

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS MICROSCÓPICOS PARA DIAGNÓSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA

ANA MOTA, EMILIA PRIETO, VERA CARNALL, FILOMENA EXPOSTO

Unidade de Doenças Sexualmente Transmitidas. Centro de Malária e outras Doenças Tropicais.
Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

O diagnóstico de Vaginose Bacteriana tem sido, ao longo do tempo, controverso. Durante vários anos, o diagnóstico laboratorial desta entidade baseou-se no critério de Amsel *et al* (1983) que inclui vários factores como corrimento vaginal aquoso, teste de KOH positivo e presença de *clue-cells* na preparação a fresco ou coloração de Gram. Ultimamente, foi proposto por Nugent *et al* (1991) um método de diagnóstico baseado apenas em dados laboratoriais. As vantagens do mesmo são as de ser rápido e mais objectivo. É também fácil de ser utilizado por qualquer laboratório ou até mesmo num consultório médico. Neste estudo analisamos 74 esfregaços vaginais corados pelo Gram e comparamos os métodos de Amsel *et al* (1983) e o de Nugent *et al* (1991). Pelo método de Amsel *et al* (1983) foi diagnosticada Vaginose Bacteriana em 28% dos casos, enquanto que pelo método de Nugent *et al* (1991) a percentagem foi de 31%. O método de Nugent *et al* (1991) parece demonstrar maior eficácia para o diagnóstico de Vaginose Bacteriana, embora as duas técnicas em conjunto possibilitem o diagnóstico de maior número de casos.

SUMMARY

Evaluation of Microscopic Techniques in the Diagnosis of Bacterial Vaginosis

The diagnosis of Bacterial Vaginosis has always been controversial. During many years, the laboratory diagnosis of this syndrome was based on the criteria of Amsel *et al* (1983). This includes many factors, such as aqueous vaginal discharge, positive KOH test and the presence of *clue-cells* in a wet mount or Gram stain. Lately, a new diagnostic method only based on laboratory findings was performed by Nugent *et al* (1991), which has the advantage of being more objective and rapid. It is also easy to be used in any laboratory or even in a doctor's room. In this study, we evaluated 74 Gram stained vaginal smears and compared both Amsel *et al* (1983) and Nugent *et al* (1991) methods. Bacterial Vaginosis was diagnosed in 28% by Amsel *et al* (1983) criteria and in 31% by the Nugent *et al* (1991) criteria. The latter method seems to have a higher efficacy in diagnosing Bacterial Vaginosis, although both techniques together diagnose a higher number of cases.

INTRODUÇÃO

Corrimento vaginal é um dos achados mais frequentemente encontrado nas clínicas de ginecologia, quer como queixa da doente, quer ocasionalmente numa consulta de rotina. Os principais responsáveis por esta situação são *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis* e um síndrome específico denominado Vaginose Bacteriana¹.

Originalmente, chamou-se vaginite não específica a este síndrome para o distinguir das outras vaginites específicas causadas por *Trichomonas vaginalis* e por *Candida sp.*, e na altura considerou-se ser consequência de uma infecção por bactérias aeróbias¹. O responsável pelas vaginites não específicas foi denominado *Haemophilus vaginalis*², o qual foi sucessivamente

chamado de *Haemophilus vaginitis*, *Corynebacterium vaginale*, e finalmente *Gardnerella vaginalis*, nome pelo qual ainda hoje se conhece, em homenagem a Gardner, que juntamente com Duke, foram quem mais se dedicou a estudar este microrganismo¹.

Mais tarde, este síndrome foi denominado por Vaginose, para descrever o aumento de corrimento vaginal sem sinais clínicos de inflamação e sem leucócitos, e Bacteriana por ausência de fungos e parasitas³. Assim, Vaginose Bacteriana caracteriza-se pelo decréscimo de *Lactobacillus*, os quais fazem parte da população microbiana normal do aparelho genital feminino, e aumento de *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides sp.*, *Mobiluncus sp.*, *Mycoplasma* e outros anaeróbios como *Prevotella sp.* e *Peptostreptococcus sp.*^{1, 4}.

Como esta infecção pode levar a corioamnionite (infecção do fluido amniótico), à morte intrauterina do feto e está associada a nascimentos prematuros⁵⁻⁷, torna-se necessária a padronização de um método de diagnóstico eficaz para a mesma.

Normalmente, o diagnóstico de Vaginose Bacteriana baseia-se em vários factores, como corrimento vaginal, teste de KOH positivo e presença de *clue-cells* na preparação a fresco ou na coloração pelo Gram. Este método⁸, que se baseia parcialmente em sinais clínicos é por vezes controverso, pois é subjectivo e os sinais podem ser muito subtis e passarem despercebidos^{9,10}.

