

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 25/08/2020.



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Juliano Novak

**Estudo da associação entre o microbioma vaginal com variáveis
sociodemográficas e de hábitos comportamentais de mulheres brasileiras
em idade reprodutiva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Camila Marconi
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva**

**Botucatu
2019**

Juliano Novak

**Estudo da associação entre o microbioma vaginal com variáveis
sociodemográficas e de hábitos comportamentais de mulheres brasileiras
em idade reprodutiva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Camila Marconi
Coorientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Novak, Juliano.

Estudo da associação entre o microbioma vaginal com variáveis sociodemográficas e de hábitos comportamentais de mulheres brasileiras em idade reprodutiva / Juliano Novak. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Camila Marconi

Coorientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40103005

1. Microbiota. 2. Vaginose bacteriana. 3. Lactobacillus. 4. Lactobacillus. 5. Doenças sexualmente transmissíveis. 6. Sequenciamento de nucleotídeo.

Palavras-chave: Lactobacillus iners; Microbioma vaginal; infecções sexualmente transmissíveis; sequenciamento de nova geração; vaginose bacteriana.

Dedico este trabalho á minha mãe Elvira,
por seu exemplo de vida.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha formação durante a elaboração deste trabalho, pois todos foram essenciais.

Agradeço também as agências de fomento à pesquisa, FAPESP pelo auxílio pesquisa e CAPES pela bolsa de mestrado.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”. Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

1. RESUMO	6
2. ABSTRACT	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
4. ARTIGO CIENTÍFICO	28
5. ANEXOS	46

1. RESUMO

A microbiota vaginal normal é composta predominantemente por *Lactobacillus* spp. que conferem proteção contra infecções por patógenos, por meio da produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Diferentemente, a vaginose bacteriana (VB) é caracterizada pela substituição da microbiota de *Lactobacillus* spp. por bactérias anaeróbias em sua maioria. A VB é a alteração de microbiota vaginal mais comum em mulheres de idade reprodutiva, acometendo aproximadamente 30% dessa população. Além disso, a VB é fator de risco para aquisição de infecções sexualmente transmissíveis (IST). Diversas características da população já foram associadas à VB, como idade, etnia, comportamentos sexual e de higiene. Entretanto, a real composição da microbiota vaginal só foi possível em 2011 com estudo utilizando o sequenciamento de nova geração do gene bacteriano RNA ribossômico 16S. Foi demonstrado que o microbioma vaginal pode ser classificado em cinco tipos de comunidades bacterianas (community-state types, CST). Quatro dessas CSTs tem predomínio de *Lactobacillus*: *L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III) e *L. jensenii* (CST V), enquanto que a CST IV apresenta grande diversidade bacteriana e engloba a maioria dos casos de VB. Apesar de quatro CSTs apresentarem predomínio de *Lactobacillus*, o papel protetor da CST III, dominada por *L. iners*, contra aquisição de IST tem se demonstrado menor que os demais. Embora os estudos de microbioma tenham possibilitado conhecer melhor a relação entre as espécies bacterianas com as IST, não existe na literatura informações acerca dos fatores sociodemográficos, comportamentais e clínicos das mulheres associados às CSTs. Desta forma, o objetivo desse estudo foi identificar as características sociodemográficas, comportamentais e clínicas da população associadas à CST III. Incluímos neste estudo transversal 609 mulheres brasileiras, que buscaram unidades de saúde para realização do exame preventivo do câncer de colo do útero. As participantes responderam a um questionário estruturado para obtenção de dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos. Para caracterização do microbioma vaginal, amostras vaginais foram submetidas ao sequenciamento das regiões V3-V4 do RNA ribossômico 16S em plataforma Miseq (Illumina, San Diego, CA). Um modelo de

