

CRISTINA MITI NISHIMURA

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DO BIOFILME EM
DISPOSITIVOS INTRAUTERINOS LIBERADORES DE
LEVONORGESTREL PELA TÉCNICA DE SONICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Santa Casa de
São Paulo para obtenção do Título de
Mestra em Ciências da Saúde.

SÃO PAULO
2017

CRISTINA MITI NISHIMURA

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DO BIOFILME EM
DISPOSITIVOS INTRAUTERINOS LIBERADORES DE
LEVONORGESTREL PELA TÉCNICA DE SONICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós - Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Santa Casa de
São Paulo para obtenção do Título de
Mestra em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Mauro José da Costa Salles

Co-orientador: Prof. Dr. José Mendes Aldrighi

SÃO PAULO
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Nishimura, Cristina Miti

Avaliação da microbiota do biofilme em dispositivos intrauterinos liberadores de levonorgestrel pela técnica de sonicação./ Cristina Miti Nishimura. São Paulo, 2017.

Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Mauro José Costa Salles

Coorientador: José Mendes Aldrighi

1. Dispositivos intrauterinos 2. Microbiota 3. Endometrite
4. Sonicação 5. Biofilmes

BC-FCMSCSP/13-17

**“ Não suba montanhas para que o mundo te veja.
Mas sim para que você veja o mundo.”**

(David McCullough Jr)

DEDICATÓRIA

À Deus.

Agradeço diariamente as bênçãos recebidas.

Aos meus filhos, André e Lucas.

Agradeço por serem a motivação para meu crescimento e por me mostrarem a vida através de seus corações.

Ao meu pai e professor, Akira (in memorian).

Gratidão, admiração e respeito pelo seu caráter, dedicação e ética, qualidades que me inspiraram seguir seus passos.

À minha mãe, Kimie.

Agradeço a força feminina, renúncia e dedicação à família.

Aos familiares, amigos e equipe de trabalho que me acompanharam durante esses anos de pesquisa, meus profundos agradecimentos.

Ao meu orientador

Prof. Dr. Mauro José Costa Salles.

Agradeço a confiança e seus ensinamentos, principalmente estímulo à pesquisa.

Ao meu querido co-orientador

Prof. Dr. José Mendes Aldrighi .

Admiração por sua capacidade de inspirar seus alunos e ensiná-los a concretizar sonhos.

Agradeço carinhosamente a determinante oportunidade que me foi concedida.

AGRADECIMENTOS

À Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, na pessoa do DD. Provedor, Prof. Dr. José Luiz Egydio Setúbal, por fornecer todos os recursos necessários para a realização desta dissertação.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP, na pessoa do DD. Diretor Prof. Dr. Valdir Golin pelo suporte acadêmico.

Agradeço ao CAPS pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

À Profa. Dra Yvoty Alves dos Santos Sens, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo pela oportunidade a mim concedida para a realização desta dissertação nesta renomada Instituição.

Ao Departamento de Obstetrícia e Ginecologia – DOGI, da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, na pessoa do DD. Diretor Prof. Dr. José Mendes Aldrighi, pelo suporte para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Tutsomu Aoki, pela amizade e incentivo à pesquisa.

À Prof. Dra. Sonia Tamanaha, pela paciência, orientações e pela inestimável amizade.

À Cely Barreto da Silva pelo enorme apoio, dedicação e orientações na área da microbiologia.

ABREVIATURAS

CD Fluido do Corpo do Dispositivo Intrauterino Com Sonicação

CDSS Fluido do Corpo do Dispositivo Intrauterino Sem Sonicação

CT Fluido do Corpo do Dispositivo Intrauterino Com Sonicação
no Caldo de Tioglicolato

DIPA Doença Inflamatória Pélvica Aguda

DIU Dispositivo Intrauterino

FD Fluido do Fio do Dispositivo Intrauterino Com Sonicação

FDSS Fluido do Fio do Dispositivo Intrauterino Sem Sonicação

FT Fluido Sonicado do Fio do Dispositivo Intrauterino Com Sonicação
no Caldo de Tioglicolato

LNG Levonorgestrel

SV Secreção Vaginal

SIU-LNG Sistema Intrauterino Liberador de Levonorgestrel

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	5
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	5
4 – RESULTADOS	12
5 – DISCUSSÃO	21
6 – CONCLUSÃO	26
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8 – ANEXOS	33
RESUMO	37

INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos temas de grande interesse na medicina é o estudo da microbiota – que representa uma população de micro-organismos que, via de regra, vive em simbiose com o órgãos dos seres humanos. Esses agentes apresentam funções fisiológicas com impactos na manutenção da saúde. Em relação as mulheres usuárias de dispositivo intrauterino, a microbiota da cavidade uterina ainda é desconhecida. O sistema intrauterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) é um dos contraceptivos reversíveis mais eficazes na atualidade ⁽¹⁾. Estudos farmacocinéticos e clínicos mostram que o SIU-LNG libera diariamente 20mcg de levonorgestrel (LNG) no primeiro ano de uso e 15 mcg nos subsequentes até o quinto ano, quando finda sua validade. Essas concentrações de LNG na cavidade uterina 100 vezes maiores do que na circulação sanguínea inibem os receptores de progesterona e estradiol determinando atrofia endometrial e espessamento do muco cervical, efeito que compromete a espermomigração e, por isso, é relatada como um dos seus principais mecanismos contraceptivos ⁽²⁻³⁾. Adicionalmente, exibem expressivos benefícios não contraceptivos como o controle de sangramentos menstruais excessivos, proteção endometrial na vigência da estrogênio terapia após a menopausa, indução de amenorréia em mais da 50% de suas usuárias, condição desejada por muitas mulheres, o que justifica seu alto índice de satisfação e aderência ⁽⁴⁾, além da redução no risco de doença inflamatória pélvica (DIPA) ⁽⁵⁾.

Historicamente, é digno de nota mencionar que o modelo de cobre - DIU Dalkon Shield desenvolvido em 1971, com fio multifilamentar foi responsável por graves casos de infecções pélvicas, infertilidade e inclusive óbitos por septicemia, pela facilidade da bactéria localizada na vagina ascender através do fio para a cavidade uterina ⁽⁶⁾. Mesmo em usuárias de outros modelos de DIU de cobre com fio monofilamentar houve maior frequência de *Actinomyces spp*, bactéria anaeróbica facultativa Gram positiva, associados a infecções pélvicas em 1,6-11,6% ⁽⁷⁾. Em um estudo, a prevalência de organismos semelhantes a *Actinomyces* em esfregaços cérvico-vaginais demonstrou ser menor em usuárias do SIU-LNG quando comparadas ao DIU de cobre ⁽⁸⁾.

Considera-se que o risco de DIPA associado ao uso do DIU aumenta em seis vezes nos primeiros 20 dias após a inserção ⁽⁹⁾ e via de regra, há envolvimento de doenças sexualmente transmissíveis ⁽¹⁰⁾, sendo que as complicações aumentam em 2 a 9 vezes nas usuárias de DIU ⁽¹¹⁾ – especialmente, nas inserções realizadas em portadoras de infecções ginecológicas causadas por *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamidia trachomatis* ou vaginose bacteriana ⁽¹²⁻¹³⁾. Contudo, um simples questionário sobre o risco de doenças sexualmente transmissíveis aplicado antes da inserção pode reduzir esses riscos em até 50% ⁽¹⁴⁾. Em estudo prévio, as culturas de DIUs removidos por DIPA mostraram infecção polimicrobiana – com crescimento de colônias de bactérias aeróbicas e anaeróbicas - sendo as mais frequentes *Staphylococcus coagulase negativo*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* ⁽¹⁵⁾. A menor prevalência de complicações infecciosas e DIPA nas usuárias do SIU-LNG ⁽⁵⁾ deve-se, entre outras causas, à diminuição do fluxo menstrual ⁽¹⁶⁾, espessamento do muco cervical ⁽³⁾, presença de peptídeos antimicrobianos, citocinas inflamatórias, imunoglobulinas e enzimas degradadoras de matriz ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, que em conjunto dificultariam a ascensão de bactérias vaginais.

A vagina é colonizada predominantemente por bactérias comensais, principalmente por *Lactobacillus*, bactérias Gram positivas facultativas que mantêm pH ácido inibindo a proliferação de micro-organismos potencialmente patogênicos e outros organismos oportunistas. Técnicas de identificação de bactérias independentes dos meios de cultura, como o processamento de sequências e análise do RNA ribossômico 16S, evidenciaram espécies de *Lactobacillus* como *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* ⁽²⁰⁾. A manutenção do ecossistema saudável deve-se a produção de ácido láctico ⁽²⁰⁾, produção de peróxido de hidrogênio, atividade local das imunidades inata e adquirida. Além disso, o epitélio vaginal apresenta imunomoduladores, que constituem fatores de proteção, como componentes associados a membranas (“*Toll-like receptors*”), células fagocitárias, defensinas, lecitina ligadora de manose, proteínas de choque térmico, células T, células dendríticas, bacteriocinas e inibição de adesão do patógeno as células epiteliais vaginais ⁽²¹⁻²²⁾. Vale destacar que mudanças no ambiente vaginal podem desequilibrar a microbiota local, causando sintomas ginecológicos. Contudo, nas usuárias do SIU-LNG, o microbioma vaginal altera muito pouco ⁽²³⁾.

A imunidade da cavidade uterina é dada principalmente por linfócitos T (CD4 e CD8), macrófagos, imunoglobulinas, neutrófilos e células dendríticas do endométrio ⁽²⁴⁾

e pela imunidade humoral ⁽²⁵⁻²⁶⁾. Assim, a cavidade uterina foi considerada por muito tempo, em condições normais, um compartimento estéril. Apesar da extensa colonização do epitélio cérvico-vaginal, a presença de bactérias no seu interior estava associada a DIPA e endometrites ⁽²⁷⁾. Mas, recentes pesquisas contrariam essa premissa – estudo utilizando histerossalpingografica mostrou que a administração de esferas de albumina radioativas marcadas no orifício externo do colo alcançavam a cavidade uterina, em questão de minutos, mostrando o peristaltismo uterino e a ausência de bloqueio da ascensão dos micro-organismos da vagina para a cavidade uterina ⁽²⁸⁾. Esses resultados sugerem que por analogia o mesmo poderia ocorrer com as bactérias presentes na cavidade uterina. Investigações utilizando técnicas moleculares de sequenciamento de rRNA demonstraram uma microbiota em estado fisiológico. As bactérias no seu interior, muitas vezes estariam associadas a uma condição não patológica e a colonização estaria associada a inflamação epitelial, sugerindo um efeito adverso da bactéria ⁽²⁹⁾, onde o microbioma uterino estaria caracterizado principalmente por *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Lactobacillus* ⁽³⁰⁾. Interessante relatar em estudos recentes, o papel do microbioma uterino na etiologia do câncer endometrial – através da amplificação do DNA ribossômico 16S, refletindo uma diversidade bacteriana, sendo de relevância o *Atopobium vaginae* e *Porphyromonas sp*, associadas principalmente a pH vaginal maior que 4,5 ⁽³¹⁾.

