

MICHELLE GARCIA DISCACCIATI DE CARVALHO

**Presença de 20% ou mais de *clue cells* como
um critério diagnóstico de vaginose bacteriana
em esfregaços de Papanicolaou**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO SIMÕES

**UNICAMP
2005**

MICHELLE GARCIA DISCACCIATI DE CARVALHO

**Presença de 20% ou mais de *clue cells* como
um critério diagnóstico de vaginose bacteriana
em esfregaços de Papanicolaou**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO SIMÕES

**UNICAMP
2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Cxxp

Carvalho, Michelle Garcia Discacciati de
Presença de 20% ou mais de *clue cells* como um
critério diagnóstico de vaginose bacteriana em
esfregaços de Papanicolaou / Michelle Garcia
Discacciati de Carvalho. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: José Antonio Simões
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esfregaço vaginal. 2. Vaginose bacteriana. 3.
Variabilidade. I. Simões, José Antonio. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

(Slp/fcm)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: MICHELLE GARCIA DISCACCIATI DE CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO SIMÕES

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 11/07/2005

Dedico este trabalho...

*Ao meu pai Eudes, meu grande incentivador,
que com muito amor e humildade me ensinou os valores da vida
e me deu força para conquistar os meus objetivos.*

*À minha mãe Mariza, que por pouco tempo
-mas com intensidade- me amou e me educou,
passando este papel para uma segunda mãe, Áurea,
a quem agradeço muito por ter assumido
esta função com tanta dedicação.*

*Aos meus irmãos, Gabriela, Liége, Rúbia, Tauana, Messias e Lucas... ufa!
Valeu o apoio e a cumplicidade.*

*À minha sobrinha Bianca,
que me diverte e enche minha vida de alegria!*

*E aos meus tios Alfeu e Berenice,
que numa demonstração de muito amor e solidariedade,
deram-me uma oportunidade única e sempre estiveram ao meu lado,
contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antonio Simões, agradeço pelos valiosos ensinamentos que resultaram neste trabalho. Agradeço também pela confiança e pela competência com que orienta nossas pesquisas, contribuindo muito para a minha formação acadêmica.

Ao Waldney Pereira Martins, que esteve ao meu lado desde o início, ensinando-me e compartilhando todas as dificuldades e conquistas.

À Dr^a Rita Gorete Amaral, que abraçou como seu o meu sonho de fazer mestrado, não medindo esforços para tornar isto possível. Agradeço ainda sua participação na leitura deste trabalho e na realização da variabilidade interobservador.

À Dr^a Cláudia Martins Carneiro, por ter me incentivado tanto a fazer a pós-graduação e pela disponibilidade em compartilhar comigo experiências científicas que enriquecem nossos trabalhos.

À Dr^a Sílvia Helena Rabelo Santos, pelo apoio e contribuição no delineamento desta dissertação.

Á Prof^a Dr^a Sophie M. Derchain, Prof. Dr. Paulo César Giraldo e Dr. Júlio César Teixeira, pelas importantes contribuições para o melhoramento deste trabalho.

Às microbiologistas Eliane Brolazo e Priscila Portugal pelo apoio e realização dos diagnósticos bacterioscópicos desta pesquisa.

À Dr^a Maria Cristina do Amaral Westin e Dr. Douglas Munhoz Montis pela oportunidade de aprendizagem e pela realização do diagnóstico citopatológico desta pesquisa.

À equipe do Planejamento Familiar da Unicamp, pelo apoio e pela dedicação no atendimento às pacientes desta pesquisa, em especial às enfermeiras Cecília e Marina.

À amiga Eliana Borin Lopes Montemor pelo apoio, conselhos e pela total disponibilidade em contribuir com este trabalho.

À Margarete Donadon, que de modo muito especial contribuiu para a realização e conclusão desta dissertação. Aos estatísticos Leonardo Sene e Sirlei Siani pelo apoio e análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, pelo apoio e confiança.

A minha amiga Érika Lopes, companheira de casa, de trabalho e de pesquisas, sempre me ajudando e facilitando o meu caminho.

Aos funcionários da Secretaria do Laboratório de Citopatologia, em especial à Márcia Iório, pela total disponibilidade e cuidado no recebimento, conferência das lâminas e digitação dos laudos.

Aos funcionários da seção técnica do Laboratório de Citopatologia do Caism, pelo cuidado com a coloração e montagem das lâminas desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Citopatologia do Caism: Ana Cristina, Ângela, Andréia, Bernadete, Cíntia, Deise, Elisabeti, Éster, Fabiana, Fassina, João, Luiz Borges, Nilton, Rivaldo, Rosana, Rosiane, Ruth, Silvana, Zé Carlos e Zé Maria, que me acolheram com muito carinho.

Às amigas Adriana, tia Marli, Daniela e Maria Helena, pelo incentivo e conselhos.

Ao amigo Luís Otávio Sarian, sempre disposto a me ajudar.

Aos funcionários da ASTEC pelo apoio na editoração e finalização deste trabalho.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	13
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. Publicação.....	23
4. Conclusões	45
5. Referências Bibliográficas.....	46
6. Bibliografia de Normatizações	51

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado (<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i>)
ACG	Atipias em células glandulares (<i>Atypical glandular cells</i>)
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DIU	Dispositivo Intra-uterino
FAEP	Fundação de Apoio à Pesquisa
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
KOH	Hidróxido de potássio
LIE	Lesão intra-epitelial escamosa
pH	Potencial hidrogeniônico
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VB	Vaginose Bacteriana
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

