

## Inovações no diagnóstico laboratorial da Microbiota vaginal - dos *Lactobacillus* à Candidíase, - e a estreita relação com a Microbiota intestinal

A Microbiota é definida como uma comunidade ecológica de micro-organismos comensais, simbióticos e patogênicos que compartilham nosso corpo ou vivem em um nicho específico dele (LEDERBERG e McCRAY 2001, LIU, 2016). E a coleção de genomas que constituem esses micro-organismos é o que chamamos de microbioma (LIU, 2016).

A microbiota vaginal (VMB) normal é constituída predominantemente por *Lactobacillus*, embora existam outras bactérias, e alguns fungos como *Candida* spp. que vivem como comensais neste ambiente. Alterações dessa microbiota, também chamadas de disbiose ou disbiose, podem trazer condições sintomáticas ou não, embora patogênicas, chamadas de vaginose bacteriana (VB) e vaginites (HOLMES et al., 2008).

Entre os *Lactobacillus* predominantes na microbiota vaginal, podemos destacar *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, por vezes aparecem também *L. salivarius* e *L. vaginalis*, além dos *Lactobacillus* provenientes do trato gastrointestinal como o *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum*, uma vez que os *Lactobacillus* presentes na vagina derivam principalmente deste nicho anatômico, que funciona como reservatório desses micro-organismos (CASTRO et al., 2015).

A presença de *Lactobacillus*, sejam de origens naturais ou administrados (vias vaginal ou oral - os chamados PROBIÓTICOS), promove a manutenção de um pH inferior a 4,5, aumenta a produção de ácido láctico e de outras moléculas solúveis como: peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, biosurfactantes, moléculas de coagregação – que bloqueiam os receptores epiteliais para fungos (CASTRO et al., 2015) -, e citocinas como IL-8 e IL-10. Esse conjunto de fatores atuam de forma eficiente contra micro-organismos patogênicos e oportunistas quando presentes nesta microbiota, reduzindo as vaginites (como a candidíase) e as vaginoses (KANG et al., 2017; RUSSO, EDU E DE SETA, 2018). Em contrapartida, a redução dos *Lactobacillus* está diretamente relacionada ao aumento do risco de infecção por HIV, HPV e *Trichomonas vaginalis* (MITRA et al, 2016).

Além disso, estudos apontam que a microbiota vaginal com predomínio de *Lactobacillus crispatus* tem menor probabilidade de desenvolver vaginose bacteriana, enquanto o contrário ocorre na microbiota dominada por *L. iners* (JANNEKE et al., 2014, MITRA et al, 2016), o que justifica o conhecimento dessa microbiota residente, principalmente em pacientes que apresentem resultados recorrentes de vaginoses bacterianas (VB) e vaginites.

Neste sentido, o diagnóstico laboratorial atual abre novas possibilidades através da pesquisa de painéis moleculares específicos, que permitem identificar não só o microbioma vaginal, como também os outros agentes etiológicos das VB e vaginites recorrentes.

A vaginose bacteriana (VB) é caracterizada pela redução de *Lactobacillus* da microbiota vaginal e pelo supercrescimento de outras bactérias anaeróbias (facultativas), destacam-se: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, bactérias da família *Lachnospiraceae* chamadas BVAB1, 2 e 3 (*Clostridiales*), *Megasphaera tipo 1*, *Sneathia*, *Prevotella* e espécies de *Peptostreptococcus* (MITRA et al, 2016), além de *Bacteroides fragilis*, *Mobiluncus curtisii* e *Mobiluncus mulieris*.

A VB é considerada a doença mais comum nas mulheres em idade reprodutiva (PAZHOHIDEH et al., 2018), no Brasil a prevalência e os fatores associados são subestimados e alguns estudos apontam a associação da doença, com numerosas complicações ginecológicas, como infecção pós-operatória, doença inflamatória pélvica e aumento dos riscos de infecções sexualmente transmissíveis (DSTs), tais como as infecções por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e HIV. A prevalência americana de VB é estimada em 29,1 %, enquanto na região Sudeste do Brasil, que é a mais populosa, a prevalência encontrada foi 30,1 %, um valor representativo para o tamanho da população brasileira (MARCONI et al., 2015).