Portanto, é plausível que na inserção do SIU-LNG, os micro-organismos provenientes da vagina ascendem através do colo uterino e produzem a formação de biofilmes na superfície do dispositivo. Os biofilmes consistem de uma estrutura de células microbiológicas que irreversivelmente se aderem à superfície submersa e produzem uma matriz polimérica extracelular (PES) que adere e promove a matriz estrutural – são altamente hidratadas (98% água) contendo canais de nutrientes e células em diferentes regiões do biofilme exibindo diferentes padrões de expressão gênica ⁽³²⁻³³⁾. Neste estado as micro-colônias de bactérias desenvolvem-se em comunidades organizadas com funções heterogêneas que multiplicam-se sobrevivendo num ambiente hostil ⁽³⁴⁻³⁷⁾. Esses revestimentos biológicos protegem essas cepas de bactérias das ações das células de defesa do hospedeiro e da ação dos antibióticos ⁽³⁸⁾. As células aderidas e envoltas por essa matriz são conhecidas como “micro-organismos sésseis”, enquanto que aquelas que se encontram livres, fora dessa estrutura, são chamadas de “micro-organismos planctônicos” ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. O biofilme nos dispositivos intrauterinos pode ser

compostos por bactérias Gram positivas, Gram negativas ou leveduras. As bactérias Gram positivas comumente isoladas são : *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e as Gram negativas são: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os biofilmes são compostos por uma ou múltipla espécies, dependendo do tipo do dispositivo e duração do uso. Longas exposições inevitavelmente conduzem a múltiplas espécies de biofilmes ⁽⁴¹⁾. Adicionalmente, o biofilme aderido aos implantes prejudica a identificação da microbiota pelos métodos diagnósticos microbiológicos convencionais ^(38, 42).

Assim, com o intuito de melhorar a identificação dos agentes produtores de biofilmes, a técnica de sonicação foi adicionada à microbiologia para a identificação de micro-organismos sésseis. Consiste na formação de microbolhas pela aplicação de ondas de ultrassom de baixa frequência e baixa intensidade sobre os implantes retirados assepticamente, proporcionando a destruição da superfície do biofilme sem produzir a destruição da bactéria, desta forma liberando os micro-organismos sésseis em meio líquido (fluido de sonicação) e permitindo a identificação da microbiota pelos métodos microbiológicos convencionais ^(34-35, 43-44). Mesmo em indivíduos com adequada reação imune celular e humoral , as infecções por biofilmes são raras e ocorre a resolução espontânea pelos mecanismos de defesa do hospedeiro ⁽⁴⁵⁾. Em estudos com próteses ortopédicas a cultura do fluido da sonicação do implante foi superior a cultura do tecido peri-implante nas infecções associadas aos implantes, demonstrando uma maior recuperação de agentes bacterianos ⁽³⁴⁻³⁶⁾. A sonicação é uma ferramenta que melhora a sensibilidade diagnóstica em infecções associadas a implantes médicos ⁽³⁴⁻³⁶⁾. Com a ampla aplicação de dispositivos médicos em todos os campos da medicina, diversos estudos demonstraram a maior recuperação de micro-organismos utilizando a técnica de sonicação em próteses ortopédicas ⁽³⁴⁻³⁶⁾, marca-passos ⁽⁴⁶⁾, próteses mamárias ⁽⁴⁷⁾, cateteres urinários ⁽⁴⁸⁾ e cateteres neurológicos ⁽⁴⁹⁾.

Então, a semelhança do que é realizado com outros tipos de implantes, estudos microbiológicos nos biofilmes dos DIUs removidos podem contribuir para aprimorar o conhecimento sobre a microbiota presente na cavidade uterina. Em relação às usuárias do SIU-LNG, pouco são os estudos que avaliaram os micro-organismos na cavidade endometrial e inexistem investigações que aplicaram a técnica de sonicação na

identificação da microbiota dos biofilmes dos DIUs removidos – razões que motivaram a realização dessa pesquisa.

OBJETIVOS:

O presente estudo em usuárias do SIU-LNG e que tiveram seus dispositivos removidos tem como objetivos:

- Caracterizar os agentes bacterianos aderidos ao biofilme dos SIU-LNG através da técnica de sonicação.
- Comparar os micro-organismos identificados nos biofilmes dos SIU-LNG com a microbiota vaginal utilizando a técnica de sonicação.

MATERIAIS E MÉTODOS:

1. **Desenho do estudo:** Em estudo do tipo transversal unicêntrico descritivo foram avaliadas 42 usuárias do SIU-LNG saudáveis, atendidas no Ambulatório de Ginecologia Endócrina, Climatério e Anticoncepção da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Brasil, no período de maio de 2014 a dezembro de 2015. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Instituição (078/14) onde todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um questionário de coleta de dados não validado (anexo 1 e 2).
2. **Critérios de inclusão e exclusão:** Foram incluídas usuárias do SIU-LNG (Bayer Shering Pharma Oy[®], Finland) que haviam realizado as inserções e seguimentos clínicos no ambulatório e que tinham indicações para a remoção dos dispositivos, seguindo as seguintes razões: 34 participantes por terem completado os cinco anos de uso, duas por desejo de gravidez, três pelo mal posicionamento do DIU, duas por sangramentos intermitentes e uma por dor persistente. Como critérios

de exclusão foram consideradas: portadoras do SIU-LNG com antecedente de uso prévio de antibiótico de até 14 dias antes da retirada e os casos de contaminação dos dispositivos na coleta, transporte ou durante o processamento no laboratório.

- 3. Coleta dos materiais e métodos microbiológicos.** Todas as participantes foram submetidas a anamnese completa e exame clínico ginecológico. A coleta de material seguiu sempre a mesma sequência: participante em posição ginecológica, seguido de introdução de espéculo estéril, não lubrificado, identificação do colo uterino para as seguintes coletas de amostras clínicas:

3.1- Coleta da secreção vaginal: Coleta das amostras da secreção vaginal e endocervical com um swab estéril de algodão, caracterizadas por secreção vaginal (SV). Esse coletor biológico foi inoculado imediatamente em frasco de transporte de amostras com meio *Amies* com carvão (Absorve[®], Citotest Labware Manufacturing CO., China). Após devidamente identificado, esses frascos eram enviados ao laboratório num prazo de até seis horas após a coleta.

3.2- Remoção e processamento dos dispositivos intrauterinos SIU-LNG: Os dispositivos foram removidos do interior da cavidade uterina por meio de tração dos fios com a pinça de *Cheron*, de forma cuidadosa visando evitar o contato com as paredes vaginais. Os dois fios do SIU-LNG eram então seccionados com tesoura estéril. A seguir, os fios e o corpo do DIU foram colocados separadamente em dois tubos individuais tipo Falcon volume 15 ml estéreis devidamente identificados, contendo 10 ml de solução de Ringer Lactato, que após vedados hermeticamente eram encaminhados ao laboratório em até seis horas. Com o intuito de avaliar a possibilidade de contaminação do corpo e fios do DIU com a microbiota da secreção vaginal, alíquotas de 10 µl (0,01ml) foram coletadas separadamente em dois frascos contendo o fluido do corpo do DIU sem sonicação (CDSS) e o fluido dos fios do DIU sem sonicação (FDSS) de 15 dispositivos. Estas 30 alíquotas, a seguir foram homogeneizadas e semeadas em meios de cultura apropriados.

Figura-1 ilustra o método de processamento da secreção vaginal, dos componentes corpo e fio do DIU, seguido da coleta de alíquotas de 10 µl de amostras para semeadura.

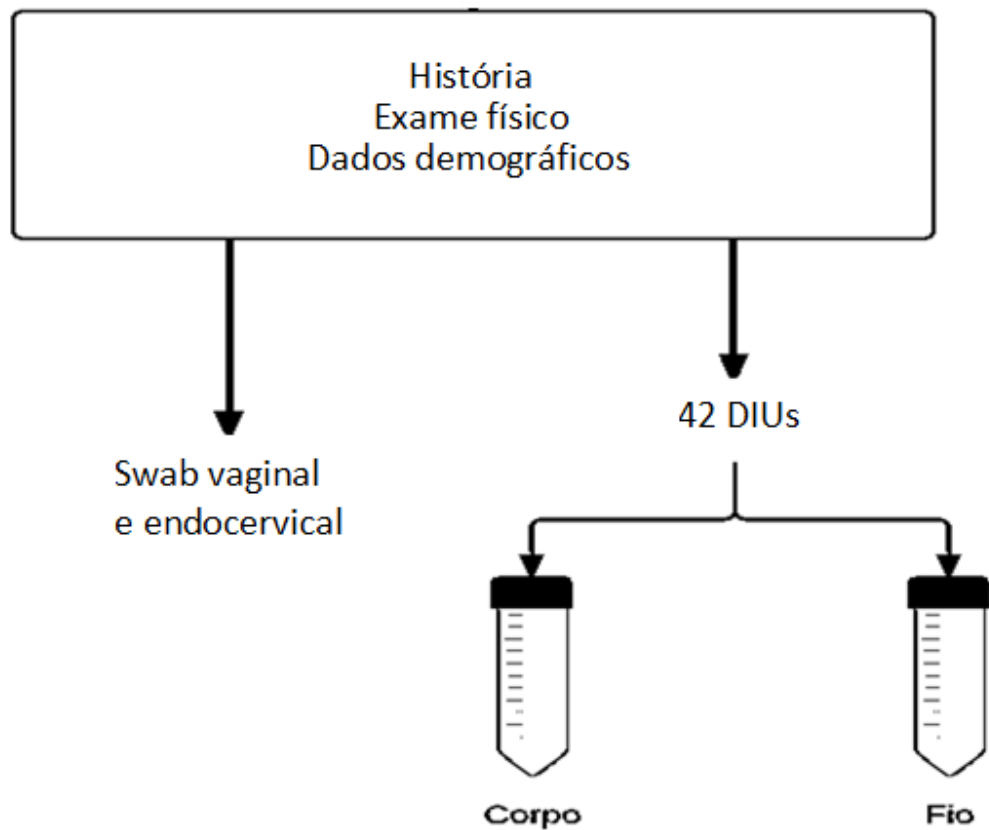


Figura 1- Dinâmica do estudo

4. **Técnica de sonicação:** No laboratório de microbiologia, os tubos Falcon contendo os fios do DIU e o corpo do DIU foram homogeneizados por 30 segundos utilizando Vortex-Genie 2[®] (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) e então submetidos à técnica de sonicação (Ultrasound bath BactoSonic[®]; Bandelin GmbH, Berlim, Alemanha) por 5 minutos (frequência de 40±2kHz e power density de 0.22±0,04 W/cm²), seguidos por homogeneização adicional de 30 segundos. Posteriormente, os tubos Falcon contendo fluido do corpo do DIU

com sonicação (CD) e do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) foram submetidos à centrifugação com 3000 rotações por minutos por 5 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi em seguida aspirado até o volume residual de 0,5 ml ⁽³⁵⁾.

