

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MICROBIOTA CERVICAL ANORMAL: DIAGNÓSTICO E ASSOCIAÇÃO COM
FATORES DE RISCO, ASPECTOS CLÍNICOS E CITOLÓGICOS.

FERNANDA ALTINO SILVESTRE

BRASÍLIA-DF

2016

FERNANDA ALTINO SILVESTRE

MICROBIOTA CERVICAL ANORMAL: DIAGNÓSTICO E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO, ASPECTOS CLÍNICOS E CITOLÓGICOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro

BRASÍLIA-DF
2016

FERNANDA ALTINO SILVESTRE

MICROBIOTA CERVICAL ANORMAL: DIAGNÓSTICO E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO, ASPECTOS CLÍNICOS E CITOLÓGICOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 08/08/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
(Presidente)
FM – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira
(Membro titular interno)
FS – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Leonora Maciel de Souza Vianna
(Membro titular externo)
FM – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama
(Membro suplente externo)
FS – Universidade de Brasília

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVESTRE, FERNANDA ALTINO

Microbiota Cervical Anormal: Diagnóstico e associação com fatores de risco, a aspectos clínicos e citológicos 2016.

Orientador: Fabiana Pirani Carneiro

Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Faculdade da Saúde, 2016.

Departamento de Patologia.

Citologia cervical, cultura de secreção cervical, método automatizado de identificação de bactérias.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVESTRE, FA (2016). Microbiota Cervical Anormal: Diagnóstico e associação com fatores de risco, a aspectos clínicos e citológicos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Patologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, p 82.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Fernanda Altino Silvestre

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Microbiota Cervical Anormal: Diagnóstico e associação com fatores de risco, a aspectos clínicos e citológicos. GRAU / ANO: Mestre / 2016

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Fernanda Altino Silvestre
Brasília - DF - Brasil
fefealtino@gmail.com

Dedico este trabalho aos meus pais Sueli Altino Silvestre e Virgílio Silvestre por me formarem como mulher para a sociedade, sempre se dedicando a dar o melhor. À minha irmã e sobrinha que em meio aos desafios estiveram também ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço pelas graças derramadas por Deus e com o coração grato hoje posso contemplar todos os seus feitos em cada circunstância que me fez superar no decorrer da minha vida e também neste caminho acadêmico;
- À minha família, que sempre ajudou e acreditou em meu potencial onde, mesmo em meio aos desafios, sempre mostrava um horizonte cheio de esperança.
- À Prof.^a Fabiana Pirani por sua disponibilidade e de forma pedagógica ajudando-me a cumprir com êxito este projeto de forma científica e pessoal, do qual obtive perspicaz aprendizado;
- A equipe Cancerlab de 2014, que me abriu portas para o meio científico, com a amizade e profissionalismo de cada um;
- Aos pacientes, por sua disponibilidade, onde a cada anamnese tive um contato mais próximo e que trazia um olhar único à pesquisa científica e melhorias também ao seu tratamento;
- Ao Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília, meus mais que sinceros agradecimentos a todos pela cooperação com a coleta de dados, em especial à Deisiane (Recepção), Mário (Técnico) e ao Celso (Citologia) por suas estimadas colaborações;
- Ao setor de microbiologia do Hospital Universitário de Brasília, em especial ao Fabiano José (Técnico), por compartilhar seu amplo conhecimento em cada cultura executada;
- À Tércia (Técnica) pela dedicação na execução dos trabalhos técnicos laboratoriais necessários para pesquisa, e à Prof.^a Leonora Vianna, me orientando em algumas situações com seu conhecimento acadêmico e científico;
- Aos graduandos do curso de medicina e staffs Dr^a. Ceres Nunes de Rezende Oyama, Dr^a Frederico Correia, Dr^a Livia Custódio Pereira e Dr^a Mariana Anauê Lozi Dias por sua disponibilidade e profissionalismo;
- Aos professores do Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em especial aos professores Fábio Pittella, Andrea Motoyama, Dora Rabello e Diêgo Madureira, que sempre tiveram comigo disponibilidade, confiança e amizade;

- À equipe do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, em especial à Edigrês (Secretária) e Prof.^a Eliete por sua atenção e orientação preciosas;
- Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pelo apoio financeiro;
- Aos irmãos da Comunidade Católica Shalom, em especial por me apoiarem de forma direta ou indireta, aos meus formadores Ana Elaine, Edman Nóbrega e Elineusa Amorim onde sempre me orientaram espiritualmente e humanamente, também à Dr. Marília.

“...Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir...”

SÃO TOMÁS DE AQUINO

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

SÃO FRANCISCO DE ASSIS

RESUMO

INTRODUÇÃO. A cultura de secreção vaginal e os diferentes métodos moleculares de identificação de micro-organismos são considerados de referência no diagnóstico das infecções. Contudo, muitas infecções do trato genital inferior são detectadas pela citologia cervical, por ser um método diagnóstico rotineiramente empregado na prevenção do câncer de colo de útero. **OBJETIVOS.** Avaliar a frequência de microbiota bacteriana anormal em secreção cervical através da citologia e cultura, verificar a concordância entre estes métodos diagnósticos e a associação da microbiota bacteriana anormal com inflamação e aspectos clínicos. **MÉTODO.** Foram analisadas 55 pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) nos anos de 2015 e 2016, as quais foram submetidas a exame clínico e coleta de secreção cervical para citologia cervical e cultura. A identificação das bactérias foi realizada por método automatizado (Vitek 2 - Biomeriéux). **RESULTADOS.** Crescimento de bactérias patogênicas foi detectado em 45,45% das amostras cervicais submetidas à cultura/VITEK. Das oito espécies isoladas, as mais frequentes foram *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis* (20% e 12,72% do total das amostras, respectivamente). Na citologia cervical, microbiota bacteriana anormal (caracterizada pela presença de cocos e/ou outros bacilos) foi observada em 52,72 % das amostras e inflamação em 78,18% das amostras. A concordância entre microbiota bacteriana anormal (presença de cocos e/ou outros bacilos) na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK foi de 60% (Kappa= 0,2). A inflamação foi significativamente mais frequente nas amostras com microbiota bacteriana anormal em comparação com amostras com microbiota bacteriana normal na citologia cervical (Teste de Fisher, $p=0,03$). Apesar dos achados inflamatórios na citologia terem sido mais frequentes nas amostras de pacientes com crescimento de bactérias patogênicas em relação às amostras sem crescimento de bactérias na cultura cervical, a diferença não foi significativa. Com relação aos aspectos demográficos, antecedentes pessoais, atividades sexuais e hábitos de vida, apenas a média da idade das pacientes foi significativa entre os grupos com e sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical. **CONCLUSÃO.** A microbiota bacteriana anormal foi um achado frequente na citologia cervical e a taxa de concordância entre a presença desta microbiota anormal na citologia cervical e crescimento de bactérias patogênicas na cultura foi

pobre. Os achados de inflamação na citologia cervical foram frequentes nas amostras com microbiota bacteriana anormal e sua presença nas amostras com microbiota normal sugere causas de origem não-infecciosa, embora a causa de origem infecciosa não possa ser excluída. Em contrapartida, a presença de microbiota bacteriana anormal em amostras sem inflamação na citologia cervical sugere que estas bactérias não são, necessariamente, patogênicas. A frequência baixa de sinais e sintomas e o número limitado de amostras do presente estudo não permitiram uma análise confiável sobre a associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical e suas possíveis repercussões clínicas.

PALAVRAS-CHAVE: citologia cervical, cultura de secreção cervical, método automatizado de identificação de bactérias.

ABSTRACT

INTRODUCTION. The culture of vaginal secretions and different methods for molecular identification of microorganisms are considered as reference in the diagnosis of infections. However, many infections of the lower genital tract are detected by cervical cytology, which the routinely diagnostic method is used to prevention of cervical cancer. **OBJECTIVE.** Evaluate the abnormal bacterial microbiota frequency in cervical secretion by cytology and culture; evaluate the agreement between these diagnostic methods and the association between abnormal bacterial microbiota with inflammation and clinical aspects. **METHOD.** This study was done in 55 patients treated at Gynecology Service in the University Hospital of Brasilia (HUB) in the years 2015 and 2016. They were subjected to clinical examination and collection of cervical secretion for cytology and culture. The identification of bacteria was performed by automated method (Vitek 2 - Biomeri ux). **RESULTS.** The pathogenic bacteria grew up in 45.45% of cervical samples submitted to culture / VITEK. Between eight isolated species, the most common were *Streptococcus agalactiae* and *Enterococcus faecalis* (20% and 12.72% of the total samples, respectively). In cervical cytology, abnormal bacterial microbiota was observed in 52.72% of the samples and inflammation in 78.18% of the samples. The agreement between abnormal bacterial microbiota in cytology and growth of pathogenic bacteria in culture / VITEK was 60% (kappa = 0.2). The inflammation was significantly more frequent in samples with abnormal bacterial microbiota compared with normal samples bacterial microbiota in cervical cytology (Fisher's exact test, $p = 0.03$). Although the inflammation findings in cytology were more frequent in samples from patients with growth of pathogenic bacteria compared to samples with no growth of bacteria in the cervical secretion culture, the difference was not significant. Regarding demographics aspects, medical history, sexual activity and lifestyle habits, only the age (mean) of patients it was significant between the groups with and without growth of pathogenic bacteria in the cervical secretion culture. **CONCLUSION.** Abnormal bacterial microbiota was a frequent finding in cervical cytology and the agreement rate between the presence of abnormal bacterial microbiota in cervical cytology and growth of pathogenic bacteria in cervical secretion culture was poor. The findings of inflammation in cervical cytology was common in the samples with abnormal bacterial microbiota and their presence in samples with normal microbiota suggests causes of non-

infectious origin but causes of infectious origin cannot be excluded. In contrast, the presence of abnormal bacterial flora without inflammation in the cervical cytology samples suggests that these bacteria are not necessarily pathogenic. The low frequency of signs and symptoms and the limited number of samples of this study did not allow a reliable analysis of the association between growth of pathogenic bacteria in the cervical secretion culture and its possible clinical consequences.

KEYWORDS: cervical cytology, cervical secretion culture, automated method of bacterial identification.

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Lactobacillus</i> spp. (Bacilos de Dorderlein), citologia cervical (setas pretas).	19
Figura 2. Estruturas fúngicas (pseudohifas) - <i>Candida</i> spp. (setas pretas).....	19
Figura 3. Alterações citológicas.)	20
Figura 4. “Clue cell” e cocos e bacilos.....	22
Figura 5. Microscopia de contraste de fase (400x) de secreção vaginal de pacientes com vaginite aeróbica..	23
Figura 6. Aspectos da mucosa com vaginite aeróbica. A. Mucosa com ulceração extensa.....	24
Figura 7. Tipos morfológicos de bactérias.	25
Figura 8. Meios de cultura.....	26
Figura 9. Cartão G.P utilizado.....	27
Figura 10. Equipamento Vitek 2 utilizado.	27
Figura 11. Frasco estéril Stuart.....	31
Figura 12 Cartões (ID) VITEK®2 G.P Gram positivos.....	33
Figura 13. Distensão citológica pela espátula de Ayre.....	33
Figura 14. Coletores para citologia.....	33
Figura 15. Frasco com fixador.....	34
Figura 16 Crescimento de bactérias.....	36
Figura 17. <i>Lactobacillus</i> spp.....	38
Figura 18. <i>Microbiobacteriana</i>	39

Figura 19. Microbiota.....	40
Figura 20. Atrofia e inflamação.....	42
Figura 21. Inflamação com numerosos neutrófilos.....	43
Figura 22. Microbiota bacteriana anormal (<i>Lactobacillus sp.</i>) em amostra com crescimento de <i>Streptococcus agalactiae</i> na cultura de secreção cervical.....	45
Figura 23. Microbiota bacteriana anormal (Cocos e/ou outros bacilos).....	46
Figura 24. Microbiota bacteriana anormal.....	47
Figura 25. Inflamação com cocos dispostos em cordões.....	49
Figura 26. Inflamação com microbiota bacteriana normal.....	50
Figura 27. Inflamação com neutrófilos, cocos e/ou outros bacilos formando cordões.	51
Figura 28. Presença ou ausência de inflamação.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios de Donders para o diagnóstico microscópico de vaginite aeróbica	23
Tabela 2 - Bactérias identificadas através de cultura/VITEK 2 de amostra cervical..	36
Tabela 3- Microbiota bacteriana identificada na citologia de amostra cervical.	37
Tabela 4- Alterações celulares na citologia cervical.....	41
Tabela 5 - Frequência de resultados concordantes e discordantes entre microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2	43
Tabela 6 - Associação entre microbiota bacteriana e inflamação na citologia	48
Tabela 7- Associação entre crescimento de bactérias patogênicas identificado através da cultura/VITEK 2 e inflamação detectada na citologia de secreção cervical.....	50
Tabela 8- Aspectos clínicos das pacientes de acordo com a presença e ausência crescimento de bactérias patogênicas na Cultura/VITEK 2 de amostra cervical.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS.....	Ágar Sangue
ASC-H.....	Células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau.
ASC-US.....	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CEP-FM.....	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB.
DGGE.....	Eletroforese em gel gradiente desnaturante
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
FISH.....	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
GBS.....	<i>Streptococcus</i> do Grupo B
HPV.....	<i>Human Papilloma vírus</i>
HUB.....	Hospital Universitário de Brasília.
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
LIEAG.....	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LIEBG.....	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MC.....	Mac Conkey
PCR.....	Reação em cadeia da Polimerase
RNA.....	Ácido ribonucleico
SUS.....	Sistema Único de Saúde
TCLE.....	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T-RFLP.....	Polimorfismo do comprimento e com posição de fragmentos terminais de restrição

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Citologia cervical	18
1.1.1. Microbiota normal	18
1.1.2. Microbiota anormal	19
1.1.3. Vaginose bacteriana.....	21
1.1.4. Vaginite aeróbica.....	22
1.2. Cultura e identificação de bactérias	24
1.2.1. Morfologia das bactérias	24
1.2.2. Meios de cultura: preparo e utilização	25
1.2.3. Sistema de identificação automatizado VITEK 2	26
1.2.4. Sistemas de identificação molecular	27
1.2.5. Bactérias identificadas na secreção vaginal.....	28
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MÉTODO.....	31
4.1. Amostra.....	31
4.2. Coleta.....	31
4.3. Cultura.....	32
4.4. Identificação das espécies de bactérias.....	32
4.5. Citologia cervical	33
4.5.1. Coleta e preparo das lâminas.....	33
4.5.2. Análise de lâminas	34
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6. RESULTADOS	36
6.1. Espécies bacterianas identificadas na cultura/VITEK de secreção cervical.....	36
6.2. Citologia Cervical	37
6.2.1. Microbiota.....	37
6.2.2. Alterações celulares	41

6.3. Concordância entre microbiota bacteriana anormal na citologia e na cultura/VITEK.....	43
6.4. Associação entre microbiota bacteriana e inflamação na citologia cervical	48
6.5. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e inflamação na citologia de secreção cervical	50
6.6. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK2 e aspectos clínicos	53
7. DISCUSSÃO	55
7.1. Crescimento e espécies de bactérias identificadas na cultura/VITEK de secreção cervical.....	55
7.2. Citologia cervical	56
7.2.1. Microbiota e alterações celulares	56
7.2.2. Concordância entre microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK de amostra cervical.....	57
7.2.3. Associação entre microbiota bacteriana e inflamação na citologia de secreção cervical.....	58
7.2.4. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e aspectos clínicos	59
7.3. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e aspectos clínicos.....	60
8. CONCLUSÕES	61
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Citologia cervical

Atualmente, cerca de 12 milhões de exames citológicos cervicais são realizados anualmente no âmbito do Programa de Controle do Câncer do Colo do Útero do Sistema Único de Saúde (SUS). O intervalo entre os exames deve ser de três anos, após dois exames negativos consecutivos anuais. O início da coleta deve ser aos 25 anos de idade para as mulheres que já tiveram atividade sexual e os exames devem seguir até os 64 anos e serem interrompidos quando, após essa idade, as mulheres tiverem pelo menos dois exames negativos consecutivos nos últimos cinco anos. Além de ser um método de rastreamento do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras, o exame citológico cervical detecta inflamação e agentes infecciosos (Diretriz brasileira *para o rastreamento* do Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer de José Alencar Gomes Silva – INCA, 2012; Salomon e Nayar, 2015).

1.1.1. Microbiota normal

A microbiota vaginal/cervical é um sistema complexo e dinâmico de vários micro-organismos em quantidade e proporções diferentes.

A microbiota bacteriana vaginal/cervical surge logo após o nascimento, com o aparecimento de lactobacilos que persistem por várias semanas. Uma microbiota mista de cocos e bacilos prevalece, em seguida, até a puberdade. Na puberdade, os lactobacilos reaparecem em grande número e predominam até a menopausa. Após a menopausa, os lactobacilos diminuem em número novamente e reaparece uma microbiota mista. Tais diferenças devem-se à variação nos níveis de estrogênio, o qual estimula a produção de glicogênio ao longo da vida da mulher. Além disso, a microbiota vaginal/cervical varia de acordo com muitos fatores, como o ciclo menstrual, o uso de contraceptivos hormonais, o uso de antibióticos, a terapia de reposição hormonal, a gravidez, presença de corpos estranhos, etc. (Donder, 2007)

Os lactobacilos (Fig.1) são os microrganismos mais prevalentes na microbiota normal da maioria das mulheres em idade fértil e diminuem o risco de infecção por outros microorganismos por diferentes mecanismos, tais como produção de substâncias nocivas (ácido láctico, H_2O_2 e bacteriocinas) e competição pelos receptores nas células epiteliais da mucosa, (Spurbeck e Arvidson, 2011). A descamação contínua das células epiteliais e a produção de imunoglobulinas são

fatores associados ao hospedeiro e também são importantes mecanismos de controle para infecções. As espécies de lactobacilos mais comumente isoladas são *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. Jensenii*, *L. Gasseri* e *L. Iners* (Donder, 2007).