regressão logística utilizando o método *stepwise* foi utilizado para testar a associação entre o microbioma dominado por *L. iners* com todas as variáveis avaliadas, considerando suas razões de chances (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC95%) em *software* Stata (Stata Corp, College station, TX). A maior prevalência foi de CST III foi de 36,5% (n = 222), das demais CST foram: CST I, 30,5% (n=186), CST II 4,4% (n = 27) e CST V 1,2% (n = 7). As demais 167 (27,4%) participantes apresentaram CST IV e não foram considerados na análise. A análise multivariada mostrou que as participantes que relataram ter dois ou mais parceiros sexuais no ano anterior ao estudo apresentaram um risco aumentado para CST III (OR: 3,27; IC 95% 1,50-7,11), bem como o achado microscópico de *Candida* spp. em esfregaços vaginais (OR: 2,24; IC 95% 1,02-4,89). Além disso, três fatores foram protetores para esse tipo de microbioma: uso de preservativo (OR: 0,59; IC 95% 0,38-0,91), ensino médio completo (OR: 0,61; IC 95% 0,41-0,91) e consumo diário de leite ou derivados (OR: 0,43; IC 95% 0,20-0,90). Dessa forma, concluímos que o microbioma vaginal dominado por *L. iners* é independentemente associado a características da população anteriormente associadas à VB como baixa escolaridade, múltiplos parceiros sexuais e sexo desprotegido.

Palavras-chave: Microbioma vaginal; *Lactobacillus iners*; Infecções sexualmente transmissíveis; Vaginose bacteriana; Sequenciamento de nova geração.

2. ABSTRACT

The normal vaginal microbiota is predominantly composed of *Lactobacillus* spp. which confer protection against pathogen infections through the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. Differently, bacterial vaginosis (BV) is characterized by the replacement of the microbiota of *Lactobacillus* spp. by anaerobic bacteria for the most part. BV is the most common vaginal microbiota alteration in women of reproductive age, affecting approximately 30% of this population. In addition, BV is a risk factor for the acquisition of sexually transmitted infections (STIs). Several characteristics of the population have already been associated with BV, such as age, ethnicity, sexual and hygiene behaviors. However, the actual composition of the vaginal microbiota was only possible in 2011 with study using the new generation sequencing of the bacterial 16S ribosomal RNA gene. It has been shown that the vaginal microbiome can be classified into five types of community-state types (CST). Four of these CSTs have a predominance of *Lactobacillus*: *L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III) and *L. jensenii* (CST V), while CST IV shows great bacterial diversity and involve most cases of BV. Although four CSTs have a predominance of *Lactobacillus*, the protective role of CST III, dominated by *L. iners*, against IST acquisition has been shown to be lower than the others are. Although microbiome studies have made it possible to know better the relationship between bacterial species and STIs, there is no information in the literature about the socio-demographic, behavioral and clinical factors of women associated with STIs. Thus, the objective of this study was to identify the sociodemographic, behavioral and clinical characteristics of the population associated with CST III. We included in this cross-sectional study 609 Brazilian women, who sought health units for the cervical cancer screening. Participants answered a structured questionnaire to obtain sociodemographic, behavioral and clinical data. To characterize the vaginal microbiome, vaginal samples were submitted to the sequencing of the V3-V4 regions of 16S ribosomal RNA in Miseq platform (Illumina, San Diego, CA). A logistic regression model using the stepwise method was used to test the association between the *L. iners* dominated microbiome with all the variables evaluated, considering its odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI)

in software Stata (Stata Corp., College Station, TX). The highest prevalence of CST III was 36.5% (n = 222); the other CSTs were CST I, 30.5% (n = 186), CST II 4.4% (n = 27) and CST V 1.2% (n = 7). The remaining 167 (27.4%) participants presented CST IV and were not considered in the analysis. Multivariate analysis showed that participants who reported having two or more sex partners in the year prior to the study had an increased risk for CST III (OR: 3.27; 95% CI 1.50-7.11), as well as the finding microscopic study of *Candida* spp. in vaginal smears (OR: 2.24; 95% CI 1.02-4.89). In addition, three factors were protective for this type of microbiome: condom use (OR: 0.59, 95% CI 0.38-0.91), complete high school (OR: 0.61, 95% CI, 0.41-0.91) and daily consumption of milk or derivatives (OR: 0.43; 95% CI 0.20-0.90). Thus, we conclude that the vaginal microbiome dominated by *L. iners* is independently associated with characteristics of the population previously associated with BV such as low education level, multiple sexual partners and unprotected sex.