O diagnóstico das VB é baseado nos critérios de Amsel e no *Score* de Nugent, pois o diagnóstico laboratorial geralmente baseado em cultura de micro-organismos é moroso e nem sempre consegue isolar o agente patogênico (NUGENT, KROHN E HILLIER, 1991; JANNEKE et al., 2014). Como as VBs são inflamatórias e frequentemente assintomáticas, achados clínicos e citológicos auxiliam o clínico no diagnóstico, mas a disponibilidade de novos métodos diagnósticos como os painéis moleculares específicos para diagnóstico dos principais micro-organismos causadores de VB, trarão além de um diagnóstico preciso, avaliações epidemiológicas sobre os micro-organismos mais prevalentes em sua prática clínica como médico, além de um tratamento mais eficiente para o paciente com a identificação exata do agente patogênico

As Vaginites mais comuns são a tricomoníase (*Trichomonas vaginalis*) e a candidíase, ambas diagnosticadas laboratorialmente. A tricomoníase, Doença Sexualmente Transmissível (DST), é facilmente diagnosticada através da microscopia da urina, de cultura (menos frequente) e mais recentemente através de técnicas moleculares como

o PCR em tempo real (RT-PCR) (HOLMES et al., 2008; JANNEKE et al., 2014). Esta última permite a pesquisa em conjunto de vários micro-organismos, agentes causadores de DST, vaginites e vaginoses, como é o caso do **Painel molecular de cervicite/uretrite**, agora disponível para um diagnóstico com confiabilidade e especificidade na identificação destes micro-organismos.

A vulvovaginite por *Candida* spp, ou candidíase vulvovaginal (CVV), é uma infecção comum, que afeta mais frequentemente mulheres na fase reprodutiva, cujos sintomas, são caracterizados por dor, prurido e secreção vaginal espessa, por vezes aderida à superfície da mucosa (SOBEL, 2007).

A prevalência de CVV não é bem caracterizada na literatura, embora estudos estimem que 75 % das mulheres apresentam pelo menos um episódio de CVV durante a vida, e como os sintomas causam impacto sobre a qualidade de vidas destas mulheres (KANG et al., 2017), um diagnóstico adequado reflete sobre um tratamento eficiente, reduzindo as taxas de recorrência da candidíase, que variam entre 5 a 10 %, considerando como recorrência o aparecimento de quatro ou mais episódios por ano (ILKIT & GUZEL, 2011; LIU, 2014; AMOURI et al., 2011).

Para o diagnóstico laboratorial da candidíase, o padrão-ouro para a identificação do fungo ainda é a cultura associada a outras técnicas disponíveis para identificação da espécie (JANNEKE et al., 2014). Muitas destas metodologias, como as provas bioquímicas e os testes automatizados falham na identificação da espécie de *Candida*, o que incide em um diagnóstico errôneo, ou tratamento inadequado, gerando nova recorrência da candidíase.

Com o desenvolvimento da técnica de RT-PCR, vários estudos vem sendo publicados demonstrando sensibilidade > 90 % na identificação das espécies de *Candida*, quando comparada à cultura e aos métodos bioquímicos (AHMAD et al., 2012; NGUYEN et al., 2012; AVNI et al., 2011; TELLAPRAGADA et al., 2014). E estão

disponíveis hoje, a um bom custo-benefício painéis moleculares de Candidíase, com identificação de espécies de *Candida albicans* e não-*albicans*.

A maioria dos casos de CVV, cerca de 80 a 90 %, são causados pelas espécies de *Candida albicans* (SOBEL et al., 1998; SOBEL, 2007; LIU, 2014) embora alguns estudos tem demonstrado que as espécies não-*albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis*, são responsáveis por até 30 % dos episódios de CVV (CVV recorrentes) em determinadas regiões (KENEDY, 2010).

Por essa razão, a identificação precisa das espécies, é especialmente relevante nos casos mais graves de CVV e nos casos de candidíase vulvovaginal recorrente, pois muitas são resistentes aos derivados azólicos, amplamente utilizados para o tratamento (MENDLING, 2015; KENNEDY, 2010), como *Candida krusei* que é naturalmente resistente ao fluconazol (ARENDRUP E PATTERSON, 2017). Nesses casos, é necessário um maior conhecimento sobre os fatores determinantes para a recorrência, e sobre a prevalência das espécies de *Candida* envolvidas para ajustar um tratamento eficiente.

Por fim e não menos importante, sabe-se que a microbiota vaginal guarda estreita relação com a microbiota intestinal, que funciona como reservatório de *Lactobacillus* e de espécies de *Candida* spp. (CASTRO et al., 2015; KANG et al., 2017), razão pela qual é de fundamental importância conhecê-la. Além disso, a microbiota intestinal vem sendo recentemente alvo de muitos estudos científicos, e exerce uma influência crucial em várias funções fisiológicas, incluindo motilidade gastrointestinal, metabolismo, nutrição, imunidade e regulação do sistema neuroendócrino (FUKUI, XU E MIWA, 2018), que estão diretamente relacionadas à manutenção do equilíbrio e da saúde. E os avanços das técnicas moleculares e de sequenciamento gênico, nos permite identificar a presença qualitativa e quantitativa de disbiose intestinal, e seus desdobramentos sobre a manutenção da condição salutógena do indivíduo.