Resumo

Objetivo: Avaliar a acurácia da presença de pelo menos 20% de *clue cells* nos esfregaços de Papanicolaou para o diagnóstico de vaginose bacteriana (VB), avaliar a reprodutibilidade interobservador deste critério padronizado e comparar a acurácia das amostras cervicais e vaginais para este diagnóstico. **Métodos:** Foi realizado um estudo de validação de teste diagnóstico envolvendo 135 mulheres em idade reprodutiva atendidas no ambulatório de Planejamento Familiar da Universidade Estadual de Campinas. As mulheres foram submetidas a um exame ginecológico, no qual foram coletadas amostras cervicais e do fundo de saco vaginal para o exame de Papanicolaou, e também amostras do fundo de saco vaginal para realização do exame bacterioscópico corado pelo método de Gram e a para o exame a fresco. Avaliaram-se também os quatro critérios clínicos de Amsel para diagnóstico de VB. As lâminas de Gram foram analisadas utilizando os critérios bacterioscópicos de Nugent, método considerado padrão-ouro, no qual uma pontuação ≥ 7 foi considerada positiva para VB. Nos esfregaços de Papanicolaou a presença de 20% ou mais de *clue cells* foi considerada positiva para VB, sendo este critério avaliado por dois observadores de laboratórios diferentes. **Resultados:** A freqüência de VB foi de 22% quando diagnosticada

pelo método de Nugent, 24% pelo método de Papanicolaou e 29% pelos critérios de Amsel. O exame de Papanicolaou para o diagnóstico de VB utilizando como o critério a presença de pelo menos 20% de *clue cells* nos esfregaços, apresentou sensibilidade de 87%, especificidade de 94%, valor preditivo positivo de 81% e valor preditivo negativo de 96%. Este critério resultou em uma excelente concordância entre as amostras cervicais e vaginais (Kappa: 0,92) e também em uma excelente concordância entre os dois observadores (Kappa: 0,87).

Conclusão: A presença de 20% ou mais de *clue cells* nos esfregaços de Papanicolaou é um critério acurado e reprodutível para o diagnóstico de VB, podendo ser utilizado para o diagnóstico presuntivo desta infecção sem a necessidade de coleta adicional de amostra vaginal.

Summary

Objective: To evaluate the accuracy of the presence of at least 20 % of *clue cells* to diagnose bacterial vaginosis (BV) in Pap-smear, to assess the reproducibility of this criterion for the diagnosis of BV between different observers and to compare the accuracy of samples collected from cervical and vaginal sites to perform the diagnosis of BV. **Methods:** This is a diagnostic test validation study of 135 women of reproductive age attending at the Family Planning Out-patient Clinic of the Universidade Estadual de Campinas. A pelvic examination was performed to collect samples from cervical and vaginal sites for Pap-smear. Swabs were also collected for Gram's stain and wet mount. Amsel's criteria were also used for the presence of BV. The Gram stained slides were evaluated and graded for the presence of BV using Nugent's criteria. A score ≥ 7 was defined as BV and considered as gold standard. The presence of $\geq 20\%$ of clue cells in Pap-smears was defined as positive for BV. These Pap-smears were analysed by two cytologists from different laboratories. **Results:** The frequency of BV was 22% by Nugent's criteria, 29% by Amsel's criteria and 24% by Pap-smear criterion. The use of the presence of at least 20% of *clue cells* in the Pap-smear for the diagnosis of BV showed a sensitivity of 87%, specificity of 94%, positive predictive value of 81% and

negative predictive value of 96%. The concordance among the cervical and vaginal samples for the diagnosis of BV by Pap-smear was excellent (Kappa: 0.92). In addition, the concordance between the observers for diagnosis of BV by Pap-smear was also excellent (Kappa: 0.87). **Conclusion:** Our findings support the accuracy and reproducibility of Pap-smear for presumptive diagnosis of BV using the presence of 20% of *clue cells* as a diagnosis criterion. Furthermore, the results suggest that the screening of BV by Pap's can be made without an additional vaginal sample collection.

1. Introdução

A flora vaginal normal é composta predominantemente por espécies de *Lactobacillus*, os quais exercem uma importante influência no ecossistema da vagina. É conhecido que a produção de substâncias inibidoras por algumas espécies de *Lactobacillus*, tais como os ácidos orgânicos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, suprimem o crescimento de bactérias patogênicas endógenas, mantendo o equilíbrio microbiológico vaginal. Entretanto, sob circunstâncias desconhecidas os *Lactobacillus* podem ser suprimidos e a condição clínica denominada vaginose bacteriana (VB) manifestar-se (Aroutcheva, 2001a).

A VB é a causa mais freqüente de corrimento vaginal em mulheres na idade reprodutiva, podendo ocorrer em 10% a 38% das mulheres atendidas em clínicas ginecológicas (Davis et al., 1997; Lamont et al., 2000; Avilés et al., 2001; Yen et al., 2003), em cerca de 40% das mulheres atendidas em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (Castro-Sobrinho e Bambilra, 1992; Riedner et al., 2003) e em 9% a 28% das mulheres grávidas (Simões et al., 1996; Greene et al., 2000). Porém, aproximadamente 50% das mulheres com VB não apresentam sintomas (Amsel et al., 1983).

Historicamente, até a década de 50 as mulheres que apresentavam corrimento vaginal anormal, no qual não se detectava fungos ou *Trichomonas vaginalis*, recebiam o diagnóstico de “vaginite inespecífica”. Em 1955, Gardner e Dukes publicaram o clássico artigo descrevendo as características desta vulvovaginite, as quais formam a base do diagnóstico atual de VB.

Ainda neste artigo, Gardner e Dukes relataram o isolamento de um novo microorganismo, o *Haemophilus vaginalis*, acreditando ser o agente etiológico da vaginite inespecífica, que passou a ser chamada então de vaginite por *Haemophilus vaginalis*. Posteriormente, este microorganismo foi reclassificado por Greenwood e Pickett (1980) dentro de um novo gênero: *Gardnerella vaginalis*, em homenagem a um de seus descobridores.

Todavia, estudos posteriores verificaram que a presença de *Gardnerella vaginalis* não era responsável pela VB por si só, havendo a necessidade do envolvimento de outras bactérias. Com o avanço das técnicas microbiológicas, estudos puderam identificar um grande número de bactérias envolvidas na VB, além da *Gardnerella vaginalis*, tais como espécies *Bacterioides*, *Mobiluncus* sp, *Mycoplasma hominis* e outros microorganismos anaeróbios. Além disto, a *Gardnerella vaginalis* foi isolada em 40% a 50% dos indivíduos normais sem sinais de cervicite ou vaginite, indicando que apenas a presença deste microorganismo não significa que a mulher tenha VB (Totten et al., 1982; Paavonen et al., 1983; Thomason et al., 1984; Holst et al., 1987).

Atualmente, a VB pode ser conceituada como uma síndrome clínica envolvendo o trato genital inferior, caracterizada pela diminuição da flora lactobacilar normal e crescimento excessivo de bactérias anaeróbias ou facultativas, como a *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp e *Mycoplasma hominis* (Aroutcheva et al., 2001b).

