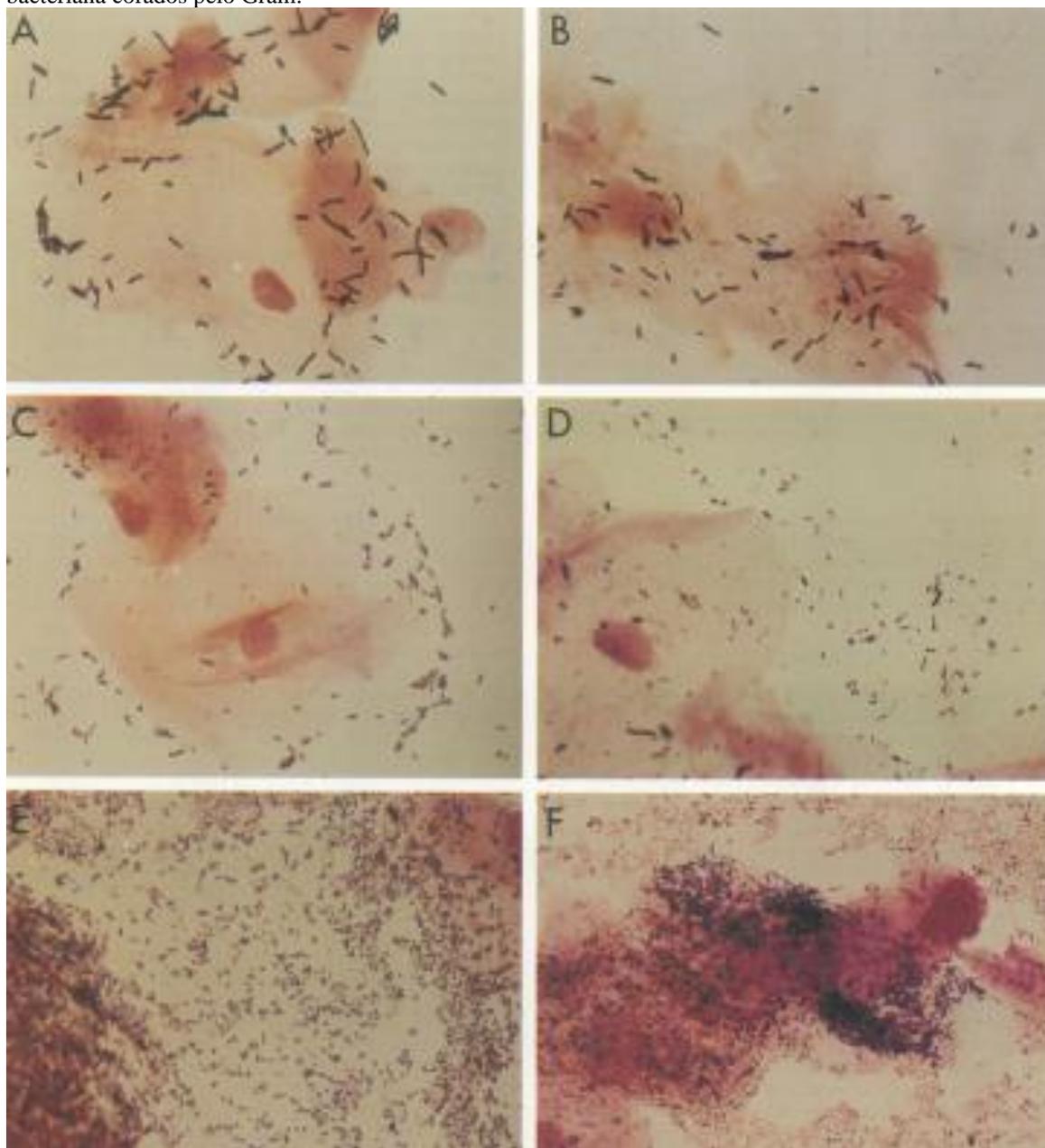
O escore de Nugent apresenta uma boa reprodutibilidade, constituindo-se um método simples e confiável para o diagnóstico de VB, podendo ser utilizado em localidades com menos recursos e que não têm acesso às técnicas de biologia molecular (MUTHUSAMY *et al.*, 2018).

Estudo recente avaliou a performance diagnóstica dos testes de *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) comparados com escore de Nugent para microbiota vaginal anormal e observou que a abordagem por PCR teve sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 93% e 93% para VB definida por escore de Nugent (HAAHR *et al.*, 2016).

Com relação às técnicas baseadas em cultura, a VB é frequentemente diagnosticada quando *G. vaginalis* é isolada, mas a sensibilidade e especificidade deste método é mais baixa (VAN DEN MUNCKHOF *et al.*, 2019).

Desta forma, a despeito dos novos métodos de biologia molecular, o escore de Nugent ainda é, por muitos autores, considerado o “padrão-ouro” para diagnóstico de vaginose bacteriana (BAGNALL *et al.*, 2017; MUTHUSAMY *et al.*, 2018).

Figura 2. Esfregaços do conteúdo vaginal de mulheres com microbiota normal, intermediária ou vaginose bacteriana corados pelo Gram.



- (A) Microbiota normal: 4+ morfotipos de *Lactobacillus*, ausência de hastes Gram-negativas ou Gram-variáveis (escore=0);
- (B) Microbiota normal: 3+ Morfotipos de *Lactobacillus*; 1+ morfotipos de *Gardnerella spp.* (escore=2);
- (C) Microbiota intermediária: 3 + Morfotipos de *Lactobacillus* e 3 + pequenas hastes Gram-variáveis (escore =4);
- (D) Microbiota intermediária: 2 + Morfotipos de *Lactobacillus* e 4 + pequenas hastes Gram-negativas e Gram-variáveis (escore = 6);
- (E) Vaginose bacteriana: sem lactobacilos e 4 + Gram-negativos e hastes variáveis (escore = 8);
Note as “células-guia” na margem à esquerda;
- (F) Vaginose bacteriana: sem lactobacilos e 4 + hastes Gram-negativas e hastes curvas (escore= 10);
Note os morfotipos de *Mobiluncus spp.* no centro do campo.

Fonte: NUGENT *et al.*, 1991, p.298.

1.1.4 Microbiota vaginal e a influência de bactérias, fungos e vírus nas respostas imunológicas

Na vagina, os microrganismos existem em uma afinada relação mutualística com o hospedeiro e proporcionam a primeira linha de defesa contra a colonização de patógenos oportunistas. Assim, o microbioma vaginal, associado a diversos componentes da imunidade inata e adquirida, desempenha um importante papel para manutenção da saúde reprodutiva (LINHARES *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2017).

A resposta imune específica contra estes patógenos pode ser humoral ou celular, a depender do tipo de microrganismo que precisa ser erradicado. Desta forma, bactérias e parasitas extracelulares estimulam a produção de anticorpos, constituindo a resposta humoral, enquanto vírus, fungos, bactérias e microrganismos intracelulares ativam a resposta imune celular (GIRALDO *et al.*, 2006).

O sistema imune inato reconhece padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) nos micróbios invasores, ao invés de reconhecer antígenos específicos. Os componentes da imunidade inata que atuam na vagina são representados por fatores solúveis, tais como, lecitina ligadora de manose, componentes do complemento, defensinas, além do inibidor de protease secretória dos leucócitos, óxido nítrico, componentes associados a membranas (“*toll-like receptors*”) e células fagocitárias (WITKIN, *et al.* 2007; LINHARES *et al.*, 2010).

As deficiências imunológicas podem influenciar a evolução de algumas infecções genitais. Candidíase vaginal recorrente parece ocorrer devido a um defeito transitório da imunidade celular. Uma resposta imunológica inadequada do hospedeiro à infecção fúngica é observada e a resposta imune humoral substitui a resposta celular, com a produção exacerbada de anticorpos ineficazes contra *Candida*. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) induz a depressão imunológica, que modifica a história natural da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) e propicia a oncogênese, bem como outras infecções genitais. O HPV é mais agressivo em pacientes com HIV, com evolução mais rápida de lesões pré-neoplásicas para o câncer (GIRALDO *et al.*, 2006).

Um estudo recente observou que alguns mediadores da resposta imunológica, tais como indutor de metaloproteinase de matriz extracelular (EMMPR), metaloproteinase de matriz-8 (MMP-8), hialuronano (HA), beta defensinas (hBD2) e lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), estavam presentes no fluido vaginal de mulheres com inflamação, sendo suas concentrações significativamente relacionadas à extensão do processo inflamatório

avaliada pelo número de leucócitos por campo de esfregaços vaginais destas mulheres ($p < 0,05$) (BEGHINI *et al.*, 2016).

A mucosa vaginal também constitui um importante fator protetor do sistema genital feminino, através de mecanismos de autodefesa e anticorpos secretores. O tecido linfóide associado à mucosa (MALT) exerce atividade anti-inflamatória protetora, inibe a adesão de microrganismos, neutraliza vírus e toxinas, além de estabilizar a microbiota. O MALT constitui o principal produtor de imunoglobulina IgA secretora, que, por sua vez, atua protegendo o lúmen da mucosa, suprimindo a produção de mediadores do sistema complemento, inibindo a fagocitose dependente de complemento e a resposta de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e metabólitos do ácido araquidônico, provenientes das células fagocíticas, prevenindo, assim, os danos decorrentes da resposta inflamatória (GIRALDO *et al.*, 2006).

A resposta imune pró-inflamatória contribui substancialmente para a inibição da colonização e propagação de microrganismos indesejáveis no trato reprodutivo feminino. No entanto, uma inflamação excessivamente vigorosa pode danificar o colo do útero e o epitélio vaginal, aumentando o risco de infecções sexualmente transmissíveis, incluindo o HIV (BEGHINI *et al.*, 2016).

Compreender os mecanismos envolvidos na manutenção de um ambiente vaginal saudável representa uma importante ferramenta para o desenvolvimento de medidas de proteção contra a aquisição de IST e outras infecções por patógenos que possam comprometer a saúde reprodutiva feminina.

1.1.5 Infecções sexualmente transmissíveis (IST)

O termo “infecções sexualmente transmissíveis” se refere a uma variedade de síndromes clínicas e infecções causadas por patógenos, que podem ser transmitidas através da atividade sexual (CDC, 2015). São principalmente adquiridas por meio do contato sexual (oral, vaginal, anal), sem o uso de preservativo masculino ou feminino, com uma pessoa que esteja infectada. A transmissão pode ocorrer ainda da mãe para a criança, durante a gestação, parto ou amamentação. O tratamento das pessoas com IST melhora a qualidade de vida e interrompe a cadeia de transmissão dessas infecções (DIAHV, 2017. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-ist>).

São infecções amplamente disseminadas mundialmente com um importante impacto na saúde sexual e reprodutiva e consequências que acometem principalmente mulheres, incluindo

complicações na gestação, câncer, infertilidade e aumento da transmissão do vírus do HIV (GOTTILIEB *et al.*, 2013).

Estima-se que no mundo cerca um milhão de pessoas adquiram uma nova IST a cada dia e que 357 milhões de pessoas têm uma infecção sexualmente transmissível curável a cada ano (WHO, 2016). Estes valores podem estar subestimados, pois a maioria das IST é assintomática. Além disso, se presume que 60% de pacientes com uma IST são simultaneamente portadores de outro agente de transmissão sexual (NARDIS *et al.*, 2013).

O crescimento da incidência do HIV em mulheres trouxe nova demanda para ginecologistas e obstetras. O controle das outras IST, importantes fatores de risco para a infecção pelo HIV, tornou-se prioritário e medidas preventivas devem ser direcionadas às mulheres sexualmente ativas. O diagnóstico precoce das IST- que são muitas vezes assintomáticas na mulher- é uma estratégia de controle a ser urgentemente agregada à rotina do atendimento ginecológico. A aplicação de testes rápidos de baixo custo, de alta acurácia e de fácil realização é preconizada pela Organização Mundial de Saúde para investigação de IST virais e sífilis, inclusive em áreas menos favorecidas e com maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde (GOTTILIEB *et al.*, 2013).

Testes rápidos são aqueles cuja execução, leitura e interpretação dos resultados são feitas em, no máximo, 30 minutos. Além disso, não necessitam de estrutura laboratorial. Os testes rápidos são, primariamente, recomendados para testagens presenciais. Podem ser feitos com amostras de sangue total obtida por punção venosa ou da polpa digital, ou com amostras de fluido oral. Dependendo do fabricante, podem também ser realizados com soro e/ou plasma. O Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV) do Ministério da Saúde (MS) fornece atualmente testes rápidos para a triagem e/ou o diagnóstico de HIV, sífilis e hepatites B e C, em todo território nacional (DIAHV, 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/profissionais-de-saude/testes-rapidos>>).

1.1.6 Microbiota vaginal, infecções sexualmente transmissíveis e infertilidade: uma complexa associação

Apesar do controle exercido pelos lactobacilos sobre o microambiente vaginal, muitos outros microrganismos podem ser cultivados em amostras vaginais saudáveis. Isoladamente, estes organismos não desencadeiam estados patológicos, mas quando uma classe deles domina, o desequilíbrio resultante pode ser o primeiro passo para acarretar disbiose ou ainda predispor a vaginites ou à aquisição de IST (CASARI *et al.*, 2010; VAN OOSTRUM *et al.*, 2013).

Brotman *et al.* (2010), em um estudo longitudinal incluindo 3620 mulheres não gestantes em idade reprodutiva, observou que a microbiota vaginal intermediária ou VB, avaliada por escore de Nugent, foi associada a um risco aumentado de 1,5 a 2 vezes de infecção por *Trichomonas*, *Gonorrhoea* ou *Chlamydia* (BROTMAN *et al.*, 2010).

Estudos de corte transversal e longitudinais têm demonstrado uma associação da microbiota vaginal com prevalência e incidência de muitas doenças virais sexualmente transmitidas como vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV) e vírus do herpes simples (HSV), além do vírus da Hepatite C (HCV) (NARDIS *et al.*, 2013; VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014; LEWIS *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, a vaginose bacteriana é considerada uma questão obstétrica e ginecológica e sua relação com trabalho de parto pré-termo e infecções pós-cirúrgicas tem sido bastante estudada. Menor número de estudos, no entanto, analisaram a associação entre VB e infertilidade feminina e curiosamente sugeriram implicações negativas para fertilidade (MANIA-PRAMANIK *et al.*, 2009; SALAH *et al.*, 2013; HAAHR *et al.*, 2016).

Achados demonstram prevalência de VB até três vezes maior entre mulheres inférteis comparadas a mulheres sem infertilidade (VAN OOSTRUM *et al.*, 2013; SALAH *et al.*, 2013; DURUGBO *et al.*, 2015).

Os estudos sugerem que a VB pode afetar diretamente a fertilidade, a partir da disseminação ascendente das espécies bacterianas envolvidas (MASTROMARINO *et al.*, 2014). Representa fator de risco independente para sequelas graves do trato reprodutivo, estando associada com doença inflamatória pélvica e infertilidade por fator tubário, quer seja o diagnóstico feito por achados clínicos, microscópicos, cultura ou biologia molecular, quer seja em pacientes sintomáticas ou assintomáticas (NARDIS *et al.*, 2013; DURUGBO *et al.*, 2015).