Painel Molecular	Exame	Material	Indicações
<b>Painel Molecular de <i>Candida</i></b>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	Vaginites como a candidíase
<b>Painel Molecular completo de <i>Candida</i></b>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. dublinensis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> .	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	Vaginites como a candidíase
<b>Perfil de vaginose e microbioma vaginal</b>	<i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , BVAB2 ( <i>Clostridiales</i> ) e <i>Megasphaera</i> tipo 1	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	Vaginose Acompanhamento tratamento com probióticos
<b>Painel de <i>Chlamydia</i> e <i>Neisseria</i></b>	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	DST
<b>Painel molecular de cervicite/uretrite</b>	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>U. parvum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>T. vaginalis</i>	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	DST, Vaginose e vaginites
<b>Painel molecular de cervicite/uretrite anaeróbios</b>	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Mobiluncus curtisii</i> , <i>Mobiluncus mulieris</i> , <i>Atopobium vaginae</i>	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	Vaginose
<b>Painel molecular de cervicite/uretrite bacteriano</b>	<i>Treponema pallidum</i> , <i>Haemophilus ducreyi</i> , LGV ( <i>linfogranuloma venéreo</i> ), GBS ( <i>Streptococcus</i> do grupo B)	2 Swabs secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	Vaginose e vaginites