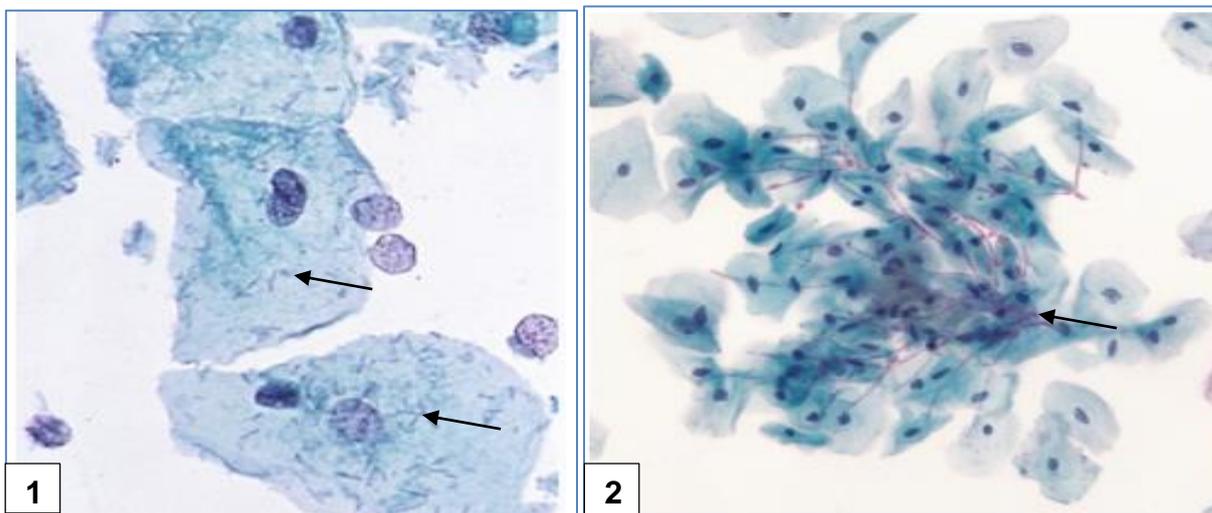


Figura 1. *Lactobacillus* spp. (Bacilos de Dorderlein), citologia cervical (setas pretas).

Figura 2. Estruturas fúngicas (pseudohifas) - *Candida* spp. (setas pretas).

FONTE: (Solomon, Nayar e Wilbur 2015)

1.1.2. Microbiota anormal

Diferentes tipos de microrganismos podem ser identificados na citologia cervical, sendo os mais frequentes *Candida* spp. (Fig. 2) *Trichomonas vaginalis* sp. (Fig.3 A) *Actinomyces* sp. (Fig.3 B) cocos e outros bacilos (Fig.3 D). Alterações citológicas (efeito citopático) sugestivo de infecções específicas como, por exemplo, a infecção por vírus *Herpes simplex* (Fig.3 C), por *Human Papilloma vírus* (HPV) (Fig. 3 E) e por (*Chlamydia trachomatis*) também podem ser identificadas na citologia cervical (Solomon e Nayar 2015; INCA, 2012 e Arora, 2014 et al).

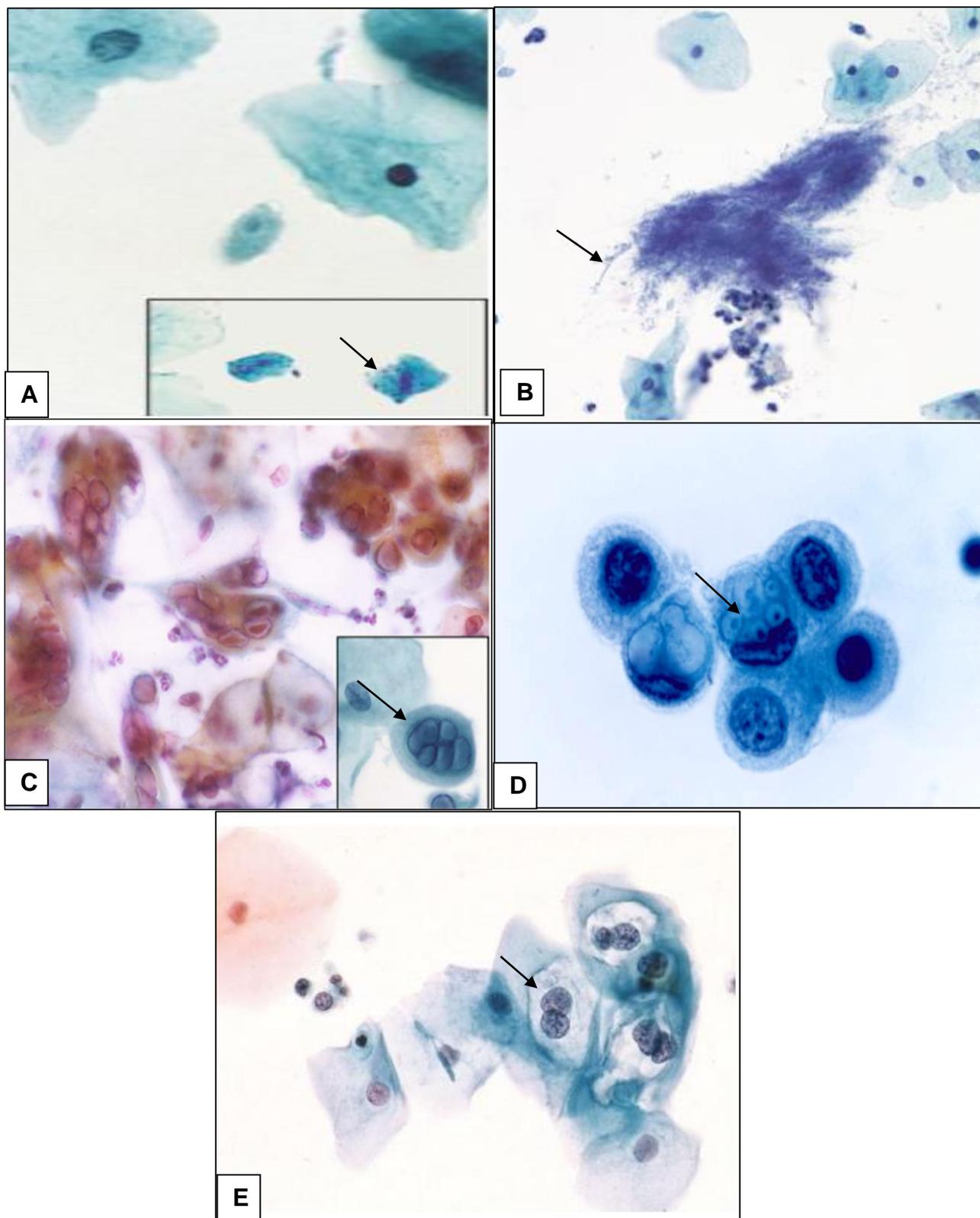


Figura 3. Alterações citológicas. (Setas pretas nas legendas). A. Organismos com núcleo excêntrico e grânulos eosinofílicos citoplasmáticos consistentes com *Trichomonas vaginalis* sp. B. Bactérias filamentosas morfologicamente consistentes com *Actinomyces* sp. C. Alterações celulares (efeito citopático) consistente com infecção por vírus *Herpes simplex* spp. Células gigantes multinucleadas, núcleos com aspecto de vidro fosco e inclusões nucleares eosinofílicas. D. Corpos de inclusão cocóide dentro de vacúolos na região perinuclear; E. Alterações celulares (efeito citopático) consistente com infecção por HPV. Células halo perinuclear e binucleação.
FONTE: (Solomon, Nayar, Wilbur 2015)

1.1.3. Vaginose bacteriana

A vaginose bacteriana é uma alteração comum da microbiota em mulheres em idade reprodutiva, caracterizada pela presença de numerosas e diferentes bactérias, geralmente anaeróbicas, incluindo *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* sp. *Bacteroides* sp. *Mobiluncus*, sp. *Atopobium vaginalis* sp, *Megasphaera* sp. Estas e outras bactérias associadas são correlacionadas com a vaginose bacteriana cujas siglas são BVAB1, BVAB2, BVAB3. (Shipitsyna, 2013 et al).

Várias complicações obstétricas e ginecológicas estão associadas a vaginose bacteriana: parto prematuro, doença inflamatória pélvica, aumento da susceptibilidade à infecção por vários agentes patogênicos, tais como *Neisseria gonorrhoeae* sp., *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, HSV-2, HIV e associação com neoplasia intraepitelial (Gillet, 2012 et al; Hillier, 1995 et al; Sweet, 1995 et al; Wiesenfeld, 2003 et al; Cherpes, 2003 et al; Myer, 2005 et al; Cherpes, 2003 et al).

A cultura para *Gardnerella vaginalis* não é útil para o diagnóstico de vaginose bacteriana porque esta bactéria ocorre com frequência em vaginas de pacientes sem vaginose e também pode ser causada por outras bactérias. (Forsum, 2002 et al; Tokyol, 2004 et al).

Na prática clínica a vaginose bacteriana é diagnosticada usando os critérios Amsel e os critérios de Nugent. Os critérios Amsel incluem a presença de pelo menos três dos seguintes achados: corrimento vaginal homogêneo, ph vaginal superior a 4,5, odor de peixe após adicionar hidróxido de potássio e presença de “clue cells” (Fig.4) na microscopia. Os critérios de Nugent avaliam a proporção de lactobacilos em relação aos morfotipos de bactérias associadas à vaginose bacteriana em preparações coradas pelo gram. Uma alternativa para o diagnóstico da vaginose bacteriana é a citologia cervical, que tem como principal argumento a favor da sua utilização o fato de ser usada amplamente e periodicamente na rotina para o rastreamento do câncer do colo do útero (Discacciati, 2006 et al).

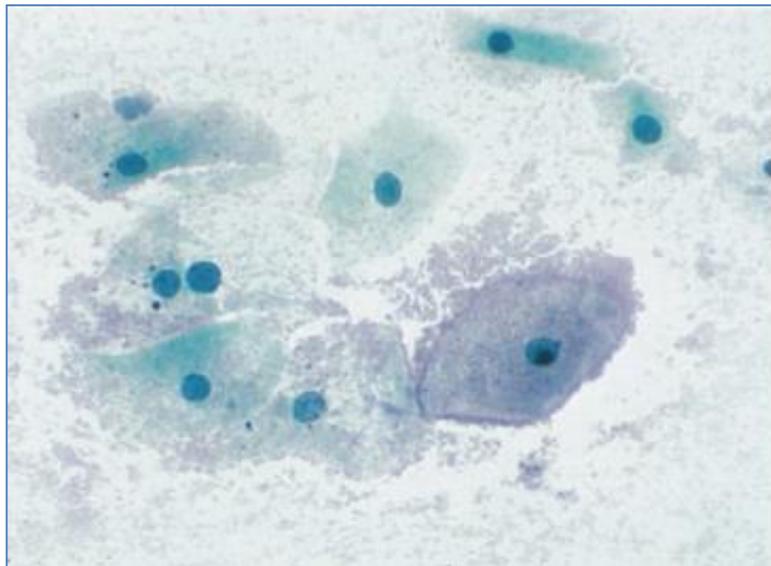


Figura 4. “Clue cell” e cocos e bacilos. **FONTE:** (Solomon, Nayar, Wilbur, 2015).

1.1.4. Vaginite aeróbica

Vaginite aeróbica é definida como uma alteração da microbiota constituída predominantemente por bactérias aeróbicas, associada a sinais de inflamação (Fig. 5) O diagnóstico microscópico de vaginite aeróbica (Tabela 1) é baseado nos cinco critérios microscópico de Donders que pontuam da seguinte forma (Donder, 2002 et al; Donder 2005 e et al) Fig.5 e Tabela 1:

- Ausente (0 ponto) se a flora do fundo for normal ou mostrar detritos e núcleos nus de células epiteliais lisadas (citólise)
- De 2 a 1 representa normalidade. Será 1 se os morfotipos lactobacilar forem muito espessos ou se assemelharem a pequenos bacilos (exceto lactobacilos) e 2 se houver cocos proeminentes ou cocos acorrentados visíveis.
- De 3 a 4 corresponde a ligeira vaginite aeróbia.
- De 5 a 6 para vaginite moderada
- Acima de 6 com no máximo 10 para vaginite aeróbia grave.
- Na prática, uma pontuação de 8 a 10 é geralmente chamada de "vaginite descamativa" e deve ser vista como a forma mais extrema de vaginite aeróbia.

Tabela 1- Critérios de Donders para o diagnóstico microscópico de vaginite aeróbica

Pontuação (VA)	Grau Lactobacilar (LBG)	Nº leucócitos	Proporção de leucócitos tóxicos	Flora de fundo	Proporção de epitélios parabasais PBC)
0	I e IIa	≤ 10/CGA	Ausente ou esporádica	Muito escassa ou citólise	Ausente ou <1%
1	IIb	≥10/CGA e ≤10/cel epit.	≤50% de leucócitos	Pequenos bacilos coliformes	≤10%
2	III	>10/cel epit.	>50% de leucócitos	Cocos ou cadeias	>10%

VA – vaginite aeróbica

Epit – epitelial

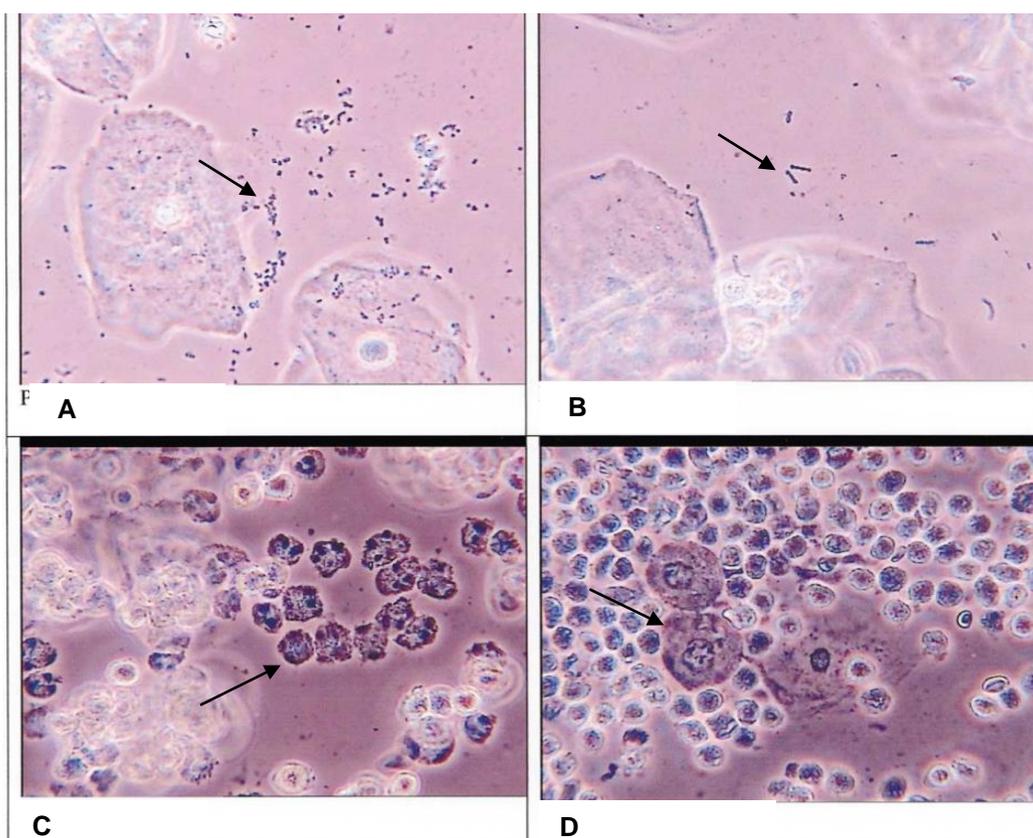


Figura 5. Microscopia de contraste de fase (400x) de secreção vaginal de pacientes com vaginite aeróbica. A. Microflora sem lactobacilos (grau III) e com bactérias cocoides. B. Cocos em cadeia, aspecto típico de vaginite aeróbica por estreptococos do grupo B. C. Leucócitos tóxicos com grânulos lisossômicos. D. Células parabasais. **FONTE:** (Donder, 2002 et al).

Bactérias entéricas, tais como *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp. do Grupo B (GBS) e os enterococos, estão associados a vaginite aeróbica (Donder, 2002 et al). As pacientes são assintomáticas ou apresentam sinais e sintomas, tais como corrimento amarelado (Fig.6B), ardência, dispaurenia (Donder, 2002 et al; Aiping 2013; Fan, Xue,2010). Ao exame clínico secreção amarelada, mucosa avermelhada e ulcerada podem ser observadas na parede vaginal anterior ao retirar o espécuro (Fig.6A) Donder, 2002 et al. Além disso, há maior predisposição a trabalho de parto prematuro, doenças sexualmente transmissíveis e infecção pelo HIV (Donder, 2002 et al; Carey, 2005; Donder, 2008 et al; Donder, 2009 et al; Donder, 2011 et al). O Estreptococo do Grupo B de Lancefield, também conhecido com *Streptococcus agalactiae*, tem sido associado a infecções em gestantes e recém-nascidos e considerado uma das principais causas da mortalidade neonatal, por isso existe a recomendação de realização da cultura para Estreptococo do Grupo B de rotina em todas as gestantes entre 35 e 37 semanas. (Lijoi, 2007 et al; Costa, 2013).

