



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Prevalência de infecção genital em mulheres com
diagnóstico de infertilidade no CHCB
Qual o agente mais comum?**

Juliana de Sá Castelo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Martinez de Oliveira
Co-orientador: Dr. Danilo Koga Morimoto

Covilhã, Maio de 2012

Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB: |
Qual o agente mais comum? |

Dedicatória

Ao valor inefável e vital de ter e ser Família.

Agradecimentos

Ao Dr. Danilo Morimoto pela orientação contínua do longo percurso de construção do conhecimento, pela celeridade e prontidão na resposta a todas as minhas dúvidas, pela insistência no rigor e pela motivação.

Ao Professor Martinez pela disponibilidade para orientação e por me permitir a oportunidade de realizar este estudo numa área que me apaixona e para a qual pretendo contribuir: a saúde da mulher.

Aos meus pais e família, pelo espírito descontraído e total confiança na minha capacidade de trabalho.

Ao Diogo Chiote pelo carinho e compreensão, e pelas “injecções” de optimismo e motivação. Aos meus amigos queridos pelo ombro sempre pronto para o desabafo e pela amizade desinteressada.

À Dr^a Conceição e técnicos do Laboratório do CHCB pelos constantes esclarecimentos técnicos sempre fornecidos com simpatia e disponibilidade.

À Dr^a Rosa Saraiva pelos conselhos acerca da melhor orientação para construção de uma tese e pela pesquisa de artigos científicos que me seriam de outro modo inacessíveis e que foram essenciais à elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Miguel Freitas pela total disponibilidade e exaustão no esclarecimento de noções estatísticas muito úteis ao planeamento de recolha e processamento de dados.

Resumo

Na área da reprodução, a importância das infecções genitais surge pela sua influência evitável no desenvolvimento de infertilidade. Infecções genitais têm potencial para alterar a cérvix e o muco cervical dificultando a passagem dos espermatozoides, e para causar doença inflamatória pélvica e consequente oclusão tubária, sendo esta um dos principais factores de infertilidade. A eficácia de técnicas de Procriação Medicamente Assistida é alterada na presença de infecções genitais. Adicionalmente, a sua propagação ascendente para o útero gravídico provoca infecção e inflamação da decídua e dos anexos embrionários sendo a causa de abortos espontâneos recorrentes. O maior foco de interesse científico incide sobre infecções de etiologia sexualmente transmissível (como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*) e as espécies *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. Bactérias associadas a Vaginose Bacteriana, *Streptococcus agalactiae*, e espécies *Candida* foram também identificadas em mulheres com infertilidade.

Este estudo retrospectivo visa calcular a prevalência de agentes infecciosos genitais em mulheres com tempo de infertilidade igual ou superior a doze meses (n=190) seguidas na Unidade de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar Cova da Beira, no período de Agosto de 2009 a Agosto de 2011. Como rotina da Unidade, realizou-se a colheita de amostras vaginais e endocervicais para pesquisar *Trichomonas vaginalis*, espécies *Ureaplasma* e *Mycoplasma hominis* via teste “MycoView”®, *Chlamydia trachomatis* via teste “QuickVue”®, e outras espécies via cultura em meios específicos.

Das mulheres estudadas, 42,63% apresentam infecção genital. O agente mais prevalente é o *Ureaplasma urealyticum*, numa percentagem (29,47%) superior à detectada noutros estudos. *Candida spp.* foi o segundo agente com maior prevalência(15,26%), e a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* foi positiva em apenas uma mulher. Nenhuma das mulheres estudadas apresentava infecção por *Neisseria gonorrhoeae* nem *Trichomonas vaginalis*.

É recomendável a aplicação dos métodos mais sensíveis e específicos disponíveis para rastreio de infecções genitais, promovendo uma prevenção eficaz de problemas de subfertilidade e de complicações após procedimentos invasivos e contribuindo para o sucesso da actuação da Unidade de Medicina da Reprodução.

Palavras-chave

Infecções Genitais, Infertilidade, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*.

Abstract

In the reproduction area, the importance of genital infections emerges by their avoidable influence in the development of infertility. Genital infections have the potential to modify cervix and cervical mucus obstructing the passage of sperm, and to cause a pelvic inflammatory disease and subsequent tubal occlusion, being this one of the main factors of infertility. The effectiveness of techniques of Medically Assisted Procreation is altered in the presence of genital infections. In addition, his ascending spreading to the pregnant uterus causes infection and inflammation of the deciduous membrane and embryonic annexes being the cause of recurrent miscarriages. The major focus of scientific interest relates on infections of sexually transmitted etiology (like *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*) and *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* species. Bacteria associated to Bacterial Vaginosis, *Streptococcus agalactiae*, and *Candida* spp. were also identified in women with infertility problems.

This retrospective study aims to estimate the prevalence of genital infectious agents in women with a infertility period equal or more than twelve months (n=190) observed in the Reproductive Medicine Unit of the Centro Hospitalar Cova da Beira, since August 2009 to August 2011. As routine of Unit, was performed vaginal and endocervical sampling to search *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma* and *Mycoplasma hominis* species using “MycoView”® test, *Chlamydia trachomatis* testing via “QuickVue”® and other species from culture in specific environment.

Of the studied women, 42,63% have genital infection, being the most prevalent agent the *Ureaplasma urealyticum*, in a percentage (29,47%) higher than that found in others studies. *Candida* spp. was the second most frequent agent (15,26%) and *Chlamydia trachomatis* was positive in only one woman. None of the women studied were infected with *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*.

It is recommended the application of the most sensitive and specific screening methods available, promoting an effective prevention of subfertility problems and complications after invasive procedures and contributing to a successful performance of the Reproductive Medicine Unit.

Keywords

Genital infections, Infertility, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*

Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB: |
Qual o agente mais comum? |

Índice

1 Introdução	1
2 Material e Métodos	3
2.1 População/Amostra	3
2.2 Colheita e transporte de amostras	3
2.3 Diagnóstico Laboratorial	4
2.4 Análise Estatística	6
3 Resultados	7
3.1 Caracterização da amostra	7
3.2 Frequência de agentes infecciosos	9
3.3 Análise de relação entre infecção genital e outras variáveis da amostra	11
4 Discussão	14
4.1 Conclusão e Perspectivas futuras	22
Referências Bibliográficas	23
Anexos	27
Anexo I - Tratamento de Infecções Genitais	27
Anexo II - Autorização para a realização do estudo	29

Lista de Figuras

Figura 1 - Histograma da distribuição de idade da amostra	8
Figura 2 - Caracterização Antropométrica da amostra	8
Figura 3 - Histograma da distribuição de tempo de infertilidade da amostra	9
Figura 4 - Agentes infecciosos identificados na amostra	10
Figura 5 - Agentes infecciosos identificados no total de infecções	11
Figura 6 - Teste de Mann-Whitney para estudo de relação entre infecção e idade (variável com distribuição não normal) em mulheres com infertilidade	12
Figura 7 - Teste de Mann-Whitney para estudo de relação entre infecção e tempo de infertilidade (variável com distribuição não normal)	13

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização da amostra	7
Tabela 2 - Frequência de Infecção Genital na amostra	9
Tabela 3 - Agentes infecciosos identificados no total de infecções	10
Tabela 4 - Análise de relação entre infecção genital e idade na amostra de mulheres com infertilidade	11
Tabela 5 - Teste Kolmogorov-Smirnov para estudo da normalidade da distribuição da variável idade	12
Tabela 6 - Análise de relação entre infecção genital e tempo de infertilidade na amostra de mulheres com infertilidade	12
Tabela 7 - Teste Kolmogorov-Smirnov para estudo da normalidade da distribuição da variável tempo de infertilidade	13
Tabela 8 - Mucinas produzidas por microorganismos no tracto genital	15

Lista de Acrónimos

<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CHCB,E.P.E.	Centro Hospitalar Cova da Beira
CHSP60	Chlamydial heat shock protein 60
CO2	Dióxido de Carbono
<i>C.trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIV	Fertilização in vitro
IC	Intervalo de Confiança
ICSI	Microinjecção Intracitoplasmática de espermatozóides
IFT	Infertilidade por Factor Tubário
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IMC	Índice de Massa Corporal
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
<i>M.hominis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
NAAT	Testes de amplificação de ácidos nucleicos
<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
PCR	Reacção de Cadeia de Polimerase
PMA	Procriação Medicamente Assistida
<i>S.agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
spp.	Espécies
TGS	Tracto Genital Superior
<i>T.vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UMR	Unidade de Medicina da Reprodução
<i>U.urealyticum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
VB	Vaginose Bacteriana

Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB: |
Qual o agente mais comum? |

1 Introdução

Há anos que a ciência procura compreender e superar obstáculos que prejudiquem a fertilidade, atendendo o direito e desejo humanos de atingir as potencialidades da sua saúde reprodutiva. Neste contexto, é importante clarificar o conceito de infertilidade como a incapacidade de obter uma gravidez após um período igual ou superior a doze meses de actividade sexual regular, sem recurso a métodos contraceptivos, e devido a uma patologia do sistema reprodutivo⁽¹⁾. Estima-se que 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva se enquadrem nesta definição^(2,3). Em Portugal, a prevalência de infertilidade segue o padrão mundial e situa-se entre os 9 e os 10%⁽⁴⁾. Um estudo do Centro de Estudos Sociais da Universidade da Beira Interior estimou em 2006 que 1311 (38,9%) mulheres residentes nos distritos da Guarda e Castelo Branco e com idade entre os 30 e os 39 anos apresentavam potenciais problemas de infertilidade⁽⁵⁾.