Por estas razões, Spiegel *et al.* propôs um método alternativo baseado apenas na interpretação de esfregaços vaginais corados pelo Gram. Este, consiste na quantificação de Lactobacilos, *G. vaginalis* e outros morfotipos (cocos, bacilos curvos e fusiformes), atribuindo-lhes uma classificação de 1+ a 4+, sendo diagnosticada Vaginose Bacteriana quando a sua soma for sete ou superior¹¹. Por sua vez, Nugent *et al* (1991)¹², modificou este método de diagnóstico, tendo em atenção os morfotipos mais comuns na Vaginose Bacteriana (*Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp.* e *Bacteroides sp.*) e os Lactobacilos. Trata-se de um método rápido, económico, de fácil padronização e passível de ser utilizado por qualquer laboratório e até mesmo por um clínico no seu consultório.

Sendo do nosso conhecimento apenas um estudo de comparação destas duas técnicas (Amsel e Nugent), na qual a primeira parecia não ser tão eficaz como a segunda¹³, resolvemos efectuar um estudo de comparação dos dois métodos, com o fim de estabelecer a necessidade de se utilizarem ambos ou apenas aquele que oferece mais garantias de reprodutibilidade. Por outro lado, e uma vez que o isolamento deste microrganismo tem sido difícil e controverso, tentámos também relacionar este parâmetro com as duas

técnicas anteriores¹⁴. De notar, no entanto, que o isolamento de *Gardnerella vaginalis* não tem sido até agora recomendado como método de diagnóstico laboratorial de rotina, uma vez que este microrganismo pode fazer parte da população microbiana normal de algumas mulheres¹⁵.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídas neste estudo setenta e quatro reclusas do Estabelecimento Prisional de Tires, as quais deram previamente autorização escrita, para o procedimento que a seguir se descreve.

Depois de efectuado um exame genital e registados todos os sinais clínicos, (corrimento, ulceração ou inflamação dos órgãos genitais), foi introduzido um espéculo vaginal esterilizado e com o auxílio de zaragatoas estéreis foram colhidas secreções vaginais, a partir das quais se prepararam esfregaços, posteriormente corados pelo Gram. Estes foram observados microscopicamente de acordo com os critérios do método de Amsel *et al* e de Nugent *et al*.

Para a aplicação do método modificado de Amsel *et al* os seguintes factores foram analisados:

- existência de corrimento vaginal;
- teste de KOH (executado directamente na zaragatoa vaginal, deitando algumas gotas de KOH e observando a libertação de um odor a peixe);
- observação microscópica de *Clue-cells* em esfregaços executados a partir do mesmo exsudado. As *Clue-cells* são células epiteliais vaginais cobertas por bacilos pleomórficos.

Considerou-se Vaginose Bacteriana, quando dois destes factores foram positivos.

Para a realização do método de Nugent *et al*, classificaram-se os morfotipos de 0 a 4+, consoante o número observado por campo óptico:

- 0: sem morfotipos;
- 1+: < um morfotipo;
- 2+: 1 a 4 morfotipos;
- 3+: 5 a 30 morfotipos;
- 4+: = 30 morfotipos.

Esta classificação é convertida em *score*, segundo o sistema que se indica no quadro I.

Quadro I - Sistema de classificação (0 a 10) para esfregaços vaginais corados pelo Gram segundo Nugent *et al*.

Lactobacillus sp.	SCORE parcial	G. vaginalis ou Bacteroides sp.		Mobiluncus sp.	SCORE parcial
		SCORE parcial	SCORE parcial		
4+	0	0	0	0	0
3+	1	1+	1	1+ ou 2+	1
2+	2	2+	2	3+ ou 4+	2
1+	3	3+	3		
0	4	4+	4		

Ao valor de cada morfotipo, corresponde um *score* parcial, também demonstrado no quadro I. Cada *score* parcial é depois somado originando um *score* total. Por sua vez, ao *score* total é atribuída a seguinte classificação:

- 0 a 3: normal;
- 4 a 6: intermédio;
- 7 a 10: Vaginose Bacteriana.

O isolamento de *Gardnerella vaginalis* foi efectuado em meio específico: gelose de sangue suplementada com anfotericina B, colistina e ácido nalidíxico.

RESULTADOS

Os resultados do estudo estão indicados no quadro II.

