

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

NATALIA MALAGUTI

Sensível detecção simultânea de treze agentes associados à vaginose bacteriana por reação em cadeia da polimerase multiplex

Maringá  
2014

NATALIA MALAGUTI

Sensível detecção simultânea de treze agentes associados à vaginose bacteriana por reação em cadeia da polimerase multiplex

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Edilaine Lopes Consolaro

Co-Orientador: Dr<sup>a</sup>. Fabrícia Gimenes

Maringá  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M236s Malaguti, Natalia  
Sensível detecção simultânea de treze agentes associados à vaginose bacteriana por reação em cadeia da polimerase multiplex / Natalia Malaguti. -- Maringá, 2014.  
65 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Edilaine Lopes Consolaro.  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabrícia Gimenes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2014.

1. Bactéria. 2. Vaginose bacteriana. 3. PCR - multiplex. 4. Amostras cervicais. I. Consolaro, Marcia Edilaine, orient. II. Gimenes, Fabrícia, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. III. Título.

CDD 21.ed. 616.014

MGC-001414

## FOLHA DE APROVAÇÃO

NATALIA MALAGUTI

Sensível detecção simultânea de treze agentes associados à vaginose bacteriana por reação em cadeia da polimerase multiplex

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Edilaine Lopes Consolaro  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raíssa Bocchi Pedroso  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vania Ramos Sela da Silva  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em 04 de dezembro de 2014.

Local: Sala 112-B bloco T-20, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA(S)

À Deus, por guiar meus caminhos e estar presente em todos os momentos desta jornada.

Aos meus pais, irmãos e noivo pelo amor, apoio, e por serem a minha maior fonte de força e felicidade.

## AGRADECIMENTO(S)

À Deus, que através da força de teu espírito, me fez superar as dificuldades encontradas no caminho. Não me deixou cair em momento algum e graças a ele alcancei mais uma conquista.

Para que a concretização deste projeto se efetivasse: agradeço às inúmeras pessoas que foram incentivadoras neste processo e seus ensinamentos. Então, por estes extraordinários exemplos, expresso meus reais agradecimentos:

Aos meus pais Celso e Marlene, meus grandes exemplos, por todo amor, dedicação e confiança depositada. Sem vocês jamais teria realizado esse sonho.

Aos meus irmãos Bruno e Rogério, pelo apoio e intercessão.

Ao meu noivo Leandro, pelo real incentivo, paciência, compreensão, estímulo e amor dedicados a mim. Deus não poderia ter me dado melhor e maior companheiro.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, que com sua capacidade e empenho soube orientar e valorizar esta pesquisa de forma brilhante. Agradeço pela confiança em me acolher no Laboratório de Citologia Clínica, pelo grande exemplo de pesquisadora e pessoa que nos é. Esse amor que dedica ao que faz nos enche de orgulho e vontade de levar a diante o espírito de pesquisador. Obrigada pela sua amizade e pelos conhecimentos adquiridos.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Fabricia Gimenes, pela amizade, paciência e conhecimentos a mim dedicados. Sem dúvida, levarei comigo tudo o que aprendi com você, toda essa dedicação que tens à pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Citologia Clínica, pela amizade, carinho e convivência fraternal.

Ao Laboratório de Citologia Clínica, pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa, bem como disponibilidade de reagentes, aparelhos e tudo o mais necessário para realização dos experimentos.

Ao Dr. Nelson Shozo Uchimura, pela coleta de parte das amostras usadas no trabalho, o que resultou num valioso auxílio para realização desta pesquisa.

Às pacientes, que permitiram a realização dos exames em seus materiais biológicos. Que esse trabalho possa vir ajudá-las.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram pela concretização deste sonho.

## Sensível detecção simultânea de treze agentes associados à vaginose bacteriana por reação em cadeia da polimerase multiplex

### RESUMO

Vaginose Bacteriana (VB) é um distúrbio muito comum caracterizado pela diminuição da microbiota lactobacilar predominante e crescimento excessivo de bactérias anaeróbias comensais. Está associada a resultados adversos na saúde de mulheres grávidas e não grávidas. Até o momento, métodos convencionais limitados têm sido usados no diagnóstico de VB, dificultando o entendimento de sua fisiopatologia e epidemiologia. Neste estudo nós reportamos a validação do método reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR-M) para detecção simultânea de treze agentes associados à vaginose bacteriana (BV-AAs) mais relacionados a quadros sintomático de VB: *Gardnerellavaginalis*, *Mobiluncuscurtisii*, *Mobiluncusmulieris*, *Bacteroides fragilis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobiumvaginae*, *Ureaplasmaurealyticum*, *Megasphaera* tipo I, BVAB1, BVAB2, BVAB3, *Sneathiasanguinegensis* *Mycoplasma genitalium*, em amostras cérvico-vaginais. Os parâmetros gerais de validação da PCR-M foram elevados, mostrando concordância de 99,08%, sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo de 100,0%, valor preditivo negativo de 97,0%, acurácia de 99,3%, e concordância de 100% com os critérios de Nugent. VB-AAs foram detectados em 162 amostras (72,6%), somente para um agente (46,9%) ou simultaneamente para dois ou mais (53,1%). O VB-AA mais frequente foi *G. vaginalis* (n = 74), seguido por *M. tipo I* (n = 52), BVAB1 (n = 35), *U. urealyticum* (n = 28) e BVAB3 (n = 27). O ensaio de PCR-M mostrou grande potencial de impacto em diagnosticar VB e contribuir para diminuição das complicações associadas em um futuro próximo.

**Palavras-chave:** Detecção. Vaginose bacteriana. PCR-multiplex. Amostras cervicais.

## Sensitive simultaneous detection of thirteen major bacterial vaginosis - associated agents by multiplex polymerase chain reaction

### **ABSTRACT**

Bacterial vaginosis (BV) is the most common vaginal disorder, characterized by depletion of the normal lactobacillus-dominant microbiota and overgrowth of commensal anaerobic bacteria. BV is associated with adverse health outcomes in both pregnant and non-pregnant women. To date, conventional methods are considered limited to evaluate BV diagnostic, difficulting the understanding of their pathophysiology and epidemiology. Here we report the validation of a multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) method to simultaneously screen thirteen Bacterial Vaginosis-associated agents (BV-AAs) most related to symptomatic BV: *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Bacteroides fragilis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma urealyticum*, Megasphaera type I, BVAB1, BVAB2, BVAB3, *Sneathia sanguinigena* and *Mycoplasma genitalium* in cervical-vaginal samples. The overall validation parameters of M-PCR were high with 99.08% agreement, sensitivity, 100.0% specificity and positive value, 97.0% negative predictive value, 99.3% accuracy, and 100% agreement with Nugent results. BV-AAs were detected in 162 samples (72.6%) as a single agent (46.9%) or simultaneously (53.1%). The most frequent of BV-AA was *G. vaginalis* (n= 74), followed by *M. type I* (n= 52), BVAB1 (n= 35), *U. urealyticum* (n= 28) and BVAB3 (n= 27). Thus, this M-PCR assay has great impact potential for BV diagnosis and contribute to diminish complications associated in the near future.

**Keywords:** Detection. Bacterial vaginosis. multiplex-PCR. Cervical samples.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Esfregaços vaginais corados por método de Gram.....  | 14 |
| Figura 2 Vaginose bacteriana.....   | 15 |
| Figura 3 Vaginose bacteriana.....   | 16 |
| Figura 4 <i>Clue cells</i> .....  | 18 |
| Figura 5 <i>Comma cells</i> .....   | 22 |
| Table 1 Nucleotide sequences of amplification primers used in the M-PCR.....  | 54 |
| Table 2 M-PCR validation parameters compared to sPCR for thirteen major BV-AAs.....   | 55 |
| Table 3 M-PCR assay performance in 45 initial samples analyzed from women with BV<br>diagnosis by Nugent criteria.....  | 56 |
| Figure 1 Electrophoretic analysis of the amplified fragments by using M-PCR in 8%<br>polyacrylamide gels.....   | 57 |
| Figure 2 Frequency of thirteen major bacterial vaginosis-associated agents (BV-AAs) in all 223<br>samples studied as single agent or in simultaneous detection..... | 58 |

Dissertação e artigo elaborados e formatados  
conforme as normas das publicações  
científicas:

*Biomed Research International*

Disponívelem:

<http://www.hindawi.com/journals/bmri/>

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | CAPÍTULO I.....  | 11 |
| 1.1   | INTRODUÇÃO.....  | 11 |
| 1.2   | PREVALÊNCIA.....   | 12 |
| 1.3   | TRANSMISSÃO.....   | 12 |
| 1.4   | PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....  | 13 |
| 1.5   | FORMAS DE DIAGNÓSTICO.....   | 13 |
| 1.6   | AGENTES ASSOCIADOS À VAGINOSE BACTERIANA.....  | 17 |
| 1.6.1 | <i>Gardnerella vaginalis</i> .....   | 17 |
| 1.6.2 | <i>Mycoplasmahominis e Mycoplasma genitalium</i> .....   | 18 |
| 1.6.3 | <i>Ureaplasma urealyticum</i> .....  | 19 |
| 1.6.4 | <i>Megasphaera</i> tipo I.....   | 20 |
| 1.6.5 | <i>Bacteroides fragilis</i> .....  | 20 |
| 1.6.6 | <i>Atopobium vaginae</i> .....   | 20 |
| 1.6.7 | <i>Mobiluncus</i> spp.....   | 21 |
| 1.6.8 | Bactérias associadas à vaginose bacteriana (BVAB).....   | 22 |
| 1.6.9 | <i>Sneathia sanguinegens</i> .....   | 23 |
| 1.7   | JUSTIFICATIVA.....   | 24 |
| 1.8   | OBJETIVOS.....   | 25 |
| 1.8.1 | Objetivo Geral.....  | 25 |
| 1.8.2 | Objetivos Específicos.....   | 25 |
| 1.9   | REFERÊNCIAS.....   | 26 |
| 2     | CAPÍTULO II.....   | 32 |
| 2.1   | Sensitive simultaneous detection of thirteen major bacterial vaginosis-associated agents in cervical-vaginal samples by Multiplex-PCR..... | 33 |
| 3     | CAPÍTULO III.....  | 59 |
| 3.1   | CONCLUSÕES.....  | 59 |
| 3.2   | PERSPECTIVAS FUTURAS.....  | 60 |
| 4     | AUTHOR GUIDELINESBioMed Research International.....  | 61 |

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Vaginose bacteriana (VB) é definida como uma alteração da microbiota vaginal caracterizada pela ausência ou diminuição na quantidade de lactobacilos acidófilos produtores de peróxido de hidrogênio e predominância de bactérias anaeróbias [1, 2, 3]. Estes lactobacilos são predominantes e possuem função de proteger a vagina contra agentes patogênicos, mantendo o pH ácido impedindo assim a proliferação de agentes causadores de doenças[4-6].

VB foi mencionada pela primeira vez, por Gardner e Dukese em 1955, que descreveram o quadro clínico de corrimento fétido em mulheres, inicialmente denominado "vaginite não específica" [7]. Em 1984, um grupo de pesquisadores chegou a um consenso que seria mais apropriado chamar essa condição de "vaginose bacteriana" [8]. Bacteriana devido a sua associação com muitas bactérias e vaginose pela falta de uma resposta inflamatória [8].

O quadro clínico de VB caracteriza-se por secreção vaginal amarelada ou acinzentada, homogênea, com odor fétido, pH mais elevado que o normal, ausência de prurido, queimação ou sintomas urinários [9]. Não se observa modificação no colo, vagina ou vulva, pois não existe processo inflamatório associado, razão para esta síndrome polimicrobiana ser chamada de vaginose, e não vaginite[6, 10]. Atualmente VB é uma doença de grande relevância devido a sua alta prevalência e complicações obstétricas e ginecológicas, como aumenta o risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (DST), como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) [5]. Quadros de VB também podem estar associados ao parto prematuro, baixo peso do recém-nascido, aborto, infecção uterina após o parto, endometrite, infertilidade, entre outras afecções [3, 6].

O desequilíbrio do ecossistema vaginal leva a diminuição dos lactobacilos predominantes, propiciando a proliferação das bactérias anaeróbicas estritas e facultativas, que vão levar ao quadro de VB[11]. Alguns gêneros bacterianos estão mais comumente relacionados, como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides fragilis* e *Mycoplasma hominis*[12]. Entretanto, alguns estudos trazem que através de técnicas moleculares, tais como, reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR-Multiplex (PCR-M), PCR Real-Time (qPCR), outros agentes foram detectados em mulheres com VB, como

*Atopobiumvaginae*, *Ureaplasmaurealyticum*, *Megasphaera* tipo I, bactéria tipo-*Clostridia* associada a vaginose (BVAB) 1, BVAB2, BVAB3, *Sneathiasanguinegens* e *Mycoplasma genitalium* [10-12].

## PREVALÊNCIA

VB apresenta alta prevalência, variando a estimativa mundial de 10 a 30%, ou seja, uma a cada três mulheres apresenta ou apresentará quadro de VB ao longo de sua vida [13]. Nos Estados Unidos da América (EUA) esta patologia tem sido diagnosticada em 17 a 19% das mulheres não grávidas e 16% em mulheres grávidas, sendo, aproximadamente, 50% das pacientes assintomáticas [14]. Landers *et al.* [15] relataram em seu estudo realizado na cidade de Pittsburgh, nos EUA, que dentre 589 mulheres com alguma queixa genital, 46% apresentaram VB.

No Brasil, VB também mostra-se muito frequente, atingindo cerca de 45% das mulheres com queixa de corrimento vaginal [13]. Grande parte das mulheres, pelo menos 50%, não apresentam sintomas [16]. No Estado de São Paulo a prevalência de VB foi de 15% entre 1998-2002 [5].

## TRANSMISSÃO

Embora não seja aceita como uma DST, o único fator predisponente para VB encontrado consistentemente por diferentes estudos é a atividade sexual [8, 17]. Logo, os principais fatores para ocorrência da VB estão associados à idade de início da vida sexual ativa, número de parceiros sexuais, frequência de relações sexuais e uso de dispositivo intrauterino (DIU) [3, 6, 17].