A relação entre infecção genital subclínica e o comprometimento da fertilidade feminina tem recebido enfoque científico desde que foi estabelecida uma linha causal entre sequelas irreversíveis de infecções genitais e infertilidade⁽²⁾. Qualquer infecção no tracto genital feminino tem potencial para provocar alterações que interferem no ambiente vaginal e na ascensão espermática, prejudicam a integridade anatómica e funcional das tubas uterinas e impedem a nidação embrionária por inflamação endometrial, criando obstáculos à fecundação e à subsistência de uma gravidez. As infecções genitais diagnosticadas em mulheres inférteis resultam de agentes inoculados sexualmente ou de microorganismos originalmente comensais que adquirem patogenicidade. O maior foco de interesse incide sobre os principais agentes de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), as bactérias *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*) e *Neisseria gonorrhoeae* (*N.gonorrhoeae*), que têm efeitos comprovados na fertilidade em ambos os sexos^(6,7). Na ausência de tratamentos, evoluem em 10-40% dos casos para uma doença inflamatória pélvica (DIP)⁽⁸⁾, documentada como a principal causa de Infertilidade por Factor Tubário (IFT)⁽⁹⁾ e a mais importante causa prevenível de infertilidade⁽⁶⁾.

O papel de *Mycoplasma hominis* (*M.hominis*) e *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyticum*) tem ganho relevo e vários estudos demonstraram percentagens significativas de *Mycoplasma spp.* (6%) e *U.urealyticum* (20 a 30%) em culturas cervicais de mulheres inférteis^(10,11,12). Estas espécies são comensais do tracto genital humano mas podem contribuir para a infertilidade feminina no cenário de uma vaginose bacteriana ou por ascensão ao tracto genital superior (TGS) estéril, ao potenciar alterações tubárias e cervicais que impedem o trajecto espermático e a fecundação⁽¹³⁾.

Não está esclarecido se o tratamento de infecções favorece a fertilidade⁽¹⁴⁾. No entanto, o seu rastreio e tratamento são importantes dada a potencial interferência na eficácia de técnicas invasivas de diagnóstico de infertilidade e de Procriação Medicamente Assistida (PMA), por contaminação dos meios de cultivo, impedindo a fertilização in útero, nidação e o desenvolvimento embrionário (induzindo aborto espontâneo), e pelo risco de DIP por inoculação de microorganismos na cavidade uterina no momento da transferência embrionária⁽¹⁵⁾.

Esta tese visa verificar a epidemiologia de infecções genitais num grupo de mulheres com infertilidade, pretendendo-se responder às questões:

- i) Qual a prevalência de infecções genitais (por *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, *Candida* spp., *Mycoplasma* spp., agentes de Vaginose bacteriana (VB), *Streptococcus agalactiae* (*S.agalactiae*), *Trichomonas vaginalis* (*T.vaginalis*)), na amostra em estudo?
- ii) Qual o agente infeccioso mais comum?
- iii) Qual a necessidade de novos métodos de diagnóstico de infecções genitais no protocolo de estudo inicial de infertilidade?

2 Material e Métodos

2.1 POPULAÇÃO/AMOSTRA

Após autorização do Departamento de Saúde da Criança e da Mulher e do Núcleo de Investigação do Centro Hospitalar Cova da Beira, e sob compromisso de estrita confidencialidade, foi realizado um estudo epidemiológico descritivo e retrospectivo em mulheres que recorreram à Unidade de Medicina da Reprodução (UMR) do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB,E.P.E.) para avaliação inicial de infertilidade.

Foram incluídas no estudo as utentes do sexo feminino com pelo menos um ano de tentativa de concepção e que realizaram estudo microbiológico no período de 1 de Agosto de 2009 a 31 de Agosto de 2011. Convencionaram-se como critérios de exclusão a gravidez espontânea antes da colheita microbiológica e incompatibilidade serológica do casal. Assim, 190 utentes apresentaram critérios elegíveis e recolheram-se os dados da pesquisa laboratorial de Vaginose bacteriana e dos microorganismos *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, espécies *Candida*, *U.urealyticum*, *M.hominis*, *S.agalactiae* e *T.vaginalis*. Todas as mulheres diagnosticadas com infecção genital realizaram tratamento específico adequado (Anexo I).

2.2 COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

A colheita foi efectivada na segunda consulta de avaliação, conforme protocolo da UMR. Com a utente em posição ginecológica e após colocação de espéculo vaginal, colheram-se amostras de exsudado das paredes vaginais com duas zaragatoas de dacron. Efectuaram-se esfregaços em lâminas para exame directo Gram. Uma segunda zaragatoa foi colocada imediatamente em meio de carvão ou meio Stuart. O meio Stuart é um meio de transporte que mantém a viabilidade das bactérias sem permitir a sua multiplicação. Deve ser mantido à temperatura ambiente até à transferência para os meios selectivos adequados.

Após a remoção de excesso de muco no exocérvix, uma zaragatoa foi introduzida e girada firmemente durante 15 a 20 segundos no canal endocervical, adiante da junção escamocolunar, permitindo a colheita de células epiteliais ou cubóides, o principal depósito de *Chlamydia spp.*. A zaragatoa foi removida evitando o contacto com a mucosa vaginal, e introduzida no tubo de transporte fornecido pelo teste “QuickVue”®. Fez-se nova colheita de amostras de raspado endocervical com zaragatoa que foi armazenada no meio de transporte T-Broth. Este meio contém reagente líquido para o transporte de *Mycoplasmas* urogenitais e pode ser mantido à temperatura ambiente durante seis horas.

O processamento das amostras foi realizado de imediato.

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Teste QuickVue® - Pesquisa de *C.trachomatis*

A zaragatoa com a amostra foi introduzida num tubo contendo cinco gotas de hidróxido de sódio 0,2N. Após 2 minutos, o reagente de neutralização (Ácido Clorídrico 0,1N) foi adicionado ao tubo e três gotas da amostra foram adicionadas ao receptáculo do cassete para teste. Os cassetes possuem duas linhas, uma linha de teste com anticorpos monoclonais murídeos para *Chlamydia spp.*, e uma linha com anticorpo de controlo leporino. Ao fim de dez minutos a presença de antígenos desta bactéria na amostra foi indicada pelo surgimento de uma linha de teste de tom vermelho, juntamente com uma linha azul de controlo do procedimento. O surgimento apenas da linha de controlo foi considerado como ausência ou baixa concentração de antígenos.

Teste MycoView® - Pesquisa de *M.hominis* e *U.urealyticum*

Hidratou-se o meio de cultura específico do teste (meio liofilizado com extractos de leveduras, cisteína, ureia e arginina, soro de cavalo e mistura selectiva de antibióticos) com a totalidade do meio de transporte contendo a amostra endocervical. Quando totalmente hidratado, este meio adquiriu coloração amarela-laranja correspondendo a pH de 6,6. Pipetaram-se 100µl do meio hidratado para os 12 poços da tira de teste, colocou-se óleo de parafina em cada um e incubou-se a 37°C. Após 24 horas, os resultados foram lidos pela alteração de cor nos diferentes poços: o crescimento de *Mycoplasmas* urogenitais foi indicado pela alteração da cor do meio para vermelho ou rosado (pH alcalino).

Uma titulação mínima de 10000 Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por mililitro é indicadora de patogenicidade. A presença de *U.urealyticum* e *M.hominis* em concentrações patogénicas altera a cor dos poços número 2 e 4, e 3 e 5, respectivamente, e o teste é considerado positivo.

Pesquisa de outros agentes bacterianos

O exame directo de esfregaço vaginal corado pela técnica de Gram identifica bactérias Gram positivas, como *Lactobacillus spp.* e *S.agalactiae*, que coram de roxo escuro, e Gram negativas, como diplococos *N.gonorrhoeae*, que adquirem coloração vermelha.

O meio Gelose Sangue® é preparado com sangue de carneiro e contém eritrócitos com a membrana conservada. Após incubação a 35°C em atmosfera enriquecida com CO₂ durante 24 a 48 horas, a presença de halo transparente em redor das colónias semeadas traduz lise total dos eritrócitos e identifica colónias de bactérias β-hemolíticas como *S.agalactiae*. A presença

de halo esverdeado traduz lise parcial dos eritrócitos por α -hemólise, e a ausência de halo revela ausência de hemólise.

A identificação de *Streptococcus agalactiae* ocorreu por visualização de Cocos Gram positivos de cadeia curta no exame directo e pela presença de actividade β -hemolítica na cultura Gelose Sangue®. O diagnóstico definitivo foi concluído por identificação bioquímica (Vitex2Compact YST®) em colónias suspeitas.

A visualização de cocobacilos Gram negativos, a ausência de Bacilos Döderlein e a identificação de “Clue cells” (células epiteliais rodeadas por bactérias Gram negativas variáveis) no exame directo Gram com microscopia óptica (amplificação 40x) estabeleceram um padrão sugestivo de **Vaginose bacteriana**.