Painel Molecular	Exame	Material	Indicações
<b>Painel molecular de cervicite/ uretrite com pesquisa de vírus</b>	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>U. parvum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>M.hominis</i> , <i>T. vaginalis</i> , Vírus Herpes simplex I, Vírus herpes simplex II, e Papilomavírus Vírus - de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68, - de provável alto risco: 26, 53, 73 e 82 - de baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 85 e 89	2 <i>Swabs</i> secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	DST, Vaginoses e vaginites
<b>Painel molecular completo de cervicite/uretrite (bactérias, fungos e vírus)</b>	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>U. parvum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>M.hominis</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Haemophilus ducrey</i> , <i>T. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. dublinensis</i> , <i>C. guilliermondi</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i> , Vírus Herpes simplex I, Vírus Herpes simplex II, Citomegalovírus	2 <i>Swabs</i> secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	DST, Vaginoses e vaginites Candidíase
<b>Painel molecular completo de cervicite/uretrite com HPV de alto risco (bactérias, fungos e vírus, incluindo HPV)</b>	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>U. parvum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>M.hominis</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Haemophilus ducrey</i> , <i>T. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. dublinensis</i> , <i>C. guilliermondi</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i> , Vírus Herpes simplex I, Vírus Herpes simplex II, Citomegalovírus e Papilomavírus - de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68, - de provável alto risco: 26, 53, 73 e 82 - de baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 85 e 89	2 <i>Swabs</i> secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	DST, Vaginoses e vaginites Candidíase
<b>Pesquisa de HPV de alto risco</b>	com discriminação dos subtipos de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68,	2 <i>Swabs</i> secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	HPV
<b>Pesquisa de HPV de alto e baixo risco</b>	Papilomavírus com discriminação dos subtipos - de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68, - de provável alto risco: 26, 53, 73 e 82 - de baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 85 e 89	2 <i>Swabs</i> secos de Exsudados vaginal, uretral, endocolo endocervical, etc	HPV
<b>Microbioma intestinal, estudo inicial do balanço intestinal</b>	Pesquisa e quantificação por RT-PCR de Bacteróides, <i>Firmicutes</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> e <i>Akkermansia muciniphila</i> .	Fezes (amostra tamanho de noz) em frasco sem conservante. Estável 5 dias Refrigerado	Ver indicação Mapa completo de disbiose
<b>Microbioma intestinal, mapa completo de disbiose</b>	<p>Pesquisa qualitativa por Sequenciamento molecular de todas as bactérias representativas do microbioma intestinal agrupadas por:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Bactérias em geral</b> (<i>Bifidobacterium spp</i>, <i>Alistipes</i>, <i>Bacterioides fragilis</i>, <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>, <i>Lactobacillus spp.</i>, <i>Ruminococcus gnavus</i>, <i>Streptococcus salivaris spp.</i>, <i>S. thermophilus</i> e <i>S. Sanguinis</i>, <i>Proteobacteria</i>, <i>Shigella spp.</i>, <i>Escherichia spp.</i>, <i>Akkermansia muciniphila</i>).</li> <li>- <b>Actinobactéria</b> (<i>Actinobacteria</i>, <i>Actinomycetales</i> e <i>Bifidobacterium spp.</i>)</li> <li>- <b>Bacteriódetes</b> (<i>Alistipes</i>, <i>Alistipes onderdonki</i>, <i>Bacterioides fragilis</i>, <i>Bacterioides spp.</i>, <i>Prevotella spp.</i>, <i>Bacterioides stercoralis</i>, <i>Bacterioides zoogloeiformans</i>, <i>Parabacterioides johnsonii</i> e <i>Parabacterioides spp.</i>)</li> <li>- <b>Firmicutes</b> (<i>Firmicutes</i>, <i>Bacilli</i>, <i>Catenibacterium mitsuokai</i>, <i>Clostridia</i>, <i>Clostridium spp.</i>, <i>Dialister invisus</i>, <i>Dialister invisus</i> e <i>Megasphera micronuciformis</i>, <i>Dorea spp.</i>, <i>Eubacterium bifforme</i>)</li> <li>- <b>Proteobactéria</b> (<i>Proteobacteria</i>, <i>Shigella spp.</i>)</li> <li>- <b>Tenericute</b> (<i>Mycoplasma hominis</i>)</li> <li>- <b>Verrucomicrobia</b> (<i>Akkermansia muciniphila</i>)</li> </ul> <p>Todas as análises com mapa comparativo em relação ao microbiota saudável e Índice de disbiose</p>	<p>Fezes (amostra tamanho de noz) em frasco sem conservante. Estável 5 dias refrigerado</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Avaliação após tratamento da disbiose com dieta, complexos homeopáticos, probióticos e organoterápicos</li> <li>- Nutrição insuficiente, com consumo excessivo de alimentos processados em detrimento dos alimentos crus</li> <li>- Avaliação do estado nutricional do paciente*</li> <li>- Envelhecimento</li> <li>- Avaliação do estado imunitário do hospedeiro</li> <li>- Uso indiscriminado de antibióticos e anti-inflamatórios</li> <li>- Uso crônico de inibidores da bomba de prótons – alteram o pH do estômago o qual tem que ser ácido. Ex.: omeprazol</li> <li>- Alergias alimentares</li> <li>- Uso prolongado de laxantes</li> <li>- Doenças consumptivas (câncer e AIDS)</li> <li>- Disfunções hepatopancreáticas (Diabetes)</li> <li>- Doenças gastrointestinais e associações, incluindo alguma doenças autoimunes**</li> <li>- Estresse</li> <li>- Avaliação candidíase e vaginoses graves e crônicas, infecções urinárias recorrentes</li> <li>- Avaliação de hipovitaminose B***</li> <li>- depressão, ansiedade, síndrome do Pânico e outros transtornos psíquicos tendo em vista que 90% da serotonina e 50% da dopamina do organismo são produzidas pelo intestino e se comunica com o cérebro pelo sistema nervoso entérico.</li> </ul>

\* Uso de açúcares em excesso como a frutose, principalmente a industrializada na forma *High Fructose Corn Syrup* (HFCS) e de farinha de trigo em excesso; uso excessivo de adoçantes artificiais como sucralose, sacarina e acessulfame; outros fatores alimentares, como dieta com excesso de proteína, gordura ou carboidrato (uma grande ingestão de carboidrato leva a maior fermentação pelas bactérias no intestino grosso), ou com baixo teor de fibras ou ainda carência de vitaminas.

\*\* Intolerância a Lactose, Dispepsia, Doença Inflamatória Intestinal, Síndrome do Intestino Irritável, Doença de Crohn, Colite Ulcerativa, Doença Celíaca, Intolerância ao Glúten, entre outras doenças autoimunes e que desencadeiam *leaky gut* (quando as junções compactas (ou ocludentes) que protegem a mucosa intestinal são danificadas, e permitem que bactérias, toxinas, alérgenos e agentes cancerígenos passem pelas junções danificadas, desencadeando doenças autoimunes).

\*\*\* A disbiose inibe a formação de vitaminas produzidas no intestino, como a B12 e permite o crescimento de fungos e bactérias capazes de afetar o funcionamento do organismo, alterando a microbiota intestinal.