Keywords: Vaginal microbiome; *Lactobacillus iners*; Sexually transmitted infections; Bacterial vaginosis; Next generation sequencing.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

A microbiota vaginal foi descrita pela primeira vez em 1892 por Albert Döderleine, já neste momento, foi considerada como saudável quando encontrada a predominância de espécies do gênero *Lactobacillus*¹. Ao longo dos anos, a literatura constantemente tem confirmado a importância da colonização por tais microrganismos². Espécies de *Lactobacillus* são responsáveis pela manutenção do ambiente vaginal equilibrado, visto que conferem defesa contra patógenos³. Dentre as linhagens de *Lactobacillus* spp., grande parte é capaz de liberar peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, conferindo importante capacidade antimicrobiana^{4,5}. Outro importante fator se dá pela capacidade que os *Lactobacillus* spp. possuem de produzir ácido láctico utilizando o metabolismo do glicogênio armazenado nas células epiteliais vaginais sob a influência do estrogênio do hospedeiro, dessa forma esses microrganismos contribuem para a manutenção do pH vaginal normal ácido, que também é considerado importante fator na manutenção da microbiota vaginal normal^{6,7}. Além disso, ao romper membranas celulares bacterianas o ácido láctico estimula a imunidade do hospedeiro na presença de lipopolissacarídeo presente na parede bacteriana de algumas espécies⁸. Curiosamente, há uma pequena porcentagem de mulheres que podem apresentar microbiota vaginal diversa com pH local ácido, composta por espécies também produtoras de ácido láctico^{9,10}, embora os métodos utilizados para identificação bacteriana nesses casos sejam atualmente questionáveis.

Devido à capacidade protetora das diferentes espécies de *Lactobacillus*, vários trabalhos tiveram por objetivo realizar avaliação individual de cada espécie. Um dos primeiros estudos, ao avaliar a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio demonstrou que apenas 9% dos isolados de *L. iners* apresentaram

essa capacidade, enquanto que 95% dos isolados de *L. crispatus* foram capazes de produzi-lo¹¹. Com relação à produção de ácido láctico, já foi demonstrado que *L. iners* produz majoritariamente a isoforma L-lactato, enquanto que *L. crispatus* produz maiores quantidades de D-lactato¹². A contribuição da isoforma L-lactato no ambiente vaginal ainda não é completamente compreendida, no entanto estudos têm mostrado que *L. iners* tem a capacidade de manter o pH vaginal relativamente baixo, mas não tão eficientemente quanto *L. crispatus*¹³⁻¹⁵. Ainda com relação ao pH, recentemente foi demonstrado que somente o pH baixo não é suficiente para proteção contra a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas a isoforma mais produzida pelo *L. crispatus* é a que oferece melhor proteção contra esse vírus por dificultar a permeabilidade ao muco cérvico-vaginal¹⁶.

A literatura é consistente ao demonstrar que mulheres com predomínio de *Lactobacillus* spp. estão menos propensas à aquisição de infecções sexualmente transmissíveis (IST), sejam as bacterianas por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, bem como as infecções virais, como pelo papilomavírus humano (HPV) e HIV^{1-3; 16}.

Quando há depleção de espécies de *Lactobacillus*, tem-se a principal alteração de microbiota vaginal, denominada vaginose bacteriana (VB), neste caso *Lactobacillus* spp. são parcialmente ou totalmente substituídos por outras espécies bacterianas, principalmente anaeróbias¹⁷. Esta alteração foi descrita pela primeira vez em 1954 por Gardner e Dukes, como sendo causada por um único agente bacteriano, o bacilo Gram-variável e anaeróbio facultativo, denominado *Gardnerella vaginalis*¹⁸. No entanto, os estudos posteriores demonstraram que na verdade a VB está associada ao aumento de várias outras

espécies bacterianas como *Mobiluncus* sp., *Mycoplasma* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Prevotella* sp., *Bacteroides fragilis*, *Ureaplasma* sp., *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp., e, portanto, tal alteração passou a ser considerada como de etiologia polimicrobiana^{17, 19-20}.