O meio Gelose Chocolate VCAT® contém Vancomicina e Colistina, inibidores de bactérias Gram positivas e negativas, respectivamente, o antifúngico Anfotericina, e Trimetropim que inibe o crescimento de *Proteus*, permitindo o isolamento selectivo de *Neisseria* spp. Realizou-se cultura de exsudado vaginal neste meio, com incubação a 35° durante 48 horas em atmosfera enriquecida com 5 a 10 % de CO₂. No exame directo-Gram das colónias consideradas suspeitas a observação de diplococos Gram negativos no citoplasma de células polimorfonucleares é sugestiva de *Neisseria gonorrhoeae*. O teste da oxidase é também rotineiramente realizado, sobre tira de papel, nas colónias suspeitas. As colónias com *N.gonorrhoeae* (bactéria oxidase positiva) adquirem cor azul-rosado. A identificação confirmatória da espécie foi feita com testes bioquímicos (Vitex2Compact YST®).

Exame micológico

Realizou-se cultura de exsudado vaginal em meio cromogénico selectivo Gelose candida® incubado a 30°C durante 24 a 48 horas. A visualização de colónias azuis de leveduras em forma de tubo germinativo identifica *Candida albicans* (*C.albicans*). Colónias de *Candida tropicalis* e *Candida israeli* adquirem cor rosada. Testes bioquímicos (Vitex2Compact YST®) permitem a diferenciação de outras espécies de *Candida* spp.

Exame parasitológico

Um esfregaço de exsudado vaginal foi submetido de imediato a exame microscópico directo citológico (ampliação 40x) para pesquisa de *T.vaginalis*. A visualização de trofozoítos móveis com flagelos e membrana ondulada curta num polo, e um axóstilo que se estende através do centro do parasita identificou *T.vaginalis*.

2.4 Análise Estatística

A análise de dados de frequência e descritivos foi feita com suporte de programas informáticos Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS Statistics 20. Associações entre a presença de infecções genitais, idade feminina e tempo de infertilidade foram examinadas via teste não paramétrico de Mann-Whitney para variáveis independentes com distribuição anormal.

3 Resultados

3.1 Caracterização da amostra

Tabela 1- Caracterização da amostra

n = 190 CASOS	Caracterização
<ul style="list-style-type: none"> Idade Feminina (anos) Média ± Desvio padrão Máximo Mínimo 	<p>32,5±4,6 44 17</p>
<ul style="list-style-type: none"> Caracterização Antropométrica (IMC-kg/m²) Média ± Desvio padrão Máximo Mínimo 	<p>23,7±4,2 44,75 16</p>
<ul style="list-style-type: none"> Tempo de Tentativa de concepção (anos) Média ± Desvio padrão Máximo Mínimo 	<p>3,4±2,8 21 1</p>
<ul style="list-style-type: none"> Tipo de Infertilidade (n) Primária Secundária 	<p>145 (76,32%) 45 (23,68%)</p>
<ul style="list-style-type: none"> Factores de Infertilidade (n) Feminino Masculino Misto (factor feminino e masculino) Infertilidade sem causa aparente Abortos de repetição Em investigação 	<p>54(28,42%) 41(21,58%) 42(22,10%) 17(8,95%) 3(1,58%) 33(17,37%)</p>
<ul style="list-style-type: none"> Evolução (n) Gravidez Aborto Desistência Alta Em acompanhamento 	<p>52 12 5 6 115</p>

O recurso à UMR da amostra é, em média, precoce (aproximadamente após 3 anos de infertilidade) mas é feito em idade mais tardia da vida da mulher (média de idade 32,5 ± 4,6 anos) (Tabela1, Figura1 e 3). A maioria das mulheres estudadas não apresenta antecedentes obstétricos (infertilidade primária), e três têm história de abortos de repetição.

O estudo de factores etiológicos de infertilidade, segundo rotina da UMR, verificou uma predominância de factores femininos incluindo alterações tubárias, uterinas e ovulatórias/endócrinas. Apesar de a investigação estar em curso em cerca de 17% dos casais, em 8,9% não foi possível demonstrar uma causa específica de infertilidade após uma investigação completa.

Durante o período analisado registaram-se 52 gravidezes e 12 abortos (Tabela 1).

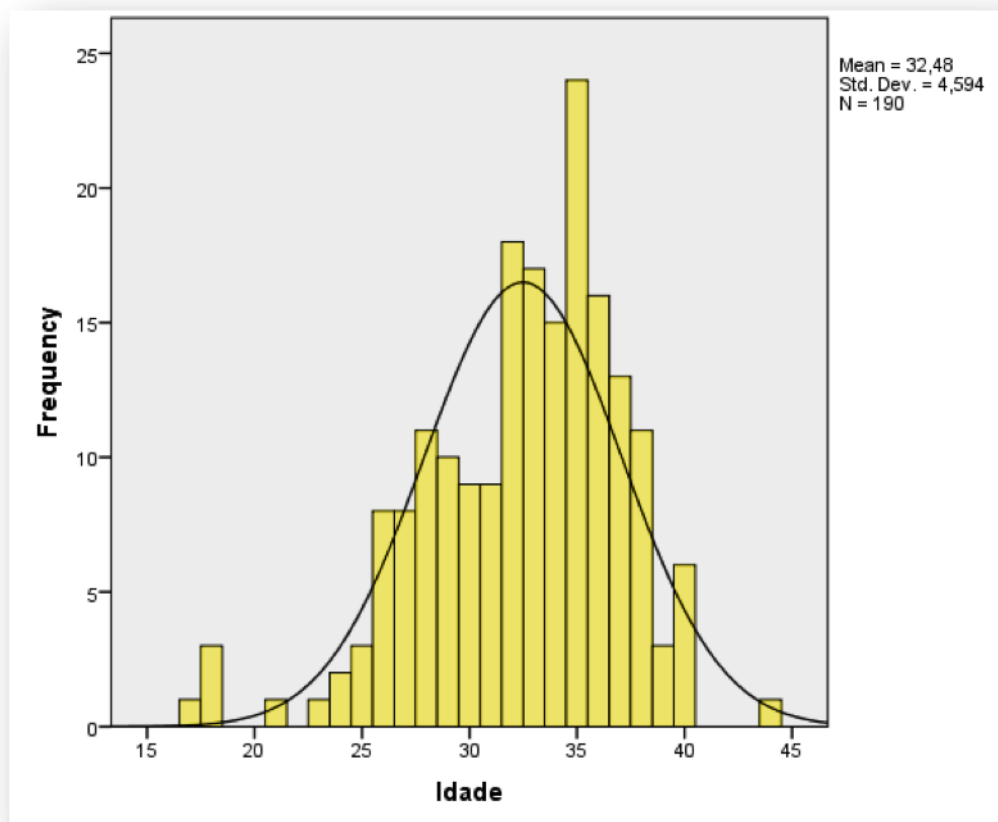


Figura 1- Histograma da distribuição de idade da amostra

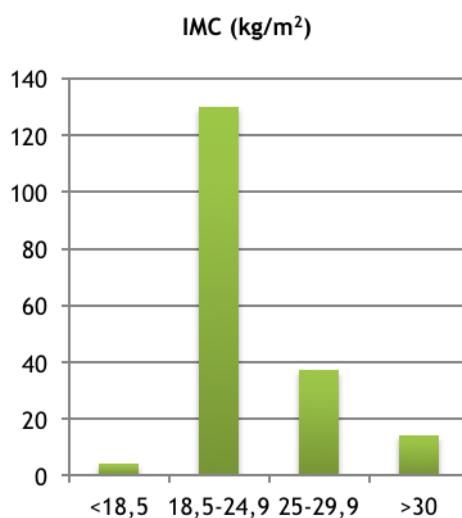


Figura 2- Caracterização Antropométrica da amostra

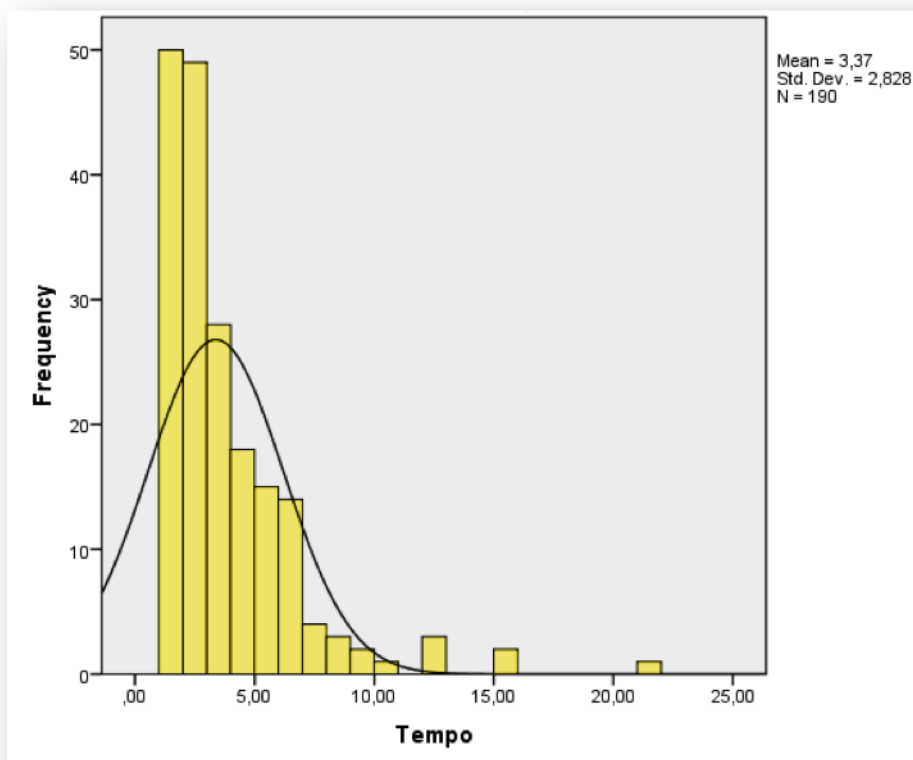


Figura 3 - Histograma da distribuição de tempo de infertilidade da amostra

3.2 Frequência dos agentes infecciosos

Tabela 2 - Frequência de Infecção Genital na amostra

	Frequência	Porcentagem (%)
Infecção genital	81	42,63
Sem infecção genital	109	57,37
Total	190	100,00