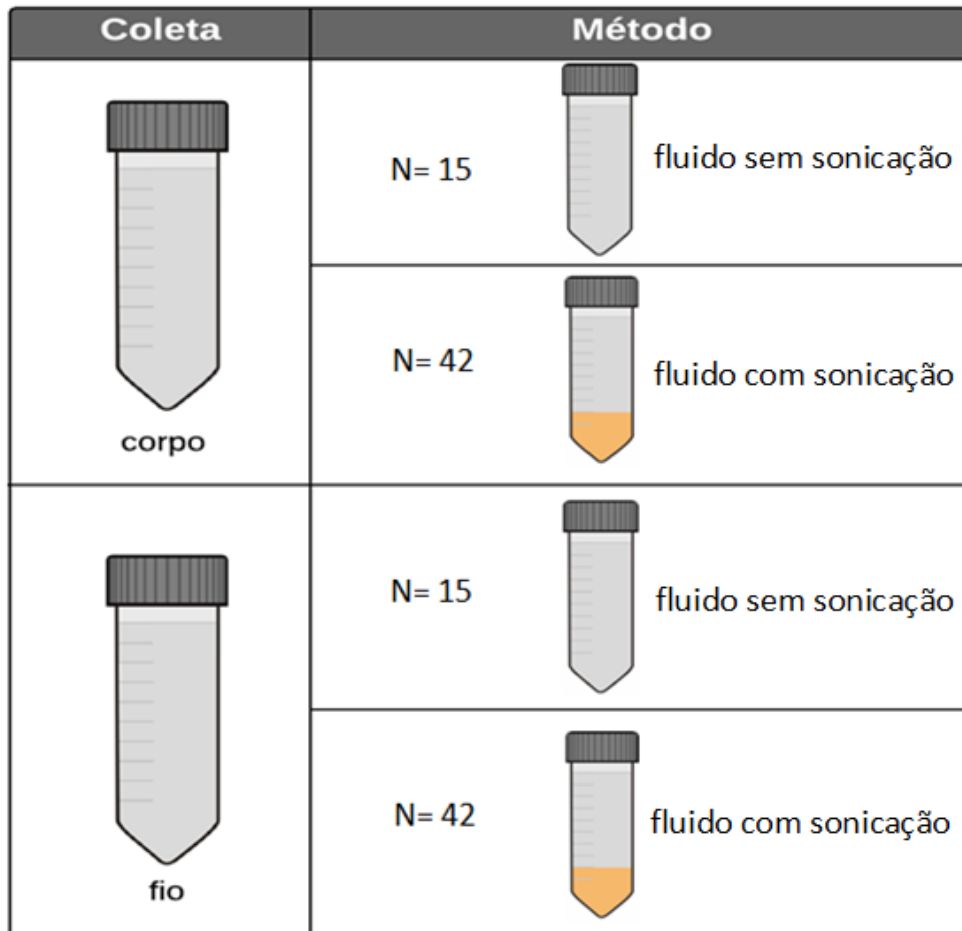


Figura 2 - Representação esquemática do método de comparação das amostras do fluido do corpo e fios dos DIUs com e sem sonicação.

5. Técnica de análise e identificação microbiológica:

5.1 – Secreção vaginal: As amostras foram semeadas em ágar sangue e ágar chocolate e em seguida incubadas em 35-37° C em 5-7 % de CO₂ durante 7 dias; cada colônia de micro-organismo era identificada por meio de técnicas

microbiológicas descritas abaixo.

5.2 – Fluidos do dispositivo intrauterino com sonicação e sem sonicação: Os fluidos do corpo e dos fios dos DIUs com sonicação e os fluidos do corpo e dos fios dos DIUs sem sonicação foram semeados por técnica quantitativa pelo auxílio de alça calibrada de 10 uL em placas de meios de cultura para micro-organismos aeróbios (ágar sangue e ágar chocolate) e cultura para micro-organismos anaeróbios (ágar anaerinsol-S). Uma alíquota de 0,5 ml de fluido do corpo do DIU com sonicação e do fluido dos fios do DIU com sonicação foram também inoculados no caldo de tioglicolato (BD[®] Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA), caracterizando respectivamente o fluido do corpo do DIU com sonicação no caldo de tioglicolato (CT) e fluido dos fios do DIU com sonicação no caldo de tioglicolato (FT).

As culturas para aeróbios foram incubadas à 37° C por 7 dias, enquanto que as placas para anaeróbios por 14 dias. Quatro ml do fluido de sonicação foram inoculados em 10 ml de caldo de tioglicolato e incubado a 35-37° C em 5 % de CO₂ por 2 dias e anaerobicamente em 37° C por 14 dias. Caso ocorresse turvação no caldo de tioglicolato em até 14 dias, estas amostras eram ressemeadas em meios de cultura sólido para identificação dos micro-organismos.

Todas as placas foram analisadas diariamente para acompanhamento do crescimento bacteriano, com exceção das placas de ágar anaerinsol-S. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) /ml era então realizada e foi considerada cultura positiva quando ≥ 50 UFC/ml do mesmo micro-organismo no fluido semeado ⁽³⁶⁾. Nos casos de crescimento de micro-organismos nas culturas, a rotina laboratorial era seguida para identificação dos agentes isolados.

A identificação bacteriana foi realizada por técnicas microbiológicas padronizadas na rotina laboratorial, incluindo avaliação da morfologia, propriedades tintoriais da coloração de Gram e testes bioquímicos ⁽⁵⁰⁾. O teste de catalase foi aplicado nas colônias Gram positivas para diferenciar *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. O teste da DNase

diferenciou *Staphylococcus aureus* dos *Staphylococcus* coagulase negativa. Os *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. foram identificados por hemólise (alfa, beta ou gama), habilidade para hidrolisar esculina na presença de bile e crescimento em 6,5 % de NaCl associado com testes de sensibilidade a optoquina ou bacitracina e CAMP *test*, quando necessários. As colônias de Gram negativos, da família *Enterobacteriaceae*, foram identificadas por série bioquímica composta pelas provas contidas no Meio de Rugai (indol, fermentação da glicose, produção de gás, produção de gás sulfídrico (H₂S), fenilalanina, ureia) associadas à utilização de citrato e motilidade. No caso dos não fermentadores de glicose foi utilizado um kit com provas apropriadas para estas espécies, contendo fermentação de açúcares (maltose, glicose e lactose), oxidação/fermentação da glicose, crescimento em ágar MacConkey, descarboxilação de aminoácidos (lisina, ornitina e arginina) e liquefação da gelatina e oxidase. As amostras de *Candida* spp. foram identificadas com auxílio de meios cromogênicos (Probac do Brasil ®) que apresentam diferentes cores associadas às espécies isoladas. Os micro-organismos anaeróbios estritos foram identificados pelo crescimento comparativo em aerobiose e anaerobiose e pelas características morfotintoriais na coloração de Gram.












Coleta	Semeadura	Procedimento
 Secreção vaginal (SV)	 ágar sangue  ágar chocolate	Atmosfera de CO2 Estufa Incubação
 corpo sem sonicação (CDSS)  corpo com sonicação (CD)	 ágar sangue  ágar chocolate	Atmosfera de CO2 Estufa Incubação
	 ágar anaerinsol - S	Atmosfera anaerobiose
 fio sem sonicação (FDSS)  fio com sonicação (FD)	 caldo tioglicolato	Estufa Incubação

Figura 3 - Representação esquemática do método de análise microbiológica das amostras de secreção vaginal, fluido do corpo e fios dos DIUs sem e com sonicação submetidos aos meios de cultura aeróbicos, anaeróbicos e meio líquido de tioglicolato.

6. **Análise estatística:** Foram utilizados os Testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher para as variáveis qualitativas, ou seja, frequências e proporções quando pertinentes. Para comparação das variáveis quantitativas entre os grupos foi utilizado Mann-Whitney, mediana e amplitude. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5%, ou $p < 0,05$. As avaliações dos dados foram realizadas através do programa SPSS e versão 13.0.

RESULTADOS

1. População do estudo:

Foram incluídas na pesquisa 52 usuárias do SIU-LNG que tiveram seus DIUs removidos. Destas, cinco foram excluídas por contaminação da amostra durante o processamento no laboratório, duas por contaminação durante o transporte e três pacientes que estavam em uso prévio de antibiótico até 14 dias antes da remoção do dispositivo; sendo assim, foram analisadas 42 usuárias do SIU-LNG. As indicações para inserção do DIU foram: 55 % (23/42) para anticoncepção, 26 % (11/42) por metrorragia, 9,5 % (4/42) por endometriose e 9,5 % (4/42) por doenças hematológicas - uma com doença de VonWillebrand, uma com trombocitopenia essencial e duas com anemia falciforme. As indicações para remoção dos dispositivos do SIU-LNG foram 81 % (34/42) dos casos por terem completado os cinco anos de uso indicado pelo fabricante, 5 % (2/42) por desejo de gravidez, 7 % (3/42) em decorrência do mal posicionamento dos DIUs, 5 % (2/42) em decorrência de sangramentos intermitentes e 2 % (1/42) por dor persistente. As principais características demográficas e clínicas das 42 participantes estão resumidas na Tabela 1, destacando o tempo médio de uso do SIU-LNG foi de 4 anos e 7 meses ($\pm 1,9$ anos) e a média de idade das mulheres submetidas a retirada foi de 40 (± 8 anos). Idade maior que 40 anos foi observado em 55 % (23/42) das usuárias de DIU. Amenorréia no momento da retirada do DIU foi observada em 69 % (29/42) e sinusorragia em 7 % (3/42). Observamos que 43 % (18/42) das mulheres tiveram mais que dois parceiros sexuais, 90,5 % (38/42) tiveram relação sexual há mais de 3 dias da retirada do SIU-LNG. A ausência de ectrópio foi observada em 93 % (39/42) e 17 % (7/42) apresentaram sangramento no momento da retirada do SIU-LNG independente do procedimento.

Tabela 1. Variáveis demográficas das 42 usuárias do SIU-LNG que foram incluídas na pesquisa microbiológica.

