

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**GIULIA KARNAUCHOVAS PORTO CUNHA**

**Infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo: coorte BRISA**

**Ribeirão Preto**

**2021**

GIULIA KARNAUCHOVAS PORTO CUNHA

**Infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo: coorte BRISA**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia – Biologia da Reprodução.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana Maria Quintana

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cunha, Giulia Karnauchovas Porto

Infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo: coorte BRISA. Ribeirão Preto, 2021.

98 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Quintana, Silvana Maria.

1. Gravidez. 2. Parto pré-termo. 3. Infecção do trato reprodutivo. 4. Micoplasma genital.

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CUNHA, Giulia Karnauchovas Porto

Título: Infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo: coorte BRISA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família incrível, que sempre me apoiou ao longo de minhas escolhas profissionais e sempre acreditou que eu daria o meu melhor em tudo o que decidisse seguir. Tudo o que sou e onde estou agora agradeço e devo a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Professora Doutora Silvana Maria Quintana, que indo além de seu papel de orientadora, contribuiu para o meu crescimento como pesquisadora e como pessoa. Obrigada por sua alegria e vontade de se desenvolver cada vez mais, me espelho sempre na profissional que é.

Ao meu parceiro de vida, João Matheus, que esteve comigo em meu Trabalho de Conclusão de Curso e agora em minha defesa do Mestrado. Obrigada por ter acompanhado todo o meu caminho até aqui. Obrigada por me mostrar, todos os dias, como as coisas podem ser mais leves.

Aos meus parceiros de casa em Ribeirão Preto e em São Paulo. Agradeço imensamente pelo respeito e torcida para a finalização deste projeto.

À Stella, Suleimy e Suelen por toda a ajuda e disposição para solucionar as diversas dúvidas que tive ao longo desses anos.

À Larissa, minha parceira de pós-graduação, que esteve comigo em cada transição deste Mestrado, contribuindo para sua melhoria.

Aos professores Doutor Ricardo de Carvalho Cavalli e Doutora Viviane Cunha Cardoso por todas as colocações levantadas e ajuda oferecida ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao Núcleo de Pesquisas em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Núcleo de Estudos de Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) da Universidade de São Paulo (USP – Campus Ribeirão Preto), responsável pelo desenvolvimento do Projeto BRISA e pelo fornecimento de seu banco de dados para análise deste projeto.

Por fim, agradeço ao apoio oferecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), através da concessão de minha bolsa de Mestrado. E pelo apoio financeiro ao Projeto BRISA que se deu através do Programa de Excelência Acadêmica (PRONEX), uma parceria entre a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

## RESUMO

CUNHA, Giulia Karnauchovas Porto. **Infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo: coorte BRISA. 2021.** Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Introdução:** Cerca de 10,6% das gestações apresentam um desfecho de parto pré-termo (PPT), sendo ele a principal causa de mortalidade e morbidade infantil. O fator predominantemente associado a este desfecho adverso é a infecção materna, com destaque à infecção por micoplasmas genitais, como *Mycoplasma hominis* (Mh) e *Ureaplasma spp.* Por serem bactérias que constituem naturalmente a microbiota genital a associação entre esses microrganismos e o PPT ainda é controversa. **Objetivo:** Avaliar, em gestantes de uma coorte prospectiva, a prevalência das infecções por Mh e Uu e a associação desta infecção no desfecho gestacional de PPT. **Métodos:** Esta coorte constitui parte do projeto BRISA e foi acompanhada em Ribeirão Preto-SP, durante 2010/2011. Foram recrutadas gestantes com 20-25 semanas que realizaram entrevistas para coleta características de base, coleta de sangue para análise de mediadores imunológicos e coleta de amostras cervicovaginais para o diagnóstico de infecção pelo kit Mycoplasma IST 2 (bioMérieux) e escore de Nugent. A associação entre a infecção por Mh/Uu e características sociodemográficas, histórico clínico, disbiose vaginal e desfecho de PPT espontâneo (PPTe) foi investigada através da análise exploratória por Teste Qui-quadrado, seguida por análise de regressão logística univariada e multivariada. **Resultados:** Foram incluídas 1.349 gestantes e a prevalência de PPT foi de 9,2% (n=124), sendo que 71,8% (n=89) deles foram classificados como espontâneos (PPTe). Para a análise final do estudo foram incluídos apenas os PPTe e os parto termo (PT) (n=1.225), totalizando 1.314 gestantes analisadas. A prevalência de infecção por micoplasma genital foi de 18% (n=236), não sendo encontrada associação entre a infecção e o desfecho de PPTe (ORa 0,66; IC 95% 0,32 - 1,35). No entanto, as gestantes com histórico de PPT anterior (ORa 1,16, IC 95% 0,55 - 2,44) e comprimento de colo  $\leq 2,5$  cm (ORa 3,97, IC 95% 1,67 - 9,47) apresentaram um risco significativamente maior de terem PPTe. Em relação à infecção, a presença de vaginose bacteriana (VB) foi a variável que mais conferiu risco à este desfecho (OR 5,1; IC 95% 3,58 - 7,28). **Conclusão:** O risco de PPTe esteve independentemente associado à um histórico de PPT em gestações anteriores e um comprimento de colo  $\leq 2$ cm, mas não à infecção por micoplasma genital.

**Palavras-chave:** Gravidez, parto pré-termo, infecção do trato reprodutivo, micoplasma genital.

## ABSTRACT

CUNHA, Giulia Karnauchovas Porto. **Genital Mycoplasma infection and preterm birth outcome: BRISA cohort. 2021.** Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Background:** Preterm birth (PTB) is the outcome of 10.6% of pregnancies and is the leading cause of morbidity and mortality in the infant. The most frequent cause associated with this outcome is maternal infection. And genital mycoplasma, such as *Mycoplasma hominis* (Mh) and *Ureaplasma urealyticum* (Uu), possibly is an important bacterium associated with PTB. Though, because they naturally constitute the genital microbiota, this correlation is controversial. **Objective:** Assess, in pregnant women of a prospective cohort, the prevalence of Mh and Uu infection and the association of these infections with the pregnancy outcome of PTB. **Methods:** This cohort constituted part of the BRISA Project and was developed in the city of Ribeirão Preto-SP in 2010/2011. For the study, pregnant women with 20-25 weeks of gestational age were enrolled. At the prenatal visit, the following variables were collected: baseline data with an interview; blood for immunological mediator analysis; cervicovaginal samples for the infection diagnosis using the *Mycoplasma* IST 2 (bioMérieux) kit and Nugent score. The association between Mh/Uu infection and sociodemographic characteristics, clinical history, vaginal dysbiosis, and spontaneous PTB (sPTB) outcome were assessed with Chi-square analysis, followed by logistic regression analysis. **Results:** 1.349 pregnant women were included and 9.2% (n=124) had PTB outcome, from those 71,8% (n=89) was classified as spontaneous (sPTB). For the final analysis, only sPTB (n=89) and the term birth (TB, n=1.225) were included, with a total of 1.314 pregnant in the final analysis. The prevalence of genital mycoplasma infection was 18% (n=236) and no association between infection and sPTB was found (aOR 0,66; 95% CI 0,32 - 1,35). However, history of previously PTB (aOR 1,16, 95% CI 0,55 - 2,44) and cervical length  $\leq 2,5$  cm (aOR 3,97, 95% CI 1,67 - 9,47) were significantly higher at sPTB group. The presence of bacterial vaginosis (BV) was the variable that had the most risk of genital mycoplasma infection (OR 5,1; 95% CI 3,58 - 7,28). **Conclusion:** The risk of sPTB was independently associated with the history of PTB and the cervical length, but not with the genital mycoplasma infection.

**Keywords:** Pregnancy, premature birth, reproductive tract infections, genital Mycoplasma.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Fluxograma de recrutamento e inclusão das participantes do estudo, BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 39

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com as características sociodemográficas e o desfecho de parto pré-termo e parto a termo e o desfecho positivo e negativo para a infecção por micoplasma genital. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 40

**Tabela 2** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com o histórico clínico e o desfecho de parto pré-termo e parto a termo e o desfecho positivo e negativo para a infecção por micoplasma genital. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 41

**Tabela 3** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com as características da infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo e parto a termo. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 42

**Tabela 4** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com as características sociodemográficas e clínicas por tipo de micoplasma genital, Mh, *Ureaplasma* spp. ou Mh+ *Ureaplasma* spp. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 43

**Tabela 5** – Análise de regressão logística univariada das características das gestantes de acordo com o desfecho de parto pré-termo e o desfecho de infecção por micoplasma genital. Análise de regressão logística ajustada de acordo com o desfecho de parto pré-termo. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 45

**Tabela 6** – Análise de regressão logística univariada das citocinas de acordo com o desfecho de parto pré-termo e o desfecho de infecção por micoplasma genital. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011. \_\_\_\_\_ 47

## LISTA DE SIGLAS

aOR: odds ratio ajustado

BRISA: Brazilian Ribeirão Preto and São Luís Birth Cohort Studies

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

DIP: Doença Inflamatória Pélvica

DUM: Data da última menstruação

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EO: Estresse oxidativo

HCFMRPUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

IFN: Interferon

IG: Idade gestacional

IL: Interleucina

IST: infecções sexualmente transmissíveis

Mh: *Mycoplasma hominis*

MMP: Metaloproteinase de Matriz

NESCA: Núcleo de Estudos de Saúde da Criança e do Adolescente

NF-κB: Fator nuclear- kappa B (*factor nuclear kappa B*)

NK: Célula *natural killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

P4: Progesterona

PIG: Pequenos para a idade gestacional

pH: potencial Hidrogeniônico

PPT: Parto Pré-Termo

PPTe: Parto Pré-Termo espontâneo

RPM: Rotações por minuto

RPMPT: Ruptura Prematura de Membranas Pré-Termo

PS: Proteína surfactante

RP: Receptor nuclear de progesterona

SASP: Fenótipo secretor associado à senescência (*senescence-associated-secretory phenotype-SASP*)

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF: Fator de Transformação do Crescimento (*transforming growth factor*)

TGIF: Trato Genital Inferior Feminino

Treg: Células T reguladoras

TLR: Receptor do tipo Toll (*toll like-receptor*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFC: Unidade formadora de colônia

UFMA: Universidade Federal do Maranhão

Up: *Ureaplasma parvum*

UPC: Unidade de Pesquisa Clínica

USP: Universidade de São Paulo

Uu: *Ureaplasma urealyticum*

VB: Vaginose bacteriana

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> _____	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> _____	<b>17</b>
2.1.	VIA COMUM DO TRABALHO DE PARTO _____	18
2.2.	PARTO PRÉ-TERMO _____	20
<b>2.2.1.</b>	<b>Epidemiologia</b> _____	<b>21</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Fatores de risco</b> _____	<b>21</b>
2.3.	MICOPLASMAS GENITAIS _____	22
<b>2.3.1.</b>	<b>Epidemiologia</b> _____	<b>23</b>
<b>2.3.2.</b>	<b>Micoplasma genitais e o desfecho de PPT</b> _____	<b>24</b>
2.4.	HIPÓTESE _____	25
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO</b> _____	<b>26</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL _____	27
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	27
<b>4.</b>	<b>MÉTODOS</b> _____	<b>28</b>
4.1.	DESENHO E ÁREA DO ESTUDO _____	29
4.2.	PARTICIPANTES _____	29
<b>4.2.1.</b>	<b>Crítérios de elegibilidade</b> _____	<b>29</b>
<b>4.2.2.</b>	<b>Recrutamento</b> _____	<b>30</b>
<b>4.2.3.</b>	<b>Cálculo amostral</b> _____	<b>30</b>
4.3.	PROTOCOLOS DE COLETA DE VARIÁVEIS _____	30
<b>4.3.1.</b>	<b>Coleta de variáveis no pré-natal</b> _____	<b>31</b>
4.3.1.1.	Questionário _____	31
4.3.1.2.	Exame ginecológico _____	31
4.3.1.2.1.	<i>Vaginose bacteriana</i> _____	31
4.3.1.2.2.	<i>Micoplasma genital</i> _____	32
4.3.1.3.	Coleta do sangue _____	33
4.3.1.3.1.	<i>Quantificação de citocinas</i> _____	33
<b>4.3.2.</b>	<b>Coleta de variáveis no puerpério</b> _____	<b>34</b>
<b>4.3.3.</b>	<b>Variáveis analisadas no estudo</b> _____	<b>34</b>
4.3.3.1.	Variáveis dependentes _____	34
4.3.3.2.	Variáveis independentes _____	35
4.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	35

4.5.	ASPÉCTOS ÉTICOS _____	36
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> _____	<b>37</b>
5.1.	ANÁLISE EXPLORATÓRIA _____	38
5.2.	MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA _____	44
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> _____	<b>48</b>
6.1.	PRINCIPAIS ACHADOS _____	49
6.2.	INTERPRETAÇÃO _____	49
<b>6.2.1.</b>	<b>Prevalência e fatores de risco associados à infecção por micoplasma genital</b> <b>49</b>	
<b>6.2.2.</b>	<b>Prevalência e fatores de risco associados ao desfecho gestacional</b> _____	<b>53</b>
<b>6.2.3.</b>	<b>Desfecho gestacional de PPTe e infecção por micoplasma genital</b> _____	<b>55</b>
6.3.	PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO _____	59
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> _____	<b>61</b>
7.1.	SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS _____	62
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	<b>63</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA</b> _____		<b>71</b>
<b>ANEXO B – MANUSCRITO</b> _____		<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

A partir de uma sequência de eventos clínicos, que incluem ruptura da membrana corioamniótica, aumento na contração miometrial e remodelamento cervical, a via comum do trabalho de parto é desencadeada, resultando na expulsão do feto e placenta (ROMERO et al., 2006). Por se tratar de uma extensa via, diversos fatores podem alterá-la, levando a complicações gestacionais e ao desencadeamento de um desfecho obstétrico adverso, como o parto pré-termo (PPT) (ROMERO; DEY; FISHER, 2014). Em 2014, cerca de 15 milhões de neonatos nasceram prematuramente (CHAWANPAIBOON et al., 2019), e as complicações decorrentes de um PPT são as principais causas de mortalidade em crianças com até 5 anos de idade, além de estarem relacionadas à diversas morbidades infantis (HOWSON C. P., KINNEY M.V., 2012).

As infecções genitais, causadas por diferentes agentes etiológicos, têm sido associadas à desfechos obstétricos adversos, no entanto as evidências sobre essa relação ainda são controversas. As infecções causadas pelos micoplasmas genitais, dentre eles *Mycoplasma hominis* (Mh) e *Ureaplasma* spp, vêm apresentando destaque no desfecho de PPT. Melhorar o entendimento a respeito desse possível fator de risco é fundamental para a identificação de gestações consideradas de risco e conseqüente para o aprimoramento de intervenções preventivas. Dessa forma, este estudo foi desenvolvido com o intuito de melhorar a qualidade do atendimento de pré-natal e contribuir para desfechos obstétricos e perinatais positivos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2.1. VIA COMUM DO TRABALHO DE PARTO

A gravidez, período em que o organismo materno precisa manter uma relação balanceada com o feto em desenvolvimento, é dependente de uma constante e efetiva comunicação cruzada entre dois organismos semialogênicos. Dessa forma, o sucesso da gestação está muito relacionado à um complexo estado de equilíbrio do sistema imune materno. Onde ao mesmo tempo em que é necessário mantê-lo tolerante o suficiente para garantir o desenvolvimento fetal, é preciso também regular a inflamação para assegurar o remodelamento vascular, diferenciação e maturação dos tecidos uterinos, além de manter um nível suficiente de imunocompetência para proteger o organismo materno de possíveis patógenos (MILLER et al., 2020; PETERSON et al., 2020; PRABHUDAS et al., 2015).

Dessa forma, durante a gestação, o repertório imune da interface materno-fetal tem a atuação de diversos tipos celulares em conjunto, com destaque à células da imunidade inata, como *natural killers* (NK) e macrófagos, além de células da imunidade adaptativa, como as células T reguladoras (Treg), que contribuem com uma função supressora, construída principalmente a partir da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator de transformação do crescimento (TGF)- $\beta$  (MILLER et al., 2020).

De uma forma contrária a quiescência uterina e ao cenário imunossupressor construído durante a gestação, o momento do trabalho de parto constitui um processo inflamatório fisiológico, responsável por romper a homeostase imune da interface materno-fetal, resultando na ruptura das membranas maternas, amadurecimento cervical, aumento das contrações uterinas e no desencadeamento do trabalho de parto (MENON et al., 2020; SMITH, 2007).

A ordem em que a via do trabalho de parto ocorre ainda não está completamente elucidada, mas as sinalizações físicas e hormonais produzidas pelo feto durante seu desenvolvimento constituem um estímulo primário para o início do processo inflamatório do parto (MENDELSON, 2009; MENON et al., 2016). Compostos bioquímicos liberados por órgãos fetais em maturação, como por exemplo a produção de proteínas surfactantes (PS) pelo pulmão, indicam a prontidão fetal para o nascimento e sinalizam a necessidade de transição de um útero em estado quiescente para um estado ativo (CONDON et al., 2004; GAO et al., 2015).

Além disso, o estresse celular causado pelo estiramento do miométrio e âmnio, devido ao crescimento fetal, também é um fator que favorece o cenário de desencadeamento do parto (MENDELSON, 2009; MENON et al., 2020). Este estiramento das membranas, somado à maturação fetal e aumento da demanda metabólica do feto durante seu crescimento, elevam os níveis de estresse oxidativo (EO) no útero, o que gera um acúmulo de espécies reativas de

oxigênio (ERO) (MENON, 2014; MENON et al., 2020). Esses sinais de estresse podem causar danos ao DNA que, somados à replicação celular das membranas durante a gestação, aceleram o processo fisiológico de senescência (envelhecimento) dos tecidos fetais e maternos (MENON et al., 2013). Durante a senescência celular, são produzidos diversos biomarcadores que caracterizam o fenótipo secretor associado à senescência (SASP), dentre eles: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases matriz (MMPs), enzimas que degradam a matriz extracelular das membranas, fazendo com que elas fiquem estruturalmente e funcionalmente mais frágeis (BEHNIA et al., 2015; COPPÉ et al., 2010).

A partir desta sobrecarga inflamatória causada pelos estímulos fetais, há o início da ativação uterina, um processo possivelmente constituído por duas vias principais: por uma ativação direta de genes associados à contração miométrial (COX-2, receptor de oxitocina), a partir de fatores de transcrição como o fator nuclear (NF)- $\kappa$ B; e por uma ação indireta a partir da redução na capacidade do receptor nuclear de progesterona (RP) em mediar a quiescência uterina (GAO et al., 2015; MENDELSON, 2009).

Estudos indicam que a produção em larga escala de progesterona (P4) durante a gestação constitui um fator importante para a construção de um ambiente imunológico tolerante (SHAH et al., 2019; SHAH; IMAMI; JOHNSON, 2018). Atuando principalmente por receptores como o RP nos tecidos do trato reprodutivo, a P4 pode afetar a cascata de inflamação e agir na manutenção da gestação a partir do antagonismo de NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, inibição de genes relacionados à contração uterina (HARDY et al., 2006; VRACHNIS et al., 2013).

No entanto, uma vez que a carga inflamatória é estabelecida no útero, a P4 perde sua efetividade. Com o aumento da inflamação, ocorrem alterações na responsividade do miométrio à P4, acarretando a queda da “progesterona funcional” no organismo (MERLINO et al., 2007; NADEEM et al., 2016). Possivelmente, essa mudança na responsividade à P4 é atribuída ao início da expressão alterada de coativadores de RP, com a produção de suas isoformas inativas, prejudicando a ação quiescente da progesterona no útero (CONDON et al., 2006; HARDY et al., 2006; TAN et al., 2012).

Sendo assim, o início do trabalho de parto pode ocorrer a partir de processos fisiológicos ou patológicos que quebram a homeostase imunológica do útero (MENON et al., 2016, 2020). Conforme o feto se desenvolve, são gerados sinais que geram uma sobrecarga inflamatória (CONDON et al., 2004), através da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (HADLEY et al., 2018) e SASPs (COPPÉ et al., 2010). Essa sinalização promove o recrutamento de células imunes ativas para a região materno-fetal, como neutrófilos e macrófagos, o que aumenta a cascata de sinalização da

inflamação e resulta na ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B (MENDELSON, 2009). A partir da ativação de NF- $\kappa$ B, são mediadas alterações na expressão de isoformas de PR, levando à queda da progesterona funcional (CONDON et al., 2006; SHAH et al., 2019) e aumento na expressão de genes relacionados à contração miométrial (NADEEM et al., 2016; TAN et al., 2012). A partir disso, é iniciando um fenótipo ativo do útero para o trabalho de parto.

## 2.2. PARTO PRÉ-TERMO

Como mencionado, o trabalho de parto é constituído por uma complexa e redundante interação entre vias que irão garantir a expulsão do feto e da placenta no momento do nascimento. No entanto, diversos fatores podem influenciar essa via, acarretando desfechos gestacionais adversos, como é o caso do PPT.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como PPT o parto que ocorre antes de 37 semanas de gestação ou com menos de 259 dias (HOWSON C. P., KINNEY M.V., 2012). Em 2014, estima-se que cerca de 14,8 milhões dos partos no mundo foram prematuros, representando cerca de 10,6% dos nascimentos (CHAWANPAIBOON et al., 2019). Já no Brasil, no ano de 2017, a prevalência de prematuridade foi de 11% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

A prematuridade, junto com doenças infecciosas como pneumonia e malária, representa uma das principais causas de mortalidade infantil, levando à óbito cerca de 1 milhão de crianças de até 5 anos de idade anualmente (HOWSON C. P., KINNEY M.V., 2012; UN IGME, 2020). Além de estar relacionada a diversas morbidades infantis, incluindo doenças respiratórias, como síndrome do desconforto respiratório e displasia broncopulmonar, sequelas neurológicas, como paralisia cerebral, retardo mental e déficits auditivo e visual, infecções, dificuldades de alimentação e disfunções cognitivas (CHAWANPAIBOON et al., 2019; LIU et al., 2016; SAIGAL; DOYLE, 2008).