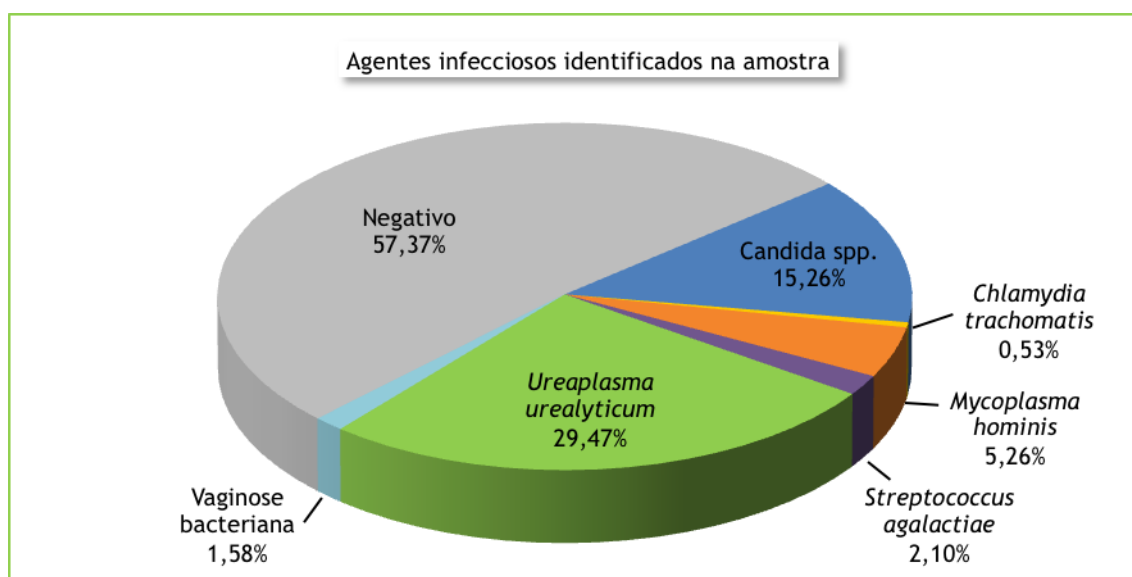


Figura 4 - Agentes infecciosos identificados na amostra

Tabela 3 - Agentes infecciosos identificados no total de infecções

Agentes infecciosos	Frequência	Porcentagem (%)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	56	54,37
<i>Candida spp.</i>	29	28,16
<i>Mycoplasma hominis</i>	10	9,71
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	3,88
Vaginose bacteriana	3	2,91
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1	0,97
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	0,00
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0	0,00
Total de Infecções	103	100

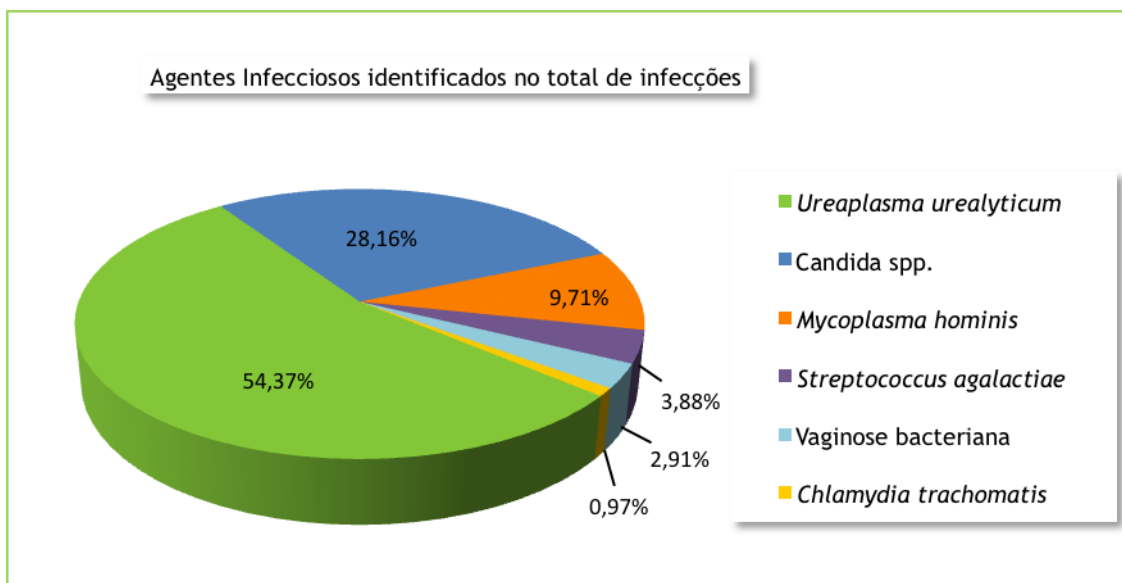


Figura 5 - Agentes infecciosos identificados no total de infecções

3.3 Análise de relação entre Infecção genital e outras variáveis na amostra

Tabela 4 - Análise de relação entre infecção genital e idade na amostra de mulheres com infertilidade

IDADE (ANOS)	INFECÇÃO	SEM INFECÇÃO
Média	32,8	32,3
Intervalo de Confiança 95% para a média	[31,7; 33,8]	[31,4; 33,1]
Desvio padrão para a média	4,8	4,4
Idade Mínima	18	17
Idade Máxima	44	40

A média de idade das mulheres com infecção ($32,7 \pm 4,8$ anos com Intervalo de confiança (IC) a 95% [31,7;33,8]) é aproximadamente igual à das mulheres sem infecção ($32,3 \pm 4,4$ anos com IC 95% [31,4;33,1]) (Tabela4). Parece não haver diferenças estatisticamente

significativas entre as variáveis infecção e idade pois a significância - 0,359 - é superior ao valor padronizado de 0,05 (Teste Mann-Whitney). (Tabela5 e Figura6).

Tabela 5 - Teste Kolmogorov-Smirnov para estudo da normalidade da distribuição da variável idade

		Kolmogorov-Smirnov		
		Estatística	df	Sig.
Idade	Infecção	,108	81	,019
	Sem infecção	,114	109	,002

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Infecção.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,359	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Figura 6 - Teste de Mann-Whitney para estudo de relação entre infecção e idade (variável com distribuição não normal) em mulheres com infertilidade

Tal como a idade, o tempo de infertilidade na UMR não varia significativamente entre mulheres com e sem infecção, visto que o nível de significância é 0,709, para $\alpha=0,05$ segundo o teste de Mann-Whitney (Tabela7 e Figura7). Reforçando esta conclusão, observa-se que o tempo de infertilidade das mulheres com infecção (média de $3,5 \pm 3,1$ anos com IC 95% [2,8;4,1]) é aproximadamente igual ao das mulheres sem infecção (média de $3,3 \pm 2,7$ anos com IC 95% [2,8;3,8]) (Tabela6)

Tabela 6 - Análise de relação entre infecção genital e tempo de infertilidade na amostra de mulheres com infertilidade

Tempo de Infertilidade (anos)	Infecção	Sem infecção
Média	3,5	3,3
Intervalo de Confiança 95% para a média	[2,8; 4,1]	[2,8; 3,8]
Desvio padrão para a média	3,1	2,7
Valor Mínimo	1	1
Valor Máximo	21	15

Tabela 7 - Teste Kolmogorov-Smirnov para estudo da normalidade da distribuição da variável tempo de infertilidade

Infecção		Kolmogorov-Smirnov		
		Estatística	Df	Sig.
Tempo	Infecção	,218	81	,000
	Sem Infecção	,213	109	,000

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tempo is the same across categories of Infecção.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,709	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Figura 7 - Teste de Mann-Whitney para estudo de relação entre infecção e tempo de infertilidade(variável com distribuição não normal)

4 Discussão

O reconhecimento do papel de infecções genitais na infertilidade tem aumentado na comunidade científica porque se assumiu que a muitos casos de infertilidade advêm de sequelas de infecções genitais⁽²⁾ ou de complicações pós-parto ou pós-aborto associadas⁽²⁾, causas essas que são preveníveis e a infertilidade evitável.