Variáveis demográficas	n=42	%
Idade (anos)		
< 40	19	45
>= 41	23	55
Etnia		
Branca	26	62
Outros	16	38
Estado marital		
Casada/união estável	31	74
Outros	11	26
Paridade		
<= 2	33	79
> 3	9	21
Indicação da inserção	21	50
Contracepção		
Indicação da retirada		
Término do tempo de uso	34	81
Desejo de gravidez e outros	8	19
Parceiros sexuais		
<= 2	24	57
> 3	18	43
Última relação sexual (dias)		
< 3	4	9,5
>= 4	38	90,5
Número de relações sexuais (por mes)		
<= 4	21	50
> 5	21	50
Amenorréia (meses)		
<= 12	24	57
13 a 48	9	21,5
>= 49	9	21,5
Sinusorragia	3	7
Ectrópio (cm)		
< 0,5	2	4,5
0,5-1,0	1	2,5
Corrimento	10	24
Sangramento na coleta (<i>swab</i>)	13	31
Sangramento no momento da retirada DIU	8	19

2. Avaliação de possível contaminação do corpo e dos fios do DIU com a microbiota vaginal durante a remoção dos dispositivos:

Com o objetivo de avaliar a possível contaminação das amostras provenientes do corpo e fios dos DIUs com a microbiota vaginal, realizou-se uma sub-análise microbiológica dos fluidos contendo os componentes do corpo e fios do DIU antes da realização da técnica de sonicação. Sendo assim, as tabelas 2 e 3 mostram a comparação da microbiota dos fluidos do corpo do DIU sem sonicação (CDSS) e fluido dos fios do DIU sem sonicação (FDSS) com os fluidos do corpo do DIU com sonicação (CD) e fluido dos fios do DIU com sonicação (FD). Os resultados evidenciam que não houve significância estatística entre a microbiota do corpo e dos fios dos DIUs submetidos ou não à técnica de sonicação.

Tabela 2- Comparação da microbiota do fluido do corpo do DIU sem sonicação (CDSS) com o fluido do corpo do DIU com sonicação (CD).

Micro-organismos	CDSS n = 21		CD n = 19		p
	No.	%	No.	%	
<i>Corynebacterium</i> spp.	10	48,0	10	52,0	0.751*
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	3	14,4	2	10,4	1,000**
<i>Enterococcus</i> spp.	1	4,8	1	5,2	1,000**
<i>Candida</i> spp.	2	9,6	2	10,4	1,000**
<i>Escherichia coli</i>	1	4,8	1	5,2	1,000**
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	4,8	1	5,2	1,000**
<i>Bacteroides</i> spp.	2	9,6	1	5,2	1,000**
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1	4,8	1	5,2	1,000**

* Teste de Qui-quadrado; ** Teste Exato de Fisher

Tabela 3 - Comparação da microbiota do fluido dos fios do DIU sem sonicação (FDSS) com o fluido dos fios do DIU com sonicação (FD).

Micro-organismos	FDSS n = 25		FD n = 26		p
	No.	%	No.	%	
<i>Corynebacterium</i> spp.	10	40,0	10	38,0	0.910*
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	3	12,0	5	19,0	0.703**
<i>Enterococcus</i> spp.	2	8,0	2	7,6	1,000**
<i>Candida</i> spp.	3	12,0	2	7,6	0.668**
<i>Escherichia coli</i>	1	4,0	1	3,8	1,000**
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	4,0	1	3,8	1,000**
<i>Bacteroides</i> spp.	4	16,0	4	15,2	1,000**
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1	4,0	1	3,8	1,000**

* Teste de Qui-quadrado; ** Teste Exato de Fisher

3. Identificação microbiana geral e comparação da microbiota da secreção vaginal (SV) com microbiota do corpo (CD) e fios do DIU (FD), submetidos à técnica de sonicação:

Os resultados das análises microbiológicas avaliadas de uma forma geral, incluindo todos os resultados de amostras positivas provenientes da secreção vaginal e dos fluidos de sonicação do corpo e dos fios dos DIUs cultivados em meios de cultura sólidos (ágar) e líquido (tioglicolato) identificaram um total de 390 micro-organismos. Destes, as bactérias Gram positivas foram isoladas em 70,0 % (272/390), as bactérias Gram negativas em 21,0 % (82/390) e as leveduras no gênero *Candida* spp. em 9,0 % (36/390). As bactérias aeróbicas, anaeróbicas estritas e anaeróbicas facultativas foram isoladas em 4,5 % (17/390), 11,0 % (43/390) e 84,5 % (330/390), respectivamente. Os agentes mais isolados nas análises microbiológicas do SIU-LNG foram Gram positivos, principalmente as espécies *Corynebacterium* spp. 29,7 % (116/390), *Staphylococcus* coagulase negativo 23 % (90/390) e *Enterococcus* spp. 10,5 % (41/390). Nos Gram negativos, os mais frequentes foram *Bacterioides* spp. 7,1 % (28/390), *Escherichia coli* 5,1 % (20/390) e *Pseudomonas aeruginosa* 3,0 % (12/390). As amostras negativas provenientes da secreção vaginal e dos fluidos do corpo e dos fios dos DIUs com sonicação cultivados em meios de cultura sólidos e líquido totalizaram 151 amostras, sendo 16 amostras aeróbicas e 135 anaeróbicas. É importante ressaltar que as amostras de secreção vaginal (SV) não foram semeadas em placas de meios de cultura para micro-organismos anaeróbios (ágar anaerinsol-S).

A Tabela 4 mostra o resultado microbiológico obtidos da microbiota da secreção vaginal (SV) e microbiota do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e do corpo do DIU com sonicação (CD). Observou-se que o número absoluto de micro-organismos encontrados foi maior na secreção vaginal (n = 93), seguida dos fios do DIU (n = 84) e do corpo do DIU (n = 64) submetidos à sonicação. *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus* spp. e *Candida* spp. foram os micro-organismos mais identificados. *Corynebacterium* spp. foi o agente mais identificado no corpo do DIU (CD), enquanto que *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus* spp. e *Candida* spp. foram mais identificados na secreção vaginal (SV). Entretanto, não houve significância estatística entre os micro-organismos identificados na microbiota secreção vaginal (SV), no fluido dos fios DIU com sonicação (FD) e no fluido do corpo DIU com sonicação (CD). As amostras da microbiota do fluido dos fios com sonicação

(FD) e do corpo com sonicação (CD) foram negativas, em 45,6 % (38/84) e 73,1 % (43/64) respectivamente, havendo significância estatística ($p < 0,001$). Não houve resultados negativos provenientes da secreção vaginal (SV).

Tabela 4: Comparação da microbiota da secreção vaginal (SV) com a microbiota do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD).

Micro-organismos	SV ^{&} n = 93		FD [§] n = 84		CD [#] n = 64		p*
	No.	%	No.	%	No.	%	
<i>Corynebacterium</i> spp.	34	37,4	29	34,5	25	42,5	0.851
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	25	27,5	18	21,5	12	20,4	0.457
<i>Enterococcus</i> spp.	10	11,0	7	8,0	5	8,5	0.781
<i>Candida</i> spp.	9	9,9	7	8,0	5	8,5	0.910
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4,4	1	1,2	1	1,7	0.351
<i>Escherichia coli</i>	5	5,5	4	5,0	3	5,1	0.964
<i>Lactobacillus</i> spp.	2	2,2	1	1,2	1	1,7	0.881
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,1	3	3,5	2	3,4	0.528
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,1	1	1,2	0	0,0	0.692
<i>Klebsiella</i> spp.	1	1,1	0	0,0	0	0,0	0.450
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1,1	1	1,2	0	0,0	0.692
<i>Streptococcus</i> grupo D não enteroc	0	0,0	1	1,2	1	1,7	0.515
<i>Alcaligenes</i> spp.	0	0,0	1	1,2	1	1,7	0.515
<i>Micrococcus</i> spp.	0	0,0	0	0,0	1	1,7	0.249
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0	0,0	2	2,4	2	3,4	0.262
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0	0,0	1	1,2	0	0,0	0.391
Negativo	0	0,0	38	45,6	43	73,1	< 0,001
Polimicrobiano	32	35,2	27	32,4	19	32,3	0.823

* Teste de Qui-quadrado; [&]SV: secreção vaginal. As amostras de SV não foram semeadas em meios de cultura para micro-organismos anaeróbicos (ágar anaerinsol-S); [§]FD: fluido dos fios do DIU com sonicação; [#]CD: fluido do corpo do DIU com sonicação.

A Tabela 5 mostra a comparação da microbiota da secreção vaginal (SV) com microbiota do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD), provenientes do meio de cultura aeróbico. Não houve significância estatística entre os micro-organismos identificados na secreção vaginal (SV) e fluido do corpo do DIU com sonicação (CD). Em relação as amostras negativas, houve significância estatística ($p = 0,001$) entre os achados. Não houve identificação de amostras negativas provenientes da secreção vaginal (SV).

Tabela 5: Comparação da microbiota da secreção vaginal (SV) com a microbiota do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD).

Micro-organismos	SV ^{&} n = 93		CD [#] n = 57		p
	No.	%	No.	%	
<i>Corynebacterium</i> spp.	34	37,4	25	42,5	0.374*
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	25	27,5	12	20,4	0.421*
<i>Enterococcus</i> spp.	10	11,0	5	8,5	0.695*
<i>Candida</i> spp.	9	9,9	5	8,5	0.853*
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4,4	1	1,7	0.650**
<i>Escherichia coli</i>	5	5,5	3	5,1	1,000**
<i>Lactobacillus</i> spp.	2	2,2	1	1,7	1,000**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,1	2	3,4	0.558**
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,1	0	0,0	1,000**
<i>Klebsiella</i> spp.	1	1,1	0	0,0	1,000**
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1,1	0	0,0	1,000**
<i>Streptococcus</i> grupo D não enteroc	0	0,0	1	1,7	0.380**
<i>Alcaligenes</i> spp.	0	0,0	1	1,7	0.380**
<i>Micrococcus</i> spp.	0	0,0	1	1,7	0.380**
Gram positivo	75	82,5	46	78,2	0.993*
Gram negativo	9	9,9	6	10,2	0.866*
Negativo	0	0,0	7	11,9	0.001**
Polimicrobiano	32	35,2	19	32,3	0.892*

* Teste de Qui-quadrado; ** Teste Exato de Fisher. [#]CD: fluido do corpo do DIU com sonicação; [&]SV: secreção vaginal. As amostras de SV não foram semeadas em meios de cultura para micro-organismos anaeróbios (ágar anaerinsol-S).