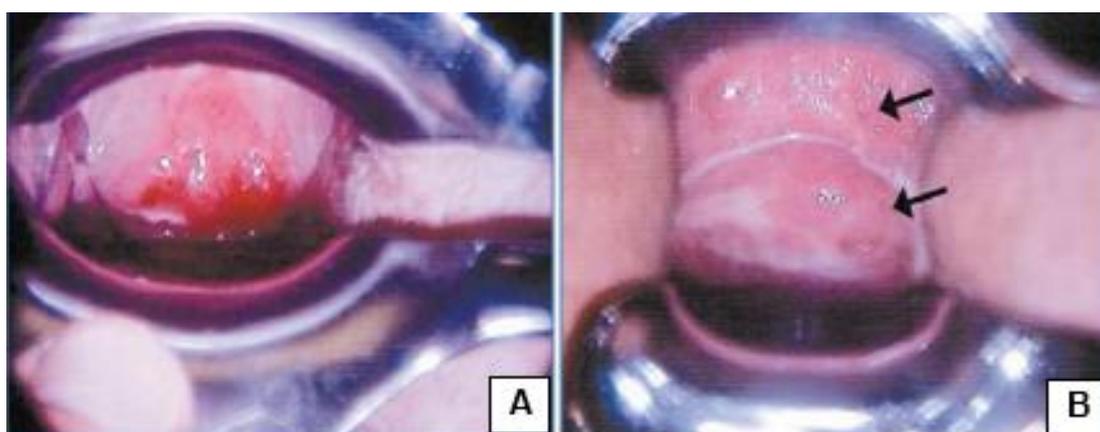


Figura 6. Aspectos da mucosa com vaginite aeróbica. A. Mucosa com ulceração extensa.

B. Corrimento amarelado com pequenas úlceras (setas). **FONTE:** (Donder, 2002 et al).

1.2. Cultura e identificação de bactérias

1.2.1. Morfologia das bactérias

A maioria das bactérias estudadas nos laboratórios de microbiologia mede de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro por 2,0 a 5,0 mm de comprimento e podem se apresentar em três tipos morfológicos fundamentais (Fig.7): bastonetes ou bacilos, espirilos e cocos. Os cocos podem formar diferentes arranjos, de acordo com a sua divisão celular: diplococos (cocos agrupados 2 a 2), estreptococos (vários cocos dispostos em cadeia, similar a um cordão), tétrades (grupos de 4 cocos unidos), sarcinas (grupos de 8 cocos

unidos, de forma semelhante a um cubo), estafilococos (cocos agrupados de forma aleatória, semelhante ao formato de um cacho de uvas). Os bastonetes (ou bacilos) na sua grande maioria se apresentam de forma isolada não se dispendo diferentes arranjos como os cocos (Nogueira, Miguel 2009).

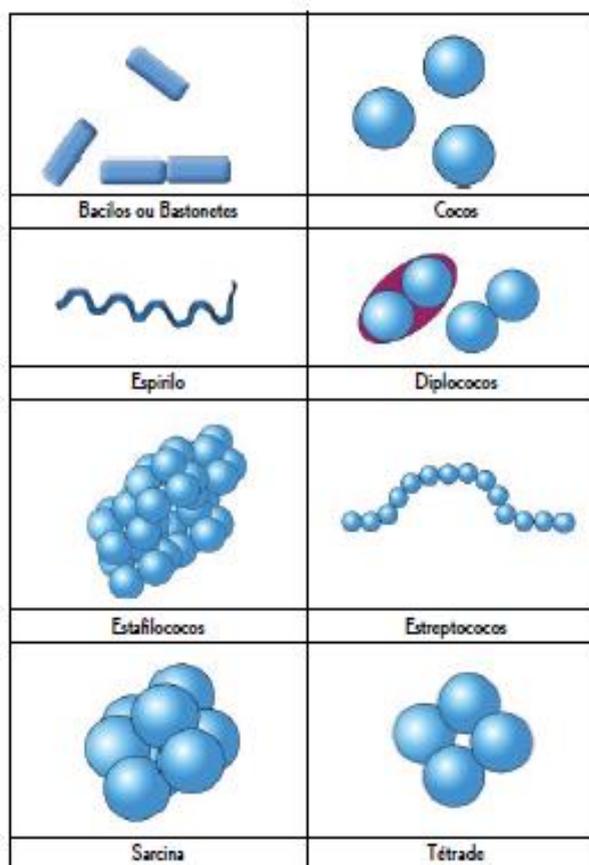


Figura 7. Tipos morfológicos de bactérias.

FONTE:<http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap3.pdf>. Data de acesso: 09/07/16

1.2.2. Meios de cultura: preparo e utilização

O cultivo dos microrganismos, em condições laboratoriais, é um pré-requisito para seu estudo adequado. O meio de cultura é qualquer substância sólida, semissólida ou líquida, que possua um conjunto de fontes de nutrientes e que seja utilizada para o cultivo de microrganismos. Podem ser classificados segundo o seu estado físico, em função da concentração de agentes solidificantes (ágar), pela sua composição e pelo seu objetivo de utilização. De acordo com o objetivo da utilização, são divididos em: **básicos** são de uso geral e podem servir de base no preparo de outros meios (ex.: caldo simples); **enriquecidos ou ricos** com adição de sangue (Fig.8A)

soro, extratos de tecidos animais ou vegetais ao caldo, ou ágar nutritivos passando a permitir o crescimento de organismos fastidiosos (ex.: ágar chocolate) (Fig.8B); **seletivos** que possuem adição de substâncias químicas específicas ao caldo ou ao ágar nutritivo prevenindo o crescimento de um grupo de bactérias específico, (ágar MacConkey (Figura 7. C), que impede crescimento de Gram-positivos (Nogueira, Miguel 2009).



Figura 8. Meios de cultura. A. Meio ágar sangue com colonização de organismos fastidiosos. **B.** Meio de ágar chocolate não seletivo, com colônias de bactérias (organismos anaeróbicos e cocos Gram positivos). **C.** Meio ágar MacConkey com colônias de bactérias Gram negativas. **FONTE:** Athiban, 2012

1.2.3. Sistema de identificação automatizado VITEK 2

O sistema VITEK 2 (Fig.10) (Biomérieux, França) foi introduzido no mercado em 1999 e sua capacidade de identificar e determinar a susceptibilidade microbiana tem sido avaliada em vários estudos (Wallet F, 2005 et al.; Chatzigeorgiou, 2011 et al).

O sistema está disponível em três formatos (VITEK 2 Compact, Vitek 2, e Vitek 2 XL) que diferem no aumento dos níveis de capacidade e automação. Todos os três sistemas acomodam os mesmos cartões reagentes colorimétricos que são incubados e interpretados automaticamente. O sistema é projetado e validado para ser usado a partir de colônias cultivadas em placas de cultura. Os cartões de reagentes têm 64 poços (Fig.9) que contém substratos para medir diversas atividades metabólicas como a acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e o crescimento na presença de substâncias inibidoras. Existem atualmente quatro cartões de reagentes disponíveis para a identificação de diferentes classes de micro-organismos como se segue: GN – bacilos Gram-negativos; GP - bacilos não-formadores de esporos e cocos Gram-positivos; YST - leveduras e BCL - bacilos Gram-positivos formadores de esporos. Uma variedade de sistemas automatizados para identificação de espécies bacterianas e teste de susceptibilidade antimicrobiana são disponíveis comercialmente. Dentre eles,

BD Phoenix system (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD.), VITEK 2 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), e MicroScan WalkAway 96 Plus, são os mais usados atualmente (He, 2016 et al; Snyder; Munier, Johnson, 2008; Chatzigeorgiou, 2011 et al).



Figura 9. Cartão G.P utilizado



Figura 10. Equipamento Vitek 2 utilizado.

1.2.4. Sistemas de identificação molecular

Diferentes técnicas têm sido empregadas na identificação de bactérias, tais como reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), 16S rDNA PCR, hibridização *in situ* por fluorescência (fluorescence in situ hybridization - FISH), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (terminal restriction fragment length polymorphism - T-RFLP), electroforese em gel desnaturante (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), etc. O gene bacteriano 16S rRNA é o mais comumente utilizado como meio de identificação por ser altamente conservado entre espécies e possuir várias regiões hiper variáveis que podem permitir a identificação do gênero e da espécie. Os produtos do 16S rDNA PCR podem ser analisados por T-RFLP e DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Enquanto T-RFLP e DGGE são técnicas úteis e econômicas, o sequenciamento direto de produtos do 16S rDNA PCR produz informação mais detalhada e com custos de sequenciamento diminuído, daí porque tornou-se a técnica mais comumente utilizada. (Rampersaud, Randis, Ratner, 2012).

Estes sistemas automatizados são amplamente utilizados em muitos laboratórios clínicos permitindo um aumento do número de amostras, adequada relação custo-benefício e uma terapia antimicrobiana específica rápida. Sistemas automatizados atuais para identificação de bactérias e teste de susceptibilidade permitem a geração

de resultados em 2 a 12 h e, em geral, proporcionam taxa de precisão semelhante a de ensaios tradicionais (Evangelista, Truant and Bourbeau, 2002; Ferraro, Jorgensen, 1999). Sistemas automatizados de identificação devem, idealmente, obter uma taxa de precisão de não menos do que 90% em comparação com métodos de referência (Carroll, Weinstein, 2007).

1.2.5. Bactérias identificadas na secreção vaginal

Meios de cultura não seletivos como ágar-sangue e ágar chocolate são os meios mais usados na cultura de secreção vaginal para promover o crescimento de bactérias (Donders, 2011 e Fan, 2010). *Streptococcus* do Grupo B (GBS), *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* e *Enterococos* sp. são as bactérias mais frequentemente isoladas (Donders, 2002 et al.; Donders, 2011; Donders, 2009; Jahic, 2013 et al). Em estudo prévio em que o sistema VITEK 2 (Biomerioux, Marcy l'Etoile, France) foi usado na identificação de bactérias da secreção vaginal, os autores relatam que as bactérias identificadas foram similares às relatadas por Donders, 2002.

2. JUSTIFICATIVA

Os critérios diagnósticos recomendados para as principais alterações da microbiota bacteriana vaginal/cervical, a vaginose bacteriana e a vaginite aeróbica, são respectivamente os critérios de Amsel/Nugent e os critérios de Donders. Estes critérios têm como vantagens a possibilidade de definir o diagnóstico no momento da consulta médica das pacientes e o custo baixo. Em contrapartida, eles demandam um maior tempo de atendimento, estrutura e experiência em microscopia, motivo pelo qual não são rotineiramente empregados nos ambulatórios de ginecologia.

As infecções cérvico-vaginais estão entre as causas mais comuns de busca por atendimento médico. No SUS o diagnóstico geralmente é realizado através do exame clínico e da citologia cervical, que, apesar de não ser considerada referência laboratorial é de custo baixo e execução fácil, sendo rotineiramente empregada na prevenção do câncer de colo de útero. A cultura de secreção vaginal e os diferentes métodos moleculares de identificação de microrganismos são considerados de referência no diagnóstico das infecções genitais, entre elas as bacterianas, mas são empregados apenas em situações específicas. Uma das principais indicações clínicas da cultura da secreção vaginal é a identificação de *Streptococcus agalactiae* spp., também conhecido como estreptococo do grupo B, bactéria associada a trabalho de parto prematuro em gestantes.

A concordância entre citologia cervical e a cultura de secreção vaginal na detecção de microbiota bacteriana anormal ainda não está bem definida na literatura. Além disso, há poucos trabalhos na literatura sobre associação desta microbiota bacteriana anormal detectada na citologia com inflamação e sinais e sintomas ginecológicos apresentados por pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a frequência de microbiota bacteriana anormal em secreção cervical através da citologia e cultura/VITEK, verificando a concordância entre estes métodos diagnósticos e a associação da microbiota bacteriana anormal com achado da inflamação na citologia e aspectos clínicos.

3.2. Objetivos específicos

1. Verificar a frequência de crescimento de bactérias patogênicas em cultura de secreção cervical.
2. Verificar as espécies de bactérias e suas frequências na cultura de secreção cervical através do sistema VITEK.
3. Verificar a frequência de microbiota bacteriana anormal na citologia de secreção cervical.
4. Analisar a taxa de concordância entre a citologia e a cultura/VITEK na identificação de microbiota bacteriana anormal de amostra cervical.
5. Avaliar a associação entre microbiota bacteriana anormal e inflamação na citologia cervical.
6. Avaliar a associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e inflamação atestada na citologia de secreção cervical.
7. Avaliar a associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 da secreção cervical e aspectos clínicos das pacientes.

4. MÉTODO

4.1. Amostra

O presente trabalho constitui-se em um estudo observacional, transversal, no qual foram colhidas 55 amostras citológicas cervicais de pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) nos anos de 2015 e 2016. As pacientes foram submetidas ao exame clínico e colposcópico realizado por uma ginecologista e a um questionário estruturado cujos dados observados visavam uma melhor análise na formulação do diagnóstico (APENDICE A). Só participaram da pesquisa as pacientes que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Tem que colocar em anexo). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FS conforme documento em (ANEXO A).

➤ Critérios de Inclusão

Pacientes maiores do que 18 anos, que não sejam de origem indígena, não apresentem nenhum déficit mental, não estejam em uso prévio de antibiótico ou antifúngico ou que não se neguem a assinar o TCLE.

➤ Critérios de Exclusão

Pacientes menores do que 18 anos, indígenas, incapazes, que estavam em uso prévio de antibiótico e antifúngico ou que se neguem a assinar o TCLE.

4.2. Coleta

As amostras obtidas do colo do útero por meio de coleta com “swab” (Fig. 11) foram armazenadas em tubo de ensaio estéril contendo meio de transporte de Stuart e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do HUB.



Figura 11. Frasco estéril Stuart

4.3. Cultura

As amostras foram cultivadas em diferentes meios para obtenção do crescimento das bactérias patogênicas mais prováveis e testes laboratoriais de rotina foram usados na identificação dos microrganismos. Usou-se método quantitativo, no qual as culturas são semeadas nos meios de ágar-sangue e ágar-chocolate.

➤ Técnica:

Swabs cervicais foram semeados em ágar sangue, ágar chocolate, ágar MacConkey e caldo de enriquecimento tioglicolato. Os meios de cultura foram incubados durante 24 - 48 horas, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Quando os meios de cultura apresentavam crescimento microbiano após o período de incubação, era realizado o isolamento primário. Se estas placas não apresentavam qualquer crescimento de microrganismo, o caldo tioglicolato era semeado em ágar sangue, ágar chocolate e ágar MacConkey por igual período de incubação. As placas foram avaliadas e caso não fosse detectado qualquer tipo de crescimento, o resultado era liberado como cultura negativa.

4.4. Identificação das espécies de bactérias

As placas com crescimento seguiam para as etapas subsequentes de identificação (painéis GN ou GP) e determinação da suscetibilidade (painéis AST-GN ou AST-GP) por método automatizado (automação Vitek 2 - BiomeriêuX);

As recomendações do fabricante do produto para inoculação e incubação dos painéis foram rigorosamente seguidas. Após 18-24 horas de incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ no aparelho, os painéis foram lidos automaticamente no sistema VITEK 2 (BiomeriêuX®).

Cartões (ID) VITEK®2 GN e GP contendo micro poços com substratos de identificação foram utilizados na identificação de bacilos gram-negativos (GN) e gram-positivos (GP), respectivamente. Os cartões de ID VITEK® 2 GN identificam 150 bactérias Gram-negativas *Enterobacteriaceae sp.*, não *Enterobacteriaceae sp.* e organismos de alta patogenicidade. Os Cartões VITEK® 2 GP ID identificam 120 espécies de bactérias gram-positivas de importância clínica. As listas das bactérias que podem ser identificadas através dos cartões (Fig 12) de ID VITEK® 2 GN e GP estão dispostas em ANEXO B.

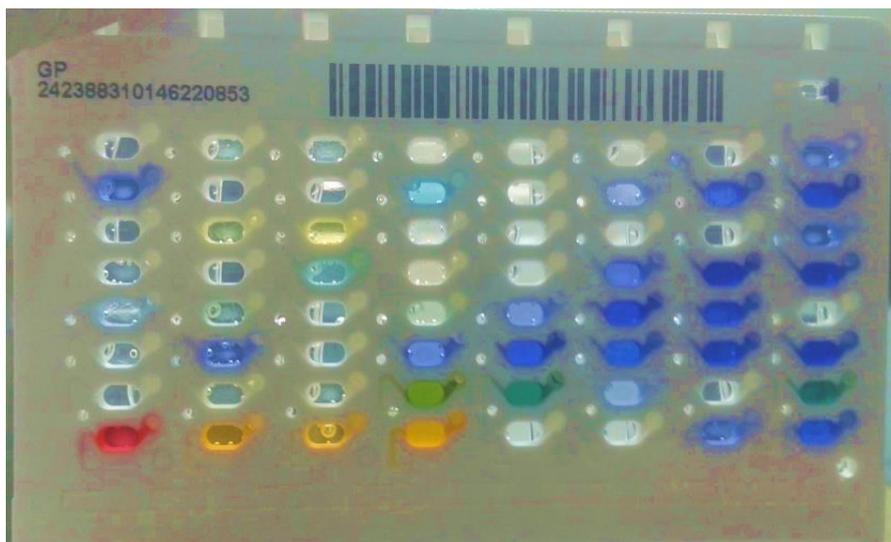


Figura 12 Cartões (ID) VITEK®2 G.P Gram positivos.

4.5. Citologia cervical

4.5.1. Coleta e preparo das lâminas

As amostras foram obtidas do colo do útero por meio de coleta com “swab”, sendo a coleta feita no ecto e endocervice (Fig. 13). Uma vez coletado o material foram feitos esfregaços citológicos realizando-se a distensão da secreção colhida sobre as lâminas (Fig.14). Posteriormente o material foi fixado em álcool 95%. (Fig.15) Uma vez fixadas as lâminas foram imediatamente coradas pelo método de Papanicolaou.



Figura 13. Distensão citológica pela espátula de Ayre.



Figura 14. Coletores para citologia esfoliativa

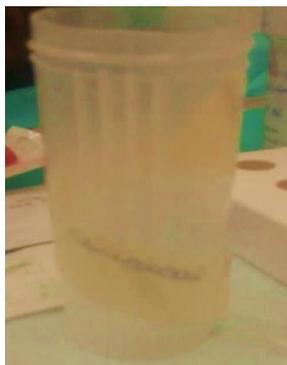


Figura 15. Frasco com fixador

4.5.2. Análise de lâminas

A classificação dos resultados citológicos foi realizada utilizando a nomenclatura do Sistema Bethesda 2014 e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC) ANEXO 3.