A taxa mundial de nascimentos prematuros vem aumentando desde 2000, quando a estimativa de PPT era de 9,8% (CHAWANPAIBOON et al., 2019). Embora nesse período o quadro de mortalidade causada pela prematuridade tenha apresentado redução em países de alta renda, em muitos países de baixa e média renda esse cenário se mantém. O Brasil, que representa 2,2% dos nascimentos mundiais, está na 9ª posição dos países com maiores taxas de prematuridade (CHAWANPAIBOON et al., 2019). Estudos indicam que, além das complicações causadas ao neonato, os PPT também estão associados à altos custos aos serviços

de saúde e dificuldades psicológicas e financeiras à mãe e familiares (KORVENRANTA et al., 2010; SINGER et al., 1999). Dessa forma, na perspectiva de melhorar o atendimento e a qualidade de vida materna e infantil, é necessário entender melhor a epidemiologia e fatores de risco relacionados ao PPT.

### **2.2.1. Epidemiologia**

Os PPTs podem ser classificados de acordo com os seus precursores obstétricos: (a) iatrogênico: quando a resolução da gravidez se deve a indicações maternas ou complicações obstétricas e o parto é induzido ou realizada uma cesárea; (b) espontâneo com início das contrações uterinas e diagnóstico de trabalho de parto com as membranas corioamnióticas íntegras; e (c) espontâneo com a ruptura prematura de membranas pré-termo (RPMPT), sendo independente da forma do parto, vaginal ou cesárea. Os cenários descritos nas letras b e c são referentes ao PPT espontâneos (PPTe), que equivale a cerca de 65-75% dos partos prematuros (GOLDENBERG et al., 2008; HOWSON C. P., KINNEY M.V., 2012).

O PPT também pode ser dividido de acordo com a idade gestacional (IG) no momento do parto. Uma média de 5,2% ocorrem entre 22-27 semanas de gestação, sendo classificados como “prematuridade extrema”; 10,4% ocorrem de 28 à 31 semanas, denominado “prematuridade moderada”; e 84,3% são classificados como “prematuridade tardia”, ocorrendo entre as 32 à 36 semanas de gestação (HOWSON C. P., KINNEY M.V., 2012). Sendo a severidade dos riscos de desfechos neonatais adversos inversamente proporcional à IG no momento do parto (SAIGAL; DOYLE, 2008).

### **2.2.2. Fatores de risco**

O PPT tem sido considerado uma síndrome multifatorial e a busca por fatores de risco para este desfecho é cada vez mais importante (ROMERO et al., 2006; ROMERO; DEY; FISHER, 2014). O reconhecimento desses fatores torna possível a identificação de mulheres com gestações consideradas de risco, permitindo intervenções precoces e mais específicas, além de contribuir para uma análise mais refinada da população de gestantes nos estudos.

Existem diversos aspectos maternos e fetais que têm sido associados ao desfecho de PPT. Dentre eles, podemos incluir algumas características sociodemográficas que estudos vêm verificando associação, como a etnia materna, baixos níveis educacionais e socioeconômicos, extremos de idade materna e situação marital (ANDERSON et al., 2017; GOLDENBERG et

al., 2008; THOMA et al., 2019); hábitos durante a gestação, como tabagismo e elitismo; histórico clínico e obstétricos da gestante, como predisposição genética, má formação uterina e PPT prévio; e fatores clínicos da gestação atual, como diabetes, hipertensão, obesidade, estresse psicossocial, encurtamento cervical e infecção (GOLDENBERG et al., 2008; LIU et al., 2019; REJNÖ et al., 2019).

Como o sistema imune participa ativamente do trabalho de parto, o aumento na expressão e regulação de moléculas imunes, devido à presença de microrganismos ou componentes microbianos solúveis na região intrauterina, pode acarretar em um desfecho obstétrico adverso (YOCKEY; IWASAKI, 2018). As infecções maternas têm sido responsabilizadas por cerca de 25 a 40% dos nascimentos prematuros espontâneos, sendo que pelo menos 1 em cada 4 desses neonatos nascem de mães com infecção intra-amniótica subclínica (GOLDENBERG et al., 2008; ROMERO; DEY; FISHER, 2014).

Estudos que caracterizaram os microrganismos presentes na cavidade uterina de gestantes com desfecho de PPTe, identificaram um padrão microbiano similar ao do trato genital inferior feminino (TGIF), sendo os micoplasmas genitais os microrganismos mais frequentemente encontrados nos casos de infecção intra-amniótica, principalmente o *Ureaplasma parvum* (Up), o *Ureaplasma urealyticum* (Uu) e o Mh (CAPPELLETTI et al., 2016; PAYNE; BAYATIBOJAKHI, 2014). Ainda que seja possível demonstrar que a colonização da cavidade amniótica de gestantes com PPTe é primordialmente constituída por micoplasmas genitais, os mecanismos de desencadeamento desse desfecho por esses microrganismos ainda não estão bem definidos, pois os mesmos também são encontrados em mulheres com parto a termo (ROMERO et al., 2014a).

No entanto, além da análise da relação dessas bactérias na cavidade uterina com o PPTe, é importante estudarmos também se a presença desses microrganismos ainda no TGIF seria capaz de influenciar o desfecho gestacional, visto que evidências recentes têm indicado que a ascensão dos micoplasma genitais do TGIF ao útero, através do cérvix, é a principal via de infecção intra-amniótica (PAYNE; BAYATIBOJAKHI, 2014; ROMERO et al., 2019; ROMERO; DEY; FISHER, 2014).

### 2.3. MICOPLASMAS GENITAIS

Mh e *Ureaplasma* spp. microrganismos de uma classe de bactérias gram-positivas chamada Mollicutes, comumente conhecidos como micoplasmas genitais (TAYLOR-ROBINSON, 2017). Essas bactérias são frequentemente encontradas no trato urogenital

feminino e masculino, tanto de indivíduos saudáveis quanto sintomáticos (HORNER et al., 2018). Em níveis elevados esses microrganismos são capazes de causar efeitos citotóxicos locais devido a produção de amônia através da quebra de arginina e ureia pelo Mh e *Ureaplasma* spp., respectivamente. Esse processo induz uma resposta inflamatória com aumento de citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, além de aumento do pH vaginal, o que torna o ambiente vaginal mais permissivo à infecções por outros microrganismos (DONDEERS et al., 2017; TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011).

A colonização da microbiota vaginal por micoplasmas genitais é comum, sendo que a maioria das mulheres não desenvolvem sintomas ou complicações genitais (TAYLOR-ROBINSON, 2017). No entanto, estudos prévios sugerem que a presença dessas bactérias pode estar associada à certas condições do trato geniturinário, como: sintomas de uretrite, cervicite, doença inflamatória pélvica (DIP) e infertilidade (GU et al., 2020; HORNER et al., 2018; PATEL; NYIRJESY, 2010). Além disso, a infecção por micoplasma genital é frequentemente associada à presença de vaginose bacteriana (VB), uma condição caracterizada pela substituição de bactérias protetoras da microbiota vaginal, como *Lactobacillus* spp., por um crescimento diverso de bactérias anaeróbicas e organismos facultativos, como *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., e o Mh, causando uma disbiose vaginal que tem sido associada à complicações na gestação (DONATI et al., 2010; KAAMBO et al., 2018; PATEL; NYIRJESY, 2010; RAMPERSAUD; RANDIS; RATNER, 2012).

### **2.3.1. Epidemiologia**

A capacidade de colonização do TGIF por micoplasmas genitais sofre a influência de diversos elementos, dentre eles: idade, hormônios, atividade sexual, características sociodemográficas, como baixo nível de escolaridade e socioeconômico, status marital, uso de contraceptivos, gravidez e a presença de infecções sexualmente transmissíveis (IST), além de VB (CAPOCCIA; GREUB; BAUD, 2013; TAYLOR-ROBINSON, 2017; TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011). Devido à esta vasta quantidade de fatores de risco associados à infecção, a literatura apresenta resultados divergentes a respeito do potencial patogênico dessa bactéria.

Além disso, a prevalência dos tipos de micoplasmas genitais também possui uma certa variabilidade entre os estudos. Em gestantes, a prevalência de infecção por Uu e Mh apresenta taxas que variam entre 35-90% e 5-75%, respectivamente (CAPOCCIA; GREUB; BAUD, 2013). Já em mulheres não gestantes, alguns estudos indicam que a prevalência pode variar de

3,1-15% para Mh, de 5,2-20% para Uu e de 20–89% para Up (HORNER et al., 2018). No entanto, alguns dados na literatura encontraram prevalências diferentes, onde mostram que as taxas entre mulheres gestantes e não gestantes são semelhantes (DONDEERS et al., 2017) ou até mesmo que gestantes podem apresentar uma prevalência menor do que não gestantes (FREITAS et al., 2017).

### 2.3.2. *Mycoplasma* genitais e o desfecho de PPT

O corpo humano possui uma vasta diversidade de comunidades microbianas, incluindo vírus, bactérias e fungos, que são conhecidos por terem forte relação com a saúde humana, devido à interação simbiótica com o seu hospedeiro (DI SIMONE et al., 2020). Na mulher, a microbiota vaginal tem um papel essencial não apenas na saúde e disbiose vaginal, mas também no sucesso da fertilização e conclusão da gravidez (YOUNES et al., 2018). Em gestantes, a colonização do TGIF pelos micoplasmas genitais pode acarretar em desfechos obstétricos adversos, incluindo: PPT, RPMPT, corioamnionite, aborto e natimorto, além de causar morbidades neonatais, com destaque às doenças respiratórias (BREUGELMANS et al., 2010; DIGIULIO et al., 2010; DONDEERS et al., 2000; SPRONG et al., 2020; TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

Estudos vêm sugerindo que, durante a gestação, a composição da microbiota vaginal pode gerar um impacto significativo no risco de PPT (FETTWEIS et al., 2019). As alterações imunológicas e hormonais decorrentes da gravidez, podem alterar o potencial de colonização de bactérias encontradas na microbiota vaginal, incluindo os micoplasmas genitais (AVERSHINA et al., 2017; MACINTYRE et al., 2015; ROMERO et al., 2014b; TAYLOR-ROBINSON, 2017). Além disso, a falta de uma microbiota dominada por comunidades de *Lactobacillus* spp. e a substituição por uma predominantemente diversa é responsável por gerar uma inflamação genital, possivelmente associada à desfechos reprodutivos adversos (ANAHTAR et al., 2018)

Visto que fatores fisiológicos durante a gestação podem levar à uma mudança no padrão de colonização por micoplasmas genitais, com aumento em sua carga bacteriana, causando efeitos citotóxicos que levam à uma condição de disbiose vaginal e ativação do sistema imune, a presença desses microrganismos no TGIF de gestantes pode acarretar em um desfecho de PPT (DIGIULIO et al., 2015; KWAK et al., 2014; TAYLOR-ROBINSON, 2017).

Por mais que certos estudos tenham identificado associações entre a infecção por micoplasmas genitais e condições patológicas, faltam evidências adequadas para confirmá-la.

Devido à divergências metodológicas, amostras inapropriadas e falhas nos ajustes de análises à potenciais fatores de confusão, ainda há controvérsias sobre a real patogenicidade desses microrganismos (HORNER et al., 2018).

Diante do exposto, até o presente momento não há um padrão para realização de testes de rotina no pré-natal e sobre a necessidade de tratamento da infecção por micoplasmas genitais (HORNER et al., 2018). Além disso, a administração de alguns antibióticos, como clindamicina e eritromicina, para o tratamento de micoplasma genitais raramente consegue erradicar a infecção, provavelmente devido à resistência dessas bactérias à droga, sendo necessário investigar a suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos para um tratamento eficiente (TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011). Sendo assim, se torna cada vez mais importante entendermos melhor os fatores de risco associados à infecção por micoplasmas genitais, assim como sua associação com os desfechos gestacionais adversos em diferentes populações no intuito de melhorar o atendimento de pré-natal.

#### 2.4. HIPÓTESE

- a) H0: A infecção causada pelo Mh e *Ureaplasma* spp. NÃO AUMENTA o risco de desfecho de PPT;
- b) H1: A infecção causada pelo Mh e *Ureaplasma* spp. AUMENTA o risco desfecho de PPT.

### **3. OBJETIVO**

---

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação das infecções por micoplasmas genitais no trato genital inferior feminino com o desfecho gestacional de PPT em mulheres de uma coorte de pré-natal.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Avaliar a prevalência e fatores de risco associados ao desfecho gestacional de PPT;
- b) Avaliar a prevalência e fatores de risco associados ao desfecho de infecção por micoplasmas genitais.

## 4. MÉTODOS

---

#### 4.1. DESENHO E ÁREA DO ESTUDO

Uma coorte prospectiva de amostras de conveniência foi realizada entre os anos de 2010 e 2011, em duas cidades brasileiras, sendo conduzida pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), sob responsabilidade do Núcleo de Estudos de Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), em Ribeirão Preto – SP, e pelo Núcleo de Pesquisas em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em São Luís – MA (DA SILVA et al., 2014). Com o objetivo de avaliar os fatores neuroendócrinos e imunológicos envolvidos no desencadeamento do PPT. Para cumprir com os objetivos propostos pelo nosso estudo, foi conduzida uma análise das amostras coletadas na cidade de Ribeirão Preto, baseada no projeto temático da coorte BRISA.

Foram usados métodos clássicos de questionário, sendo aplicado por um entrevistador, e análises laboratoriais para explorar a hipótese inflamatória da prematuridade, além de analisar fatores de risco desse desfecho adverso. As análises referentes aos mediadores imunológicos seguiram um desenho de caso-controle aninhado à coorte prospectiva, pois não há necessidade de se analisar espécimes biológicos para todos os controles. Os PPTe identificados na coorte foram considerados casos, e foi realizada uma randomização, na proporção 3:1, para a seleção dos controles. Esse desenho de estudo reduz custos, e mantém praticamente o mesmo poder estatístico da análise referente à coorte inteira.

#### 4.2. PARTICIPANTES

A coorte do projeto BRISA investigada nesse estudo, foi a “Coorte de pré-natal”. Esse estudo apresenta uma amostra de conveniência, sendo a população de referência gestantes com IG entre 20 e 25 semanas. Por não haver registros de mulheres grávidas ou que fazem o acompanhamento do pré-natal, não é possível obter uma amostra aleatória representativa dessa população, sendo necessário realizar uma amostra de conveniência.

##### 4.2.1. Critérios de elegibilidade

Para serem incluídas no estudo, as participantes deveriam:

- a) ter realizado o primeiro exame de ultrassonografia obstétrica antes de 20 semanas de gestação, devido à maior facilidade para estimar a IG;
- b) ter entre 20-25 semanas de gestação no momento do recrutamento;
- c) ter gestação única;

As participantes foram excluídas do estudo, caso ocorresse:

- a) Perda de segmento entre a avaliação do pré-natal e do nascimento;
- b) Gestação não finalizada (aborto);
- c) Natimorto;
- d) Não realização do exame ou amostra insuficiente para o teste de infecção por micoplasma genital.

#### **4.2.2. Recrutamento**

O recrutamento das pacientes foi realizado através de convite e divulgação por rádio, entre os anos de 2010 e 2011. Em serviços de saúde da rede pública e privada, previamente selecionados, as participantes eram convidadas a participarem do estudo durante uma consulta de pré-natal. As interessadas em participarem da pesquisa, foram encaminhadas à Unidade de Pesquisa Clínica (UPC), do Hospital das Clínicas da FMRP (HCFMRP), para análise dos critérios de elegibilidade.

#### **4.2.3. Cálculo amostral**

O cálculo amostral foi baseado nas prevalências das variáveis explicativas avaliadas pelo projeto temático original, que variam de 10 a 50%. Dessa forma, sendo considerada a taxa de prematuridade de 12%, o tamanho amostral da coorte de conveniência de pré-natal do BRISA foi de 3.000 mulheres (1.500 em cada cidade participante: Ribeirão Preto e São Luís).

### **4.3. PROTOCOLOS DE COLETA DE VARIÁVEIS**

A coleta de dados das participantes foi realizada em dois momentos: no pré-natal, durante o recrutamento, e no puerpério. Na visita do recrutamento, a IG das participantes foi determinada, tendo como base dois critérios: ultrassonografia obstétrica, realizada antes de 20 semanas de gestação, e a data da última menstruação (DUM) (VERBURG et al., 2008). As

participantes que tivessem IG entre 20-25 semanas e preenchessem os demais critérios de inclusão eram registradas no estudo e encaminhadas para coleta de dados.

#### **4.3.1. Coleta de variáveis no pré-natal**

As participantes deveriam responder à um questionário geral sobre o pré-natal e dados sociodemográficos, realizarem exames clínico para coleta de amostras biológicas do sangue e conteúdo cervicovaginal. Após a coleta de dados, as participantes recebiam um cartão de identificação e eram instruídas a apresentá-lo na maternidade quando retornassem no momento do parto.

##### 4.3.1.1. Questionário

O questionário foi aplicado por um entrevistador, contendo perguntas para coleta de variáveis de caracterização da amostra, como: dados socioeconômicos e demográficos (idade materna, etnia, escolaridade, ocupação, status marital, renda familiar); hábitos de vida (uso de álcool e cigarro); dados sexuais e reprodutivos (histórico gestacional, número de parceiros sexuais); características da gravidez atual (hipertensão e diabetes gestacional).

##### 4.3.1.2. Exame ginecológico

Após a inclusão das participantes e aplicação do questionário, foi realizado o exame ginecológico, com espéculo descartável, para coleta de amostras do conteúdo cervicovaginal. Essas amostras foram utilizadas para os seguintes diagnósticos:

###### *4.3.1.2.1. Vaginose bacteriana*

Para o diagnóstico da vaginose bacteriana (VB) foi aferido o pH vaginal e coletado um *swab* do conteúdo vaginal. O *swab* foi inserido em um tubo com solução salina, e posteriormente feito o esfregaço em lâmina, para a realização do exame à fresco. As participantes com bacterioscopia de VB foram tratadas com metronidazol 500 mg de 12/12 horas, via oral durante 7 dias.

Para confirmação da VB, foi utilizado o escore de Nugent (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991). Outros dois *swabs* do conteúdo vaginal foram coletados e realizado o

esfregação vaginal em duas lâminas, que foram submetidas à técnica de coloração por Gram. Em seguida, foi realizada a avaliação por microscopia de imersão – magnificação de 1000x – para a caracterização da microbiota vaginal. A microbiota vaginal foi classificada de acordo com a somatória dos escores determinados para cada população bacteriana, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp. e *G. vaginalis*, sendo dividida entre microbiota normal (escore: 0 – 3), intermediária (escore: 4 – 6) e indicativa de vaginose bacteriana (escore: 7 – 10).

#### 4.3.1.2.2. *Mycoplasma genital*

A presença de Mh e *Ureaplasma* spp., assim como a suscetibilidade antimicrobiana dessas bactérias, foi analisada através do kit Mycoplasma IST 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), conforme indicado pelo fabricante. Com o uso de *swab*, uma amostra do conteúdo endocervical de cada participante foi coletada e inserida no meio de transporte R1, fornecido pelo kit. As amostras eram mantidas entre 2-8°C por até 48h, durante o transporte até o Laboratório de Microbiologia do HCFMRP, onde foram realizadas as análises.

Para a análise, 3mL do conteúdo do meio R1 foram adicionados ao meio R2, que continha 1mL de ureia/arginina liofilizada, permitindo o crescimento do *Ureaplasma* spp. e Mh, respectivamente. Após homogeneizado, 55 µL da solução R1+R2 foram pipetados em cada um dos 22 poços presentes na placa, seguido pela adição de duas gotas de óleo mineral. A placa com a amostra foi incubada à 37°C, e observada após 24h, para detecção do *Ureaplasma* spp., e até 48h, para detecção do Mh.

Caso houvesse a presença do micoplasma genital na amostra, a ureia/arginina era degradada, causando a mudança na cor do meio. A cor amarela ou laranja-amarela indicava que a amostra era negativa para *Ureaplasma* spp. ou Mh; vermelho claro indicava um resultado positivo. A placa também estimava a unidade formadora de colônia (UFC) por espécie de bactéria,  $\geq 10^4$  ou  $< 10^4$ .

O teste de suscetibilidade antimicrobiana incluiu a análise de 9 antibióticos: doxiciclina, ofloxacina, eritromicina, tetraciclina, josamicina, ciprofloxacina, azitromicina, claritromicina e pristinamicina. A placa apresentava dois poços por antibiótico, um com uma concentração baixa e outro com uma concentração alta da droga, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (WAYNE, 2011) para o desempenho de testes de sensibilidade antimicrobiana. Dessa forma, com presença ou ausência da cor vermelha nos poços, era possível identificar cepas sensíveis, intermediárias e resistentes à cada um dos antibióticos.

As participantes que tiveram exame positivo para micoplasma genital foram contatadas e enviada uma prescrição de azitromicina 1g, dose única, por via oral para o tratamento da gestante e do parceiro. O controle de cura não foi realizado. Nesse estudo, as participantes que tiveram infecção por micoplasma genital, constituíram o grupo positivo para a infecção, e aquelas que não apresentaram infecção, formaram o grupo negativo para a infecção.

#### 4.3.1.3. Coleta do sangue

Para a quantificação dos mediadores imunológicos, foram coletados 20mL de sangue, por punção venosa, em sistema a vácuo, por tubos de polietileno com EDTA. O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, e posteriormente aliqüotadas as amostras do plasma em tubos *Eppendorf* de 2 mL, onde foram armazenadas em freezer -80°C no Laboratório Multiusuário da FMRP/USP, até processamento.

##### 4.3.1.3.1. Quantificação de citocinas

Foram analisados os seguintes mediadores imunológicos: IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , pelo kit Luminex LX 200® da Multiplex Assays (MILLIPLEX®, Merk). As amostras de plasma foram transferidas para freezer -20°C por período *overnight* para descongelamento. Durante o experimento foram mantidas no gelo. Todos os reagentes utilizados foram previamente preparados e mantidos em temperatura ambiente, de acordo com o protocolo do fabricante.

O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, primeiramente lavada com tampão de lavagem por 10 minutos, sob agitação constante em temperatura ambiente. Para a curva padrão, foram adicionados 25  $\mu$ L de cada solução padrão, em diluição seriada, nos poços apropriados. Em seguida, foram adicionados mais 25  $\mu$ L do tampão de teste em todos os poços e 25  $\mu$ L da matriz sérica. Posteriormente, 25  $\mu$ L de amostra do plasma de cada gestante foram adicionados nos demais poços da placa, seguido por 25  $\mu$ L da solução preparada com as *beads* marcadas com anticorpos específicos para cada analito. A placa foi incubada *overnight* à 4°C, em agitação constante, para posterior análise.