4. Comparação dos achados microbiológicos o corpo (CD) e dos fios do DIU (FD) provenientes da semeadura em meios de cultura sólidos (ágar sangue, ágar chocolate e ágar anaerinsol-S) e meio de cultura líquido (caldo de tioglicolato).

A tabela 6 mostra a identificação da microbiota do fluido dos fios do DIU com sonicação semeado no meio sólido (FD) comparado ao meio líquido (FT), onde não houve recuperação de micro-organismos utilizando meio de cultura líquido (caldo de tioglicolato). O *Corynebacterium* spp. foi o agente microbiológico mais prevalente na cultura em meio sólido, com significância estatística (p = 0,006).

A tabela 7 mostra a identificação da microbiota do fluido do corpo do DIU com sonicação semeado no meio sólido (CD) comparado ao meio líquido (CT), onde não houve recuperação de micro-organismos utilizando meio de cultura líquido (caldo de

tioglicolato). A identificação de *Corynebacterium* spp. foi o agente microbiológico mais prevalente na cultura em meio sólido, com significância estatística ($p = 0,034$).

Tabela 6 – Comparação da microbiota do fluido de sonicação dos fios do DIU semeados no meio cultura sólido (FD) com a microbiota no meio de cultura líquido (FT).

Micro-organismos	FD [§]		FT [°]		p
	n = 84		n = 81		
	No.	%	No.	%	
<i>Corynebacterium</i> spp.	29	34,5	13	15,6	0.006*
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	18	21,5	17	20,4	0.945*
<i>Enterococcus</i> spp.	7	8,0	11	13,5	0.280*
<i>Candida</i> spp.	7	8,0	8	9,6	0.730*
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1,2	5	6,0	0.113**
<i>Escherichia coli</i>	4	5,0	5	6,0	0.743**
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	1,2	1	1,2	1,000**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3,5	4	4,8	0.717**
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,2	1	1,2	1,000**
<i>Klebsiella</i> spp.	0	0,0	1	1,2	0.490**
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1,2	2	2,4	0.616**
<i>Streptococcus</i> grupo D não enterococos	1	1,2	2	2,4	0.616**
<i>Alcaligenes</i> spp.	1	1,2	1	1,2	1,000**
<i>Bacteroides</i> spp.	7	8,0	8	9,6	0.730*
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	2,4	2	2,4	1,000**
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1	1,2	0	0,0	1,000**
Polimicrobiano	27	32,4	23	27,6	0.601*

* Teste de Qui-quadrado; ** Teste Exato de Fisher. [§]FD: fluido dos fios do DIU com sonicação; [°]FT: fluido dos fios do DIU com sonicação no caldo de tioglicolato.

Tabela 7 Comparação na microbiota do fluido de sonicação do corpo do DIU semeados no meio de cultura sólido (CD) com a microbiota no meio de cultura líquido (CT).

Micro-organismos	CD [#]		CT		p
	n = 64		n = 68		
	No	%	No	%	
<i>Corynebacterium</i> spp.	25	40,0	15	22,5	0.034*
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	12	19,2	18	27,0	0.290*
<i>Enterococcus</i> spp.	5	8,0	8	12,0	0.446*
<i>Candida</i> spp.	5	8,0	7	10,5	0.620*
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1,6	2	3,0	1,000**
<i>Escherichia coli</i>	3	4,8	3	4,5	1,000**
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	1,6	1	1,5	1,000**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	3,2	2	3,0	1,000**
<i>Klebsiella</i> spp.	0	0,0	1	1,5	1,000**
<i>Streptococcus</i> grupo D não enteroc	1	1,6	0	0,0	0.485**
<i>Alcaligenes</i> spp.	1	1,5	1	1,5	1,000**
<i>Micrococcus</i> spp.	1	1,6	0	0,0	0.485**
<i>Bacteroides</i> spp.	5	8,0	8	12,0	0.446*
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	3,2	2	3,0	1,000**
Polimicrobiano	19	30,4	16	24,0	0.423*

* Teste de Qui-quadrado; ** Teste Exato de Fisher. [#]CD: fluido do corpo do DIU com sonicação; ^{\$}CT: fluido do corpo do DIU com sonicação no caldo de tioglicolato.

5. Contagem de colônias de micro-organismos provenientes do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD) e fluido dos fios do DIU com sonicação (FD).

O gráfico 1 mostra a contagem de colônias de micro-organismos provenientes de amostras do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD) e dos fios do DIU com sonicação (FD), com significância estatística ($p = 0,04$), sendo o maior número provenientes do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) quando comparadas com as amostras do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD).

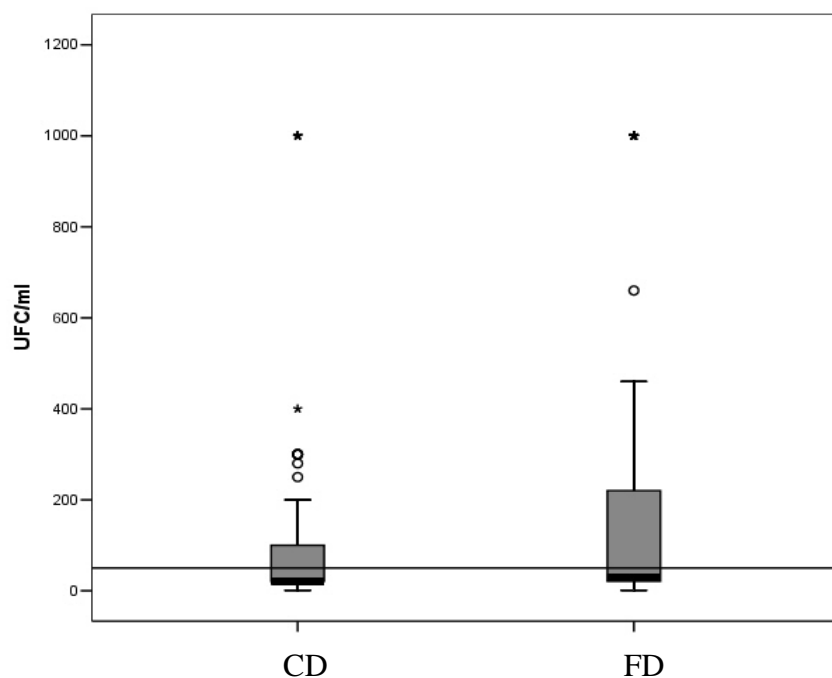


Gráfico 1- Identificação de maior número de colônias de micro-organismos provenientes do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) quando comparada as amostras do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD). O ponto de corte para considerar amostras positivas foi de 50 UFC/ml. Utilizou-se o Teste de Mann-Whitney para a comparação das variáveis quantitativas. O resultado mostrou significância estatística ($p = 0,04$).

6. Distribuição de micro-organismos provenientes do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD), fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e secreção vaginal (SV).

O gráfico 2 mostra a distribuição de micro-organismos provenientes de amostras do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD), fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e secreção vaginal (SV), sendo os micro-organismos mais prevalentes: *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo, *Candida* spp. e *Enterococcus* spp.. O maior número de agentes bacterianos foram provenientes da secreção vaginal (SV), seguida do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e depois do fluido do corpo do DIU com sonicação (CD). Não houve significância estatística entre as distribuições dos micro-organismos.

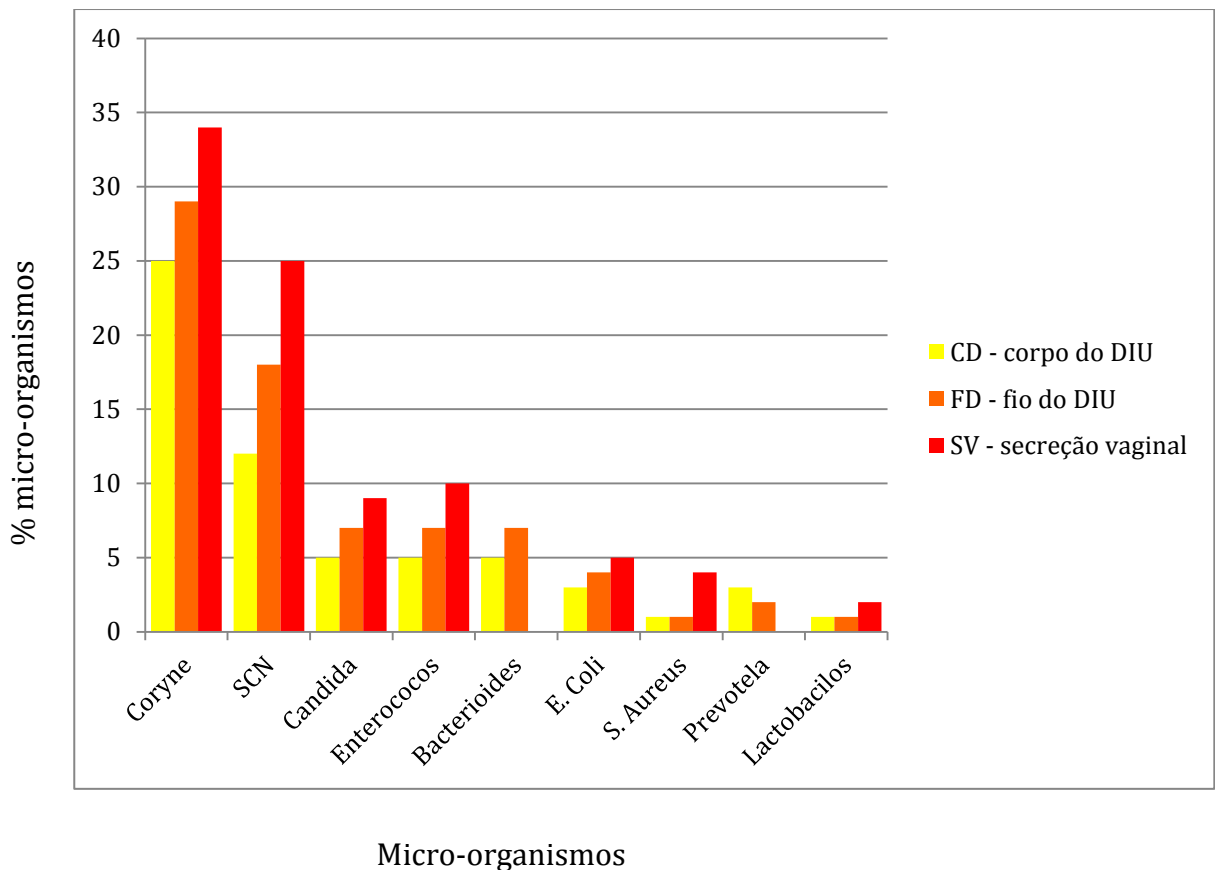


Gráfico 2: Distribuição de micro-organismos (%) identificados no fluido do corpo do DIU com sonicação (CD), fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e secreção vaginal (SV).

DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo que avaliou a microbiota da cavidade uterina e a presença de biofilme aderido ao SIU-LNG utilizando a técnica de sonicação, seguido pelos métodos de cultivo em meios sólido e líquido. O resultados mostraram que há provavelmente formação de biofilme aderido aos implantes removidos da cavidade uterina, e a comparação das análises microbiológicas do fluido do DIU com sonicação e da secreção vaginal mostraram resultados semelhantes.

Este achado, por si só se reveste de grande importância, pois evidências recentes demonstraram a presença de uma microbiota na cavidade endometrial em estado fisiológico; de fato, os micro-organismos não estavam associados a resposta inflamatória, comportando-se como uma condição não patológica e a concentração

bacteriana na cavidade endometrial se mostrou inferior à da vagina^(27, 29-30). A presença de colonização bacteriana no trato genital superior deve-se provavelmente à contaminação de micro-organismos que ascendem da vagina⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Em usuárias do SIU-LNG, um achado significativo, é que logo nos primeiros 20 dias após a inserção do dispositivo, ocorre aumento transitório na frequência de infecção pélvica, especialmente nas portadoras de doenças sexualmente transmissíveis causada por *Chlamidia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoea* e vaginose bacteriana. Esta constatação justifica-se pela presença de micro-organismos no canal cervical e/ou vagina no momento da inserção⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾ e que, podem migrar para o interior da cavidade uterina⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾. Estudos demonstram que a vaginose bacteriana constitui um desvio da microbiota vaginal, com predomínio do crescimento polimicrobiano, e este desequilíbrio predispõe à DIPA e outras doenças sexualmente transmissíveis⁽⁵⁸⁾. Além disso, ocorrem complicações gravídicas como parto pré-termo, corioaminionite, rotura prematura de membranas e endometrite pós-parto⁽⁵⁹⁾.

Adicionalmente, a colonização da microbiota vaginal é constituída predominantemente por bactérias comensais produtoras de ácido láctico, tais como o *Lactobacillus* spp. que contribuem para a manutenção do pH ácido no ambiente, promovendo a inibição do crescimento de outros patógenos⁽⁶⁰⁾. A composição da microbiota vaginal é dinâmica e sofre constantes influências de fatores que interferem na presença do *Lactobacillus* spp., como endócrinos (ciclo menstrual / gravidez), sexuais, mecânicos (contraceptivos de barreira) e comportamentais (higiene, troca de parceiros sexuais)⁽⁶¹⁾. Sendo assim, há uma proporção variável de mulheres saudáveis assintomáticas que apresentam baixas concentrações de *Lactobacillus* spp., favorecendo a colonização de outros micro-organismos, entre as quais, as espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, Enterobacteriaceae (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli* e *Proteus* spp.) e bactérias anaeróbias estritas⁽⁶²⁻⁶³⁾.

No presente estudo, a microbiota vaginal de mulheres saudáveis e assintomáticas predominou o *Corynebacterium* spp. (37,4 %), *Staphylococcus* coagulase negativo (27,5 %), *Enterococcus* spp. (11%) e *Candida* spp. (9,9 %). Os mesmos micro-organismos foram igualmente encontrados com maior frequência no fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e corpo do DIU com sonicação (CD). Interessante acrescentar que a frequência de *Lactobacillus* spp. identificados na secreção vaginal (SV), nos fios do DIU (FD) e corpo do DIU com sonicação (CD) foram muito baixas. A explicação pode estar

associada a permanência prolongada do SIU-LNG na cavidade uterina (4 anos e 7 meses).

Em estudo prévio que analisa a microbiota do trato genital superior em usuárias de DIU de cobre mostra culturas positivas em 94,5 % dos dispositivos retirados. Os micro-organismos mais comumente encontrados são *Staphylococcus* coagulase negativo, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, sendo atribuídos à contaminação na retirada do dispositivo através da vagina e do cérvix uterino ⁽⁴³⁾. No presente estudo utilizou-se a técnica de sonicação nos SIU-LNG retirados com o intuito de incrementar a identificação de micro-organismos nos biofilmes. De fato, dentre os agentes microbiológicos mais frequentes formadores de biofilme estão *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp, e *Candida* spp., os mesmos encontrados no fluido do corpo do DIU com sonicação (CD), nos fios do DIU com sonicação (FD) e secreção vaginal (SV). Adicionalmente, foram identificados micro-organismos em todas as culturas da secreção vaginal (SV), ao contrário das culturas provenientes do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e corpo do DIU com sonicação (CD) que não apresentaram crescimento bacteriano em 45,6 % e 73,1 % respectivamente, com significância estatística.

Segundo a literatura, nas usuárias do SIU-LNG, o aumento da viscosidade do muco cervical ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ induzida pelo progestágeno dificulta a colonização de micro-organismos na cavidade uterina provenientes da vagina. Soma-se a esse fato, a presença de imunomoduladores no muco cervical ⁽¹⁹⁾ representados pela imunidade adquirida - linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas - e imunidade humoral ⁽²⁴⁻²⁵⁾ que atuam como fatores de proteção do trato genital feminino. No presente estudo, dos efeitos protetores induzidos pela ação do progestágeno não foram eficazes. Entretanto, nossos achados demonstraram um número absoluto de micro-organismos significativamente menor no corpo e nos fios do DIU quando comparados com a secreção vaginal. Além disso, as propriedades e características da microbiota endometrial normal e microbioma vaginal ainda são pouco conhecidas em usuárias do SIU-LNG ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Estudos relatam que o uso prolongado de SIU-LNG está associado a maior frequência de *Candida* spp. nos esfregaços cérvico-vaginais. Isto provavelmente se deve à maior frequência de ovulações em decorrência do aumento do nível de estrogênio e conseqüentemente do glicogênio ⁽⁶⁴⁾ após 1 ano de inserção ⁽⁶⁵⁾. No presente estudo observamos que a *Candida* spp. foi o quarto micro-organismo mais isolado, em torno de

10% nas amostras. Apesar de tratar-se de mulheres assintomáticas, a presença do progestágeno parece ter contribuído para estes achados.

Apesar de estudos que avaliam a presença de biofilme nos DIUs serem escassos ⁽⁶⁶⁾, os micro-organismos presentes na microbiota vaginal podem ascender para a cavidade endometrial e desenvolver condições propícias para a formação de biofilmes na superfície dos dispositivos. Os principais agentes que possuem habilidade intrínseca de formar biofilme são o *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp., tornando estes dispositivos vulneráveis. Pál Z et al (2005), encontraram grande quantidade de micro-organismos formadores de biofilme em DIUs removidos de mulheres com e sem sintomas de DIPA, e uma associação positiva entre a permanência do DIU na cavidade e maior concentração de micro-organismos sésseis ⁽⁶⁶⁾.

Neste estudo, atenções especiais foram destinadas para a microbiota bacteriana dos biofilmes dos dispositivos de usuárias SIU-LNG e para o desempenho da técnica de sonicação como método de aprimoramento na recuperação bacteriana ⁽³⁵⁾. A técnica de sonicação consiste em emissão de microbolhas por ultrassom de baixa frequência e baixa intensidade que rompem o biofilme sem perder a viabilidade dos micro-organismos ⁽⁶⁷⁾.

Os resultados do presente estudo mostraram que a técnica de sonicação, diferentemente do que ocorreu em estudos com implantes ortopédicos e cardíacos infectados, não incrementou a recuperação de agentes formadores de biofilme na cavidade uterina, já que os micro-organismos identificados nos 42 DIUs foram os mesmos identificados na secreção vaginal. Não obstante, não houve recuperação de agentes diferentes entre a secreção vaginal e o corpo do DIU, e tampouco não houve diferenças estatísticas entre os achados microbiológicos das amostras provenientes do fluido com sonicação (representando o biofilme) e do fluido sem sonicação (representando a microbiota da cavidade uterina) realizado em 15 implantes. As possíveis explicações para estes achados podem estar associadas ao tamanho amostral reduzido, dificuldade na liberação de agentes sésseis dos dispositivos pela técnica de sonicação ou pelo número reduzido de micro-organismos no interior do biofilme em decorrência do efeito protetor parcial do muco cervical.

Em estudos prévios de Costerton et al (2012), os meios de cultura líquido proporcionam melhores condições para o crescimento de micro-organismos sésseis provenientes dos biofilmes, quando comparados aos meios de cultura sólidos ^(45, 68). No

presente estudo, as amostras do fluido dos fios do DIU com sonicação (FD) e do corpo do DIU com sonicação (CD) semeadas em caldo de tioglicolato não foram mais eficientes em identificar a presença de *Corynebacterium* spp. quando comparada à semeadura em meios sólidos. As espécies do gênero *Corynebacterium* são bastonetes Gram positivos com comportamento aeróbio ou anaeróbio facultativo, que estão distribuídas em uma ampla gama de ambientes ecológicos, incluindo a pele humana e trato genital feminino, porém, podem ainda ser responsáveis por doença inflamatória pélvica e infecções associadas a formação de biofilmes ⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾. *Corynebacterium* são agentes exigentes no cultivo laboratorial, crescendo lentamente após a inoculação em meios de cultivo enriquecidos como o caldo de tioglicolato, porém, podem também crescer em ágar sangue ⁽⁷⁰⁾. Importante observar que os biofilmes podem ter se formado através de micro-organismos que ascendem da vagina através do fio do DIU e estas usuárias não apresentam sintomas de infecção endometrial, além disso, a maior prevalência do *Corynebacterium* spp no estudo deve-se ao método de recuperação dos micro-organismos.

O presente estudo apresenta limitações por tratar-se de um estudo transversal de investigação exclusivamente microbiológica fenotípica em mulheres saudáveis e sem sintomas de infecção. A análise de bactérias estritamente anaeróbias (por exemplo, *Bacteroides* spp.) na secreção vaginal foi prejudicada pela ausência de cultivo em meios sólidos específicos (ágar anaerinsol-S) e de difícil crescimento. Entretanto, utilizamos este meio para os cultivos de anaeróbios estritos em amostras do corpo e fios do DIU. Além disso, todas as amostras da secreção vaginal, fio do DIU e corpo do DIU foram inoculadas em meios sólidos e caldo de tioglicolato, favorecendo o crescimento e identificação de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas e estritas. Reconhecemos também, que o tamanho amostral foi pequeno, o que pode ter influenciado os resultados do presente estudo. Entretanto, até onde sabemos, este foi o primeiro estudo que demonstrou a presença de biofilmes aderidos ao SIU-LNG utilizando a técnica de sonicação validada. Adicionalmente, não houve coleta de amostras de tecido endometrial para confirmação de endometrite crônica nestas mulheres, o que poderia estar associado aos 21,6 % dos casos de sangramentos uterinos e 7 % de sinusorragias.