Nesta síndrome ocorrem mudanças de fatores metabólicos que afetam o equilíbrio microbiológico. A glicose proveniente do glicogênio vaginal deixa de ser degradada em ácido láctico pelos lactobacilos produtores de H₂O₂ e passa a ser transformada em ácidos graxos pelas bactérias anaeróbias. Estes ácidos graxos, por sua vez, aumentarão o pH vaginal para valores acima de 4,5, criando um ambiente desfavorável ao crescimento dos lactobacilos e favorável ao crescimento das bactérias potencialmente patogênicas, fechando desta maneira um ciclo que favorece o estabelecimento da VB (Eschenbach, 1989).

A VB tem sido considerada um distúrbio inofensivo de flora vaginal, mas estudos mostram que gestantes com VB possuem maior risco de infecção intra-amiótica, trabalho de parto prematuro, rotura precoce das membranas, nascimento prematuro e endometrite pós-parto (Watts et al., 1990; Kurki et al., 1992; Romero et al., 1993; Hitti et al., 2001; Genc et al., 2004).

Além destas complicações em gestantes, na população em geral a presença de VB pode estar relacionada à infertilidade idiopática (Spandorfer et al., 1998); aumento do risco de aquisição e transmissão de HIV (Cohen et al., 1995; Taha et al., 1998; Simões et al., 2001) e possível associação com neoplasia

intra-epitelial cervical (Platz-Christensen et al., 1994; Discacciati et al., 2004), por isto a necessidade de um correto diagnóstico.

Na prática clínica, o diagnóstico da VB é mundialmente feito por meio do método de Amsel et al. (1983), o qual preconiza que para o diagnóstico de VB é necessária a presença de pelo menos três dos seguintes critérios: presença de um corrimento vaginal fino e homogêneo; pH vaginal $\geq 4,5$; teste de wiff positivo (liberação de um odor de “peixe” característico ao se adicionar gotas de KOH 10% a uma fração do conteúdo vaginal) e a identificação das chamadas *clue cells*, ou células indicadoras no exame microscópico a fresco do conteúdo vaginal, as quais podem ser definidas como células epiteliais recobertas por bactérias.

Entretanto, a identificação de *clue cells* representa a maior dificuldade para o diagnóstico clínico, uma vez que a maioria dos ginecologistas não dispõe de tempo, habilidade ou microscópio para este procedimento durante a consulta. Além disto, devido ao fato de que métodos laboratoriais são mais facilmente padronizados e menos subjetivos do que o uso dos critérios clínicos para o diagnóstico de VB, eles vêm sendo preferidos (Schewebke et al., 1996).

Neste sentido, alguns autores propuseram métodos para simplificar e tornar mais objetivo o diagnóstico de VB por meio de exame bacterioscópico. Dunkelberg (1965) foi o primeiro a sugerir a utilização da amostra vaginal corada pelo Gram para o diagnóstico de VB.

Posteriormente, Spiegel et al. (1983), introduziram o primeiro método padronizado para diagnóstico de VB, também em amostras vaginais coradas

pelo Gram. Nesse artigo, as bactérias foram categorizadas de acordo com o seu tipo morfológico em: morfotipos de *Lactobacillus*, morfotipos de *Gardnerella*, bacilos curvos, bacilos gram-negativos, cocos gram-positivos e microorganismos fusiformes. Dependendo da quantidade destes morfotipos a flora era considerada normal ou compatível com VB.

O método de Nugent et al. (1991) representa uma simplificação do método de Spiegel, sendo atualmente o método laboratorial de escolha para o diagnóstico de VB. Por este método as bactérias são classificadas como morfotipos de *Lactobacillus* (bacilos longos gram-positivos); morfotipos de *Gardnerella vaginalis* e *Bacteriodes* sp (cocobacilos gram-negativos ou gram-variáveis) e morfotipos de *Mobiluncus* spp (bacilos curvos gram-negativos). Cada morfotipo é quantificado e graduado em uma escala de pontuação de 0 a 10, na qual um valor igual ou maior a 7 é considerado positivo para VB.

QUADRO 1

Critério de Nugent modificado para o diagnóstico de vaginose bacteriana pelo método de Gram

Tipo morfológico dos microorganismos	Pontuação segundo a quantidade de microorganismos				
	Nada	1+	2+	3+	4+
Bacilos longos Gram (+)	4	3	2	1	0
Cocobacilos Gram (-) ou Gram variáveis	0	1	2	3	4
Bacilos curvos Gram (-)	0	1	2	2	2

0-3: Normal

4-6: Intermediário

7-10: Vaginose bacteriana

Outro método laboratorial utilizado para o diagnóstico de VB, apesar de não ser um método bacterioscópico, é o próprio exame de Papanicolaou. Os citotécnicos, citologistas e citopatologistas comumente relatam a presença de *clue cells* nos esfregaços corados por este método, baseando-se na observação de células escamosas, as quais assumem uma coloração violeta devido à densidade bacteriana aderida à sua superfície citoplasmática (Gompel e Koss, 1997). Mas é necessário que os profissionais que realizam este exame estejam cientes que o uso do termo *Gardnerella vaginalis* como sinônimo de VB é inadequado, pois a presença desta bactéria não significa necessariamente a presença da doença.

Os critérios para o diagnóstico de VB em esfregaços cervicovaginais corados pelo método de Papanicolaou variam entre os estudos. Schnadig et al. (1988) classificaram a flora bacteriana pelo método de Papanicolaou resumidamente como: 1) padrão lactobacilar, 2) padrão anaeróbio com ou sem *Gardnerella vaginalis* ou bacilos curvos, 3) padrão escasso.

No estudo de Giacomini et al. (1998), a presença de um fundo de lâmina composta por cocobacilos, formando um espaço vazio ao redor das células epiteliais, foi considerado o critério mais importante utilizado para o diagnóstico de VB. Outros estudos utilizam apenas a identificação de *clue cells* para o diagnóstico de VB (Platz-Christensen et al., 1989; Platz-Christensen et al., 1995; Greene et al., 2000), entretanto sem nenhuma forma de quantificação.