Fethers *et al.* [18] relatam em seu estudo que VB está significativamente associada com o contato sexual com novos e múltiplos parceiros, tanto do gênero feminino quanto masculino, e que o ato sexual protegido (uso de preservativos) pode reduzir o incidente e infecções recorrentes.

## PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Devido à etiologia da VB não ser totalmente compreendida, não se sabe exatamente como preveni-la [19]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) [19] a prevenção da VB pode ser feita através de procedimentos, como uso de preservativos durante as relações e contatos sexuais, pois o esperma contribui para desequilibrar a microbiota vaginal, não fazer duchas vaginais sem recomendações médicas, evitar relações sexuais com múltiplos parceiros e sempre fazer exames ginecológicos de rotina. O uso de contraceptivos hormonais, por promover uma microbiota predominantemente lactobacilar, parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento da VB [14].

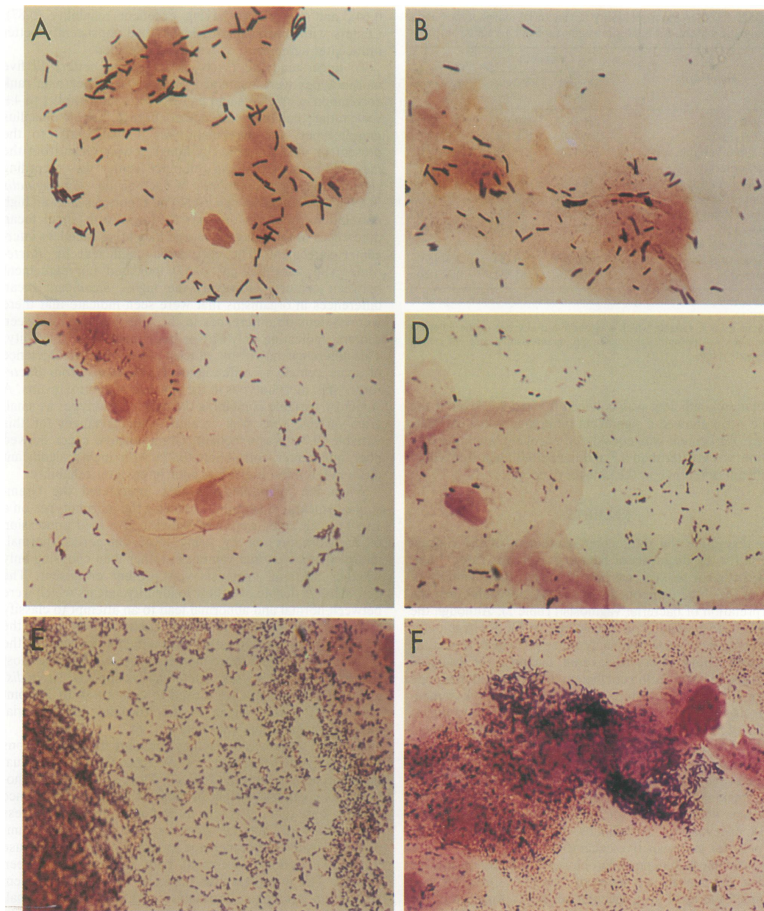
O seguimento adotado para o tratamento da VB é o uso de antibióticos como a Clindamicina e o Metronidazol, aplicados no local ou tomados em forma de comprimidos[3, 19]. Em mulheres grávidas o esquema terapêutico é diferente, não é recomendado o uso do metronidazol no 1º trimestre da gravidez, mas pode ser usado no 2º e 3º trimestres. Se o tratamento tiver sido iniciado no 1º trimestre, recomenda-se o uso de doses inferiores para reduzir o risco de efeitos negativos e normalmente os parceiros não precisam ser tratados [3, 19, 20]. Estes antibióticos podem inibir o crescimento das bactérias anaeróbias, mas não necessariamente elimina-las, pois existem fatores que levam ao desenvolvimento e proliferação dessas bactérias, logo, recaídas são relativamente comuns [20].

## FORMAS DE DIAGNÓSTICO

Clinicamente VB pode ser diagnosticada pela presença de pelo menos três dos quatro sinais dos critérios de Amsel[21]:fluxo vaginal viscoso amarelado ou acinzentado e homogêneo característico; fluido vaginal com pH> 4,5; teste das aminas positivo (odor fétido) e presença de células-alvo (*cluecells*) [4, 6, 21-23]. No entanto, algumas pacientes negativas para VB podem manifestar achados clínicos semelhantes às pacientes positivas. Desta forma, uma abordagem diagnóstica alternativa é necessária [12]. Métodos laboratoriais que incluem cultura da secreção vaginal, citologia cérvico-vaginal (Papanicolaou), coloração de Gram(Critérios de Nugent) e

identificação sorológica são muito utilizados [24-28].

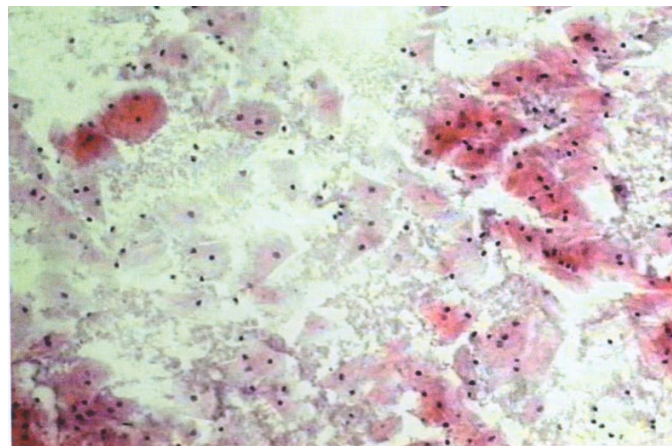
A coloração de Gram do fluido vaginal é muito utilizada para distinguir microbiota vaginal normal daquela característica de VB. Nugent[24] propôs um sistema de pontuação que permite gradações em termos de gravidade, na interpretação de esfregaços vaginais corados pelo método de Gram. Fundamenta-se, principalmente, pela presença ou não dos lactobacilos e estabelece um escore que vai de 0 a 10. Logo, a normalidade do ecossistema recebe um escore de 0 a 3 (microbiota vaginal normal); uma zona de transição ou indefinição, escore de 4 a 6 (microbiota vaginal intermediária); e uma completa desestruturação do equilíbrio dos microrganismos normais da microbiota vaginal, escore 7 a 10 (vaginose bacteriana) (Figura 1) [24].



**Figura 1.** Esfregaços vaginais corados por método de Gram. Mulheres com microbiota vaginal normal (A e B), microbiota vaginal intermediária (C e D), vaginose bacteriana (E e F) [24].

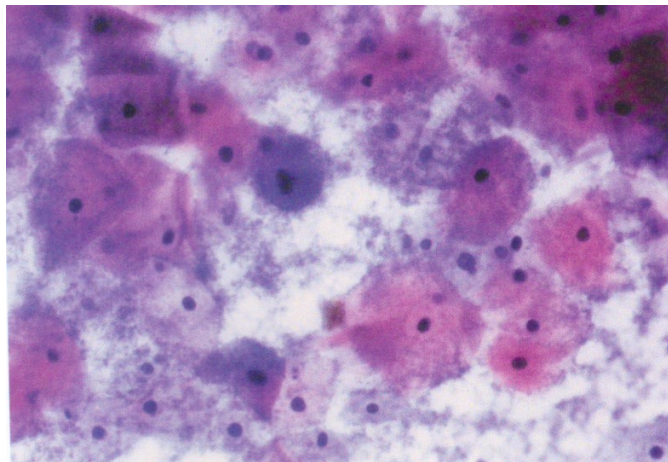
Esta técnica exige profissionais altamente experientes para sua realização e fornece informações muito limitadas sobre a identidade dos microrganismos presentes em uma amostra [12]. De forma complementar, a cultura é realizada apenas para confirmação da presença dos organismos envolvidos na VB [10].

A citologia cérvico-vaginal, ou exame de Papanicolaou, possui papel importante na identificação e reconhecimento das alterações sugestivas de VB [10]. Os esfregaços citológicos de mulheres com VB são caracterizados por ausência ou escassez de leucócitos, células com aparência normal, cianofílicas ou eosinofílicas, cariopicnóticas, citoplasmas finos e transparentes; as bactérias se encontram dispersas como poeira entre as células epiteliais descamadas e em alguns casos recobrimo-as; os cocobacilos acumulam-se na superfície celular e nas bordas, obscurecendo a membrana celular e deixando os limites celulares imprecisos (Figuras 2 e 3)[10, 29].



**Figura 2.** Vaginose bacteriana. Descamação de uma grande quantidade de células escamosas apresentando cariopcnose. As bactérias encontram-se dispersas como poeira entre as células epiteliais descamadas, recobrimo-as. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (100x) [10].





**Figura 3.** Vaginose bacteriana. Ausência ou escassez de lactobacilos, cariopicnose, com descamação de uma grande quantidade de células escamosas superficiais. As células têm aparência normal, eosinofílicas, citoplasmas finos e transparentes. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400x) [10].

A citologia cérvico-vaginal permite avaliar a intensidade da reação inflamatória presente no local, acompanhar sua evolução e determinar, em certos casos, o agente causal da doença [10]. Embora a maioria desses agentes não possam ser classificados nas preparações citológicas, a presença de alguns destes nos esfregaços pode acrescentar informações importantes para estabelecimento do diagnóstico clínico e direcionamento do tratamento [29]. Logo, sua utilização se torna importante para detecção preliminar de determinados organismos da microbiota vaginal e de algumas infecções cérvico-vaginais associadas ou não à patógenos de transmissão sexual [10].

No entanto, segundo Diaz *et al.*[30], os métodos citados acima são demorados, dispendiosos e dificilmente permitem a detecção de mais de um agente simultaneamente, pois cada patógeno é detectado por métodos diferentes e independentes. Logo, métodos moleculares também têm sido utilizados para detecção de bactérias causadoras de VB, pois apresentam as vantagens de serem mais sensíveis e específicos, permitindo a detecção de pacientes sintomáticos e assintomáticos [31].

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método fiel de diagnóstico da VB, pois permite a identificação de bactérias que não são detectadas pelos demais métodos laboratoriais [12, 32]. Com esta técnica, consegue-se investigar a diversidade bacteriana em diferentes micro-

habitats, além de ser uma técnica rápida e confiável para identificar a microbiota predominante, estando normal ou alterada, como na VB[11].

A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), é uma técnica molecular que pode ser utilizada na identificação de agentes associados à VB como *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas*[33]. Esta técnica detecta e quantifica os produtos simultaneamente amplificados em tempo real, emitindo um sinal fluorescente, cujo aumento é em proporção direta a quantidade de produto da reação de PCR [33, 34]. No entanto, esta técnica é conveniente quando se analisa apenas um ou poucos genes [35]. A PCR-multiplex (PCR-M), por sua vez, permite a detecção simultânea de múltiplos microrganismos em uma única reação [36]. É uma técnica muito eficiente, apresentando a vantagem de ser mais sensível que métodos convencionais, permitindo a detecção em pacientes assintomáticas [34]. Além disso, a PCR-M apresenta vantagens como: redução do número de reagentes, custos e tempo trabalho, proporcionando maior rapidez, especificidade e reprodutibilidade na detecção [34, 37].

Esta abordagem molecular é amplamente empregada na identificação e diferenciação microbiana porque é capaz de fornecer uma impressão digital simples de determinadas comunidades bacterianas quando comparadas com os perfis de padrões de cepas de referência[34]. No entanto, para a identificação se faz necessário utilizar mais de um conjunto de oligonucleotídeos alvo específicos, tendo como resultado da amplificação um produto que é uma mistura de amplicons para cada amostra analisada [34]. A PCR-M pode ser aplicada a uma variedade de amostras clínicas, tornando uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças bacterianas [34, 38, 39].

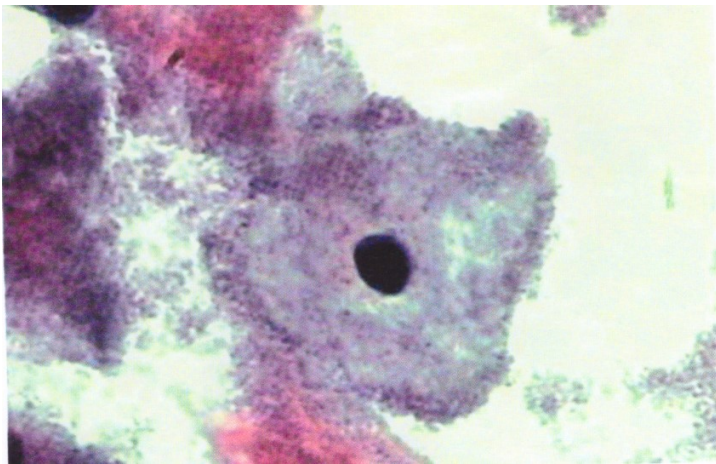
## **AGENTES ASSOCIADOS À VB**

### ***Gardnerellavaginalis***

É uma bactéria anaeróbia facultativa, imóvel, observada sob a forma de cocobacilos gram-variáveis [40]. Desde sua primeira descrição por Gardner e Dukes em 1955, é reconhecida por colonizar o trato genital feminino e fazer parte da microbiota endógena em 30 a 70% das mulheres em idade reprodutiva[7, 41].

*G. vaginalis* é a bactéria mais estudada associada à VB. No entanto, não é específica, pois comumente está presente em mulheres com microbiota vaginal normal, embora, geralmente em menor número do que naquelas com VB [42, 43]. Os sintomas mais comumente relacionados à *G. vaginalis* são corrimento amarelado ou acinzentado e odor fétido, principalmente quando em contato com o sêmen (pH acima de 4,5) [10, 40, 41]. Em esfregaços cérvico-vaginais corados por Papanicolaou, é possível observar a aderência da *G. vaginalis* às células escamosas maduras, principalmente do tipo superficiais, caracterizando as *Cluecells* (Figura 4) [10].

Os métodos de diagnóstico mais usados para detecção da *G. vaginalis* são: coloração de Gram, cultura, citologia cérvico-vaginal e técnicas moleculares [10, 20].



**Figura 4.** *Cluecells*. São células escamosas maduras, com cocobacilos sugestivos de *Gardnerellavaginalis* aderidos a sua superfície. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000x) [10].