Patogenia. A homeostasia do ambiente vaginal depende da sua flora comensal que é dominada por espécies *Lactobacillus* spp.^(16,17), designados também Bacilos Döderlein⁽¹⁷⁾. O papel protector destes bastonetes gram-positivos resulta do contributo para a manutenção do ambiente ácido (pH entre 4 e 4,5) da vagina saudável⁽¹⁸⁾ e para a integridade do muco cervical⁽¹⁹⁾. Certas espécies de *Lactobacillus* produzem peróxido de hidrogénio e ácido láctico através do metabolismo de glicogénio do epitélio vaginal, depositado por influência da elevada concentração de estrogénio durante a idade reprodutiva da mulher⁽¹⁸⁾. O pH ácido vaginal resultante cria um ambiente restritivo e correlaciona-se com menor risco de infecção por *C.trachomatis*, *T.vaginalis* e *Mycoplasmas* genitais⁽¹⁸⁾. A diminuição da concentração ou da função das bactérias acidófilas diminui a acidificação do microambiente alterando o estado de equilíbrio dinâmico. Espécies patogénicas e oportunistas têm assim maior probabilidade de sobrevivência nestas comunidades, com implicações directas na susceptibilidade a doenças infecciosas genitais.

A lactoferrina, lisozima e imunoglobulina A (IgA) presentes no muco cervical, são moléculas com capacidade antibacteriana inespecífica e constituem um sistema de defesa do TGS⁽¹⁹⁾. A viscosidade e a quantidade do muco cervical complementam esse sistema e são reguladas por glicoproteínas designadas mucinas. A actividade exacerbada de enzimas mucinases é um mecanismo patogénico de organismos causadores de infecções genitais (Tabela 8).

O metabolismo das mucinas permite a aderência à superfície mucosa e a nutrição destes organismos, prejudicando a continuidade da barreira física do muco cervical. Assim, criam oportunidade para o possível desenvolvimento de DIP, a “síndrome aguda associada à disseminação de microorganismos da região cervico-vaginal para o endométrio, tubas uterinas e/ou estruturas contíguas”⁽²⁰⁾. A passagem via óstio cervical é ainda facilitada pela aderência aos espermatozóides ou a instrumentos de procedimentos intrauterinos (como histeroscopia ou transferência de embriões em PMA), e pelo efeito aspirativo das contracções uterinas^(15,21).

Tabela 8 - Mucinas produzidas por microorganismos no tracto genital¹

ORGANISMOS	GLICOSIDASES	PROTEINASES
<i>Candida albicans</i>	N-acetilglucosaminidase	Aspartil proteinase
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	Proteinase IgA1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	N-acetilglucosaminidase N-acetilgalctosaminase Sialidase	Proteinase Cistaina
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Hialuronidase	Extracelular-proteases
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Desconhecido	Desconhecido
<i>Mycoplasma hominis</i>	α e β - glicosidase β -galactosidase β -N-acetilglucosaminidase Sialidase	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	Protease IgA

A progressão dos espermatozoides para a cavidade uterina depende da interacção muco-sémen e é dificultada pelas alterações da endocérvix relacionadas com espécies de *Candida*, *Mycoplasma*, *T.vaginalis* e agentes de VB^(11,17).

O epitélio das tubas uterinas é constituído por células colunares ciliadas e células secretoras não ciliadas⁽²²⁾. Os cílios são um instrumento fundamental para a função desta estrutura: o seu batimento permite o transporte do oócito envolvido pelas secreções das células secretoras até ao útero.

¹ Adaptado de Wiggins et al, 2001 (19)

A mucosa genital feminina apresenta características imunológicas únicas que permitem tolerar a presença de espermatozóides e do embrião, mas activam mecanismos de defesa humoral e celular em resposta a antígenos microbiológicos. Quando a camada epitelial é afectada durante uma salpingite, os produtos destes mecanismos somam-se aos efeitos tóxicos dos patogénios e contribuem para a lesão das células tubárias, desde a alteração qualitativa e quantitativa dos seus cílios, até à apoptose e morte tecidual⁽²²⁾. A subsequente substituição das células lesadas por fibroblastos pode resultar em alterações morfológicas irreversíveis como adesões intraluminais e oclusão tubária. Espécies *Mycoplasma*, *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* foram consideradas dos principais agentes etiológicos de salpingite aguda^(6,19,21,22,23,24). O compromisso da integridade anatómica e funcional das tubas uterinas é uma causa reconhecida de infertilidade feminina (30-40% dos casos)^(20,25) já que esta estrutura funciona como órgão colector e transportador dos oócitos, fornece condições para a fertilização e nutrição do zigoto que posteriormente conduz até ao útero. Werström et al observou que a taxa de infertilidade involuntária é significativamente maior em doentes com alterações da anatomia tubária e que o número e severidade de episódios de DIP são preditores de prognóstico de fertilidade. Prevenir infecções genitais e a incidência de salpingite reduzirá a prevalência de IFT⁽²⁶⁾.

A placenta e as membranas fetais são adversamente influenciadas pela acção lesiva directa do processo infeccioso sobre o endométrio, pela resposta imunitária aos epítomos bacterianos, e por citocinas libertadas em resposta à infecção⁽²⁷⁾. As citocinas do tipo Th2 são cruciais para a implantação embrionária e formação do tecido trofoblástico mas a sua expressão é inibida por citocinas Th1, cuja concentração excessiva na decídua desencadeia reacções inflamatórias e pró-trombóticas interferindo com o fluxo sanguíneo na zona de nidacão⁽²⁷⁾.

A evidência histológica de inflamação das membranas fetais (corioamnionite) relaciona-se com eventos obstétricos adversos, salientando-se, à luz do tema da infertilidade, o aborto espontâneo. Stein et al demonstrou que 68% das placentas após aborto apresentavam corioamnionite histológica que, por sua vez, estava positivamente relacionada com a presença de *Mycoplasma* spp., incluindo *U.urealyticum*⁽²⁸⁾. Este autor verificou que a prevalência de aborto foi maior em placentas com culturas positivas para *Mycoplasmas* genitais (45%), do que em placentas infectadas por outras espécies (33%) ou em placentas estéreis (2,5%)⁽²⁸⁾.

Várias técnicas de PMA são actualmente a solução para muitos problemas de infertilidade. Este tratamento é bem sucedido quando resulta numa gravidez com nascimento de um recém-nascido vivo. Nos casos em que se realiza Fertilização in vitro (FIV) ou Microinjecção Intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) é efectuada a transferência dos embriões fertilizados para a cavidade uterina por meio de um cateter através do óstio cervical. Durante

este processo, existe o risco de veicular agentes patogênicos da flora cérvico-vaginal para o TGS⁽²¹⁾, o que pode resultar em DIP comprometendo a taxa de sucesso do procedimento. Eckert et al comparou a colonização de cateteres utilizados na transferência embrionária com a taxa de gravidez e de abortos precoces e concluiu que a presença de *Lactobacillus spp.* tem um impacto positivo na gravidez (70% engravidaram) e diminuem a taxa de abortamento (0%). Nos casos em que foram detectados agentes de VB (n=17), apenas três engravidaram e, dessas, duas não mantiveram a gravidez além de cinco semanas⁽²⁹⁾. Outros estudos relacionaram a VB com maior prevalência de interrupções de gravidezes quer espontâneas quer resultantes de FIV^(30,31). A indução de resposta inflamatória intra-uterina e endometrite será um mecanismo pelo qual microorganismos infecciosos como *U.urealyticum*, *Candida spp.*, e agentes de IST levam ao insucesso de técnicas de PMA e impedem a fertilização e manutenção de uma gravidez⁽²⁹⁾.

Prevalência de infecção genital em mulheres inférteis. Em oitenta e uma das 190 mulheres inférteis estudadas (42,63%) foram isolados agentes de infecção genital (Tabela2), padrão semelhante ao de um estudo de prevalência numa população ibérica que verificou que 47,3% de 376 mulheres inférteis apresentavam dados laboratoriais consistentes com infecção genital⁽¹¹⁾.

***Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*.** A influência das espécies *M.hominis* e *U.urealyticum* na etiologia da infertilidade é debatida há largos anos. A presença comensal de *M.hominis* em 5 a 20%⁽³²⁾ de mulheres saudáveis sexualmente activas e de *Ureaplasma* em 45 a 75%⁽³²⁾ dificulta a distinção entre simples colonização ou patogenia⁽²⁸⁾. Concentrações superiores a 10⁴UFC por mililitro são consideradas clinicamente significativas⁽¹⁷⁾.

O *U.urealyticum*, com 56 análises positivas (29,47% da amostra) (Figura4, Tabela3), foi o agente com maior prevalência nas utentes da UMR. Pelo menos um estudo demonstrou resultado semelhante da análise de amostras vaginais de mulheres inférteis (29%)⁽³³⁾. Tal como o teste MycoView®, o teste Mycoplasma IST2® aplicado por Casari et al.⁽¹⁷⁾ identifica *M.hominis* e *Ureaplasma spp.* com base no uso diferencial de substratos bioquímicos e nas resistências antibióticas específicas de cada *Mycoplasma spp.* Nesse estudo, *U.urealyticum* foi identificado em apenas 3,79% de amostras endocervicais de 396 mulheres inférteis⁽¹⁷⁾.