Após o período de incubação, foi realizado o descarte do conteúdo da placa, seguido por duas lavagens com tampão de lavagem e com uso de placa magnética para a aderência das *beads*. Posteriormente à lavagem, a placa foi incubada por 1h, após adição de 25  $\mu$ L/poço do anticorpo de detecção. Em seguida, a placa foi novamente incubada com streptavidina por 30

minutos. Finalizada as lavagens após a incubação, a placa feita a leitura das placas pelo equipamento Luminex®. Os níveis de cada analito foram dosados pela quantificação de fluorescência emitida pelas *beads*, cujos anticorpos de superfície se ligaram de maneira específica aos mediadores imunológicos de interesse. Os resultados foram gerados em pg/mL.

#### **4.3.2. Coleta de variáveis no puerpério**

No momento do nascimento, as gestantes eram entrevistadas novamente para a atualização e melhor apuração de certas informações, como características da gravidez atual, idade materna, hábitos de vida e características do parto. Também foram coletadas informações para as variáveis de caracterização do desfecho gestacional.

As participantes que tivessem menos de 37 semanas de gestação foram classificadas como PPT. Por meio de uma avaliação de questionário do parto e prontuário, os PPT foram classificados como espontâneos ou iatrogênicos. Como o objetivo do estudo foi investigar a relação da infecção com o desfecho de PPTe, foram incluídas na análise apenas as gestantes que tiveram PPTe. Para a identificação desse tipo de parto, foram analisadas as respostas referentes ao motivo da hospitalização, se as participantes estavam sentindo contrações dolorosas, se tiveram perda de líquido amniótico e se foi preciso o rompimento da bolsa amniótica pelo médico. Também foram analisadas informações do prontuário quanto à via de parto, e em caso de cesárea, o motivo.

Nesse estudo, as participantes que tiveram menos de 37 semanas de gestação e foram classificadas como PPT espontâneo de acordo com a avaliação de questionário e prontuário, constituíram o grupo PPTe. E as gestantes com mais de 37 semanas foram classificadas como parto a termo (PT), formando o grupo PT.

#### **4.3.3. Variáveis analisadas no estudo**

##### **4.3.3.1. Variáveis dependentes**

Foram realizadas duas análises principais no estudo, estratificando as gestantes em dois desfechos:

- a) Desfecho obstétrico: parto pré-termo espontâneo e parto a termo;
- b) Desfecho de infecção: presença e ausência de infecção por micoplasma genital;

#### 4.3.3.2. Variáveis independentes

Análise da caracterização da amostra:

- a) Idade dividida em três categorias:  $\leq 19$  vs 20–34 vs  $\geq 35$  anos
- b) Etnia: branca vs negra;
- c) Escolaridade:  $\leq 9$  vs 10–12 vs  $\geq 12$  anos;
- d) Estado civil: casada/união estável vs solteira/divorciada;
- e) Atividade remunerada: sim vs não;
- f) Consumo de bebida alcoólica: sim vs não;
- g) Tabagismo: sim vs não.

Análise das características clínicas:

- a) Histórico de parto pré-termo anterior: não vs sim vs nulípara;
- b) Histórico de aborto anterior: não vs sim;
- c) Hipertensão gestacional: não vs sim;
- d) Diabetes gestacional: não vs sim;
- e) Comprimento cervical:  $\leq 2,5$  cm vs  $> 2,5$  cm;
- f) Número de parceiros sexuais: 1-4 vs  $\geq 5$ ;
- g) Escore de Nugent: 1-3 vs 4-6 vs  $\geq 7$ .

Análise da infecção por micoplasma genital:

- a) Tipo de bactéria: Mh vs *Ureaplasma* spp. vs Mh+*Ureaplasma* spp.;
- b) UFC:  $< 10^4$  vs  $\geq 10^4$ ;
- c) Resistência antimicrobiana: eritromicina (sensível vs resistente), azitromicina (sensível vs resistente), claritromicina (sensível vs resistente).

Avaliação de mediadores imunológicos:

- a) Citocinas pró-inflamatórias: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ;
- b) Citocina anti-inflamatória: IL-10;

#### 4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foram realizadas análises exploratórias univariadas dos dados para verificar a associação entre as variáveis independentes e o desfecho gestacional (PPT vs PT), desfecho de infecção (positivo vs negativo para micoplasma genital) e desfecho de tipo da infecção (Mh vs *Ureaplasma* spp. vs Mh e *Ureaplasma* spp.). Para a análise exploratória de variáveis independentes qualitativas foi realizado o Teste Qui-quadrado e os resultados estão apresentados em frequência absoluta e relativa.

Em seguida, foi realizada a análise de regressão logística univariada para quantificar a associação entre as variáveis e cada um dos desfechos: gestacional e de infecção, através da medida de tamanho de efeito *odds ratio* (OR). As variáveis que apresentaram um  $p < 0,20$  nas análises de *odds ratio* (OR) bruto tanto do desfecho de PPTe, quanto no de infecção por micoplasma genital, ou foram consideradas clinicamente importantes para o estudo, foram incluídas no modelo de regressão logística multivariada, na tentativa de ajustar a análise à possíveis fatores de confusão. A análise de regressão logística multivariada foi utilizada para identificar as variáveis que apresentaram uma associação independente ao risco de PPT.

Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises de Qui-quadrado e regressão logística foram realizadas no programa SAS versão 9.4.

#### 4.5. ASPÉCTOS ÉTICOS

Esse projeto foi aprovado em todas as fases pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, HCFMRP/USP (Protocolo N°. 4116/2008), no ano de 2008. Todas as gestantes foram informadas, de forma clara e objetiva, sobre o protocolo de pesquisa. Após adesão ao projeto, as gestantes que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e, para menores de 18 anos, o adulto responsável também assinou. Foi garantida a liberdade em recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma (ANEXO A).

## **5. RESULTADOS**

---

## 5.1. ANÁLISE EXPLORATÓRIA

Entre os anos de 2010 e 2011, foram recrutadas para o estudo 1.400 gestantes na cidade de Ribeirão Preto. No entanto, 51 mulheres (3,6%) não preencheram os critérios de elegibilidade, devido à perda de seguimento entre a visita de pré-natal e o momento do parto (2,1%), ausência de resultados para os exames de Mh e *Ureaplasma* spp. (1%) e desfechos gestacionais de natimorto (0,43%) e aborto (0,07%), totalizando 1.349 (96,4%) elegíveis para a coorte. A prevalência de prematuridade entre as gestantes elegíveis foi de 9,2% (n=124), sendo 28 (22,6%) partos iatrogênicos e 89 (71,8%) espontâneos. Não foi possível classificar 7 (5,6%) dos PPT devido à falta de informações no questionário de puerpério e no prontuário das participantes. Por se tratar de um estudo em que o objetivo era avaliar a associação de infecção com o desfecho de PPT, foram incluídos na análise final apenas os PPT classificados como espontâneos (n=89) e os PT (n=1.225). Dessa forma, das participantes elegíveis para a coorte, 1.314 (97,49%) foram incluídas na análise final. O fluxo de recrutamento e inclusão das participantes no estudo está resumido na figura 1. A prevalência de PPTe dentre as gestantes incluídas na análise final deste estudo foi de 6,8% e a de infecção por micoplasma genital foi de 18%, sendo que 12,4% eram colonizadas apenas por *Ureaplasma* spp., 2,7% apenas por Mh e 2,9% apresentaram coinfeção por ambos.

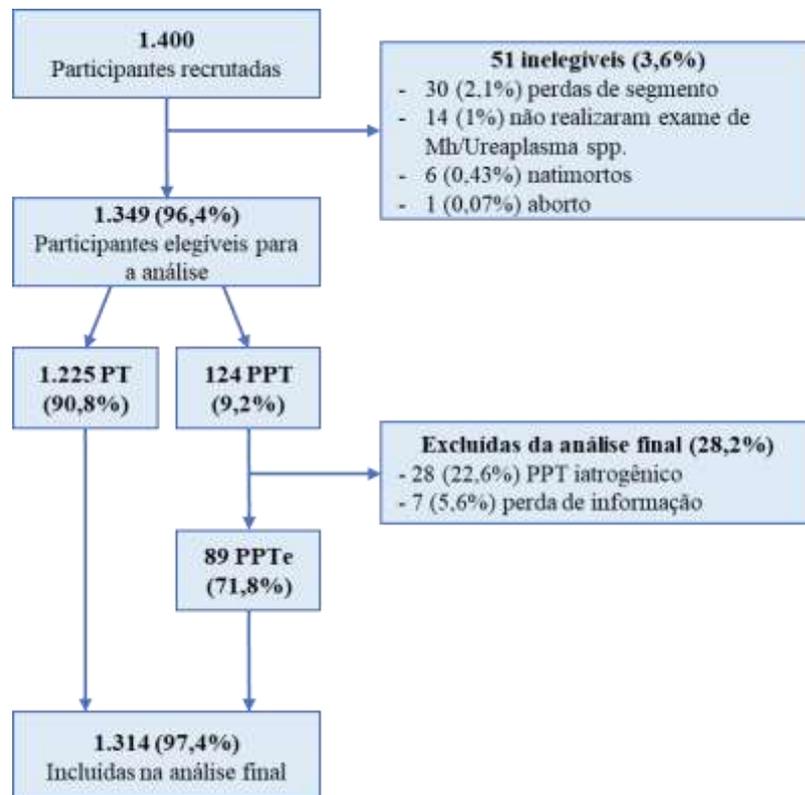
Foi realizada uma análise exploratória por Qui-quadrado das características sociodemográficas e clínicas das participantes. A análise foi estratificada pelo desfecho gestacional (PPTe vs PT) e desfecho de infecção por micoplasma genital (positivo vs negativo para a infecção).

Na tabela 1 é possível verificar as características sociodemográficas das gestantes incluídas, a maior parte delas tinha entre 20-34 anos de idade (74,6%), com as participantes apresentando uma frequência entre as etnias semelhante, 51,3% se auto declaravam brancas e 47,8% negras. Dentre as gestantes que tiveram PPTe, houve uma frequência significativamente maior de consumo de bebida alcoólica quando comparado às gestantes que tiveram PT (p=0,0391), essa característica não foi observada entre as gestantes com e sem infecção (p=0,6971). Já o uso de cigarro esteve associado tanto ao desfecho de PPTe (p=0,0053), quanto à presença de infecção (p=0,0009), com esses grupos apresentando uma porcentagem de gestantes tabagistas quase duas vezes maior do que seus grupos controles.

Características como estado civil e escolaridade não apresentaram diferenças em ambos os desfechos. Quanto à atividade remunerada, uma parcela significativamente maior de gestantes com infecção (58,1%, p=0,0473) era desempregada. De forma oposta, a maior parte

das gestantes com desfecho de PPT praticava alguma atividade remunerada (52,8%), mas não houve diferença do grupo controle ( $p=0,3262$ ) (Tabela 1).

**Figura 1** – Fluxograma de recrutamento e inclusão das participantes do estudo, BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.



Mh, *Mycoplasma hominis*; PT, parto a termo; PPT, parto pré-termo; PPTe, parto pré-termo espontâneo.

Em relação às características clínicas (tabela 2), ao analisar a população pelo tipo de desfecho gestacional, foi possível verificar que o histórico de PPT em gestações anteriores esteve significativamente associado ao desfecho de PPTe na gestação atual ( $p<,0001$ ), onde 42,7% das mulheres deste grupo informaram ter tido pelo menos um PPT anterior, contra 7,5% no grupo controle. Também houve associação entre o PPTe e o comprimento do colo  $\leq 2,5$  cm ( $p<,0001$ ) e hipertensão gestacional ( $p= 0,026$ ).

Já em relação ao micoplasma genital, foi possível observar uma associação da infecção com mais de 5 parceiros sexuais ao longo da vida ( $p=0,0019$ ) e com um escore de Nugent indicativo de VB ( $p<,0001$ ). Para a análise do escore de Nugent, foram utilizadas 1.304 amostras, pois em 10 delas não foi possível realizar a bacterioscopia nos esfregaços vaginais.

As características da infecção por micoplasma genital de acordo com o desfecho gestacional estão descritas na tabela 3. A presença de infecção não esteve associada ao desfecho de PPTe, apresentando prevalência semelhante entre os grupos de PPTe e PT, com 16,8% e

18%, respectivamente ( $p=0,7782$ ). A colonização do TGIF por micoplasmas genitais também apresentou ausência de associação com o PPTe mesmo ao ser estratificada pelo tipo da bactéria, *Mh*, *Ureaplasma* spp. ou ambas ( $p=0,8277$ ). Além disso, ao analisarmos as gestantes em que havia presença de VB junto à infecção por micoplasma genital, também foi possível verificarmos que a associação dessas duas condições microbianas não apresentou diferença entre os desfechos gestacionais ( $p=0,3548$ ), com mais de 90% das gestantes apresentando ausência dessa característica vaginal.

**Tabela 1** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com as características sociodemográficas e o desfecho de parto pré-termo e parto a termo e o desfecho positivo e negativo para a infecção por micoplasma genital. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.

Variáveis incluídas n (%)	N	Desfecho gestacional			Desfecho de infecção		
		Parto pré-termo	Parto termo	p	Positivo	Negativo	p
<b>Total</b>	<b>1.314</b>	<b>89 (6,8)</b>	<b>1.225 (93,2)</b>		<b>236 (18)</b>	<b>1.078 (82)</b>	
<b>Idade (anos)</b>							
≤ 19	211	16 (18)	195 (15,9)	0,8245	47 (19,9)	164 (15,2)	0,2043
20 – 34	981	64 (71,9)	917 (74,9)		168 (71,2)	813 (75,4)	
≥ 35	122	9 (10,1)	113 (9,2)		21 (8,9)	101 (9,4)	
<b>Etnia</b>							
Branca	674	41 (46,1)	633 (52,2)	0,2650	131 (56)	543 (50,8)	0,1541
Negra	628	48 (53,9)	580 (47,8)		103 (44)	525 (49,2)	
<b>Escolaridade (anos)</b>							
≤ 9	361	25 (28,1)	336 (27,5)	0,6744	72 (30,6)	289 (26,9)	0,1261
10 – 12	843	59 (66,3)	784 (64,2)		151 (64,3)	692 (64,4)	
> 12	106	5 (5,6)	101 (8,3)		12 (5,1)	94 (8,7)	
<b>Estado civil</b>							
Casada/União estável	1.065	70 (78,7)	995 (81,4)	0,5284	190 (80,5)	875 (81,3)	0,7728
Solteira/Divorciada	247	19 (21,3)	228 (18,6)		46 (19,5)	201 (18,7)	
<b>Atividade remunerada</b>							
Não	685	42 (47,2)	643 (52,6)	0,3262	137 (58,1)	548 (50,9)	<b>0,0473</b>
Sim	627	47 (52,8)	580 (47,4)		99 (41,9)	528 (49,1)	
<b>Consumo de bebida alcoólica</b>							
Não	1.221	79 (90,8)	1.142 (95,6)	<b>0,0391</b>	220 (94,8)	1001 (95,4)	0,6971
Sim	60	8 (9,2)	52 (4,4)		12 (5,2)	48 (4,6)	
<b>Tabagismo</b>							
Não	1.141	69 (77,5)	1.072 (87,8)	<b>0,0053</b>	190 (80,5)	951 (88,6)	<b>0,0009</b>
Sim	169	20 (22,5)	149 (12,2)		46 (19,5)	123 (11,4)	

P-valor referente ao teste Qui-quadrado.

**Tabela 2** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com o histórico clínico e o desfecho de parto pré-termo e parto a termo e o desfecho positivo e negativo para a infecção por micoplasma genital. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.

Variáveis incluídas n (%)	N	Desfecho gestacional			Desfecho de infecção		
		Parto pré-termo	Parto termo	p	Positivo	Negativo	p
<b>Total</b>	<b>1.314</b>	<b>89 (6,8)</b>	<b>1.225 (93,2)</b>		<b>236 (18)</b>	<b>1.078 (82)</b>	
<b>Histórico de parto pré-termo anterior</b>							
Não	536	18 (20,2)	518 (42,5)	<b>&lt;,0001</b>	84 (35,7)	452 (42,1)	0,1894
Sim	130	38 (42,7)	92 (7,5)		24 (10,2)	106 (9,9)	
Nulípara	643	33 (37,1)	610 (50)		127 (54,1)	516 (48)	
<b>Histórico de aborto anterior</b>							
Não	1.084	68 (76,4)	1.016 (83)	0,1130	200 (84,8)	884 (82,1)	0,3283
Sim	229	21 (23,6)	208 (17)		36 (15,2)	193 (17,9)	
<b>Hipertensão gestacional</b>							
Não	1.180	75 (84,3)	1.105 (91,3)	<b>0,0260</b>	210 (90,1)	970 (91)	0,6782
Sim	119	14 (15,7)	105 (8,7)		23 (9,9)	96 (9)	
<b>Diabetes gestacional</b>							
Não	1.244	84 (94,4)	1.160 (94,7)	0,8993	228 (96,6)	1.016 (94,3)	0,1434
Sim	70	5 (5,6)	65 (5,3)		8 (3,4)	62 (5,7)	
<b>Comprimento cervical</b>							
≤ 2,5 cm	47	11 (12,5)	36 (2,9)	<b>&lt;,0001</b>	8 (3,4)	39 (3,6)	0,8693
> 2,5 cm	1.264	77 (87,5)	1.187 (97,1)		227 (96,6)	1.037 (96,4)	
<b>Número de parceiros sexuais</b>							
1-4	1.026	70 (84,3)	956 (81,4)	0,5088	161 (74,2)	865 (83,2)	<b>0,0019</b>
≥ 5	231	13 (15,7)	218 (18,6)		56 (25,8)	175 (16,8)	
<b>Escore de Nugent</b>							
1 - 3	947	60 (67,4)	887 (73)	0,3168	114 (48,7)	833 (77,9)	<b>&lt;,0001</b>
4 - 6	177	12 (13,5)	165 (13,6)		46 (19,7)	131 (12,2)	
≥7	180	17 (19,1)	163 (13,4)		74 (31,6)	106 (9,9)	

P-valor referente ao teste Qui-quadrado.

No intuito de verificar se as associações com o desfecho de infecção por micoplasma genital diferiam de acordo com o tipo de microrganismo, analisamos as variáveis que demonstraram uma associação sugestiva com a infecção a partir da estratificação das bactérias entre Mh, *Ureaplasma* spp. e Mh+*Ureaplasma* spp. (Tabela 4). Dentre as variáveis que apresentaram associações ao tipo de bactéria, foi possível observar que houve uma maior taxa de tabagismo entre as gestantes infectadas por Mh (25,7%) e coinfetadas por Mh e *Ureaplasma* spp. (34,2%) do que nas amostras apenas com *Ureaplasma* spp. (14,7%, p=0,0145). Também houve diferença significativa entre a densidade bacteriana (p<,0001), onde 68,6% das amostras de Mh apresentaram uma densidade < 10<sup>4</sup> UFC, e de forma oposta 71,2% e 79% das amostras de *Ureaplasma* spp. e Mh+*Ureaplasma* spp., respectivamente, apresentaram uma densidade ≥ 10<sup>4</sup> UFC. Além disso, as gestantes infectadas apenas por *Ureaplasma* spp. apresentaram uma

microbiota significativamente mais saudável ( $p < ,0001$ ), com o escore de Nugent de 62,1% delas entre 1-3, já as gestantes coinfectadas por Mh e *Ureaplasma* spp. tiveram as maiores taxas de microbiota intermediária (26,3%) e indicativa de VB (60,5%).

**Tabela 3** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com as características da infecção por micoplasma genital e o desfecho de parto pré-termo e parto a termo. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.

Variáveis incluídas n (%)	N	Desfecho gestacional		
		Parto pré-termo	Parto termo	P
<b>Total</b>	<b>1.314</b>	<b>89 (6,8)</b>	<b>1.225 (93,2)</b>	
<b>Micoplasma genital</b>				
Negativo	1.078	74 (83,2)	1.004 (82)	0,7782
Positivo	236	15 (16,8)	221 (18)	
<b>Tipo de bactéria</b>				
Mh	35	3 (20)	32 (14,5)	0,8277
<i>Ureaplasma</i> spp.	163	10 (66,7)	153 (69,2)	
Mh+ <i>Ureaplasma</i> spp.	38	2 (13,3)	36 (16,3)	
<b>UFC/ml</b>				
< 10 <sup>4</sup>	79	5 (33,3)	74 (33,5)	0,9904
≥ 10 <sup>4</sup>	157	10 (66,7)	147 (66,5)	
<b>VB + Micoplasma genital</b>				
Não	1.230	82 (92,1)	1.148 (94,5)	0,3548
Sim	74	7 (7,9)	67 (5,5)	

Mh, teste positivo para *Mycoplasma hominis*; Mh+ *Ureaplasma* spp., teste positivo para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp.; UFC, unidade formadora de colônia; *Ureaplasma* spp., teste positivo para *Ureaplasma* spp.; VB+*Mycoplasma* genital, amostras positivas para vaginose bacteriana (VB) e micoplasma genital. P-valor referente ao teste Qui-quadrado.

Também foi avaliada a resistência de cada micoplasma genital à três tipos de antibióticos que podem ser prescritos durante a gestação, eritromicina, azitromicina e claritromicina. As bactérias presentes na coinfecção por Mh e *Ureaplasma* spp. foram as que apresentaram as maiores taxas de resistência quando comparadas aos demais tipos de infecção. Das 38 amostras positivas para a coinfecção, 37 (97,4%) obtiveram resistência a pelo menos um dos antibióticos analisados. Seguido pelo Mh, em que 30 (85,7%) das amostras apresentaram alguma resistência. E de forma contrária às demais bactérias, as amostras de *Ureaplasma* spp. foram as que apresentaram maior sensibilidade nos testes, apenas 16 (9,8%) delas tiveram resistência à alguma das drogas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Distribuição das 1.314 gestantes de acordo com as características sociodemográficas e clínicas por tipo de micoplasma genital, Mh, *Ureaplasma* spp. ou Mh+ *Ureaplasma* spp. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.