### ***Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma genitalium***

São os menores organismos de vida livre conhecidos e não possuem parede celular o que dificulta seu isolamento para detecção pelos métodos convencionais e também são classificados separadamente dentro do reino *Prokaryotae* [10, 44, 45].

Para infectar o homem e também outros animais, esse microrganismos se aderem de forma firme na mucosa epitelial tanto do trato respiratório, quanto urogenital. O gênero *Mycoplasma* apresenta diversas espécies já isoladas no homem, onde o maior interesse médico são *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma genitalium* [46]. *M. genitalium* possui uma estrutura de

terminais que facilita sua aderência nas células epiteliais. Seu genoma de 580 kilo pares de base (Kpb) contém apenas 485 genes codificadores de proteínas, tornando-o o menor microrganismo de vida livre. Já o *M. hominis* apresenta um genoma de 665 Kpb, contendo 527 genes codificadores de proteínas [33].

Estas duas espécies são comensais pertencentes à microbiota do trato genital feminino, sendo altamente prevalentes em mulheres sexualmente ativas, onde 21% a 53% dessas mulheres são colonizadas no colo do útero ou na vagina [33]. Apresentam papel etiológico em algumas doenças do trato urogenital feminino, como VB, pielonefrite, doença inflamatória pélvica (DIP), septicemia e infertilidade [30, 47].

Pelo fato de não possuírem parede celular, os *Mycoplasmas* não são visíveis em preparações coradas com o método de gram, sendo necessárias técnicas mais específicas para seu diagnóstico, como cultura, técnicas imunológicas, como as reações imunoenzimáticas (ELISA) e de biologia molecular (PCR) [10, 46]. Em esfregaços corados com Papanicolaou, agregados granulares observados na superfície das células do epitélio vaginal, fornecem um aspecto sujo aos esfregaços e podem estar relacionados com a presença desses *Mycoplasmas*[48].

### ***Ureaplasma urealyticum***

Os membros do gênero *Ureaplasma* hidrolisam uréia e usam como um substrato metabólico para geração de adenosina trifosfato(ATP). Este gênero tem sete espécies reconhecidas, sendo *U. parvum* e *U. urealyticum* as duas espécies encontradas em seres humanos. O *U. urealyticum* por sua vez é mais patogênico, justificando sua identificação na maioria dos estudos, estando presente em 40% a 80% das mulheres adultas saudáveis [33]. Apesar dessa frequente ocorrência em mulheres saudáveis, o *U. urealyticum* pode estar associado a uma variedade de condições clínicas em adultos, incluindo artrite, endometrite pós-parto, bem como nascimento prematuro, pneumonia, bacteremia, abscessos, meningite e doença pulmonar crônica em neonatos [33].

Os métodos de diagnósticos usados para detecção do *U. urealyticum* são: cultura, técnicas imunológicas, como as reações imunoenzimáticas (ELISA) e de biologia molecular, como PCR convencional, PCR em tempo real e PCR-M[10, 33].

### ***Megasphaera* tipo I**

O advento na utilização de técnicas moleculares, como PCR convencional e qPCR, permitiram a identificação de novas bactérias, como *Megasphaera* tipo I, e as relataram como possíveis agentes associados à VB [12, 43].

É uma bactéria anaeróbia, produtora de ácido láctico semelhante aos lactobacilos, fortemente relacionada à VB [43, 49]. Fetherset *al.* [43], mostraram em seu estudo que a *Megasphaera* tipo I apresenta associação significativa com o aumento da exposição sexual.

### ***Bacteroides fragilis***

É uma bactéria gram-negativa, anaeróbica, não formadora de esporos, obrigatoriamente encontrada no trato intestinal de humanos e animais [50]. Não fazem parte da microbiota vaginal normal, mas são ocasionalmente isoladas de culturas vaginais e frente a um distúrbio, há um crescimento excessivo dessa bactéria, caracterizando quadros de VB [51, 52]. É reconhecida por causar adversidades como abscessos e outras infecções não intestinais em vários tecidos humanos [50].

Segundo Myers[50], *B. fragilis* pode ser detectado por cultura, análises bacteriológicas e sorológicas. Métodos moleculares também vêm sendo utilizados para detecção deste microorganismo, como PCR convencional e quantitativo[53].

### ***Atopobiumvaginae***

O gênero *Atopobium* foi proposto em 1992, e desde então vem sendo isolado de infecções em humanos [54]. O gênero é caracterizado como coco anaeróbico gram-positivo produtor de ácido láctico, similar a lactobacilos. O membro mais recente do gênero, *Atopobiumvaginae*, foi caracterizado em 1999 a partir da microbiota vaginal de uma mulher saudável na Suécia [55].

*A. vaginae* parece ser mais comum em mulheres com VB e microbiota vaginal heterogênea, do que em mulheres saudáveis[56]. Portanto, *A. vaginae* está intimamente associada com VB, e sua presença têm alta sensibilidade e especificidade na predição desta patologia [57, 58]. Como apresenta uma morfologia variável podem ocorrer erros de identificação quando

realizado métodos de detecção convencionais, como coloração de Gram. Logo, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares para que seu diagnóstico seja preciso, como PCR convencional e PCR-M[56, 57].

### ***Mobiluncusspp.***

Trata-se de um bacilo anaeróbio estrito, por isso extremamente fastidioso, requerendo meios de cultura não seletivos e ricos em nutrientes, como ágar chocolate ou ágar sangue BHI. Após três a cinco dias de incubação a 35°C, sob anaerobiose, é possível observar pequenas colônias translúcidas, lisas e convexas. O nome do gênero, *Mobiluncus*, vem dos termos *mobilis* e *uncus* que fazem referência a sua motilidade e morfologia semelhante a um gancho, respectivamente [59].

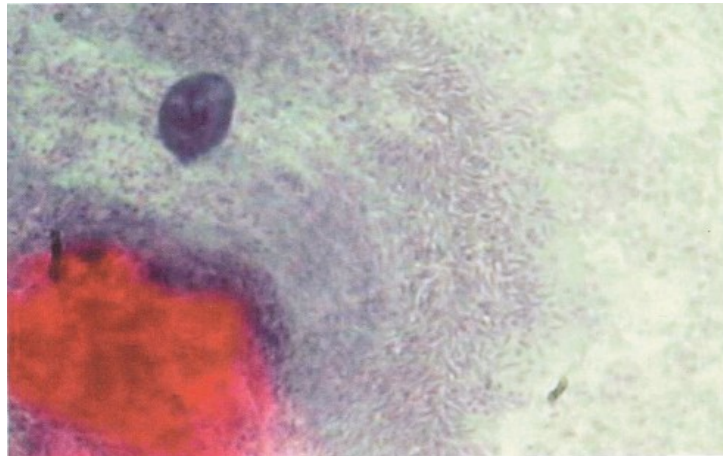
Este gênero possui duas espécies que são identificadas em humanos, *M. curtisii* e *M. mulieris*, que se diferem por parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares [10, 60, 61]. *M. curtisii* são bacilos menores, possuem cerca de 1,7 µm de comprimento, enquanto a espécie *M. mulieris* possui aproximadamente 2,9 µm. Além disso, *M. curtisii* é gram-variável e *M. mulieris* apresenta-se negativo [59].

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Mobiluncus* são frequentemente encontrados em amostra de mulheres com VB, desta forma sua presença pode servir como um indicador da doença[62]. Alguns estudos mostraram a presença de *Mobiluncus* spp. em comunidades bacterianas vaginais somente quando VB estava presente [11].

São relacionados com complicações pós-parto, como infecção umbilical, endometrite e sepse[59]. Sua presença é fortemente associada com os sintomas clínicos de VB, muito embora nenhum destes, como odor fétido, fluxo menstrual aumentado e prolongado, dor abdominal e corrimento amarelado, podem ser considerados indicadores da presença de *Mobiluncus* spp. [62]. *Mobiluncusspp.*, especialmente *M. curtisii* apresenta-se altamente resistente a metronidazol, uma das drogas mais comumente utilizadas para tratamento de VB no Brasil [63]. Desta forma, a presença de *M. curtisii* e sua persistência, são altamente associadas à recorrência de VB [64].

A presença de *Mobiluncus* spp. pode ser verificada por diferentes técnicas, como pela coloração de gram de uma amostra vaginal em que se observa bacilos curvos, no formato de asa

de gaivota[59], ou por isolamento em cultura. As *commacells* são características da presença de *Mobiluncus* spp., são células escamosas maduras, principalmente intermediárias, com microrganismos aderidos a sua superfície, recobrendo as bordas celulares, dando um aspecto de “tapete de pelo” (Figura 5) [10].



**Figura 5.** *Commacells*. São células escamosas maduras, principalmente do tipo intermediárias, com bacilos curvos sugestivos de *Mobiluncus* spp. aderidos em sua superfície, recobrendo as bordas celulares, dando um aspecto de “tapete de pelo”. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000x) [10].

Técnicas mais sensíveis e específicas têm sido descritas para identificação destes agentes como ensaios imunológicos, exemploimunofluorescência, e moleculares, como PCR com iniciadores específicos para cada bactéria e análise de uma sequência altamente conservada, mas filogeneticamente informativa no gene correspondente à subunidade 16S do ribossomo bacteriano (*broad-range* PCR), para a qual cada bactéria possui uma sequência específica [12, 65].

### **Bactérias associadas à vaginose bacteriana(BVAB)**

No ano de 2005, Fredricks e colaboradores, realizaram um estudo para identificação de diferentes agentes envolvidos na VB, baseado na sequência do rDNA 16S das bactérias presentes no fluido vaginal de 73 mulheres, das quais 27 possuíam VB e 46 apresentavam condições

normais [66]. No estudo referido foram identificadas 3 novas bactérias, nomeadas provisoriamente como bactérias associadas a vaginose bacteriana (BVAB) 1, 2 e 3. Na análise filogenética, BVAB1, BVAB2 e BVAB3, apresentaram-se relacionadas ao filo Clostridium, mas não intimamente relacionada a qualquer bactéria com sequência de rDNA 16S conhecida anteriormente [66]. Desde então, alguns artigos tem identificado estes agentes em mulheres com VB [67-69]. Sua identificação tem sido altamente relacionada à presença de VB. Um estudo encontrou estas bactérias no fluido vaginal de mulheres saudáveis, entretanto, as mesmas desenvolveram VB poucos meses após as análises [66].

A morfologia destas bactérias foi observada por técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), as sondas para sequências de BVAB1 hibridizaram em bactérias curvas, já BVAB2 parece ser um pequeno bacilo, reto, mais largo que BVAB1, enquanto BVAB3 apresentou-se mais longo, largo, reto e em forma de lanceta. Sendo assim, BVAB1, BVAB2 e BVAB3 são morfologicamente distintos uns dos outros e facilmente distinguíveis de outras bactérias comumente envolvidas na VB, como *Mobiluncusspp.* e *Gardnerellaspp.* [66]. As três bactérias foram observadas aderidas às células epiteliais, formando as típicas *clue-cells* que caracterizam VB [66].

Até o presente momento, em nosso conhecimento, não há estudos que relatam o isolamento por cultura destes microrganismos, provavelmente por se tratarem de bactérias extremamente fastidiosas. Desta maneira seu diagnóstico na maioria das vezes é feito por técnicas moleculares como PCR tradicional, PCR quantitativa, PCR-M e FISH de amostras de fluido vaginal [66, 69]. Em relação aos sinais e sintomas característicos de VB, BVAB1 é relacionado com a presença de odor de amina, enquanto BVAB2 está relacionado positivamente com a presença de *clue-cells* no fluido vaginal [69].

### ***Sneathiasanguinegens***

Em 1995, Hanffet *al.*, indicaram uma nova espécie do gênero *Leptotrichia* a partir de isolados de pacientes com quadro de bacteremia pós-parto e neonatal, esta bactéria desconhecida foi chamada *Leptotrichiasanguinegens* [70]. Entretanto, em 2001, Collins *et al.*, propuseram um novo nome a este microrganismo, afirmando que esta nova espécie nunca havia sido validamente



descrita [71]. Neste estudo foram avaliados três isolados, sendo dois, amostras de sangue, e um de fluido amniótico, que tiveram sua região rDNA 16S sequenciada. As sequências obtidas foram comparadas às de outras bactérias previamente descritas no GenBank. A partir da análise fenotípica e genotípica concluiu-se que a bactéria em questão não se tratava de uma nova espécie do gênero *Leptotrichia* e sim de uma bactéria que merece uma nova classificação quanto ao gênero e à espécie. Desta maneira, o nome proposto foi *Sneathiasanguinegens* (*Sneathia* em homenagem ao microbiologista britânico Peter H. A. Sneath; *sanguinegens* dos termos *sanguis*, sangue, e *egens*, necessidade, ou seja, necessidade de sangue, porque elas precisam de sangue para seu crescimento) [71].

Esta é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia, não esporogênica, não móvel, em forma de bacilo. Suas células podem apresentar pleomorfismos e filamentos podem ser observados. São microrganismos fastidiosos, necessitam de soro ou sangue para seu crescimento, após 72 horas de incubação observam-se colônias milimétricas e convexas [71].

Acredita-se que esteja envolvida na causa de partos prematuros e infecções pós-parto [72]. Por tratar-se de uma bactéria dificilmente cultivável, seu diagnóstico é realizado por meio de técnicas moleculares, como PCR simples e *broad-range* PCR do rDNA bacteriano [71, 72].