## Referências

- AHMAD, S., KHAN, Z., ASADZADEH, M., THEYYATHEL, A., CHANDY, R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infectious Diseases*. 25:12:230, 2012.
- AMOURI I., SELLAMI H., ABBES S., HADRICH I., MAHFOUDH N., MAKNI H., AYADI A. Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal of Meical Microbiology*. v.61 n.8, p.1091-1096, 2011.
- ARENDROP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. S3, p. S445-S451, 2017.
- AVNI, T.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiolog*, v.49, n.2,p.665-670, 2011.
- CASTRO A., GONZÁLEZ M., TARÍN J J., Cano A. Papel de los probióticos en *Obstetricia y Ginecología Nutr Hosp.*, v.31 (Supl. 1), p. 26-30, 2015.
- FUKUI H., XU X., MIWA H. Role of Gut Microbiota-Gut Hormone Axis in the Pathophysiology of Functional Gastrointestinal Disorders. *J Neurogastroenterol Motil.*, v. 30, 24(3), p. 367-386, 2018. doi: 10.5056/jnm18071.
- HOLMES KK, SPARLING PF, STAMM WE, PIOT P, WASSERHEIT JN, et al. (2008) *Sexually Transmitted Diseases*. 4th edn New York: McGraw-Hill Medical.
- ILKIT, M.; GUZEL, A.B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 37, n.3, p.250-261, 2011.
- JANNEKE H.H.M., WIJGERTI VAN DE, BORGDORFF H., VERHELST R., CRUCITI T., FRANCIS S., VERSTRAELEN H., JESPER S. The Vaginal Microbiota: What Have We Learned after a Decade of Molecular Characterization? *PLOS ONE*, v. 9 (8), e105998, 2014.
- KANG C-H., HAN S.H., KIM Y.G., PAK N-S., SO J-S. In Vitro Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* MG242 Isolated from Human Vagina. *Probiotics & Antimicro. Prot.* DOI 10.1007/s12602-017-9323-5, 2017
- KENNEDY, M.A., SOBEL, J.D. Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans *Candida* Species: New Insights. *Current Infectious Diseases Report.*, v.12, n.6, p.465-470, 2010.
- LEDERBERG J., MCCRAY A.T. Ome Sweet Omics - a genealogical treasury of words. *Scientist*, v. 15 (8), 2001.
- LIU XP, FAN SR, PENG YT, ZHANG HP. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. *Journal de Mycologie Medicale.*, v.24, n.2, p.106-111, 2014.
- MARCONI C., DUARTE M.T.C., SILVA D.C., SILVA M.G. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.*, v. 131, p. 137-141, 2015.
- MENDLING W<sup>1</sup>, BRASCH J, CORNELI OA, EFFENDY I, FRIESE K, GINTER-HANSELMAYER G, HOF H, MAYSER P, MYLONAS I, RUHNKE M, SCHALLER M, WEISSENBACHER ER. Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). *Mycoses.*, v.58, n.1, p.1-15, 2015.
- MITRA A., MACINTYRE D.A., MARCHESI J.R., LEE Y.S., BENNETT P.R., KYRGIU M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome*, v. 4 (58), 2016 DOI 10.1186/s40168-016-0203-0
- NGUYEN, M.H., WISSEL, M.C., SHIELDS, R.K., SALOMONI, M.A., HAO, B., PRESS, E.G., SHIELDS, R.M., CHENG, S., MITSANI, D., VADNERKAR, A., SILVEIRA, F.P., KLEI-BOEKER, S.B., CLANCY, C.J. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction,  $\beta$ -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clinical Infectious Diseases.*, v.54, n.9, p.1240-1248, 2012.
- NUGENT RP, KROHN MA, HILLIER SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.*, v. 29, p. 297-301, 1991.
- PAZHOHIDEH Z., MOHAMMADI S, BAHRAMI N., MOJAB F, ABEDI P, MARAGH E. The effect of *Calendula officinalis* versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A double-blind randomized controlled trial. *J Adv Pharm Technol Res.*, v. 9, p. 15-19, 2018. doi: 10.4103/japtr.JAPTR\_305\_17
- RUSSO R., EDU A., DE SETA F. Study on the effects of an oral lactobacilli and lactoferrin complex in women with intermediate vaginal microbiota. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2018, <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4771-z>
- SOBEL, J.D., FARO, S., FORCE, R.W., FOXMAN, B., LEDGER, W.J., NYIRJESY, P.R., REED, B.D., SUMMERS, P.R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v.178, n.2, p.203-211, 1998.
- SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, v. 9, n.369, p. 1961-1971, 2007.
- TELLAPRAGADA, C., ESHWARA, V.K., JOHAR, R., SHAW, T., MALIK, N., BHAT, P.V., KAMATH, A., MUKHOPADHYAY, C. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. *Journal of Pathogens*. 2014:142864, 2014.
- LIU X. Microbiome. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 89, pp.275-276, 2016.