Variáveis incluídas n (%)	N	Tipo de micoplasma genital			p
		Mh	<i>Ureaplasma</i> spp.	Mh+ <i>Ureaplasma</i> spp.	
<b>Total</b>	<b>236</b>	<b>35</b>	<b>163</b>	<b>38</b>	
<b>Etnia</b>					
Branca	131	14 (40)	98 (60,9)	19 (50)	0,0567
Negra	103	21 (60)	63 (39,1)	19 (50)	
<b>Escolaridade (anos)</b>					
≤ 9	12	1 (2,8)	11 (6,8)	0 (0)	0,1574
10 – 12	72	10 (28,6)	54 (33,3)	8 (21)	
> 12	151	24 (68,6)	97 (59,9)	30 (79)	
<b>Atividade remunerada</b>					
Não	137	24 (68,6)	92 (56,4)	21 (55,3)	0,3896
Sim	99	11 (31,4)	71 (43,6)	17 (44,7)	
<b>Tabagismo</b>					
Não	190	26 (74,3)	139 (85,3)	25 (65,8)	<b>0,0145</b>
Sim	46	9 (25,7)	24 (14,7)	13 (34,2)	
<b>Parceiros sexuais</b>					
1-4	161	26 (83,9)	113 (75,3)	22 (61,1)	0,0891
≥ 5	56	5 (16,1)	37 (24,7)	14 (38,9)	
<b>Histórico de parto pré-termo anterior</b>					
Não	84	13 (37,1)	52 (32,1)	19 (50)	0,3508
Sim	24	3 (8,6)	18 (11,1)	3 (7,9)	
Nulípara	127	19 (54,3)	92 (56,8)	16 (42,1)	
<b>Diabetes gestacional</b>					
Não	228	35 (100)	156 (95,7)	37 (97,4)	0,4270
Sim	8	0 (0)	7 (4,3)	1 (2,6)	
<b>Escore de Nugent</b>					
1 - 3	114	9 (25,7)	100 (62,1)	5 (13,2)	<b>&lt;,0001</b>
4 - 6	46	7 (20)	29 (18)	10 (26,3)	
≥7	74	19 (54,3)	32 (19,9)	23 (60,5)	
<b>UFC/mL</b>					
< 10 <sup>4</sup>	79	24 (68,6)	47 (28,8)	8 (21)	<b>&lt;,0001</b>
≥ 10 <sup>4</sup>	157	11 (31,4)	116 (71,2)	30 (79)	
<b>Resistência antimicrobiana<sup>a</sup></b>					
Eritromicina	78	28 (80)	14 (8,6)	36 (94,7)	<b>&lt;,0001</b>
Azitromicina	56	20 (57,1)	10 (6,1)	26 (68,4)	<b>&lt;,0001</b>
Claritromicina	79	29 (82,9)	13 (8)	37 (97,4)	<b>&lt;,0001</b>

Mh, teste positivo para *Mycoplasma hominis*; *Ureaplasma* spp., teste positivo para *Ureaplasma* spp.; Mh+ *Ureaplasma* spp., teste positivo para micoplasma genital; UFC, unidades formadoras de colônia. P-valor referente ao teste Qui-quadrado. <sup>a</sup> O p valor é referente à análise de resistência à cada tipo de droga vs sem resistência à droga.

## 5.2. MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA

Foi feita uma análise de regressão logística univariada para quantificar a associação entre as variáveis e cada um dos desfechos: gestacional e de infecção. As variáveis que apresentaram associação significativa com o desfecho de PPTe e infecção por micoplasma genital na análise de Qui-quadrado mantiveram a associação na análise de regressão logística univariada (Tabela 5).

No entanto, ao ajustarmos o modelo de regressão logística multivariada à fatores de risco e possíveis fatores de confusão (etnia, escolaridade, atividade remunerada, consumo de bebida alcoólica, tabagismo, parceiros sexuais, histórico obstétrico de PPT, histórico de aborto, hipertensão gestacional, diabetes gestacional, comprimento do colo, escore de Nugent, infecção por micoplasma genital), foi possível observar que, o uso de bebida alcóolica, que antes apresentava um OR bruto de 2,23; IC 95% 1,02 - 4,85, deixou de ser um fator de risco para o desfecho de PPTe (ORa 1,9; IC 95% 0,72 - 5,02). O mesmo foi observado com o tabagismo, que embora as gestantes que faziam o uso de cigarro tivessem uma chance 2 vezes maior de ter PPTe, a variável não manteve a associação significativa. E também com a hipertensão gestacional, que deixou de ser um fator de risco para um PPTe (ORa 1,16, IC 95% 0,55 - 2,44). Quanto à infecção por micoplasma genital, a ausência de associação com o desfecho gestacional de PPTe se manteve no modelo ajustado (ORa 0,66; IC 95% 0,32 - 1,35).

O histórico de PPT (ORa 12,06, IC 95% 6,21 - 23,43) e um comprimento cervical  $\leq 2,5$  cm (ORa 3,97, IC 95% 1,67 - 9,47) foram as únicas variáveis que mantiveram uma associação independente com o PPTe na análise de regressão logística multivariada, representando fatores de risco para este desfecho gestacional adverso.

Para verificar a hipótese inflamatória do trabalho de parto, investigamos se citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias estiveram associadas ao desfecho de PPTe e à infecção por micoplasma genital. As análises dos mediadores imunológicos: IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , não foram realizadas com amostras de todas as gestantes, sendo utilizadas amostras de apenas 346 participantes. Das 10 citocinas avaliadas, nenhuma apresentou associação significativa com o desfecho de infecção por micoplasma genital ou PPTe na análise de regressão logística univariada (Tabela 6).

**Tabela 5** – Análise de regressão logística univariada das características das gestantes de acordo com o desfecho de parto pré-termo e o desfecho de infecção por micoplasma genital. Análise de regressão logística ajustada de acordo com o desfecho de parto pré-termo. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.

Variáveis incluídas	Continua					
	Desfecho gestacional		Desfecho de infecção		Desfecho gestacional	
					Parto pré-termo (80) vs PT (1.105)	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>	ORa (IC 95%) <sup>b</sup>	<i>p</i>
<b>Idade (anos)</b>						
≤ 19	1,18 (0,67 - 2,08)	0,8247	1,39 (0,96 - 2,00)	0,2061	-	
20 – 34 (ref.)	-		-		-	
≥ 35	1,14 (0,55 - 2,36)		1,01 (0,61 - 1,66)		-	
<b>Etnia</b>						
Branca (ref.)	-	0,2659	-	0,1545	-	0,3673
Negra	1,28 (0,83 - 1,97)		0,81 (0,61 - 1,08)		1,26 (0,76 - 2,08)	
<b>Escolaridade (anos)</b>						
> 12 (ref.)	-	0,6781	-	0,1319	-	0,4313
10 – 12	1,52 (0,60 - 3,88)		1,71 (0,91 - 3,20)		2,0 (0,64 - 6,2)	
≤ 9	1,50 (0,56 - 4,03)		1,95 (1,02 - 3,75)		1,65 (0,49 - 5,54)	
<b>Estado civil</b>						
Casada/União estável (ref.)	-	0,5288	-	0,7728	-	
Solteira/Divorciada	1,19 (0,70 - 2,01)		1,05 (0,74 - 1,51)		-	
<b>Atividade remunerada</b>						
Sim (ref.)	-	0,3269	-	<b>0,0478</b>	-	0,2428
Não	0,81 (0,52 - 1,24)		1,33 (1,003 - 1,77)		0,75 (0,45 - 1,22)	
<b>Consumo de bebida alcoólica</b>						
Não (ref.)	-	<b>0,0441</b>	-	0,6973	-	0,1984
Sim	2,23 (1,02 - 4,85)		1,14 (0,59 - 2,18)		1,9 (0,72 - 5,02)	
<b>Tabagismo</b>						
Não (ref.)	-	<b>0,0062</b>	-	<b>0,0010</b>	-	0,0859
Sim	2,09 (1,23 - 3,53)		1,87 (1,29 - 2,72)		1,79 (0,92 - 3,49)	
<b>Parceiros sexuais</b>						
1-4 (ref.)	-	0,5096	-	<b>0,0021</b>	-	0,0724
≥ 5	0,81 (0,44 - 1,5)		1,72 (1,22 - 2,43)		0,52 (0,25 - 1,06)	
<b>Histórico de parto pré-termo anterior</b>						
Não (ref.)	-	<b>&lt;,0001</b>	-	0,1905	-	<b>&lt;,0001</b>
Sim	11,89 (6,50 - 21,73)		1,22 (0,74 - 2,01)		12,06 (6,21 - 23,43)	
Nulípara	1,56 (0,87 - 2,80)		1,32 (0,98 - 1,79)		1,59 (0,83 - 3,06)	
<b>Histórico de aborto anterior</b>						
Não (ref.)	-	0,1152	-	0,329	-	0,8976
Sim	1,51 (0,90 - 2,52)		0,82 (0,56 - 1,22)		0,96 (0,51 - 1,81)	
<b>Hipertensão gestacional</b>						
Não (ref.)	-	<b>0,0286</b>	-	0,6783	-	0,6944
Sim	1,97 (1,07 - 3,60)		1,11 (0,69 - 1,79)		1,16 (0,55 - 2,44)	
<b>Diabetes gestacional</b>						
Não (ref.)	-	0,8994	-	0,1482	-	0,7388
Sim	1,06 (0,42 - 2,71)				1,2 (0,42 - 3,45)	
<b>Comprimento cervical</b>						
> 2,5 cm (ref.)	-	<b>&lt;,0001</b>	-	0,8693	-	<b>0,0018</b>
≤ 2,5 cm	4,71 (2,31 - 9,61)		0,94 (0,43 - 2,03)		3,97 (1,67 - 9,47)	

Variáveis incluídas	Continuação					
	Desfecho gestacional		Desfecho de infecção		Desfecho gestacional	
	Parto pré-termo (80) vs PT (1.105)					
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	ORa (IC 95%) <sup>b</sup>	P
<b>Escore de Nugent</b>						
1 - 3 (ref.)	-	0,3215	-	<,0001	-	
4 - 6	1,08 (0,57 - 2,04)		2,57 (1,74 - 3,79)		1,41 (0,71 - 2,83)	0,4728
≥7	1,54 (0,88 - 2,71)		5,10 (3,58 - 7,28)		1,39 (0,69 - 2,8)	
<b>VB + Micoplasma genital</b>						
Não (ref.)	-	0,3576	-		-	
Sim	1,46 (0,65 - 3,29)		-		-	
<b>Micoplasma genital</b>						
Negativo (ref.)	-	0,7783	-		-	0,2497
Positivo	0,92 (0,52 - 1,64)		-		0,66 (0,32 - 1,35)	
<b>Tipo de infecção<sup>a</sup></b>						
Mh	1,27 (0,38 - 4,25)	0,9332	-		-	
<i>Ureaplasma</i> spp.	0,89 (0,45 - 1,75)		-		-	
Mh+ <i>Ureaplasma</i> spp.	0,75 (0,18 - 3,19)		-		-	
<b>UFC/mL<sup>a</sup></b>						
< 104	0,92 (0,36 - 2,34)	0,9611	-		-	
≥ 104	0,92 (0,47 - 1,83)		-		-	

Mh, teste positivo para *Mycoplasma hominis*; Mh+ *Ureaplasma* spp., teste positivo para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp.; OR, odds ratio; ORa, odds ratio ajustado; *Ureaplasma* spp., teste positivo para *Ureaplasma* spp.; Ref, referência; UFC, unidades formadoras de colônia; VB + Micoplasma genital: amostras positivas para vaginose bacteriana (VB) e micoplasma genital. P-valor referente ao teste Qui-quadrado. <sup>a</sup> Referência: sem infecção. <sup>b</sup> Modelo de OR ajustado às variáveis: etnia, escolaridade, atividade remunerada, consumo de bebida alcoólica, tabagismo, parceiros sexuais, histórico obstétrico de PPT, histórico de aborto, hipertensão gestacional, diabetes gestacional, comprimento do colo, escore de Nugent, infecção por micoplasma genital.

**Tabela 6** – Análise de regressão logística univariada das citocinas de acordo com o desfecho de parto pré-termo e o desfecho de infecção por micoplasma genital. BRISA-HCFMRPUSP, 2010-2011.

Variáveis incluídas	Desfecho gestacional		Desfecho de infecção	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,998 (0,995 - 1,001)	0,119	0,998 (0,995 - 1,001)	0,2336
<b>IL-10</b>	0,992 (0,976 - 1,009)	0,3495	0,997 (0,986 - 1,007)	0,5605
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	0,996 (0,993 - 1,0)	0,0608	0,999 (0,995 - 1,002)	0,5573
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0,978 (0,94 - 1,018)	0,2759	0,993 (0,963 - 1,024)	0,6511
<b>IL-2</b>	1,00 (0,996 - 1,007)	0,6382	1,002 (0,995 - 1,008)	0,6077
<b>IL-6</b>	0,996 (0,987 - 1,005)	0,385	0,987 (0,972 - 1,002)	0,0874
<b>IL-8</b>	0,998 (0,995 - 1,001)	0,2184	0,998 (0,972 - 1,002)	0,2139
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,984 (0,965 - 1,004)	0,1225	0,980 (0,954 - 1,007)	0,1467
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	0,997 (0,992 - 1,002)	0,2613	0,993 (0,985 - 1,002)	0,1349

OR, odds ratio. P-valor referente ao teste Qui-quadrado.

## **6. DISCUSSÃO**

---

## 6.1. PRINCIPAIS ACHADOS

Esta coorte prospectiva teve como objetivo principal verificar a associação entre a infecção por micoplasmas genitais durante as 20-25 semanas de gestação e o desfecho de PPTe em uma população de mulheres residentes da cidade de Ribeirão Preto – SP. Uma amostra de conveniência de 1.314 mulheres foi incluída na análise final do estudo e a prevalência do desfecho de PPTe foi de 6,8%.

Dentre os principais achados deste trabalho, temos que a presença da infecção por micoplasma genital não esteve associada à um parto com menos de 37 semanas (ORa 0,66; IC 95% 0,32 - 1,35), sendo que os desfechos de PPTe e PT apresentaram prevalências de infecção semelhantes de 16,8% e 18%, respectivamente. Os fatores de risco associados ao micoplasma genital incluíram: status socioeconômico, uso de cigarro, número de parceiros sexuais ao longo da vida e o tipo de microbiota vaginal, de acordo com o escore de Nugent. Já dentre os fatores de risco independentemente associados ao desfecho gestacional adverso, identificamos o histórico de PPT em gestações anteriores e um comprimento cervical  $\leq 2,5$  cm.

## 6.2. INTERPRETAÇÃO

### 6.2.1. Prevalência e fatores de risco associados à infecção por micoplasma genital

A colonização do trato genitourinário por micoplasmas genitais é frequente em mulheres saudáveis e sintomáticas (HORNER et al., 2018), o que torna difícil caracterizar a significância clínica desses microrganismos em desfechos reprodutivos adversos. Dessa forma, ainda se mantém em pauta a necessidade de rastreamento desses microrganismos em mulheres assintomáticas, assim como o tratamento em sintomáticas. No entanto, como o uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento de bactérias pode trazer malefícios, gerando uma seleção de microrganismos resistentes (HORNER et al., 2018), é importante delinear uma melhor forma de manejo dessas infecções. Sendo assim, é necessário investigar as relações dessas bactérias com o hospedeiro, visto que os micoplasmas genitais podem atuar como patógenos dependendo das condições do organismo em que se encontram.

Estudos brasileiros que verificaram a prevalência e associações de micoplasmas genitais com possíveis fatores de risco são escassos. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investiga a associação dessa infecção em mulheres brasileiras gestantes. Em nosso estudo, a

prevalência em gestantes assintomáticas de Mh, *Ureaplasma* spp. e a coinfeção por ambos foi de 2,7%, 12,4% e 2,9%, respectivamente. Sendo a prevalência geral por micoplasma genital de 18%.

Comparando os nossos resultados com as análises feitas em estudos brasileiros com mulheres não gestantes assintomáticas, as prevalências de Mh variaram de 0,8% - 11,3% e para *Ureaplasma* spp. as taxas foram de 0,94% - 14,9% (CARNEIRO et al., 2020; CHRISTOFOLINI et al., 2012; LIMA et al., 2018). Já em artigos realizados com populações sintomáticas, a prevalência de Mh apresentou taxas de 21,9 - 31,8% e *Ureaplasma* spp. esteve entre 16,6% - 60,6% (CAMPOS et al., 2015; LOBÃO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2011). Nessas publicações não foram verificadas informações sobre a coinfeção de micoplasmas genitais.

Considerando estudos realizados em demais regiões do mundo, a literatura indica que, em gestantes, a prevalência de Mh costuma estar abaixo de 30% e de *Ureaplasma* spp. as taxas variam de 20%-88%, já para a coinfeção por ambos a prevalência varia entre 1,7% - 17,7% (BAYRAKTAR et al., 2010; FREITAS et al., 2017; GU et al., 2020; KWAK et al., 2014; LEE et al., 2009; MARAKI et al., 2018; ZENG et al., 2016). De forma geral, por mais que nossos resultados tenham demonstrado uma prevalência de micoplasma genital um pouco mais baixa do que demais estudos, provavelmente devido ao fato das gestantes serem assintomáticas (BAYRAKTAR et al., 2010; TIBALDI et al., 2009), o padrão de prevalência foi semelhante ao encontrado na literatura em gestantes. Assim como demais estudos, verificamos uma maior prevalência da infecção por *Ureaplasma* spp. e da associação de Mh com *Ureaplasma* spp., do que por Mh sozinho.

Das variáveis analisadas em nosso estudo, foi verificada a associação da infecção por micoplasma genital durante a gestação com: escolaridade  $\leq 9$  anos (OR 1,95; IC 95% 1,02 - 3,75), ausência de atividade remunerada (OR 1,33; IC 95% 1,003 - 1,77), uso de cigarro (OR 1,87; IC 95% 1,29 - 2,72), número de parceiros sexuais ao longo da vida  $\geq 5$  (OR 1,72; IC 95% 1,22 - 2,43), presença de uma microbiota intermediária (OR 2,57; IC 95% 1,74 - 3,79) e característica de VB (OR 5,1; IC 95% 3,58 - 7,28). Conforme outros estudos da literatura já demonstraram, características relacionadas ao status socioeconômico, hábitos e microbiota vaginal do hospedeiro costumam ser consideradas fatores de risco para a infecção por micoplasma genital (CAMPOS et al., 2015; DIADHIOU et al., 2019; LOBÃO et al., 2017; SILVA et al., 2018; TIBALDI et al., 2009).

No entanto, de forma diferente, em nosso trabalho a etnia da gestante não esteve associada à infecção (Negra OR 0,81; IC 95% 0,61 - 1,08), conforme demonstrado por Campos

et al. (2015). Mesmo estratificando a análise pelo tipo de bactéria, em que o Mh apresentou uma prevalência de 60% em gestantes negras, contra 39,1% para o *Ureaplasma* spp. e 50% para a coinfeção, não houve associação significativa com esta variável ( $p=0,0567$ ). Também não houve associação da infecção com a idade, conforme alguns estudos identificaram maior risco de infecção em mulheres com menos de 25 anos (CAMPOS et al., 2015; DIADHIOU et al., 2019; TIBALDI et al., 2009) ou com idade entre 20-29 anos (SILVA et al., 2018).

Em nosso estudo, verificamos uma forte associação entre a presença de infecção por micoplasma genital e uma microbiota não saudável. Em relação à um escore de Nugent de 1-3, as gestantes com uma microbiota intermediária e indicativa de VB tiveram um aumento significativo no risco de infecção.

Para as variáveis que apresentaram uma tendência de associação à infecção por micoplasma genital, ao realizarmos a análise de acordo com o tipo da bactéria, verificamos que houve diferença significativa na associação do tipo de micoplasma genital com duas variáveis: uso de cigarro e escore de Nugent.

Na literatura, a relação entre micoplasma genital e VB já é bem consolidada (HILL, 1993; KAAMBO et al., 2018; RAMPERSAUD; RANDIS; RATNER, 2012), sendo a associação entre o aumento da carga bacteriana de Mh em um cenário de disbiose de VB mais extensa do que para o *Ureaplasma* spp. (HORNER et al., 2018). Visto que o Mh é encontrado com mais frequência e em maior quantidade em mulheres com VB do que em microbiotas saudáveis, enquanto o *Ureaplasma* spp. é encontrado em larga escala tanto em amostras de conteúdo cervicovaginal de mulheres com VB quanto sem (MARAOKI et al., 2018; PATEL; NYIRJESY, 2010).

Um estudo realizado por Cox et al. (2016) demonstrou uma alta associação entre Mh e *G. vaginalis* em amostras de VB (60,7%), comparado às amostras de microbiota intermediária (36,4%) e sem VB (8,8%), além de ter observado um aumento crescente e significativo na carga de Mh nas condições de VB. O mesmo não foi observado com outros tipos de Mollicutes. Esses resultados indicam que o Mh possivelmente apresenta uma relação simbiótica com bactérias associadas à VB e que o aumento de uma delas pode desencadear o crescimento da outra, iniciando o processo que causa a VB.

Embora tenhamos encontrado, de forma semelhante a este artigo, uma prevalência significativamente maior de Mh em amostras de gestantes com VB (54,3%) do que em gestantes sem VB (25,7%), a infecção por Mh não apresentou uma taxa bacteriana elevada. Na verdade, de forma contraditória, 68,6% das amostras tinham uma carga bacteriana abaixo de  $10^4$  UFC/mL. Diferente da infecção por *Ureaplasma* spp., que não apresentou associação com a

VB, mas foi verificada uma carga bacteriana elevada em 71,2% das amostras. No caso das gestantes coinfectadas por Mh e *Ureaplasma* spp., as taxas de VB (60,5%) foram as maiores do estudo, assim como a carga bacteriana, em que 79% das amostras de coinfeção tiveram mais de  $10^4$  UFC/mL.

Nossos resultados indicam que a VB esteve associada ao tipo da bactéria responsável pela infecção por micoplasma genital, mas não pelo aumento na carga bacteriana. Visto que o Mh sozinho e sua coinfeção com *Ureaplasma* spp. foram associadas à VB, mas não a infecção sozinha por *Ureaplasma* spp., que apresentou cargas bacterianas elevadas. Como as gestantes eram assintomáticas e pelo *Ureaplasma* spp. ser encontrado com mais frequência em microbiotas saudáveis do que o Mh, é possível que mesmo com maior carga bacteriana ele mantenha um escore de Nugent baixo, pois sendo considerada uma bactéria comensal, também seriam necessários outros fatores de risco relacionados ao hospedeiro para manifestações clínicas (LOBÃO et al., 2017).