## JUSTIFICATIVA

Vaginose bacteriana (VB) é caracterizada como uma síndrome polimicrobiana de grande relevância, principalmente devido à alta prevalência e às complicações obstétricas e ginecológicas, que aumentam o risco de transmissão de DSTs, incluindo o vírus HIV. Seu diagnóstico depende de métodos laboratoriais tradicionais, como Papanicolaou, cultura, coloração de Gram e em alguns casos identificação sorológica. Entretanto, estes métodos são demorados, dispendiosos e dificilmente permitem detecção de mais de um agente simultaneamente, pois cada patógeno é detectado por métodos diferentes e independentes. Já, os métodos moleculares têm sido utilizados para detecção de agentes microbianos, incluindo os envolvidos em VB, pois apresentam as vantagens de serem mais sensíveis e específicos. PCR-M apresenta vantagem adicional no rastreio, uma vez que permite a detecção simultânea de vários

agentes patogênicos, reduzindo número de reagentes, custos e tempo trabalho, proporcionando maior rapidez, especificidade e reprodutibilidade, além de permitir a detecção em pacientes sintomáticos e assintomáticos. Considerando que as informações na literatura ainda são escassas e conflitantes sobre frequência destes agentes, propomos a padronização da técnica de PCR-M na detecção de 13 agentes associados à Vaginose Bacteriana: *Gardnerellavaginalis*, *Mobiluncuscurtisii*, *Mobiluncusmulieris*, *Bacteroides fragilis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobiumvaginae*, *Ureaplasmaurealyticum*, *Megasphaera* tipo I, BVAB1, BVAB2, BVAB3, *Sneathiasanguinegensis* e *Mycoplasma genitalium*. Esta técnica foi padronizada e validada para detecção das bactérias em amostras cérvico-vaginais de mulheres atendidas no laboratório de Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (UEM)/Brasil, como uma tentativa de melhorar o diagnóstico de VB em mulheres sintomáticas e assintomáticas, evitando complicações decorrentes.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Padronizar e validar a técnica de PCR-multiplex para detecção de 13 agentes associados à VB em amostras cérvico-vaginais de mulheres atendidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (UEM)/Brasil.

### **Objetivos Específicos**

- Obtenção de amostras cérvico-vaginais de mulheres atendidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (UEM) /Brasil;
- Extrair o DNA genômico e padronizar a técnica;
- Amplificar o DNA dos treze agentes associados à VB utilizando a técnica de PCR-M;
- Visualizar o material amplificado em géis de poliacrilamida 8%;
- Validar a técnica de PCR-M utilizando PCR simples para cada agente estudado.

## REFERÊNCIAS

- [1] D. H. Watts, M. Fazzari, M. Fazarriet al., “Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women,” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 191, no. 7, pp. 1129-39, 2005.
- [2] B. M. Tavares-Murta, A. D. de Resende, F. Q. Cunha et al., “Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia,” *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 138, no. 1, pp. 93-9, 2008.
- [3] Brasil, "Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis DST," M. d. S. S. d. V. e. S. P. N. d. D. e. Aids, ed., Ministério da Saúde, 2006, pp. 61-63.
- [4] R. C. V. Santos, R. S. R. Pulcinelli, B. S. Vizzotto et al., “Prevalência de vaginose bacterianas em pacientes ambulatoriais atendidas no Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS,” *RS. NewsLab*, vol. 75, pp. 161-4, 2006.
- [5] V. d. A. Tanaka, S. L. D. Gotlieb, R. Soreano et al., “Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo, SP Epidemiological profile of women with bacterial vaginosis treated at a clinic for sexually transmitted diseases in the city of Sao,” *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 82, no. 1, pp. 41-6, 2007.
- [6] D. A. Mota, C. A. Monteiro, S. G. Monteiro et al., “Prevalência de vaginose bacteriana em pacientes que realizaram bacterioscopia de secreção vaginal em laboratório de saúde pública,” *Revista Brasileira de Clínica Médica*, vol. 10, no. 1, pp. 15-18, 2012.
- [7] H. L. GARDNER, and C. D. DUKES, “Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis,” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 69, no. 5, pp. 962-76, 1955.
- [8] C. S. Easmon, P. E. Hay, and C. A. Ison, “Bacterial vaginosis: a diagnostic approach,” *Genitourinary Medicine*, vol. 68, no. 2, pp. 134-8, 1992.
- [9] K. Fethers, “Is bacterial vaginosis a sexually transmitted infection,” *Sexually Transmitted Infections*, vol. 77, no. 5, pp. 390, 2001.
- [10] M. E. L. Consolaro, and S. S. Maria-Engler, "Microbiologia Cérvico-Vaginal," *Citologia Clínica Cérvico-Vaginal: Texto e Atlas*, Roca, ed., pp. 73-94, São Paulo: Grupo Editorial Nacional, 2012.
- [11] Z. Ling, J. Kong, F. Liuet al., “Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis,” *BMC Genomics*, vol. 11, pp. 488, 2010.
- [12] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, K. K. Thomaset al., “Targeted PCR for detection of vaginal

- bacteria associated with bacterial vaginosis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 10, pp. 3270-6,2007.
- [13] M. S. Almeida, F. H. F. Barbosa, and M. d. S. M. Gomes, “Prevalência de microrganismos patogênicos presentes em secreções vaginais de pacientes atendidas na unidade de saúde de mazagão-ap/Brasil no ano de 2009 e 2010,” *Revista BIOTERRA-ISSN 1519-5228*, vol. 13, no. 1, 2013.
- [14] P. C. Giraldo, M. R. L. Passos, R. Bravo et al., “O frequente desafio do entendimento e do manejo da vaginose bacteriana,” *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, vol. 19, no. 2, pp. 84-91, 2007.
- [15] D. V. Landers, H. C. Wiesenfeld, R. P. Heine et al., “Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women,” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 190, no. 4, pp. 1004-10, 2004.
- [16] E. Gillet, J. F. Meys, H. Verstraelen et al., “Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis,” *BMC Infectious Diseases*, vol. 11, pp. 10, 2011.
- [17] U. Forsum, A. Hallén, and P. G. Larsson, “Bacterial vaginosis--a laboratory and clinical diagnostics enigma,” *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 113, no. 3, pp. 153-61, 2005.
- [18] K. A. Fethers, C. K. Fairley, J. S. Hocking et al., “Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 11, pp. 1426-35, 2008.
- [19] OMS, "Orientações para o tratamento de infecções sexualmente transmissíveis," O. M. d. Saúde, ed., Organização Mundial da Saúde, pp. 58-59, 2005.
- [20] P. Hay, “Bacterial vaginosis,” *Medicine*, vol. 42, no. 7, pp. 359-363, 2014.
- [21] R. Amsel, P. A. Totten, C. A. Spiegelet et al., “Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations,” *American Journal of Medicine*, vol. 74, no. 1, pp. 14-22, 1983.
- [22] J. A. Simoes, M. G. Discacciati, E. M. Brolazo et al., “Clinical diagnosis of bacterial vaginosis,” *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, vol. 94, no. 1, pp. 28-32, 2006.
- [23] M. R. Barcelos, P. R. Vargas, C. Baroniet et al., “Genital infections in women attending a Primary Unit of Health: prevalence and risk behaviors,” *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, vol. 30, no. 7, pp. 349-54, 2008.
- [24] R. P. Nugent, M. A. Krohn, and S. L. Hillier, “Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation,” *Journal of*

*Clinical Microbiology*, vol. 29, no. 2, pp. 297-301, 1991.

- [25] H. Bahar, M. M. Torun, F. Oçeret al., “Mobiluncus species in gynaecological and obstetric infections: antimicrobial resistance and prevalence in a Turkish population,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 25, no. 3, pp. 268-71, 2005.
- [26] G. A. Nai, A. L. Mello, A. D. Ferreira et al., “Frequency of *Gardnerella vaginalis* in vaginal smears of hysterectomized women,” *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 53, no. 2, pp. 162-5, 2007.
- [27] A. B. Oliveira, C. A. d. S. França, T. B. Santos et al., “Prevalência de *Gardnerella* e *Mobiluncus* em exames de colpocitologia em Tome-Açu, Pará,” *Revista Paraense de Medicina*, vol. 21, no. 4, pp. 47-51, 2007.
- [28] R. T. Gergova, T. V. Strateva, and I. G. Mitov, “*Gardnerella vaginalis*-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women,” *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 17, no. 3, pp. 313-8, 2013
- [29] J. E. Junior, and D. I. M. Cavalcante, “Contagem de morfotipos de *Mobiluncus* sp e concentração de leucócitos em esfregaços vaginais de pacientes com vaginose bacteriana,” *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, vol. 26, no. 3, pp. 221-225, 2004.
- [30] N. Diaz, D. Dessì, S. Dessole et al., “Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* by a new multiplex polymerase chain reaction,” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 67, no. 1, pp. 30-6, 2010.
- [31] K. A. Stellrecht, A. M. Woron, N. G. Mishriket al., “Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital *Mycoplasmas*,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 4, pp. 1528-33, 2004.
- [32] J. A. Dols, P. W. Smit, R. Kortet al., “Microarray-based identification of clinically relevant vaginal bacteria in relation to bacterial vaginosis,” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 204, no. 4, pp. 305-7, 2011.
- [33] K. B. Waites, L. Xiao, V. Paralanov et al., “Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology,” *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 14, no. 5, pp. 437-50, 2012.
- [34] L. Settanni, and A. Corsetti, “The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 69, no. 1, pp. 1-22, 2007.
- [35] M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson et al., “The real-time polymerase chain reaction,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, no. 2-3, pp. 95-125, 2006.

- [36] J. S. Chamberlain, R. A. Gibbs, J. E. Ranier et al., "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification," *Nucleic Acids Research*, vol. 16, no. 23, pp. 11141-56, 1988.
- [37] C. J. McIver, N. Rismanto, C. Smith et al., "Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical *mycoplasma*, *ureaplasma*, and *trichomonas* and viral agent infections in sexually active australian women," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 5, pp. 1358-63, 2009.
- [38] B. Bhattacharya, K. Karak, A. G. Ghosale et al., "Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species," *Tropical Medicine & International Health*, vol. 8, no. 2, pp. 150-7, 2003.
- [39] D. a. R. Poroca, A. S. Lima, J. F. Lima et al., "Differentiation of micobacteria by multiplex PCR," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 42, no. 6, pp. 716-22, 2009.
- [40] B. W. Catlin, "*Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 5, no. 3, pp. 213-37, 1992.
- [41] A. C. d. O. Silveira, H. A. P. H. d. M. Souza, and C. A. Albin, "A *Gardnerella vaginalis* e as infecções do trato urinário," *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina*, vol. 46, no. 4, pp. 295-300, 2010.
- [42] J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo et al., "Vaginal microbiome of reproductive-age women," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108 Suppl 1, pp. 4680-7, 2011.
- [43] K. Fethers, J. Twin, C. K. Fairley et al., "Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. e30633, 2012.
- [44] J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch et al., "*Mycoplasmas*: molecular biology and pathogenesis," *American Society for Microbiology*, 1992.
- [45] A. Edberg, M. Jurstrand, E. Johansson et al., "A comparative study of three different PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens from men and women," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 57, no. Pt 3, pp. 304-9, Mar, 2008.
- [46] K. B. Waites, B. Katz, and R. L. Schelonka, "*Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* as neonatal pathogens," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 18, no. 4, pp. 757-89, 2005.
- [47] J. S. Huppert, J. R. Bates, A. F. Weber et al., "Abnormal vaginal pH and *Mycoplasma genitalium* infection," *Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology*, vol. 26, no. 1, pp. 36-9, 2013.

- [48] Y. Hirai, T. Kanatani, M. Ono et al., "An indirect immunofluorescence method for detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smears," *Microbiology and Immunology*, vol. 35, no. 10, pp. 831-9, 1991.
- [49] I. M. Linhares, P. C. Giraldo, and E. C. Baracat, "New findings about vaginal bacterial flora," *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 56, no. 3, pp. 370-4, 2010.
- [50] L. L. Myers, D. S. Shoop, L. L. Stackhouse et al., "Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 25, no. 12, pp. 2330-3, 1987.
- [51] R. Hemalatha, B. A. Ramalaxmi, E. Swetha et al., "Evaluation of vaginal pH for detection of bacterial vaginosis," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 138, no. 3, pp. 354-9, 2013.
- [52] H. M. Wexler, "*Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 20, no. 4, pp. 593-621, 2007.
- [53] J. M. Marrazzo, "Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: are we still confused?," *Anaerobe*, vol. 17, no. 4, pp. 186-90, 2011.
- [54] J. P. Trama, K. E. Pascal, J. Zimmerman et al., "Rapid detection of *Atopobium vaginae* and association with organisms implicated in bacterial vaginosis," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 22, no. 2, pp. 96-102, 2008.
- [55] M. Rodriguez Jovita, M. D. Collins, B. Sjoden et al., "Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov.," *International journal of systematic bacteriology*, vol. 49 Pt 4, pp. 1573-6, 1999.
- [56] C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley et al., "The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 6, pp. 828-36, 2006.
- [57] J. P. Menard, F. Fenollar, M. Henry et al., "Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 1, pp. 33-43, 2008.
- [58] A. Swidsinski, W. Mendling, V. Loening-Baucke et al., "An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 198, no. 1, pp. 971-6, 2008.
- [59] C. A. Spiegel, "*Mobiluncus curtisii* and *Mobiluncus mulieris*, curved motile bacteria from the human vagina," *Clinical Microbiology Newsletter*, vol. 6, no. 22, pp. 163-165, 1984.
- [60] S. L. Hiller, and D. A. Eschenbach, "Bacterial vaginosis: Role of *Mobiluncus* species,"

- Infectious Diseases Newsletter*, vol. 5, no. 9, pp. 65-68, 1986.
- [61] M. Gatti, "Isolation of *Mobiluncus* species from the human vagina," *Zentralbl Bakteriolog*, vol. 289, no. 8, pp. 869-78, 2000.
- [62] S. L. Hillier, C. W. Critchlow, C. E. Stevens et al., "Microbiological, epidemiological and clinical correlates of vaginal colonisation by *Mobiluncus* species," *Genitourinary Medicine*, vol. 67, no. 1, pp. 26-31, 1991.
- [63] C. A. Spiegel, "Susceptibility of *Mobiluncus* species to 23 antimicrobial agents and 15 other compounds," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 31, no. 2, pp. 249-52, 1987.
- [64] M. C. Meltzer, R. A. Desmond, and J. R. Schwebke, "Association of *Mobiluncus curtisii* with recurrence of bacterial vaginosis," *Sexually Transmitted Diseases*, vol. 35, no. 6, pp. 611-3, 2008.
- [65] A. Hallén, C. Pålsson, and U. Forsum, "Bacterial vaginosis in women attending STD clinic: diagnostic criteria and prevalence of *Mobiluncus spp*," *Genitourinary medicine*, vol. 63, no. 6, pp. 386-9, 1987.
- [66] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, and J. M. Marrazzo, "Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 18, pp. 1899-911, 2005.
- [67] F. L. Thies, W. König, and B. König, "Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56, no. Pt 6, pp. 755-61, 2007.
- [68] M. Zozaya-Hinchliffe, R. Lillis, D. H. Martin et al., "Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 48, no. 5, pp. 1812-9, 2010.
- [69] S. Srinivasan, N. G. Hoffman, M. T. Morgan et al., "Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. e37818, 2012.
- [70] P. A. Hanff, J. A. Rosol-Donoghue, C. A. Spiegelet et al., "*Leptotrichia sanguinegens* sp. nov., a new agent of postpartum and neonatal bacteremia," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 20 Suppl 2, pp. S237-9, 1995.
- [71] M. D. Collins, L. Hoyles, E. Tornqvist et al., "Characterization of some strains from human clinical sources which resemble "*Leptotrichia sanguinegens*": description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov.," *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 24no. 3, pp. 358-61, 2001.
- [72] D. B. DiGiulio, R. Romero, H. P. Amogan et al., "Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation," *PLoS One*, vol. 3, no. 8, pp. e3056, 2008.