Estudos futuros que utilizem técnicas moleculares em mulheres saudáveis e com sinais e sintomas de endometrite permitirão elucidar melhor estes resultados.

CONCLUSÕES

O presente estudo em usuárias do SIU-LNG e que tiveram seus dispositivos removidos permitiu-nos concluir que:

1. A cavidade endometrial não é estéril e os agentes encontrados nos biofilmes dos DIUs provavelmente ascenderam da cavidade vaginal. Os micro-organismos sésseis aderidos aos biofilmes mais identificados pela técnica de sonicação são as bactérias Gram positivas *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo e *Enterococcus* spp.
2. Os micro-organismos identificados nos biofilmes dos SIU-LNG são semelhantes aos detectados na microbiota vaginal, portanto a técnica de sonicação não incrementou a recuperação de agentes formadores de biofilme na cavidade uterina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fritz MA, Speroff L. Intrauterine Contraception. In: Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8th ed. Philadelphia: W Lippincott; 2011.
2. Luukkainen T, Allonen H, Haukkamaa M, Lähteenmäki P, Nilsson CG, Toivonen J. Five years' experience with levonorgestrel-releasing IUDs. *Contraception*. 1986;33:139-48.
3. Natavio MF, Taylor D, Lewis RA, Blumenthal P, Felix CF, Melamed A, Gentschein E, Stanczyk FZ, Mishell Jr DR. Temporal changes in cervical mucus after insertion of the levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Contraception*. 2013;426-31.
4. Bahamondes L, Valeria Bahamondes M, Shulman LP. Non-contraceptive benefits of hormonal and intrauterine reversible contraceptive methods. *Hum Reprod Update*. 2015;21:640-51.
5. Toivonen J, Luukkainen T, Allonen H. Protective effect of intrauterine release of levonorgestrel on pelvic infection: Three years' comparative experience of levonorgestrel and Cooper-releasing intrauterine devices. *Obstet Gynecol*. 1991;77:261-4.
6. Tatum HJ, Schmidt, Phillips FH et al. The Dalkon Shield controversy, structural and bacteriological studies of IUD tails. *JAMA*. 1975;231:711-7.
7. Evans DT. *Actinomyces israelii* in the female genital tract: a review. *Genitourin Med*. 1993;69(1):54-9.
8. Merki-Feld GS, Lebeda E, Hogg B, Keller PJ. The incidence of *Actinomyces*-like organisms in Papanicolaou-stained smears of copper and levonorgestrel-releasing intrauterine devices. *Contraception*. 2000;61:365-8.
9. Farley TM, Rosenberg MJ, Rowe PJ, Chen JH, Meirik O. Intrauterine devices and pelvic inflammatory disease: an international perspective. *Lancet*. 1992;28:339(8796):785-8.
10. Grimes DA. Intrauterine device and upper-genital-tract infection. *Lancet*. 2000;356:1013-9.
11. Washington AE, Aral SO, Wolner-Hanssen P et al. Assessing risk for caption inflammatory disease and its sequelae. *JAMA*. 1991;266:2581-6.
12. Faundes A, Telles E, Cristofolletti ML et al. The risk of inadvertent intrauterine device insertion in women carriers of endocervical *Chlamydia trachomatis*. *Contraception*. 1998;58:105-9.
13. Lago, RF, Simões JA, Bahamondes L et al. Follow-up of users of intrauterine device with and without bacterial vaginosis and other cervico vaginal infections. *Contraception*.

2003;68:105-8.

14. Morrison CS, Sekadde-Kidondu C, Miller WC et al. Use of sexually transmitted disease risk assessment algorithms for selection of intrauterine device candidates. *Contraception*. 1999;59:97-106.

15. Tsanadis G, Kalantaridou S N, et al. Bacteriological cultures of removed intrauterine devices and pelvic inflammatory disease. *Contraception*. 2002;65: 339-42.

16. Andersson, K and Rybo, G. Levonorgestrel releasing intrauterine device in the treatment of menorrhagia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990;97:690-4.

17. Lewis R, Taylor D, Natavio M, Melamed A, Felix J, Mishell DR. Effects of the levonorgestrel-containing intrauterine system on cervical mucus quality and sperm penetrability. *Contraception*. 2010; 82:491-6.

18. Sparks RA, Purrier BG, Watt PJ, Elstein M. Bacteriological colonization of uterine cavity: role of tailed intrauterine contraceptive device. *Br Med J*. 1981; 282:1189-91.

19. Rebello R, Green FHY, Fox H. A study of the secretory immune system of the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol*. 1975;82:812-6.

20. Pavlova SI, Kilic SS, So JS et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16 S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol*. 2002;92:451-9.

21. Linhares IM, Giraldo PC, Baracat EC. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(3):370-4.

22. Nguyen PV, Kafka JK, Ferreira VH et al. Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cell Mol Immunol*. 2014;11:410-27.

23. Jacobson JC, Turok DK, Dermish AI, Nygaard IE, Settles ML. Vaginal microbiome changes with levonorgestrel intrauterine system placement. *Contraception*. 2014;90(2):130-5.

24. Achilles SL, Hillier S. The complexity of contraceptives: understanding their impact on genital immune cells and vaginal microbiota. *AIDS*. 2013;27(1):S5-15.

25. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly (I:C). *J Immunol*. 2005;174:992-1002.

26. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol*. 2002;57:61-79.

27. Andrews WW, Hauth JC, Cliver SP, Conner MG, Goldenberg RI, et al. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with endometrial microbial colonization and plasma cell endometritis in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:1611-6.
28. Kunz G, Beil D, Deiniger R et al. The uterine peristaltic pump. Normal and impeded sperm transport within the female tract. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:267-77.
29. Mitchell, CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, Fredricks DN, Eschenbach D. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;212:611.e1-9.
30. Verstraelen H, Vichez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, Verhelst R, Sutter PD, Pieper DH, Wiele TVD. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ.* 2016;4:e1602.
31. Walther-António MRS, Chen J, Multinu F et al. Potencial contribution of the uterine microbiome in the development of endometrial cancer. *Genome Med.* 2016;8(1):122.
32. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-90.
33. Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(4):1181-6.
34. Yano MH, M, Klautau GB, da Silva CB, Nigro S, Avanzi O, Mercadante MT, Salles MJ. Improved diagnosis of infection associated with osteosynthesis by use of sonification of fracture fixation implants. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4176-82.
35. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654-63.
36. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wust J, Trampuz A. Improved diagnosis of implants periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonification fluid from removed. *J Clin Microbiol.* 2010;1208-14.
37. DeBeer. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.* 1994;43(11):1131-8.
38. Sampedro MF, Huddleston PM, Piper KE, et al. A biofilm approach to detect bacteria on removed spinal implants. *Spine.* 2010;35:1218-24.
39. Wolcott R et col. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:107-12.
40. Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:204-9.

41. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1387-92.
42. Evans RP, Nelson CL, Bowen WR, Kleve MG, 8. Dougherty SH: Pathobiology of infection in prosthetic devices. *Rev Infect Dis.* 1988;10:1102-17.
43. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR et al. Sonification of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357(7):654-63.
44. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L et al. Sonification versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2013;51:591-4.
45. Khoury AE, Lam K, Ellis B, Costerton JW. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. 1992;38(3):M174-8.
46. Rohacek M, Weisser M, Kobza R et al. Bacterial colonization and infection of electrophysiological cardiac devices detected with sonication and swab culture. *Circulation.* 2010;121(15):1691-7.
47. Rieger UM, Mesina J, Kalbermatten DF, Haug M, Frey HP, Pico R et al. Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants. *Br J Surg.* 2013; 100(6):768-74.
48. Holà V, Ruzicka F, Horka M. Microbial diversity in biofilm infections of the urinary tract with the use of sonication techniques. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59(3):525-8.
49. Jost GF, Wasner M, Taub E, Walti L, Mariani L, Trampuz A. Sonication of catheter tips for improved detection of microorganisms on external ventricular drains and ventrículo-peritoneal shunts. *J Clin Neurosci.* 2014;21(4):578-82.
50. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, 2010, Vol. 23 No.
51. Duff P, Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ. Endometrial culture techniques in puerperal patients. *Obstet Gynecol.* 1983;61:217-22.
52. Teisala K. Endometrial microbial flora of hysterectomy specimens. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1987;26:151-5.
53. Cicinelli E, Ballini A, Marinaccio M, et al. Microbiological findings in endometrial specimen: our experience. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285:1325-9.
54. Faundes A, Telles E, Cristofolletti ML, Faundes D, Castro S, Hardy E. The risk of inadvertent intrauterine device insertion in women carriers of endocervical *Chlamydia trachomatis*. *Contraception.* 1998;58:105-9.

55. Lago RF, Simoes JA, Bahamondes L, et al. Follow-up of users of intrauterine device with and without bacterial vaginosis and other cervicovaginal infections. *Contraception*. 2003;68:105-9.
56. Meirik O. Intrauterine devices – upper and lower genital tract infections. *Contraception*. 2007;75(6):S41-7.
57. Gareen IF, Greeland S, Morgenstern H. Intrauterine devices and PID: meta-analyses of published studies 1974-1990. *Epidemiology*. 2000;11:589-97.
58. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis*. 1999;180(6):1863-8.
59. Kimberlin DF, Andrews WW. Bacterial vaginosis: association with adverse pregnancy outcome. *Semin Perinatol*. 1998;22(4):242-50.
60. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204:120.e1-5.
61. Gajer P, Brotman RM, Gai G et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*. 2012;4(132):132ra52.
62. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*. 2007;1(2):121–33.
63. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(1):4680-7.
64. Lessard T, Simões JA, Discacciati MG, Hidalgo M, Bahamondes L. Cytological evaluation and investigation of the vaginal flora of long-term users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS). *Contraception*. 2008;77(1):30-3.
65. Donders GG et al. Vaginal flora changes on Pap smears after insertion of levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Contraception*. 2011;83(4):352-6.
66. Z. Pál, E. Urbán, E. Dósa, A. Pál, E. Nagy. Biofilm formation on intrauterine devices in relation to duration of use. *J Med Microbiol* . 2005;54:1199–203.
67. Trampuz A, Steinrücken J, Clauss M, Bizzini A, Furustrand U, Uckay I, Peter R, Bille J, Borens O. New methods for the diagnosis of implant-associated infections [article in French]. *Rev Med Suisse*. 2010; 6:731-4.
68. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, Costerton JW, Moter A, Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65:127–45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x>.
69. Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota and bacterial

vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008;2008:750479.