O Sistema Bethesda 1991 traz como critérios para o diagnóstico a presença de um fundo de lâmina constituído por uma fina camada de cocobacilos; presença

de *clue cells* e notável ausência de lactobacilos; utilizando o termo “predominância de cocobacilos compatíveis com a modificação da flora vaginal” para designar esta síndrome. Na revisão de 2001, este termo foi substituído por “modificação da flora vaginal compatível com VB”, porém mantendo os mesmos critérios (Solomon et al., 2002).

Apesar de o Sistema Bethesda representar uma padronização para o relato de laudos citopatológicos, as definições e critérios propostos para o diagnóstico microbiológico ainda não são totalmente adotados pelos laboratórios. A falta de um critério único e objetivo para o diagnóstico de VB pode determinar a variabilidade interobservador e tornar o exame de Papanicolaou um método pouco reprodutível para este diagnóstico (Giacomini et al., 1998).

Existem controvérsias em relação ao uso do exame citopatológico de Papanicolaou para o diagnóstico de VB, pois o seu papel para este fim tem gerado resultados conflitantes. Alguns estudos demonstraram que este método possui boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de VB, sugerindo seu uso para o rastreamento desta vulvovaginite (Platz-Christensen et al., 1989; Schnadig et al., 1989; Castro-Sobrinho e Bambera, 1992). Entretanto, outros estudos não encontraram resultados tão satisfatórios (Davis et al., 1997; Greene et al., 2000; Avilés et al., 2001).

Um fator que vem limitando o uso do exame de Papanicolaou para o diagnóstico de VB é o local onde a amostra é coletada, freqüentemente na ectocérvice e endocérvice. A vagina é considerada o sítio primário da VB (Hillier

1993). Por isso recomenda-se uma coleta tríplice, com adição de uma amostra vaginal, procedimento que nem sempre é feito na prática.

A acurácia do método de Papanicolaou para o diagnóstico de VB vai depender não só do critério utilizado, como também da conscientização dos citotécnicos, citologistas e citopatologistas sobre a importância prática de um correto diagnóstico da VB, além das alterações citopatológicas. Por isso, é necessário o emprego de um critério padronizado, de fácil avaliação e que, quando utilizado por diferentes examinadores, ofereça o mesmo diagnóstico.

O exame de Papanicolaou é amplamente utilizado para o rastreamento do câncer de colo uterino e possui fácil acessibilidade, graças às campanhas existentes. Sendo grande o número de mulheres que se submetem a este exame periodicamente, acredita-se que este método possa ser uma alternativa para o diagnóstico presuntivo e rastreamento da VB, o que é importante principalmente para os casos assintomáticos, os quais poderão ser identificados, fornecendo ao clínico informações que auxiliarão na melhor conduta para estas pacientes.

Assim, é importante avaliar o papel do exame de Papanicolaou para o diagnóstico de VB, por meio de um critério acurado e reprodutível para ser empregado na rotina da leitura dos esfregaços de Papanicolaou.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a acurácia da presença de pelo menos 20% de *clue cells* nos esfregaços de Papanicolaou para o diagnóstico de VB em amostras cervicais e vaginais, além da reprodutibilidade deste critério quando avaliado por diferentes observadores.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da presença de 20% ou mais de *clue cells* nos esfregaços de Papanicolaou coletados nas amostras cervicais e vaginais como critério diagnóstico de VB.
- Analisar a taxa de concordância do diagnóstico de VB, por meio deste critério padronizado no exame de Papanicolaou realizado na amostra

cervical, através da comparação dos resultados obtidos por dois observadores de diferentes laboratórios.

- Analisar a concordância entre as amostras cervicais e vaginais para o diagnóstico de VB, através deste critério padronizado no exame de Papanicolaou.

3. Publicação

Artigo - **PRESENCE OF 20% OR MORE *CLUE CELLS*: AN ACCURATE CRITERION FOR THE DIAGNOSIS OF BACTERIAL VAGINOSIS IN PAPANICOLAOU CERVICAL SMEARS**

Artigo submetido à revista Diagnostic Cytopathology (junho 2005).

PRESENCE OF 20% OR MORE *CLUE CELLS*: AN ACCURATE CRITERION FOR THE DIAGNOSIS OF BACTERIAL VAGINOSIS IN PAPANICOLAOU CERVICAL SMEARS

Michelle G. Discacciati¹, José A. Simões¹, Rita G. Amaral², Eliane Brolazo¹,
Silvia H. Rabelo-Santos^{1,2}, Maria C. A. Westin³, Eliana B. L. Montemor³

Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas (UNCAMP), SP, Brazil¹; School of Pharmacy, Federal University of Goiás, GO, Brazil²; Cytopathology Laboratory, Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher/UNCAMP³.

Sponsoring agency: Fundação de Apoio à Pesquisa (FAEP) da Faculdade de Ciências Médicas/UNCAMP

Grant number: FAEP: 1508/03

Corresponding author:

Professor José Antonio Simões, M.D.

Caixa Postal: 6181

Cidade Universitária Zeferino Vaz,

13.083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

Telephone: (55-19)3289 2856, (55-19) 3799-9306.

Fax: (55-19) 3289 2440

e-mail: jsimoes@caism.unicamp.br

Running headline: *Clue cells* for the diagnosis of BV in Pap-smears

Abstract

A study was carried out in 135 women of reproductive age to evaluate the role of the Papanicolaou smear performed in cervical and vaginal samples for the diagnosis of bacterial vaginosis (BV), to validate the method for this diagnosis and to evaluate the reproducibility of the criterion used. The cervical and vaginal smears were stained using the Papanicolaou method and evaluated by two separate observers. The finding of 20% or more *clue cells* was considered positive for the presence of BV. This diagnostic criterion presented a sensitivity of 87%, specificity of 94%, a positive predictive value of 81% and a negative predictive value of 96%, both in cervical and vaginal samples. There was excellent agreement in the diagnosis of BV between the two observers (Kappa: 0.87) and between cervical and vaginal samples (Kappa 0.92). Therefore, the presence of 20% or more *clue cells* in the Papanicolaou smear is an accurate and reproducible criterion for the diagnosis of BV and may be used in screening for this infection, eliminating the need for further vaginal sample collection.

Key words: Papanicolaou smear, bacterial vaginosis, interobserver variability, diagnostic validation study.