Quadro II – Comparação dos dois métodos de diagnóstico de Vaginose Bacteriana

		Nugent <i>et al</i>		
		Vaginose Bacteriana	Intermédio	Normal
Amsel <i>et al</i>	Vaginose Bacteriana	21	18	1
	Normal	53	5	24
			23	25

Com o método modificado de Amsel *et al* (1983) diagnosticaram-se 21 casos de Vaginose Bacteriana, enquanto que com o método de Nugent *et al* 26 casos foram considerados normais, 25 intermédios e 23 como Vaginose Bacteriana. Considerando os dois métodos em conjunto obtiveram-se dezoito casos positivos comuns e 26 positivos na totalidade. Analisando-os separadamente, a técnica de Nugent *et al* diagnostica cinco casos de Vaginose Bacteriana negativos pela de Amsel *et al* e esta três casos, dois negativos e um intermédio pelo Nugent *et al*. É de notar que nestes dois casos foram isolados outros microorganismos implicados no aparecimento de corrimento vaginal.

Gardnerella vaginalis foi isolada apenas em sete casos. Destes, dois correspondem a casos intermédios do método de Nugent *et al* e negativos no Amsel *et al*. Os restantes quatro foram positivos em ambas as técnicas, um positivo pelo método de Nugent *et al* e um negativo pelo de Amsel *et al*.

DISCUSSÃO

Muito se tem falado sobre os métodos de diagnóstico de Vaginose Bacteriana e também da reprodutibilidade dos mesmos em vários centros.

O método de Amsel *et al* foi durante muito tempo aquele que melhor permitia fazer o diagnóstico desta entidade clínica. No entanto, apresenta alguns problemas

como o facto de se basear em características clínicas subjectivas ao doente e ao próprio médico, apesar de ter em consideração alguns parâmetros laboratoriais considerados importantes para diagnóstico de Vaginose Bacteriana, como a existência de *Mobiluncus*, *Bacteroides* e *Lactobacillus*. Além disso, ao considerar o corrimento vaginal como um dos parâmetros de diagnóstico, não entra em linha de conta com o facto de que aquele pode ser originado por outras doenças que não Vaginose Bacteriana. Também o pH vaginal é um critério de diagnóstico sensível, mas pouco específico, uma vez que pode ser influenciado por hemorragias e lavagens vaginais, assim como por relações sexuais próximas do dia do exame ginecológico ¹.

Nos últimos anos, o método de Nugent *et al* tem sido referido como o que apresenta critérios padronizados que permitem uma melhor reprodutibilidade dos resultados. Devido a estes factos e sendo um método barato e rápido de executar, tal como o de Amsel *et al* poderá ser efectuado em qualquer laboratório e eventualmente num consultório médico.

O estudo por nós efectuado permitiu confirmar que realmente este método é de fácil utilização e padronizados, além de que quando comparado com o método de Amsel *et al*, permite a detecção de maior número de casos de Vaginose Bacteriana. No entanto, é de notar que existiram três doentes nas quais Vaginose Bacteriana foi apenas detectada pelo método de Amsel *et al*, sendo dois normais e um intermédio no método de Nugent *et al*. Os dois primeiros apresentavam outras causas de corrimento vaginal que não Vaginose Bacteriana, o que não aconteceu no caso intermédio. Como o método de Amsel *et al* se baseia no corrimento vaginal, estes casos podem até ser negativos, o que corresponderia aos dois normais encontrados no método de Nugent *et al*. É pois de toda a conveniência o isolamento do microorganismo, de modo a podermos esclarecer melhor este tipo de situações. É também importante referir a existência de vinte e cinco casos *intermédios* quando se utiliza o método de Nugent *et al*, os quais foram todos negativos pelo método de Amsel *et al*, com excepção de um que foi considerado positivo. Estas situações podem eventualmente corresponder a um estado precoce desta infecção, que poderá mais tarde evoluir para Vaginose Bacteriana.

Em relação à cultura, achámos que o meio utilizado necessita de ser aperfeiçoado, uma vez que só foi positivo em 19% de casos diagnosticados pelo método de Amsel *et al*, em 22% quando se utilizou o método de Nugent *et al*. (1991) e em 20% quando os dois métodos

foram analisados em conjunto. Noutros estudos, o mesmo aconteceu, tendo a percentagem de isolamento variado entre 0,7% e 65%^{16,17}, dependendo das características e da concentração dos antibióticos dos meios utilizados.

Sendo a cultura ainda difícil e controversa, os autores de estudos em que esta foi comparada com o método de Nugent *et al* consideraram a microscopia como um método mais sensível, o que aconteceu também no nosso estudo^{18,19}.