Alguns estudos indicam ainda que a presença de VB pode interferir nos resultados das técnicas de reprodução assistida. Dados para análise do microbioma têm sido coletados, em cada etapa do processo de reprodução assistida, do ovário, folículo e oócito, tuba uterina, cérvix e vagina. A microbiota vaginal parece interferir em todas as etapas da reprodução, da gametogênese até a fertilização, migração e implantação embrionária, podendo seu desequilíbrio levar a resultados reprodutivos e obstétricos desfavoráveis (FRANASIAK *et al.*, 2015).

Uma revisão sistemática com metanálise avaliou doze estudos que observaram a prevalência de VB diagnosticada através do escore de Nugent em pacientes inférteis, a associação entre VB e causas de infertilidade, e a associação entre VB e taxas de concepção e perda gestacional precoce após fertilização *in vitro* (FIV). A análise evidenciou que VB é

significativamente mais prevalente em mulheres com infertilidade (OR 3.32; 95% IC: 1.53-7.20); mulheres com infertilidade por fator tubário tiveram significativamente mais alta prevalência de VB (OR 2.77; 95% IC: 1.62-4.75) comparadas a mulheres com outras causas de infertilidade; e que VB não foi associada com diminuição das taxas de concepção (OR 1.03; 95% IC: 0.79-1.33), mas foi associada com risco significativamente elevado para perda gestacional pré-clínica (OR 2.36; 95% IC:1.24-4.51) (VAN OOSTRUM *et al.*, 2013).

Muitas infecções sexualmente transmissíveis, incluindo *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, têm sido bastante estudadas e possuem um papel bem estabelecido como determinantes de infertilidade (NDOWA *et al.*, 2012; OLALEYE *et al.*, 2016).

Por outro lado, a associação entre infertilidade com patógenos como *Trichomonas vaginalis* ainda não está bem esclarecida (MIELCZAREK *et al.*, 2016). Estudos retrospectivos têm observado que mulheres com história de infertilidade apresentam 2 a 3 vezes maior prevalência de infecção por *T. vaginalis*, e mulheres com tricomoníase têm risco aproximadamente 2 vezes maior de infertilidade por fator tubário (EL-SHAZLY *et al.*, 2001; TSEVAT *et al.*, 2017).

A relação entre a infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) entre casais que procuram tratamento com fertilização *in vitro* (FIV) e as causas de infertilidade é desconhecida. Estudo recente avaliando 831 casais inférteis, mostrou uma prevalência de infecção por HBV em 6,3% das mulheres e 7,3% dos homens avaliados, e a infecção de um ou ambos os parceiros foi associada com infertilidade primária (44,2% vs 55,1%, $p=0,038$). Os resultados sugeriram que a infecção por HBV em qualquer um dos parceiros aumenta o risco de infecção pélvica feminina, através do comprometimento da resposta imune às infecções sexualmente transmissíveis, com consequente dano tubário e infertilidade (LAO *et al.*, 2017).

Estudo retrospectivo anterior avaliou o impacto da soropositividade para o HCV nos resultados de FIV e observou que a ausência de resposta ovarina foi significativamente maior em mulheres soropositivas comparadas com controles (10/42 vs 5/84 ciclos, respectivamente; $p < 0,01$). Para ciclos com recuperação de oócitos, as mulheres soropositivas para o HCV necessitaram de maior dose de gonadotropina em comparação com os controles (ENGLERT *et al.*, 2007).

Com relação à sífilis, há poucos dados sobre sua associação com infertilidade. Um estudo caso-controle comparou os resultados após FIV e transferência de embriões entre pacientes inférteis com e sem sífilis. A taxa de gravidez clínica foi significativamente menor no grupo com sífilis em relação ao controle (43,8% vs. 55,6%, $p=0,03$), sugerindo associação

entre sífilis e resultados reprodutivos desfavoráveis de técnicas de reprodução assistida (WANG *et al.*, 2015).

Estudo realizado em 11 países africanos, durante o período de 2003 a 2013, avaliou o tempo para engravidar de 3181 mulheres e comparou o grupo de mulheres soropositivas para o HIV com mulheres soronegativas para o vírus. Durante um período de observação de 12 meses, as mulheres HIV-positivas tiveram uma redução média de 25% na fecundidade em comparação com mulheres HIV negativas (OR 0.75; 95% IC:0.62–0.92), após ajuste para fatores de confusão (GEMMILL *et al.*, 2018).

Observa-se, assim, que os diferentes agentes causadores de infecções sexualmente transmissíveis, as co-infecções existentes e as interações com as características do hospedeiro, incluindo a microbiota vaginal individual, podem associadamente afetar a capacidade de concepção da mulher (TSEVAT *et al.*, 2017; GRASPEUNTNER *et al.*, 2018).

Desta forma, o entendimento aprofundado desta complexa associação, bem como a identificação dos diversos fatores que podem ocasionar disbiose e seus impactos, são significativamente importantes para a compreensão do processo de saúde e doença e para o aprimoramento dos cuidados prestados em saúde reprodutiva.

1.2 Justificativa da pesquisa

Com base nos avanços do conhecimento atual sobre a associação entre microbiota vaginal, infecções sexualmente transmissíveis e infertilidade, e diante da necessidade de mais pesquisas nesta área, o presente estudo investigou a frequência de algumas IST (hepatites virais B e C, HIV, sífilis e tricomoníase), a prevalência de vaginose bacteriana e vaginites e dos tipos de microbiota vaginal, em mulheres acompanhadas em ambulatório de reprodução humana, considerando características sociodemográficas locais e fornecendo dados necessários para possibilitar o planejamento e adoção de estratégias e medidas de intervenção direcionadas à promoção da saúde sexual e reprodutiva das pacientes atendidas no serviço.

2 HIPÓTESE

Mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas em ambulatório especializado da MEAC têm alta prevalência de infecções sexualmente transmissíveis (sífilis, HIV, hepatites virais B e C), infecções vaginais e vaginose bacteriana, corroborando a associação entre microbiota vaginal anormal e as infecções sexualmente transmissíveis pesquisadas com infertilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a prevalência de sífilis, hepatites virais B e C, HIV, vaginose bacteriana, *Trichomonas vaginalis* e *Candida sp* e identificar os tipos de microbiota vaginal mais prevalentes. Identificar as associações destes quadros com sintomas e achados clínicos, em mulheres com infertilidade primária ou secundária, atendidas em ambulatório especializado da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand no município de Fortaleza-Ceará.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar a prevalência de infecção por vírus da Hepatite B (HBV), vírus da Hepatite C (HCV), vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e sífilis, através de testes rápidos específicos;
- b) Avaliar a prevalência de vaginose bacteriana (VB), através do escore de Nugent;
- c) Estabelecer a frequência dos tipos de microbiota vaginal (normal, intermediária ou VB), pelo escore de Nugent;
- d) Identificar prevalência de *Candida sp* ou *Trichomonas vaginalis*, com o exame direto do conteúdo vaginal;
- e) Comparar os achados dos tipos de microbiota vaginal com sinais e sintomas referidos pelas participantes;
- f) Avaliar a associação entre achados de exame especular (características do conteúdo vaginal e pH) com os tipos de microbiota vaginal pelo escore de Nugent;
- g) Traçar o perfil sociodemográfico da população estudada e possíveis associações com achados da microbiota vaginal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e população alvo

Estudo observacional, descritivo, de corte transversal que tem como população alvo mulheres em idade reprodutiva com infertilidade primária ou secundária.

4.2 Tipo de amostra e cálculo do tamanho amostral

A amostra foi calculada com base na estimativa da média de prevalência de vaginose bacteriana na população geral e entre mulheres com infertilidade disponível na literatura, usando como referência a média de prevalências relatadas no estudo de Bagnall *et al.* (2017) e na revisão sistemática de Van Oostrum *et al.* (2013).

O tamanho da amostra encontrado correspondeu ao valor mínimo de 92 mulheres.

4.3 Período e local de estudo

O estudo foi realizado no Ambulatório de Infertilidade da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC) em Fortaleza- Ceará durante o período de fevereiro a dezembro de 2018.

O ambulatório funciona semanalmente às quintas e sextas-feiras pela manhã, durante o horário de 7:00 às 13:00h, sendo as pacientes referenciadas pela rede de saúde do município de Fortaleza, agendadas previamente para consulta ambulatorial.

O corpo clínico é constituído por equipe multiprofissional devidamente capacitada e representada por profissionais médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, psicólogos e assistentes sociais.

A pesquisa foi realizada às sextas-feiras pela manhã, durante o atendimento ambulatorial.

4.4 Elegibilidade

4.4.1 Critérios de inclusão

- a) Mulheres com diagnóstico estabelecido de infertilidade, ou seja, atividade sexual regular há um ano ou mais, sem uso de métodos anticoncepcionais, com desejo de gestação, sem êxito;
- b) Ser acompanhada no ambulatório de infertilidade da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand;
- c) Estar de acordo em participar da investigação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pela participante.

4.4.2 Critérios de Exclusão

- a) Uso atual de cremes vaginais ou hormônios;
- b) Mulheres grávidas;
- c) Mulheres em uso de dispositivo intrauterino (DIU)
- d) Sangramento vaginal no dia da entrevista;
- e) Uso de antibióticos nas últimas quatro semanas;
- f) Atividade sexual nas últimas 48h;
- g) Recusa da paciente em participar de qualquer etapa da pesquisa.

4.5 Coleta de dados

4.5.1 Instrumento de coleta de dados

As pacientes recrutadas para o estudo responderam inicialmente a uma lista de verificação (APÊNDICE A), onde constavam os critérios para inclusão ou exclusão na pesquisa.

Foi preenchido um formulário padronizado (APÊNDICE B), onde constavam dados sobre o perfil sócio epidemiológico e antecedentes ginecológicos e obstétricos das mulheres incluídas, além dos achados do exame ginecológico e resultados de testagens rápidas para IST.

Todo processo de coleta de dados e exame ginecológico das pacientes foi realizado pela pesquisadora.

4.5.2 Testagem rápida

Foram oferecidos e realizados testes rápidos de imunoenensaio cromatográfico para detecção qualitativa de HBV (HBsAg-K145, Bioclin Quibasa[®], Brasil), HCV (Alere HCV, Alere[®], Brasil), HIV (Medtest, Medlevenoohn[®], Brasil) e sífilis (Imuno-Rápido Sífilis, Wama Diagnóstica[®], Brasil).

Após aconselhamento pré-teste, foram colhidas amostras de sangue total, obtidas por punção única da polpa digital das participantes.

Os resultados dos testes foram lidos após 15 minutos. Um teste com resultado positivo era representado por uma linha rosa em ambas as áreas de controle e teste. Um teste negativo era representado por apenas uma linha rosa na área de controle.

Após a realização dos testes, procedeu-se ao aconselhamento pós-teste de acordo com os resultados obtidos para cada paciente.

Todo o processo de testagem rápida para HBV, HCV, HIV e sífilis foi realizado por profissional de enfermagem devidamente capacitada.

4.5.3 Coleta do conteúdo vaginal

Duas amostras do conteúdo vaginal foram coletadas durante o exame ginecológico, com a paciente em posição de litotomia e realização de exame especular, sem utilização de lubrificante ou solução salina no espéculo para não comprometer a avaliação do espécime na microscopia.

A primeira amostra foi colhida de parede vaginal lateral com espátula de Ayre e feito um esfregaço em lâmina encaminhada para realização de bacterioscopia com coloração de Gram. O diagnóstico de vaginose bacteriana e a caracterização dos tipos de microbiota vaginal foram realizados através do escore de Nugent, com a contagem dos morfotipos de *Lactobacillus*, *Gardnerella/Bacteroides* e *Mobiluncus* existentes.

Os tipos morfológicos foram quantificados de 1+ a 4+ de acordo com o número deles por campo e somados, para a definição do tipo de microbiota vaginal:

- a) 0 a 3 - Microbiota normal
- b) 4 a 6 - Microbiota intermediária
- c) ≥ 7 - Vaginose bacteriana

Outra amostra foi colhida de conteúdo vaginal acumulado em fundo de saco posterior com escova cytobrush e depositada em solução salina, sendo encaminhada em até 4h para realização de exame direto. Uma gota da suspensão obtida foi colocada em lâmina limpa e coberta por lamínula e examinada microscopicamente com aumento de 100x e 400x.

O diagnóstico de *Candida spp.* foi realizado através da identificação de morfotipos (blastocônídios e/ou pseudohifas/pseudomicélios) e de *Trichomonas vaginalis* por sua morfologia e pela motilidade característica no exame a fresco.

Medição do pH vaginal foi realizada aplicando fita medidora de pH (pH Fix 0-14, Macherey-Nagel®, Alemanha) no terço médio da parede lateral da vagina utilizando pinça de Cherron para direcionar a aplicação da fita, com verificação do pH vaginal através da comparação da cor obtida com o padrão do pH. O valor do pH vaginal foi considerado normal quando abaixo de 4,5.

4.6 Aspectos éticos

O projeto foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC) e teve aprovação em 07 de dezembro de 2017 (Parecer N° 2.423.554) (ANEXO). Todas as mulheres recrutadas para o estudo concordaram em participar da investigação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C), após tomar conhecimento da metodologia e dos objetivos, seguindo as determinações da Resolução N° 466/12 do Ministério da Saúde (MS) que trata das pesquisas científicas envolvendo seres humanos. Após a assinatura do TCLE, as pacientes responderam ao formulário padronizado.

4.7 Processamento e análise dos dados

Os dados coletados foram alimentados semanalmente no Google formulários, com formatação em planilha Excel. As variáveis categóricas foram expostas em frequência absoluta e relativa. De modo a investigar associações entre fatores de risco e doença, foram aplicados os testes qui-quadrado de Pearson, teste exato de Fisher (nos casos onde a frequência esperada foi menor que 5 em pelo menos 25% das células da tabela cruzada) e correlação Gama (quando as duas variáveis são ordinais). Variáveis quantitativas foram apresentadas em termos de média, mediana e desvio padrão, sendo a idade da primeira relação sexual o único atributo avaliado em associação com outros, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Adotou-se um nível

de significância de 5% (valores de $p < 0.05$ são considerados estatisticamente significantes). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 22.0 (USA).