A microbiota foi considerada normal na presença de bactérias compatíveis com *Lactobacillus* spp. A microbiota foi considerada anormal na presença de cocos, bacilos curtos, bacilos supracitoplasmáticos, pseudohifas e esporos de *Candida* spp, *Actinomyces* spp, *Trichomonas vaginalis*. Efeitos citopáticos sugestivos de infecção por Herpes vírus e HPV também foram avaliados. A microbiota bacteriana foi considerada anormal na presença de cocos e bacilos curtos. A presença de “clue cells” (células escamosas revestidas por coco/bacilos ou bacilos supracitoplasmáticos e com limites celulares mal definidos) foi sugestiva de infecção por *Gardnerella/Mobiluncus*.

A inflamação foi considerada quando observou-se número ≥ 10 leucócitos por células epiteliais e alterações celulares de origem inflamatória (binucleação, vacuolização citoplasmática, policromasia citoplasmática, atrofia) (Jahic, 2013 et al). Quando foram observadas atipias celulares associadas a inflamação estas foram classificadas segundo o sistema de Bethesda em células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células escamosas atípicas em que não é possível excluir uma lesão de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) e lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEBG). Salientando que as lesões com os diagnósticos de ASC-US ou ASC-H podem ser causadas somente por um processo inflamatório enquanto que as LIEBG e LIEBG são tumorais “*in situ*” (Solomon, Nayar, 2004).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) foi utilizado nas análises estatísticas considerando-se o nível de significância de $p < 0,05$. O teste de Fisher foi usado nas análises de associação. O teste t com correção de Welch foi utilizado para comparação entre as médias de variáveis quantitativas paramétricas e o teste de Mann Whitney para comparação entre as medianas de variáveis quantitativas não-paramétricas. O coeficiente kappa foi usado para a análise do nível de concordância: 0,01-0,20 concordância pobre, 0,21- 0,40 concordância fraca, 0,41-0,60 concordância moderada, 0,61-0,80 concordância substancial e 0,81-,99 concordância quase perfeita. (Viera, Garrett, 2005; Fan, Xue, 2010).

6. RESULTADOS

6.1. Espécies bacterianas identificadas na cultura/VITEK de secreção cervical

O Crescimento de bactérias patogênicas foi detectado em 45,45% (25/55) das amostras cervicais submetidas à cultura/VITEK (Fig.16). Um total de oito espécies diferentes foram identificadas (Tabela 2). As espécies isoladas mais frequentemente foram *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis* (20% e 12,72% do total das amostras, respectivamente). Apenas uma espécie de bactéria foi isolada por amostra, com a exceção de uma amostra em que 3 bactérias foram identificadas.

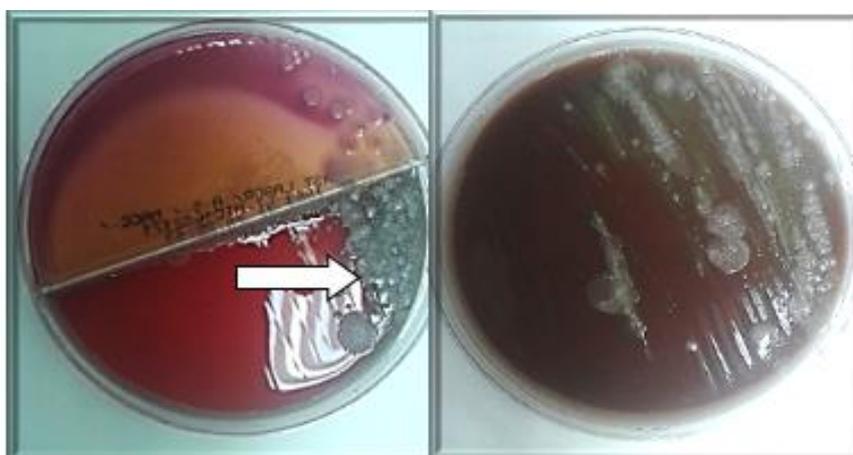


Figura 16 Crescimento de bactérias

Tabela 2 - Bactérias identificadas através de cultura/VITEK 2 de amostra cervical

ESPÉCIE/BACTÉRIA	AMOSTRAS (N=55)	%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	11	20,00%
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	12,72%
<i>Escherichia Coli</i>	3	5,45%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	3,63%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1,81%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1,81%
<i>Proteus Mirabilis</i>	1	1,81%
<i>klebisiella pneumoniae</i>	1	1,81%

6.2. Citologia Cervical

6.2.1. Microbiota

A microbiota identificada na citologia cervical é apresentada na Tabela 3. A microbiota mais frequente foi o *Lactobacillus* sp (Fig.17). Cocos e/ou outros bacilos foram detectados em 52,72 % (29/55) das amostras (Fig. 18). *Candida* sp. foi identificada em 12,72% (7/55) das amostras e bacilos supra citoplasmáticos (“clue cells”, sugestivas de Vaginose bacteriana) em 7,27% (4/55) das amostras (Fig. 19). *Trichomonas vaginalis*, *Actinomyces* sp., efeitos citopáticos sugestivos de infecção por *Chlamydia* sp. e por vírus do grupo *Herpes* não foram observados.

Tabela 3- Microbiota bacteriana identificada na citologia de amostra cervical.

MICROBIOTA	N=55	%
<i>Lactobacillus</i> sp.	22	40%
<i>Lactobacillus</i> sp.+ <i>Candida</i> sp	4	7,27%
Microbiota bacteriana anormal		
Cocos e/ou outros bacilos	13	23,63%
Cocos e/ou outros bacilos+ <i>Lactobacillus</i> sp.	9	16,36%
Cocos e/ou outros bacilos + Bacilos supracitoplasmáticos	4	7,27%
Cocos e/ou outros bacilos + <i>Lactobacillus</i> sp.+ <i>Candida</i> sp.	3	5,45%

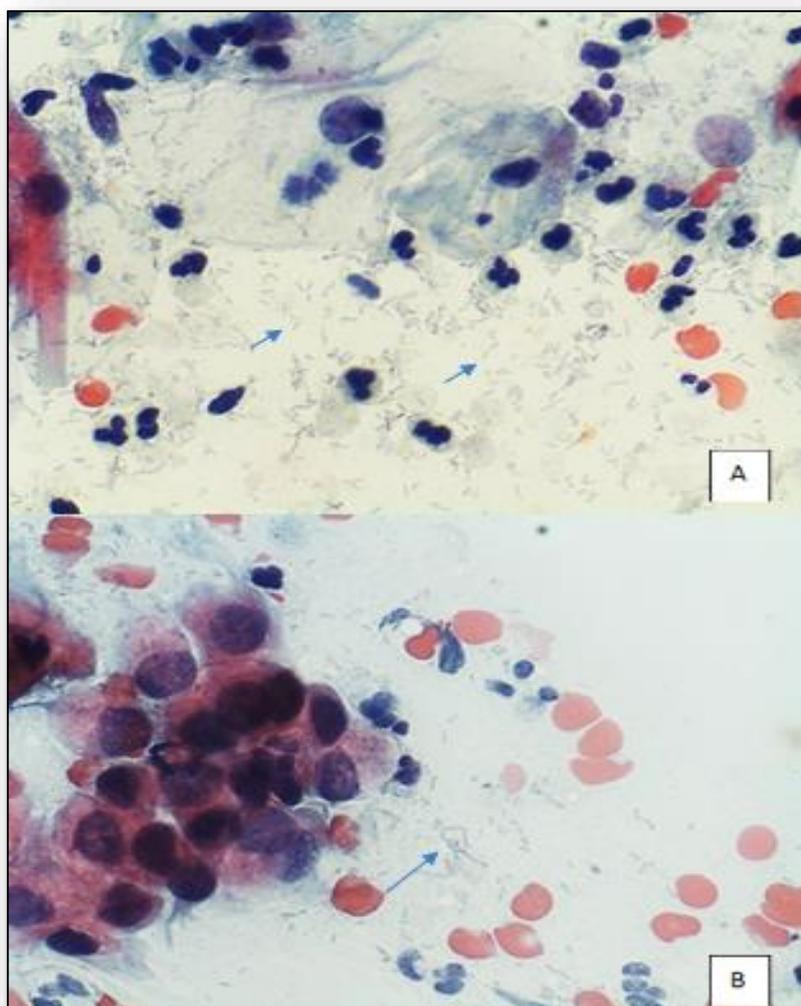


Figura 17. *Lactobacillus* spp. (setas azuis). **A.** Ectocervical. **B.** Endocervice. Papanicolaou, 400x.

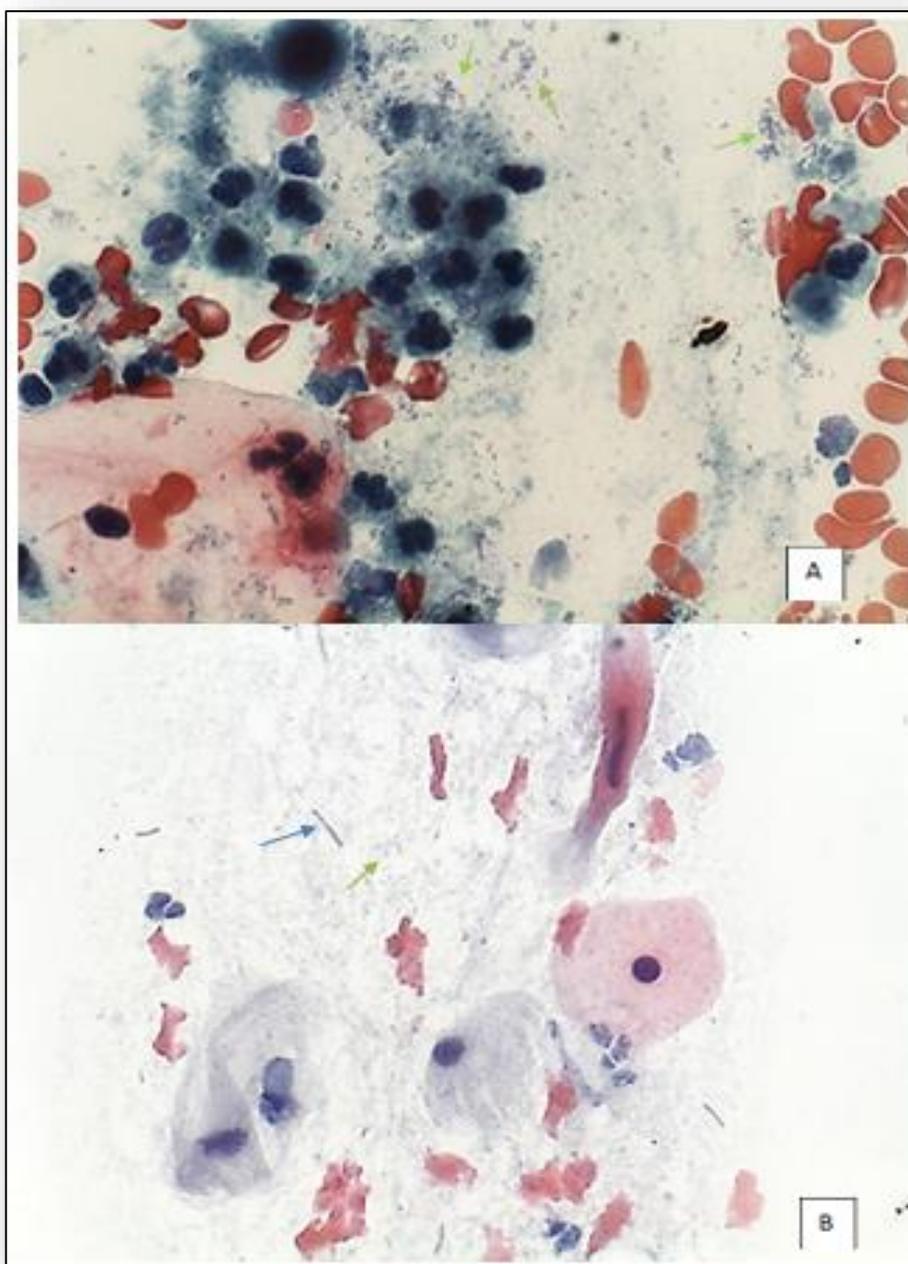


Figura 18. *Microbioba bacteriana*. A. Cocos e/ou outros bacilos (seta verde). B. Cocos e/ou outros bacilos (seta verde) + *Lactobacillus* spp. (seta azul). Papanicolaou, 400x.

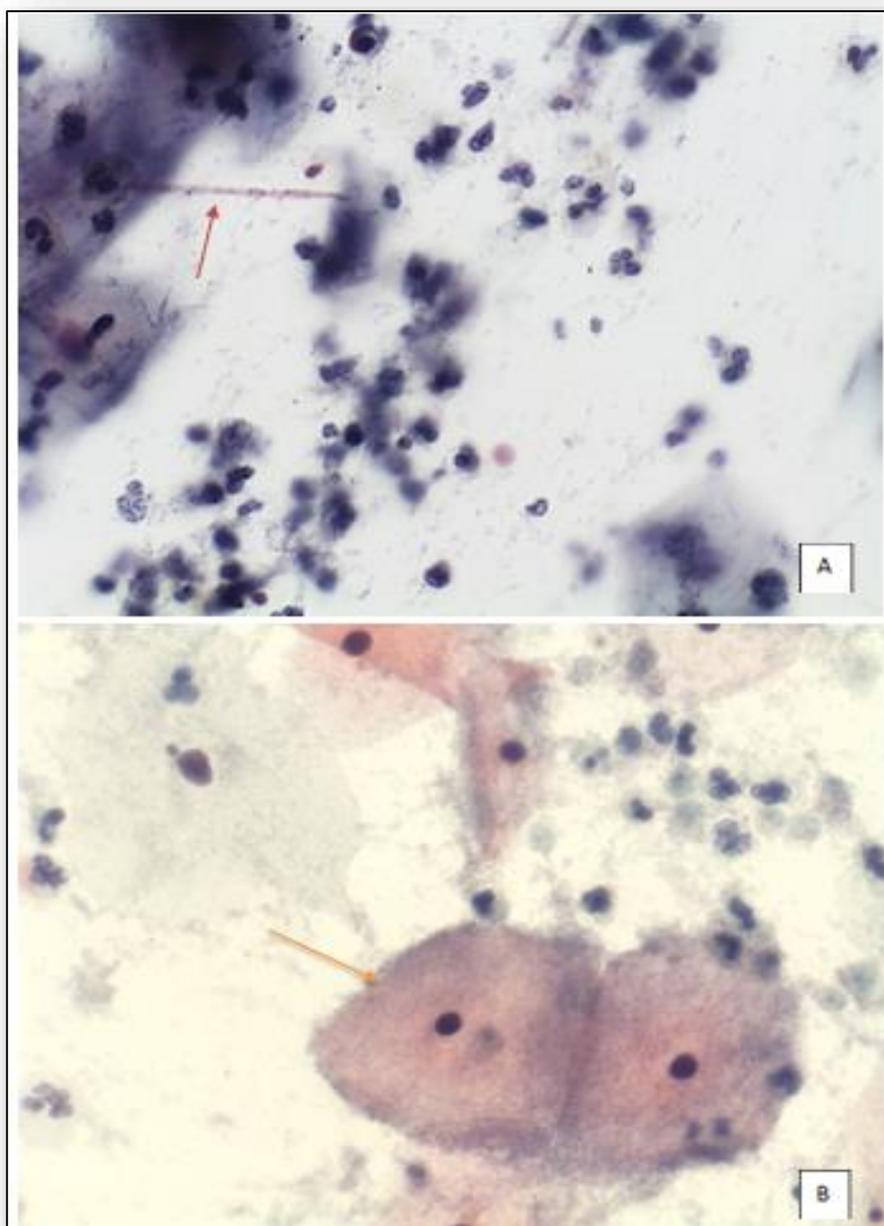


Figura 19. Microbiota. A. Cocos e/ou outros bacilos + *Lactobacillus* + *Candida* (seta vermelha). B. Cocos e/ou outros bacilos + Bacilos supracitoplasmáticos, “clue cell” (seta laranja). Papanicolaou, 400x.

6.2.2. Alterações celulares

As alterações celulares na citologia cervical encontram-se apresentadas na Tabela 4. A inflamação foi à alteração celular mais frequente sendo observada em 78,18% (43/55) das amostras (Fig. 20).