De forma consistente, verificamos em nosso trabalho que o uso de cigarro foi significativamente maior entre as gestantes infectadas por Mh (25,7%) e pela coinfeção (34,2%), quando comparado à infecção por *Ureaplasma* spp. (14,7%). O uso de cigarro tem sido considerado um fator de risco para uma microbiota característica de VB e à uma redução na proporção de *Lactobacillus* spp, provavelmente devido às alterações que seu uso causa na imunidade inata (BROTMAN et al., 2014; MURPHY; MITCHELL, 2016). Visto que em nosso estudo apenas a presença de Mh esteve associada ao uso de cigarro, é possível que essa substância esteja atuando como um fator de risco à mais para uma disbiose vaginal. No entanto, a relação causal do uso de cigarro com alterações no microbioma vaginal ainda precisa ser melhor estudada.

A grande maioria dos estudos que fizeram análise da suscetibilidade antimicrobiana dos micoplasmas genitais identificaram uma alta resistência entre essas bactérias à azitromicina, eritromicina e claritromicina (GU et al., 2020). Em nossas amostras, o *Ureaplasma* spp. apresentou uma taxa de resistência menor que 10% para os três antibióticos avaliados, enquanto o Mh e a coinfeção apresentaram resistências acima de 57% para todas as drogas.

Zeng et al. (2016) mostrou que o Uu possui uma maior sensibilidade do que o Mh aos antimicrobianos, no entanto eles não incluíram a claritromicina na análise. De forma contrária, um estudo realizado na Grécia verificou que o *Ureaplasma* spp. apresentou as maiores taxas de resistência comparado ao Mh (MARAKI et al., 2018). Além disso, enquanto o estudo de Bayraktar et al. (2010) identificou a claritromicina como o antibiótico em que as bactérias apresentaram menor resistência, em nosso estudo ele foi o que apresentou a maior.

As discrepâncias entre as taxas de suscetibilidade antimicrobiana dos micoplasmas genitais entre os estudos nos mostram que há uma grande diferença na sensibilidade dessas bactérias de acordo com a região, destacando a importância de análise de resistência local dessas bactérias para o delineamento de um tratamento mais eficaz. Nosso estudo mostrou que entre a eritromicina, azitromicina e claritromicina, o antibiótico mais indicado para o tratamento de gestantes infectadas por Mh, *Ureaplasma* spp. e a coinfeção de ambos é a azitromicina, mesmo apresentando resistência entre 57,1%-68,4% nas infecções por Mh.

### **6.2.2. Prevalência e fatores de risco associados ao desfecho gestacional**

Na coorte geral, a prevalência de gestantes que tiveram um desfecho de PPT foi de 9,2% (n=124), com 71,8% (n=89) classificados como espontâneos. Um estudo multicêntrico realizado em 2014 com dados de 20 hospitais obstétricos distribuídos em diferentes locais do Brasil, verificou uma taxa de PPT de 12,3%, sendo 64,6% deles espontâneos (PASSINI et al., 2014). Outras análises da população de gestante brasileira também identificaram prevalências similares às de Passini et al. (2014), com taxas de PPT entre 11% - 11,5% (DO CARMO LEAL et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

A partir do relatório “*Born too Soon*”, publicado em 2012 (HOWSON C. P., KINNEY M.V., 2012) e uma revisão sistemática que avaliou os partos que ocorreram entre 1990-2014 no mundo (CHAWANPAIBOON et al., 2019), a OMS verificou que o Brasil está entre os 10 países com maiores taxas de prematuridade, representando cerca de 2,3% dos PPT globais. No entanto, esses estudos também avaliaram que a prevalência global de PPT em 2014 foi de 10,6%, maior do que a encontrada em nosso estudo.

Embora nosso estudo não tenha apresentado diferenças nas características socioeconômicas normalmente associadas ao PPT, como extremidade de idade materna, etnia e status econômico (THOMA et al., 2019; VOLTOLINI et al., 2013), foi relatado na regressão logística univariada que o desfecho gestacional adverso de PPTe foi significativamente associado aos hábitos de consumo de bebida alcoólica e cigarro, e características clínicas como histórico de PPT em gestações anteriores, hipertensão gestacional e comprimento de colo  $\leq 2,5$  cm.

Uma revisão sistemática e meta-análise, realizada com o objetivo de avaliar evidências sobre o efeito de diferentes substâncias durante a gestação e o desfecho obstétrico em mulheres da Etiópia, encontrou resultados bem semelhantes aos nossos quanto ao uso de cigarro e álcool

(BAYIH et al., 2021), assim como outros artigos publicados na literatura (LIU et al., 2020; MIYAKE et al., 2014). Verificamos que o consumo de bebida alcóolica e cigarro esteve presente em 4,5% e 12,9% das gestantes recrutadas em nosso estudo, respectivamente. Sendo que as mulheres que fizeram uso dessas substâncias durante a gestação tiveram uma probabilidade 2 vezes maior de terem um PPTe (Uso de bebida alcóolica OR 2,23, IC 95% 1,02 - 4,85. Uso de cigarro OR 2,09, IC 95% 1,23 - 3,53). No entanto, diferente dos estudos citados, essa associação deixou de ser significativa quando ajustada às demais variáveis socioeconômicas e clínicas (Uso de bebida alcóolica, ORa 1,9; IC 95% 0,72 - 5,02; Uso de cigarro, ORa 1,79; IC 95% 0,92 - 3,49). O mesmo

O histórico de PPT em gestações anteriores, tanto na análise de OR bruto, quanto na ajustada, aumentou em 12 vezes a chance de ocorrer um desfecho adverso de PPTe na gestação atual (OR 11,89, 95% 6,50 - 21,73; ORa 12,06, IC 95% 6,21 - 23,43). A literatura indica que mulheres com PPT prévio têm um risco 2 a 5 vezes maior de apresentarem um desfecho de PPT em uma próxima gravidez (MERCER et al., 1999). Uma coorte realizada com quase 20.000 mulheres nos EUA demonstrou que essa associação é afetada por três fatores principais: a frequência de PPT anteriores, a severidade deles através da IG e a ordem em que o PPT anterior ocorreu (nos casos de mais de duas gestações) (KAZEMIER et al., 2014; MCMANEMY et al., 2007). Essas gestantes com histórico de PPT anterior possivelmente possuem fatores de risco e características biológicas que são menos suscetíveis a intervenções e que normalmente permanecem em gestações futuras, como é o caso de fatores de risco maternos que levam, por exemplo, à diabetes, hipertensão, IMC extremo, infecções intrauterinas persistentes ou recorrentes e um menor comprimento cervical (GEORGIU et al., 2015; GOLDENBERG et al., 2008).

As gestantes com um comprimento do colo  $\leq 2,5$  cm tiveram uma probabilidade 4 vezes maior de terem um PPTe, até mesmo quando ajustadas às demais variáveis do estudo ( $\leq 2,5$  cm, ORa 3,97, IC 95% 1,67 - 9,47). Uma meta-análise realizada com 57 artigos que incluíram gestantes entre 16-24 semanas, verificou que o comprimento cervical apresentou diferenças significativas entre regiões geográficas e foi em média 3,8 mm menor em gestantes com PPT comparado às gestantes com PT (BORTOLETTO et al., 2021).

O cérvix apresenta um papel importante na manutenção da gestação, e um balanço na atividade endócrina e imune é responsável por sustentar essa barreira funcional. As propriedades mecânicas do cérvix mudam ao longo da gestação, com alterações na densa rede de colágeno, permitindo que a barreira funcional seja remodelada e dilatada (YELLON, 2020). Evidências vêm sugerindo que fatores como declínio de progesterona, cirurgia cervical anterior,

inflamação/infecção intra-amniótica e a insuficiência cervical genuína contribuem para um amadurecimento incompleto do cérvix, podendo levar à um aumento no risco de PPT (ROMERO et al., 2012; TARCA et al., 2017).

Dessa forma, tanto o histórico de PPT, quanto o comprimento do colo foram variáveis independentemente associadas ao desfecho de PPTe no modelo de regressão logística ajustada à covariáveis como etnia, escolaridade, status socioeconômico, uso de bebida alcoólica e cigarro, número de parceiros sexuais, histórico obstétrico de PPT e aborto, hipertensão e diabetes gestacionais, comprimento do colo e escore de Nugent. Dessa forma, isso destaca a importância em considerar essas duas variáveis como fatores de risco durante a gestação.

### **6.2.3. Desfecho gestacional de PPTe e infecção por micoplasma genital**

Embora a causa de PPT seja multifatorial, diversos microrganismos estão associados à essa patogênese. Em gestantes que tiveram um desfecho de PPT, o fluido amniótico frequentemente apresenta uma cultura bacteriana positivo para bactérias do grupo de micoplasmas genitais (ALLEN-DANIELS et al., 2015; CAPPELLETTI et al., 2016; TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011). Visto que a principal via de infecção do fluido amniótico é através da ascensão, pelo cérvix, dessas bactérias do TGIF (PAYNE; BAYATIBOJAKHI, 2014; ROMERO et al., 2019), a presença desses microrganismos ainda na microbiota vaginal também tem sido associada ao PPT (AMABEBE et al., 2019; DIGIULIO et al., 2015; DONDERS et al., 2009, 2017; SPRONG et al., 2020). No entanto, os dados publicados na literatura ainda são controversos e outros autores não encontraram essa mesma associação.

Em nosso estudo, a presença de infecção por micoplasma genital durante as 20-25 semanas de gestação não esteve associada à um parto prematuro, tanto no modelo de regressão logística univariada, quanto no modelo ajustado à possíveis fatores de risco. A ausência de associação entre essas duas variáveis corrobora com alguns estudos na literatura (CAPOCCIA; GREUB; BAUD, 2013; KATAOKA et al., 2006; LEE et al., 2009; LEON et al., 2018).

Uma coorte prospectiva realizada em 537 gestantes nulíparas e assintomáticas do Reino Unido, comparou amostras de biópsias placentárias de gestações com desfechos de PPTe, pré-eclâmpsia e neonatos pequenos para a idade gestacional (PIG), com amostras de gestantes controles. Através da utilização de diferentes métodos de extração e detecção de DNA, o autor verificou que a carga bacteriana na placenta era extremamente reduzida, não encontrando evidências de que há um tipo de microbioma placentário específico e de que ele estaria associado ao risco de um desfecho obstétrico adverso (DE GOFFAU et al., 2019). Já em

amostras do conteúdo vaginal, Romero et al. (2014a) verificou, através da análise de bactérias por pirosequenciamento das regiões V1-V3, que embora haja mudanças na microbiota vaginal ao longo da gestação, não são identificadas taxas bacterianas que apresentem abundâncias relativas diferentes entre os desfechos de PPT e PT.

Além disso, uma revisão sistemática e meta-análise publicada recentemente, investigou se os tipos de micoplasmas genitais são considerados fatores de risco para diferentes desfechos reprodutivos adversos (MA et al., 2021). Analisando 35 artigos, o estudo concluiu que a infecção por Mh pode aumentar significativamente o risco de desfechos como infertilidade feminina, natimorto e RPMPT, mas não está associada ao PPT. Para o *Ureaplasma* spp. não foi encontrada nenhuma associação com desfechos adversos. E quanto à associação das duas bactérias, foi verificada uma relação entre infertilidade, aborto espontâneo e natimorto, mas também não houve relação com o PPT.

Como os micoplasmas genitais são microrganismo que constituem naturalmente a microbiota vaginal, existem diversos fatores associados a alterações da composição microbiana que podem interferir na relação dessas bactérias com os desfechos obstétricos (PROCTOR et al., 2019). Conforme já descrito em estudos anteriores, a relação entre a microbiota vaginal e complicações obstétricas é dependente da população estudada, com divergências de acordo com a etnia, regiões geográficas, mudanças de hábito e características biológicas da população estudada (CAMPOS et al., 2015; DI SIMONE et al., 2020; VERTERAMO et al., 2013).

Foxman et al. (2014) e Wen et al. (2014) demonstraram que embora a presença de Mh tenha sido fortemente associada ao desfecho de PPT, sua associação foi alterada de acordo com a etnia da gestante, ocasionando maior risco em mulheres negras e hispânicas, quando comparado às mulheres brancas. Essa modificação de efeito na associação de acordo com o grupo racial da gestante pode ser um indicativo de que o Mh em si não seja a causa do PPT, e sim um marcador da presença de outros fatores que possam acarretar este desfecho.

Como em nosso estudo as gestantes com e sem infecção apresentaram uma frequência semelhante na maior parte dos fatores de risco associados ao PPT, não sendo identificada associação entre o micoplasma genital e variáveis como consumo de bebida alcoólica (OR 1,14; IC 95% 0,59 - 2,18), histórico de PPT (OR 1,22; IC 95% 0,74 - 2,01), hipertensão gestacional (OR 1,11; IC 95% 0,69 - 1,79) e comprimento do colo ( $\leq 2,5$  cm, OR 0,94; IC 95% 0,43 - 2,03), é possível que a presença de micoplasma genital sem a associação desses fatores de risco não tenha sido capaz de acarretar o PPT.

Alguns estudos indicam que em gestantes com associação entre a VB e infecção de micoplasma genital teriam um aumento no risco de desfecho obstétrico adverso causado pelo

micoplasma genital (CAPOCCIA; GREUB; BAUD, 2013; TAYLOR-ROBINSON, 2017; TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011). Uma revisão realizada por Donders et al. (2017) verificou que a infecção de Mh em presença de uma microbiota vaginal anormal, como é o caso da VB e da coinfeção com *Ureaplasma* spp., estaria mais associada ao aumento no risco de desfechos gestacionais adversos do que a presença de *Ureaplasma* spp. sozinho. No entanto, em nosso estudo não identificamos esses resultados. Embora tenhamos encontrado associação entre a infecção por micoplasma genital e VB, essa condição microbiana VB não representou diferença significativa no risco de PPTe (OR 1,46; IC 95% 0,65 - 3,29), assim como a presença de Mh junto ao *Ureaplasma* spp. (OR 0,75; IC 95% 0,18 - 3,19). Além disso, 19,1% das gestantes com PPTe apresentaram uma microbiota indicativa de VB, contra 13,4% das gestantes de PT, não sendo identificada associação entre a VB sozinha e o desfecho gestacional adverso (ORa 1,39; IC 95% 0,69 - 2,8).

Uma microbiota vaginal não dominada por *Lactobacillus* spp. pode estar associada ao aumento no risco de PPT. No entanto, esses achados não são consistentes em todos os estudos (DIGIULIO et al., 2015; FOXMAN et al., 2014; ROMERO et al., 2014a; YOCKEY; IWASAKI, 2018). Como mencionado, diversos fatores sociais, geográficos e biológicos afetam a construção da microbiota vaginal de cada hospedeira, e por mais que a VB possa gerar um risco de PPT, o mesmo é pequeno e a maior parte das gestantes que apresentarem essa condição terão um PT (ROMERO et al., 2014a).

Além disso, as gestantes foram recrutadas entre 20-25 semanas de gestação e alguns artigos indicam que a presença de VB é mais diagnosticada no primeiro trimestre de gestação, com sua prevalência reduzida ao longo dos próximos trimestres (DONATI et al., 2010; ROMERO et al., 2014a). Um estudo publicado por Krauss-Silva et al. (2014) realizado com 1.699 gestantes de até 20 semanas, assintomáticas e sem risco, identificou uma prevalência de VB de 28,1% que, após 8 semanas de seguimento, apresentou uma conversão natural de 40% das gestantes com microbiota característica de VB para não VB. Dessa forma, de acordo com o período em que as amostras deste estudo foram coletadas, é possível que as gestantes tenham tido uma resolução parcial da microbiota vaginal anormal, não sendo identificada associação com o desfecho de PPTe.

Dentre os biomarcadores imunológicos analisados no plasma, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , não foi verificada associação deles a nenhum dos desfechos, PPTe ou infecção. Esse resultado também contribui para uma explicação da ausência de associação da infecção por micoplasma genital com o PPTe, visto que não houve presença de um cenário de citocinas pró-inflamatórias nas gestantes estudadas.

Um estudo realizado *in vivo*, no intuito de entender como a microbiota vaginal diversa seria capaz de induzir a resposta imune do hospedeiro, delineou uma possível via dessa interação (ANAHTAR et al., 2015). O grupo demonstrou que as bactérias da microbiota são reconhecidas, via receptores do tipo Toll (TLR), por células apresentadoras de antígenos (APC) e pelas células epiteliais vaginais, em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) microbianos. A partir dessa interação, a via NF- $\kappa$ B é ativada, iniciando a produção de citocinas pró-inflamatórias, com foco no IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF-  $\alpha$ , levando ao recrutamento de linfócitos ao TGIF (ANAHTAR et al., 2015). Dessa forma, era esperado que a presença da infecção por micoplasma genital alterasse a concentração de citocinas pró-inflamatórias nas gestantes, e devido à esse aumento da inflamação, baseado na hipótese de que o trabalho de parto corresponde à um processo de quebra da homeostase imunológica a partir da ativação do sistema imune (MENON et al., 2020; PETERSON et al., 2020), acarretaria o PPT.

No entanto, as citocinas não apresentaram risco no desfecho de infecção e PPTe. Esses resultados estão de acordo com um estudo publicado por Amabebe et al. (2019), que indicou que a presença sozinha da infecção, sem uma associação com citocinas pró-inflamatórias, não seria suficiente para causar o PPT. Além do estudo de Elovitz et al. (2019), que mostrou que fatores imunes são críticos na modulação do risco de PPT associado à uma microbiota diversa, assim como também são importantes nos casos de microbiotas predominantemente constituídas por *Lactobacillus* spp.

Uma hipótese para a ausência de diferença nas concentrações de citocinas envolve o fato de as gestantes recrutadas serem assintomáticas. É possível que a quantidade total de bactérias presentes no TGIF dessas gestantes não tenha sido suficiente para ativar seu sistema imune, criando um meio inflamatório, e conseqüentemente levando ao PPT (LOBÃO et al., 2017; TIBALDI et al., 2009). Além disso, Lobão et al. (2017) verificou que, em infecções por *Ureaplasma* spp., maiores concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-6 estiveram mais associadas às mulheres que apresentaram sintomas do que às que eram assintomáticas.

Além da ausência de diferença na concentração de biomarcadores inflamatórios entre os desfechos de infecção e PPTe, é possível que o tratamento com azitromicina das gestantes identificadas com a infecção por micoplasma genital tenha alterado a associação desses microrganismos com o PPTe. Um estudo observacional realizado com dados de 2010 à 2015 concluiu que a utilização de terapia antibiótica em gestantes de risco reduziu a incidência de PPTe (OR 0,24; IC 95% 0,06 – 0,99) (HATANAKA et al., 2019). Entretanto, a relação do tratamento de gestantes com a diminuição do risco de desfechos gestacionais adversos apresenta divergências na literatura. Uma revisão sistemática realizada com estudos que trataram

gestantes com disbiose bacteriana com clindamicina e metronidazol oral antes de 28 semanas de gestação verificou que não houve redução na incidência de PPT nos grupos tratados comparado aos controles (REBOUÇAS et al., 2019).

### 6.3. PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Até onde sabemos este é o primeiro estudo brasileiro que avaliou a prevalência de infecção por micoplasma genital em gestantes entre 20-25 semanas e investigou o risco dessa infecção no desfecho adverso de PPTe. Além da prevalência e risco com o PPTe, também verificamos os fatores de risco mais associados à infecção, no intuito de caracterizá-la melhor afim de mapear possíveis gestantes com maior probabilidade de apresentarem essas bactérias. Também destacamos o fato de termos estratificado o PPT de acordo com sua etiologia, permitindo que nossas análises de associação tenham sido realizadas apenas com o PPTe, e não tenham incluído os PPT iatrogênico. Além disso, tivemos um tamanho amostral grande, sem alta perda de segmento e o hospital em que o estudo foi realizado é considerado de referência para a região de Ribeirão Preto.

No entanto, como limitações devemos ressaltar que, embora tenhamos usado um padrão de diagnóstico da infecção frequentemente utilizado em laboratórios clínicos, através de kits baseados em meio de cultura, que fornecem uma identificação, enumeração e suscetibilidade às drogas de forma confiável e fácil para os micoplasmas genitais, os dados gerados a partir de metodologias moleculares apresentam resultados mais apurados, com maior sensibilidade e especificidade (CAPOCCIA; GREUB; BAUD, 2013; YI; YOON; KIM, 2005).

Dessa forma, em nosso estudo, não foi possível identificar a presença de *Mycoplasma genitalium*, também pertencente à classe Mollicute, mas sendo considerada uma IST, que tem demonstrado associação com desfechos reprodutivos adversos, como cervicite, DIP, PPT e aborto espontâneo (LIS; ROWHANI-RAHBAR; MANHART, 2015). Além disso, também não foi possível diferenciar o *Ureaplasma* spp. entre Uu e Up. Como o Up apresenta maior prevalência do que o Uu e tem se mostrado mais prejudicial ao desfecho gestacional adverso, seria necessário realizar a identificação de ambos para caracterizar melhor o resultado de ausência de associação entre PPTe e esse tipo de bactéria encontrado em nosso estudo (DONDEERS et al., 2017).

Diversos estudos têm analisado o papel de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alfa, e anti-inflamatórias, como IL-10, como possíveis preditores do PPT (FETTWEIS et al., 2019; HADLEY et al., 2018; YOCKEY; IWASAKI, 2018).

Devido às amplas formas de análise para caracterização do sistema imune e tipos de amostras utilizadas (sangue, fluido amniótico e conteúdo cervicovaginal), os resultados de associação entre citocinas e desfechos gestacionais diferem entre os estudos. Uma revisão sistemática realizada por Wei; Fraser; Lou (2010) não encontrou evidências suficientes que comprovem a associação de PPT com citocinas IL-1, IL-2, IL-8, IL-10. Já em relação à IL-6, foi verificado que concentrações elevadas no fluido amniótico e no conteúdo cervicovaginal, mas não no plasma, aumentou em 14% o risco de PPT em gestantes assintomáticas. Por mais que a utilização de amostras de sangue para análise de biomarcadores imunológicos seja de fácil acesso, processamento e menos invasiva, seu alto volume e relação remota com os tecidos materno-fetais sugere que os biomarcadores associados à gestação estejam diluídos dentre várias outras proteínas do sangue, não representando de forma tão fidedigna o cenário local do trato genital (GEORGIU et al., 2015; GOMES et al., 2019; LEE et al., 2018).