5 RESULTADOS

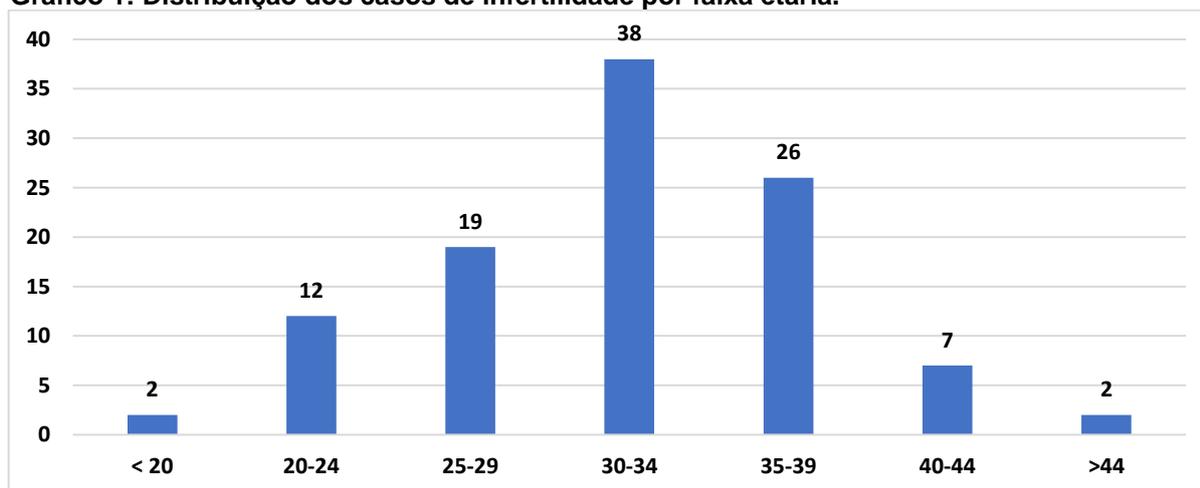
Foram incluídas no estudo 107 mulheres com infertilidade primária ou secundária atendidas em ambulatório durante o período de fevereiro a dezembro de 2018.

Os resultados foram subdivididos em tópicos para melhor compreensão dos achados e análise dos dados.

5.1 Características sociodemográficas

A média de idade das pacientes foi de $31,79 \pm 5,84$ anos, variando de um mínimo de 18 anos a um máximo de 45 anos. O Gráfico 1 representa a distribuição dos casos por faixa de idade.

Gráfico 1: Distribuição dos casos de infertilidade por faixa etária.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação ao estado civil, sessenta e quatro mulheres incluídas eram casadas (59,8%) e 40 viviam em união estável com seus parceiros (37,4%). Duas mulheres eram separadas (1,9%) e uma solteira (0,9%), sendo nestes últimos casos acompanhadas por história de infertilidade prévia.

Quanto ao nível de escolaridade, predominaram mulheres com ensino médio completo, representando 51,4% (55/107) das pacientes avaliadas. Dezoito (16,8%) mulheres têm ensino superior completo, seis (5,6%) com ensino superior incompleto, dezesseis (15%) ensino médio incompleto, sete (6,5%) com ensino fundamental completo e quatro (3,7%) com ensino fundamental incompleto. Apenas uma (0,9%) paciente avaliada tem pós-graduação (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição de pacientes por nível de escolaridade.

Nível de Escolaridade	Nº de pacientes	Frequência (%)
Ensino Fundamental Incompleto	4	3,7
Ensino Fundamental Completo	7	6,5
Ensino Médio Incompleto	16	15,0
Ensino Médio Completo	55	51,4
Ensino Superior Incompleto	6	15,0
Ensino Superior Completo	18	16,8
Pós-Graduação	1	0,9
Total	107	100

Fonte: Elaborado pela autora.

A maioria das mulheres incluídas no estudo apresentaram renda familiar entre 1 a 3 salários mínimos, representando um total de 68,2% (73/107) das pacientes avaliadas. Vinte e quatro (22,4%) com renda familiar menor que um salário mínimo, oito (8,2%) entre 3 e 5 salários mínimos e apenas uma (1%), acima de 5 salários mínimos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição de pacientes por renda familiar

Renda Familiar	Nº de pacientes	Frequência (%)
Até 1 salário mínimo	24	22,4
De 1 a 3 salários mínimos	73	68,2
De 1 a 3 salários mínimos	8	8,2
Acima de 5 salários mínimos	2	1
Total	107	100

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Antecedentes ginecológicos e obstétricos

Sessenta e seis (61,7%) mulheres incluídas no estudo apresentaram diagnóstico de infertilidade primária, ou seja, nunca engravidaram previamente, enquanto 41 (38,3%) tinham relato de gestação prévia (infertilidade secundária).

Cerca de 51,4% (55/107) das mulheres incluídas no estudo tentavam engravidar há mais de três anos, 16,8% (18/107) tentavam por um período entre 2 e 3 anos, 26,2% (28/107) entre 1 e 2 anos e apenas 5,6% (6/107) tentavam há menos de um ano.

Não houve associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e o tipo de infertilidade primária ou secundária, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Associação entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e tipos de infertilidade.

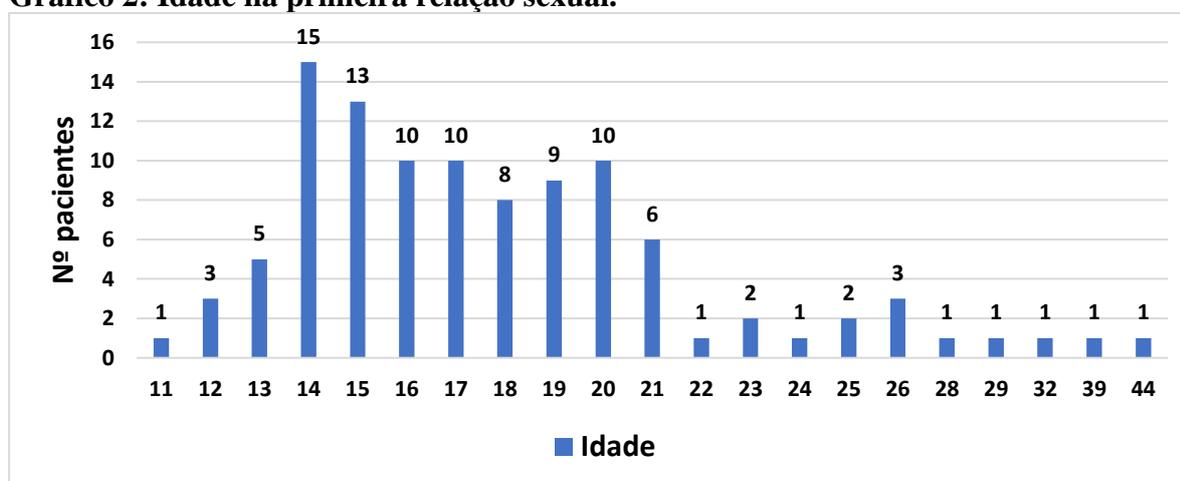
Diagnóstico de VB pelo escore de Nugent (≥ 7)	Tipos de Infertilidade		<i>p</i> *
	Primária	Secundária	
Sim	43,9%	39,0%	0,617
Não	56,1%	61,0%	0,197

*Teste do Qui quadrado de Pearson

Fonte: Elaborado pela autora.

A média de idade da primeira relação sexual foi de $17,86 \pm 4,07$ anos, com idade mínima de 11 anos e máxima de 44 anos, conforme o Gráfico 2.

Gráfico 2: Idade na primeira relação sexual.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação ao número de parceiros sexuais, 36,2% (38/105) das mulheres relataram ter apenas um parceiro sexual durante a vida, 15,2% (16/105) referiram dois parceiros e 48,6% (51/105) mulheres tiveram três ou mais parceiros. Em dois casos esta informação não foi registrada.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a idade na primeira relação sexual e os tipos de microbiota vaginal (Tabela 5) nem entre o número de parceiros sexuais e os tipos de microbiota vaginal (Tabela 6).

Tabela 5: Associação entre idade na primeira relação sexual e tipos de microbiota vaginal.

Escore de Nugent	n	Idade da primeira relação sexual		<i>p</i> *
		Mediana		
0-3	28	16		0,442
4-6	31	18		
7-10	45	17		

*Teste não paramétrico de Kruskal- Wallis. O teste paramétrico foi descartado devido à idade da primeira relação sexual não estar normalmente distribuída (p-valor do teste de Shapiro-Wilk $< 0,001$).

Tabela 6: Associação entre número de parceiros sexuais e tipos de microbiota vaginal.

Escore de Nugent	n	Nº de parceiros sexuais			Correlação (γ)	p*
		1	2	3 ou mais		
0-3 (normal)	28	53,6%	10,7%	35,7%	0,258	0,062
4-6 (intermediária)	32	31,3%	18,8%	50,0%		
7-10 (VB)	45	28,9%	15,6%	55,6%		
Total	105	36,2%	15,2%	48,6%		

* Correlação Gama (ordinal por ordinal)

Fonte: Elaborado pela autora.

A maioria (87,9%) das mulheres com infertilidade incluídas no estudo, não apresentava história prévia conhecida de IST. Apenas 13 pacientes (12,1%) relataram alguma IST prévia, sendo quatro destas com história de condiloma vulvar, quatro com história de infecção por HPV em colo uterino, uma com história de achado clínico de condiloma em cavidade oral, duas com diagnóstico clínico de herpes genital, uma com história de sífilis prévia e uma mesma paciente com história de sífilis, condiloma vulvar e HPV de alto risco em colo uterino (diagnosticado por citologia oncológica). Os resultados encontram-se descritos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Frequência de infecções sexualmente transmissíveis (IST) prévias.

História de IST	Frequência (Nº pacientes)	Porcentagem (%)
Não	94	87,9
Sim	13	12,1
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8: Distribuição de IST na amostra populacional avaliada.

IST prévia	Frequência (Nº pacientes)	Porcentagem (%)
Nenhuma	94	87,9
Condiloma genital	4	3,7
Herpes genital	2	1,9
HPV (colo uterino)	4	3,7
Condiloma oral	1	0,9
Sífilis	1	0,9
Sífilis, condiloma, HPV (NICII/III)	1	0,9
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre história de IST prévia e tipos de microbiota vaginal (Tabela 9).

Tabela 9: Análise da associação entre história de IST e tipos de microbiota vaginal.

Escore de Nugent	n	IST prévia		p*
		não	sim	
0-3 (normal)	28	92,9%	7,1%	0,702
4-6 (intermediária)	34	85,3%	14,7%	
7-10 (VB)	39	86,7%	13,3%	
Total	107	36,2%	15,2%	

* Teste Exato de Fisher

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Sintomas e achados clínicos

Com relação aos sintomas clínicos, vinte e oito (26,2%) pacientes tinham queixas de corrimento vaginal e 79 (73,8%) eram assintomáticas no momento da investigação.

Quanto aos achados clínicos ao exame especular, 79,4% (85/107) apresentavam conteúdo vaginal fisiológico, 14% (15/107) tinham corrimento vaginal com odor fétido, 15% (16/107) apresentavam conteúdo vaginal fino e homogêneo, e 3,7% (4/107) com corrimento vaginal branco e grumoso (Tabela 10).

Tabela 10: Aspecto do conteúdo vaginal ao exame especular.

Conteúdo vaginal fisiológico	Nº pacientes	Porcentagem (%)
Não	22	20,6
Sim	85	79,4
Total	107	100,0
Corrimento vaginal com odor fétido		
Não	92	86,0
Sim	15	14,0
Total	107	100,0
Corrimento vaginal fino e homogêneo		
Não	91	85,0
Sim	16	15,0
Total	107	100,0
Corrimento vaginal espesso e grumoso		
Não	103	96,3
Sim	4	3,7
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Não houve associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e queixas de corrimento vaginal, porém observou-se associação significativa de VB com os achados no exame especular de corrimento vaginal fino e homogêneo e corrimento vaginal com odor fétido, conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11: Análise da associação entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e queixas de corrimento vaginal e achados no exame especular.

Variável	VB Nugent (≥ 7)		<i>p</i> *
	não (n = 62)	sim (n = 45)	
Queixas de corrimento vaginal?			
não	74,2%	73,3%	0,920
sim	25,8%	26,7%	
Exame especular [fino e homogêneo]			
não	96,8%	68,9%	<0,001
sim	3,2%	31,1%	
Exame especular [odor fétido]			
não	95,2%	73,3%	<0,001
sim	4,8%	26,7%	

* Teste Qui-quadrado de Pearson

Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se uma associação positiva estatisticamente significativa entre a presença de conteúdo vaginal fisiológico ao exame especular e a presença de lactobacilos na bacterioscopia por coloração de Gram. A presença de morfotipos de lactobacilos nos esfregaços do conteúdo vaginal de pacientes com corrimento vaginal com odor fétido ou fino e homogêneo no exame especular, foi significativamente menor. Não houve associação entre a presença de lactobacilos e o achado de corrimento vaginal espesso e grumoso ao exame especular das pacientes avaliadas (Tabela 12).

Tabela 12: Análise da associação entre a presença de lactobacilos (Gram) e achados do conteúdo vaginal ao exame especular.

Exame especular	Morfotipos (lactobacilos)		<i>p</i> *
	sim (n = 56)	não (n = 51)	
Fisiológico	55 (94,6)	32 (62,7)	<0,001 ^c
Odor fétido	2 (3,6)	13 (25,5)	0,001 ^c
Fino e homogêneo	2 (3,6)	14 (27,5)	0,001 ^d
Espesso e grumoso	1 (1,8)	3 (5,9)	0,346 ^d

Dados expostos em n (%)

c: Teste Quiquadrado de Pearson; d: Teste exato de Fisher

Fonte: Elaborado pela autora.

Cinquenta e seis pacientes (52,3%) apresentaram pH do conteúdo vaginal igual a 4; trinta e sete (34,6%) pacientes com pH igual a 5 e quatorze pacientes (13,1%) tinham pH do conteúdo vaginal igual a 6 (Tabela 13).

Tabela 13: Distribuição dos valores de pH na amostra populacional estudada.

pH	Frequência (Nº pacientes)	Porcentagem (%)
4,0	56	52,3
5,0	37	34,6
6,0	14	13,1
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Em 73,3% das pacientes com diagnóstico de VB por escore de Nugent na amostra estudada, o pH vaginal foi maior que 4,0 (tabela 14).

Tabela 14: Associação do diagnóstico de VB por escore de Nugent e valores de pH

Variável	Diagnóstico de VB por Nugent (≥ 7)		<i>p</i>*
	não (n = 62)	sim (n = 45)	
pH > 4,0			
não	74,2%	26,7%	<0,001
sim	25,8%	73,3%	

*Teste Qui-quadrado de Pearson

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4. Prevalência de vaginose bacteriana e tipos de microbiota vaginal

A prevalência de vaginose bacteriana diagnosticada através do escore de Nugent na amostra estudada foi de 42,1% (45/107) (Tabela 15).

Tabela 15: Prevalência de VB pelo escore de Nugent.

Diagnóstico de VB pelo Escore de Nugent (≥ 7)	Nº pacientes	Prevalência (%)
não	62	57,9
sim	45	42,1
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Cerca de 26,2% (28/107) das mulheres com infertilidade avaliadas apresentaram microbiota vaginal normal (escore de Nugent 0 a 3); enquanto microbiota intermediária foi

observada em 31,8% (34/107) das pacientes. A Tabela 16 mostra a distribuição dos tipos de microbiota vaginal observada no estudo.

Tabela 16: Distribuição das prevalências dos tipos de microbiota vaginal.

Tipos de Microbiota Vaginal	Nº pacientes	Prevalência (%)
0-3 (normal)	28	26,2
Escore de Nugent 4-6 (intermediária)	34	31,8
7-10 (VB)	45	42,1
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5. Prevalência de *Candida sp* e *Trichomonas vaginalis*

A prevalência de *Candida sp* entre as mulheres avaliadas foi de 24,3% (26/107), enquanto de *Trichomonas vaginalis* foi de 1,9% (2/107) no exame a fresco (Tabela 17).