Introduction

Bacterial vaginosis (BV) is the most frequent cause of vaginal discharge in women of reproductive age, being present in 9-38% of women attending gynecological clinics¹⁻⁴. This syndrome is characterized by a reduction in the normal lactobacillus microflora and an excessive growth of microorganisms such as *Gardnerella vaginalis*, anaerobes and *Mycoplasma sp.* in the lower genital tract⁵.

Although still considered by some as an inoffensive disorder of the vaginal flora, studies show that BV may be related to gynecological and obstetrical complications including intraamniotic infection, premature labor and prematurity^{6,7}, an increased risk of acquiring HIV⁸, and a possible association with cervical intraepithelial neoplasia^{9,10}.

The methods of choice for the diagnosis of BV are the clinical criteria established by Amsel *et al*¹¹ and the microscopic assessment criteria of Nugent *et al*¹². An alternative diagnosis suggested by some authors is the Papanicolaou smear. Studies on the accuracy of this method for the diagnosis of BV have led to conflicting results and have generated controversy regarding the use of this method for this diagnostic purpose. Some studies using Papanicolaou smears have reported good sensitivity and specificity and suggest the use of this method in screening for this infection¹³⁻¹⁵. On the other hand, other studies have failed to find such satisfactory results^{3,4,16}.

The principal argument in favor of the use of the Papanicolaou smear as a presumptive diagnostic method for BV, particularly in asymptomatic women, is the fact that it is a routine test widely used for cervical cancer screening to which a very large number of women are periodically submitted ³.

The objectives of this study were therefore to evaluate the accuracy of a standardized criterion for the diagnosis of BV in Papanicolaou smears, to evaluate the reproducibility of this criterion for the diagnosis of BV when performed by different observers, and to compare the accuracy of diagnosis in cervical samples and in samples taken from the vaginal cul-de-sac.

Methods

This study to validate diagnostic testing was carried out at the family planning clinic of the State University of Campinas (UNICAMP) between July 2004 and February 2005. The research protocol was approved by the Internal Review Board of the School of Medical Sciences, UNICAMP, under reference #508/2003.

Sample size was calculated assuming a sensitivity of 88.2% for the diagnosis of BV by Papanicolaou smear and a prevalence of BV of 31.7%¹⁵. An alpha of 0.05 and a maximum sensitivity variation of 7% were assumed, resulting in a sample size of 135 women.

Women of 18-50 years of age attending the clinic for routine Papanicolaou smear testing were invited to participate in the study. Exclusion criteria consisted of: pregnancy, the presence of vaginal bleeding, use of vaginally applied medication during the three days prior to sample collection, and sexual intercourse in the 24 hours prior to the examination. All 135 women included in the study gave their signed informed consent prior to inclusion.

The participants were submitted to a gynecological examination. A swab was collected from the vaginal cul-de-sac for wet mount examination and a second swab was taken from the same location for gram stain. Samples were then taken for the preparation of two smears, the first using a sample from the ectocervix and endocervix and another with samples from the vaginal cul-de-sac. These smears were immediately fixed in 95% alcohol for subsequent staining according to the Papanicolaou technique.

The gram stained slides were analyzed by a trained microbiologist under 1000x magnification and bacterial morphotypes were quantified according to the Nugent score. A score of 0-3 was considered normal, while a score between 4 and 6 was classified as intermediate and a score ≥ 7 was considered positive for BV¹². For the purpose of this study, smears with an intermediate score were considered negative. The microbiologist was unaware of the results of the Papanicolaou smear test.

Amsel's diagnostic criteria¹¹ were also evaluated. For this purpose, vaginal pH was measured during the gynecological examination using a colorimetric tape left in contact with the vaginal wall for one minute. For the amine-odor (whiff) test, two drops of 10% potassium hydroxide (KOH) were added to a fraction of the sample collected from the vaginal cul-de-sac. Tests were considered positive when the characteristic fishy odor was detected. The wet-mount specimen was analyzed for the presence of *clue cells* under 40x magnification immediately after collection of the vaginal swab.

The clinical diagnosis for BV was considered positive when at least three of the following criteria were fulfilled: vaginal pH ≥ 4.5 , positive whiff test, presence of a thin homogeneous discharge, and the presence of *clue cells* in the wet mount¹¹.

The cervical and vaginal smears fixed in alcohol were sent to the Cytopathology Laboratory of the *Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM)*, where they were stained according to the Papanicolaou technique. Cytopathological evaluation was carried out according to routine laboratory procedures, using the 2001 Bethesda System classification¹⁷.

The diagnosis of BV in the Papanicolaou smear was based on the observation of at least 20% of *clue cells* as follows: 20 representative fields containing at least 10 epithelial cells were randomly selected and examined under 40x magnification. The smear was considered positive for BV when at least two *clue cells* were found per field.

The analysis of this criterion for the diagnosis of BV in the Papanicolaou smear was carried out by a cytologist, referred to as observer A, who had no knowledge of the results of the clinical examination or the gram stain. In addition, the same criterion used was also evaluated by a second cytologist from another laboratory, referred to as observer B, who had no knowledge of any of the previous results.

The diagnosis of BV obtained using the Papanicolaou smear method was compared with the Nugent score¹², which was considered the gold standard. The sensitivity, specificity and their respective 95% confidence intervals (95% CI) were calculated for the cervical smears and the samples taken from the vaginal cul-de-sac. The positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) were also calculated. To evaluate the diagnostic agreement of BV in the Papanicolaou smears between the two observers and between vaginal and cervical samples, the Kappa index was applied, using a confidence interval of 95%.

Since clinical criteria are widely used for the routine diagnosis of BV, the results of the Papanicolaou method were also compared to Amsel's clinical criteria¹¹.

Results

The mean age of the 135 women who participated in the study was 32 ± 7.14 years. Of these, 120 women (89%) presented negative results, while 15 (11%) tested positive. Seven of these 15 women (5%) were found to have low-grade squamous intraepithelial lesion (L-SIL), 3 (2%) had high-grade squamous

intraepithelial lesion (H-SIL), 4 (3%) presented atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), and 1 (1%) was diagnosed with atypical glandular cells (AGC).

When diagnosed according to the Nugent score, the frequency of BV was 22%, while it was found in 29% of cases when Amsel's clinical criteria were applied and in 24% when the Papanicolaou smear criterion was used to define diagnosis.