Visto que em nosso estudo as amostras utilizadas foram de plasma, é possível que não tenhamos conseguido rastrear de forma apurada as citocinas alteradas no trato genital que estariam associadas ao PPTe. No entanto, como outros estudos identificaram associação entre PPT e citocinas pró-inflamatórias, mesmo em amostras do plasma (AGHAEPOUR et al., 2017; ROMERO et al., 2017), seria preciso realizarmos mais análises com outros tipos de amostra para verificarmos essa ausência de associação em nosso trabalho.

Mesmo que tenhamos conduzido o estudo em um local de referência da região, ressaltamos que a amostra da coorte BRISA foi de conveniência, devido à dificuldade de obter uma amostra randomizada representativa da população de gestantes. Visto que características fisiológicas, prevalências de infecções, alterações na microbiota do hospedeiro e outras variáveis clínicas são muito afetadas por fatores geográficos, culturais e socioeconômicos, é muito importante que sejam desenvolvidos estudos com amostras randomizadas e em diferentes regiões do país.

## **7. CONCLUSÃO**

---

Em nosso estudo, uma coorte prospectiva realizada com uma amostra de conveniência de gestantes entre 20-25 semanas, com objetivo principal de avaliar a associação de infecção por micoplasma genital e o risco no desfecho gestacional de PPTe, concluímos que a infecção não esteve associada ao PPTe. Dentre as variáveis estudadas, verificamos que o histórico de PPT em gestações anteriores e um comprimento cervical  $\leq 2$ cm foram considerados fatores de risco independentemente associado ao desfecho gestacional de PPTe. Além disso, identificamos que a presença da classe de bactérias micoplasma genital esteve presente no TGIF de 18% das gestantes, sendo associada à disbiose vaginal, uso de cigarro, atividade remunerada e número de parceiros sexuais ao longo da vida.

Por mais que não tenhamos encontrado associação entre a infecção por micoplasma genital e o desfecho de PPTe, nosso estudo traz importantes contribuições para a literatura brasileira a respeito do perfil de gestantes assintomáticas que apresentam essa infecção no TGIF, dos fatores de risco associados a ela e da melhor forma de tratá-la.

## 7.1. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Devido às divergências nos resultados, até então publicados, sobre a relação da infecção por micoplasma genital e PPT, não há um delineamento comum sobre a necessidade de realização de testes para rastreio dessa infecção durante o pré-natal ou mesmo em mulheres não gestantes. Além disso, devido à alta resistência apresentada por essas bactérias, em casos de necessidade de tratamento, faltam estudos que analisaram as melhores drogas a serem utilizadas para controle da infecção.

A infecção por micoplasma genital sofre alterações em sua capacidade patogênica por diversos fatores e é possível que interações com outras variáveis possam interferir no resultado de associação com o desfecho de PPTe. Sendo assim, como ainda há poucos estudos publicados no Brasil que tenham avaliado essa classe de bactérias, se torna necessário estudarmos de forma mais extensa a presença de micoplasma genital com uma população de estudo que abranja uma maior diversidade regional do Brasil. Além disso, é importante a condução de estudos que verifiquem a relação destas bactérias não apenas com o PPT, mas também com outros desfechos obstétricos, como o aborto espontâneo, natimorto e LBW. Sendo indicada a análise do conteúdo cervicovaginal de forma longitudinal durante a gestação, com metodologias de biologia molecular que identifiquem de modo mais apurado os tipos de bactérias pertencentes à classe Mollicute.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AGHAEPOUR, N. et al. An immune clock of human pregnancy. **Science Immunology**, v. 2, n. 15, 2017.

ALLEN-DANIELS, M. J. et al. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 6, p. 779.e1-779.e13, 2015.

AMABEBE, E. et al. Infection/inflammation-associated preterm delivery within 14 days of presentation with symptoms of preterm labour: A multivariate predictive model. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, 2019.

ANAHTAR, M. N. et al. Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. **Immunity**, v. 42, n. 5, p. 965–976, 2015.

ANAHTAR, M. N. et al. **Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of SimplicityCell Host and Microbe**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.013>>

ANDERSON, J. G. et al. Racial and Ethnic Disparities in Preterm Infant Mortality and Severe Morbidity: A Population-Based Study. **Neonatology**, v. 113, n. 1, p. 44–54, 2017.

AVERSHINA, E. et al. Diversity of vaginal microbiota increases by the time of labor onset. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

BAYIH, W. A. et al. **The effect of substance use during pregnancy on neonatal outcomes in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis** *Heliyon*, 2021. Disponível em: <[www.cell.com/heliyonhttps://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06740](http://www.cell.com/heliyonhttps://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06740)>. Acesso em: 14 jun. 2021

BAYRAKTAR, M. R. et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. e90–e95, 2010.

BEHNIA, F. et al. Chorioamniotic membrane senescence: A signal for parturition? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 3, p. 359.e1-359.e16, 1 set. 2015.

BORTOLETTO, T. G. et al. Cervical length varies considering different populations and gestational outcomes: Results from a systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2 February, 2021.

BREUGELMANS, M. et al. Association of abnormal vaginal flora and *Ureaplasma* species as risk factors for preterm birth: A cohort study. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 89, n. 2, p. 256–260, 2010.

BROTMAN, R. M. et al. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: A pilot study. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014.

CAMPOS, G. B. et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of Brazilian women. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2015.

CAPOCCIA, R.; GREUB, G.; BAUD, D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 231–240, 2013.

CAPPELLETTI, M. et al. Inflammation and preterm birth. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 1, p. 67–78, 2016.

CARNEIRO, F. P. et al. Cervical Cytology of Samples with *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Neisseria gonorrhoeae* Detected by Multiplex PCR. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 10, 2020.

CHAWANPAIBOON, S. et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 1, p. e37–e46, 2019.

CHRISTOFOLINI, D. M. et al. Prevalence of cases of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in women with no

- gynecologic complaints. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 11, n. 4, p. 201–205, 2012.
- CONDON, J. C. et al. Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 4978–4983, 2004.
- CONDON, J. C. et al. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor- $\kappa$ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 764–775, 2006.
- COPPÉ, J. P. et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, 12 fev. 2010.
- COX, C. et al. Mycoplasma hominis and Gardnerella vaginalis display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 481–487, 2016.
- DA SILVA, A. A. M. et al. A protocol to identify non-classical risk factors for preterm births: The Brazilian Ribeirão Preto and São Luís prenatal cohort (Brisa). **Reproductive Health**, v. 11, n. 1, 2014.
- DE GOFFAU, M. C. et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. **Nature**, v. 572, n. 7769, p. 329–334, 2019.
- DI SIMONE, N. et al. **Recent Insights on the Maternal Microbiota: Impact on Pregnancy Outcomes** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 23 out. 2020.
- DIADHIOU, M. et al. Prevalence and Risk Factors of Lower Reproductive Tract Infections in Symptomatic Women in Dakar, Senegal. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 12, p. 117863371985182, 2019.
- DIGIULIO, D. B. et al. Prevalence and Diversity of Microbes in the Amniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and Pregnancy Outcome in Women with Preterm Pre-Labor Rupture of Membranes. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 1, p. 38–57, 2010.
- DIGIULIO, D. B. et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 35, p. 11060–11065, 2015.
- DO CARMO LEAL, M. et al. Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. **Reproductive Health**, v. 13, 2016.
- DONATI, L. et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 281, n. 4, p. 589–600, 2010.
- DONDERS, G. G. et al. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 2, p. 431–437, 2000.
- DONDERS, G. G. et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 116, n. 10, p. 1315–1324, 2009.
- DONDERS, G. G. G. et al. Mycoplasma/Ureaplasma infection in pregnancy: To screen or not to screen. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 45, n. 5, p. 505–515, 2017.
- ELOVITZ, M. A. et al. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.
- FETTWEIS, J. M. et al. The vaginal microbiome and preterm birth. **Nature Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1012–1021, 2019.
- FOXMAN, B. et al. Mycoplasma, bacterial vaginosis-associated bacteria BVAB3, race, and risk of preterm birth in a high-risk cohort. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 210, n. 3, p. 226.e1-226.e7, 2014.
- FREITAS, A. C. et al. The vaginal microbiome of pregnant women is less rich and diverse, with lower prevalence of Mollicutes, compared to non-pregnant women. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

- GAO, L. et al. Steroid receptor coactivators 1 and 2 mediate fetal-to-maternal signaling that initiates parturition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 7, p. 2808–2824, 2015.
- GEORGIU, H. M. et al. **Predicting Preterm Labour: Current Status and Future Prospects** **Disease Markers**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/435014>>. Acesso em: 10 jul. 2020
- GOLDENBERG, R. L. et al. **Epidemiology and causes of preterm birth** **The Lancet**, 2008.
- GOMES, J. et al. **Maternal blood biomarkers and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis** **Critical Reviews in Toxicology**, 2019.
- GU, X. et al. Epidemiological investigation and antimicrobial susceptibility analysis of mycoplasma in patients with genital manifestations. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 4, 12 abr. 2020.
- HADLEY, E. E. et al. Gestational tissue inflammatory biomarkers at term labor: A systematic review of literature. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 2, p. 1–11, 2018.
- HARDY, D. B. et al. Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor- $\kappa$ B activation of cyclooxygenase 2 expression. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 11, p. 2724–2733, nov. 2006.
- HATANAKA, A. R. et al. Antibiotic treatment for patients with amniotic fluid “sludge” to prevent spontaneous preterm birth: A historically controlled observational study. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, n. January, p. 1157–1163, 2019.
- HILL, G. B. The microbiology of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 2 PART 2, p. 450–454, 1993.
- HORNER, P. et al. Should we be testing for urogenital Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum in men and women? – a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 11, p. 1845–1851, 2018.
- HOWSON C. P., KINNEY M.V., L. J. E. **Born too soon: the global action report on preterm birth** **March of Dimes, PMNCH, Save the children, World health organization, Geneva**. [s.l: s.n.].
- KAAMBO, E. et al. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. **Frontiers in Public Health**, v. 6, 26 mar. 2018.
- KATAOKA, S. et al. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 51–55, jan. 2006.
- KAZEMIER, B. M. et al. Impact of obstetric history on the risk of spontaneous preterm birth in singleton and multiple pregnancies: a systematic review. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 121, n. 10, p. 1197–1208, 2014.
- KORVENRANTA, E. et al. Impact of very preterm birth on health care costs at five years of age. **Pediatrics**, v. 125, n. 5, 2010.
- KRAUSS-SILVA, L. et al. Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: Prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low socioeconomic and multiethnic South American population. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 14, n. 1, 2014.
- KWAK, D. W. et al. Co-infection with vaginal Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 333–337, 2014.
- LEE, S. E. et al. A high Nugent score but not a positive culture for genital mycoplasmas is a risk factor for spontaneous preterm birth. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 22, n. 3, p. 212–217, 2009.

- LEE, S. M. et al. Inflammatory proteins in maternal plasma, cervicovaginal and amniotic fluids as predictors of intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, 2018.
- LEON, L. J. et al. Enrichment of clinically relevant organisms in spontaneous preterm-delivered placentas and reagent contamination across all clinical groups in a large pregnancy cohort in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 14, 2018.
- LIMA, L. D. M. et al. Sexually transmitted infections detected by multiplex real time PCR in asymptomatic women and association with cervical intraepithelial neoplasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 40, n. 9, p. 540–546, set. 2018.
- LIS, R.; ROWHANI-RAHBAR, A.; MANHART, L. E. **Mycoplasma genitalium Infection and Female Reproductive Tract Disease: A Meta-analysis** *Clinical Infectious Diseases*, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-abstract/61/3/418/491226>>
- LIU, B. et al. Association between maternal pre-pregnancy obesity and preterm birth according to maternal age and race or ethnicity: a population-based study. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 707–714, 2019.
- LIU, B. et al. Maternal cigarette smoking before and during pregnancy and the risk of preterm birth: A dose–response analysis of 25 million mother–infant pairs. **PLoS Medicine**, v. 17, n. 8, p. e1003158, 18 ago. 2020.
- LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 2016.
- LOBÃO, T. N. et al. Ureaplasma urealyticum and U. parvum in sexually active women attending public health clinics in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 11, p. 2341–2351, 2017.
- MA, C. et al. **The Associations of Genital Mycoplasmas with Female Infertility and Adverse Pregnancy Outcomes: a Systematic Review and Meta-analysis** *Reproductive Sciences* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 4 jan. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s43032-020-00399-w>>. Acesso em: 30 maio. 2021
- MACINTYRE, D. A. et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- MARAKI, S. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Ureaplasma species and Mycoplasma hominis in Greek female outpatients, 2012–2016. **Journal of Chemotherapy**, v. 30, n. 3, p. 140–144, 2018.
- MCMANEMY, J. et al. Recurrence risk for preterm delivery. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 196, n. 6, p. 576.e1-576.e7, 2007.
- MENDELSON, C. R. Minireview: Fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 7, p. 947–954, 2009.
- MENON, R. et al. Senescence of primary amniotic cells via oxidative DNA damage. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 27 dez. 2013.
- MENON, R. **Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2014.
- MENON, R. et al. **Novel concepts on pregnancy clocks and alarms: Redundancy and synergy in human parturition** *Human Reproduction Update* Oxford University Press, , 1 set. 2016.
- MENON, R. et al. Novel pathways of inflammation in human fetal membranes associated with preterm birth and preterm pre-labor rupture of the membranes. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, n. 4, p. 431–450, 2020.
- MERCER, B. M. et al. **The Preterm Prediction Study: Effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome.** *American Journal of Obstetrics and*

Gynecology. **Anais...** Mosby Inc., 1999

MERLINO, A. A. et al. Nuclear progesterone receptors in the human pregnancy myometrium: Evidence that parturition involves functional progesterone withdrawal mediated by increased expression of progesterone receptor-A. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 5, p. 1927–1933, maio 2007.

MILLER, D. et al. Maternal and fetal T cells in term pregnancy and preterm labor. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 7, p. 693–704, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, D. DE A. EM S. E V. DE D. NÃO T. **Saúde Brasil 2019: uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização**. [s.l: s.n.].

MIYAKE, Y. et al. Alcohol consumption during pregnancy and birth outcomes: The Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 14, n. 1, 2014.

MURPHY, K.; MITCHELL, C. M. The Interplay of Host Immunity, Environment and the Risk of Bacterial Vaginosis and Associated Reproductive Health Outcomes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, p. S29–S35, 2016.

NADEEM, L. et al. Molecular evidence of functional progesterone withdrawal in human myometrium. **Nature communications**, v. 7, p. 11565, 25 maio 2016.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 2, p. 297–301, fev. 1991.

PASSINI, R. et al. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): Prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109069, 9 out. 2014.

PATEL, M. A.; NYIRJESY, P. **Role of Mycoplasma and Ureaplasma species in female lower genital tract infections** **Current Infectious Disease Reports**, 2010.

PAYNE, M. S.; BAYATIBOJAKHI, S. **Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: An overview of the uterine microbiome** **Frontiers in Immunology**, 2014. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 6 nov. 2019

PETERSON, L. S. et al. **Multiomic immune clockworks of pregnancy** **Seminars in Immunopathology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 ago. 2020.

PRABHUDAS, M. et al. **Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: Perspectives and challenges** **Nature Immunology** Nature Publishing Group, , 19 mar. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.3131>. Acesso em: 2 maio. 2021

PROCTOR, L. M. et al. The Integrative Human Microbiome Project. **Nature**, v. 569, n. 7758, p. 641–648, 2019.

RAMPERSAUD, R.; RANDIS, T. M.; RATNER, A. J. Microbiota of the upper and lower genital tract. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 51–57, 2012.

REBOUÇAS, K. F. et al. Treatment of bacterial vaginosis before 28 weeks of pregnancy to reduce the incidence of preterm labor. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 146, n. 3, p. 271–276, 2019.

REJNÖ, G. et al. Maternal anxiety, depression and asthma and adverse pregnancy outcomes – a population based study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, dez. 2019.

RODRIGUES, M. M. et al. Frequency of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis and Ureaplasma species in cervical samples. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 31, n. 3, p. 237–241, 2011.

ROMERO, R. et al. The preterm parturition syndrome. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 113, n. SUPPL. 3, p. 17–42, 2006.

ROMERO, R. et al. Vaginal progesterone in women with an asymptomatic sonographic short cervix in the midtrimester decreases preterm delivery and neonatal morbidity: A systematic review and metaanalysis of individual patient data. **American Journal of Obstetrics and**

**Gynecology**, v. 206, n. 2, p. 124.e1-124.e19, 2012.

ROMERO, R. et al. The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term. **Microbiome**, v. 2, n. 1, 2014a.

ROMERO, R. et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, v. 2, n. 1, 2014b.

ROMERO, R. et al. The maternal plasma proteome changes as a function of gestational age in normal pregnancy: a longitudinal study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 217, n. 1, p. 67.e1-67.e21, 1 jul. 2017.

ROMERO, R. et al. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion - A molecular microbiological study. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 47, n. 9, p. 915–931, 2019.

ROMERO, R.; DEY, S. K.; FISHER, S. J. Preterm labor: One syndrome, many causes. **Science**, v. 345, n. 6198, 2014.

SAIGAL, S.; DOYLE, L. W. **An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood** **The Lancet**, 2008.

SHAH, N. M. et al. Progesterone-related immune modulation of pregnancy and labor. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. MAR, p. 1–19, 2019.

SHAH, N. M.; IMAMI, N.; JOHNSON, M. R. Progesterone modulation of pregnancy-related immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 20 jun. 2018.

SILVA, J. et al. Genital mycoplasmas and ureaplasmas in cervicovaginal self-collected samples of reproductive-age women: prevalence and risk factors. **International Journal of STD and AIDS**, v. 29, n. 10, p. 999–1006, 2018.

SINGER, L. T. et al. Maternal psychological distress and parenting stress after the birth of a very low-birth-weight infant. **Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 9, p. 799–805, 3 mar. 1999.

SMITH, R. Parturition. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 271–283, 18 jan. 2007.

SPRONG, K. E. et al. **Ureaplasma species and preterm birth: current perspectives** **Critical Reviews in Microbiology**, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imby20>>. Acesso em: 27 jul. 2020

TAN, H. et al. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: Implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 5, p. 719–730, 2012.

TARCA, A. L. et al. The cytokine network in women with an asymptomatic short cervix and the risk of preterm delivery. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, n. 3, 1 set. 2017.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9–10, p. 875–881, 2017.

TAYLOR-ROBINSON, D.; LAMONT, R. F. Mycoplasmas in pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 118, n. 2, p. 164–174, 2011.

THOMA, M. E. et al. Black–White Disparities in Preterm Birth: Geographic, Social, and Health Determinants. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 57, n. 5, p. 675–686, set. 2019.

TIBALDI, C. et al. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: Risk factors and rates of occurrence. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 670–679, 2009.

UN IGME. **Levels & Trends in childhood mortality: Report 2020, Estimates developed by**

- the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation Who/Unicef/World Bank/Un. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/unpd\\_2020\\_levels-and-trends-in-child-mortality-igme-.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/unpd_2020_levels-and-trends-in-child-mortality-igme-.pdf)>.
- VERBURG, B. O. et al. New charts for ultrasound dating of pregnancy and assessment of fetal growth: longitudinal data from a population-based cohort study. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 31, n. 4, p. 388–396, abr. 2008.
- VERTERAMO, R. et al. An epidemiological survey of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in gynaecological outpatients, Rome, Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 12, p. 2650–2657, 2013.
- VOLTOLINI, C. et al. **Understanding spontaneous preterm birth: From underlying mechanisms to predictive and preventive interventions** *Reproductive Sciences*, 2013.
- VRACHNIS, N. et al. Immune aspects and myometrial actions of progesterone and CRH in labor. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2013.
- WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 757–789, 2005.
- WAYNE, P. **CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline. CLSI document M43-A.** [s.l: s.n.].
- WEI, S. Q.; FRASER, W.; LUO, Z. C. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: A systematic review. **Obstetrics and Gynecology**, v. 116, n. 2, p. 393–401, 2010.
- WEN, A. et al. Selected Vaginal Bacteria and Risk of Preterm Birth: An Ecological Perspective. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 7, p. 1087–1094, 1 abr. 2014.
- YELLON, S. M. **Immunobiology of Cervix Ripening** *Frontiers in Immunology*, 2020. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 18 mar. 2021
- YI, J.; YOON, B. H.; KIM, E. C. Detection and biovar discrimination of Ureaplasma urealyticum by real-time PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 4, p. 255–260, 1 ago. 2005.
- YOCKEY, L. J.; IWASAKI, A. **Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development** *Immunity*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.017>>
- YOUNES, J. A. et al. **Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship** *Trends in Microbiology*, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.008>>
- ZENG, X. Y. et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in Xi'an, China. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 12, p. 1941–1947, 2016.

## ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 13 de novembro de 2008

Ofício nº 4116/2008  
CEP/RCC

**Prezados Professores,**

O trabalho intitulado **“FATORES ETIOLÓGICOS DO NASCIMENTO PRÉ-TERMO E CONSEQUÊNCIAS DOS FATORES PERINATAIS NA SAÚDE DA CRIANÇA: COORTES DE NASCIMENTOS EM DUAS CIDADES BRASILEIRAS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 276ª Reunião Ordinária realizada em 10/11/2008, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores  
**PROF. DR. MARCO ANTONIO BARBIERI**  
**PROFª. DRª. HELOISA BETTIOL**  
Depto. de Puericultura e Pediatria

## ANEXO B – MANUSCRITO

### **Genital mycoplasma infection and spontaneous preterm birth outcome: a prospective cohort study**

**Running title:** Genital mycoplasma and spontaneous preterm birth

Giulia Karnauchovas Porto Cunha\*<sup>1</sup>, Larissa Brito Bastos<sup>1</sup>, Stella Felipe de Freitas<sup>1</sup>, Ricardo de Carvalho Cavalli<sup>1</sup> and Silvana Maria Quintana\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 14049-900, Brazil

**\* Corresponding authors:**

Giulia Karnauchovas Porto Cunha, MSc

Address: Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 14049-900, Brazil

E-mail: [giulia.cunha@usp.br](mailto:giulia.cunha@usp.br) or [giulia.cunha@outlook.com](mailto:giulia.cunha@outlook.com); Phone: +55(16)99718-7869

Silvana Maria Quintana, MD

Address: Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 14049-900, Brazil

E-mail [quintana@fmrp.usp.br](mailto:quintana@fmrp.usp.br) or [smquintana64@gmail.com](mailto:smquintana64@gmail.com); Phone: +55(16)3602-2583 – Fax: +55(16)3602-2415

## **Abstract**

### **Objective**

To determine the prevalence of genital mycoplasma infection and the risk of spontaneous preterm birth (sPTB) in asymptomatic pregnant women.