A prevalência de VB é de aproximadamente 30% em mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo, incluindo estudos realizados no Brasil, mas pode variar conforme características populacionais como idade, etnia e características comportamentais²¹⁻²². Deste modo, os estudos já demonstraram a associação entre VB e fatores como hábitos sexuais como histórico de mais de um parceiro sexual na vida, relato de novo parceiro sexual ou início de atividade sexual em idade mais jovem, além do uso de duchas vaginais e estresse crônico²²⁻²⁵.

É bem estabelecido que há associação entre a VB e diversas complicações obstétricas e ginecológicas levando a efeitos deletérios para a saúde, visto que, mulheres que apresentam essa alteração de microbiota têm risco aumentado para desenvolver doença inflamatória pélvica (DIP) e aquisição e transmissão de IST. No contexto da associação negativa entre *Lactobacillus* spp. e IST, a VB já foi associada à infecção por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, HPV e HIV. Além destas, a instalação dessa condição também aumenta o risco de infecção pelo parasita *Trichomonas vaginalis*²⁶⁻³⁰. Com relação à infecção pelo HPV, sabe-se que a persistência desta infecção é condição necessária para o desenvolvimento das lesões neoplásicas no colo uterino e nesse sentido já foi demonstrado que a VB aumenta o tempo de *clearance* viral³¹.

Dentre as mulheres grávidas, tal condição é particularmente deletéria, visto que a VB durante a gestação pode levar a complicações como aborto

espontâneo, corioamnionite, trabalho de parto pré-termo, além de ser um fator de risco para apresentar baixo peso ao nascimento³²⁻³⁵.

O padrão-ouro para o diagnóstico da VB se dá pela observação microscópica dos morfotipos bacterianos presentes no esfregaço do conteúdo vaginal após coloração pela técnica de Gram desenvolvida por Nugent et al.¹³ Desta forma, baseando-se na semiquantificação dos morfotipos presentes, são atribuídos escores de 0 a 10, onde a microbiota normal recebe escores de 0 a 3, a intermediária de 4 a 6 e escores superiores são compatíveis com VB³⁶. Devido às diversas complicações ocasionadas pela VB e as limitações das técnicas microscópicas, vários estudos direcionaram seus esforços a fim de se conhecer a composição bacteriana exata do ambiente vaginal, bem como as interações existentes entre as espécies. Desta forma, os primeiros estudos realizados com métodos de cultura bacteriana contribuíram para o conhecimento da composição bacteriana do ambiente vaginal, no entanto tais métodos não permitiam cultivar bactérias fastidiosas ou não-cultiváveis, com o avanço das técnicas de biologia molecular, inicialmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e depois por clonagem pôde-se ter conhecimento das espécies presentes nesta alteração, embora houvesse limitação com relação ao número de clones recuperados³⁷⁻⁴⁰.

Embora as técnicas acima citadas já tivessem permitido avanços no conhecimento da composição bacteriana da microbiota vaginal, o marco para a determinação não só do microbioma vaginal, bem como do microbioma humano como um todo foi o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento de nova geração. Neste sentido, tais técnicas permitiram conhecer a real composição bacteriana no ambiente vaginal bem como os estudos tornaram possível avaliar as transições de microbiota vaginal saudável e VB^{13, 41}. Tal técnica consiste no

sequenciamento de porções do gene bacteriano RNA ribossômico 16S, permitindo a identificação das espécies bacterianas presentes, além de determinar qual a participação de cada espécie na comunidade bacteriana total⁴². A partir da utilização dessa técnica demonstrou-se que grande parte da microbiota vaginal é composta por organismos fastidiosos e até então nunca cultivados em laboratório^{13, 43}.