## **CAPÍTULO II**

**Article: “SENSITIVE SIMULTANEOUS DETECTION OF THIRTEEN  
MAJOR BACTERIAL VAGINOSIS-ASSOCIATED AGENTS BY  
MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION”**

**Sensitive simultaneous detection of thirteen major bacterial vaginosis -  
associated agents by multiplex polymerase chain reaction**

Natalia Malaguti<sup>1</sup>, Larissa Danielle Bahls-Pinto<sup>1</sup>, Nelson Shozo Uchimura<sup>2</sup>, Fabrícia  
Gimenes<sup>1</sup>, and Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>1\*</sup>

*<sup>1</sup>Clinical Cytology and STD Laboratory, Department of Clinical Analysis and Biomedicine,  
State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil*

*<sup>2</sup>Department of Medicine, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil*

\*Correspondence should be addressed to Márcia Edilaine Lopes Consolaro;  
melconsolaro@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Av.  
Colombo, 5790, Zona 07, 87020-900; Maringá, PR, Brazil

## Abstract

Bacterial vaginosis (BV) is characterized by a polymicrobial proliferation of anaerobic bacteria and depletion of lactobacilli that are components of natural vaginal microbiota. BV has been associated with many sexually transmitted infections (STIs), and the main hypothesis is that the reduction of lactic acid-producing bacteria facilitates entry and/or proliferation of pathogens. To date there are limited conventional methods to evaluate BV diagnostic, and they are time-consuming, expensive and hardly allow the detection of more than one agent simultaneously. Thus, we aimed at conceiving and validating a multiplex PCR (M-PCR) assay for simultaneous screening of thirteen bacterial vaginosis-associated agents (BV-AAs) most related to symptomatic cases: *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Bacteroides fragilis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Megasphaera type I*, BVAB1, BVAB2, BVAB3, *Sneathia sanguinegens* and *Mycoplasma genitalium* in cervical-vaginal samples. We also investigated the potential usefulness of this M-PCR assay in screening programs for major BV-AAs and in addition we aimed evaluate the prevalence of the thirteen BV-AAs in cervical samples. The overall validation parameters of M-PCR were extremely high including agreement of 99.08%, sensitivity, specificity and positive value of 100.0%, negative predictive value of 97.0%, accuracy of 99.3% and 100% agreement with Nugent results. The prevalence of BV-AAs was very high (72.6%), with simultaneously detected agents observed (53%), demonstrating the effectiveness of M-PCR method. Thus, this M-PCR assay has great potential impact for BV diagnostic in cervical-vaginal samples and contribute to diminish associated complications in the near future.

**Keywords:** Detection. Bacterial vaginosis. multiplex-PCR. Cervical samples.

## 1. Introduction

Bacterial vaginosis (BV) is the most prevalent lower genital tract infection in women of reproductive age throughout the world [1]. Women with BV typically report symptoms that include a thin vaginal discharge and a fishy malodor [2]; however, a substantial portion of affected women are asymptomatic [3]. Although the etiology of BV is incompletely understood, no single etiologic agent is known to be the cause of BV, and the syndrome is considered an ecological disorder of the vaginal microbiota. It is characterized by reduction of lactic acid-producing bacteria (mainly *Lactobacillus* spp.) and increase in the number and diversity of facultative and strictly anaerobic bacteria [4-6]. BV has been shown to be an independent risk factor for adverse outcomes, including pelvic inflammatory disease (PID) [7, 8] and subsequent infertility [9], increased risk of preterm labor and delivery [9, 10], amniotic fluid infections [11], chorioamnionitis [12], low birth weight [13], endometritis [14], cervicitis [15], and still increased risk of acquiring sexually transmitted infections (STIs) like HIV [5, 16]. Therefore, it is essential the diagnosis of BV especially in pregnant females as early as possible to prevent complications [17], the precise pathophysiology and epidemiology of BV, as well as the optimal medical management of the condition, are far from clear, with much of this lack of understanding occurring as a direct result of the difficulty in establishing a diagnostic standard for the syndrome [18].

In clinical settings, BV is often diagnosed based on the criteria described by Amsel et al. [19] wherein three of the following four signs must be evident: elevated vaginal fluid, pH greater than 4.5; homogeneous vaginal discharge on examination; detection of a fishy odor upon addition of 10% potassium hydroxide to vaginal fluid; and presence of significant clue cells (>20%). Another method widely used for the diagnosis is based on grading or scoring the microbiota in the Gram stained smears of vaginal fluid [20]. Both methods score the smears by quantification of the different vaginal morphotypes, making the evaluation of smears very subjective that requires an experienced slide reader and also considerable time and skill [17]. In research and laboratory settings, BV diagnosis depended on traditional methods such as culture and Gram-staining vaginal smears [5, 21, 22]. Conventional microbiological approaches have only limited utility in evaluating patients for BV. Since the hallmark of the condition is a complex perturbation of the normal vaginal microbiota, culture-based identification of single “marker” organisms lacks both sensitivity and specificity [23]. In addition, many of the key

organisms associated with BV are obligate anaerobes and are either difficult to recover or unrecoverable using conventional culture methods, which makes a true evaluation of vaginal microbiota by culture impossible [6].

The true extent of the microbial diversity in BV has been indicated only with the advent of recent cultivation-independent molecular-based approaches, such as polymerase chain reaction (PCR), multiplex-PCR (M-PCR), real-time PCR, taxon-directed PCR, broad-range bacterial 16S rDNA PCR and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [10, 23-30]. Using these techniques, several novel bacteria have been shown to be associated with BV [29]. Actually, the most common major bacterial vaginosis-associated agents (BV-AAs) include *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae* and *Bacteroides fragilis*, wherein the presence of *G. vaginalis* and *A. vaginae* together in high copy numbers have a high sensitivity (95%) and specificity (99%) in predicting BV [10, 24, 31]. Still, BV-AAs include Clostridia-like bacterial vaginosis-associated bacteria (BVAB) 1, 2 and 3, *Sneathia* spp., *Megasphaera* type I, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* [10, 32-36]. According to Fredrickson *et al.* [32], the presence of BVAB2 or *Megasphaera* type I have a sensitivity of 100% and specificity of 91.3% in predicting BV. Ling *et al.* [10] showed that *Megasphaera* type I and *Sneathia* spp. were detected at higher prevalence and higher relative abundance in women with BV.

Here we report a validated M-PCR diagnostic method to simultaneously screen for thirteen BV-AAs most related to symptomatic BV: *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Bacteroides fragilis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Megasphaera* type I, BVAB1, BVAB2, BVAB3, *Sneathia sanguinegens* and *Mycoplasma genitalium*. We believe that M-PCR will potentially impact diagnostics of BV in cervical-vaginal samples and contribute to diminish complications associated in the near future.

## 2. Material and Methods

*2.1. Study population and samples collection.* From February 2013 to March 2014, 223 unselected women attending in the Clinical and Research Laboratory of State University of Maringá (UEM)/Brazil for regular Papanicolaou screening referred by their doctors, that agreed to participate and fulfilled the inclusion criteria were enrolled in the study. Accordingly, all

women were non-pregnant, of reproductive age (range, 15–54 years; mean, 34 years; median, 32 years), had not been using antimicrobials (oral or topical) within the previous 4 weeks, and had not been using an intrauterine device or contraceptives delivered directly to the vaginal mucosa. The epidemiological characteristics were obtained through the analysis of data from a standard registration form for each woman. The execution of this study was approved by the Committee for Ethics in Research Involving Humans at the State University of Maringá (UEM)/Paraná, Brazil (n° 085/2011 and n° 104/2012) and each woman involved signed a consent form.

This study has included initially 45 samples from women with previous BV diagnosis by Nugent criteria (maximum 15 days prior to study collection), which has not yet received treatment, for standardization of the M-PCR method to simultaneous screen for thirteen BV-AAs. Subsequently, the remaining 178 samples were included to validate the assay, totaling 223 samples from an equal number of women.

Cervical-vaginal samples for molecular analysis were collected using an Ayre's spatula prior to Papanicolaou and Gram smears collection, transferred to tubes containing 1.0 mL of sterile 0.9% NaCl solution, and immediately stored at -80°C until DNA extraction.

## *2.2. Multiplex-PCR for detection of thirteen BV-AAs.*

*2.2.1. Genomic DNA extraction.* It was used an AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (Axygen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of purified DNA were measured by spectrophotometry (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA).

*2.2.2. Design of Primers.* The thirteen primers were selected from published papers, adaptations were made and checked for specificity against all sequences in GenBank and analyzed using BLAST. All selected primers were designed to have similar physical characteristics to allow simultaneous amplification in a multiplex reaction, easily separated by gel electrophoresis and without the loss of sensitivity as follows: melting temperatures, 55 °C to 65°C; length, 18 to 26 bp and amplicon sizes, 80 to 842 bp (Table 1).

2.2.3. *M-PCR conditions*. Different parameters (MgCl<sub>2</sub> and primers concentration, annealing and extension temperatures, and number of cycles) have been tested in different combinations. Different annealing temperatures for the primers were found, so we had to split our analysis in three M-PCR assays.

The M-PCR assay 1 was standardized to detect six BV-AAs: *G. vaginalis*, *M. curtisii*, *B. fragilis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* and *M. type I*; assay 2 detect three BV-AAs: *A. vaginae*, BVAB1 and BVAB2; and assay 3 detect four BV-AAs: *M. mulieris*, BVAB3, *S. sanguinegens* and *M. genitalium*. The annealing temperature used for each assay was 55°C, 62°C and 63°C, respectively.

The optimized protocol for each of the three assays was a mixture of 25 µL containing 2.5 mM of each dNTP, 0.6 mM of MgCl<sub>2</sub>, 25 mM of each primer, 5 µL of extracted DNA (50 ng of total sample) and 1 U of *Platinum Taq* DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA). The PCR conditions comprised thirty-five amplification cycles of denaturation for 10 min at 94°C, annealing for 1 min with variable temperature depending of the assay (55°C or 62°C or 63°C), extension for 1 min at 72°C and final extension for 10 min at 72°C (Thermal cycler, Biosystem, CA, USA). The M-PCR products were electrophoresed on 8% polyacrylamide gel stained with 1 µg/mL ethidium bromide.

Positive controls for all studied BV-AAs were derived from positive clinical samples detected by reference methods, including culture and/or single-target PCR (sPCR). For standardization and validation, sPCR was also performed for the thirteen bacteria in all samples studied and positive controls using the same primers as for the M-PCR. sPCR (gold standard) is generally more sensitive than M-PCR, and cross-reactivity, which can occur during M-PCR, is avoided [37]. Still, co-amplification of the human β-globin gene specific primers GH20/PC04 was made in all clinical samples and controls as an internal control for amplification, to ensure that amplifiable DNA was successfully extracted from the samples, and to monitor for PCR inhibitors under the same conditions as the M-PCR or sPCR reactions [38].

2.3. *sPCR*. It was performed using a mixture of 15 µL containing 2.5 mM of each dNTP, 0.6 mM of MgCl<sub>2</sub>, 25 mM of each primer, 5 µL of extracted DNA (50 ng of total sample) and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA). The PCR conditions comprised thirty-five amplification cycles of denaturation for 10 min at 94°C, annealing for 1 min with variable

temperature (depending of the BV-AAs temperature used in assay of M-PCR, being 55°C, 62°C or 63°C), extension for 1 min at 72°C and final extension for 10 min at 72°C (Thermal cycler, Biosystem, CA, USA). The amplification fragments were electrophoresed on 1.5% agarose gel stained with 1 µg/mL ethidium bromide.

2.4. *β-globin PCR*. Co-amplification of the human  $\beta$ -globin gene was performed using primers GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'), under the same conditions as the M-PCR or sPCR. Still, two types of controls were also included in each reaction series: 'no-DNA' (negative control) and 'HPV-positive DNA' (positive control).

2.5. *Statistical analysis*. It was performed using Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health/OpenEpi, Version 2.3.1. All variables were expressed as absolute and relative frequencies.

### 3. Results

3.1. *M-PCR assay overall performance*. The M-PCR assay clearly distinguished and identified all thirteen BV-AAs in cervical-vaginal samples whether only one (1 bacteria) or simultaneous bacteria (2 or more), and false-positives results were not detected. Final results were regarded as true positives if the sPCR was positive (gold standard).

The overall agreement of M-PCR results with sPCR was 99.1%, and the validation parameters were as follows: 100% sensitivity, specificity and positive predictive value, 97.0% negative predictive value, and 99.3% accuracy. When individually analyzed, *G. vaginalis*, *Megasphaera* type I, BVAB1, *U. urealyticum*, BVAB3, *M. curtisii*, *A. vaginae*, *S. sanguinegens*, *M. mulieris*, *B. fragilis* and *M. genitalium* showed values of 100% for all parameters of M-PCR. For both BVAB2 and *M. hominis* agents, M-PCR showed 100% specificity and positive predictive values and 98.0% of accuracy. These agents differ in sensitivity (80.0% and 88.8%) and negative predictive value (97.8% and 97.6%) respectively (Table 2). Figure 1 shows the electrophoretic analysis of the amplified fragments by using M-PCR in 8% polyacrylamide gel



of positive samples for different BV-AAs.

*3.2.M-PCR assay performance in initial BV positive samples.* The agreement of M-PCR results with Nugent criteria was 100% since all 45 samples from women with previous BV diagnosis (Nugent criteria) initially included for M-PCR standardization showed BV-AAs.