### **Design**

Prospective cohort.

### **Setting**

Public and private health services in Ribeirão Preto-SP, Brazil.

### **Population**

1.349 asymptomatic women with a singleton pregnancy at 20-25 weeks of gestation (WG) recruited between 2010 and 2011.

### **Methods**

Baseline data was assessed using a questionnaire, in addition to cervicovaginal fluid and blood samples, to analyze lower reproductive tract infections (RTIs) and immune mediators, respectively. The association between variables and the risk of sPTB was evaluated using logistic regression analysis to estimate the odds ratios (ORs).

### **Main outcome measures**

Genital mycoplasma infection and prematurity.

### **Results**

The prevalence of the sPTB and genital mycoplasma was 6.8% and 18%, respectively. The infection was not a risk factor for sPTB (aOR 0.66; 95% CI 0.32-1.35), even when associated with bacterial vaginosis (BV). However, it was associated with a low socioeconomic status ( $p=0.0470$ ), cigarette use ( $p=0.0009$ ), number of sexual partners ( $p=0.0019$ ), and BV ( $p<.0001$ ).

Regarding the risk factors associated with sPTB, previous history of PTB (aOR 12.06; 95% CI 6.21-23.43) and a cervical length  $\leq 2.5$  cm (aOR 3.97; 95% CI 1.67-9.47) were significant.

## **Conclusions**

The risk of sPTB was independently associated with the history of PTB and the cervical length but not with the genital mycoplasma infection.

## **Funding:**

This work was founded by CNPq, FAPESP and CAPES.

## **Keywords:**

Preterm birth, pregnancy, genital mycoplasma, bacterial vaginosis, risk factor

## **Tweetable abstract:**

The genital mycoplasma infection was not a risk for sPTB, even when bacterial vaginosis (BV) was associated.

## **Introduction**

Around the world, almost 15 million (10.6%) births occur before 37 weeks of pregnancy. Moreover, with a prevalence of 11%, Brazil is among the ten countries with the highest numbers of estimated preterm births (1,2). Thus PTB is the leading cause of death in children under five years, improving the knowledge of this gestational outcome is essential for public health (3).

Communities of microbiota in the female genital tract (FGT) represent a crucial part of vaginal health in addition to dysbiosis, involved in various gynecological dysfunctions and pregnancy complications (4,5). Genital mycoplasma, including *Mycoplasma hominis* (Mh) and *Ureaplasma* spp., are microorganisms frequently found in the human urogenital tract (6,7).

Although the colonization with this microorganism is harmless in most women, increasing evidence suggests an association of the infection with adverse gestational outcomes such as

spontaneous miscarriage (8,9), chorioamnionitis (10,11), stillborn (12), preterm premature rupture of membranes (PPROM) (11,13) and preterm birth (PTB) (14–16).

At present, the necessity for screening and treating genital mycoplasma infections in pregnant women is lacking evidence. Nevertheless, a variety of physiological events associated with pregnancy, including immune response remodeling (17) and increased hormone levels (18), beyond behavioral changes (19) can drive to alterations in the vaginal microbiota composition. Consequently, modification in the colonization patterns of genital mycoplasma may cause adverse gestational outcomes (5,20). Therefore, this study aimed to estimate the prevalence of the Mh and *Ureaplasma* spp. infection in asymptomatic pregnant women with 20-25 weeks of pregnancy and investigate the association of this infection with the PTB outcome.

## **Methods**

### **Study Design**

This prospective cohort was entitled: “Etiological factors of preterm birth and consequences of perinatal factors on the child’s health: birth cohorts in two Brazilian cities, Ribeirão Preto and São Luís – BRISA” that occurred in 2010-2011. For the analysis of this study, we used data available from the “Prenatal cohort” of Ribeirão Preto, a city located in the southeast region of Brazil. In addition, the BRISA protocol has been previously reported (21).

### **Participants and sample**

In this cohort, pregnant women who attended prenatal visits in public and private health services were invited to participate. This cohort was obtained based on a convenience sample due to the difficulty in obtaining a representative random sample from the pregnant women population. All pregnant that fulfilled the eligibility criteria, who had an interest in participating in the

study, and who gave the informed consent form (ICF) were included. Inclusion criteria were: completion of a first obstetrical ultrasound exam before 20 weeks of GA, had 20-25 weeks of gestational (WG), and had a singleton pregnancy. In addition, participants who had a loss to follow-up, miscarriage, stillbirth, and did not have the result for the genital mycoplasma test were excluded from this analysis.

## Data collection

Data collection occurred in two moments of the cohort: prenatal visit and at the time of delivery. During the prenatal visit, a questionnaire was used to access the following baseline information: maternal age (years), self-reported race/ethnicity (white or black), education level, marital status (with or without a partner), remunerated activity (no or yes), alcohol consumption (no or yes), smoking status (non-smoker or smoker). For clinical history, participants were asked about: previous history of PTB (no, yes, or nulliparous), previous miscarriage (no or yes), gestational hypertension and/or diabetes, and lifetime sexual partners (in number).

After the application of the questionnaire, participants were submitted to blood sample collection (20mL) and a gynecological exam for vaginal fluid collection, and a cervical ultrasound examination to assess cervical length ( $\leq 2,5$  cm or  $> 2,5$  cm). Further, vaginal fluid was collected using a cotton swab, and those samples were used to evaluate the diagnosis of genital mycoplasma infection in addition to bacterial vaginosis (BV).

The presence of Mh and *Ureaplasma* spp., the antimicrobial susceptibilities of these microorganisms to erythromycin, azithromycin, and clarithromycin, as well as the colony-forming unit (CFU) for bacterial load, were investigated using the Mycoplasma IST 2 Kit (bioMérieux®, Marcy-l'Étoile, France), following the manufacturer's instructions. An endocervical swab was inoculated in the transport medium R1, provided by the kit, and stored at 2-8°C until sample processing. Subsequently, the R1 medium was vortexed with 3 ml of the

R2 medium and supplied by the kit, containing 1 mL of lyophilized urea/arginine broth. Afterward, 55 $\mu$ L of the solution R1+R2 were distributed into the 22 wells of the kit plate, followed by an addition of two drops of mineral oil. The plate was incubated at 37°C for 24h and 48h until the results for *Ureaplasma* spp. and Mh, respectively, being assessed. Positive genital mycoplasma infection, which was defined as a change of sample color, was one of the outcomes of interest in this study.

Moreover, a cervicovaginal smear was Gram-stained to assess the Nugent score and consequently to classified the vaginal microbiota as BV (Nugent score from 7-10), intermediate (Nugent score from 4-6), and normal (Nugent score 0-3) (22). Positive participants for genital mycoplasma infections were treated with oral azithromycin and/or oral metronidazole if positive for BV.

For the assessment of the immune mediators IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , G-CSF, and IL-10, blood samples of all PTB and a proportion of three randomly selected control per case (1:3) were centrifuged for plasma separation and placed in Eppendorf tubes. Subsequently, serum samples were analyzed with the MILLIPLEX Multiplex® Assay kits using Luminex LX 200® (Cat #:HCYTOMAG-60K, Merck, New York, USA), as manufacturer's instructions.

At the time of delivery, the questionnaire was reviewed to obtain more accurate information regarding the socio-demographic, clinical and, behavioral data during pregnancy. In addition, information about the birth was collected to characterize the gestational outcome: type of delivery (vaginal or caesarian), whether the mother had started labor with pain, and GA-based obstetrical ultrasound (OU). PTB, defined as delivery occurring before 37 WG, was classified as medically indicated and spontaneous PTB (sPTB). Therefore, only participants with sPTB and term birth (TB) constituted the final sample of pregnant women analyzed.

Pregnant women were not involved in developing the study design, interpreting the data, or writing up the results. There is a core outcome set for studies on primary prevention of preterm birth / Patients were not involved in the development of the study.

## Statistical analysis

At first, to compare differences in prevalence between the groups, we performed Chi-square tests. Then, to further clarify associations between outcomes variables and potential risk factors, we used logistic regression analysis to estimate the odds ratios (ORs) and 95% CI of preterm birth and genital mycoplasma infection. Socio-demographic, clinic, and behavioral variables that were found to be associated in univariate analysis ( $P < 0.2$ ) or clinically significant for the study proposal were included as adjusted covariates in the multivariate logistic regression analysis of preterm birth. As missing data constituted less than 5% of our data, only participants with completed data were analyzed in the logistic regression. P values less than 0.05 were considered significant. All analyses were performed using SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, USA).

## Results

As shown in the flowchart (Figure 1), a total of 1.400 pregnant women were approached to participate in the study, of which 51 (3,6%) were ineligible due to losses to follow-up ( $n=30$ ), lack of test result for Mh and *Ureaplasma* spp. infection ( $n=14$ ), and gestational outcome as stillborn ( $n=6$ ) and miscarriage ( $n=1$ ). Therefore, 1.349 participants were eligible, and the prevalence of PTB in the cohort was 9,2% ( $n=124$ ). However, since the primary outcome of interest was to investigate the association of infection and PTB, after delivery classification according to its etiology, the final analysis only considered participants with sPTB ( $n=89$ ) and

those with full TB (n=1.225). The study population was similarly composed of white (51,3%) and black (47,8%) women, with the most of them (74,7%) between 20-34 years and with an education level up to high school (64,2%).

The sPTB rate was significantly higher among women with alcohol (p=0.0391) and cigarette (p=0.005) consumption habits than women with a full birth. In addition, 42.7% of participants with a history of PTB in a previous pregnancy had the same gestational outcome in the current pregnancy (p<.0001). Moreover, we found a significant association of this adverse gestational outcome with a cervical length lower than 2.5 cm (p<0.0001) and gestational hypertension (p=0.026) (Table 1).

The prevalence of genital mycoplasma infection in the study was 18% (n=236), with 12,4% (n=163) of women colonized only with *Ureaplasma* spp., 2,7% (n=35) with Mh and 2,9% (n=38) co-infected with both bacteria. The presence of infection during the 20-25 WG was not associated with the gestational outcome of sPTB (p=0.7782). Furthermore, the infection remained without association even after adjustment for confounders (aOR 0.66; 95% CI 0.32 - 1.35) and stratified by the type of the bacteria, Mh, *Ureaplasma* spp., and both (p=0.8277).

Conversely, infection was associated with a greater than five-lifetime sexual partners (p=0.0019) and a lower remunerated activity (p=0.0473) (Table 1). Similarly, the BV rate was significantly higher among infected women (p<.0001), but this microbiota characteristic had different associations according to the condition of genital mycoplasma infection. The BV was associated with Mh and co-infection in 54,3% and 60,5% of samples, respectively, in contrast to 19,9% of *Ureaplasma* spp. infection (p<.0001) (Tabela S1). In the same way, the use of cigarettes was more frequent in women infected with Mh and both types of bacteria together than just *Ureaplasma* spp. (p=0.0145).

For the antimicrobial susceptibilities analysis, the three types of drugs investigated had elevated rates of resistance among Mh and co-infection with Mh and *Ureaplasma* spp. On the other

hand, *Ureaplasma* spp. infection had more sensibility to these medications ( $p < .0001$ ) (Table S1).

In the univariate analysis, covariates associated with gestational and infection outcomes were included in the adjusted model of the multivariate logistic regression. Since none of the cytokines analyzed were significantly associated with both outcomes (Table S2), only the following covariates were included: race/ethnicity, education level, remunerated activity, alcohol consumption, smoking status, lifetime sexual partners, previous history of PTB, previous miscarriage, gestational hypertension, gestational diabetes, cervical length, Nugent score, and genital mycoplasma. After adjustment, some variables no longer presented a risk to the sPTB outcome. However, previous history of PTB (aOR 12.06; 95% CI 6.21-23.43) and cervical length lower than  $\leq 2.5$  cm (aOR 3.97; 95% CI 1.67-9.47) were independently associated with the risk of sPTB in the current pregnancy.

## **Discussion**

### **Main findings**

This prospective cohort aimed to verify the association between infection by genital mycoplasma in asymptomatic pregnant women with 20-25 WG and the outcome of sPTB in a population of women living in the city of Ribeirão Preto-SP. A convenience sample of 1.314 women was included in the final analysis of the study. In addition, the prevalence of the sPTB and infection outcome was 6.8% and 18%, respectively. Among the main findings of this study, genital mycoplasma infection was not associated with a birth that occurred before 37WG (aOR 0.66; 95% CI 0.32-1.35). The risk factors associated with genital mycoplasma included: socioeconomic status, cigarette use, lifetime number of sexual partners and a microbiota characteristic of BV. Regarding the primary outcome of sPTB, a history of PTB in previous

pregnancies and a cervical length  $\leq 2.5$  cm were risk factors independently associated with adverse gestational outcome.

## **Strengths and limitations**

As far as we know, this is the first Brazilian study that evaluated the prevalence of genital mycoplasma infection in pregnant women and investigated the risk of this infection in the adverse outcome of sPTB. In addition, we excluded medically indicated PTB to reduce possible confounding factors in this analysis. Moreover, even though the BRISA cohort has a convenience sample, we conducted the study in a reference health services Ribeirão Preto and region. On the other hand, our study has limitations. First, although we have used a standard methodology for diagnosing infection based on culture media, molecular methods have more accurate results, with greater sensitivity and specificity to characterize different types of genital mycoplasma (23,24). Secondly, even though blood samples for analysis of immunological biomarkers are easily accessible, the high volume suggests that the biomarkers associated with pregnancy could be too diluted among other blood proteins, not reliably representing the FGT setting (25–27).

## **Interpretation**

FGT colonization by *Ureaplasma* spp. and Mh is frequent in both healthy and symptomatic women (6). Consequently, it is difficult to characterize the clinical significance of these microorganisms in adverse reproductive outcomes. Therefore, the screening and treatment are still discussed. In addition, it is essential to outline a better way of managing these infections, as their pathogenicity changes depending on the conditions of the organism in which they are found (24,28).

In studies worldwide, the prevalence of Mh is below 30%, *Ureaplasma* spp. rates range from 20%-88% and the co-infection with both has a prevalence of 1,7%-17,7% (16,29,30). In our study, Mh, *Ureaplasma* spp., and co-infection prevalence was 2.7%, 12.4%, and 2.9%, respectively. Therefore, it was lower than the prevalence found in the literature, probably because the pregnant women recruited was asymptomatic (31,32).

The association of genital mycoplasma infection with variables such as socioeconomic status and behavioral habits, as sexual partners and use of cigarettes, were also considered risk factors in other studies (31,33–36). On the other hand, the ethnicity of the pregnant women was not associated with the infection ( $p=0.1541$ ), as demonstrated by Campos et al. (2015). Furthermore, there was no association between infection and age ( $p=0.2043$ ), as some studies identified a higher risk of infection among women under 25 years (31,33,35,36).

We verified an association between the presence of infection and microbial dysbiosis, in agreement with other studies (37). With a more extensive association between BV and Mh (54.3%) than with *Ureaplasma* spp. (25.7%) (6,38,39). Furthermore, Cox et al. (2016) also demonstrated a relationship between Mh and *G. vaginalis* in BV samples (60.7%), with a significant increase in Mh load under these conditions. In contrast to these results, we found that Mh infection did not manifest high bacterial loads, with 68.6% of the samples with  $<10^4$  CFU/mL. In summary, this shows that BV was associated with the type of genital mycoplasma but not with the bacterial load.

Moreover, we confirmed that among erythromycin, azithromycin, and clarithromycin, the most indicated antibiotic for the treatment of pregnant women infected with genital mycoplasma is azithromycin, which has the highest sensitivity among all type of infection. However, studies have a discrepancy in the prevalence and antimicrobial susceptibility rates of genital mycoplasmas (29,30,32,38), indicating a difference in the sensitivity and colonization of these bacteria according to region.

The prevalence of sPTB was 9.2% (n=124), with 71.8% (n=89) classified as spontaneous. Although Brazil is among the ten countries with the highest rates of prematurity, our study identified a lower prevalence than the global rate of 10,6% (1), and the rate of 12,3% found in a Brazilian multicenter study (41).

We did not identify differences in socioeconomic characteristics that usually are associated with PPT, such as extremity of maternal age, ethnicity, and economic status (42,43). Though, in agreement with other studies, both the history of sPTB (44) and cervical length (45) were independently associated with the outcome of sPTB, confirming the importance of considering them as risk factors during prenatal.

Although the cause of PTB is multifactorial, several microorganisms are associated with this pathogenesis. For example, genital mycoplasma is one of the most frequently found bacteria in amniotic fluid and (46,47) CVF samples (7,15,48) of pregnant women with adverse outcomes. However, data published in the literature are still controversial (9,24,49). In addition, we did not observe an association between those bacteria and sPTB.

The correlation between vaginal microbiota and obstetric complications depends on the studied population, with divergences according to ethnicity, geographic regions, changes in habits, and biological characteristics (20,35). Moreover, as genital mycoplasmas naturally constitute the vaginal microbiota, the association of genital mycoplasma and PTB may have a variance according to the presence of other risk factors (50–52). Therefore, the genital mycoplasma alone may be insufficient to cause pathological issues, but in combination with other factors, such as BV and co-infections with one or more different types of Mollicutes may represent an additional risk of PTB (7).

Although Mh infection was associated with BV, this condition did not represent a difference in sPTB risk (p=0.3548). The same was observed with the co-infection of Mh with Ureaplasma spp. (p=0.8277). Consequently, our results indicate that the presence of genital mycoplasma,

even when associated with other abnormal vaginal microbiota conditions, was not considered a risk of sPTB.

Moreover, according to some studies, the presence of infection without association with immune mediators is not sufficient to cause PTB (53,54). Hence, as there was no association of immune mediators found with any outcomes, the pregnant women probably did not have a pro-inflammatory scenario capable of breaking the immunological homeostasis and starting labor.

## **Conclusion**

In conclusion, although no association between genital mycoplasma infection and sPTB has been identified, our results bring essential contributions to the Brazilian literature. It was possible to verify the profile of asymptomatic pregnant women who present genital mycoplasmas infection in the FGT, the risk factors associated with this infection, and the best manner to treat it. Though, the understanding of this infection during pregnancy in the Brazilian population has been little explored. And since other covariates may lead to alterations in the association of genital mycoplasma and the sPTB outcome, it is crucial to conduct more studies to assess these bacteria's association with other obstetrics outcomes, recruiting a greater population diversity.

## **Acknowledgements**

The BRISA Project researchers' team that provided the database used in this study. Statistical tests were performed by Suleimy Cristina Mazin, statistician of the Department of Gynecology and Obstetrics of Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University.

## **Disclosure of interests**

The authors report no conflict of interests.

## **Contribution to authorship**

SMQ and RCC contributed to the study conception and wrote the study protocol with technical expertise from GKC and LBB. SFF managed the sample processing and quality assurance methods. GKC, LBB, and SMQ supervised study implementation. GKC wrote and performed the statistical analysis plan, interpreted the data, and wrote the draft version of the manuscript, which was then critically reviewed and revised by the other co-authors. All authors contributed to the final version.

## **Ethics approval**

The study protocol was approved by the Institutional Review Board (IRB) of Ribeirão Preto Medical School (Process: 11157/2008) and followed the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each participant before data collection.

## **Funding**

This work was partially supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, in the Portuguese acronym), Maranhão State Foundation (FAPEMA in the Portuguese acronym), Program of Support to Cores of Excellence (PRONEX, in the Portuguese acronym; Grant number 001/2007), São Paulo Research Foundation (FAPESP in the Portuguese acronym; Grant number #2008/53593-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES; Grant number 001) by productivity grant and Foundation to Support Teaching, Research and Assistance of Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School (FAEPA).

## List of Tables

Table 1: Baseline characteristics in the gestational and genital mycoplasma outcomes (n=1.314).

Table 2: Genital mycoplasma characteristics in the gestational outcome (n=1.314).

Table 3: Adjusted odds ratio with 95% confidence interval for risk of premature birth (n=1.185).

## List of Supporting Information

Table S1: Baseline characteristics in the type of genital mycoplasma infection (n=1.314)

Table S2: Odds ratio with 95% confidence interval for the association of immune mediators with premature birth and genital mycoplasma infection.

## Figure Legends

**Figure 1:** Flowchart of participants recruitment in the BRISA cohort study of 2010-2011. Mh, *Mycoplasma hominis*. PTB, preterm birth. sPTB, spontaneous preterm birth. TB, term birth.

## References

1. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Heal*. 2019;7(1):e37–46.
2. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde D de A em S e V de D não T. Saúde Brasil 2019: uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização. 2019.
3. UN IGME. Levels & Trends in childhood mortality: Report 2020, Estimates developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation [Internet].