Tabela 4- Alterações celulares na citologia cervical

ALTERAÇÕES CELULARES	N=55	%
Dentro dos limites da normalidade	10	18,18%
Inflamação	35	63,63%
Atrofia com inflamação	4	7,27%
Inflamação e ASC-US	3	5,45%
Inflamação ASC-H	1	1,81%
LIEBG	1	1,81%
LIEAG	1	1,81%

LIEBG - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; **LIEAG** - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

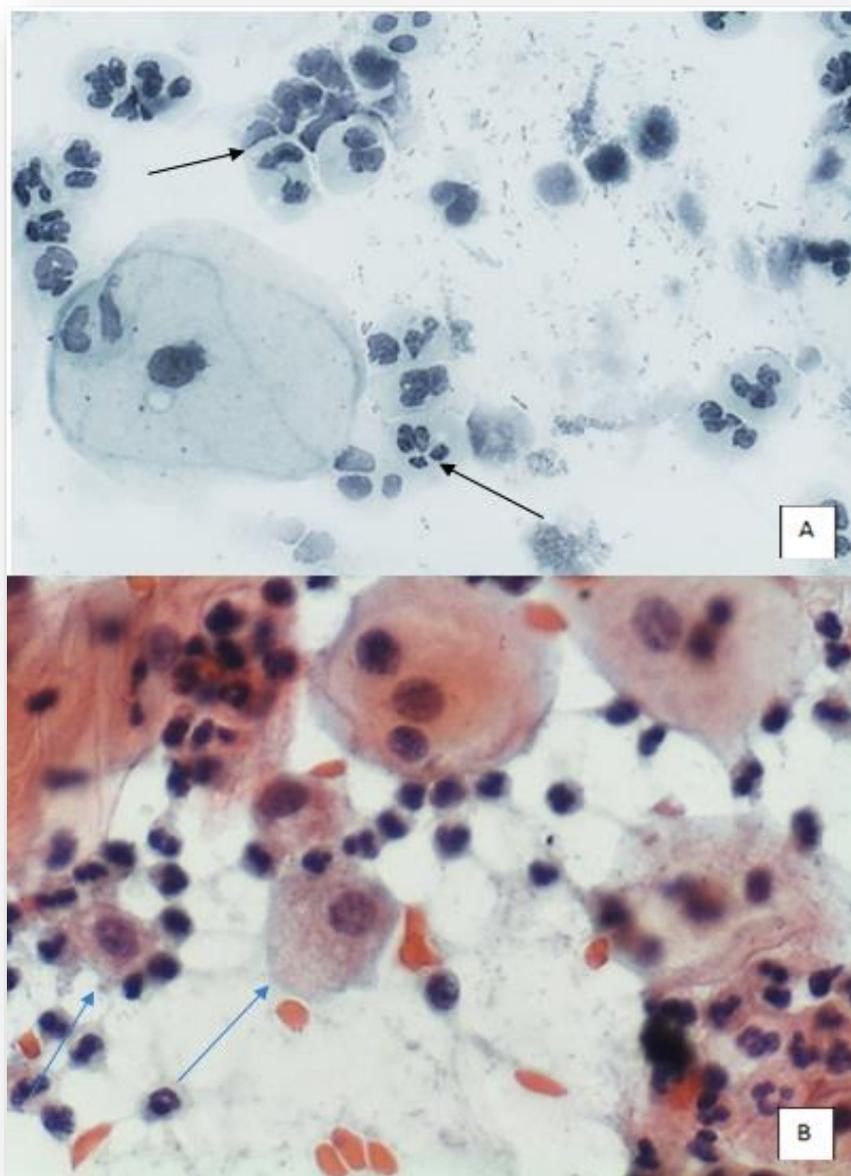


Figura 20. Atrofia e inflamação. A. Inflamação com numerosos neutrófilos (seta preta). **B.** Atrofia com inflamação com células parabasais (seta azul). Papanicolaou, 400x

6.3. Concordância entre microbiota bacteriana anormal na citologia e na cultura/VITEK

A concordância entre microbiota bacteriana anormal (presença de cocos e/ou outros bacilos) na citologia e o crescimento (Fig. 21) de bactérias patogênicas na cultura/VITEK foi de 60% (Kappa= 0,2) (Tabela 5). Em 23,63% (13/55) das amostras, a microbiota bacteriana na citologia era anormal, mas não houve crescimento bacteriano e em 16,36% (9/55) das amostras houve crescimento bacteriano, mas a microbiota era normal (Fig. 22, 23,24).

Tabela 5 - Frequência de resultados concordantes e discordantes entre microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2

MICROBIOTA BACTERIANA ANORMAL	CRESCIMENTO NA CULTURA/VITEK 2		TOTAL
	Presente	Ausente	
Presente	16	13	29
Ausente	9	17	26
Total	25	30	55

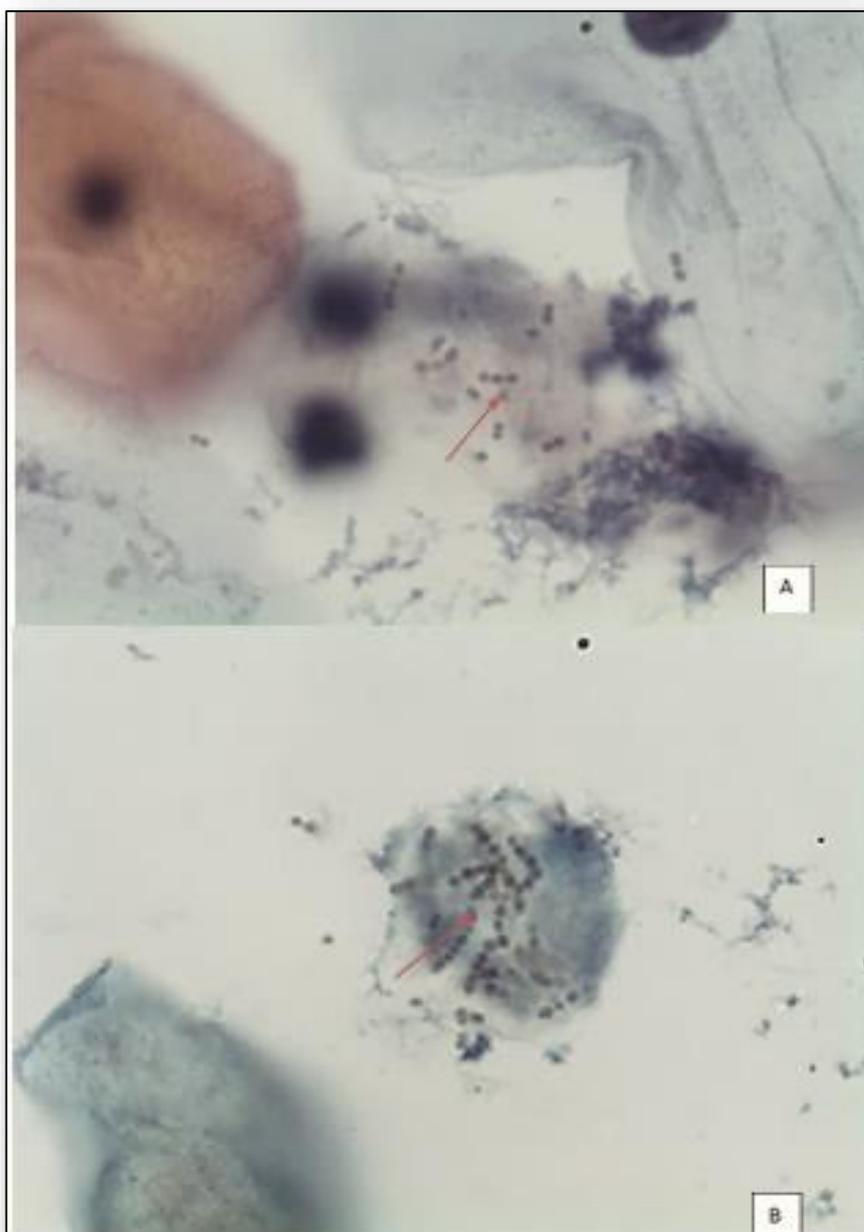


Figura 21. Microbiota bacteriana anormal com cocos em cordões (seta vermelha) em amostra com crescimento de *Streptococcus agalactiae* spp. na cultura de secreção cervical. (A e B). Papanicolaou, 1000x.

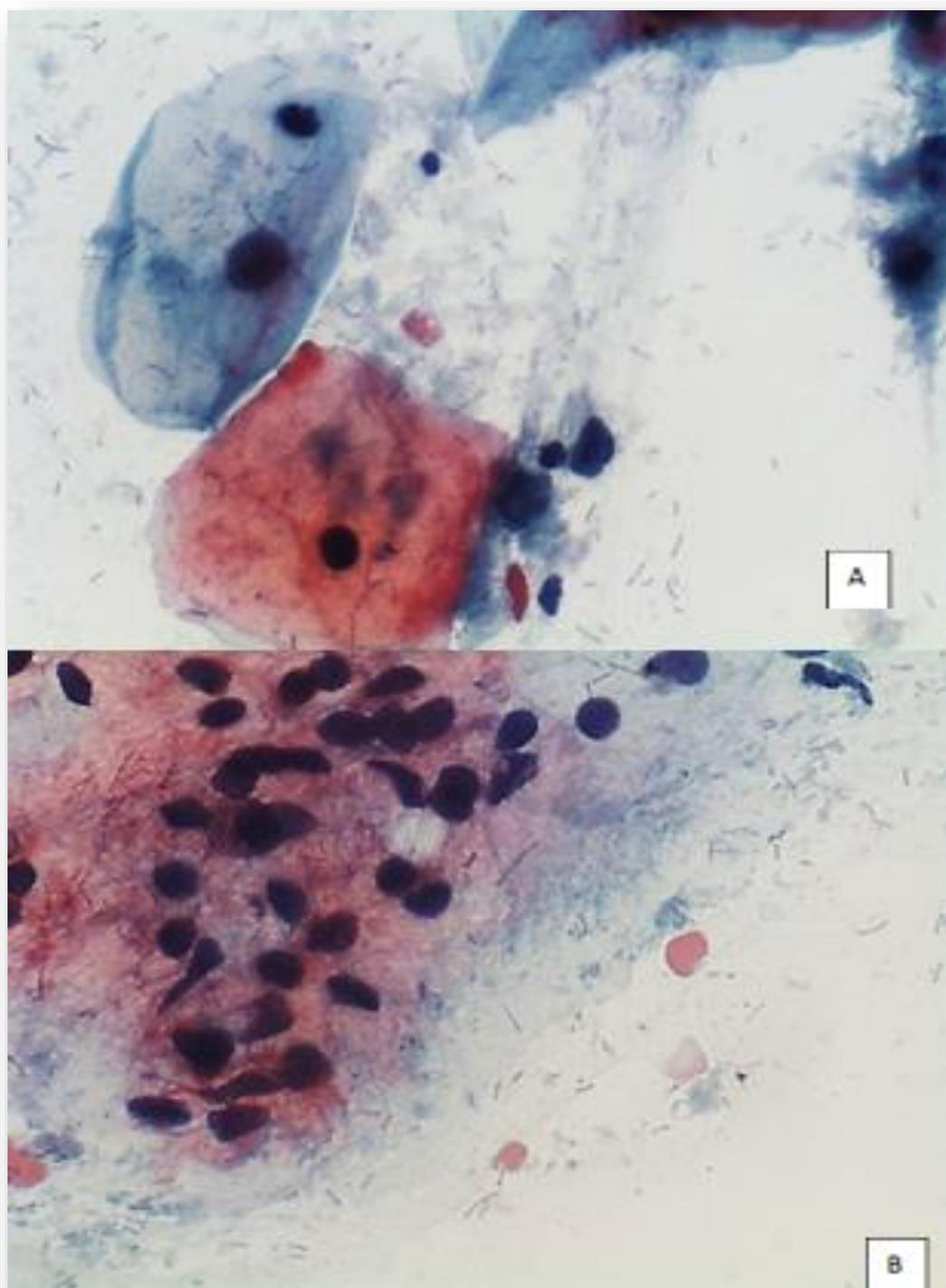


Figura 22. Microbiota bacteriana anormal (*Lactobacillus sp.*) em amostra com crescimento de *Streptococcus agalactiae* na cultura de secreção cervical. A. Ectocérvice. B. Endocérvice). Papanicolaou, 400x.

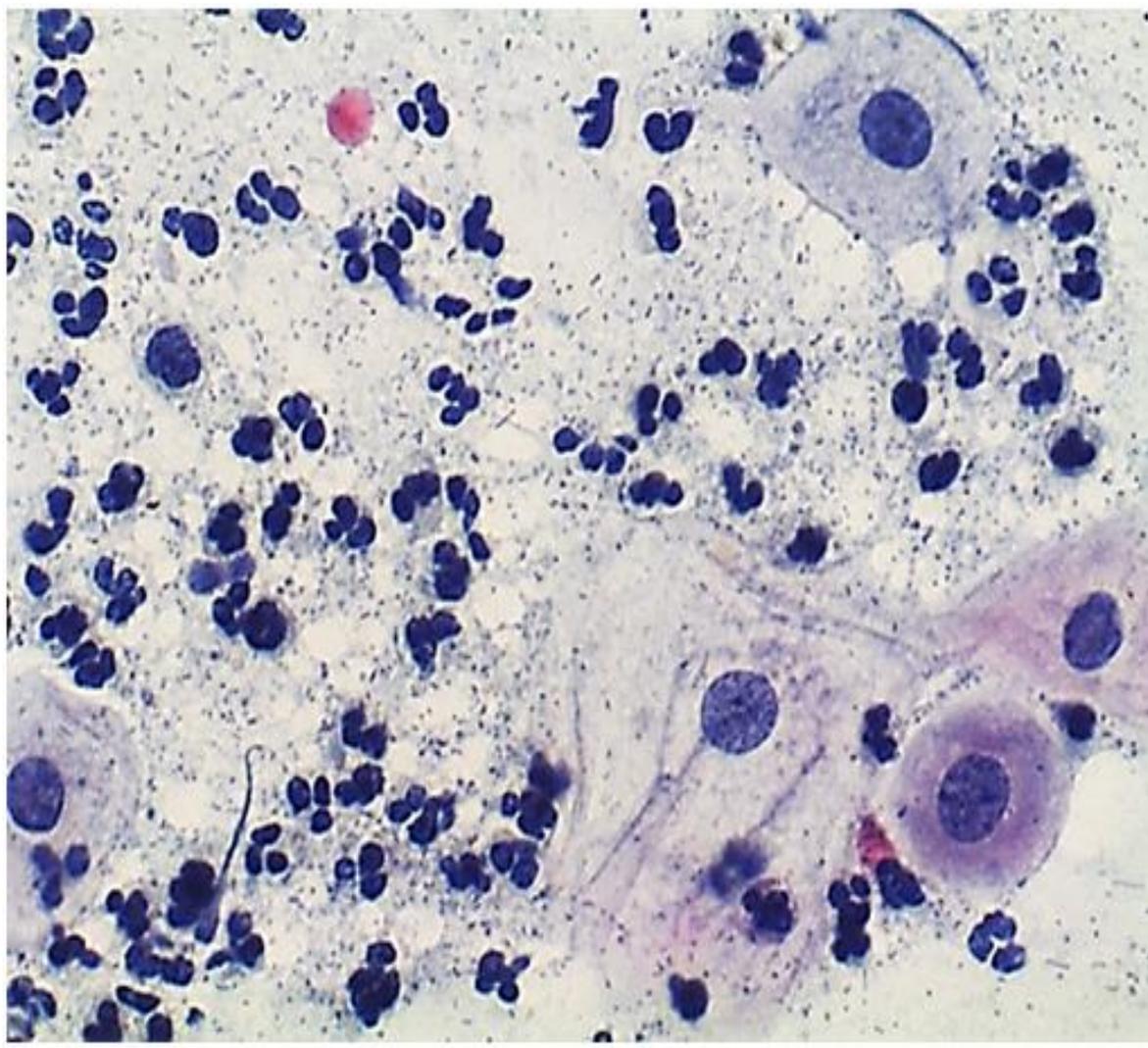


Figura 23. Microbiota bacteriana anormal (Cocos e/ou outros bacilos) em amostra sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical. Papanicolaou, 400x.

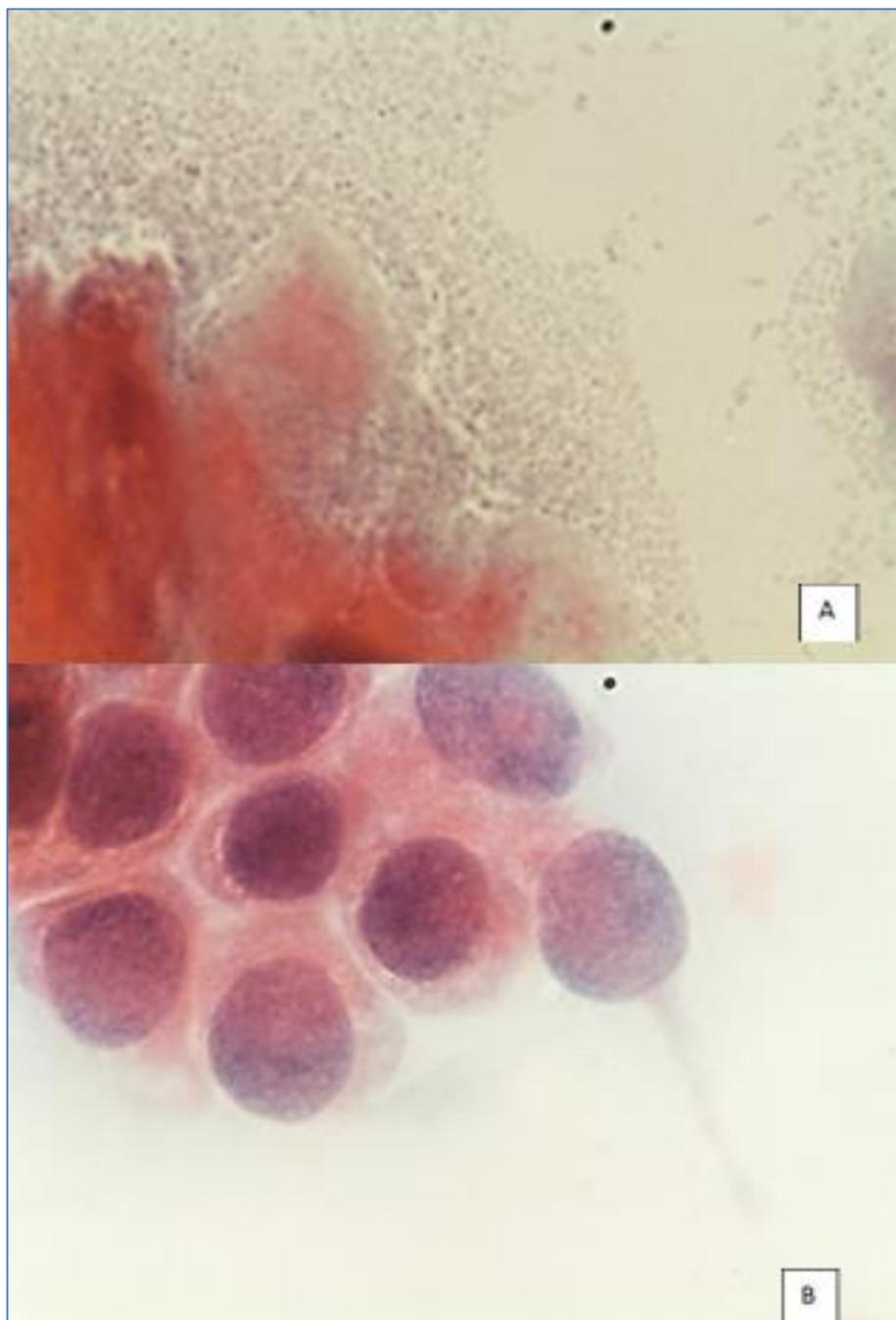


Figura 24. Microbiota bacteriana anormal. **A.** Microbiota bacteriana anormal (Cocos e/ou outros bacilos) na ectocérvice. **B.** Ausente na endocérvice em amostra sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical. Papanicolaou, 1000X.