In these samples, 20 (44.5%) had only one BV-AAs; 10 (22.2%) had 2 simultaneously BV-AAs; 6 (13.3%) had 3 simultaneously BV-AAs; 6 (13.3%) had 4 simultaneously BV-AAs; 2 (4.4%) had 5 simultaneously BV-AAs; and 1 (2.2%) 6 simultaneously BV-AAs. In these samples, the most common BV-AA detected as a single agent or simultaneously was *Megasphaera* type I (n= 21, 46.7%), followed by *G. vaginalis* (n= 14, 31.1%), *M. curtisii* and BVAB2 (n= 12, 26.7% each). *Bacteroides fragilis* had not been detected. The table 3 shows M-PCR results for BV-AAs as single agent or simultaneously in these 45 initially analyzed samples.

*3.3.BV-AAs positivity in all samples analyzed.* Considering the thirteen bacteria analyzed in all 223 samples, BV-AAs were detected in 162 samples (72.6%) as a single agent or simultaneously. The most frequent of BV-AA was *G. vaginalis* (n= 74), detected in 45.7% of the positive samples, followed by *M.* type I (n= 52; 32.1%), BVAB1 (n=35; 21.6%), *U. urealyticum* (n=28; 17.3%), BVAB3 (n=27; 16.7%), *M. curtisii* (n=22; 13.6%), BVAB2 (n= 20; 12.3%), *A. vaginae* (n=15; 9.3%), *M. hominis* and *S. sanguinegens* (n= 9; 5.5%, each), *M. mulieris* (n= 6; 3.7%), *B. fragilis* (n= 4; 2.5%) and *M. genitalium* (n= 2; 1.2%) (Figure 2).

*3.4. BV-AAs positivity as a single agent.* Among the 162 positive samples in 76 (46.9%) were detected only one BV-AA, representing 34.1% of total samples studied. The most frequent agent in these cases was *G. vaginalis* (n=31, 40.8%), followed by *M.* type I (n=14; 18.4%), *U. urealyticum* (n=11; 14.5%), *M. curtisii* (n=6; 7.9) and *M. hominis* (n=4; 5.3%).

*3.5. Simultaneous BV-AAs detection positivity.* Two or more BV-AAs were detected simultaneously in the remaining 86 BV-AAs positive samples (53.1%), representing 38.6% of total samples studied. Of these, 50 (30.9%) showed simultaneously two BV-AAs. In these 50 samples which represent 58.1% of all samples with simultaneously BV-AAs detected, the most

frequent associations were: *G. vaginalis* + BVAB1 (n= 7; 14.0%), *U. urealyticum*+ *G. vaginalis*(n= 5; 10.0%), *M.type I* + BVAB1 and *M.type I* + *G. vaginalis* (n =4; 8.0%, each).

Threesimultaneous BV-AAswere detectedin 22 samples, representing 13.6% of BV-AApositive samples, 25.6% of total samples with simultaneously BV-AAs and 9.9% of total samples studied. The most frequent associations were: *A. vaginae* + BVAB2 + BVAB3 and *G. vaginalis* + *M. curtisi*+ *M.type I* (n= 2; 9.0%, each).

Four simultaneous BV-AAs were detected in 11 samples, representing 6.8%of BV-AApositive samples, 12.8% of total samples with simultaneously BV-AAs, and 4.9% of total samples studied. The most frequent association was *U. urealyticum*+*G. vaginalis*+*M.type I*+BVAB1 (n =2; 18.2%).

Five simultaneous BV-AAs were detected in 2 samples (1.2%of positive BV-AAsamples, 2.3% of total samples with simultaneously BV-AAs, and 0.9% of total samples studied). The associationswere: *M. curtisi*+ *M. type I*+BVAB3+*M. mulieris*+*S. sanguinegens*, and *U. urealyticum*+*G. vaginalis*+*A. vaginae*+BVAB1+BVAB2. Six simultaneous BV-AAs were detected in 1 sample (0.6%of positive BV-AAsamples, 1.2% of total samples with simultaneously BV-AAs, and 0.4% of total samples studied): *G. vaginalis*+*M. curtisii*+ *M. type I*+*A. vaginae*+BVAB2+*M. mulieris*.

#### 4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to simultaneous screen for thirteen BV-AAs most related to BV in cervical-vaginal samples using M-PCR in Brazil and Latin America. Our study did not aim to find or evaluate BV-AAs alone or in combination as markers of BV, but to standardize and validate an M-PCR assay that can be especially useful in screening of populations in which the complications of BV can be more severe. The overall agreement of the M-PCR with sPCR was elevated (99.1%), and other validation parameters, including sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and accuracy, were also excellent (ranging from 99.3% to 100%). Considering the BV-AAs individually, the M-PCR also showed excellent values for all the parameters and detected 86 cervical samples (53%) with two or more BV-AAs simultaneously. Still, the agreement of M-PCR results with Nugent method was 100%.

The application of this panel of thirteen BV-AAAs-targeted PCR assay to cervical-vaginal samples serves for several purposes. First, these data help to establish the bacterial compositions of the human cervix and vagina in subjects with and without BV and validate our earlier findings from a smaller group of subjects BV positive for Nugent method (n =45). Second, the recent use of molecular microbial detection methods in well-characterized subjects has established that a large portion of the vaginal microbiota in subjects with BV is derived from bacteria that appear to be novel and uncultivated [6, 27, 34, 39-42]. To overcome this limitation, we developed a highly sensitive M-PCR assay targeting particular bacterial species previously detected by other molecular studies. Although this approach will clearly not detect new species, it is helpful in determining the true frequencies of key vaginal bacteria, which is a critical first step in understanding how vaginal bacteria interact with each other and the human host. Finally, rapid PCR assays may allow the microbiological diagnosis of BV in the clinic [34] and clinical laboratories. The M-PCR assay is very sensitive and simplifies workflow, reducing costs and time, allowing for its use in routine diagnostic laboratories with basic molecular facilities [43-45]. Furthermore, applying the M-PCR assay will potentiate the diagnostics of BV-AAAs, since thirteen agents can be detected independent of the clinical status of women, wherein many these BV-AAAs are difficult to identify using conventional methods. Accordingly, we detected BV-AAAs as single or simultaneous agents in 162 women from a total of 223. Thus, this M-PCR assay has great potential to be applied in screening for BV-AAAs in both pregnant and non-pregnant women as early as possible to prevent complications. Below, we will discuss only the frequency of BV-AAAs detected once our study did not aim to find or evaluate BV-AAAs alone or in combination as markers of BV, but standardize and validate the M-PCR assay.

Considering the initial 45 positive samples for BV by the Nugent method, the BV-AA more detected as a single agent or simultaneously was *Megasphaera type I* (46.7%), followed by *G. vaginalis* (31.1%), *M. curtisii* and BVAB2 (26.7% each). When considering all sample studied together, the BV-AA more detected was *G. vaginalis* (45.7%), followed by *M. type I* (32.1%), BVAB1 (21.6%), *U. urealyticum* (17.3), BVAB3 (16.7%) and *M. curtisii* (13.6%).

Since cultivation methods have failed to unequivocally identify a specific bacterial pathogen or unique pathogenic community in subjects with BV, it had been hypothesized that several of the uncultivated bacteria associated with BV detected by PCR would be more reliable indicators of BV than the cultivated bacteria previously linked to this condition [34].

Considering this situation, our study detected elevated values of validation parameters 53.1% of BV-AAs positive samples with two or more BV-AAs simultaneously which 30.9% showed simultaneously two bacteria, 25.6% three, 12.8% four, 2.3% five and 1.2% six. Thus, the assay proved to be very important also to assess the association between bacteria in the cervical-vaginal microbiota.

Individually analyzing each of the BV-AAs, the most frequently detected in single or simultaneous agents was *G. vaginalis* (n= 74; 45.7%). Historically *G. vaginalis* is thought to have the leading role in the infection, making the niche suitable for colonization by strict anaerobes that are largely responsible for the clinical symptoms of BV [46-49]. Still, recent published findings had suggested that *G. vaginalis* biofilms may be critical in BV pathogenesis and symptomatology [24, 48]. However, the detection of bacteria is not a specific marker of BV since it is commonly present in women with normal vaginal microbiota, although generally in smaller numbers than in those with BV [6, 27, 42, 50].

*Megasphaera* type I was the second most frequent BV-AA (32.1%), and the third was BVAB1 (n = 35; 21.60%). *M. type I* is an anaerobic bacterium similar to lactobacilli producing lactic acid, strongly related to BV [27, 41] and correlate significantly with increased sexual exposure [27]. According to Fredricks et al. [34], these bacteria are excellent markers of BV and can be used alone or in combination with other BV-AAs. Still, Fethers et al. showed that the detection of the combination of either *M. type I* or/and one of the *Clostridiales* bacteria (BVAB 1-3) by PCR yielded a sensitivity of 99% and a specificity of 89% for the diagnosis of BV [27, 34]. The other BVAB (2 and 3) were detected in the present study in lower frequency than BVAB1 (12.3% and 16.7% of samples, respectively). Previous study showed that the detection of BVAB (1-3) is highly related to the presence of BV. Despite of detection in vaginal fluid of healthy women, BVAB (1-3) developed BV a few months after analyzes [32]. Thus, our results in the detection of *M. type I*, BVAB1, BVAB2 and BVAB3 ratifies their importance in the BV physiopathology and further demonstrated that our technique has great reliability and potential use for BV screening.

*U. urealyticum* and *M. curtisii* were detected with intermediate frequency (17.3%, and 13.6%, respectively) while other BV-AAs in much lesser frequency, as follows: *A. vaginae* (9.2%), *M. hominis* and *S. sanguinegens* (5.5%, each), *M. mulieris* (3.7%), *B. fragilis* (2.5%) and *M. genitalium* (1.2%). Different molecular studies are not unanimous to BV markers as well

with respect to frequencies and bacterial agents detected. Some findings are more common, but there is a wide variation [26, 27, 29]. For example, in the study of Pépin et al. [26], the presence of *G. vaginalis*, *Bifidobacterium*, *Megasphaeraelsdenii*, *Dialister*, *M. hominis*, *Leptotrichia*, and *Prevotella* were independently associated with BV. However, *Mobiluncus*, *A. vaginae*, *Anaerococcus*, and *Eggerthella* were not independently associated with BV. For Fethers et al. [27], only *M. type I*, BVAB2, *A. vaginae* and *G. vaginalis* were significantly associated with BV. Shipitsyna et al. [29] showed that only *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Eggerthella*, *Prevotella*, BVAB2 and *M. type 1* were highly predictable for BV, with the best diagnostic accuracy shown for. Still, Twin et al. [51] detected most bacteria of the genus *Prevotella* (predominately *P. amnii*), followed by *Megasphaera*, *Leptotrichia/Sneathia* and *Fusobacterium* (8%), which *P. amnii* was found to be strongly associated with BV. The variations between studies are possibly influenced by the type of women studied (pregnant or not; with or without symptoms of BV; with differences in the frequency and type of sexual contact, etc). Still, due to the type of molecular technique used, among others. Therefore, we chose a roster of BV-AAs that are commonly found in women with BV by several studies to be part of our M-PCR assay.

We recognize that there are limitations in our study. First, the M-PCR assays developed here were qualitative and do not provide information about the quantities of bacteria present in subjects with and without BV. The quantity of bacteria may be a more important predictor of disease than qualitative presence or absence [34]. However, we proposed a technique that is more economically accessible and also easier to be used as screening so that women can be benefited with the molecular diagnosis, even in regions and/or countries with less financial resources. Second, we did not attempt to assay for every known vaginal bacterium using targeted PCR assays due to practical limitations. We expect that many additional bacterial species are present in cervical-vaginal samples from subjects with and without BV. For instance, several additional *Prevotella* and *Porphyromonass* species commonly found in subjects with BV were not assayed in this study. Nevertheless, these results help to build a foundation for understanding the bacterial diversity present in the human cervix and vagina. Third, our research subjects were recruited from only one laboratory of Maringá city/Paraná State/Brazil. The generalization of these results will be augmented when our assays are applied to other populations of women in different regions of our city, state and country. Fourth, it was not possible for us to obtain more detailed comparison of our subjects' characteristics, race, sexual

behavior, and concomitant genital infections, and these details may be important for a better understanding of VB. Fifth, Gram stain of cervical-vaginal fluid was not performed routinely on subjects from the laboratory in which the patients were recruited. This analysis is performed only for medical request. However, we included initially 45 samples from women with previous BV diagnosis by Nugent criteria which had not yet received treatment, for standardization of the M-PCR method to simultaneous screen for thirteen BV-AAs. Subsequently, the remaining 178 samples were included to validate the assay, totaling 223 samples from an equal number of women.

Based on the data presented here, we conclude that the detection of thirteen BV-AAs by M-PCR, provides important information about the frequency of these agents. Also, shall be apply for diagnosis or confirmation of BV, leading to early diagnosis allowing to prevent possible complications in specific women, without the impediment due to high cost high time of the assay, besides difficulties of workflow. Finally, providing information for better understanding this syndrome, which can assist to improve the management and as well as the optimal medical for women with BV.

### **Conflict of Interests**

The authors declare that they have no competing interests regarding the publication of this paper.

### **Acknowledgment**

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), AUX-PE-PRODOC 2571/2010, Brazilian Government.

### **References**

- [1] J. R. Schwebke, "New concepts in the etiology of bacterial vaginosis," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 11, no. 2, pp. 143-7, 2009.
- [2] J. M. Marrazzo, "Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: are we still confused?," *Anaerobe*, vol. 17, no. 4, pp. 186-90, 2011.
- [3] M. A. Klebanoff, J. R. Schwebke, J. Zhanget al., "Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 104, no. 2, pp. 267-72, 2004.
- [4] E. Gillet, J. F. Meys, H. Verstraelenet al., "Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis," *BMC Infectious Diseases*, vol. 11, pp. 10, 2011.
- [5] P. Hay, "Bacterial vaginosis," *Medicine*, vol. 42, no. 7, pp. 359-363, 2014.
- [6] J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdoet al., "Vaginal microbiome of reproductive-age women," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, vol. 108 Suppl 1, pp. 4680-7, 2011.
- [7] J. F. Peipert, R. B. Ness, J. Blumeet al., "Clinical predictors of endometritis in women with symptoms and signs of pelvic inflammatory disease," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 184, no. 5, pp. 856-63, 2001.
- [8] C. L. Haggerty, S. L. Hillier, D. C. Basset al., "Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 39, no. 7, pp. 990-5, 2004.
- [9] M. A. Klebanoff, S. L. Hillier, R. P. Nugentet al., "Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation?," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 192, no. 2, pp. 470-7, 2005.