- Who/Unicef/World Bank/Un. 2020. Available from: [https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/unpd\\_2020\\_levels-and-trends-in-child-mortality-igme-.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/unpd_2020_levels-and-trends-in-child-mortality-igme-.pdf)
4. Younes JA, Lievens E, Hummelen R, van der Westen R, Reid G, Petrova MI. Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship [Internet]. Vol. 26, Trends in Microbiology. 2018. p. 16–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.008>
  5. Al-Nasiry S, Ambrosino E, Schlaepfer M, Morr  SA, Wieten L, Voncken JW, et al. The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction. Vol. 11, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2020.
  6. Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? – a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2018;32(11):1845–51.
  7. Donders GGG, Ruban K, Bellen G, Petricevic L. *Mycoplasma/Ureaplasma* infection in pregnancy: To screen or not to screen. *J Perinat Med*. 2017;45(5):505–15.
  8. Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(2):431–7.
  9. Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, et al. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2021 May 30];44(1):51–5. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
  10. Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J, et al. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion - A molecular

- microbiological study. *J Perinat Med* [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 11];47(9):915–31. Available from: <https://doi.org/10.1515/jpm-2019-0297>
11. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gómez R, Kim CJ, Seok KS, et al. Prevalence and Diversity of Microbes in the Amniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and Pregnancy Outcome in Women with Preterm Pre-Labor Rupture of Membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2010;64(1):38–57.
  12. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2005;18(4):757–89. Available from: <http://cmr.asm.org/>
  13. Jayaprakash TP, Wagner EC, Van Schalkwyk J, Albert AYK, Hill JE, Money DM, et al. High diversity and variability in the vaginal microbiome in women following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A prospective cohort study. *PLoS One*. 2016;11(11).
  14. Breugelmans M, Vancutsem E, Naessens A, Laubach M, Foulon W. Association of abnormal vaginal flora and Ureaplasma species as risk factors for preterm birth: A cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010;89(2):256–60.
  15. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van Den Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2009;116(10):1315–24.
  16. Kwak DW, Hwang HS, Kwon JY, Park YW, Kim YH. Co-infection with vaginal Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Neonatal Med*. 2014;27(4):333–7.
  17. Zhou JZ, Way SS, Chen K. Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae. *Trends*

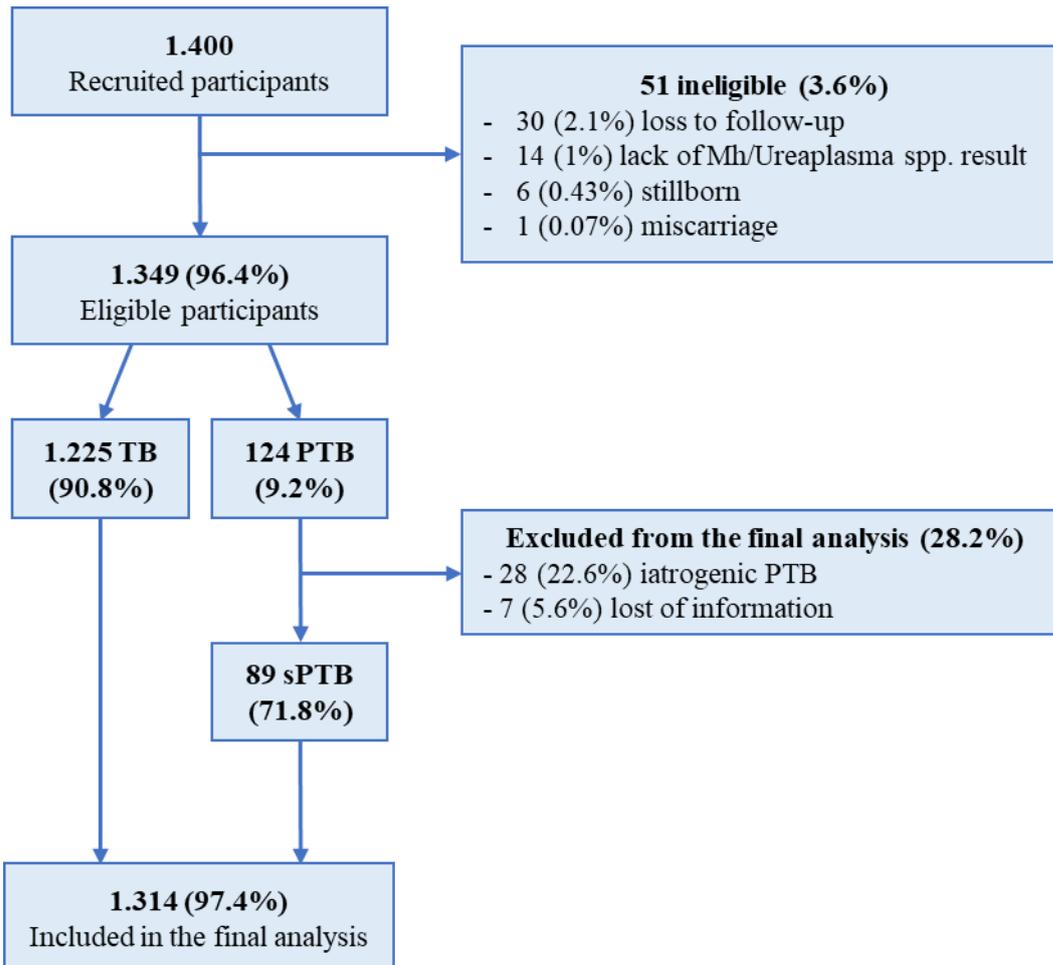
- Immunol [Internet]. 2018;39(4):302–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2018.01.007>
18. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel M V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract [Internet]. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. 2015 [cited 2018 Oct 17]. p. 217–30. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3819>
  19. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*. 2012;4(132).
  20. Di Simone N, Santamaria Ortiz A, Specchia M, Tersigni C, Villa P, Gasbarrini A, et al. Recent Insights on the Maternal Microbiota: Impact on Pregnancy Outcomes. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
  21. Da Silva AAM, Simões VMF, Barbieri MA, Cardoso VC, Alves CMC, Thomaz EBAF, et al. A protocol to identify non-classical risk factors for preterm births: The Brazilian Ribeirão Preto and São Luís prenatal cohort (Brisa). *Reprod Health* [Internet]. 2014;11(1). Available from: <http://www.reproductive-health-journal.com/content/11/1/79>
  22. Nugent, RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. Vol. 29, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1991.
  23. Yi J, Yoon BH, Kim EC. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. *Mol Cell Probes*. 2005 Aug 1;19(4):255–60.
  24. Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(3):231–40.
  25. Georgiou HM, Di Quinzio MKW, Permezel M, Brennecke SP. Predicting Preterm Labour: Current Status and Future Prospects [Internet]. Vol. 2015, *Disease Markers*.

- 2015 [cited 2020 Jul 10]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/435014>
26. Lee SM, Park KH, Jung EY, Kook SY, Park H, Jeon SJ. Inflammatory proteins in maternal plasma, cervicovaginal and amniotic fluids as predictors of intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. *PLoS One* [Internet]. 2018 [cited 2019 Dec 9];13(7). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200311>
  27. Gomes J, Au F, Basak A, Cakmak S, Vincent R, Kumarathasan P. Maternal blood biomarkers and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. Vol. 49, *Critical Reviews in Toxicology*. 2019. p. 461–78.
  28. Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Res Microbiol*. 2017;168(9–10):875–81.
  29. Gu X, Liu S, Guo X, Weng R, Zhong Z. Epidemiological investigation and antimicrobial susceptibility analysis of mycoplasma in patients with genital manifestations. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2020 Apr 12 [cited 2020 Sep 20];34(4). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcla.23118>
  30. Zeng XY, Xin N, Tong XN, Wang JY, Liu ZW. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;35(12):1941–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2745-2>
  31. Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Masuelli G, Marini S, Benedetto C. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: Risk factors and rates of occurrence. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(7):670–9.
  32. Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2010;14(2):e90–5. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.020>
33. Silva J, Cerqueira F, Teixeira AL, Bicho MC, Campainha R, Amorim J, et al. Genital mycoplasmas and ureaplasmas in cervicovaginal self-collected samples of reproductive-age women: prevalence and risk factors. *Int J STD AIDS*. 2018;29(10):999–1006.
  34. Lobão TN, Campos GB, Selis NN, Amorim AT, Souza SG, Mafra SS, et al. *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum* in sexually active women attending public health clinics in Brazil. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2017 [cited 2020 Feb 26];145(11):2341–51. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0950268817001145>
  35. Campos GB, Lobão TN, Selis NN, Amorim AT, Martins HB, Barbosa MS, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of Brazilian women. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1).
  36. Diadhiou M, Ba Diallo A, Barry MS, Alavo SC, Mall I, Gassama O, et al. Prevalence and Risk Factors of Lower Reproductive Tract Infections in Symptomatic Women in Dakar, Senegal. *Infect Dis Res Treat* [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 7];12:117863371985182. Available from: <https://doi.org/10.1177/1178633719851825>
  37. Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1993;169(2 PART 2):450–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90339-K](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(93)90339-K)
  38. Maraki S, Mavromanolaki VE, Nioti E, Stafylaki D, Minadakis G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in Greek female outpatients, 2012–2016. *J Chemother* [Internet]. 2018;30(3):140–4. Available from: <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1404287>
  39. Patel MA, Nyirjesy P. Role of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* species in female lower genital tract infections. Vol. 12, *Current Infectious Disease Reports*. 2010. p. 417–22.
  40. Cox C, Watt AP, McKenna JP, Coyle P V. *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella*

- vaginalis display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(3):481–7.
41. Passini R, Cecatti JG, Lajos GJ, Tedesco RP, Nomura ML, Dias TZ, et al. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): Prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 9 [cited 2021 Jun 16];9(10):e109069. Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
  42. Voltolini C, Torricelli M, Conti N, Vellucci FL, Severi FM, Petraglia F. Understanding spontaneous preterm birth: From underlying mechanisms to predictive and preventive interventions. Vol. 20, *Reproductive Sciences*. 2013. p. 1274–92.
  43. Thoma ME, Drew LB, Hirai AH, Kim TY, Fenelon A, Shenassa ED. Black–White Disparities in Preterm Birth: Geographic, Social, and Health Determinants. *Am J Prev Med*. 2019 Sep;57(5):675–86.
  44. Kazemier BM, Buijs PE, Mignini L, Limpens J, de Groot CJM, Mol BWJ. Impact of obstetric history on the risk of spontaneous preterm birth in singleton and multiple pregnancies: a systematic review. *BJOG*. 2014;121(10):1197–208.
  45. Bortoletto TG, Silva T V, Borovac-Pinheiro A, Pereira CM, Silva AD, França MS, et al. Cervical length varies considering different populations and gestational outcomes: Results from a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 6];16(2 February). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245746>
  46. Cappelletti M, Della Bella S, Ferrazzi E, Mavilio D, Divanovic S. Inflammation and preterm birth. *J Leukoc Biol*. 2016;99(1):67–78.
  47. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2011;118(2):164–74.
  48. Sprong KE, Mabenge M, Wright CA, Govender S. *Ureaplasma* species and preterm

- birth: current perspectives [Internet]. Vol. 46, *Critical Reviews in Microbiology*. 2020 [cited 2020 Jul 27]. p. 169–81. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imby20>
49. Lee SE, Romero R, Kim EC, Yoon BH. A high Nugent score but not a positive culture for genital mycoplasmas is a risk factor for spontaneous preterm birth. *J Matern Neonatal Med*. 2009;22(3):212–7.
  50. Foxman B, Wen A, Srinivasan U, Goldberg D, Marrs CF, Owen J, et al. Mycoplasma, bacterial vaginosis-associated bacteria BVAB3, race, and risk of preterm birth in a high-risk cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(3):226.e1-226.e7.
  51. Wen A, Srinivasan U, Goldberg D, Owen J, Marrs CF, Misra D, et al. Selected Vaginal Bacteria and Risk of Preterm Birth: An Ecological Perspective. *J Infect Dis* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2021 Jun 6];209(7):1087–94. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/209/7/1087/878283>
  52. Proctor LM, Creasy HH, Fettweis JM, Lloyd-Price J, Mahurkar A, Zhou W, et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569(7758):641–8.
  53. Amabebe E, Reynolds S, He X, Wood R, Stern V, Anumba DOC. Infection/inflammation-associated preterm delivery within 14 days of presentation with symptoms of preterm labour: A multivariate predictive model. *PLoS One* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 4];14(9). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222455>
  54. Elovitz MA, Gajer P, Riis V, Brown AG, Humphrys MS, Holm JB, et al. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nat Commun*. 2019 Dec 1;10(1).



**Figure 1:** Flowchart of participants recruitment in the BRISA cohort study of 2010-2011. Mh, *Mycoplasma hominis*; PTB, preterm birth; sPTB, spontaneous preterm birth; TB, term birth.

**Table 1:** Baseline characteristics in the gestational and genital mycoplasma outcomes (n=1.314)

Variables n (%)	N 1.314	PTB (n=89)	TB (n=1.225)	P*	Positive (n=236)	Negative (1.078)	P*
<b>Age (Years)</b>							
< 19	211	16 (18)	195 (15.9)	0.8245	47 (19.9)	164 (15.2)	0.2043
20 – 34	981	64 (71.9)	917 (74.9)		168 (71.2)	813 (75.4)	
≥ 35	122	9 (10.1)	113 (9.2)		21 (8.9)	101 (9.4)	
<b>Race/ethnicity</b>							
White and Asian	674	41 (46.1)	633 (52.2)	0.2650	131 (56)	543 (50.8)	0.1541
Black	628	48 (53.9)	580 (47.8)		103 (44)	525 (49.2)	
<b>Education level</b>							
Less than high school	361	25 (28.1)	336 (27.5)	0.6744	72 (30.6)	289 (26.9)	0.1261
High school	843	59 (66.3)	784 (64.2)		151 (64.3)	692 (64.4)	
More than high school	106	5 (5.6)	101 (8.3)		12 (5.1)	94 (8.7)	
<b>Marital status</b>							
With a partner	1.065	70 (78.7)	995 (81.4)	0.5284	190 (80.5)	875 (81.3)	0.7728
Without a partner	247	19 (21.3)	228 (18.6)		46 (19.5)	201 (18.7)	
<b>Remunerated activity</b>							
Yes	685	42 (47.2)	643 (52.6)	0.3262	137 (58.1)	548 (50.9)	<b>0.0470</b>
No	627	47 (52.8)	580 (47.4)		99 (41.9)	528 (49.1)	
<b>Alcohol consumption</b>							
No	1.221	79 (90.8)	1.142 (95.6)	<b>0.0390</b>	220 (94.8)	1001 (95.4)	0.6971
Yes	60	8 (9.2)	52 (4.4)		12 (5.2)	48 (4.6)	
<b>Smoking status</b>							
Non-smoker	1.141	69 (77.5)	1.072 (87.8)	<b>0.005</b>	190 (80.5)	951 (88.6)	<b>0.0009</b>
Smoker	169	20 (22.5)	149 (12.2)		46 (19.5)	123 (11.4)	
<b>Lifetime sexual partners</b>							
1-4	1.026	70 (84.3)	956 (81.4)	0.5088	161 (74.2)	865 (83.2)	<b>0.0019</b>
≥ 5	231	13 (15.7)	218 (18.6)		56 (25.8)	175 (16.8)	
<b>Previous history of PTB</b>							
No	536	18 (20.2)	518 (42.5)	<b>&lt;.0001</b>	84 (35.7)	452 (42.1)	0.1894
Yes	130	38 (42.7)	92 (7.5)		24 (10.2)	106 (9.9)	
Nulliparous	643	33 (37.1)	610 (50)		127 (54.1)	516 (48)	
<b>Previous miscarriage</b>							
No	1.084	68 (76.4)	1.016 (83)	0.1130	200 (84.8)	884 (82.1)	0.3283
Yes	229	21 (23.6)	208 (17)		36 (15.2)	193 (17.9)	
<b>Gestational hypertension</b>							
No	1.180	75 (84.3)	1.105 (91.3)	<b>0.0260</b>	210 (90.1)	970 (91)	0.6782
Yes	119	14 (15.7)	105 (8.7)		23 (9.9)	96 (9)	
<b>Gestational diabetes</b>							
No	1.244	84 (94.4)	1.160 (94.7)	0.8993	228 (96.6)	1.016 (94.3)	0.1434
Yes	70	5 (5.6)	65 (5.3)		8 (3.4)	62 (5.7)	
<b>Cervical length</b>							
> 2.5 cm	47	11 (12.5)	36 (2.9)	<b>&lt;.0001</b>	8 (3.4)	39 (3.6)	0.8693
≤ 2.5 cm	1.264	77 (87.5)	1.187 (97.1)		227 (96.6)	1.037 (96.4)	
<b>Nugent score</b>							
1 - 3	947	60 (67.4)	887 (73)	0.3168	114 (48.7)	833 (77.9)	<b>&lt;.0001</b>
4 - 6	177	12 (13.5)	165 (13.6)		46 (19.7)	131 (12.2)	
≥7	180	17 (19.1)	163 (13.4)		74 (31.6)	106 (9.9)	

PTB, preterm birth; TB, term birth. \*Chi-square test.

**Table 2:** Genital mycoplasma characteristics in the gestational outcome (n=1.314)

Variables n (%)	PTB (n=89)	TB (n=1.225)	P*
<b>Genital mycoplasma</b>			
Negative	74 (83.2)	1.004 (82)	0.7782
Positive	15 (16.8)	221 (18)	
<b>Bacteria of genital mycoplasma</b>			
Mh	3 (20)	32 (14.5)	0.8277
<i>Ureaplasma</i> spp.	10 (66.7)	153 (69.2)	
Mh+ <i>Ureaplasma</i> spp.	2 (13.3)	36 (16.3)	
<b>BV + Genital mycoplasma</b>			
No	82 (92.1)	1.148 (94.5)	0.3548
Yes	7 (7.9)	67 (5.5)	

BV + Genital mycoplasma, positive test for bacterial vaginosis and genital mycoplasma; Mh, positive test for *Mycoplasma hominis*; Mh + *Ureaplasma* spp., positive test for *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp.; PTB, preterm birth; TB, term birth; *Ureaplasma* spp., positive test for *Ureaplasma* spp. \*Chi-square test.

**Table 3:** Adjusted odds ratio with 95% confidence interval for risk of premature birth (n=1.185)

Variables	Adjusted OR (CI 95%) <sup>a</sup>	P
<b>Race/ethnicity</b>		
White and Asian (ref.)	-	0.3673
Black	1.26 (0.76 - 2.08)	
<b>Education level</b>		
More than high school (ref.)	-	0.4313
High school	2.0 (0.64 - 6.2)	
Less than high school	1.65 (0.49 - 5.54)	
<b>Remunerated activity</b>		
Yes (ref.)	-	0.2428
No	0.75 (0.45 - 1.22)	
<b>Alcohol consumption</b>		
No (ref.)	-	0.1984
Yes	1.9 (0.72 - 5.02)	
<b>Smoking status</b>		
Non-smoker (ref.)	-	0.0859
Smoker	1.79 (0.92 - 3.49)	
<b>Lifetime sexual partners</b>		
1-4 (ref.)	-	0.0724
≥ 5	0.52 (0.25 - 1.06)	
<b>Previous history of PTB</b>		
No (ref.)	-	<.0001
Yes	12.06 (6.21 - 23.43)	
Nulliparous	1.59 (0.83 - 3.06)	
<b>Previous miscarriage</b>		
No (ref.)	-	0.8976
Yes	0.96 (0.51 - 1.81)	

<b>Gestational hypertension</b>		
No (ref.)	-	0.6944
Yes	1.16 (0.55 - 2.44)	
<b>Gestational diabetes</b>		
No (ref.)	-	0.7388
Yes	1.2 (0.42 - 3.45)	
<b>Cervical length</b>		
> 2.5 cm (ref.)	-	<b>0.0018</b>
≤ 2.5 cm	3.97 (1.67 - 9.47)	
<b>Nugent score</b>		
1 – 3 (ref.)	-	
4 - 6	1.41 (0.71 - 2.83)	0.4728
≥7	1.39 (0.69 - 2.8)	
<b>Genital micoplasma</b>		
Negative (ref.)	-	0.2497
Positive	0.66 (0.32 - 1.35)	

CI, confidence interval; OR, odds ratio; PTB, preterm birth; Ref., reference. <sup>a</sup>Adjusting the covariables: race/ethnicity, education level, remunerated activity, alcohol consumption, smoking status, lifetime sexual partners, previous history of PTB, previous miscarriage, gestational hypertension, gestational diabetes, cervical length, Nugent score, genital micoplasma.

**Table S1:** Baseline characteristics in the type of genital mycoplasma infection (n=1.314)

Variables n (%)	Mh (n=35)	<i>Ureaplasma</i> spp. (n=163)	Mh+ <i>Ureaplasma</i> spp. (n=38)	P*
<b>Smoking status</b>				
Non-smoker	26 (74.3)	139 (85.3)	25 (65.8)	<b>0.0145</b>
Smoker	9 (25.7)	24 (14.7)	13 (34.2)	
<b>Nugent score</b>				
1 - 3	9 (25.7)	100 (62.1)	5 (13.2)	<b>&lt;.0001</b>
4 - 6	7 (20)	29 (18)	10 (26.3)	
≥7	19 (54.3)	32 (19.9)	23 (60.5)	
<b>CFU/mL</b>				
< 10 <sup>4</sup>	24 (68.6)	47 (28.8)	8 (21)	<b>&lt;.0001</b>
≥ 10 <sup>4</sup>	11 (31.4)	116 (71.2)	30 (79)	
<b>Antimicrobial resistance <sup>a</sup></b>				
Erythromycin	28 (80)	14 (8.6)	36 (94.7)	<b>&lt;.0001</b>
Azithromycin	20 (57.1)	10 (6.1)	26 (68.4)	<b>&lt;.0001</b>
Clarithromycin	29 (82.9)	13 (8)	37 (97.4)	<b>&lt;.0001</b>

CFU, colony-forming unit; Mh, positive test for *Mycoplasma hominis*; Mh + *Ureaplasma* spp., positive test for *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp.; *Ureaplasma* spp., positive test for *Ureaplasma* spp. <sup>a</sup> P-value refers to the analysis of drug resistance vs. without drug resistance.

\*Chi-square test.

**Table S2:** Odds ratio with 95% confidence interval for the association of immune mediators with premature birth and genital mycoplasma infection.

Variables	Premature birth	<i>P</i>	Genital Mycoplasma	<i>P</i>
	OR (CI 95%)		OR (CI 95%)	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,998 (0,995 - 1,001)	0,119	0,998 (0,995 - 1,001)	0,2336
<b>IL-10</b>	0,992 (0,976 - 1,009)	0,3495	0,997 (0,986 - 1,007)	0,5605
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	0,996 (0,993 - 1,0)	0,0608	0,999 (0,995 - 1,002)	0,5573
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0,978 (0,94 - 1,018)	0,2759	0,993 (0,963 - 1,024)	0,6511
<b>IL-2</b>	1,00 (0,996 - 1,007)	0,6382	1,002 (0,995 - 1,008)	0,6077
<b>IL-6</b>	0,996 (0,987 - 1,005)	0,385	0,987 (0,972 - 1,002)	0,0874
<b>IL-8</b>	0,998 (0,995 - 1,001)	0,2184	0,998 (0,972 - 1,002)	0,2139
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,984 (0,965 - 1,004)	0,1225	0,980 (0,954 - 1,007)	0,1467
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	0,997 (0,992 - 1,002)	0,2613	0,993 (0,985 - 1,002)	0,1349
<b>G-CSF</b>	0,998 (0,996 - 1,0)	0,0949	0,999 (0,997 - 1,002)	0,6481

CI, confidence interval; OR, odds ratio; PTB, preterm birth. OR Premature birth: preterm birth (n=87) and term birth TB (n=259). OR Genital mycoplasma: positive (n=57) and negative (n=289).