Nesta população a prevalência tem sido superior no muco cervical com 20,1% a 50% de amostras positivas^(10-12,33,34), correlacionando-se com o efeito deletério da protease de IgA do *U.urealyticum* (Tabela8) que degrada proteínas presentes no muco cervical, comprometendo a sua eficácia protectora e facilitando a disseminação ascendente de microorganismos até aos órgãos pélvicos reprodutivos.

Espécies de *Mycoplasma* têm sido identificadas em amostras endometriais e vaginais de casos de DIP não associada a *C.trachomatis* nem *N.gonorrhoeae*^(20,32), e a incidência do biovar T960 do *U.urealyticum* é superior em casos de DIP (57%) e em mulheres com um antecedente de aborto (42%)⁽³⁵⁾.

A presença de *U.urealyticum* no tracto genital feminino é influenciada pelo sistema endócrino tendo maior prevalência em mulheres grávidas⁽³²⁾. Porém, a colonização da placenta associa-se frequentemente a corioamnionite histológica (38-66%) e constitui um factor importante para morbilidade da gravidez e aborto espontâneo^(28,36): a colonização de *U.urealyticum* no endométrio é significativamente maior em casos de abortos recorrentes (28%) e associa-se a infertilidade inexplicada em 26 a 50%^(37,34). Em todos os casos de endometrite, este agente foi simultaneamente identificado no muco cervical, indicando uma rota ascendente de disseminação para a cavidade uterina⁽³⁷⁾.

Bactérias pertencentes à flora vaginal foram identificadas juntamente com *U.urealyticum* no endométrio de mulheres inférteis^(34,37). Na amostra em estudo, dez mulheres apresentavam concomitantemente *M.hominis* (5,26% da amostra) (Figura4). Estes valores são comparáveis aos da literatura científica (1,3%; 4,8%; 6%)⁽¹⁰⁻¹²⁾. *M.hominis* foi diagnosticado em 40-70% das infecções genitais inferiores⁽³²⁾ e em tubas uterinas com salpingite⁽²⁶⁾ surgindo anticorpos específicos num quarto destes casos⁽³²⁾. Produtos tóxicos do metabolismo de *Mycoplasma* spp., como peróxido de hidrogénio e radicais de oxigénio, causam danos oxidativos nas membranas das células ciliadas tubárias, diminuindo a cinética ciliar e a eficácia das ligações intercelulares^(22,32).

Vaginose Bacteriana. Uma comunidade microbiana vaginal caracterizada pela deficiência de bactérias acidófilas como *Lactobacillus* spp. e com concentrações aumentadas de bactérias anaeróbicas (incluindo *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* e bastonetes curvados variáveis) associa-se a pH vaginal superior a 4,5 e é descrita como Vaginose Bacteriana^(38,39).

Ness et al mostrou que mulheres com VB têm um risco significativamente maior de desenvolver DIP⁽³⁹⁾, e metade das mulheres sintomáticas apresentam endometrite⁽³⁰⁾. Esta infecção tem também maior prevalência em situações de IFT (31,5%) comparativamente com a inexistência de alterações das tubas (19,7%)⁽³⁰⁾. Dada a sua frequente associação a outras infecções do tracto genital, como *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, não é certo se a relação com infertilidade é secundária ao dano tubário resultante destes agentes ou se a vaginose isoladamente provoca IFT. A prevalência de VB e flora normal num estudo em mulheres que realizaram FIV foi de 25.6 e 60.4% respectivamente⁽³⁰⁾. Contudo, esta infecção não parece prejudicar a taxa de fertilização⁽³¹⁾ nem a taxa de sucesso de implantação de embrião⁽³⁰⁾, mas são necessários mais estudos para esclarecimento desta influência.

A VB associa-se microscopicamente a uma etiologia multiorgânica variável e não totalmente conhecida, pelo que existem múltiplos critérios de diagnóstico. Os critérios clínicos de Amsel (presença de leucorreia, pH vaginal superior a 4,5, “clue cells”, odor amináceo característico após adição de hidróxido de potássio) têm baixa sensibilidade⁽³⁸⁾ dado que muitos casos de VB são assintomáticos. Critérios baseados nas proporções de diferentes morfologias celulares (bactérias variáveis, *Lactobacillus* spp. e “clue cells”) observadas via exame Gram de amostras vaginais, como os critérios de Nugent e os aplicados neste estudo, têm maior sensibilidade embora a sua interpretação esteja dependente da acuidade técnica do laboratório⁽³⁸⁾. Três mulheres inseridas neste estudo (1,58%) apresentavam VB (Tabela3). Estes valores são muito inferiores aos detectados noutro estudo (24,6%)⁽³¹⁾ que identificou VB na ausência ou presença de poucos *Lactobacillus* spp. e concentração aumentada de *G.vaginalis* e/ou outros morfotipos no exame Gram, segundo critérios de Spiegel modificados. Rodríguez et al. detectou VB em 5% de mulheres inférteis, baseando-se numa combinação de critérios clínicos, exame de Gram e cultura de *G.vaginalis* e enterobactérias gramnegativas⁽¹¹⁾. A inexistência de um padrão universalmente admitido e aplicado para o diagnóstico de VB pode justificar as diferenças de prevalência detectadas e dificultar comparações.

Candida spp. *Candida* spp. foi o segundo agente mais prevalente, sendo detectado em 15,26% da amostra (Figura4). Este valor é comparativo aos 12,9%⁽¹¹⁾ e superior aos 5,05%⁽¹⁷⁾ detectados noutros estudos via cultura em meio Sabouraud.

Embora integrem o microambiente vaginal de 20% de mulheres saudáveis⁽⁴⁰⁾, estas leveduras adquirem actividade patogénica nos tractos genitais se houver alteração da homeostasia protectora da flora e do pH vaginal. Neste cenário, a actividade multiplicativa ocorre sem restrições e a concentração aumentada de fungos pode progredir para o TGS. Tal disseminação tem maior gravidade num contexto de gravidez, pois a infecção micótica intra-uterina aumenta o risco de morte fetal e aborto espontâneo⁽⁴¹⁾. A expressão de receptores uterinos específicos para *C.albicans* nas células embrionárias parece aumentar durante a gestação⁽⁴²⁾ ampliando a probabilidade de os epítomos fúngicos iniciarem uma reacção inflamatória uterina. A indução de citocinas proinflamatórias, especialmente IL-8, foi correlacionada com a presença de *C.albicans*⁽⁴³⁾, a espécie fúngica mais frequente no tracto genitourinário. Assim, surgiu a hipótese de este mecanismo ser uma etiologia não reconhecida de infertilidade por aborto espontâneo recorrente e inexplicado⁽⁴³⁾. Embora a influência de *Candida* spp. na etiologia de infertilidade necessite de maior esclarecimento científico, o seu diagnóstico e tratamento (Anexo I) permite a prevenção de sequelas infecciosas/inflamatórias nos órgãos fetais e na placenta que os sustenta.

Chlamydia trachomatis. Esta bactéria gram-negativa sexualmente transmissível é um importante e frequente agente etiológico de DIP^(26,44), sendo isolada no TGS em cerca de um

quarto destas doentes⁽⁴⁴⁾. A infecção vaginal é predominantemente silenciosa e evolui para DIP em 20 a 40% dos casos^(6,23,25). Alertando para as sequelas de DIP, um estudo retrospectivo demonstrou maior predisposição para infertilidade involuntária em mulheres com DIP e cultura positiva para *C.trachomatis*⁽⁴⁴⁾.

Uma reacção celular imunitária à presença de antigénios “chlamydial heat shock protein 60” (CHSP60) foi demonstrada em mulheres com salpingite e IFT⁽⁴⁵⁾ parecendo contribuir para a sua etiologia^(6,45). Tiitinen concluiu que anticorpos IgG específicos para CHSP60 são detectáveis principalmente no soro de mulheres com IFT (43,2 versus 13,5% no grupo controlo) ($p < 0,001$)⁽⁴⁵⁾, e as respostas imunes celulares induzidas por CHSP60 ocorrem em 45,5% dos casos de IFT⁽⁴⁵⁾. Identificada no citoplasma de células epiteliais tubárias, exerce um efeito citotóxico predominantemente sobre as ciliadas, destruindo ligações intercelulares e a microestrutura ciliar vital à função de transporte e de suporte nutritivo das tubas uterinas⁽²²⁾. Contudo, a presença desta bactéria não é inevitavelmente patogénica isolando-se também em tubas saudáveis⁽²⁶⁾.

A infecção uterina durante a gravidez resulta na ruptura prematura de membranas e em corioamnionite⁽⁶⁾. Abortos precoces e recorrentes podem ser induzidos por infecção assintomática por *C.trachomatis* através da acção de mediadores imunitários: mulheres com historial de abortos recorrentes e insucesso de técnicas de FIV têm maiores titulações serológicas de IgG específicos para *C.trachomatis*, e 41% sofre pelo menos um aborto espontâneo⁽³⁶⁾.