- [10] Z. Ling, J. Kong, F. Liuet al., “Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis,” *BMC Genomics*, vol. 11, pp. 488, 2010.
- [11] H. M. Silver, R. S. Sperling, P. J. St Clairet al., “Evidence relating bacterial vaginosis to intraamniotic infection,” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 161, no. 3, pp. 808-12, 1989.
- [12] S. L. Hillier, J. Martius, M. Krohnet al., “A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity,” *New England Journal of Medicine*, vol. 319, no. 15, pp. 972-8, 1988.
- [13] H. Leitich, B. Bodner-Adler, M. Brunbaueret al., “Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis,” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 189, no. 1, pp. 139-47, 2003.
- [14] R. L. Sweet, “Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient,” *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, vol. 8, no. 3-4, pp. 184-90, 2000.
- [15] A. H. Ugwumadu, “Bacterial vaginosis in pregnancy,” *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, vol. 14, no. 2, pp. 115-8, 2002.
- [16] C. R. Cohen, S. C. Cheng, S. Shiboskiet al., “Diaphragm used with replens gel and risk of bacterial vaginosis: results from a randomized controlled trial,” *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, vol. 2012, pp. 921519, 2012.
- [17] R. Chawla, P. Bhalla, S. Chadhaet al., “Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis,” *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 365194, 2013.
- [18] R. M. Brotman, and J. Ravel, “Ready or not: the molecular diagnosis of bacterial



vaginosis,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 1, pp. 44-6, 2008.

[19] R. Amsel, P. A. Totten, C. A. Spiegelet al., “Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations,” *American Journal of Medicine*, vol. 74, no. 1, pp. 14-22, 1983.

[20] R. P. Nugent, M. A. Krohn, and S. L. Hillier, “Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, no. 2, pp. 297-301, 1991.

[21] H. Bahar, M. M. Torun, F. Oçeret al., “*Mobiluncus* species in gynaecological and obstetric infections: antimicrobial resistance and prevalence in a Turkish population,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 25, no. 3, pp. 268-71, 2005.

[22] R. T. Gergova, T. V. Strateva, and I. G. Mitov, “*Gardnerella vaginalis*-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women,” *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 17, no. 3, pp. 313-8, 2013.

[23] C. P. Cartwright, B. D. Lembke, K. Ramachandran et al., “Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 7, pp. 2321-9, 2012.

[24] J. P. Menard, F. Fenollar, M. Henry et al., “Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 1, pp. 33-43, 2008.

[25] C. L. Haggerty, P. A. Totten, M. Ferriset al., “Clinical characteristics of bacterial vaginosis among women testing positive for fastidious bacteria,” *Sexually Transmitted Infections*, vol. 85, no. 4, pp. 242-8, 2009.

[26] J. Pépin, S. Deslandes, G. Giroux et al., “The complex vaginal flora of West African

women with bacterial vaginosis,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, pp. e25082, 2011.

[27] K. Fethers, J. Twin, C. K. Fairley et al., “Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. e30633, 2012.

[28] S. Srinivasan, N. G. Hoffman, M. T. Morgan et al., “Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. e37818, 2012.

[29] E. Shipitsyna, A. Roos, R. Dancu et al., “Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible?,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, pp. e60670, 2013.

[30] B. Foxman, A. Wen, U. Srinivasan et al., “*Mycoplasma*, bacterial vaginosis-associated bacteria BVAB3, race, and risk of preterm birth in a high-risk cohort,” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 210, no. 3, pp. 226.e1-7, 2014.

[31] C. H. Livengood, “Bacterial vaginosis: an overview for 2009,” *Rev Obstet Gynecol*, vol. 2, no. 1, pp. 28-37, 2009.

[32] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, and J. M. Marrazzo, “Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 18, pp. 1899-911, 2005.

[33] K. Mallard, K. Schopfer, and T. Bodmer, “Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 60, no. 1, pp. 13-9, 2005.

[34] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, K. K. Thomas et al., “Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 10,

pp. 3270-6, 2007.

[35] K. B. Waites, L. Xiao, V. Paralanov et al., "Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology," *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 14, no. 5, pp. 437-50, 2012.

[36] J. S. Huppert, J. R. Bates, A. F. Weber et al., "Abnormal vaginal pH and *Mycoplasma genitalium* infection," *Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology*, vol. 26, no. 1, pp. 36-9, 2013.

[37] C. J. McIver, N. Rismanto, C. Smith et al., "Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical *mycoplasma*, *ureaplasma*, and *trichomonas* and viral agent infections in sexually active australian women," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 5, pp. 1358-63, 2009.

[38] D. N. Fredricks, and D. A. Relman, "Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 29, no. 3, pp. 475-86; quiz 487-8, 1999.

[39] R. Verhelst, H. Verstraelen, G. Claeys et al., "Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis," *BMC Microbiology*, vol. 4, pp. 16, 2004.

[40] M. J. Ferris, J. Norori, M. Zozaya-Hinchliffe et al., "Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 3, pp. 1016-8, 2007.

[41] I. M. Linhares, P. C. Giraldo, and E. C. Baracat, "New findings about vaginal bacterial flora," *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 56, no. 3, pp. 370-4, 2010.

- [42] Y. Turovskiy, K. Sutyak Noll, and M. L. Chikindas, "The aetiology of bacterial vaginosis," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 110, no. 5, pp. 1105-28, 2011.
- [43] M. L. McKechnie, R. Hillman, D. Couldwellet al., "Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 6, pp. 1871-7, 2009.
- [44] R. P. Souza, A. L. de Abreu, É. Ferreiraet al., "Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus-infected Brazilian women by multiplex polymerase chain reaction," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 89, no. 6, pp. 1199-202, 2013.
- [45] F. Gimenes, F. S. Medina, A. L. Abreuet al., "Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, pp. e98862, 2014.
- [46] A. Swidsinski, W. Mendling, V. Loening-Bauckeet al., "Adherent biofilms in bacterial vaginosis," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 106, no. 5 Pt 1, pp. 1013-23, 2005.
- [47] A. Swidsinski, W. Mendling, V. Loening-Bauckeet al., "An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 198, no. 1, pp. 97.e1-6, 2008.
- [48] W. E. Josey, and J. R. Schwebke, "The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment," *International Journal of STD & AIDS*, vol. 19, no. 3, pp. 152-4, 2008.
- [49] M. D. Harwich, J. M. Alves, G. A. Bucket al., "Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies," *BMC*

*Genomics*, vol. 11, pp. 375, 2010.

[50] C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley et al., “The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy,” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 6, pp. 828-36, 2006.

[51] J. Twin, C. S. Bradshaw, S. M. Garland et al., “The potential of metatranscriptomics for identifying screening targets for bacterial vaginosis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, pp. e76892, 2013.

## Legend of Figures

FIGURE 1: Electrophoretic analysis of the amplified fragments by using M-PCR in 8% polyacrylamide gels. In all gels a positive control (C) was used. A) M-PCR Assay 1: C1: *Gardenerellavaginalis* (330 base pairs-bp); C2: *Megasphoeratype I*(211 pb); C3: *Mycoplasma hominis*(270 pb); C4: *Mobiluncuscurtisii*(130 pb); C5: *Bacteroidesfragilis*(842 pb); C6: *Ureaplasmaurealyticum* (541 pb); A1: positive sample for *B. fragilis*, *G. vaginalis* and *M. hominis*; A2: positive sample for *M. type I* and *M. curtisii*; A3: positive sample for *U. urealyticum* and *G. vaginalis*; A4: positive sample for *G. vaginalis* ; A5: positive sample for *M. type I*(211 pb); A6: negative control. B) M-PCR Assay 2: C1: BVAB1 (90 bp); C2: BVAB2 (260 pb); C3: *Atopobiumvaginae*(155 pb); A1: positive sample for BVAB1; A2: positive sample for BVAB2; A3: positive sample for *A. vaginae*; A4: positive sample for BVAB2 and BVAB1; A5: positive sample for *A. vaginae* and BVAB1; A6: positive sample for BVAB2 and *A. vaginae*; A7: positive sample of BVAB2, *A. vaginae* and BVAB1; A8: negative control. C) M-PCR Assay 3: C1: *Sneathiasanguinegens*(102 bp); C2: BVAB3 (160 pb); C3: *Mobiluncusmulieris*(80 pb); C4: *Mycoplasma genitalium* (193 pb); A1: positive sample for *S. sanguinegens*(102 bp); A2: positive sample for BVAB3; A3: positive sample of *Mobiluncusmulieris*; A4: positive sample of *M. genitalium*; A5: positive sample of BVAB3 and *M. mulieris*; A6: positive sample for BVAB3 and *S. sanguinegens*; A7: negative control. Lanes M1: molecular weight marker (100 bp); M2: molecular weight marker (25 bp).

FIGURE 2: Frequency of thirteen major bacterial vaginosis-associated agents (BV-AAs) in all 223 samples studied as single agent or in simultaneous detection.

TABLE 1: Nucleotide sequences of amplification primers used in the M-PCR.

| BV-AAs/primers               | Sequence (5'-3')           | Ampliconsize (bp) |
|------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <b>M-PCR assay 1</b>         |                            |                   |
| <i>Mobiluncuscurtisii</i>    |                            |                   |
| Forward                      | GCCAGCCTTCGGGGTGGTGT       | 130               |
| Reverse                      | TCACGAGTCCCCGGCCGAACC      |                   |
| <i>Ureaplasmaurealyticum</i> |                            |                   |
| Forward                      | AGAAGACGTTTAGCTAGAGG       | 541               |
| Reverse                      | ACGACGTCCATAAGCAACT        |                   |
| <i>Mycoplasma hominis</i>    |                            |                   |
| Forward                      | ATACATCGATGTCGAGCGAG       | 270               |
| Reverse                      | CATCTTTAGTGGCGCCTTAC       |                   |
| <i>Gardnerellavaginalis</i>  |                            |                   |
| Forward                      | TTACTGGTGTACTACTGTAA       | 330               |
| Reverse                      | CCGTACAGGCTGAACAGT         |                   |
| <i>Megasphaera type I</i>    |                            |                   |
| Forward                      | GATGCCAACAGTATCCGTCCG      | 211               |
| Reverse                      | CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA     |                   |
| <i>Bacteroides fragilis</i>  |                            |                   |
| Forward                      | TTCGCTTTTCTGTTTTCTGTGT     | 842               |
| Reverse                      | CAGCAACCACCCAAACATTATT     |                   |
| <b>M-PCR assay 2</b>         |                            |                   |
| <i>Atopobiumvaginae</i>      |                            |                   |
| Forward                      | TAGGTCAGGAGTTAAATCTG       | 155               |
| Reverse                      | TCATGGCCCAGAAGACCGCC       |                   |
| BVAB1                        |                            |                   |
| Forward                      | GGAGTGTAGGCGGCACTA         | 90                |
| Reverse                      | CTCTCCGATACTCCAGCTCTA      |                   |
| BVAB2                        |                            |                   |
| Forward                      | TTAACCTTGGGGTTCATTACAA     | 260               |
| Reverse                      | GAATACTTATTGTGTTAACTGCGC   |                   |
| <b>M-PCR assay 3</b>         |                            |                   |
| BVAB3                        |                            |                   |
| Forward                      | CATTTAGTTGGGCACTCAGGC      | 160               |
| Reverse                      | ACATTGGGGATTTGCTTCGCC      |                   |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> |                            |                   |
| Forward                      | ACCTTGATGGTCAGCAAACTT      | 193               |
| Reverse                      | CCTTTGATCTCATTCCAATCAGTA   |                   |
| <i>Mobiluncusmulieris</i>    |                            |                   |
| Forward                      | ATGGATATGCGTGTGGATGG       | 80                |
| Reverse                      | CCAGGCATGTAAGCCCAA         |                   |
| <i>Sneathiasanguinegens</i>  |                            |                   |
| Forward                      | AATTATTGGGCTTAAAGGGCATC    | 102               |
| Reverse                      | AGTACTCTAGTTATACAGTTTTGTAG |                   |

M-PCR, multiplex polymerase chain reaction; BV-AAs, bacterial vaginosis-associated agents; bp, base pairs; BVAB1, 2, 3, bacterial vaginosis associated bacteria-1, 2, 3.

TABLE 2: M-PCR validation parameters compared to sPCR for thirteen major BV-AAs.

| Agents                                   | Sensibility (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) | Accuracy (%) |
|--|-----------------|-----------------|---------|---------|--------------|
| <b>Overall</b>                           | 99.1            | 100.0           | 100.0   | 97.0    | 99.3         |
| <i>Mobiluncus curtisii</i>               | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i>            | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Mycoplasma hominis</i>                | 80.0            | 100.0           | 100.0   | 97.8    | 98.0         |
| <i>Gardnerella vaginalis</i>             | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Megasphaera type I</i>                | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Bacteroides fragilis</i>              | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Atopobium vaginae</i>                 | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| BVAB1                                    | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| BVAB2                                    | 88.8            | 100.0           | 100.0   | 97.6    | 98.0         |
| BVAB3                                    | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Mycoplasma genitalium</i>             | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Mobiluncus mulieris</i>               | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <i>Sneathia sanguinegens</i>             | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |
| <b>Two or more agents simultaneously</b> | 100.0           | 100.0           | 100.0   | 100.0   | 100.0        |

M-PCR, multiplex polymerase chain reaction; sPCR, single polymerase chain reaction; BV-AAs, bacterial vaginosis-associated agents; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; BVAB1, 2, 3, bacterial vaginosis associated bacteria-1, 2, 3.