6.4. Associação entre microbiota bacteriana e inflamação na citologia cervical

Inflamação foi observada em 90,47% (19/21) das amostras com microbiota bacteriana anormal (cocos e/ou outros bacilos) e em 60,86% (14/23) das amostras com microbiota bacteriana normal sendo esta diferença estatisticamente significativa (Teste de Fisher, $p=0,03$) (Tabela 6, Fig 25,26). Nesta análise foram excluídas as amostras com *Candida* spp.e bacilos supra citoplasmáticos.

Tabela 6 - Associação entre microbiota bacteriana e inflamação na citologia

Microbiota bacteriana	Inflamação		Total
	Presente	Ausente	
Anormal	19	2	21
Normal	14	9	23
Total	33	11	44

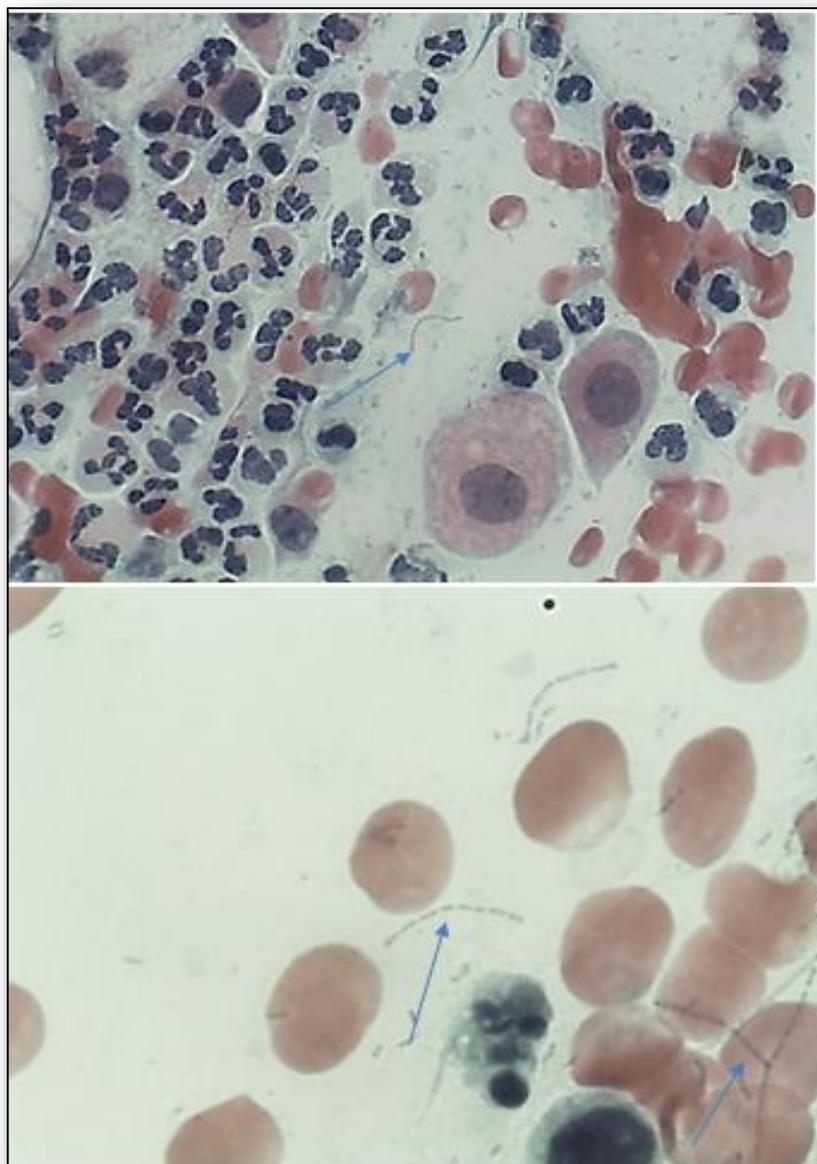


Figura 25. Inflamação com cocos dispostos em cordões (seta azul) em amostra com crescimento de *Streptococcus agalactiae* na cultura de secreção cervical. A (400x). B(1000x), Papanicolau.

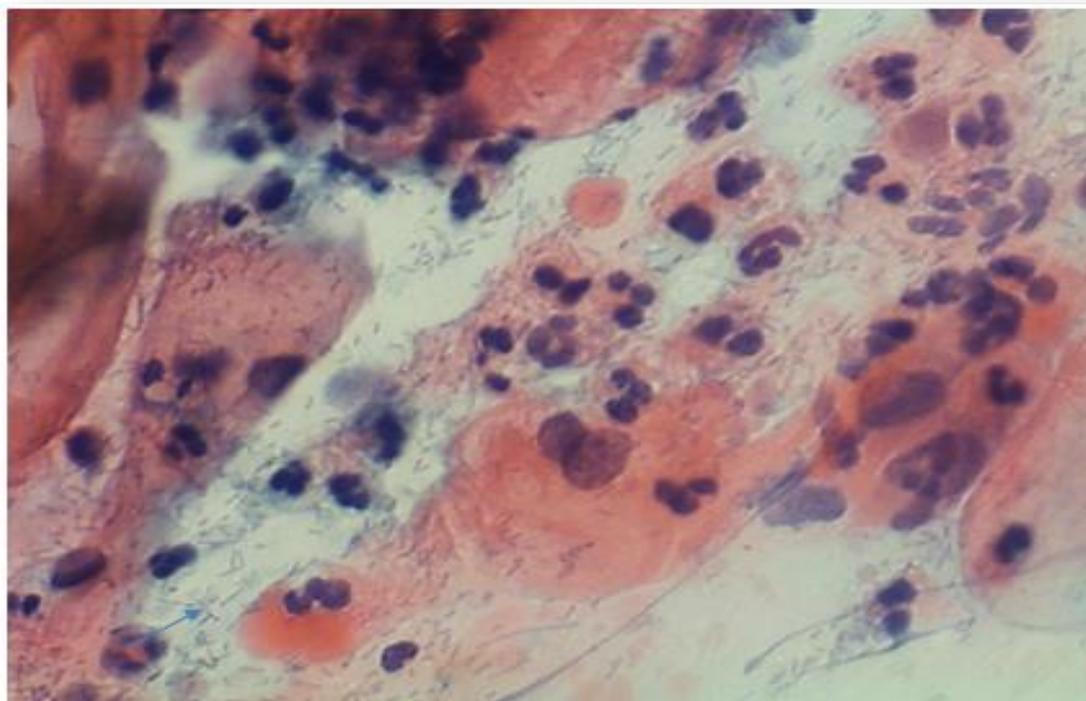


Figura 26. Inflamação com microbiota bacteriana normal (*Lactobacillus* spp. seta azul) em amostra sem crescimento de bactérias na cultura de secreção cervical. Papanicolaou 400x.

6.5. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e inflamação na citologia de secreção cervical

Inflamação foi observada, em 80% (16/20) e 70,83% (17/24) respectivamente, das amostras com e sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (Teste de Fisher, $p=0,72$) (Tabela 7, FIG 27,28). Nesta análise, foram excluídas as amostras com *Candida spp.* e bacilos supracitoplasmáticos.

Tabela 7- Associação entre crescimento de bactérias patogênicas identificado através da cultura/VITEK 2 e inflamação detectada na citologia de secreção cervical

Crescimento de bactérias patogênicas	Inflamação		Total
	Presente	Ausente	
Presente	16	4	20
Ausente	17	7	24
Total	33	11	44

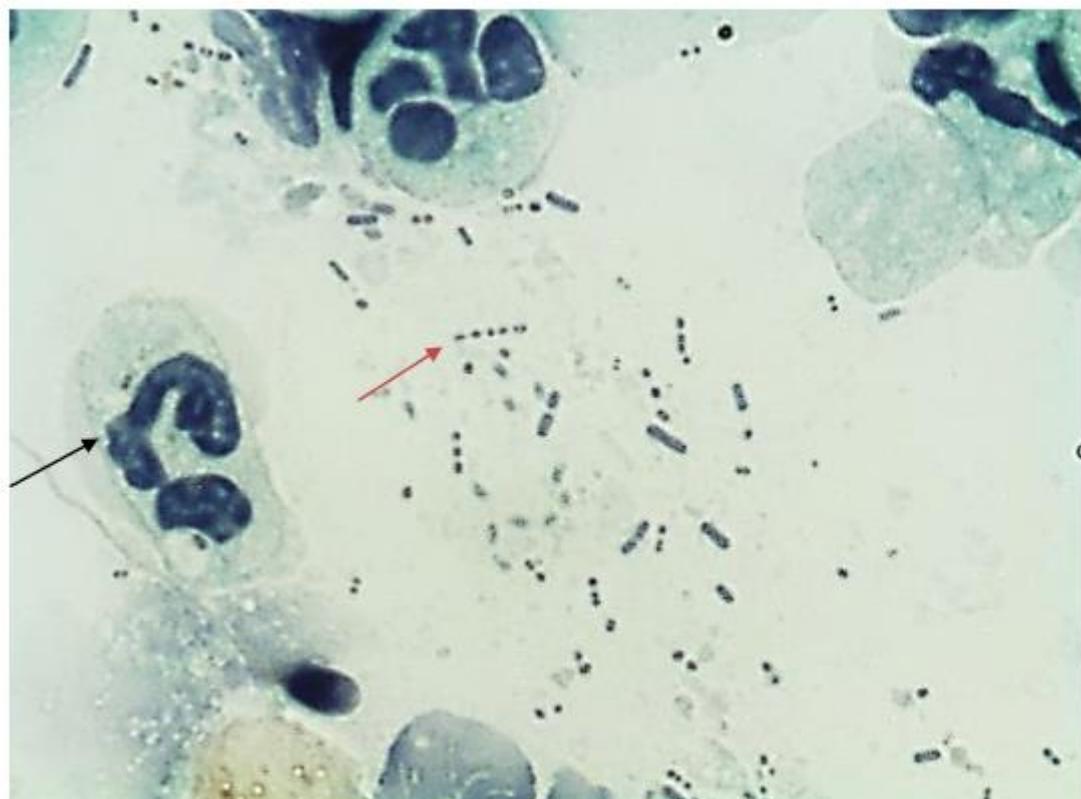


Figura 27.Inflamação com neutrófilos (seta preta), cocos e/ou outros bacilos formando cordões (seta vermelha) em amostra com crescimento de *Streptococcus agalactiae*ssp. na cultura de secreção cervical. Papanicolaou, 1000x.

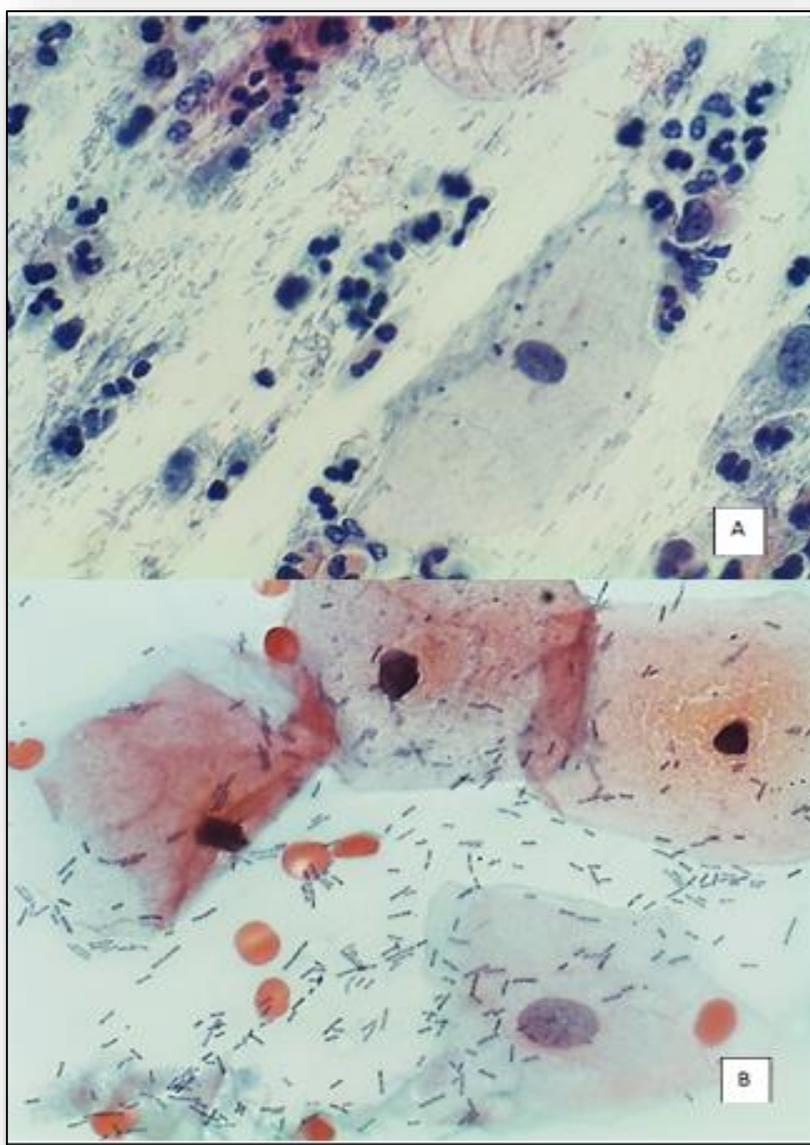


Figura 28. Presença ou ausência de inflamação. A. Inflamação em amostra sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical. B. Ausência de inflamação em amostra com crescimento de *Streptococcus agalactiae* ssp. na cultura de secreção cervical. Papanicolaou, 400x.

6.6. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK2 e aspectos clínicos

A média da idade (34,88) das pacientes com crescimento de bactérias patogênicas foi significativamente menor do que das pacientes (41,64) sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de amostras cervicais (Unpaired t test with Welch's correction, $p=0,02$) (Tabela 8).

Não se observou diferença significativa entre as amostras cervicais com e sem crescimento de bactérias patogênicas. Os seguintes aspectos clínicos das pacientes foram observados: menarca, número de gestações, partos normais e cesarianas, abortos, gravidezes ectópicas, infecções neonatais, presença de menopausa, se-xarca, número de parceiros na vida, número de parceiros nos últimos 12 meses, uso de preservativo, uso de anticoncepcional oral, uso de terapia de reposição hormonal, uso de ducha vaginal, uso de dispositivo intrauterino, tabagismo, etilismo, corrimento, prurido, sangramento pós-coito, sangramento intermenstrual, disúria, polaciúria, dor pélvica, infertilidade, gravidez, ectopia cervical e sinais de endocervicite. (Tabela 8). A análise dos sinais e sintomas, as amostras com *Candida* sp. e bacilos supra citoplasmáticos foram excluídos.

Tabela 8- Aspectos clínicos das pacientes de acordo com a presença e ausência crescimento de bactérias patogênicas na Cultura/VITEK 2 de amostra cervical

Aspectos demográficos	Crescimento de bactérias		P
	Presente (n=16)	Ausente (n=22)	
Idade (média± dp)	34,88 ± 2,31	41,64 ± 1,67	0,02
Baixa escolaridade	37,50%	40,91%	>0,99
Antecedentes pessoais			
Menarca (média ± dp)	12,75 ± 0,41	13,23 ± 0,5	0,46
Gestações (média ± dp)	2 ± 0,24	2,40 ± 0,38	0,37
Parto normal (mediana, min-máx)	1(0-3)	1,5(0-5)	0,31
Parto cesáreo (mediana, min-máx)	0(0-2)	0(0-2)	0,82
Aborto (mediana, min-máx)	0(0-2)	0(0-2)	0,51
Gravidez ectópica	7,69%	0,00%	0,41
Infecção neonatal	0,00%	5,56%	>0,99
Menopausa	0,00%	0,00%	-
Atividade sexual			
Sexarca (mediana, máx.-min)	17(15-23)	16 (12-25)	0,18
Parceiros na vida (mediana, max-min)	1(1-19)	3(1-10)	0,13
Parceiros nos últimos 12 meses (média± dp)	1(1-1)	1(1-2)	>0,99
Uso de preservativo	0,00%	18,18%	0,12
Hábitos de vida			
Uso de anticoncepcional oral	25%	40,91%	0,48
Uso de terapia de reposição hormonal	0,00%	0,00%	-
Uso de ducha vaginal	18,75%	4,55%	0,29
Uso de dispositivo intrauterino	12,50%	0,00%	0,17
Tabagismo	6,25%	0,00%	0,42
Sinais e sintomas			
	Presente (n=13)	Ausente (n=18)	
Corrimento	23,08%	11,11%	0,62
Prurido	15,38%	0,00%	0,16
Sangramento pós-coito	7,69%	0,00%	0,41
Sangramento intermenstrual	0,00%	11,11%	0,49

7. DISCUSSÃO

7.1. Crescimento e espécies de bactérias identificadas na cultura/VITEK de secreção cervical

Alguns aspectos, relacionados ao método empregado na coleta e cultura das amostras, devem ser discutidos anteriormente à discussão dos resultados. Primeiramente, as amostras submetidas à cultura, no presente estudo, foram do colo do útero, principalmente da endocérvice e da transição entre endo e ectocérvice (junção escamo-colunar-JEC). Diferentemente do presente estudo, na maioria dos trabalhos as amostras submetidas à cultura para análise da microbiota genital feminina são da vagina (Donder,2002 et al; Donders,2011; Donders,2009; Jahic, 2013 et al). A opção pela amostragem da região cervical se deve a maior precisão na comparação com os achados da citologia cervical.