Empregando o pirosequenciamento do gene bacteriano RNAr 16S, Ravel et al. (2011)⁴¹, classificaram pela primeira vez o microbioma vaginal. Este estudo demonstrou que 75% das mulheres norte-americanas apresentaram microbiota vaginal constituída predominantemente por uma ou mais espécies de *Lactobacillus*, além do fato de que apesar da grande diversidade microbiana vaginal, o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva pode ser agrupado em cinco principais comunidades bacterianas (CST, *Community-state type*) conforme predominância de determinadas espécies. Destas cinco comunidades, quatro são caracterizadas pela prevalência de uma das espécies de *Lactobacillus*: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*. Enquanto que a comunidade remanescente não apresenta predomínio de *Lactobacillus* spp., mas sim grande diversidade de espécies, embora em alguns casos possa existir a presença de *Lactobacillus* spp. Neste ponto, vale destacar que é justamente nesta comunidade onde há diversidade e heterogeneidade bacteriana que estão incluídos a maioria dos casos de VB, quando a microbiota é classificada pelo método de Nugent, além do fato de que a microbiota vaginal intermediária pode estar distribuída entre as cinco comunidades descritas, mas a maior parte delas concentra-se naquela dominada por *L. iners*.

Lactobacillus iners foi descrito pela primeira vez em 1999 sendo isolado do trato genital inferior e urinário⁴⁴. Este microrganismo foi descrito como bacilo Gram-positivo, com arranjos individuais, em pares ou ainda em cadeias curtas. O crescimento é lento, aproximadamente 24 horas, e as colônias são pequenas, lisas e não pigmentadas⁴⁴. Posteriormente foi demonstrado que a espécie nem sempre é Gram-positiva, visto que alguns isolados se apresentam como cocobacilo e coloração Gram-negativa. Tal fator possivelmente dificultou seu reconhecimento em esfregaços vaginais ⁴⁵. Essa diferença na morfologia celular e nas propriedades de coloração de Gram do *L. iners* deve ser ainda explorada, visto que muitas determinações diagnósticas dependem dessas características, por exemplo, o escore de Nugent, que é amplamente usado na rotina diagnóstica de alterações da microbiota vaginal. Tal método se baseia na coloração pelo método de Gram do conteúdo vaginal permitindo diferir *Lactobacillus* spp. como bastonetes Gram-positivos de outros morfotipos bacterianos proporcionando o diagnóstico, principalmente da VB, sendo um método de diagnóstico dependente da morfologia vista ao microscópio, o comportamento diferente do *L. iners* comparado as outras espécies lactobacilar, pode ser um fator confundidor³⁶.

O microbioma com predomínio de *L. iners* corresponde a um dos mais prevalentes em mulheres em todo o mundo, chegando a quase 40% dependendo da população estudada⁴⁶⁻⁴⁹ sendo que em gestantes essa prevalência pode ser ainda maior, visto que estudo encontrou predomínio desta espécie em 51% da população avaliada⁴⁹.

Visto que *L. iners* figura entre as espécies mais prevalentes colonizando o ambiente vaginal, estudos direcionaram seus objetivos a entender melhor a sua participação na microbiota vaginal. Desta forma, alguns autores apontam que a

comunidade com predomínio de *L. iners* é mais instável e variável com relação à variedade de outras espécies co-habitando o mesmo ambiente, dessa forma pode-se assumir que o microbioma com predomínio de *L. iners* favorece o aumento da beta-diversidade, enquanto que as comunidades com predomínio de *L. crispatus* e *L. gasseri* tendem a ser mais estáveis ao longo do tempo^{13, 50}. De fato, estudos prévios já demonstraram associação entre o *L. iners* e a VB^{39-40,51-52}.

Além da associação com VB, o microbioma vaginal dominado por *L. iners* já demonstrou ter associação com ISTs, como no caso da infecção pelo HPV, além disso, este estudo demonstrou que o tempo do *clearance* viral foi maior, diferente do que ocorreu no microbioma dominado por *L. gasseri*⁵⁰. No caso da infecção bacteriana por *C. trachomatis*, o microbioma dominado por *L. iners* é fator de risco para aquisição, enquanto que o microbioma dominado por *L. crispatus* apresenta associação contrária, diminuindo as chances de se adquirir essa infecção⁵³. De fato, estudo *in vitro* demonstrou que *L. crispatus* é capaz de diminuir a adesão e a infectividade da *C. trachomatis* devido a sua capacidade de produção de D-lactato⁵⁴⁻⁵⁵.