Table 1 relates the accuracy of the Papanicolaou smear criteria in the diagnosis of BV, with the Nugent score being applied as the gold standard. Good sensitivity, specificity, PPV and NPV were achieved both in the cervical and vaginal samples and in the analysis of both observers.

There was excellent agreement in BV diagnosis according to the Papanicolaou smear method between the cervical smears analyzed by observers A and B (Kappa 0.87 95% CI 0.78-0.97), (Table 2).

Table 3 shows the agreement between cervical and vaginal smears using the Papanicolaou-stain technique for the diagnosis of BV. Note the excellent agreement between the two samples (Kappa 0.92, 95% CI: 0.84-1.00).

Moreover, when the results of the Papanicolaou smear test were compared with Amsel's criteria for the diagnosis of BV, a sensitivity of 77%, specificity of 98%,

PPV of 94% and NPV of 91% were found for cervical smears, also indicating high accuracy (92%), (data not shown).

Discussion

In this study, the proposed criterion of 20% or more *clue cells* in the Papanicolaou smears for the diagnosis of BV resulted in high accuracy. There was good sensitivity, specificity, PPV and NPV, both for cervical and for vaginal smears. Moreover, this criterion presented excellent interobserver agreement, which suggests that it may be reproducible when performed by different analysts.

In some previous studies, the diagnosis of BV was based on the simple presence of *clue cells* in the Papanicolaou smear^{13,15,16}. Others have used the 1991 Bethesda System criteria¹⁸ for this purpose.

In the present study, the presence of 20% or more *clue cells* in the smears was selected as the criterion for the diagnosis of BV based on the report by Eschenbach *et al*¹⁹ confirming that this finding in wet mount examination was better correlated with the presence of BV. However, these authors evaluated the quantity of *clue cells* in only three representative fields. In this study, we analyzed a larger number of fields in order to try to perform a more precise quantification of *clue cells* without, however, significantly increasing the amount of time required for smear analysis. This is of extreme importance for the

possible future applicability of this technique in the routine practice of reading Papanicolaou smears.

The results found here are in agreement with those of Platz-Christensen *et al*¹³, who reported a sensitivity of 90% and a specificity of 97% using the Papanicolaou smear for the diagnosis of BV. These authors based their results on the simple observation of *clue cells* in the smear without, however, using any quantitative criterion.

In contrast, another study that also used the simple presence of *clue cells* in the smear failed to reproduce the results reported by Platz-Christensen *et al*¹³, and found a sensitivity of only 49% for the Papanicolaou smear in the diagnosis of BV¹⁶. We believe that merely identifying the presence of *clue cells* in the smear, with no form of quantification, is a more subjective criterion than the one used by us, and may ultimately result in lower reproducibility. Neither of the two above-mentioned studies evaluated the interobserver variability of the criterion used.

Other studies have also reported a lower sensitivity than that reported here^{3,4}, and this may perhaps be explained by the type of criterion used for the diagnosis of BV. Davis *et al*⁴ and Avilés *et al*³ reached a diagnosis of BV only when the three criteria described in the 1991 Bethesda System¹⁸ were present; these being: the presence of a background composed of coccobacillus, the presence of *clue cells* and the notable absence of lactobacillus. Compared to our results, the study carried out by Davis *et al*⁴ presented low sensitivity (55%)

despite good specificity (98%) in the diagnosis of BV. Similarly, Avilés *et al*³ reported sensitivity of 66% and specificity of 86%.

The Bethesda criteria¹⁸ for the diagnosis of BV may perhaps be more rigorous and evaluation may require more effort than the criterion proposed in our study, since this system requires the presence of the three above-mentioned findings for the diagnosis of BV, which may reduce sensitivity. Moreover, the Bethesda System¹⁸ uses no form of quantification, which may make it more subjective and may result in low interobserver reproducibility.

Our results show that the criterion that is comprised of the presence of 20% or more *clue cells* in Papanicolaou smears renders an excellent interobserver agreement for the diagnosis of BV, thus representing an additional advantage in the applicability of this method.

BV is believed to be more accurately diagnosed in vaginal samples than in cervical samples since the vagina is the primary location of BV²⁰. It is therefore currently accepted in clinical practice that the collection of samples for the evaluation of BV and other infections should be taken from the vaginal cul-de-sac. However, in routine Papanicolaou smears, vaginal samples are not always taken. Our study showed excellent agreement between the samples taken from the vaginal cul-de-sac and cervical samples in the diagnosis of BV by Papanicolaou smear, a fact that may eliminate the need for triple sample collection for performing cytopathological diagnosis of BV.

One question that should be considered in future studies is that of the intermediate flora in BV diagnosis. Clinically, the decision regarding how to manage cases of intermediate flora is based on individual physician discretion. For research purposes, most studies consider intermediate flora to be negative for BV. In our study, of the four cases in which the Papanicolaou smear was negative and the Nugent score was positive for BV, all presented an initial diagnosis of intermediate flora with a marked reduction in lactobacillus according to the Papanicolaou smear, and all cases also had a positive diagnosis for BV according to Amsel's clinical criteria.

It may be that, together with the observation and quantification of the *clue cells* used in this study, the addition of a criterion that quantifies the number of lactobacillus may further increase the sensitivity of the Papanicolaou smear method for the diagnosis of BV, thereby improving the classification of cases of intermediate flora.

Considering that clinical diagnosis is carried out during routine visits at gynecology clinics, we also compared the Papanicolaou smear with Amsel's clinical criteria for the diagnosis of BV. The cervical smears using the criterion proposed in this study presented high accuracy compared to clinical diagnosis.

The difficulty of having to carry out additional procedures to those normally performed at a routine gynecological out-patient visit has limited the use of Amsel's criteria since this method requires wet mount examinations, which cannot be

carried out by the majority of gynecologists. This fact encourages the application of exclusively laboratory techniques such as gram stain using the Nugent score, which is currently considered the best laboratory method for the diagnosis of BV.