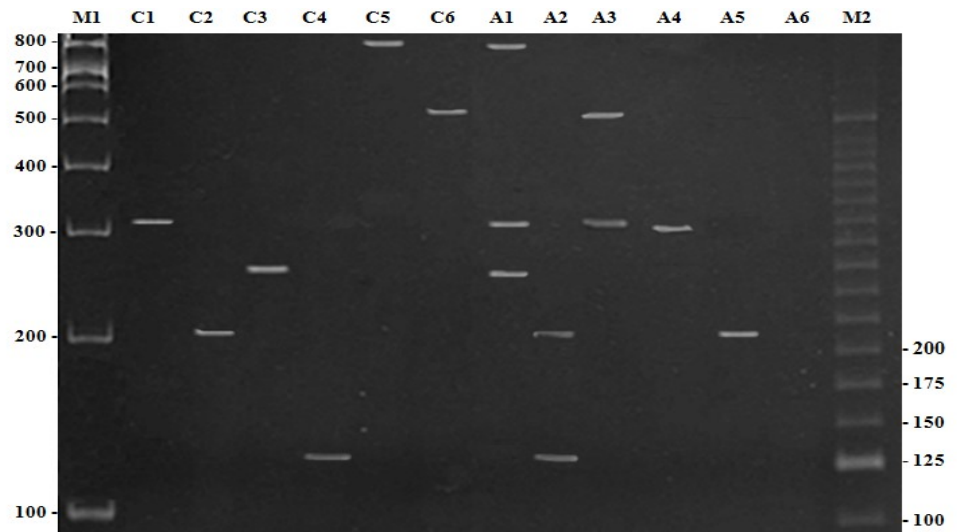
TABLE 3: M-PCR assay performance in 45 initial samples analyzed from women with BV diagnosis by Nugent criteria.

| <b>BV-AAAs detected</b>   | <b>n</b>  | <b>%</b>    |
|---|-----------|-------------|
| <b>Only one BV-AA</b>   | <b>20</b> | <b>44.5</b> |
| <i>Megasphaera</i> type I   | 9         | 45.0        |
| <i>Mobiluncus curtisii</i>  | 6         | 30.0        |
| <i>Gardnerellavaginalis</i>   | 4         | 20.0        |
| <i>Mycoplasma hominis</i>   | 1         | 5.0         |
| <b>2 simultaneously BV-AAAs</b>   | <b>10</b> | <b>22.2</b> |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Gardnerellavaginalis</i>   | 2         | 20.0        |
| <i>Megasphaera</i> type I+BVAB1   | 2         | 20.0        |
| <i>Mobiluncus curtisii</i> +BVAB1   | 1         | 10.0        |
| <i>Megasphaera</i> type I+ <i>M. hominis</i>  | 1         | 10.0        |
| <i>Megasphaera</i> type I+ <i>Atopobium vaginae</i>   | 1         | 10.0        |
| <i>Mycoplasma hominis</i> + <i>Sneathiasanguinegens</i>   | 1         | 10.0        |
| <i>Gardnerellavaginalis</i> + BVAB3   | 1         | 10.0        |
| <i>Mobiluncus curtisii</i> +BVAB2   | 1         | 10.0        |
| <b>3 simultaneously BV-AAAs</b>   | <b>6</b>  | <b>13.3</b> |
| <i>Megasphaera</i> type I +BVAB1+BVAB3  | 2         | 33.3        |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> +BVAB2+BVAB3   | 1         | 16.6        |
| <i>Mobiluncus curtisii</i> +BVAB1+BVAB3   | 1         | 16.6        |
| <i>Megasphaera</i> type I+BVAB2+BVAB3   | 1         | 16.6        |
| <i>Gardnerellavaginalis</i> + <i>Atopobium vaginae</i> +BVAB2   | 1         | 16.6        |
| <b>4 simultaneously BV-AAAs</b>   | <b>6</b>  | <b>13.3</b> |
| <i>Megasphaera</i> type I+ <i>Atopobium vaginae</i> +BVAB2+ <i>Sneathiasanguinegens</i>   | 1         | 16.6        |
| <i>Gardnerellavaginalis</i> + <i>Mobiluncus curtisii</i> +BVAB2+ <i>Sneathiasanguinegens</i>  | 1         | 16.6        |
| <i>Gardnerellavaginalis</i> + <i>Mobiluncus curtisii</i> +BVAB2+ <i>Atopobium vaginae</i>   | 1         | 16.6        |
| <i>Gardnerellavaginalis</i> + <i>Atopobium vaginae</i> +BVAB2+BVAB3   | 1         | 16.6        |
| <i>Megasphaera</i> type I+ <i>Atopobium vaginae</i> +BVAB2+BVAB3  | 1         | 16.6        |
| <i>Megasphaera</i> type I+BVAB3+ <i>Mobiluncus mulieris</i> + <i>Sneathiasanguinegens</i>   | 1         | 16.6        |
| <b>5 simultaneously BV-AAAs</b>   | <b>2</b>  | <b>4.4</b>  |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Gardnerellavaginalis</i> + <i>Atopobium vaginae</i> +BVAB1+BVAB2   | 1         | 50.0        |
| <i>Mobiluncus curtisii</i> + <i>Megasphaera</i> type I+BVAB3+ <i>Mobiluncus mulieris</i> + <i>Sneathiasanguinegens</i>                            | 1         | 50.0        |
| <b>6 simultaneously BV-AAAs</b>   | <b>1</b>  | <b>2.2</b>  |
| <i>Gardnerellavaginalis</i> + <i>Mobiluncus curtisii</i> + <i>Megasphaera</i> type I+ <i>Atopobium vaginae</i> +BVAB2+ <i>Mobiluncus mulieris</i> | 1         | 100.0       |

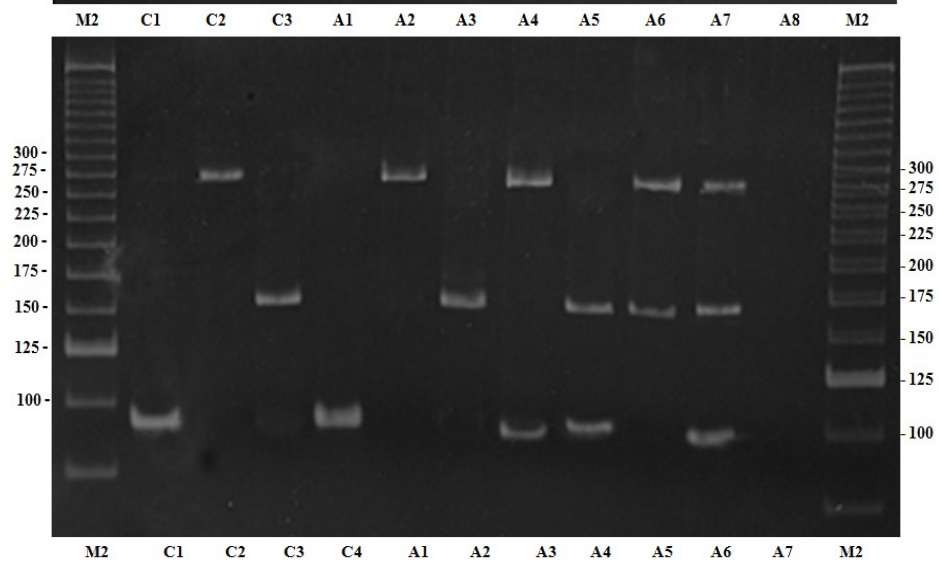
M-PCR, multiplex polymerase chain reaction; BV, bacterial vaginosis; BV-AAAs, bacterial vaginosis-associated agents; BVAB1, 2, 3, bacterial vaginosis associated bacteria-1, 2, 3.

FIGURE 1

## A) M-PCR assay1



## B) M-PCR assay2



## C) M-PCR assay3

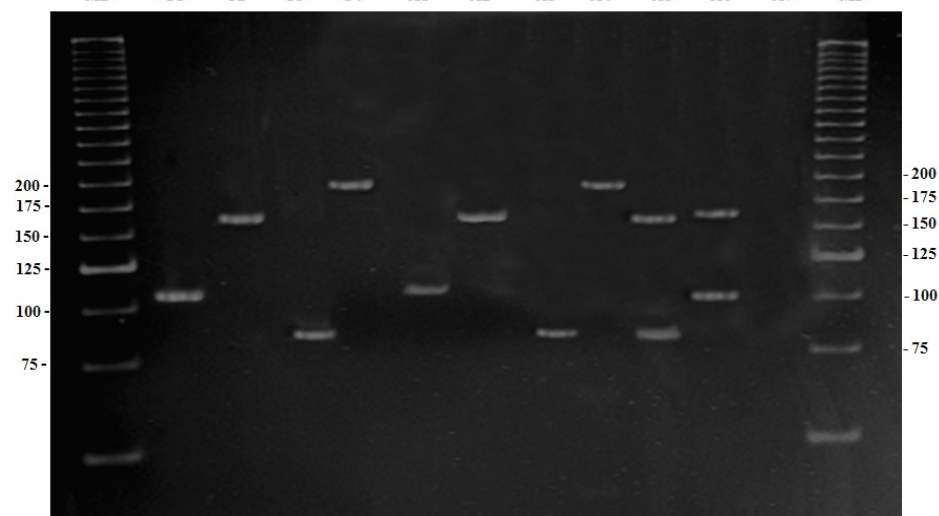
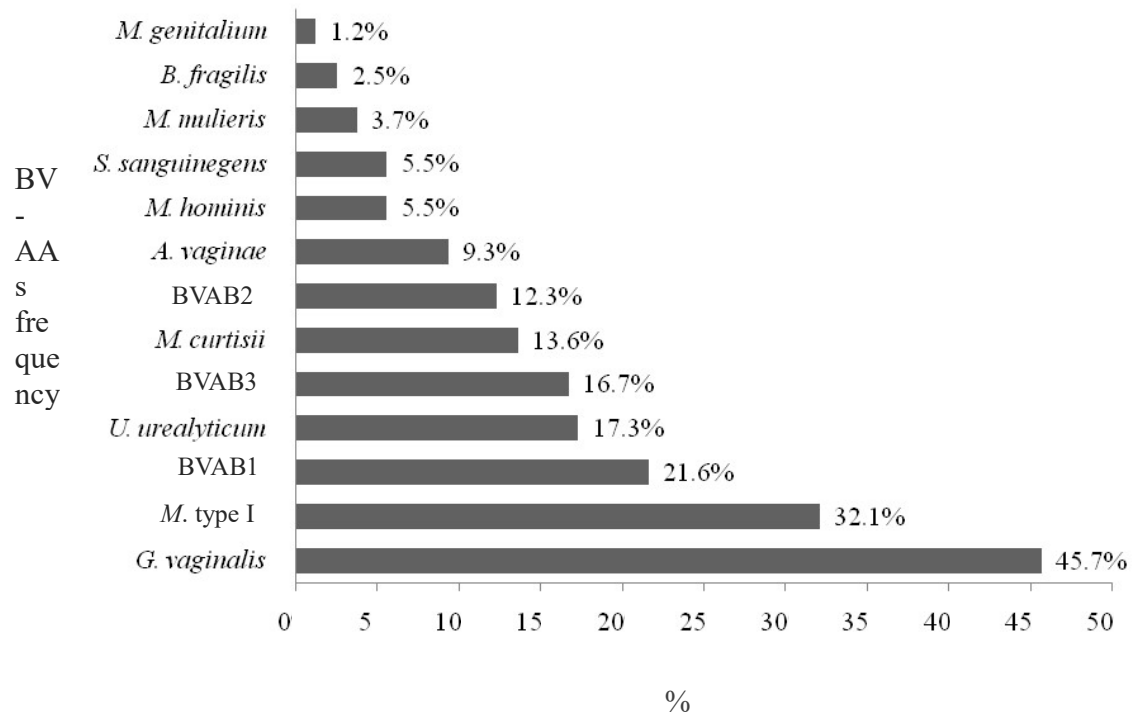


FIGURE 2



## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que:

- 1) A técnica de PCR-Multiplex (PCR-M) mostrou-se muito eficiente para detecção simultânea dos treze agentes associados à VB avaliados no estudo, fato comprovado pelos excelentes valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo, e acurácia da técnica quando comparada com a PCR convencional;
- 2) Os resultados obtidos com a PCR-M foram 100% concordantes com os resultados obtidos pelo método de Nugent;
- 3) A prevalência dos treze agentes associados à VB na população estudada foi elevada (72,6%), sendo que um agente foi detectado em 46,9% e dois ou mais simultaneamente em 53,1%, demonstrando a importância da detecção destes agentes pelo PCR-M;
- 4) O agente associado à VB mais frequente foi *G. vaginalis* (n = 74/45,7%), seguido por *M. tipo I* (n = 52/32,1%), BVAB1 (n = 35/21,6%), *U. urealyticum* (n = 28/17,3%) e BVAB3 (n = 27/16,7%);
- 5) O ensaio de PCR-M tem grande potencial para o diagnóstico da VB e pode contribuir com a detecção precoce e com a diminuição de possíveis complicações.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Seguindo a mesma linha de pesquisa, pretende-se:

- Realizar estudos de associação entre agentes de VB, HPV e lesões cervicais;
- Realizar estudos de prevalência dos agentes de VB em sêmen humano;
- Avaliar se existe associação entre os agentes de VB com a infertilidade masculina.

## **Author Guidelines**

### **Submission**

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact [bmri@hindawi.com](mailto:bmri@hindawi.com) for support.

### **Terms of Submission**

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to [bmri@hindawi.com](mailto:bmri@hindawi.com).

### **Peer Review**

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and “if not rejected right away” by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

### **Microarray Data Submission**

Before publication, the microarray data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number

must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

### **Concurrent Submissions**

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non- peer reviewed manuscript types.

### **Article Processing Charges**

BioMed Research International is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of BioMed Research International, please visit the Article Processing Charges information page.

### **Units of Measurement**

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

### **Title and Authorship Information**

The following information should be included

Paper title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

**Abstract**

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

**Introduction**

This section should be succinct, with no subheadings.

**Materials and Methods**

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

**Results and Discussion**

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

**Conclusions**

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

**Acknowledgments**

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

**References**

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

**Preparation of Figures**

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF



file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

### **Preparation of Tables**

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

### **Proofs**

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

### **Copyright**

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited. Paper title Full author names Full institutional mailing addresses Email addresses The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations. While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

### **Disclosure Policy**

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interests in their submitted manuscripts. If there is no conflict of interests, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.”

### **Clinical Study**

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

### **Ethical Guidelines**

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any human experiments, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include a statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors should provide a full description of any anesthetic and surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.