Tabela 17: Prevalência de *Candida sp* e *Trichomonas vaginalis* no exame a fresco.

Exame a fresco (<i>Candida sp</i>)	Nº pacientes	Prevalência (%)
não	81	75,7
sim	26	24,3
Total	107	100,0
Exame a fresco (<i>Trichomonas vaginalis</i>)		
não	105	98,1
sim	2	1,9
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6. Prevalência de sífilis, hepatites B e C e HIV

Foi encontrada uma prevalência de 4,7% (5/107) pacientes com teste rápido reagente para sífilis (Tabela 18). Não houve casos positivos de Hepatites B e C e HIV na amostra populacional avaliada.

Tabela 18: Prevalência de pacientes com testes rápidos reagentes para sífilis

Sífilis	Nº pacientes	Prevalência (%)
Reagente	5	4,7
Não reagente	102	95,3
Total	107	100,0

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Ao longo da segunda década do novo milênio, a infertilidade permanece como um problema de proporções globais, estimando-se que acometa mundialmente entre 8 a 12% dos casais em idade reprodutiva (INHORN *et al.*, 2015).

Em algumas regiões do mundo, no entanto, notadamente em áreas com menores recursos, as taxas de infertilidade são mais elevadas atingindo valores de até 30% em algumas populações (TSEVAT *et al.*, 2017; VANDER BORGHT *et al.*, 2018).

Apesar do reconhecimento da infertilidade como um problema de saúde pública, existem lacunas nas pesquisas e no desenvolvimento de políticas de prevenção, detecção e manejo da infertilidade. Uma abordagem mais ampla é necessária, incluindo vigilância e monitorização para explorar e compreender melhor os fatores de risco preveníveis e as disparidades no acesso aos cuidados e ao tratamento (CRAWFORD *et al.*, 2017).

Desta forma, as pesquisas que envolvem investigação das associações entre possíveis fatores causais ou de risco para infertilidade possuem, potencialmente, relevante impacto na saúde coletiva.

O presente estudo avaliou mulheres atendidas ambulatorialmente em serviço terciário de infertilidade de hospital-escola (Maternidade-Escola Assis Chateaubriand) do sistema público de saúde na cidade de Fortaleza-Ceará, possibilitando a formação de um banco de dados com características sociodemográficas, história ginecológica e obstétrica, bem como achados clínicos e laboratoriais específicos para esta população.

As mulheres incluídas no estudo apresentavam idade compreendida entre 18 e 45 anos, eram casadas em sua maioria (59,8%), possuíam predominantemente ensino médio completo (51,4%) e renda familiar menor que 3 salários mínimos em 90,6% dos casos, sugerindo a associação entre menor poder aquisitivo e infertilidade já observada em alguns estudos (INHORN *et al.*, 2015; VANDER BORGHT *et al.*, 2018).

A maioria das pacientes (61,7%) avaliadas foi classificada como possuindo infertilidade primária, sendo que cerca de 51,4% tentavam engravidar há mais de 3 anos.

Dados da literatura descrevem a infertilidade secundária como o tipo mais prevalente de infertilidade feminina no mundo, principalmente em regiões com altas taxas de abortamento inseguro e com precária assistência ao pré-natal e ao parto, levando a infecções pós-abortivas e pós-parto (VANDER BORGHT *et al.*, 2018).

Estudo transversal realizado na Nigéria, baseado em informações padronizadas disponíveis em dados de inquéritos demográficos e de pesquisa em saúde, rotineiramente

aplicados entre os países de renda baixa a média, estimou a prevalência de infertilidade entre 7063 mulheres em idade reprodutiva. A porcentagem estimada de mulheres inférteis foi de 31,1% (95% IC: 27,9-34,7%), consistente com outros estudos menores do mesmo país. A prevalência de infertilidade primária (17,4%, 95% IC: 12,9-23,8%) foi substancialmente inferior à infertilidade secundária (34,1%, 95% IC: 30,3-39,3%) nesta população (POLIS *et al.*, 2017).

Desta forma, o achado de maior prevalência de infertilidade primária na presente pesquisa suscita duas possibilidades a serem consideradas: ou a infertilidade primária predomina na população avaliada, podendo refletir indiretamente avanços locais nos cuidados obstétricos; ou mulheres com infertilidade primária procuram mais assistência médica especializada em relação àquelas com infertilidade secundária na população de estudo.

A média de idade da primeira relação sexual no estudo foi de 17,86 ($\pm 4,07$) anos, sendo que 34,58% das mulheres investigadas iniciaram a atividade sexual com 15 anos ou menos e 48,6% referiram 3 ou mais parceiros durante a vida.

O início precoce da atividade sexual e o número de parceiros sexuais têm associação estabelecida com o risco aumentado para aquisição de IST (FALASINNU *et al.*, 2015), assim como há evidências da associação entre IST e infertilidade (TSEVAT *et al.*, 2017). O papel da microbiota vaginal na fertilidade, no entanto, ainda não está bem claro.

No presente estudo, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a idade de início da atividade sexual e o tipo de microbiota vaginal ($p=0,442$). Com relação ao número de parceiros sexuais, observou-se uma tendência de associação com o tipo de microbiota vaginal, porém também não estatisticamente significativa ($p=0,062$).

A maioria das mulheres incluídas no estudo (87,9%) relataram não ter história conhecida de IST prévia, não tendo sido observada associação estatisticamente significativa entre história de IST e tipos de microbiota vaginal ($p=0,702$). Tal resultado pode ser atribuído ao fato de muitas das IST virais e não virais serem assintomáticas e de que não há rotina instituída nem disponibilidade de tecnologia diagnóstica específica para a triagem das IST (tais como, métodos de biologia molecular para investigação de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*) nos serviços públicos de saúde do nosso Estado.

A análise dos resultados observou associação estatisticamente significativa entre o conteúdo vaginal fisiológico ao exame especular e a presença de morfotipos de lactobacilos na bacterioscopia por coloração de Gram ($p < 0,001$). A presença de lactobacilos nos esfregaços do conteúdo vaginal de pacientes com conteúdo vaginal com odor fétido ou fino e homogêneo ao exame especular, foi significativamente menor ($p=0,001$). Os dados corroboram os achados

da literatura de que a predominância de lactobacilos na microbiota vaginal constitui importante parâmetro a ser considerado para a avaliação do estado de saúde do trato urogenital feminino e que o ambiente vaginal saudável tem micropopulações menos diversas em sua composição em relação ao microbioma de outras áreas do corpo humano (VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014; KROON *et al.*, 2018). Não houve associação entre a presença de lactobacilos e o achado de corrimento vaginal espesso e grumoso ao exame especular das pacientes incluídas ($p=0,346$).

Casari *et al.* (2010) realizaram estudo que teve como objetivo estabelecer as diferentes prevalências de diferentes microrganismos em dois grupos considerados: mulheres férteis com sintomas e mulheres assintomáticas com infertilidade. Observaram uma associação entre a presença de *Gardnerella vaginalis* ($p<0,001$), *Streptococcus agalactiae* ($p<0,001$), *Ureaplasma urealyticum* ($p=0,001$) e a diminuição do número de lactobacilos. No entanto, esta associação não foi observada para *Candida sp.* ($p=0,822$), *Trichomonas vaginalis* ($p=0,124$) e *Chlamydia trachomatis* ($p=0,789$).

Recente estudo de corte transversal comparou a microbiota vaginal e analisou a incidência de vaginose bacteriana assintomática, avaliada por escore de Nugent, entre mulheres saudáveis e mulheres com infertilidade. O estudo observou uma diminuição relativa de *Lactobacillus* na microbiota vaginal das mulheres inférteis comparadas às férteis. Bactérias associadas à vaginose bacteriana foram significativamente mais prevalentes na vagina de mulheres com diagnóstico de infertilidade, sendo mais comuns entre pacientes com infertilidade primária quando comparadas com infertilidade secundária. A VB assintomática foi significativamente mais frequente entre mulheres inférteis ($p \leq 0,05$) (BABU *et al.*, 2017).

Nossos achados, no entanto, não observaram associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e o tipo de infertilidade (primária ou secundária). Por outro lado, a maioria das pacientes com VB (73,3%) diagnosticada pelo escore de Nugent, não referiam sintomas de corrimento vaginal, podendo sugerir a prevalência aumentada de VB assintomática entre mulheres inférteis descrita por Babu *et al* (2017).

A abordagem metagenômica permitiu a descoberta de novas espécies bacterianas, anteriormente não identificadas, possibilitando melhor caracterização do microbioma vaginal e sua relação com o estado saudável ou patológico do trato reprodutivo feminino. As técnicas de biologia molecular estão se tornando cada vez mais acessíveis e surgem como uma importante ferramenta para esclarecer os questionamentos relacionadas à etiologia e patogênese da disbiose.

Por outro lado, o escore de Nugent permanece como um método confiável para diagnóstico de VB por sua alta sensibilidade e especificidade. Haahr *et al.* (2016) avaliaram a

performance diagnóstica dos testes de PCR comparados com escore de Nugent para microbiota vaginal anormal. A prevalência de VB pelo escore de Nugent foi de 21% (27/130), enquanto a prevalência de microbiota vaginal anormal definida por PCR foi 28% (36/130) com altas concentrações de *Gardnerella vaginalis* e/ou *Atopobium vaginae*. A abordagem por PCR teve sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 93% e 93% para VB definida por escore de Nugent, sugerindo uma elevada correlação entre a prevalência de VB por Nugent e PCR (HAAHR *et al.*, 2016).

Desta forma, em muitos serviços públicos de saúde onde as técnicas de biologia molecular ainda não estão disponíveis, o escore de Nugent constitui o método de escolha para diagnóstico de VB. Em nossa pesquisa, utilizamos este escore para a investigação da prevalência de VB e determinação dos tipos de microbiota vaginal entre as pacientes com infertilidade.

Van de Wijgert *et al.* (2014) demonstraram conclusivamente que a microbiota vaginal dominada por lactobacilos está associada a um microambiente vaginal saudável e que a VB representa uma disbiose, cuja extensão se correlaciona bem com o escore de Nugent e o pH vaginal, mas não tanto com os outros critérios de Amsel. Nossos achados também observaram associação positiva estatisticamente significativa entre diagnóstico de VB por escore de Nugent e pH vaginal acima de 4,5 ($p < 0,001$).

Estudos sugerem que a vaginose bacteriana e a microbiota vaginal anormal são significativamente mais comuns em mulheres com infertilidade em comparação com mulheres férteis (VAN OOSTRUM *et al.*, 2013; SALAH *et al.*, 2013; DURUGBO *et al.*, 2015). No entanto, embora os autores reconheçam a associação entre microbiota anormal e infertilidade, a relação entre causa e efeito permanece desconhecida.

Durugbo *et al.* (2015) compararam a prevalência de VB, diagnosticada pelos critérios de Amsel, entre pacientes com infertilidade por fator tubário e mulheres férteis. Vaginose bacteriana foi observada em 28,1% (50/178) das mulheres com infertilidade tubária, comparadas com 7,9% (14/178) das mulheres férteis ($p < 0,001$). O mesmo estudo observou que pacientes com infertilidade apresentaram maior risco de vaginose bacteriana, quando pertenciam a um nível socioeconômico menos favorecido (OR 11.89; 95% CI 5.20–27.69), utilizavam ducha vaginal (OR 19.15; 95% IC: 7.26–47.75) ou agentes que ressecam a vagina (OR 17.04; 95% IC: 6.91–43.24), iniciavam atividade sexual mais precocemente (OR 32.08; 95% IC: 12.02–88.89), ou tinham história de doenças de transmissão sexual (OR 12.42; 95% IC: 5.36–29.35), sugerindo a influência de fatores sociodemográficos e comportamentais na microbiota vaginal.

Em revisão sistemática com metanálise, Van Oostrum *et al.* (2013) objetivaram identificar estudos que avaliaram a prevalência de VB, diagnosticada através do escore de Nugent, em pacientes com infertilidade. Foram selecionados doze estudos, envolvendo um total de 3189 pacientes. A prevalência de VB entre mulheres inférteis foi estimada em 19 % (95% IC: 14-25%). Microbiota vaginal anormal, incluindo VB e microbiota intermediária (escore de Nugent de 4-10), ocorreu em 39% de pacientes com infertilidade (95% IC: 26-52%) (VAN OOSTRUM *et al.*, 2013).

A prevalência de VB avaliada por escore de Nugent entre mulheres atendidas no ambulatório de Infertilidade da MEAC foi de 42,1 %, enquanto microbiota intermediária foi observada em 31,8% dos casos, sendo a microbiota vaginal anormal (vaginose bacteriana e microbiota intermediária) representada pela expressiva prevalência de 73,9 % dos casos.

Desta forma, nossos resultados sugeriram uma prevalência mais elevada de VB em nossa população que a média da literatura internacional. Ainda não há estudos publicados, que avaliaram a prevalência de VB entre mulheres brasileiras inférteis.

Com relação às IST, cinco pacientes apresentaram testes rápidos reagentes para sífilis, sendo duas delas com diagnóstico e tratamento prévios, representando uma prevalência de 4,7% de casos na amostra avaliada, significativamente maior que a prevalência global estimada de 0,5% em mulheres descrita em boletim da WHO publicado em 2019 (ROWLEY *et al.*, 2019).

As testagens rápidas para hepatites B e C e HIV foram negativas para todas as pacientes incluídas, não permitindo a análise de uma associação estatística dos dados.

A prevalência de *Candida sp* em nossa amostra de mulheres com infertilidade foi de 24,3%, semelhante a prevalência de 20% estimada na população geral de mulheres (CDC, 2019).

Em nossa população, 1,9% das pacientes apresentaram *Trichomonas vaginalis* no exame a fresco, significativamente menor que a prevalência mundial estimada de 5,3% (ROWLEY *et al.*, 2019).

Por se tratar de uma pesquisa que abordou mulheres acompanhadas em ambulatório de infertilidade, podemos relatar como limitação, o número expressivo de pacientes excluídas, devido ao fato de estarem utilizando indutores de ovulação ou hormônios, como parte da terapêutica da infertilidade, ou por terem relato de atividade sexual em até 48h do dia da entrevista, com o intuito de obter uma gravidez. Soma-se ainda, os casos de pacientes excluídas por estarem menstruadas no dia da consulta e daquelas que obtiveram uma gestação clínica durante o seguimento e retornaram com teste de gravidez positivo.

Outra limitação do estudo se deve ao fato de não termos adotado um grupo controle de mulheres férteis com características semelhantes às da população de pacientes inférteis estudadas, para que fosse possível estabelecer uma comparação entre as taxas de prevalência das diferentes variáveis analisadas. Tal fato é devido à dificuldade de recrutar pacientes ambulatoriais férteis e, simultaneamente, sem queixas ou patologias ginecológicas que pudessem interferir na análise dos resultados, em um hospital terciário de referência em ginecologia e obstetrícia, como é o caso da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand. Objetivamos realizar estudo complementar posterior, com grupo controle bem selecionado, para a obtenção de tais dados.