We believe that a good criterion for the diagnosis of BV using the Papanicolaou smear should be objective as well as accurate, should be easy to evaluate and reading the slides should not incur much additional time. Moreover, the specialists who interpret the Papanicolaou smear have to be trained to use a standardized method for the diagnosis of BV. Above all, these specialists should be aware of the importance of providing an accurate diagnosis for clinical practice. It is also important to emphasize that Papanicolaou smear testing does not substitute Gram stain for the confirmatory diagnosis of BV. It should, however, be seen as a useful screening instrument for this infection, particularly in asymptomatic women, and for providing the gynecologist with the information that there are microbiological changes that require a more thorough investigation.

In conclusion, the presence of 20% or more *clue cells* in the Papanicolaou smears is an accurate criterion with excellent reproducibility for the presumptive diagnosis of BV, eliminating the need for an additional collection of vaginal samples.

Acknowledgments

We would like to thank the Fundação de Apoio a Pesquisa (FAEP) / UNICAMP for financial support. We would also like to express our gratitude to the microbiologist Priscila M. Portugal, to the cytologist Adriana L.C Balys, and to the cytopathologist Douglas M. Montis for their collaboration in carrying out the tests required for this study.

References

1. Lamont RF, Morgan DJ, Wilden SD, Taylor-Robinson D. Prevalence of bacterial in women attending one of three general practices for routine cervical cytology. *Int J STD AIDS* 2000; 11:495-8.
2. Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-experienced young women entering the military. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 102:927-33.
3. Avilés AG, Zaragoza CO, Barrera LT, Vasquez RM, Rosas RP. Es útil la tinción de Papanicolaou como auxiliar del diagnóstico de algunas infecciones de transmisión sexual? *Atención Primaria* 2001; 27:222-6.
4. Davis JD, Connor EE, Clark P, Wilkinson EJ, Duff P. Correlation between cervical cytologic results and Gram stain as diagnostic tests for bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:532-5.
5. Aroutcheva AA, Simões JA, Behbakht K, Faro S. *Gardenerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clinical Infect Dis* 2001; 33:1022-1027.
6. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. Vaginal Indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. *Obstet Gynecol* 2001; 97:211-9.
7. Genc MR, Witkin SS, Delaney ML, et al. A disproportionate increase in IL β over IL-1ra in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1191-7.

8. Simões JA, Hashemi FA, Aroutcheva AA, et al. Human immunodeficiency virus type 1 stimulatory activity by *Gardnerella vaginalis*: relationship to biotypes and other pathogenic characteristics. J Infect Dis 2001; 184:22-27.
9. Platz-Christensen JJ, Sundström E & Larsson PG. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. Acta Obstet Gynecol Scand 1994; 73:586-8
10. Guijon F, Parakesvas M, Rand T. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. Int J Obstet Gynecol 1992; 37:185-191.
11. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial epidemiologic associations. Am J Med 1983; 74:14-22.
12. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiology 1991; 29:297-301.
13. Platz-Christensen JJ, Larsson PG, Sundström E, Bondeson L. Detection of bacterial vaginosis in Papanicolaou smears. Am J Obstet Gynecol 1989; 160:132-3.
14. Giacomini G, Calcinai A, Moreti D, Cristofani AR. Accuracy of cervical/vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. Sex Trans Dis 1998; 25: 24-7.
15. Platz-Christensen JJ, Larsson PG, Sundström E, Wikvist N. Detection of bacterial vaginosis in wet mount, Papanicolaou stained vaginal smears and in Gram stained smears. Acta Obstet Gynecol Scand 1995; 74:67-70.

16. Greene JF, Kuehl TM, Allen SR. The Papanicolaou smear: inadequate screening test for bacterial vaginosis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1048-9.
17. Solomon D, Davey D, Kurman et al. The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-19.
18. Current issues. The 1991 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnosis. *Diagnostic Cytopathol* 1993; 9:235-243.
19. Eschenbach, DA, Hillier S, Critchlow C, Stevens, C, DeRouen T, Holmes KK. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:819-28.
20. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am Obstet Gynecol* 1993; 169:455-9.

Table 1: Papanicolaou smears using the presence of $\geq 20\%$ of *clue cells* for the diagnosis of bacterial vaginosis*

	Observer A		Observer B	
	Cervical sample	Vaginal sample	Cervical sample	Vaginal sample
Sensitivity (%) (95% CI)	87(74-99)	87 (74-99)	80 (66-94)	80 (66-94)
Specificity (%) (95% CI)	94 (90-99)	94 (90-99)	92 (87-97)	93 (88-98)
PPV** (%)	81	81	75	77
NPV*** (%)	96	96	94	94
Accuracy (%)	93	93	90	90

* Nugent Score ≥ 7 used as gold standard

**PPV: positive predictive value

***NPV: negative predictive value

Table 2: Agreement in the diagnosis of bacterial vaginosis between the two observers in the Papanicolaou-stained cervical smears

Observer A	Observer B	
	Positive	Negative
Positive	29	03
Negative	03	100
Total	32	103

Kappa = 0.87 (95% CI 0.78-0.97)

Table 3: Agreement in the diagnosis of bacterial vaginosis between cervical and vaginal Papanicolaou-stained samples

Cervical Sample	Vaginal Sample	
	Positive	Negative
Positive	30	02
Negative	02	101
Total	32	103

Kappa (95% CI): 0.92 (0.84-1.0)

4. Conclusões

- O exame de Papanicolaou, utilizando como critério a presença de 20% ou mais de *clue cells* nos esfregaços, possui uma boa sensibilidade (87%), especificidade (94%), VPP (81%) e VPN (96%) para o diagnóstico de VB, tanto nas amostras cervicais quanto nas amostras vaginais.
- A concordância do diagnóstico de VB pelo método de Papanicolaou realizado pelos dois observadores foi excelente (Kappa 0,87 IC 95% 0,78-0,97).
- O diagnóstico de VB pelo método de Papanicolaou apresentou uma excelente concordância entre as amostras cervicais e vaginais (Kappa 0,92 IC 95% 0,84-1,0).

5. Referências Bibliográficas

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74:14-22.

Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simões JA et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2001a; 185:375-9.

Aroutcheva, AA, Simões, JA, Behbakht, K, Faro, S. *Gardenerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clinical Infect Dis* 2001b; 33:1022-7.

Avilés AG, Zaragoza CO, Barrera LT, Vasquez RM, Rosas RP. Es útil la tinción de Papanicolaou como auxiliar del diagnóstico de algunas infecciones de transmisión sexual? *Atención Primaria* 2001; 27:222-6.