70. Kalra A, Palcu CT, Sobel JD, Akins RA. Bacterial Vaginosis: Culture- and PCR based Characterizations of a Complex Polymicrobial Disease's Pathobiology. *Curr Infect Dis Rep.* 2007;9(6):485-500.

Anexo 1:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do Protocolo – Sonicação _____

Nome da Paciente _____

ESTUDO:

Você inseriu um sistema intrauterino liberador de levonorgestrel por contracepção e já chegou a hora de retirar . Alguns dos motivos fez com você desistisse do método: desejo de gravidez, vencimento do prazo de validade, sangramento, infecção ou dor. Neste estudo será retirado o DIU e será colhido material para identificar qual é a bactéria que fica dentro do útero e que pode causar dor, sangramento ou infecção.

OBJETIVOS DO ESTUDO:

O objetivo deste estudo é identificar se existem bactérias presentes nos DIUs removidos e testar o desempenho de uma técnica para detecção de bactéria nos DIUs.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

Se você concordar em participar deste estudo, o DIU retirado e os materiais colhidos da vagina e colo do útero serão encaminhados para o laboratório de microbiologia da Santa Casa, e serão analisados para detectar se há alguma bactéria no DIU.

Antes de retirar o material DIU, será realizado exame ginecológico.

Durante a pesquisa, você terá suas visitas médicas ambulatoriais (Ambulatório de Ginecologia Endócrina, Climatério e Anticoncepção da Santa Casa de São Paulo) normalmente agendadas.

BENEFÍCIOS E POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS:

Os benefícios de saber se há bactérias no DIU, e se existe alguma relação com sintomas de sangramento e dor. A participação no estudo não causaria efeitos colaterais ou riscos para sua saúde.

SEUS DIREITOS:

A sua participação é totalmente voluntária. Isso significa que não é obrigatória. A continuidade do tratamento e a atitude de seu médico não serão afetadas caso você decida não fazer parte deste estudo. Se participar, você precisará assinar um documento dizendo que você esta dando o seu consentimento.

Contudo, você poderá retirar-se do estudo a qualquer momento sem penalização alguma e sem prejuízo aos seus cuidados. Para a sua própria segurança, é aconselhável avisar o investigador responsável se você pretender retirar-se do estudo.

As informações obtidas serão confidenciais. No registro dos resultados deste estudo, você será referida apenas por suas iniciais.

Você receberá uma cópia deste documento de consentimento informado e poderá solicitar informações adicionais, a qualquer tempo.

Dra. Cristina Miti Nishimura

Telefone trabalho: (11) 5052 9880

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

1. Declaro ter lido o consentimento informado. Recebi explicação da natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo. Minhas dúvidas foram esclarecidas.

2. Concordo em participar da pesquisa, cooperando totalmente com a investigadora, com a qual me comunicarei caso sofra qualquer sintoma inesperado ou incomum. E também comunicarei a investigadora sobre quaisquer outros tratamentos médicos que se fizerem necessários.

3. Informei a investigadora sobre doenças anteriores e medicamentos utilizados.

4. Estou ciente de que, se não cooperar integralmente com as solicitações e orientações da investigadora, posso prejudicar o estudo.

5. Entendo que a minha participação é voluntária e que posso retirar-me do estudo, a qualquer tempo, sem nenhuma penalidade ou perda ou perda de benefícios aos quais eu tenha direito.

6. Fui informada de que este estudo foi submetido ao Comitê de Ética da instituição.

7. Concordo que os resultados do estudo sejam comunicados às autoridades apropriadas, publicados em revistas científicas.

Meu nome e endereço permaneceram confidenciais.

8. Meu nome e endereço permanecerão confidenciais.

9. Representantes do Comitê de Ética ou autoridades governamentais podem examinar meus registros médicos para verificar as informações coletadas. Ao assinar este documento, dou minha permissão para revisão de meus registros médicos.

Declaro, após convenientemente esclarecida pela pesquisadora e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar da presente pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura da participante da pesquisa ou responsável legal

Assinatura da Pesquisadora (carimbo e nome legível)

Anexo 2:

QUESTIONÁRIO

ANÁLISE DA MICROBIOTA DOS BIOFILMES DOS DISPOSITIVOS INTRAUTERINOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE SONICAÇÃO

Nome:

Data:

Registro:

Estado marital:

Raça:

Endereço:

Telefone: ()

Idade:

Gestação:

Paridade:

Aborto:

Data da inserção:

Número do estudo:

Indicação da inserção : Contracepção () Pós-aborto () Metrorragia () Doença hematológica () Transplantada () Mioma () Endometriose () Dor pélvica () Tensão pré-menstrual () Terapia hormonal: transição () pós-menopausal ()

Método contraceptivo anterior:

Após inserção: sangramento () dor () infecção () corrimento ()

Característica:

Uso de anti-inflamatório não hormonal: dor () sangramento ()

Sangramento: Spotting (3-5 d) () Sangramento (>3-5d) ()

Frequente () Infrequente () - x/mês, x/ano

Amenorreia () Depois de quanto tempo?

Data última menstruação: ciclo regular () ciclo irregular ()

Sinusorragia: sim () não ()

Dor: Dispaureunia de penetração () de profundidade ()

Infecção: Corrimento ou infecção vaginal: sim () não ()

Doença sexualmente transmissível anterior: sim () não () - Idade:

Causa: Antibiótico: sim () não () qual:

Infecção após 20 dias pós inserção: sim () não ()

Infecção após 3-4 meses pós inserção: sim () não ()

Última relação sexual: menos de 3 dias () mais de 3 dias ()

Uso de creme vaginal últimos 7 dias: sim () não ()

Número de parceiros: 1 () 2 () 3 () 4 ou mais ()

Número de relações sexuais: : 0 () 1 () 2 () 3 ()

4 () 5 ou mais/mês ()

Menarca:

Coitarca:

Indicação da retirada: Término do tempo de uso ()

Desejo de gravidez () dificuldade de adaptação com o método ()

Antibiótico nos últimos 14 dias: sim () não ()

Doença associada:

Trombofilia: sim () não ()

Medicações em uso:

Exame físico:

Ectrópio: não ()

Sim () ate 0,5 cm () 0,5-1,0 cm () >1,0 cm ()

Secreção vaginal: sim () não () Aspecto:

Sangramento na coleta com escova: sim () não ()

Colpite: sim () não ()

Candidíase () Vaginose bacteriana () Tricomoniase ()

Ultrassonografia: (/ /):

Citologia oncótica (/ /):

Actinomyces: sim () nao ()

Captura híbrida: () clamídia () gonococo ()

Horário da coleta:

Horário da entrega:

Horário da sonicação:

RESUMO

O sistema intrauterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) é um dos contraceptivos reversíveis mais eficazes na atualidade. Exibe expressivos benefícios não contraceptivos, como o controle de sangramentos menstruais excessivos, indução de amenorréia em mais da 50% de suas usuárias, o que justifica seu alto índice de satisfação e aderência. Além disso, reduz o risco de doença inflamatória pélvica decorrente do espessamento do muco cervical e de fatores imunológicos locais. Entretanto, micro-organismos provenientes da colonização da secreção vaginal podem ascender pelo colo uterino e formar biofilmes na superfície dos dispositivos intrauterinos. Os biofilmes são revestimentos biológicos constituídos por polímeros extracelulares que se aderem a superfícies de corpos estranhos e protegem as bactérias das ações das células de defesa do hospedeiro e dos antibióticos. Com o intuito de identificar os micro-organismos produtores de biofilme, a sonicação é uma nova técnica que incrementa o diagnóstico de micro-organismos sésseis. Consiste na aplicação de ondas de ultrassom de baixa frequência e baixa intensidade, que danificam a superfície do biofilme, sem a destruição dos patógenos; desta forma, liberam os micro-organismos em meio líquido permitindo a identificação pelos métodos microbiológicos convencionais. Como escassos são os estudos que avaliaram os micro-organismos na cavidade endometrial em usuárias do SIU-LNG e, como inexitem investigações aplicado à técnica de sonicação na identificação da microbiota dos biofilmes dos dispositivos intrauterinos - razões que motivaram a realização dessa pesquisa.

Material e métodos: Estudo transversal unicêntrico, descritivo onde foram avaliados 42 SIU-LNG retirados por terem completado os 5 anos de uso do dispositivo, desejo de gravidez, mal posicionamento do DIU na cavidade uterina e por dor e sangramento intermitente . Inicialmente realizou-se coleta da secreção vaginal. Retirado os dispositivos com técnica asséptica e desmembrado o corpo e fio do DIU, sendo analisados individualmente. Realizamos uma sub-análise de 15 dispositivos para avaliar a possibilidade de contaminação do DIU com a microbiota vaginal. No total dos 42 dispositivos foram submetidos a homogeneização, sonicação, novamente homogeneização e finalmente centrifugação. A alíquotas foram semeadas em ágar sangue, ágar chocolate, ágar anaerinsol-S e caldo de tioglicolato. A secreção vaginal foi cultivada em meio de cultura sólido.

Resultados: Foram identificados 390 micro-organismos, sendo isoladas 70,0 % de bactérias Gram positivas, 21,0 % de bactérias Gram negativas e 9,0 % de leveduras do gênero *Candida* spp.. As bactérias aeróbicas, anaeróbicas estritas e anaeróbicas facultativas foram isoladas em 4,5 %, 11,0 % e 84,5 % respectivamente. Os agentes mais isolados nas análises microbiológicas do SIU-LNG foram Gram positivos, principalmente as espécies *Corynebacterium* spp. 29,7 % , *Staphylococcus* coagulase negativo 23,0 % e *Enterococcus* spp. 10,5 % . Nos Gram negativos, os mais frequentes foram *Bacterioides* spp. 7,1 % , *Escherichia coli* 5,1 % e *Pseudomonas aeruginosa* 3,0 % . As amostras negativas provenientes das secreções vaginais e dos fluidos de sonicação dos corpos e dos fios dos DIUs cultivados em meios de culturas sólidos e líquidos totalizaram 151 amostras, sendo 16 amostras aeróbicas e 135 anaeróbicas.

Conclusão: O estudo revelou que a cavidade endometrial não é estéril e os agentes encontrados no biofilme do SIU-LNG provavelmente ascendam da vagina. Os micro-organismos sésseis aderidos aos biofilmes mais identificados pela técnica de sonicação foram as bactérias Gram-positivas *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo e *Enterococcus* spp. Os micro-organismos identificados no biofilme do SIU-LNG foram semelhantes aos detectados na microbiota vaginal, portanto a técnica de sonicação não incrementou a recuperação de agentes formadores de biofilme na cavidade uterina.

Palavras-chave: Biofilme, dispositivo intrauterino, sonicação, microbiota, endometrite.