Em resumo, os estudos sugerem que vaginose bacteriana e microbiota vaginal anormal são significativamente mais prevalentes em mulheres com infertilidade em comparação com pacientes férteis e que o ambiente vaginal saudável tem menor diversidade microbiana.

Vale ressaltar ainda o fato de que a VB tem uma alta tendência a recorrer e, portanto, VB incidente pode servir como um marcador de disbiose prévia, constituindo também um fator de risco para aquisição de IST (BROTMAN, 2011).

Recente estudo prospectivo objetivou avaliar o valor prognóstico dos testes diagnósticos para VB na previsão da recorrência e observou que o escore de Nugent apresentou valor preditivo positivo de 93%, mas valor preditivo negativo ruim (57%) quando realizado logo após tratamento com metronidazol oral (SOBEL et al., 2019).

Diante do exposto, os recursos para o diagnóstico de microbiota anormal e as intervenções destinadas a restaurar e manter um microbioma vaginal dominado por lactobacilos devem ser considerados na abordagem clínica e terapêutica de pacientes com infertilidade, sejam sintomáticas ou não.

Estudos posteriores procurando estabelecer uma relação causa e efeito entre alterações da microbiota vaginal e infertilidade são necessários.

Assim, se uma correlação negativa entre a microbiota vaginal anormal e resultados reprodutivos for corroborada, será possível considerar o rastreio e subsequente tratamento de mulheres inférteis com VB, sintomáticas ou assintomáticas, durante a abordagem e terapêutica da infertilidade, inclusive para o perfil de pacientes avaliadas em nossa população de estudo.

7 CONCLUSÃO

Na amostra populacional estudada de mulheres atendidas no ambulatório de infertilidade da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC), durante o período de fevereiro a dezembro de 2018, a prevalência de sífilis foi de 4,7%. Não houve casos positivos para hepatites virais B e C nem para HIV.

A prevalência de vaginose bacteriana diagnosticada através do escore de Nugent foi de 42,1%, enquanto a microbiota vaginal foi normal 26,2% das pacientes avaliadas e intermediária em 31,8% dos casos.

Através de avaliação pelo exame a fresco do conteúdo vaginal, as prevalências de *Candida sp* e *Trichomonas vaginalis* em nossa amostra foram 24,3% e 1,9%, respectivamente.

Observou-se associação estatisticamente significativa de VB com os achados no exame especular de corrimento vaginal fino e homogêneo e corrimento vaginal com odor fétido, bem como com valores de pH acima de 4,5. Não houve associação entre o diagnóstico de VB por escore de Nugent e queixas de corrimento vaginal.

Associação positiva estatisticamente significativa também foi observada entre a presença de conteúdo vaginal fisiológico ao exame especular e a presença de lactobacilos na bacterioscopia por coloração de Gram.

Quanto ao perfil sociodemográfico, a amostra populacional avaliada tinha uma faixa etária de 18 a 45 anos, nível de escolaridade predominantemente com ensino médio completo (51,4%) e renda familiar de 1 a 3 salários mínimos em 68,2% dos casos.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a idade na primeira relação sexual e os tipos de microbiota vaginal nem entre o número de parceiros sexuais e os tipos de microbiota vaginal.

As prevalências de vaginose bacteriana e microbiota intermediária entre mulheres atendidas no ambulatório de infertilidade da MEAC foram mais elevadas do que a média observada na literatura internacional descrita.

A prevalência de *Candida sp.*, foi semelhante aos achados da literatura internacional.

A prevalência de sífilis foi mais elevada na amostra avaliada que na população geral de mulheres, enquanto de tricomoníase foi menor comparada aos dados da literatura descrita.

A ausência de casos positivos de HIV e hepatites virais B e C na amostra populacional avaliada, não permitiu inferências estatísticas.

REFERÊNCIAS

- AMSEL, R. *et al.* Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **Am J Med**, vol. 74, n. 1, p. 14-22, Jan 1983.
- BABU, G. *et al.* Comparative Study on the Vaginal Flora and Incidence of Asymptomatic Vaginosis Among Healthy Women and in Women with Infertility Problems of Reproductive Age. **J Clin Diagn Res**, vol. 11, n. 8, p. DC18-DC22, Aug 2017.
- BAGNALL, P.; RIZZOLO, D. Bacterial vaginosis: A practical review. **JAAPA**, vol. 30, n.12, p. 15-21, Dec 2017.
- BEGHINI, J. *et al.* Vaginal Inflammation: Association Between Leukocyte Concentration and Levels of Immune Mediators. **Am J Reprod Immunol**, vol. 75, n. 2, p. 126-133, 2016.
- BROTMAN, R.M., *et al.* Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. **J Infect Dis**. vol. 202, n. 12, p.1907–1915, 2010.
- BROTMAN, R.M. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. **J Clin Invest**, vol. 121, n. 12, p. 4610-4617, Dec 2011.
- CASARI, E. *et al.* *Gardnerella*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. **New Microbiol**, vol. 33, p. 69-76, 2010.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/intro.htm> Acesso em: 14 mar.19.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html> Acesso em: 31 jul.19.
- CRAWFORD, S. *et al.* Risks Factors and Treatment Use Related to Infertility and Impaired Fecundity Among Reproductive-Aged Women. **J Womens Health (Larchmt)**, vol. 26, n. 5, p. 500–510, May 2017.
- DIAHV. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e Hepatites Virais, 2017. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-ist>. Acesso em: 14 set.2018.
- DIAHV. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e Hepatites Virais, 2017 Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/profissionais-de-saude/testes-rapido> Acesso em: 14 set.2018.
- DURUGBO, I.I. *et al.* Bacterial vaginosis among women with tubal factor infertility in Nigeria. **Int J of Gynaecol and Obstet**, vol. 131, p. 133-136, 2015.

- EL-SHAZLY, A.M. *et al.* A study on Trichomoniasis vaginalis and female infertility. **J Egypt Soc Parasitol**, vol. 31, n. 2, p. 545-553, Aug 2001.
- ENGLERT, Y. *et al.* Impaired ovarian stimulation during in vitro fertilization in women who are seropositive for hepatitis C virus and seronegative for human immunodeficiency virus. **Fertil Steril**, vol. 88, n. 3, p. 607-611, 2007.
- FALASINNU, T. *et al.* Predictors identifying those at increased risk for STDs: a theory-guided review of empirical literature and clinical guidelines. **Int J STD AIDS**, vol. 26, n.12, p. 839-851, Oct 2015.
- FARQUHAR, C.; MARJORIBANKS, J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. **Cochrane Database Syst Rev**, vol. 8, p. CD010537, Aug 2018.
- FRANASIAK, J.M.; SCOTT, R.T. Introduction: Microbiome in human reproduction. **Fertil Steril**, vol. 104, n. 6, p. 1341-1343, 2015.
- GARCIA-VELASCO, J.A; MENABRITO, M.; CATALÁN, I.B. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. **Reprod Biomed Online**, vol. 35, n. 1, p. 103-112, 2017.
- GEMMILL, A.; BRADLEY, S.E.K; VAN DER POEL, S. Reduced fecundity in HIV-positive women. **Hum Reprod**, vol. 33, n. 6, p. 1158-1166, Jun 2018.
- GIRALDO, P.C.; GONÇALVES, A.K.; ELEUTÉRIO JR, J. Secretory Immunoglobulin A: A Protective Factor in the Genital Mucosa. **Braz J Infec Dis**, vol. 10, n. 4, p. 232-234, 2006.
- GOTTILIEB, S.L. *et al.* Sexually transmitted infections and women's sexual and reproductive health. **Int J Obstet Gynecol**, vol. 123, p. 183-84, 2013.
- GRASPEUNTNER, S. *et al.* Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the diagnosis of infectious infertility. **PLoS One**, vol. 13, n. 1, p. e0191047, 2018.
- GREEN, K.A.; ZAREK, S.M.; CATHERINO, W.H. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. **Fertil Steril**, vol. 104, p. 1351-57, 2015.
- HAAHR, T. *et al.* Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: A prospective study in IVF patients. **Hum Reprod**, vol. 31, n. 4, p. 795-803, 2016.
- HART, R.J. Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics. **Physiol Rev**, vol. 96, p. 873-909, 2016.
- INHORN, M.; PATRIZIO, P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movement in the 21st century. **Hum Reprod Update**, vol. 21, p. 411-426, 2015.
- KROON, S.J.; RAVEL, J.; HUSTON, W.M. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. **Fertil Steril**, vol. 110, n. 3, p. 327-336, 2018.

- LAO, T.T.; MAK, J.S.M.; Li, T.C. Hepatitis B virus infection status and infertility causes infertilidade couples seeking fertility treatment- Indicator of impaired immune response? **Am J Reprod Immunol**, vol. 77, n. 4, p. e12636, 2017.
- LEWIS, F.M.; BERNSTEIN, K.T.; ARAL, S.O. Vaginal microbiome and its relationship to behavior, sexual health, and sexually transmitted diseases. **Obstet Gynecol**, vol. 129, n. 4, p. 643-654, 2017.
- LINHARES, I.M.; GIRALDO, P.C.; BARACAT, E.C. New findings about bacterial flora. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, vol. 56, n. 3, p. 370-374, 2010.
- MANIA-PRAMANIK, J.; KERKAR, S.C.; SALVI, V.S. Bacterial vaginosis: a cause of infertility? **Int J STD AIDS**, vol. 11, p. 778-781, 2009.
- MASTROMARINO, P. *et al.* Biological control of vaginosis to improve reproductive health. **Indian J Med Res**, vol. 140, n. Suppl 1, p. S91-S97, 2014.
- MIELCZAREK, E.; BLASZKOWSKA, J. Trichomonas vaginalis: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, vol. 44, n. 4, p. 447-458, 2016.
- MOR, A.; DRIGGERS, P.H.; SEGARS, J.H. Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. **Fertil Steril**, vol. 104, n. 6, p. 1344-1350, 2015.
- MUTHUSAMY, S. *et al.* Evaluation of interobserver reliability of Nugent score for diagnosis of bacterial vaginosis. **Indian J Sex Transm Dis AIDS**, vol. 39, n. 2, p. 120-123, 2018.
- NARDIS, C.; MOSCA, L.; MASTROMARINO, P. Vaginal microbiota and viral sexually transmitted diseases. **Ann Ig**, vol. 25, n. 5, p. 443-456, 2013.
- NDOWA, F.; LUSTI-NARASIMHAN, M. The threat of untreatable gonorrhoea: implications and consequences for reproductive and sexual morbidity. **Reprod Health Matters**, vol. 20, n. 40, p. 76-82, Dec 2012.
- NUGENT, R.P.; KROHN, M.A.; HILLIER, S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **J Clin Microbiol**, vol. 29, n. 2, p. 297-301, 1991.
- OLALEYE, O.; OLAMIJULO, J.A. The value of chlamydial antibody level for predicting tubal blockage among women undergoing hysterosalpingography in Lagos, Nigeria. **Int J Gynaecol Obstet**, vol. 134, n.1, p. 33-36, Jul 2016.
- ONDERDONK, A.B.; DELANEY, M.L.; FICHOROVA, R.N. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. **Clin Microbiol Rev**, vol. 29, n. 2, p. 223-238, 2016.
- PFEIFER, S. *et al.* Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. **Fertil Steril**, vol. 103, n.6, p. e44-50, 2015.

- POLIS, C.B. *et al.* Estimating infertility prevalence in low-to-middle-income countries: an application of a current duration approach to Demographic and Health Survey data. **Hum Reprod**, vol. 32, n. 5, p. 1064-1074, May 2017.
- RAVEL, J. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 108, n. suppl 1, p. 4680-4687, 2011.
- ROWLEY, J. *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bull World Health Organ**, vol. 97, n. 8, p. 548–562P, Aug 2019.
- SALAH, R.M. *et al.* Bacterial vaginosis and infertility: cause or association? **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, vol. 167, n. 1, p. 59-63, 2013.
- SIROTA, I.; ZAREK, S.M.; SEGARS, J.H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. **Semin Reprod Med**, vol. 32, n. 1, p. 35-42, 2014.
- SMITH, S.B.; RAVEL, J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. **J Physiol**, vol. 595, n. 2, p. 451-463, 2017.
- SOBEL, J.D. *et al.* Prognostic indicators of recurrence of bacterial vaginosis. **J Clin Microbiol**, Mar 2019. doi: 10.1128/JCM.00227-19.
- SPIEGEL, C.A.; AMSEL, R.; HOLMES, K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. **J Clin Microbiol**, vol.18, n.1, p. 170-177, 1983.
- TSEVAT, D.G. *et al.* Sexually transmitted diseases and infertility. **Am J Obstet Gynecol**, vol. 216, n. 1, p. 1-9, 2017.
- VALENTI, P. *et al.* Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. **Front Immunol**, vol. 9, Article 376, Mar 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00376.
- VAN OOSTRUM, N.; DE SUTTER, P.; VERSTRAELEN, H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. **Hum Reprod**, vol. 28, n. 7, p. 1809-1815, 2013.
- VANDER BORGHT, M.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clin Biochem**, vol. 62, p. 2-10, 2018.
- VAN DE WIJGERT, J.H.H.M. *et al.* The Vaginal Microbiota: What have we learned after a decade of molecular characterization? **PLoS ONE**, vol. 9, n. 8, p. e105998, 2014.
- VAN DEN MUNCKHOF, E.H.A. *et al.* Comparison of Amsel criteria, Nugent score, culture and two CE-IVD marked quantitative real-time PCRs with microbiota analysis for the diagnosis of bacterial vaginosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, vol. 38, n. 5, p. 959-966, May 2019.
- WANG, J. *et al.* Clinical outcomes of in vitro fertilization among Chinese infertile couples treated for syphilis infection. **PLoS One**, vol. 10, n. 7, p. e0133726, 2015.

WITKIN, S.S.; LINHARES, I.M.; GIRALDO, P. Bacterial flora of female genital tract: function and immune regulation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, vol. 21, n. 3, p.347-354, Jun 2007.

WITKIN, S.S.; LINHARES, I.M. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? **BJOG**, vol. 124, n. 4, p. 606-611, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019. **Sexual and Reproductive Health**. Disponível em: < <https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en/>> Acesso em: 23 mai. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016. **Sexual and Reproductive Health**. Disponível em: <<http://who.int/reproductivehealth/topics/rtis/en/>>. Acesso em: 10 mar.2019.

YOUNES, J.A. *et al.* Women and their microbes: the unexpected friendship. **Trends Microbiol**, vol. 26, n. 1, p. 16-32, 2018.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. *et al.* The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. **Human Reprod**, vol. 32, n. 9, p. 1786-1801, Sep 2017.