Castro-Sobrinho JM e Bampirra EA. Contribuição para o estudo etiológico das vaginoses bacterianas. *Rev Bras Anal Clin* 1992; 24:31-4.

Cohen CR, Duerr A, Pruithithada N, Ruggao S, Hillier S, Garcia P. et al. Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers on Chiang Mai, Thailand. *AIDS* 1995; 9:1093-7.

Davis JD, Connor EE, Clark P, Wilkinson EJ, Duff P. Correlation between cervical cytologic results and Gram stain as diagnostic tests for bacterial vaginosis. **Am J Obstet Gynecol** 1997; 177:532-5.

Discacciati MG, Rabelo-Santos SH, Campos EA, Simões JA, Derchain SFM, Sarian LOZ et al. Vaginose Bacteriana e Papilomavírus de Alto risco oncogênico em mulheres submetidas a conização com alça diatérmica para tratamento da Neoplasia Intraepitelial de Alto grau. **RBGO** 2004; 26:721-5.

Dunkelberg WE Jr. Diagnosis of *Haemophilus vaginalis* vaginitis by gram-stained smears. **Am J Obstet Gynecol** 1965; 91:998.

Eschenbach DA. Prevalence of hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **J Clin Microbiol** 1989; 27:251-6.

Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified nonspecific vaginitis **Am J Obstet Gynecol** 1955; 69:962-76.

Genc MR, Witkin SS, Delaney ML, Paraskevas LR, Tuomala RE, Norwitz ER. et al. A disproportionate increase in IL β over IL-1ra in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth. **Am J Obstet Gynecol** 2004; 190:1191-7.

Giacomini G, Calcinai A, Moreti D, Cristofani AR. Accuracy of cervical/vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. **Sex Trans Dis** 1998; 25:24-7.

Gompel C, Koss LG. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas. Ed Brás, Ed. Manole Ltda. 1997.

Greene JF, Kuehl TM, Allen SR. The Papanicolaou smear: inadequate screening test for bacterial vaginosis during pregnancy. ***Am J Obstet Gynecol*** 2000; 182:1048-9.

Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella vaginalis*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes). ***Int J Syst Bacteriol*** 1980; 30:170-8.

Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. ***Am J Obstet Gynecol*** 1993; 169:455-9.

Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. Vaginal Indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. ***Obstet Gynecol*** 2001; 97:211-9.

Holst E, Wahne B, Hovelius B, Mardh PA. Bacterial vaginosis: microbiological and clinical findings. ***Eur J Clin Microbiol*** 1987; 6:536-41.

Kurkki T, Sivonen A, Renkonen OL, Savia E, Ylikorkala O. Bacterial vaginosis in early pregnancy outcome. ***Obstet Gynecol*** 1992; 80:173-7.

Lamont, RF, Morgan DJ, Wilden, SD, Taylor-Robinson, D. Prevalence of bacterial in women attending one of three general practices for routine cervical cytology. ***Int J STD AIDS*** 2000; 11:495-8.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. ***J Clin Microbiology*** 1991; 29:297-301.

Paavonen J, Miettinen A, Stevens CE, Kiviat N, Kuo CC, Stamm WE. et al. *Mycoplasma hominis* in nonspecific vaginitis. ***Sex Transm Dis*** 1983; 10:271-5.

Platz-Christensen JJ, Larsson PG, Sundström E, Bondeson L. Detection of bacterial vaginosis in Papanicolaou smears. **Am J Obstet Gynecol** 1989; 160:132-3.

Platz-Christensen JJ, Sundström E, Larsson PG. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1994; 73:586-8.

Platz-Christensen JJ, Larsson PG, Sundström E, Wijkvist N. Detection of bacterial vaginosis in wet mount, Papanicolaou stained vaginal smears and in Gram stained smears. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1995; 74:67-70.

Riedner G, Rusizoka M, Hoffman O, Nichombe F, Lyamuya E, Mmbando D et al. Baseline survey of sexually transmitted infections in a cohort of female bar workers in Mbeya region, Tanzania. **Sex Transm Infect** 2003; 79:328-7.

Schanidg VJ, Davie KD, Shafer SK, Yandel RB, Islam MZ, Hannigan EV. The cytologist and bacteriologist of the vaginal ectocervical area; clues, commas and confusion. **Acta Cytologica** 1988, 33:287-97.

Shwebke JR, Hillier SL, Sobel JD, McGregor JA, Swer R. Validity of the vaginal gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. **Obstet Gynecol** 1996; 88:573-6.

Simões JA, Giraldo PC, Ribeiro-Filho AD e Faundes A. Prevalência e fatores de risco associados às infecções cérvico-vaginais durante a gestação. **Rev Bras Ginec Obstet** 1996; 18:459-67.

Simões JA, Hashemi FA, Aroutcheva AA, Heimler I, Spear GT, Shott S. et al. Human immunodeficiency virus type 1 stimulatory activity by *Gardnerella vaginalis*: relationship to biotypes and other pathogenic characteristics. **J Infect Dis** 2001; 184:22-7.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M. et al. The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002; 287:2114-9.

Spandorfer SD, Neuer A, Giraldo PC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. **J Reprod Med** 2001; 46:806-10.

Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis Bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. **J Clin Microbiol** 1983; 18:170-7.

Taha TE, Hoover DR, Dalabetta GA, Kumwenda NI, Mtimavalye LA, Yang LP, et al. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora with increased acquisition of HIV. **AIDS** 1998; 12:1699-706.

Thomason JL, Schreckenberger PC, Spellacy WN, Riff LJ, LeBeau LJ. Clinical and microbiological characterization of patients with nonspecific vaginosis associated with motile, curved anaerobic rods. **J Infect Dis** 1984; 149:801-9.

Totten PA, Amsel R, Hale J, Piot P, Holmes KK. Selective differential human bilayer media for isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. **J Clin Microbiol** 1982; 15:141-7.

Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-experienced young women entering the military. **Am J Obstet Gynecol** 2003; 102:927-33.

Watts H, Khrohn MA, Hiller SI, Eschenbach D. Bacterial vaginosis as a risk factor for post-cesarean endometritis. **Obstet Gynecol** 1990; 75:52-8.

6. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).