Não existe consenso científico acerca do método mais indicado para o rastreio desta bactéria⁽²³⁾. O método tradicional é a cultura em tecido celular cuja qualidade depende da experiência do laboratório. O teste de imunofluorescência directa utiliza anticorpos monoclonais e visualiza a sua ligação a corpos elementares da *C.trachomatis*. Embora altamente específico e rápido, é tecnicamente exigente e dependente da prática laboratorial. O surgimento de testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) revolucionou o diagnóstico pela elevada performance (especificidade e sensibilidade superiores a 90%)⁽²³⁾ e habilidade de produzir resultados fidedignos em amostras colhidas de forma não invasiva, com microorganismos não viáveis e com uma sequência de DNA. A reacção em cadeia da polimerase (PCR) pertence à classe das NAAT e é considerado o teste de escolha para diagnóstico de *C.trachomatis*^(6,23). Para a análise neste estudo foi utilizado um imunoensaio enzimático, o teste “QuickVue”® baseado na detecção directa e qualitativa de antigénios de *C.trachomatis* em amostras cervicais. Apresenta uma limitação intrínseca do uso de anticorpos que não diferenciam as diferentes espécies *Chlamydia*. A possibilidade de reacção cruzada com outras espécies aumenta assim o risco de falsos-negativos. Além da limitada especificidade, tem menor sensibilidade que as técnicas de cultura e PCR⁽²³⁾. Estas características podem justificar o único caso positivo de *C.trachomatis* (Tabela3) que é uma

das mais prevalentes IST no mundo e foi detectada, mediante técnicas de imunofluorescência directa, em 10,7% de mulheres inférteis⁽¹¹⁾. Casari et al. diagnosticou *C.trachomatis* em apenas 0,51% de mulheres inférteis usando a técnica PCR (COBAS Amplicor system®)⁽¹⁷⁾. Apesar das implicações provadas do papel deste microorganismo, poucos estudos tiveram sucesso no seu isolamento da região endocervical de mulheres inférteis^(6,17,23).

Neisseria Gonorrhoeae é um diplococo gram-negativo sexualmente transmissível capaz de colonizar o epitélio mucoso vaginal e cervical. Em 10 a 25% dos casos sem tratamento dissemina-se para o TGS⁽¹⁹⁾. Por meio de adesinas que possui (tabela 8), adere especificamente às microvilosidades das células tubárias secretoras com efeitos citotóxicos evidentes⁽²²⁾. Os efeitos da resposta inflamatória à infecção contribuem adicionalmente para a astenia ciliar e das junções intercelulares verificando-se apoptose e descamação do epitélio celular⁽⁷⁾. De todos os microorganismos etiológicos de salpingite, *N.gonorrhoeae* tem maior efeito citotóxico e é severamente nocivo, de modo que nunca foi isolado em tubas uterinas saudáveis^(19,22). Assim, a infecção gonocócica relaciona-se com significativo risco de oclusão ou aderência tubária e infertilidade consequente⁽⁴⁶⁾, e, na grávida, conduz a aborto espontâneo em 35% dos casos⁽²⁴⁾.

Sessenta e dois milhões de novos casos anuais de *N.gonorrhoeae* são esperados na população adulta mundial⁽²⁴⁾. A sua incidência na população feminina infértil tem sido, no entanto, baixa (0,3-0,4%)^(11,10) tal como se verificou neste estudo (0%) (Tabela3). Não existem normas universalmente aceites para o diagnóstico de *N.gonorrhoeae*. Os NAAT têm alta especificidade e sensibilidade e permitem a pesquisa simultânea de *N.gonorrhoeae* e *C.trachomatis* numa amostra única⁽²³⁾.

Trichomonas vaginalis. Este protozoário flagelado é o agente causal da IST não viral mais prevalente⁽²⁴⁾ e facilita a colonização de outros agentes infecciosos. Sobrevivente apenas em microambientes alcalinizados, o seu desenvolvimento é favorecido num cenário de VB⁽⁴⁷⁾. *T.vaginalis* estabelece uma relação de simbiose com *M.hominis*⁽⁴⁷⁾ e pode contribuir para a infertilidade ao influenciar a patogenia do *M.hominis*. Todavia, esta IST pode evoluir para endometrite e salpingite^(21,47) e foi demonstrado que, a longo prazo, duplica o risco de IFT irreversível⁽⁴⁶⁾. A prevalência de *T.vaginalis* em amostras vaginais de mulheres inférteis é em regra baixa rondando 0,3 % a 4%^(17,11) e os resultados obtidos neste estudo (0%) não são discordantes (Tabela3).

Streptococcus agalactiae. *S.agalactiae* foi detectada em 4 doentes (2,1%) (Tabela3, Figura4), percentagem inferior aos 8,59% referidos na literatura actual⁽¹⁷⁾. Na presença de alterações da concentração de *Lactobacillus* spp. e do ambiente vaginal, esta bactéria comensal adquire patogenicidade^(17,19). Foi isolada em um quarto das culturas positivas de placentas e fetos resultantes de aborto espontâneo, sendo agente único em 62% dos casos e relacionando-se significativamente com corioamnionite histológica⁽⁴⁸⁾. O mecanismo de

infertilidade desta bactéria permanece incerto⁽⁴⁸⁾ mas a sua relação com aborto espontâneo confere especial importância ao seu rastreio em mulheres com orientação para PMA.

4.1 Conclusões e Perspectivas futuras

A elevada prevalência de *U.urealyticum*, o agente mais comum nas utentes da UMR, sugere que esta amostra está exposta a maior risco de sequelas associadas como salpingite, oclusão tubária, corioamnionite e aborto recorrente, que limitam a fertilidade e comprometem a eficácia de técnicas de PMA. Assim, reveste-se de real importância a realização de rastreio infeccioso rotineiro na população infértil, abrangendo não só agentes de IST, mas também *U.urealyticum* e *Mycoplasma spp.*

A taxa de IST por *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, agentes indubitavelmente implicados na génese de IFT, foi inferior a 1%, o que se relacionará com a baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos utilizados. Dada a elevada taxa de infecções assintomáticas por *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* e as suas implicações graves na fertilidade, é recomendável o seu rastreio conjunto com técnicas de NAAT como o PCR, consideradas mais sensíveis e específicas.

Protelar o diagnóstico e tratamento precoce de infecções genitais, diagnosticadas em 42,63% das mulheres acompanhadas na UMR, amplia o risco de complicações da saúde reprodutiva feminina como DIP, gravidez ectópica, aborto espontâneo e infertilidade. O rastreio alargado e recorrendo aos métodos mais eficazes disponíveis beneficia casais inférteis, principalmente os com indicação para tratamentos de PMA, aumentando a eficácia dos procedimentos e o sucesso da gravidez.

A informação deste estudo poderá orientar o planeamento de acções de rastreio e prevenção de infecções genitais com vista a maximizar a eficiência da UMR, e poderá contribuir para estudos comparativos com outras unidades de medicina reprodutiva e com dados futuros do CHCB,E.P.E.. É necessário maior conhecimento da realidade de casais com infertilidade, focando a atenção nas infecções genitais. Seria recomendável a realização de estudos adicionais que conduzissem ao consenso acerca de protocolos de diagnóstico de Vaginose bacteriana, *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*. São necessários estudos populacionais e analíticos para analisar hipóteses de relação entre infecções genitais, nomeadamente *U.urealyticum* e *Candida spp.*, e infertilidade, eficácia de técnicas de PMA e incidência de abortos espontâneos, de modo a encontrar novos caminhos para a concretização do desejo de muitos casais no mundo.

Referências Bibliográficas

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K et al. International committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*. 92(5):1522.
2. World Health Organization, Division of Family Health. *Infertility, A tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility*, Programme on Maternal and Child Health and Family Planning. Geneva, 1991.
3. Direção-Geral de Saúde. Norma de conduta em Infertilidade para os Cuidados de Saúde Hospitalares. Lisboa 2011 Jan 20; nº 004/2011.
4. Carvalho JL, Santos AS. Estudo Afrodite, caracterização da infertilidade em Portugal. Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2009.
5. Augusto A, Correia S. Estudo sobre a viabilidade da implementação de um serviço de reprodução medicamente assistida no Centro Hospitalar Cova da Beira. Covilhã: Universidade da Beira Interior e Centro de Estudos Sociais; 2006.
6. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction, *Human Reproduction*. 1999;5(5):433-47.
7. Morales P, Reyes P, Vargas M, Rios M, Imarai M, Cardenas H et al. Infection of human fallopian tube epithelial cells with *Neisseria gonorrhoeae* protects cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Infect Immun* 2006;74(6):3643-50.
8. World Health Organization. Sexually transmitted infections. [Online]. 2007 Oct. Fact sheet N° 110. Available from: URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>
9. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Capri Workshop. *Infertility revisited: The state of the art today and tomorrow*. 1996 April 17; p. 1779-1807
10. Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:43-6.
11. Rodríguez R, Hernández R, Fuster F, Torres A, Prieto P, Alberto J. Infección genital y esterilidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:261-6.
12. Gupta A, Gupta A, Gupta S, Mittal A, Chandra P, Gill AK. Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280:981-5.
13. Gump DW, Gibson M, Ashikaga T. Lack of association between genital mycoplasmas and infertility. *N Engl J Med* 1984;310(15):937-41.