APÊNDICE A - LISTA DE VERIFICAÇÃO PARA CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Paciente (iniciais): _____ **Prontuário:** _____ **Data:** _____

1. **Consentimento da paciente em participar do estudo:** () Sim () Não
2. **Em uso de antibiótico nas últimas quatro semanas:** () Sim () Não
3. **Tem sangramento vaginal no momento:** () Sim () Não
4. **Em uso de DIU:** () Sim () Não
5. **Em uso de hormônio:** () Sim () Não
6. **Em uso de creme vaginal:** () Sim () Não
7. **Está grávida:** () Sim () Não
8. **Atividade sexual nas últimas 48h:** () Sim () Não

- **Incluída** ()
- **Excluída** ()

APÊNDICE B- FORMULÁRIO

DATA: ___/___/___ **Prontuário:** _____ **Nº** _____

Nome: _____ **Idade:** ___ anos

Endereço: _____

Telefone: _____

Qual seu estado civil?

() Solteira () Casada () Viúva

() União Estável () Divorciada/Separada

Qual o nível mais elevado de escolaridade que você completou?

() Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo () Pós graduação

() Ensino médio incompleto () Ensino médio completo

() Ensino superior incompleto () Ensino superior completo

Qual a sua renda familiar? (Salário Mínimo de 2018: R\$ 954,00)

() Até 01 salário mínimo () Acima de 01 e até 03 salários mínimos

() Acima de 03 e até 05 salários mínimos () Acima de 05 e até 15 salários mínimos

() Acima de 15 salários mínimos () Sem Renda

Data da Última Menstruação: ___/___/___

Nº de gestações: _____ **Nº de abortamentos:** _____ **Quantos?** Espontâneos: _____ Provocados: _____

Ocorrência em qual trimestre? Primeiro: _____ Segundo: _____

Nº de gestações ectópicas: _____

Quantas de suas tentativas de gestação terminaram em nascimento de criança viva?

() Nunca engravidei () Nenhuma () Uma () Duas ou mais

Há quanto tempo tenta engravidar? () <01a () Entre 01 e 02a () Entre 02 e 03a () > 03a

Tipo de Infertilidade: () Primária () Secundária

Idade da primeira relação sexual: _____

Nº parceiros sexuais que teve na vida? () Um () Dois () Três ou mais

Tem corrimento: () Sim () Não

Teve ou tem alguma IST? () Sim () Não Qual (is)? _____

Fumante () **Ex-fumante** () **Nunca fumou** ()

APÊNDICE B- FORMULÁRIO

(continuação)

EXAMES

Paciente (iniciais): _____ Prontuário: _____ Data: _____

Exame especular (achados): Conteúdo vaginal fisiológico: Sim () Não ()

Corrimento com odor fétido: Sim () Não ()

Corrimento vaginal fino e homogêneo: Sim () Não ()

Corrimento vaginal espesso e grumoso: Sim () Não ()

pH: _____

Critérios de Amsel:

Corrimento vaginal fino e homogêneo: Sim () Não ()

Teste das aminas positivo: Sim () Não ()

pH>4,5: Sim () Não ()

Presença de Células Guia: Sim () Não ()

Quantos critérios? _____

Exame a fresco: *Gardnerella vaginalis* (); *Mobiluncus sp* (); *Candida sp* (); *Trichomonas vaginalis* ().**Bacterioscopia:**Escore de Nugent: 0-3 (); 4-6 (); 7-10 ()Morfotipos: *Lactobacillus* (); *Gardnerella vaginalis* (); *Mobiluncus sp* (); *Candida sp* (); *Trichomonas vaginalis* (); Outro () _____Papanicolaou: *Lactobacillus* (); *Gardnerella vaginalis* (); *Mobiluncus sp* (); *Candida sp* (); *Trichomonas vaginalis* ();

Atipias epiteliais: () Não () Sim Qual(is)? _____

TESTE RÁPIDO	RESULTADO
SÍFILIS	
HIV	
HBV	
HCV	

APÊNDICE C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

(De acordo com as normas da Resolução nº466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde)

TÍTULO DO ESTUDO: INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, VAGINOSE BACTERIANA E VAGINITES EM MULHERES COM INFERTILIDADE EM MATERNIDADE DE FORTALEZA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA/
FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS

INSTITUIÇÃO: MATERNIDADE-ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAND (MEAC-UFC)

TELEFONE PARA CONTATO: (85) 33668506 **EMAIL:** muse_santiago@yahoo.com.br

LOCAL DE COLETA DE DADOS: AMBULATÓRIO DE INFERTILIDADE

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) para participar de estudo de forma esclarecida, respondendo a perguntas e realizando testes de forma totalmente voluntária.

Antes de concordar em participar desta pesquisa, responder às questões e realizar exames é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.

Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de você decidir a participar.

Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade.

Objetivo do estudo: avaliar a prevalência de hepatites virais, sífilis, HIV, vaginose bacteriana e vaginites em mulheres com infertilidade.

Procedimentos: Participando do estudo, você está sendo convidado(a) a responder a um formulário para avaliação do perfil epidemiológico e história ginecológica, além do rastreamento de infecções sexualmente transmissíveis, através da realização de testes rápidos e coleta de conteúdo vaginal. Os questionários serão aplicados em uma consulta de rotina de infertilidade e a coleta das amostras do conteúdo vaginal serão realizadas durante exame ginecológico habitual.

Benefícios: sua participação no estudo permitirá que sejam investigadas algumas infecções sexualmente transmissíveis, infecções genitais e alterações do exame de prevenção, as quais muitas vezes não apresentam sintomas, o que possibilitará o conhecimento e tratamento ou controle destas condições.

Os resultados deste estudo contribuirão para a melhoria do serviço de infertilidade desta maternidade e permitirão a adoção de medidas que possam tornar melhor seu atendimento e os resultados do seu tratamento.

Riscos: os riscos relacionados com sua participação são o desconforto ao realizar os testes rápidos (sensação de “picada” no dedo, menos incômoda do que a coleta de sangue), além do desconforto da coleta da amostra do conteúdo vaginal, sendo o mesmo evidenciado durante o exame ginecológico de rotina. O risco de perda de confidencialidade será minimizado através de alocação do material obtido sob responsabilidade dos pesquisadores, em local protegido. Os participantes não serão identificados em momento algum.

Privacidade: Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo seu nome não será citado.

Acompanhamento e assistência: As pacientes serão liberadas após realização da consulta de rotina, exames e aplicação do questionário.

Ressarcimento: O estudo será feito durante a rotina do participante, como consulta médica na instituição de saúde citada, durante horário de trabalho da equipe médica.

Este termo de consentimento está sendo elaborado em duas vias, sendo uma para a participante da pesquisa e outro para o arquivo do pesquisador.

Em caso de dúvidas, você poderá se procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola encontra-se disponível para reclamações pertinentes à pesquisa pelo telefone 33668569 ou no endereço Rua coronel Nunes de Melo S/N Rodolfo Teófilo - CEP 60430-270.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____
_____, RG _____ estou de acordo em
participar desta pesquisa, assinando este consentimento em duas vias ficando com a posse de
uma delas.

Fortaleza, ____ de _____ de 20_____.

Assinatura do sujeito da pesquisa - Número da identidade

(somente para o responsável pela entrevista/pesquisa)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste
sujeito de pesquisa e/ou representante legal para a participação neste estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de 20_____.

Assinatura do responsável pela pesquisa

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

Assinatura do participante ou nome e assinatura do responsável

Data: ____/____/____.

APÊNDICE D- ARTIGO DE REVISÃO

(SUBMETIDO AO *BRAZILIAN JOURNAL OF STD/JORNAL BRASILEIRO DE DST*)

INFERTILIDADE E MICROBIOMAVAGINAL – ESTUDO DE REVISÃO

INFERTILITY AND VAGINAL MICROBIOME – REVIEW STUDY

Muse Santiago de Oliveira¹, Francisco das Chagas Medeiros², José Eleutério Júnior³

1. Gynecologist and Obstetrician with specialization in Sexually Transmitted Infections by SBDST – Sociedade Brasileira de Doenças Sexualmente Transmissíveis. Graduate in the Professional Health Master's Degree of the Health Department of Woman, Child and Teenager at the Medicine School of the Federal University of Ceará.

2. Associate Professor of the Health Department of Woman, Child and Teenager at the Medicine School of the Federal University of Ceará.

3. Associate Professor of the Health Department of Woman, Child and Teenager, at the Medicine School of Federal University of Ceará, Professor of the Master in Pathology at the Medicine School of Federal University of Ceará, Professor of the Professional Master of Woman and Child at the Medicine School of the Federal University of Ceará, Secretary General of the Brazilian Association of Pathology of Lower Genital Tract and Colposcopy, Secretary General of the Brazilian Society of Sexually Transmitted Diseases, President of the National Specialized Committee on Infectious-contagious diseases – FEBRASGO, Member of the International Academy of Cytology.

RESUMO

Introdução: Infertilidade é um importante problema de saúde pública e possui muitos fatores causais. Achados prévios, baseados principalmente em técnicas de cultura, sugerem associação entre infertilidade e alterações do microbioma vaginal. A abordagem metagenômica permitiu a descoberta de novas espécies bacterianas, anteriormente não identificadas, no trato genital feminino, possibilitando um conhecimento mais aprofundado do papel do microbioma vaginal na saúde reprodutiva feminina. **Objetivo:** Avaliar a associação das alterações da microbiota vaginal com infertilidade e suas repercussões no resultado das técnicas de reprodução assistida após uma década do Projeto Microbioma Humano. **Métodos:** Foi realizada busca sistemática

na base de dados MEDLINE entre os meses de setembro a novembro de 2018, e selecionados quatorze estudos que associavam microbioma vaginal com infertilidade ou com resultados de técnicas de reprodução assistida. **Resultados:** Os achados evidenciaram uma maior prevalência de vaginose bacteriana e aumento da diversidade microbiana na vagina de mulheres com infertilidade. Com relação ao sucesso das técnicas de reprodução assistida, a maioria dos estudos não evidenciou associação significativa entre vaginose bacteriana e redução nas taxas de gravidez. **Conclusão:** São necessários novos estudos para melhor compreender a influência do equilíbrio das espécies de microrganismos vaginais na saúde reprodutiva feminina, abordando a composição do microbioma em contextos além das técnicas de fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Infertilidade, Microbiota, Vaginose Bacteriana, *Gardnerella vaginalis*, Fertilização *in vitro*, Técnicas de Reprodução Assistida.

ABSTRACT

Introduction: Infertility is an important public health problem and has many causal factors. Previous findings based mainly on culture techniques suggest an association between infertility and changes in the vaginal microbiome. The metagenomic approach allowed the discovery of new bacterial species, previously unidentified in the female genital tract permitting a deeper knowledge of the vaginal microbiome role in female reproductive health. **Objectives:** to evaluate the association of changes in the vaginal microbiota with infertility and its repercussions on the outcome of assisted reproduction techniques after a decade of the Human Microbiome Project. **Methods:** a systematic search was carried out in the MEDLINE database between September and November 2018, by selecting 14 studies associating vaginal microbiome with infertility or with results of assisted reproduction techniques. **Results:** the findings showed a higher prevalence of bacterial vaginosis and increased microbial diversity in the vagina of women with infertility. Regarding the success of assisted reproduction techniques, most of the studies did not show a significant association between bacterial vaginosis and reduction in pregnancy rates. **Conclusion:** new studies are needed to better understand the influence of the vaginal microorganism species balance on female reproductive health, addressing the microbiome composition in contexts beyond *in vitro* fertilization techniques.

Keywords: Infertility, Microbiota, Bacterial Vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, In Vitro Fertilization, Assisted Reproduction Techniques.

INTRODUCTION

Vaginal microenvironment and brief history of taxonomy

Since the times of Aristotle, and later of Lineu, living organisms were classified into two kingdoms: the Kingdom Animalia, which included heterotrophic organisms that in general move along the environment, capture and ingest food, including the protozoan, considered unicellular animals, and metazoans or multicellular animals; and the Kingdom Plantae (Vegetal Kingdom) which included the photosynthesizing autotrophs, prokaryotes or eukaryotes. In the latter, there were non-photosynthesizing bacteria and fungi, considered achlorophyllous plants [1]. Until then, the microorganisms that inhabited the vagina were in their set called "vaginal flora".

With the advances in Biology, new proposals for classification emerged, and a system of four kingdoms was created, and the bacteria were included in the Moneran Kingdom, which represented all prokaryotes organisms [2]. In 1959, Whittaker presented a new proposal for classifying living organisms into five kingdoms, including the Fungi Kingdom [3].

All classifications, until then, characterized the bacteria based on phenotypic markers, such as morphology, growth or pathogenic potential, as well as physiological and biochemical properties [4].

In 1990, a new classification was proposed based on the analysis of rRNA (Ribosomal Ribonucleic Acid), dividing living organisms into three domains (a taxonomic category superior to Kingdom): Archea, Bacteria and Eucaria, based on phenotypic data, chemotaxonomic, genotypic and phylogenetic evolution [4, 5].

Microbiota was then defined as the "set of microorganisms that exist within a given environment and are revealed through molecular techniques" [6], and the consequent denomination of vaginal microbiota.

The Human Microbiome Project, initiated in 2007 by the National Institutes of Health (NHI), performed metagenomic studies through sequencing and analysis of high-performance DNA, which helped characterize the bacterial population of various sites of the human body [7]. These molecular techniques take advantage of the 16S rRNA gene, which is unique to bacteria and contains hypervariable regions that serve as identifiers for a genus or bacterial species [8]. The

human microbiome was then defined as "the total of commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms and their genetic material existing in the human body" [9].

Thus, the vaginal microbiome was also characterized, and areas previously considered sterile, such as the uterine cavity and the placenta, evidenced a microbiome itself [10,11].

With the advances of molecular biology, the microbial taxonomy and phylogenetic had rapid changes, making the microbial classification process quite complex [12], bringing us the following question: What will be the term to be used to define the vaginal microenvironment in one or two decades when new genomic technologies will surely emerge?

Vaginal Microbiota and Infertility

Historically, bacteria are identified using Gram staining or culture-based techniques. Only 20% of the bacteria in the human body, however, can be cultivated, and culture methods can therefore underestimate the diversity of the microbiome [13].

Information obtained from the combination of molecular biology methods with culture-based methods can clarify not only the role of bacteria in gynecological health, but also how the shift of the vaginal microbiota affects the susceptibility to diseases.

Infertility, in turn, is defined as the inability to conceive after 12 months of regular sexual activity without the use of contraceptive methods [14]. It is an important public health problem, globally affecting around 9% of women in the menacme, and approximately 1.5 million women in the United States [15]. It is estimated that one in six couples will present problems with fertility during their reproductive life [16].

Several decades ago, studies have shown that some microorganisms such as *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* have a well-established association with infertility [15, 17, 18].

The association between bacterial vaginosis (BV) and infertility has also been studied, with findings of BV prevalence up to three times higher among infertile women compared to women without infertility [19].

Moreover, with the development of molecular biology techniques, new microorganisms associated with infertility were identified [20, 21].

Disorders in the composition of bacterial communities seem to contribute to disease conditions, and there are growing evidences that vaginal microbiota, which is unique for each woman and presents variations associated with the menstrual cycle, sexual activity, stage of reproductive life, habits and external factors, plays an important role in determining the multiple facets of reproductive health [6, 22].