Pouco se sabe sobre a interação entre microbioma vaginal e presença de *Candida* spp., causadora de vaginites como a candidíase vulvovaginal, que acomete entre 30 a 50% de mulheres ao menos uma vez durante a vida⁵⁶⁻⁵⁷, e compartilha de fatores de risco já associados ao microbioma, como frequência de relação sexual, ducha vaginal e uso de contraceptivos⁵⁸⁻⁵⁹. Neste sentido, estudo apontou que embora não houvesse associação estatisticamente significativa, houve maior prevalência de mulheres com candidíase vulvovaginal na comunidade com predomínio de *L. iners* definida pelo microbioma⁶⁰.

Até o presente momento existem diversos estudos associando fatores sociodemográficos, comportamentais e clínicos à VB, possibilitando saber quais características populacionais são fatores de risco para o desenvolvimento desta alteração que pode levar a efeitos deletérios a saúde da mulher²²⁻²⁵. Sabe-se que a composição do microbioma humano está relacionada a fatores ambientais, de comportamento e dieta do hospedeiro. No entanto, a literatura ainda carece de dados acerca da relação entre o microbioma vaginal e variáveis sociodemográficas, comportamentais e clínicas. Principalmente, no que se refere ao microbioma vaginal com predomínio de *L. iners*, que embora seja o mais frequente em diversas populações e apresente similaridades com àquelas observadas na alteração da microbiota vaginal, não existem informações sobre sua relação com características da população.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Doderlain A. Das scheiden sekretund seine Bedeutung fur das puerperal fieber. Leipzig: Verloag von Edgard Besold. Jan 1892.
- 2.Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. Clin Infect Dis 1993; 4: 273-81.
- 3.Graver MA, Wade JJ. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2011; 10:8.
- 4.McLean NW, Rosenstein IJ. Characterization and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. J Med Microbio 2000; 49: 543-52.
- 5.Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1989; 27: 251-6.
- 6.Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. Infect Immun 1999; 67: 5170-5.
- 7.Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med 1983; 74: 14-22.
- 8.Bradshaw CS, Brotman RM. Making inroads into improving treatment of bacterial vaginosis-striving for long-term cure. BMC Infect Dis 2015; 15: 292.

9. Petrova MI, van den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 762–92.
10. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol* 2015; 6: 164.
11. Antonio MAD, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* 1999; 180: 1950-6.
12. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *mBio* 2013; 4: 00460-13.
13. Gajer P, Brotman RM, Bay G, Sakamoto J, Schutte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012; 4: 132-52.
14. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One* 2012; 7: 37818.
15. Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, Dickson RJ, Changalucha J, Gloor GB, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. *PLoS One* 2010; 5: 12078.

- 16.Nunn KL, Wang YY, Harit D, Humphrys MS, Ma B, Cone R, et al. Enhanced trapping of HIV-1 by human cervicovaginal mucus is associated with *Lactobacillus crispatus*-dominant microbiota. *M Bio* 2015; 6(5): 01084-15.
- 17.Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:485-502.
- 18.Gardner HL, Dukes CD. New etiologic agent in non-specific bacterial vaginitis. *Science* 1954; 120: 853.
- 19.Newton ER, Piper JM, Shain RN, Perdue ST, Peairs W. Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 845-55.
- 20.Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 69-77.
- 21.Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis* 2007; 34: 864-9.
- 22.Marconi C, Duarte MT, Silva DC, Silva MG. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil. *Int J Gynaecol Obstet* 2015; 131: 137-41.
- 23.Schwebke JR, Richey CM, Weiss HL. Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 1999; 180: 1632-6.
- 24.Culhane JF, Rauh V, McCollum KF, Elo IT, Hogan V. Exposure to chronic stress and ethnic differences in rates of bacterial vaginosis among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1272-6.
- 25.Gallo MF, Macaluso M, Warner L, Fleenor ME, Hook EW, Brill I, et al. Bacterial vaginosis, gonorrhea, and chlamydial infection among women attending a sexually

transmitted disease clinic: a longitudinal analysis of possible causal links. *Ann Epidemiol* 2012; 22: 213-20.

26. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 663-8.

27. Myer L, Denny L, Telerant R, Souza M, Wright TC Jr, Kuhn L. Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: a nested case-control study. *J Infect Dis* 2005; 192: 1372-80.

28. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997; 350: 546-50.

29. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999; 180: 1863-8.

30. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 10.

31. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011; 2011: 319460.

32. Donders GG, Van Bulk 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; 183:431-7.

33. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342: 1500-7.

34. Platz-Christensen JJ, Pernevi P, Hagmar B, Andersson E, Brandberg A, Wiquist N. A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993; 72: 99-102.
35. Leitch H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 139-47.
36. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 297-301.
37. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69: 962-76.
38. Spiegel CA, Eschenbach DA, Amsel R, Holmes KK. Curved anaerobic bacteria in bacterial (nonspecific) vaginosis and their response to antimicrobial therapy. *J Infect Dis* 1983; 148: 817-22.
39. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Simaey LV, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol* 2004; 21:16-26.
40. Fredricks DN, Fiedler TL, Mrazek JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1899-911.
41. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: Suppl1:4680-7.

42.Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, Ott S, Sengamalay N, Brotman RM, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq Platform. *Microbiome* 2014; 24: 2-6.

43.Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A, Väin E, et al. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS One* 2013; 8(1): 54379.

44.Falsen E, Pascual C, Sjöden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 217-21.

45.De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol* 2007; 19: 115.

46.Mitra A, MacIntyre D A, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep* 2015; 5: 16865.

47.Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, Thiébaud A, Bébéar C, Ravel J, et al. Vaginal microbiota composition and association with prevalent *Chlamydia trachomatis* infection: a cross-sectional study of young women attending a STI clinic in France. *Sex Transm Infect* 2018; 0: 1–3.

48.Balle C, Lennard K, Dabee S, Barnabas SL, Jaumdally SZ, Gasper MA, et al. Endocervical and vaginal microbiota in South African adolescents with asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infection. *Sci Rep* 2018; 8: 11109.

49.Nasioudis D, Forney LJ, Schneider GM, Gliniewicz K, France MT, Boester A, et al. The composition of the vaginal microbiome in first trimester pregnant women

influences the level of autophagy and stress in vaginal epithelial cells. *J of Rep Immun* 2017; 123: 35–39.

50. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis* 2014; 210: 1723–33.

51. Mitchell C, Fredricks D, Agnew K, Hitti J. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli are associated with lower levels of vaginal interleukin-1beta, independent of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis* 2015; 42: 358-63.

52. Santiago GL, Cools P, Verstraelen H, Trog M, Missine G, Aila NE, et al. Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles. *PLoS One* 2011; 6: 28180.

53. van Houdt R, Ma B, Bruisten SM, Speksnijder AGCL, Ravel J, de Vries HJC, et al. *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota is associated with increased susceptibility to *Chlamydia trachomatis* infection in Dutch women: a case-control study. *Sex Transm Infect.* 2018; 94: 117–123.

54. Nardini P, Ñahui Palomino RA, Parolin C, Laghi L, Foschi C, Cevenini R, et al. *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study. *Sci Rep* 2016; 6: 29024.

55. Gong Z, Luna Y, Yu P. & Fan, H. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H₂O₂. *PLoS One* 2014; 9: 107758.

56. Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110(1): 66-72.

57. Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. *J Low Genit Tract Dis* 2013; 17(3):340-5.
58. Geiger AM, Foxman B. Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students. *Epidemiology* 1996; 7(2): 182-7.
59. Foxman B. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: risk factors. *Am J Public Health* 1990; 80(3): 329-31.
60. Gautam R, Borgdorff H, Jespers V, Francis SC, Verhelst R, Mwaura M, et al. Correlates of the molecular vaginal microbiota composition of African women. *BMC Infectious Diseases* 2015; 15:86.