CONCLUSÃO

Assim, os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que:

- o método de Nugent *et al* parece ser o método a utilizar, quando o laboratório só tem condições para efectuar uma técnica de diagnóstico de Vaginose Bacteriana. No entanto, e até se efectuar um estudo com maior número de casos, do qual se poderão tirar conclusões estatísticas que nos permitam afirmar que o método de Amsel *et al* é dispensável, pensamos que seria necessário utilizar os dois métodos em conjunto;

- a cultura para *Gardnerella vaginalis* deve continuar a ser realizada, embora tentativas de melhorar o seu isolamento devam ser levadas a cabo, talvez mediante o uso de concentrações mais elevadas de antibióticos e até mesmo a utilização de outros antibióticos;

- nas mulheres com diagnósticos *intermédios* no método de Nugent *et al* deverão ser efectuadas novas colheitas ao longo de alguns meses, para se verificar a existência de evolução ou não para Vaginose Bacteriana.

BIBLIOGRAFIA

1. BISWAS MK.: Bacterial vaginosis. Clin Obstet Gynecol 1993; 36: 166-176.
2. GARDNER HL, DUKES CD: *Haemophilus vaginalis* vaginitis. Am J Obstet Gynecol 1955; 69: 962.
3. HOLMES KK, SPIEGEL C, AMSEL R: Nonspecific vaginosis. Scand J Infect Dis Suppl 1981; 26: 110.
4. HILL GB: The microbiology of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 169(2): 450-454.
5. HAY PE, MORGAN DJ, ISON CA, BHITE SA, ROMNEY M, MCKENZIE P, PEARSON J, LAMONT RF, ROBINSON DT: A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 1994; 101: 1048-1053.
6. HILLIER SL, NUGENT RP, ESCHENBACH DA, KROHN MA, GIBBS RS, MARTIN DH, COTCH MF, ELDMAN R *et al.*: Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The vaginal infections and prematurity study group. N Engl J Med 1995; 333(26): 1737-1742.
7. DI-ROSA R, MASTRANTONIO P: Anaerobic bacteria and gynecologic infections. Recent Prog Med. 1993; 84(11): 794-800.
8. AMSEL R, TOTTEN PA, SPIEGEL CA, CHEN KCS, ESCHENBACH DA, HOLMES KK: Nonspecific vaginitis. Am J Med 1983; 74: 14-22.
9. MORGAN DJ, ABOUD CJ, MACAFFREY IMB, BHITE SA, LAMONT RF, ROBINSON DT: Comparison of Gram-stained smears prepared from blind vaginal swabs with those obtained at speculum examination for the assessment of vaginal flora. Br J Obstet Gynaecol 1996; 103: 1105-1108.
10. HILLIER SL, KROHN MA, NUGENT RP, GIBBS RS: Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 938-944.
11. THOMASON JL, ANDERSON RA, GELBERT SM, OSYPOWSKI PJ, SCAGLIONE NJ, TABBACH G, JAMES J: A Simplified Gram stain interpretative method for diagnosis of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 16-19.
12. NUGENT RP, KROHN MA, HILLIER SL: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991; 29: 297-301.
13. SCHWEBKE JR, HILLIER SL, SOBEL JD, MCGREGOR JA, SWEET RL: Validity of the vaginal Gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. Obstet Gynecol 1996; 88(4): 573-576.
14. BURNS FM, GOULD IM, PATTERSON A, WOOD WJ: Diagnosis of bacterial vaginosis in a routine diagnostic laboratory. Med Lab Sci 1992; 49(1): 8-11.
15. HACKEL H, HARTMANN AA, ELSNER P, MARTIUS J, ENGEL C, BURG G: The value of *Gardnerella vaginalis* culture in bacterial vaginitis score confirmed bacterial vaginosis. Hautarzt 1991; 42(3): 173-175.
16. NICAND E, CAVALLO JD, CRENN Y, MCYRAN M: Value of the score for Gram strains in the diagnosis of bacterial vaginosis. Pathol Biol Paris 1994; 42(5): 539-543.
17. ISON CA, DAWSON SG, HILTON J, CSONKA GW, EASMON CSF: Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* infection. J Clin Pathol 1982; 35: 550-554.
18. MAZZULI T, SIMOR AE, LOW DE: Reproducibility of interpretation of Gram-stained vaginal smears for the diagnosis of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1990; 28: 1506-1508.
19. JOESOEUF MR, HILLIER SL, JOSODIWONDO S, LINNAN M: Reproducibility of a scoring system for Gram stain diagnosis of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1991; 29(8): 1730-1731.