The objective of this review is to evaluate the association of vaginal microbiota alterations with female infertility and its repercussions on the results of assisted reproduction techniques, addressing the findings of the last decade after the advent of the Human Microbiome Project.

METHODS

The research was carried out from September to November 2018. We sought to identify studies addressing associations between vaginal microbiome and women with infertility diagnosis. Studies in the English language published in the last ten years (January 2008 to November 2018), such as meta-analyses, original cross-sectional, cohort and case-control studies were evaluated.

The levels of evidence of the mentioned studies were evaluated according to the Oxford Centre for evidence-based Medicine levels (March 2009 – www.cebm.net) [23].

A systematic search in the MEDLINE database was conducted using the following terms from the Medical Subject Headings (MeSH) Dictionary: ("Infertility") AND ("Microbiota" OR "Vaginosis, Bacterial" OR "Gardnerella vaginalis"). Complementary search was performed using the terms of the MeSH: ("Fertilization in Vitro" OR "Reproductive Techniques, Assisted") AND ("Microbiota" OR "Vaginosis, Bacterial" OR "Gardnerella vaginalis").

RESULTS

Thirty studies were initially identified, 14 of which were selected after reading the abstract and excluded those who evaluated microbiome of the male reproductive tract and studies not performed in humans, according to the flowchart shown in Figure 1.

The studies were divided into two groups: studies comparing the vaginal microbiota of fertile and infertile women, and studies evaluating the association of vaginal microbiome with the results from assisted reproduction techniques.

Vaginal microbiome and infertility

Eight studies [17, 24-30] were selected comparing the vaginal microbiome of fertile and infertile women, totaling 3,611 patients, in addition to a systematic review with meta-analysis [19], which evaluated 12 articles, and a total of 3,229 patients. The origin of each study and the diagnostic methods used for the characterization of the microbiota are described in Table 1.

Mania-Pramanik et al [24] evaluated a group of 510 women: 112 (21.96%) had a diagnosis of infertility, 115 (22.5%) a history of repeated miscarriage, 100 (19.6%) women with signs and symptoms of lower genital tract infections, 102 (20%) healthy pregnant women (gestational age of 2 – 3 months) and 81 (15.9%) asymptomatic women. Reproductive tract infections, such as bacterial vaginosis (BV), *Candida sp*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* and *Human papillomavirus* (HPV), were investigated through Nugent score, fresh examination and Polymerase Chain Reaction (PCR). The rate of BV was higher (25.9%; 29/112) among infertile women when related to the other groups, evidencing a statistically significant association ($p=0.0001$).

A study [25] evaluated the vaginal microbiota, through Gram, culture and molecular biology (BD Affirm™ VPIII [Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA] and COBAS Amplicor™ [Roche, Milan, Italy]), of 952 women divided into two groups: fertile women with vaginal pruritus (N = 556) and asymptomatic women with infertility who would undergo assisted reproduction procedure (N = 396).

Statistical analysis showed a significant association ($p\leq 0.001$) between the presence of *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus agalactiae*, *Gardnerella vaginalis* and *Enterobacteriaceae* or *Enterococci* in the vaginal microbiota with the decrease of the *Lactobacilli* species. The study brought evidence that the reduction of *Lactobacilli* and the presence of a high number of polymorphonuclear in the vaginal content are important parameters to be considered for the evaluation of the health status of the female urogenital tract.

In a prospective cohort study [26] evaluating 874 infertile women and 382 fertile controls, the prevalence of BV evaluated by the modified Spiegel method was also significantly higher among women with infertility. The prevalence of BV was of 45.5% (398/874) in infertile women compared to 15.4% (59/382) in fertile women ($p<0.001$). The highest prevalence of BV in patients with infertility was found in women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) (60.1%) and Infertility Without Apparent Cause (IWAC) (37.4%).

Van Oostrum et al [19], in a systematic review with meta-analysis, evaluated 12 Nugent scores studies and demonstrated that BV is significantly more prevalent in women with infertility (OR 3.32; 95% CI: 1.53-7.20). On the other hand, in this study, infertile women for tubal factor had significantly higher prevalence of BV (OR 2.77; 95% CI: 1.62-4.75) compared to women with other infertility causes.

The prevalence of BV diagnosed by the Amsel criteria among patients with infertility for tubal factor was evaluated in a study with 356 women (178 fertile and 178 with tubal infertility) [27]. Bacterial vaginosis was observed in 50 women (28.1%) with tubal infertility, compared to 14 (7.9%) fertile women ($p < 0.001$). Women with infertility showed a higher risk of bacterial vaginosis when belonged to a lower socioeconomic level (OR 11.89; 95% CI 5.20–27.69), used vaginal showers (OR 19.15; 95% CI: 7.2 –47.75), used agents that dry out the vagina (OR 17.04; 95% CI: 6.91–43.24), initiated sexual activity early (OR 32.08; 95% CI: 12.02–88.89), or had a history of sexually transmitted infections (OR 12.42; 95% CI: 5.36–29.35).

The prevalence of asymptomatic BV diagnosed through Nugent score among fertile women (N = 84) and women with infertility (N = 116) was also evaluated in another study [28].

It was observed that the vaginal microbiota of healthy women was dominated by *Lactobacillus* (40, 27.8%), while the percentage of microbiota with predominance of *Lactobacillus* in the group of women with infertility was relatively low (4, 3.5%). Asymptomatic bacterial vaginosis was present in 27.6% (32/116) of infertile women, while in the fertile women group only 7.1% (6/84) had asymptomatic BV ($p \leq 0.05$).

Wee et al [29] examined the vaginal, cervical and endometrial microbiota through 16S rRNA sequencing of 15 women with a history of infertility compared with 16 fertile women (controls), and observed a tendency of women with infertility show more often two most prevalent microorganisms: *Ureaplasma* in the vagina ($p=0.042$) and *Gardnerella* in the cervix ($p=0.044$). Four out of five women with infertility colonized by *Ureaplasma* also had vaginal microbiota dominated by *L. inners* ($p=0.015$). There was no statistically significant difference in the expression of genes selected in the endometrium and microbiome composition between cases and controls.

The vaginal and cervical microbiota were characterized by sequencing the rDNA V3-16S gene in a study [30] that evaluated 14 women with idiopathic infertility, 13 women with non-idiopathic infertility, 39 fertile women with BV and 30 healthy women (controls). The affected

groups (idiopathic, non-idiopathic infertility and BV) had α -diversity (diversity of microorganisms within the same sample) greater than in the control group. The controls were significantly different from the group with idiopathic infertility ($p < 0.05$), non-idiopathic infertility ($p < 0.01$) and fertile with vaginosis ($p < 0.01$).

An unequal distribution of *Lactobacilli* was observed among the studied groups. *L. iners* acted as a marker of microbiome health based on its prevalence in each group: controls (51%) compared to idiopathic infertility (29%), non-idiopathic infertility (18%), and vaginosis (15%). There was a decrease in the prevalence of *L. crispatus* in infertile women and with BV (25% and 6%, respectively) in relation to women with idiopathic infertility (31%), which, in turn, was lower than in controls (36%). There was a higher prevalence of *L. gasseri* in the idiopathic infertility women group.

In order to evaluate the bacterial composition and other microorganisms of the reproductive tract of women with infertility with infectious cause, a study [17] recruited a group of 210 women, as follows: 26 women with non-infectious infertility; 21 women with infectious infertility, 89 fertile women and 54 sex workers. Three cervical samples were collected: the first for conventional culture of commensal and pathogenic bacteria of the urogenital tract, the second for PCR test for *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *M. hominis* and *U. urealyticum*, and the third for 16S rRNA gene sequencing. Women with infectious infertility differed significantly in the frequency of *C. trachomatis* infections compared to fertile controls ($p < 0.01$) and women with non-infectious infertility ($p < 0.05$). No differences were observed between groups with HPV, HSV, *Treponema pallidum*, HIV or hepatitis B and C infections. Despite the increase in the rate of positive tests for *U. urealyticum/parvum* (41.30%), *N. gonorrhoeae* (7.90%), *M. genitalium* (9.50%) and *M. hominis* (34.90%) among sex workers, no significant differences were observed between the other groups.

The analysis of the microbiota using amplification of the 16S sequence of cervical smears revealed significant differences between the group of women with infectious infertility and the fertile controls' in relation to the prevalence of *Gardnerella* (10.08% vs 5.43%). The α -diversity varied between the groups: among fertile women communities dominated by *Lactobacillus* prevailed, among women with infectious infertility communities dominated by *Gardnerella* occurred more often, and a diversity of communities in other groups was observed.

Results in assisted reproduction

Five studies [19, 21, 31-33] evaluated the association between vaginal microbiota and the results of assisted reproduction techniques, as shown in Table 2.

Selim et al [31] investigated through culture and Nugent score the impact of vaginal bacterial microbiota on the rates of live births during Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). In women with bacterial vaginosis, intermediate microbiota and normal microbiota, the conception rates were of 35% (9/26), 42% (14/33) and 58% (7/12), respectively, with no statistically significant difference between the groups ($p=0.06$). The conception rate was of 29% (2/7) in those with *S. viridians*, and 22% (2/9) with *Staphylococcus aureus* isolated from the embryonic transfer catheter tip, 39% (18/46) when no bacteria was isolated from the catheter tip, and 80% (8/10) when the *Lactobacilli* H₂O₂ producers were recovered ($p<0.001$).

Using 16S rRNA sequencing techniques, a study [21] evaluated the composition of the vaginal microbiota on the day of embryo transfer in women undergoing *in vitro* fertilization (IVF). Through a sophisticated calculation of the diversity index (Shannon Diversity Index), comparing the vaginal fluid swabs of women who had a live newborn with those who did not succeed, it was demonstrated that a lower rate of diversity of vaginal microbiota correlated with the highest rate of live births ($p=0.01$).

Using the Nugent score and PCR, a study [32] evaluated the prevalence of BV in 307 infertile women submitted to *in vitro* fertilization and the impact of BV on the pregnancy rate after IVF. The embryo implantation rate did not decrease significantly, by comparing the normal vaginal microbiota women group with the BV women group (36.3% vs 27.6%, respectively, $p=0.418$), nor the rate of clinical pregnancy (33.1% vs 27.6%, respectively, $p=0.68$). Obstetric results (frequency of early miscarriage, premature rupture of membranes, gestational age at delivery and delivery or birth weight) also showed no statistically significant differences.

In the systematic review of Van Oostrum et al [19] it was demonstrated that BV was not associated with decreased conception rates (OR 1.03; 95% CI: 0.79-1.33) nor with increased risk of abortion in the first trimester (OR 1.20; 95% CI: 0.53 – 2.75), but associated with risk significantly elevated for pre-clinical gestational loss (OR 2.36; 95% CI: 1.24-4.51). None of the studies evaluated in the review found an association between abnormal microbiota and conception rates after IVF.

Another study [33] evaluated the diagnostic performance of the PCR tests compared to the Nugent score for abnormal vaginal microbiota and to predict the success rate of the treatment of women submitted to IVF. The prevalence of BV by the score was of 21% (27/130), while the prevalence of abnormal vaginal microbiota defined by PCR was of 28% (36/130) with high concentrations of *Gardnerella vaginalis* and/or *Atopobium vaginae*. The PCR approach showed sensitivity and specificity, respectively, of 93% and 93% for BV defined through Nugent score. In addition, PCR allowed the stratification of Nugent's intermediate microbiota. Eighty-four patients completed IVF treatment. The overall rate of clinical pregnancies was of 35% (29/84). Curiously, only 9% (2/22) with abnormal microbiota defined by PCR obtained a clinical gestation ($p=0.004$).

Table 3 summarizes selected studies with their respective levels of evidence and results.

CONCLUSION

Studies suggest that bacterial vaginosis and abnormal vaginal microbiota are significantly more prevalent in women with infertility compared to fertile patients, and that the healthy vaginal environment has lower microbial diversity.

The role of vaginal microbiome in the success or failure of assisted reproduction techniques (ART) is still unclear, and most of the selected studies did not reveal a significant association between bacterial vaginosis and reduction in pregnancy rates, being necessary new studies addressing the microbiome composition in contexts beyond the *in vitro* fertilization techniques.

Conflict of interest: There is no conflict of interest to be reported.

Funding or other financing: The authors do not have commercial or other associations that could constitute a conflict of interest regarding this article.

Correspondence:

Muse Santiago de Oliveira

Rua General Silva Júnior, 640 Bloco 2 Apartamento 1501 Fátima, Fortaleza-CE, Brazil

CEP: 60411-200, Fone: +5585 99658-2771.

E-mail: muse_santiago@yahoo.com.br

REFERENCES

1. Ambrose CT. Carolus Linnaeus (Carl von Linné), 1707-1778: the Swede who named almost everything. *Pharos Alpha Omega Alpha Honor Med Soc* 2010; 73(2): 4-10.
2. Copeland, HF. *The Classification of lower organisms*. Palo Alto, California: Ed. Pacific Books; 1956.
3. Whittaker RH. On the broad classification of organisms. *Q Rev Biol* 1959;34: 210-226.
4. Schleifer KH. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 2009; 533-542.
5. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(12): 4576-4579.
6. Garcia-Velasco JA, Menabrito M, Catalán IB. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. *Reprod Biomed Online* 2017; 35(1):103-112.
7. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009;19: 2317-2323.
8. Mor A, Driggers PH, Segars JH. Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. *Fertil Steril* 2015; 104(6):1344-1350.
9. Venter JC, Adam MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Suton GG, et al. The sequence of the Human Genome. *Science* 2001; 291:1304-135.
10. Franasiak JM, Scott RT. Introduction: Microbiome in human reproduction. *Fertil Steril* 2015; 104(06):1341-1343.
11. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota- new player in town. *Fertil Steril* 2017; 108(1):32-39.

12. Janda JM. Taxonomic update on proposed nomenclature and classification changes for bacteria of medical importance, 2013-2014. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 83:82-88.
13. Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertil Steril* 2015; 104:1351-1357.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Reproductive health 2018. Available at: <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/index.htm> Acessado em 05/11/2018.
15. Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peirpert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 216(1):1-9.
16. Farquhar C, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 8: CD010537.
17. Graspeuntner S, Bohlmann MK, Gillman K, Speer R, Kuenzel S, Mark H et al. Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the diagnosis of infectious infertility. *PLoS One* 2018; 13(1) e0191047.
18. Gottlieb SL, Newman LM, Amin A, Temmerman M, Broutet N. Sexually transmitted infections and women's sexual and reproductive health. *Int J Obstet Gynecol* 2013; 123:183-184.
19. Van Oostrum N, De Sutter P, Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2013; 28(7): 1809-1815.
20. Haggerty CL, Totten PA, Tang G, Astete SG, Ferris MJ, Norori J, et al. Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. *Sex Transm Infect* 2016; 92(6):441-446.
21. Hyman RW, Herndon CN, Jiang H, Palm C, Fukushima M, Bernstein D, et al. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization- embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2012; 2:105-115.