14. Samra Z, Soffer Y, Pansky M. Prevalence of genital chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic. *European Journal of Epidemiology* 1994;10:69-73.
15. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawcys M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril*. 1996 Nov;66(5):776-80.
16. Ravel J, Gajer P, Abdob Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCullea SL et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *PNAS* 2011 March;108(1):4680-7.
17. Casari E, Ferrario A, Morengi E, Montanelli A. Gardnerella, Trichomonas vaginalis, Candida, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. *New Microbiologia* 2010;33:69-76.
18. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun* 1999;67(10):5170-5.
19. Wiggins R, Hicks SJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Inf* 2001;77:402-8.
20. Weström L, Wolner-Hanssen P. Pathogenesis of pelvic inflammatory disease. *Genitourin Med* 1993;69:9-17.
21. Halbel HW, da Cunha DC. Doença inflamatória pélvica. *Diagn Tratamento* 2010;15(3):106-9.
22. Baczyńska A, Funch P, Fedder J, Knudsen HJ, Birkelund S, Christiansen G. Morphology of human fallopian tubes after infection with Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis—in vitro organ culture study. *Human Reproduction* 2007;22(4):968-79.
23. Manavi K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, Elsevier, 2006;20(6):941-51.
24. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. [Online]. Geneva 2001. Available from: URL http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf.
25. World Health Organization. Sexually transmitted infections. [Online]. 2011 August. Fact sheet N° 110 Available from: URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>
26. Weström L, Joesoef R, Reynolds G, Hagdu A, Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and fertility, a cohort study of 1844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. *Sexually Transmitted Diseases* 1992;19(4):185-92.
27. Robertson SA. Control of the immunological environment of the uterus. *Reviews of Reproduction* 2000;5:164-74.
28. Stein A, Boubli L, Blanc B, Raoult D. Genital mycoplasmas in placental infections. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1994;1:275-81.

29. Eckert LO, Moore DE, Patton DL, Agnew KJ, Eschenbach DA. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2003;11:11-17.
30. Liversedge NH, Turner A, Horner PJ, Keay SD, Jenkins JM, Hull MGR. The influence of bacterial vaginosis on in-vitro fertilization and embryo implantation during assisted reproduction treatment. *Human Reproduction* 1999;14(9):2411-5.
31. Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ* 1999 July 24;319:220-3.
32. Mårdh PA. Mycoplasmal PID: a review of natural and experimental infections. *The Yale journal of biology and Medicine* 1983;56:529-36.
33. Rehewy MS, Jaszczak S, Hafez ES, Thomas A, Brown WJ. *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) in vaginal fluid and cervical mucus from fertile and infertile women. *Fertil Steril* 1978 Sep;30(3):297-300.
34. Stray-Pedersen B, Bruu AL, Molne K. Infertility and uterine colonization with *Ureaplasma urealyticum*. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982;61(1):21-4.
35. Horn MA, Wolfe C, Dressel P, Pfaff F, Zimmermann A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 1997 May; 35(5):1199-202.
36. Tadmor OP, Shaia M, Rosenman H, Livshin Y, Chonkroun C, Barr I et al. Pregnancy outcome in serologically indicated active chlamydia trachomatis infection. *Isr J Med Sci* 1993;29:280-4.
37. Stray-Pedersen B, Eng J, Reikvam TM. Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Feb 1;130(3):307-11
38. 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(2):297-301.
39. Ness RB, Kip KE, Hillier SL, Soper DE, Stamm CA, Sweet RL et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am J Epidemiol* 2005;162:585-90.
40. Wira CR, Ghosh M, Smith JM, Shen L, Connor RI, Sundstrom P et al. Epithelial cell secretions from the human female reproductive tract inhibit sexually transmitted pathogens and *Candida albicans* but not *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol* 2011 May; 4(3):335-42.
41. Albarracin NS Jr, Patterson WS, Haust MD. *Candida albicans* infection of the placenta and fetus, report of a case. *Obstet Gynecol* 1967 Dec;30(6):838-41.
42. Polacheck I, Antman A, Barth I, Sagi E, Giloh H. Adherence of *Candida albicans* to epithelial cells: studies using fluorescently labelled yeasts and flow cytometry. *Microbiology* 1995;141:1523-33

43. 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 Sep;46(9):806-10.
44. Taylor BD, Haggerty CL. Management of chlamydia trachomatis genital tract infection: screening and treatment challenges. *Infection and Drug Resistance* 2011;4 19-29.
45. Tiitinen A, Surcel HM, Halttunen M, Birkelund S, Bloigu A, Christiansen G et al. Chlamydia trachomatis and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell-mediated responses predict tubal factor infertility. *Human Reproduction* 2006;21(6):1533-8.
46. Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 1993 Mar 1;137(5):577-84.
47. Zaki MES, Raafat D, El Emshaty W, Azab MS, Goda H. Correlation of *Trichomonas vaginalis* to bacterial vaginosis: a laboratory-based study. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(3):156-63.
48. McDonald HM, Chambers HM. Intrauterine infection and spontaneous midgestation abortion: is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor?. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8:220-7.

Anexos

Anexo I - Tratamento de Infecções Genitais

Tabela - Esquemas recomendados pela Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S, 2010 para tratamento de infecções genitais não complicadas²

ORGANISMOS	TRATAMENTO (POSOLOGIA)	MODO DE ADMINISTRAÇÃO E DURAÇÃO DO TRATAMENTO
<i>Candida spp.</i>	Butoconazole creme a 2% (5g) <i>Ou</i>	Aplicação intravaginal diária por 3 dias
	Clotrimazole creme a 1% (5g) <i>Ou</i>	Aplicação intravaginal diária por 7-14 dias
	Clotrimazole creme a 2% (5 g) <i>Ou</i>	Aplicação intravaginal diária por 3 dias
	Miconazole creme a 2% (5 g) <i>Ou</i>	Aplicação intravaginal diária por 7 dias
	Miconazole creme a 4% (5 g) <i>Ou</i>	Aplicação intravaginal diária por 3 dias
	Miconazole (100 mg) <i>Ou</i>	Um ovo vaginal diário durante 7 dias
	Miconazole (200 mg) <i>Ou</i>	Um ovo vaginal diário durante 3 dias
	Miconazole (1,200 mg) <i>E</i>	Um ovo vaginal diário durante 1 dia
	Fluconazol (150 mg)	Dose única, Via oral

² Adaptado de: Workowski KA, Berman S. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. WWMR, CDC, December 17, 2010 / 59(RR12);1-110

Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB:
Qual o agente mais comum?

ORGANISMOS	TRATAMENTO (POSOLOGIA)	MODO DE ADMINISTRAÇÃO E DURAÇÃO DO TRATAMENTO
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Azitromicina (1g)	Toma oral única
	<i>Ou</i> Doxiciclina (100 mg)	Duas tomas diárias durante 7 dias por via oral
<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>	Azitromicina (1g)	Toma oral única
	<i>Ou</i> Doxiciclina (100 mg)	Duas tomas diárias durante 7 dias por via oral
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Ceftriaxona (250 mg)	Injeção intramuscular única
	<i>Ou</i> Cefixima (400 mg)	Toma oral única
	<i>Ou</i> Um regime de Cefalosporina + Azitromicina (1g)	Injeção única toma oral única
	<i>Ou</i> Doxiciclina (100 mg)	Duas tomas diárias durante 7 dias por via oral
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Metronidazol (2g)	Toma oral única
	<i>Ou</i> Tinidazol (2g)	Toma oral única
Vaginose Bacteriana	Metronidazol (500 mg)	Duas tomas diárias durante 7 dias por via oral
	<i>Ou</i> Metronidazol gel 0,75% (5g)	Aplicação intravaginal diária por 5 dias
	<i>Ou</i> Clindamicina creme 2% (5g)	Aplicação intravaginal antes de deitar durante 7 dias

Anexo II - Autorização para realização do estudo

 Centro
Hospitalar
Cova da Beira, E.P.E.

15 SET 2011
ADMINISTRAÇÃO
C.H.C.B., E.P.E.
24. OUT. 2011
ENVIADO A
Núcleo de Investigação

Parecer:	Despacho: CENTRO HOSPITALAR COVA DA BEIRA, E.P.E. 24. OUT. 2011
ASSUNTO: Projecto de Investigação nº77/2011 - "Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB: qual o agente mais comum?"	
PARA: Exmo. Sr. Presidente do Conselho de Administração	N.º 74/2011
DE: Núcleo de Investigação	Data 14/09/2011
<p>Em relação ao assunto em epígrafe, junto envio o pedido de autorização de Juliana de Sá Castelo, aluna do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior para a realização de um estudo subordinado ao tema "Prevalência de infecção genital em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CHCB: qual o agente mais comum?", a realizar na Unidade de Medicina da Reprodução deste Centro Hospitalar.</p> <p>Informo que se encontram reunidos todos os requisitos necessários de acordo com o Regulamento e normas do Núcleo de Investigação.</p> <p>Informo ainda que o estudo não foi submetido ao parecer da Comissão de Ética de acordo com a tomada de decisão desta Comissão, constante na Acta nº 2, da reunião de 22 de Janeiro de 2009: "A Comissão de Ética decidiu ainda: ---</p> <p>Que o parecer da Comissão de Ética será dispensável sempre que não haja contacto directo com os doentes, como é o caso de consulta de processos clínicos e desde que o investigador se comprometa a manter a confidencialidade;...".</p> <p>Com os melhores cumprimentos, <i>Pescocois</i></p> <p>P^olo Núcleo de Investigação <i>Rosa Saraiva</i> (D.^a Rosa Saraiva)</p>	
Nota: Solicita-se aos investigadores a entrega de um exemplar do trabalho final.	