Um outro aspecto importante é a variedade de meios de cultura e métodos de identificação para isolamento de bactérias da secreção vaginal em estudos prévios. Os meios de cultura mais utilizados para identificação de bactérias aeróbicas, que são as bactérias associadas à vaginite aeróbica, são os meios não seletivos ágar-sangue e ágar-chocolate (Donders, 2011, Fan, 2010). Estes meios de cultura não seletivos, ágar-sangue e ágar-chocolate, também foram os meios de cultura empregados no presente estudo e, portanto, adequados apenas para o diagnóstico das bactérias associadas à vaginite aeróbica. A cultura para *Gardnerella vaginalis*, a principal bactéria associada a vaginose bacteriana, não é útil para o diagnóstico de vaginose bacteriana porque esta bactéria ocorre com frequência elevada em vaginas de pacientes sem vaginose e também porque a vaginose pode ser causada por outras bactérias (Forsum, 2002 et al; Tokyol, 2004 et al).

Com relação aos resultados, o crescimento de bactérias aeróbicas gram-positivas e negativas foi detectado em 45,45% (25/55) das amostras cervicais submetidas à cultura/VITEK. As espécies bacterianas identificadas no presente estudo coincidem com àquelas isoladas de amostras da secreção vaginal frequentemente associadas à vaginite aeróbica (Jahic, 2009 et al; Donders,2011; Bumbulienè, 2014) e também com as espécies de bactérias aeróbicas isoladas de amostras endocervical e intra-abdominal de pacientes com doença pélvica (Schindlbeck 2014 et al.; Audu, 2004; Judlin,2010 et al).

7.2. Citologia cervical

7.2.1. Microbiota e alterações celulares

Lactobacillus foi a microbiota mais frequentemente observada e a microbiota bacteriana anormal (cocos e/ou outros bacilos) foi detectada em 52,72 % das amostras. *Candida sp.* foi identificada em 12,72% das amostras e Bacilos supracitoplasmáticos (“clue cells”, sugestivas de Vaginose bacteriana) em 7,27% das amostras. *Trichomonas vaginalis sp.*, *Actinomyces sp.* e efeitos citopáticos sugestivos de infecção por *Chlamydia sp.* e por vírus do grupo Herpes não foram observados por serem achados menos frequentes e devido ao número limitado de amostras do presente estudo. Os critérios utilizados por Discacciati 2006, em que a presença de 20% ou mais de “clue cells” na citologia cervical permite o diagnóstico de vaginose bacteriana sem haver necessidade de um teste adicional, foram aplicados no presente estudo.

A inflamação foi observada em 78,18% das amostras de citologia da secreção cervical do total de pacientes (sintomáticas e assintomáticas). Em estudo recente, foi relatada uma frequência de inflamação na citologia cervical de 55,68% em pacientes assintomáticas (Baka,2013). Assim sendo, a análise do presente estudo, associado aos observados na literatura, permite sugerir que a presença de inflamação na citologia cervical não necessariamente resulta em sinais e sintomas.

No presente trabalho, a citologia secreção cervical mostrou que a microbiota de cocos e/ou outros bacilos está presente isolada ou associada a lactobacilos e a outros microrganismos como *Candida sp.* e Bacilos supracitoplasmáticos. Estes resultados são semelhantes aos de estudos prévios em que foram usados critérios de Amsel/Nugent e cultura para o diagnóstico de vaginose bacteriana e vaginite por *Candida sp.* respectivamente (Fan e Xue, 2010). O diagnóstico da vaginite aeróbica é importante porque o seu tratamento é diferente do tratamento da vaginite por *Candida sp.* e da Vaginose bacteriana e não deve ser baseado apenas nos resultados da cultura. Os melhores resultados no tratamento dependem dos achados microscópicos (critérios de Donders) do componente predominante: infeccioso (antibiótico), inflamatório (esteroides) e atrófico (estrógeno) (Donders,2015; Han, 2015 et al). De acordo com os achados do presente estudo, pode-se dizer que os critérios de Donders, (microbiota bacteriana, o número de leucócitos e o número de células basais) também podem ser avaliados na citologia cervical, que teria como vantagens possibilitar a identificação de outros micro-organismos e ser um exame realizado periodicamente.

Pode-se concluir, portanto, que cocos e/ou outros bacilos e inflamação foram, respectivamente, achados frequentes da microbiota e das alterações celulares da citologia cervical. A microbiota de cocos e/ou outros bacilos está presente isolada ou associada a lactobacilos e a outros agentes infecciosos como *Candida sp.* Assim sendo os critérios de Donders e diferentes microrganismos e/ou seus efeitos citopáticos podem ser avaliados na citologia cervical, que dessa forma, pode contribuir no direcionamento do tratamento da vaginite aeróbica isolada ou associada à vaginite por outros agentes infecciosos.

7.2.2. Concordância entre microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK de amostra cervical

A concordância entre microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK foi pobre, com 40% de discordância entre as amostras.

Em 23,63% das amostras, os resultados foram discordantes porque a microbiota bacteriana na citologia era anormal mas não houve crescimento de bactérias patogênicas na cultura. A diferença no local da amostragem pode ter contribuído parcialmente para a discordância nestes resultados. A coleta da amostra para a citologia cervical é realizada na endocérvice e na junção escamo-colunar (JEC) com uma escovinha e na ectocérvice com uma espátula, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Diferentemente da coleta para citologia, amostra para a cultura da secreção cervical foi obtida com o auxílio de “swab”, fornecido com o frasco do meio Stuart, sempre antes da coleta para a citologia, mas apenas das regiões da endocérvice e da junção escamo-colunar (JEC). Esta coleta restrita à área da endocérvice e JEC pode explicar um possível menor número de bactérias na amostra enviada para cultura já que o número de bactérias observado nestas regiões foi menor do que na ectocérvice na citologia. Portanto, esta diferença no local da amostragem pode ter contribuído para a discordância nos resultados. Um outro aspecto importante que pode explicar, pelo menos parcialmente, esta discordância está relacionado aos tipos de meio de cultura empregados. Os meios de cultura ágar- sangue e ágar-chocolate são meios usados habitualmente para promover o crescimento de bactérias gram-negativas e positivas nos laboratórios de análises clínicas porém não permitem o crescimento de todos os tipos de bactérias.

Em 16,36% das amostras, os resultados foram discordantes porque houve crescimento de bactérias patogênicas na cultura mas a microbiota era normal na citologia. Uma explicação para esta discordância é a dificuldade de análise da microbiota bacteriana na citologia, principalmente quando o número de bactérias é escasso.

Concluindo vemos que os seguintes fatores podem ter contribuído para a discordância entre a presença de microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura: a diferença no local da coleta das amostras para cada método, o número limitado de meios de cultura empregados e a dificuldade de análise da microbiota bacteriana na citologia.

7.2.3. Associação entre microbiota bacteriana e inflamação na citologia de secreção cervical

A frequência de inflamação foi elevada (90,47%) nas amostras com microbiota bacteriana anormal e significativamente maior que a frequência de inflamação nas amostras com microbiota normal. Nesta análise de associação, as amostras com *Candida sp.* e **bacilos supra citoplasmáticos** foram excluídas por serem possíveis causas de inflamação.

A presença de inflamação em 60,86% das amostras com microbiota normal pode ser possivelmente e parcialmente explicada pela sensibilidade relativamente baixa da citologia para a detecção de agentes infecciosos. A citologia cervical apresenta especificidade de 86%, 99% e 97% e sensibilidade de 66%, 21% e 60% no diagnóstico de candidíase, **vaginose bacteriana e tricomoníase**, respectivamente, quando comparada aos critérios de Amsel, cultura para *Candida sp* e PCR para *Trichomonas vaginalis* (Forsum, 2002 et al; Lobo, 2003 et al .A inflamação pode ainda ser causada pela ação de agentes físicos (radioativos, mecânicos ou térmicos), agentes químicos (medicamentos abrasivos ou cáusticos, quimioterápicos e acidez vaginal) e uso de DIU. A atrofia com inflamação é um achado normal após a menopausa (frequentemente associado a presença de flora de cocos e/ou bacilos e sintomas como secura vaginal e dispareunia) cujo tratamento consiste na administração vaginal de creme de estrogênios (*Diretriz brasileira para o rastreamento* do Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer de José Alencar – INCA). Em contrapartida, presença de microbiota bacteriana anormal foi observada em 18,18% das amostras sem

sinais de inflamação e este achado sugere que cocos e bacilos curtos na microbiota cervical não são, necessariamente, patogênicos.

Portanto, pode-se dizer que a inflamação foi significativamente mais frequente nas amostras com microbiota bacteriana anormal quando comparada com a microbiota normal. Nas amostras com microbiota normal, outras causas de inflamação de origem não-infecciosa podem estar envolvidas e a origem infecciosa não pode ser excluída. Em contrapartida podemos observar a presença de cocos e/ou outros bacilos (bacilos curtos) em amostras sem inflamação na citologia cervical.

7.2.4. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e aspectos clínicos

Inflamação foi observada em 80% e 70,83% das amostras com e sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura, respectivamente, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Nesta análise, foram excluídas as amostras com *Candida* sp. e bacilos supra citoplasmáticos.

A presença de inflamação na citologia em 70,83% das amostras sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura pode ser explicada pela possibilidade de causas de origem não-infecciosa ou infecciosa não-bacteriana. Além disso, deve-se ressaltar que os meios de cultura usados no presente estudo e na rotina dos laboratórios de análises clínicas não promovem o crescimento de todas as espécies de bactérias e que algumas espécies não crescem em meios de cultura sendo geralmente detectadas por testes moleculares. Similarmente a estes resultados, em estudo prévio, em 40% das amostras com inflamação a cultura para diferentes patógenos foi negativa (Baka, 2013 et al.).

A presença crescimento de bactérias (cocos e bacilos curtos) na cultura em amostras sem inflamação na citologia foi observada 36,36% das amostras o que sugere que as bactérias (cocos e bacilos curtos) da secreção cervical em crescimento na cultura não são, necessariamente, patogênicas.

Concluindo, a inflamação na citologia não foi mais frequente nas amostras com crescimento quando comparada com as amostras sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura. A inflamação nas amostras sem crescimento pode ser de origem não infecciosa ou infecciosa, inclusive bacteriana, considerando as limitações do método da cultura. Em contrapartida, a presença crescimento de bactérias na cultura da

secreção cervical sem inflamação na citologia sugere que estas bactérias não são necessariamente patogênicas e que a cultura não deve ser analisada de forma isolada.

7.3. Associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura/VITEK 2 e aspectos clínicos

Com relação aos aspectos demográficos, antecedentes pessoais, atividades sexuais e hábitos de vida, apenas a média da idade das pacientes foi diferente entre os grupos com e sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical. Em estudo prévio, envolvendo uma grande população de mulheres entre 13 e 66 anos, uma frequência maior de bactérias gram-negativas foi observada na pré-puberdade e de bactérias gram-positivas na menopausa. Na menopausa, este resultado foi justificado pelo hipoestrogenismo e na pré-puberdade atribuído à falta de higiene e também pelo hipoestrogenismo (Tibaldi, 2009 et al). Os sinais e sintomas foram pouco frequentes e a frequência dos mesmos não foi diferente entre os grupos com e sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical. Em concordância com este resultado, a inflamação, que seria a possível causa destes sinais e sintomas, também não esteve associada com crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical no presente estudo. Contudo, estudos com maior número de amostras são necessários para o entendimento da associação da presença destas bactérias na secreção cervical com os aspectos clínicos.

Concluindo, a frequência baixa de sinais e sintomas e o número limitado de amostras do presente estudo não permitiram uma análise confiável sobre a associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical e suas possíveis repercussões clínicas.

8. CONCLUSÕES

Crescimento de bactérias aeróbicas gram positivas e negativas foi detectado em 45,45% das amostras cervicais de acordo com o método de Donders. As espécies na secreção cervical foram semelhantes as espécies isoladas da secreção vaginal (associadas à vaginite aeróbica) e semelhantes às espécies isoladas na endocérvice e intra-abdominal de pacientes com doença inflamatória pélvica.

A microbiota de cocos e/ou outros bacilos é frequente e está presente isolada ou associada lactobacilos e a outros agentes infecciosos como *Candida* sp. na citologia cervical. Os critérios de Donders e diferentes microrganismos e/ou seus efeitos citopáticos podem ser avaliados na citologia cervical, que dessa forma, pode contribuir no direcionamento do tratamento da vaginite aeróbica isolada ou associada a vaginite por outros agentes infecciosos.

A taxa de concordância entre a presença de microbiota bacteriana anormal na citologia e crescimento de bactérias patogênicas na cultura foi pobre e os seguintes fatores podem ter contribuído com a discordância entre os resultados: a diferença no local da coleta das amostras, o número limitado de meios de cultura empregados e dificuldade de análise da microbiota bacteriana na citologia.

A inflamação foi significativamente mais frequente nas amostras com microbiota bacteriana anormal na citologia cervical quando comparada com a microbiota normal. Nas amostras com microbiota normal, outras causas de inflamação de origem não-infecciosa podem estar envolvidas porém a causa de origem infecciosa não pode ser excluída. Em contrapartida, a presença de cocos e/ou outros bacilos em amostras sem inflamação na citologia cervical sugere que estas bactérias não são, necessariamente, patogênicas.

A inflamação na citologia não foi mais frequente nas amostras com crescimento quando comparada com as amostras sem crescimento de bactérias patogênicas na cultura da secreção cervical. A inflamação nas amostras sem crescimento, pode ser de origem não-infecciosa ou de origem infecciosa, inclusive bacteriana, considerando as limitações do método da cultura. Em contrapartida, a presença crescimento de bactérias na cultura da secreção cervical sem inflamação na citologia sugere que estas bactérias não são, necessariamente, patogênicas e que a cultura não deve ser analisada de forma isolada.

A frequência baixa de sinais e sintomas e o número limitado de amostras do presente estudo não permitiram uma análise confiável sobre a associação entre crescimento de bactérias patogênicas na cultura de secreção cervical e suas possíveis repercussões clínicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4 Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final/ Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária(ANVISA), 2013.
2. AIPING F, YINGLI Y, NY G, HUIYING Z, YINGMEI W, FENGXIA X. Aerobic vaginitis and mixed infections: comparison of clinical and laboratory findings. *Arch Gynecol Obstet* 2013 Feb; 287: 329-5 ISSN: 0932-0067.
3. Arora BB, Megha Maheshwari, Naiya Devgan and D. R. Arora. Prevalence of Trichomoniasis, Vaginal Candidiasis, Genital Herpes, Chlamydiasis, and Actinomycosis among Urban and Rural Women of Haryana, Índia. *J Sex Transm Dis* 2014 Oct;28: 963812; doi: 10.1155/2014/963812.
4. Audu BM, Kudi AA. Microbial isolates and antibiogram from endocervical swabs of patients with pelvic inflammatory disease. *J Obstet Gynaecol* 2004 Feb;24(2)161-4.
5. Baka, S., Tsirmpa, I., Chasiakou, A., Tsouma, I., Politi, E., Gennimata, V., & Kouskouni, E. Inflammation on the Cervical Papanicolaou Smear: Evidence for Infection in Asymptomatic Women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2013 Sep;184302. <http://doi.org/10.1155/2013/184302>.
6. Bumbulienė Ž, Venclavičiūtė K, Ramašauskaitė D, Arlauskienė A, Bumbul E, Drašutiene G. Microbiological findings of vulvovaginitis in prepubertal girls. *Postgrad Med J* 2014 Jan; 90(1059):8-12. doi: 10.1136/postgradmedj-2013-131959.
7. Carey J, Klebanoff M. Is a change in the vaginal flora associated with an increased risk of preterm birth *Am J Obstet Gynecol* 2005 Apr; 192(4):1341-6.

8. Carroll, K. C., and M. P. Weinstein. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In P. R. Murray (ed.), *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington 2007; 9th ed.(1): 192-7.
9. Chatzigeorgiou KS, Sergentanis TN, Tsiodras S, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: a comprehensive meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2011 Sep;49(9):3284-91.
10. Cherpes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003 Aug 1; (37): 319–325.
11. Costa P de FC. Recomendações Sociedade de Pediatria. Atualização de Condutas em Pediatria. Gestão 2010-2013. Departamento científico SPSP Jan 63 - São Paulo 2013; http://www.spsp.org.br/site/asp/recomendacoes/Rec_63_Neonato.pdf.
12. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. (RJ) 2011 Abr.
13. Discacciati MG, Simoes JA, Amaral RG, Brolazo E, Rabelo-Santos SH, Westin MC, Montemor EB. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears. *Diagn Cytopathol* 2006 April;34(4):272-6.
14. Donder GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002 Jan;109(1): 34-43.
15. Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *International Journal of Obstetrics and Gynecology BJOG* 2011 Sep;118(10):1163-70.

16. Donders G, Odds A, Vereecken A, Van Bulck B, Londers L, Salembier G. Abnormal vaginal flora in the first trimester, but not full blown bacterial vaginosis is associated with preterm delivery and low birth weight. *Prenat Neonat Med.* 2008;3: 588-593.
17. Donders G, Van Kalsteren K, Bellen G, Reybroeck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG* 2009 Sep; 116(10):1315-1324.
18. Donders G, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Aerobic vaginitis: Abnormal vaginal flora entity that is distinct from bacterial vaginosis. *Gynecology Obstetrics and Reproductive Medicine* 2005 April; 1279:118-129.
19. Donders GG, Ruban K, Bellen G. Selecting anti-microbial treatment of aerobic vaginitis. *Curr Infect Dis Rep* 2015 May;17(5):477.
20. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007 Jun;21(3):355-73.
21. Evangelista, A. T., A. L. Truant, and P. P. Bourbeau. Chapter 3: Rapid Systems and instruments for the identification of bacterie. In Truant A (ed), *Manual of commercial methods in clinical microbiology*. American Society for Microbiology. ASM Press, Washington, D.C 2002; 22–49 p. doi: 10.1128/9781555817961.
22. Fan A, Xue F. Clinical characteristics of aerobic vaginitis and its mixed infections. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2010 Dec;45(12): 904-908.
23. Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility Testing in Instrumentation and Computerized Expert Systems for Data Analysis and Interpretation. In *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. (Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover, F.C. and Tenover, R.H., Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC.1999, p. 1593-600.