22. Younes JA, Lievens E, Hummelen R, van der Westen R, Reid G, Petrova MI. Women and their microbes: the unexpected friendship. *Trends Microbiol* 2018; 26(1):16-32.
23. Oxford Centre for Evidence-based Medicine- Levels of Evidence 2009. Available at: <https://www.cebm.net/2009/06/oxford-centre-evidence-based-medicine-levels-evidence-march-2009/> Accessed in: 12/09/2018.
24. Mania-Pramanik J, Kerkar SC, Salvi VS. Bacterial vaginosis: a cause of infertility? *Int J STD AIDS* 2009; 11:778–781.
25. Casari E, Ferrario A, Morengi E, Montanelli A. *Gardnerella*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. *New Microbiol* 2010; 33: 69-76.
26. Salah RM, Allam AM, Magdy AM, Mohamed AS. Bacterial vaginosis and infertility: cause or association? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 167:59–63.
27. Durugbo II, Nyengidiki TK, Bassey G, Wariso KT. Bacterial vaginosis among women with tubal factor infertility in Nigeria. *Int J of Gynaecol and Obstet* 2015; 131: 133-136.
28. Babu G, Singaravelu BG, Srikumar R, Reddy SV, Kokan A. Comparative Study on the Vaginal Flora and Incidence of Asymptomatic Vaginosis Among Healthy Women and in Women with Infertility Problems of Reproductive Age. *J Clin Diagn Res* 2017; 11(8):DC18-DC22.
29. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2017; 58(3): 341–348.
30. Campisciano G, Florian F, D'Eustacchio A, Stanković D, Ricci G, Comar M. Subclinical alteration of the cervical–vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J Cell Physiol* 2017; 232(7): 1681-1688.

31. Selim SA, El Alfy SM, Aziz MH, Mohammed HM, Alasbahi AA. Effectiveness of metronidazole to bacterial flora in vagina and the impart of microbes on live birth rate during intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Arch Gynaecol Obstet*2011; 284(6):1449–1453.
32. Mangot-Bertrand J, Fenollar F, Bretelle F, Gannerre M, Raoult D, Courbiere B. Molecular diagnosis of bacterial vaginosis: impact on IVF outcome. *EurJ Clin Microbiol Infect Dis*2013; 32:535–541.
33. Haahr T, Jensen JS, Thomsen LD, Rygaard K, Humaidan P. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: A prospective estudy in IVF patientes. *Hum Reprod*2016; 31(4) 795-803.

Figure 1. Flowchart of the Selected Studies.

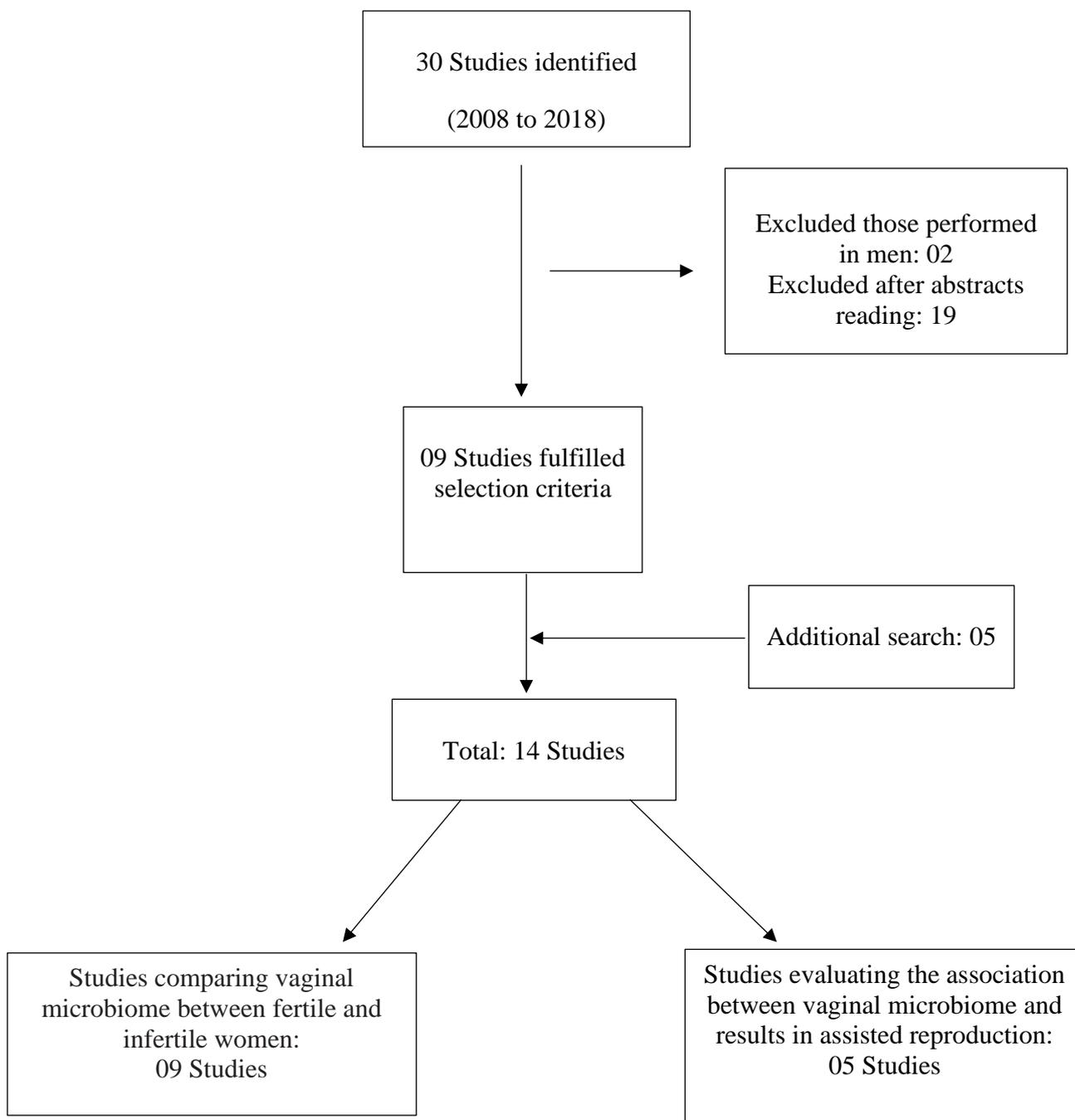


Table 1. Comparison studies of reproductive tract microbiome among fertile and infertile women.

Study/ Year	Country	Population	Diagnosis Method	Microbiome Site
Mania-Pramanik <i>et al.</i> (2009)	India	N=510	Nugent score, PCR and fresh examination	Vaginal
Casari <i>et al.</i> (2010)	Italy	N=952	Gram, culture, molecular biology	Vaginal
Salah <i>et al.</i> (2013)	Egypt	N= 1256	Spiegel modified	Vaginal
Van Oostrum <i>et al.</i> (2013)	Belgium	-----	Nugent score	Vaginal
Durugbo <i>et al.</i> (2015)	Nigeria	N= 356	Amsel	Vaginal
Babu <i>et al.</i> (2017)	India	N=200	Fresh examination, Gram and Nugent score	Vaginal
Wee <i>et al.</i> (2017)	Australia	N=31	16S rRNA	Vaginal, cervical, and endometrial
Campisciano <i>et al.</i> (2017)	Itália	N=96	rDNA V3-16S	Vaginal and cervical
Graspeuntner <i>et al.</i> (2018)	Germany	N=210	Culture, PCR, 16S rRNA	Cervical

Table 2. Studies evaluating the association between the reproductive tract microbiota and the results of assisted reproductive techniques.

Study/ Year	Country	Population	Diagnosis Method	Microbiome Site
Selim <i>et al.</i> (2011)	Egypt	N=71	Culture and Nugent score	Vaginal
Hyman <i>et al.</i> (2012)	USA	N=30	16S rRNA	Vaginal
Mangot-Bertrand <i>et al.</i> (2013)	India	N= 307	PCR and Nugent score	Vaginal
Van Oostrum <i>et al.</i> (2013)	Belgium	-----	Nugent score	Vaginal
Haahr <i>et al.</i> (2016)	Denmark	N= 130	PCR and Nugent score	Vaginal

Table 3. Summary of selected studies results.

REFERENCE	TYPE OF STUDY	N.° PATIENTS	RESULTS (VALUE OF P)
Graspeuntner S <i>et al.</i> , 2018 (B3B)	Case study-control	N=210	Frequency of <i>C. trachomatis</i> greater in women with infectious infertility compared to fertile controls ($p<0.01$) and women with non-infectious infertility ($p<0.05$)
Babu G <i>et al.</i> , 2017 (B3B)	Case study-control	N=200	Asymptomatic BV present in 27.6% of infertile women and in 7.1% of fertile women ($p\leq 0.05$).
Wee BA <i>et al.</i> , 2017 (B3B)	Case study-control	N=31	Women with infertility showed two predominant microorganisms: <i>Ureaplasma</i> in vagina ($p=0,042$) and <i>Gardnerella</i> in cervix ($p=0,044$); not adjusted.
Campisciano G <i>et al.</i> , 2017 (B3B)	Case study-control	N=96	The α -greater diversity in patients with idiopathic infertility ($p<0.05$), non-idiopathic ($p<0.01$) and BV ($p<0.01$) compared to the control group.
Haahr T <i>et al.</i> , 2016 (B2B)	Case study	N=130	Prevalence of BV through Nugent and PCR were highly correlated and women with abnormal microbiota defined by PCR were significantly less likely to obtain a clinical pregnancy (9%) compared to the overall rate of 35% ($p=0.004$).
Durugbo I <i>et al.</i> , 2015 (B3B)	Cross-sectional study	N= 356	Prevalence of higher BV among women with tubal infertility compared to fertile women ($p<0.001$).
Van Oostrum N <i>et al.</i> , 2013 (B2A)	Systematic review with meta-analysis	N=3229	BV more prevalent in women with infertility compared with women in prenatal monitoring (OR 3.32; 95% CI 1.53 -7.20) and associated with increased risk of early gestational loss (OR 2.36; 95% CI: 1.24-4.51). BV was not associated with decreased rates of conception (OR 1.03; 95% CI 0.79-1.33) nor with increased risk of first trimester abortion (OR 1.20; 95% CI: 0.53-2.75).
Salah RM <i>et al.</i> , 2013 (B2B)	Cohort study	N= 1256	BV higher prevalence in infertile women than in fertile women (45.5% vs. 15.4%). The highest prevalence was observed in PCOS (60.1%) and IWAC (37.4%) patients. Cumulative pregnancy rates among patients with PCOS and IWAC were significantly higher among patients who were treated for BV.
Mangot-Bertrand J <i>et al.</i> , 2013 (B2B)	Cohort study	N=307	There was no significant decrease in the rates of embryo implantation by comparing the groups with normal vaginal flora and BV ($p=0.418$), nor in the clinical pregnancy rates between the two groups ($p=0.68$).
Hyman RW <i>et al.</i> , 2012 (B2B)	Cohort study	N= 30	The diversity of species varied in different hormonal environments, and on the day of embryo transfer correlated with the outcome (live births/no live births) ($p=0.01$).
Selim AS <i>et al.</i> , 2011 (B2B)	Cohort study	N=71	In women with bacterial vaginosis, intermediate flora and normal flora, the conception rates were of 35% (9/26), 42% (14/33) and 58% (7/12), respectively ($p=0.06$).
Casari E <i>et al.</i> , 2010 (B3B)	Case study-control	N=952	Significant association ($p\leq 0.001$) between the decrease of <i>Lactobacilli</i> and the increased prevalence of <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> or <i>Enterococci</i> in vaginal flora.
Mania-Pramanik <i>et al.</i> , 2009 (B3B)	Cross-sectional study	N=510	Statistical analysis between negative and positive women for BV revealed statistically significant association ($p=0.0001$) with infertility.

$p\leq 0,05$ (statistically significant)

BV= Bacterial Vaginose; PCR= Polimerase Chain Reaction; OR= Odds ratio; CI=Confidence Interval; PCOS= Polycystic Ovary Syndrome; IWAC=Infertility Without Apparent Cause.

ANEXO - PARECER CEP/MEAC

UFC - MATERNIDADE ESCOLA
ASSIS CHATEAUBRIAND DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, VAGINOSE BACTERIANA E VULVOVAGINITES EM MULHERES COM INFERTILIDADE EM MATERNIDADE DE FORTALEZA

Pesquisador: MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80395617.7.0000.5050

Instituição Proponente: Maternidade Escola Assis Chateaubriand / MEAC/ UFC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.423.554

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto bem apresentado que pretende avaliar a prevalência e a associação entre infecções sexualmente transmissíveis, tipos de flora vaginal, prevalência de vaginose bacteriana e vaginites, com infertilidade primária ou secundária. Constituiu-se num estudo observacional, descritivo e prospectivo de corte transversal de um grupo de mulheres em idade reprodutiva com diagnóstico de infertilidade primária ou secundária atendidas em ambulatorio especializado na Maternidade Escola Assis Chateaubriand

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a prevalência de infecções sexualmente transmissíveis, tipos de flora vaginal, vaginose bacteriana e vaginites em mulheres com diagnóstico de infertilidade primária ou secundária, atendidas em ambulatório especializado da Maternidade Escola Assis Chateaubriand no município de Fortaleza-Ceará.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo permitirá que sejam investigadas algumas infecções sexualmente transmissíveis e suas consequências o que permitirá o conhecimento e tratamento ou controle das patologias e da infertilidade. Os riscos se restringem ao desconforto na realização de testes rápidos e na coleta de sangue e secreção vaginal

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8569 **Fax:** (85)3366-8528 **E-mail:** cepmeac@gmail.com

UFC - MATERNIDADE ESCOLA
ASSIS CHATEAUBRIAND DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 2.423.554

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa inclui todos os documentos exigidos, inclusive o orçamento, muito embora nele não seja mencionada a contra-partida da Instituição, que está implícita na execução do trabalho.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme mencionamos os termos de apresentação obrigatória estão inseridos, com a ressalva referida pela não menção da contra-partida da Maternidade Escola Assis Chateaubriand nas despesas.

Recomendações:

A Recomendação tem caráter didático não invalidando a possível aprovação do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Veja a recomendação anterior

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado concorda com o relator

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1035309.pdf	27/11/2017 16:34:00		Aceito
Outros	termo.pdf	27/11/2017 16:33:32	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	fiel.pdf	27/11/2017 16:33:12	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	autores.pdf	27/11/2017 16:32:46	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ciencia.pdf	27/11/2017 16:32:30	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia.pdf	27/11/2017 16:32:14	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	27/11/2017 16:31:58	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MUSE.doc	16/11/2017 14:57:12	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETO_MUSE_CEP.doc	16/11/2017 14:55:54	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8569 **Fax:** (85)3366-8528 **E-mail:** cepmeac@gmail.com

UFC - MATERNIDADE ESCOLA
ASSIS CHATEAUBRIAND DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 2.423.554

Investigador	PROJETO_MUSE_CEP.doc	16/11/2017 14:55:54	MUSE SANTIAGO DE OLIVEIRA	Aceito
--------------	----------------------	------------------------	------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 07 de Dezembro de 2017

Assinado por:

**Maria Sidneuma Melo Ventura
(Coordenador)**

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8569 **Fax:** (85)3366-8528 **E-mail:** cepmeac@gmail.com