24. Forsum U, Jakobsson T, Larsson PG, Schmidt H, Beverly A, Bjørnerem A, Carlsson B, Csango P, Donders G, Hay P, Ison C, Keane F, McDonald H, Moi H, Platz-Christensen JJ, Schwebke J.; An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis 2002 Nov; 110 (11): 811-8.
25. Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H, et al. Association between Bacterial Vaginosis and Cervical Intraepithelial Neoplasia: Systematic Review and Meta-Analysis. Atashili J. *PLoS ONE* 2012 Oct;7(10):45201; doi:10.1371/journal.045201.
26. Han C, Wu W, Fan A, Wang Y, Zhang H, Chu Z, Wang C, Xue F. Diagnostic and therapeutic advancements for aerobic vaginitis. *Arch Gynecol Obstet* 2015 Feb; 291(2):251-7. doi: 10.1007/s00404-014-3525-9;
27. He Q, Chen W, Huang L, Lin Q, Zhang J, Liu R, Li B. Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016 Jun;15(1):40.
28. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birthweight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med*.1995 Dec;333:1737–1742; 1995.
29. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais. Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. (RJ): Inca 2012;(3):23. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/historico_acoes.
30. Jahic M, Mulavdic M, Nurkic J, Jahic E, Nurkic M. Clinical Characteristics of Aerobic Vaginitis and Its Association to Vaginal Candidiasis, Trichomonas Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Medical Archives* 2013;67(6):428-430.doi:10.5455/medarh.

31. Judlin P, Liao Q, Liu Z, Reimnitz P, Hampel B, Arvis P. Efficacy and safety of moxifloxacin in uncomplicated pelvic inflammatory disease: the Monalisa study. *BJOG* 2010 Nov;117(12):1475-84.
32. Lijoi D, Di Capua E, Ferrero S, Mistrangelo E, Giannattasio A, Morano S, Ragni N. The efficacy of 2002 CDC guidelines in preventing perinatal group B Streptococcal vertical transmission a prospective study. *Arch Gynecol Obstet* 2007 May;275(5):373-9.
33. Lobo TT, Feijó G, Carvalho SE, Costa PL, Chagas C, Xavier J, Simoes-Barbosa A. *Sex Transm Dis*. A comparative evaluation of the Papanicolaou test for the diagnosis of trichomoniasis 2003 Sep;30(9):694-9.
34. Myer L, Kuhn L, Stein ZA, Wright TC Jr; Denny L. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and women's susceptibility to HIV infection: epidemiological evidence and biological mechanisms. *Lancet Infect Dis* 2005 Dec;(5):786-794.
35. Nogueira, JMR e Miguel LFS. Bacteriologia. *In: <http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap3.pdf>. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: Fio Cruz 2009:221-397.*
36. Pincus, DH Microbial identification using the Biomérieux Vitek 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association 2006. https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf
37. Rampersaud R, Randis TM, Ratner AJ. Microbiota of the upper and lower genital tract. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012 Feb;17(1):51-7.
38. Schindlbeck C, Dziura D, Mylonas I. Diagnosis of pelvic inflammatory disease (PID): intra-operative findings and comparison of vaginal and intra-abdominal cultures. *Arch Gynecol Obstet* 2014 Jun; 289(6):1263-9.

39. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, Engstrand L, Unemo M. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible. *PLoS One* 2013 Apr 9;8(4):e60670.
40. Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms. *J Clin Microbiol* 2008 Jul; 46(7):2327-33.
41. Solomon D: Foreword; in Nayar R, Wilbur DC. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes* ed. Springer; New York, 2015 May.
42. Spurbeck RR, Arvidson CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol* 2011 May; 6(5):567-82.
43. Sweet RL. Role of bacterial vaginosis in pelvic inflammatory disease. *Clin Infect Dis.*1995 Jun 20 PubMed. Suppl 2:S271-5.
44. Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Masuelli G, Marini S, Benedetto C. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clin Microbiol Infect* 2009 Jun;15(7):670-9.
45. Tokyol C, Aktepe OC, Cevrioğlu AS, Altindiş M, Dilek FH. Bacterial vaginosis: comparison of Pap smear and microbiological test results. *Mod Pathol* 2004 Jul; 17(7):857-60.
46. Vardar E, Maral I, Inal M, Ozgüder O, Tasli F, Postaci H. Comparison of Gram-stain and Pap smear procedures in the diagnosis of bacterial vaginosis 2002 Jul; 10(4):203-7.

47. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005 May;37(5):360-3.
48. Wallet F, Loiez C, Renaux E, Lemaitre N, Courcol RJ. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2005 Sep;43(9):4402-6.
49. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL; Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003 Mar; 1; 36 (5): 663-8.

APENDICE A

Questionário

Prontuário: _____

Nome:-

_____ DN: __/__/____

Menarca

Sexarca _____ anos

Relação desprotegida:

DST (HPV, Herpes, Trichomonas...) no Passado : não() sim () qual _____

Gesta _____/Parto _____ Aborto _____/Cesariana _____

Menopausa Não() sim ()

Terapia de reposição hormonal? _____

Uso de medicação e quais? Não () Sim()

_____ Duração _____ Término _____

Método contraceptivo atual e prévios _____

Escolaridade _____

Número de parceiros sexuais na vida _____ nos últimos 12 meses _____

Tabagismo não () sim() quantos/dia _____

Etilismo não () sim() quantos/dia _____

Radioterapia não() sim() Duração _____ Término _____

Braquiterapia não() sim() Duração _____ Término _____

Quimioterapia não() sim() Duração _____ Término _____

Coleta do citopatológico em __/__/____

Teste rápido de Clamídia: Negativo () Positivo()

Anamnese e exame médico se houver marque X:

- Ducha Vaginal
- Prurido
- Dispaurenia
- corrimento vaginal mucopurulento,
- sangramento pós-coito,
- sangramento intermenstrual
- disúria
- aumento da frequência urinária
- dor abdominal e pélvica
- infertilidade e gravidez ectópica
- complicações da infecção na gravidez incluem trabalho de parto prematuro, infecção pós-aborto, infecção materna pós-parto e infecção neonatal (conjuntivite e pneumonia)
- ectopia cervical
- história atual de DST ou infecção pelo HIV
- Aspecto clínico de Cervicite: leve moderado grave
- Colposcopia:
 - laudo
 - Negativo LIE-BG LIE-AG Insatisf.

APENDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE A senhora está sendo convidada a participar do projeto: "Rastreamento da infecção genital por *Chlamydia trachomatis*: criação de fluxogramas para detecção da doença em pacientes sintomáticas e assintomáticas visando à implantação no sistema único de saúde". O objetivo deste estudo será detectar, através do exame preventivo do câncer de colo do útero, a infecção genital causada por uma bactéria chamada *Chlamydia trachomatis*. A senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la. Para a realização do nosso estudo, durante a coleta da amostra para o exame preventivo do colo do útero, uma amostra adicional terá que ser obtida da senhora, o que não causará maior desconforto.

A senhora terá acesso ao resultado do exame e será encaminhada para tratamento. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador. Além do exame, a senhora será convidada a responder um questionário com a ajuda do médico e duração de cerca de 5 minutos. Ao responder o questionário, a senhora terá o direito de recusar-se e a responder perguntas que ocasionem constrangimentos de alguma natureza. Em caso de recusa em participar da pesquisa não haverá penalização ou prejuízo de atendimento naquele serviço. Se a Senhora tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, telefone para 61-92859877 (falar com Dra Fabiana Pirani Carneiro) ou na instituição pelo telefone: 32444282 em horário comercial. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Nome / assinatura:

Pesquisador Responsável

Nome e assinatura:

Brasília, ____ de _____ de _____

ANEXO B

Bacteria identified with VITEK®2 GP ID card

Alphabetical order

Abiotrophia defectiva

Aerococcus urinae

Aerococcus viridans

Alloiococcus otitis

Dermacoccus nishinomiyaensis/Kytococcus sedentarius

Enterococcus avium

Enterococcus casseliflavus

Enterococcus cecorum

Enterococcus columbae

Enterococcus durans

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Enterococcus gallinarum

Enterococcus hirae

Enterococcus raffinosus

Enterococcus saccharolyticus

Erysipelothrix rhusiopathiae

Facklamia hominis

Gardnerella vaginalis

Gemella bergeri

Gemella haemolysans

Gemella morbillorum

Gemella sanguinis

Globicatella sanguinis

Globicatella sulfidifaciens

Granulicatella adiacens

Granulicatella elegans

Helcococcus kunzii

Kocuria kristinae

Kocuria rhizophila
Kocuria rosea
Kocuria varians
Lactococcus garvieae
Lactococcus lactis ssp. *cremoris*
Lactococcus lactis ssp. *lactis*
Lactococcus raffinolactis
Leuconostoc citreum
Leuconostoc lactis
Leuconostoc mesenteroides ssp. *cremoris*
Leuconostoc mesenteroides ssp. *dextranicum*
Leuconostoc mesenteroides ssp. *mesenteroides*
Leuconostoc pseudomesenteroides
Listeria grayi+
Listeria innocua+
Listeria ivanovii+
Listeria monocytogenes+
Listeria seeligeri+
Listeria welshimeri+
Micrococcus luteus/lylae
Pediococcus acidilactici
Pediococcus pentosaceus
Rothia dentocariosa
Rothia mucilaginoso
Staphylococcus arlettae
Staphylococcus aureus *+
Staphylococcus auricularis
Staphylococcus capitis
Staphylococcus caprae
Staphylococcus carnosus ssp. *carnosus*
Staphylococcus chromogenes
Staphylococcus cohnii ssp. *cohnii*
Staphylococcus cohnii ssp. *urealyticus*

Staphylococcus epidermidis+

Staphylococcus equorum

Staphylococcus gallinarum

Staphylococcus haemolyticus

Staphylococcus hominis ssp. hominis

Staphylococcus hominis ssp. novobiosepticus

Staphylococcus hyicus+

Staphylococcus intermedius+

Staphylococcus kloosii

Staphylococcus lentus

Staphylococcus lugdunensis

Staphylococcus pseudintermedius

Staphylococcus saprophyticus

Staphylococcus schleiferi

Staphylococcus sciuri

Staphylococcus simulans

Staphylococcus vitulinus

Staphylococcus warneri

Staphylococcus xylosus

Streptococcus agalactiae

Streptococcus alactolyticus

Streptococcus anginosus

Streptococcus canis

Streptococcus constellatus ssp. constellatus

Streptococcus constellatus ssp. pharyngis

Streptococcus cristatus

Streptococcus downei

Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae

Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis

Streptococcus equi ssp. equi

Streptococcus equi ssp. zooepidemicus

Streptococcus equinus

Streptococcus gallolyticus ssp. gallolyticus

Streptococcus gallolyticus ssp. pasteurianus
Streptococcus gordonii
Streptococcus hyointestinalis
Streptococcus infantarius ssp. coli (Str. lutetiensis)
Streptococcus infantarius ssp. infantarius
Streptococcus intermedius
Streptococcus mitis/Streptococcus oralis
Streptococcus mutans
Streptococcus ovis
Streptococcus parasanguinis
Streptococcus pluranimalium
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus porcinus
Streptococcus pseudoporcinus
Streptococcus pyogenes
Streptococcus salivarius ssp. salivarius
Streptococcus salivarius ssp. thermophilus
Streptococcus sanguinis
Streptococcus sobrinus
Streptococcus suis I
Streptococcus suis II
Streptococcus thoraltensis
Streptococcus uberis
Streptococcus vestibularis
Vagococcus fluvialis

**Staphylococcus aureus* claim contains only the subspecies *aureus*.

+ OMA Official Methods of Analysis validated claim.

Gram-negative bacteria can be responsible for infections including wound/surgical site infections, pneumonia and meningitis. As they are highly and increasingly **resistant to multiple drugs**, preventing the spread of these organisms is a key goal in the healthcare setting. VITEK® 2 ID cards are convenient and safe self-contained, disposable cards developed for use with the VITEK® 2 family of instruments. The VITEK® 2 GN ID card is an effective means of rapidly and accurately identifying **abroad range of Gram-negative Enterobacteriaceae, non-Enterobacteriaceae and highly pathogenic organisms**.

***Enterobacteriaceae*TOP**

Alphabetical order

Budvicia aquatica

Buttiauxella agrestis

*Cedecea davisae**

*Cedecea lapagei**

*Citrobacter amalonaticus**

*Citrobacter braakii**

*Citrobacter farmeri**

*Citrobacter freundii**

*Citrobacter koseri**

Citrobacter sedlakii

*Citrobacter youngae**

Cronobacter sakazakii group+

*Edwardsiella hoshinae**

*Edwardsiella tarda**

*Enterobacter aerogenes**

*Enterobacter amnigenus*¹*

*Enterobacter amnigenus*²*

*Enterobacter asburiae**

*Enterobacter cancerogenus**

Enterobacter cloacae complex+

*Enterobacter gergoviae**

*Escherichia coli**

Escherichia coli O157*

Klebsiella pneumoniae ssp. *rhinoscleromatis*

*Kluyvera ascorbata**

Kluyvera cryocrescens

*Kluyvera intermedia** (formerly known as *Enterobacter intermedius*)

*Leclercia adecarboxylata**

*Moellerella wisconsensis**

Morganella morganii ssp. *morganii**

Morganella morganii ssp. *sibonii*

Pantoea agglomerans *
Pantoea spp.
Plesiomonas shigelloides
Proteus hauseri
*Proteus mirabilis**
*Proteus penneri**
Proteus vulgaris
*Providencia alcalifaciens**
Providencia rettgeri
Providencia rustigianii
*Providencia stuartii**
*Rahnella aquatilis**
Raoultella ornithinolytica
Raoultella planticola
Roseomonas gilardii
*Salmonella enterica ssp. arizonae**
Salmonella enterica ssp. diarizonae
*Salmonella group**
*Salmonella ser. Gallinarum**
*Salmonella ser. Paratyphi A**
*Salmonella ser. Typhi**
*Serratia ficaria**
*Serratia fonticola**
*Serratia liquefaciens group**
Serratia marcescens *
Serratia odorifera *
Serratia plymuthica *
*Serratia rubidaea**
*Shigella group**
*Shigella sonnei**
Yersinia aldovae
*Yersinia enterocolitica/frederiksenii**
*Yersinia intermedia**
*Yersinia kristensenii**

Yersinia pestis

*Yersinia pseudotuberculosis**

*Yersinia ruckeri**

Yokenella regensburgei

*** OMA Official Methods of Analysis validated claim.**

+ Species within this group or complex that are OMA Official Methods of Analysis validated

claims are *Burkholderia cepacia*, *Cronobacter sakazakii*, and *Enterobacter cloacae*.

Non-EnterobacteriaceaeTOP

Alphabetical order

Achromobacter denitrificans

Achromobacter xylosoxidans

Acinetobacter baumannii complex

Acinetobacter haemolyticus

Acinetobacter junii

Acinetobacter lwoffii

Acinetobacter radioresistens

Acinetobacter ursingii

Actinobacillus ureae

Aeromonas hydrophila/*Aeromonas caviae*

Aeromonas salmonicida

Aeromonas sobria

Aeromonas veronii

Alcaligenes faecalis ssp. *faecalis*

Bordetella bronchiseptica

Bordetella hinzii

Bordetella trematum

Brevundimonas diminuta/*vesicularis*

Brucella melitensis

Burkholderia cepacia group+

*Burkholderia gladioli**

Burkholderia mallei

Burkholderia pseudomallei
Chromobacterium violaceum
Chryseobacterium gleum
Chryseobacterium indologenes
Comamonas testosteroni
Cupriavidus pauculus
Delftia acidovorans
Elizabethkingia meningoseptica
Francisella tularensis
Grimontia hollisae
Mannheimia haemolytica
Methylobacterium spp.
Moraxella group
Myroides spp.
Neisseria animaloris/zoodegmatidis
Ochrobactrum anthropi
Oligella ureolytica
Paracoccus yeei
Pasteurella aerogenes
Pasteurella canis
Pasteurella dagmatis
Pasteurella multocida
Pasteurella pneumotropica
Pasteurella testudinis
Photobacterium damsela
*Pseudomonas aeruginosa**
Pseudomonas alcaligenes
*Pseudomonas fluorescens**
Pseudomonas luteola
Pseudomonas mendocina
Pseudomonas oleovorans
Pseudomonas oryzihabitans
Pseudomonas putida
Pseudomonas stutzeri

Ralstonia mannitolilytica
Ralstonia pickettii
Rhizobium radiobacter
Roseomonas gilardii
Shewanella algae
Shewanella putrefaciens
Sphingobacterium multivorum
Sphingobacterium spiritivorum
Sphingobacterium thalpophilum
Sphingomonas paucimobilis
Stenotrophomonas maltophilia
*Vibrio alginolyticus**
*Vibrio cholerae**
*Vibrio fluvialis**
*Vibrio metschnikovii**
*Vibrio mimicus**
*Vibrio parahaemolyticus**
*Vibrio vulnificus**

*** OMA Official Methods of Analysis validated claim.**

+ Species within this group or complex that are OMA Official Methods of Analysis validated claims are *Burkholderia cepacia*, *Cronobacter sakazakii*, and *Enterobacter cloacae*.

Highly pathogenic organismsTOP

Alphabetical order

Brucella melitensis *

Burkholderia mallei *

*Burkholderia pseudomallei**

Escherichia coli O157*

*Francisella tularensis**

*Yersinia pestis**

*** OMA Official Methods of Analysis validated claim.**