UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA, COMPORTAMENTAL E CLÍNICA DE MULHERES ACOMETIDAS POR INFECÇÃO PERSISTENTE PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO

LAURA EMI YONEZAWA DE SOUZA

ORIENTADORA: DRA MARIANA DE CASTRO SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA, COMPORTAMENTAL E CLÍNICA DE MULHERES ACOMETIDAS POR INFECÇÃO PERSISTENTE PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO

LAURA EMI YONEZAWA DE SOUZA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Dra. Mariana de Castro Silva

BOTUCATU
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Souza, Laura Emi Yonezawa.
Caracterização sociodemográfica, comportamental e clínica de mulheres acometidas por infecção persistente pelo Papilomavírus Humano de alto risco oncogênico / Laura Emi Yonezawa Souza. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Mariana de Castro Silva
Coorientador: Márcia Guimarães da Silva
Capes: 40103005

1. Gardnerella. 2. Papillomaviridae. 3. Infecção Persistente.

Palavras-chave: Alto risco; Gardnerella; HPV; Infecção persistente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e pelo incentivo aos meus estudos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelos ensinamentos e pelo acolhimento.

Agradeço aos meus amigos por tornarem os dias mais leves e felizes.

Agradeço ao time Pipeleaders por tornarem o esporte algo essencial e apaixonante.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº do processo: 123264/2023-5) pelo financiamento deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO 4
1. INTRODUÇÃO 5
2. OBJETIVO 6
3. MATERIAL E MÉTODOS 6
3.1. Desenho do estudo 6
3.2 Detecção e tipagem de HPV 7
3.3. PCR em tempo real para detecção do gene de G. vaginalis 8
4. RESULTADOS 8
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 12

RESUMO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) representam um importante problema de saúde pública. Dentre elas, a mais prevalente é a infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV), sendo que cerca de 40 tipos apresentam afinidade pelo trato anogenital e compreendem alguns tipos que estão envolvidos na etiologia de lesões neoplásicas. Os HPV-16 e 18 são os mais prevalentes dos HPVs alto risco oncogênico e estão relacionados às lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo do útero. Recentemente, tem sido proposto que, além do genótipo viral, o tempo de *clearance* do HPV, que é a eliminação das infecções por HPV, também pode sofrer influência de outros fatores, como a presença de coinfecções genitais e composição da microbiota vaginal. **Objetivo:** caracterizar e descrever dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos de mulheres com persistência de HPV de alto risco oncogênico (HPV16 e HPV18) na região de Botucatu. **Metodologia:** o estudo envolveu uma coorte de 73 mulheres. Foi realizado o exame especular para coleta de conteúdo vaginal e classificação da microbiota vaginal em exame microscópico. O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit de extração de DNA e a genotipagem de HPV foi realizada empregando o kit Linear Array HPV. **Resultados:** a maioria das mulheres incluídas no estudo eram brancas e solteiras, e a maioria não faz uso de preservativos nas relações sexuais. As pacientes, em sua maioria, não possuíam outra ISTs associada, porém a vaginose bacteriana esteve presente na maioria dos diagnósticos de microbiota vaginal. **Conclusão:** estudos que caracterizam a população de mulheres acometidas pela persistência de HPVs de alto risco oncogênico são de grande relevância para futuras estratégias de intervenção e para o correto manejo e orientação das pacientes, visam entregar melhorias na qualidade de vida das mulheres e o *clearance* viral.

1. INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) representam um importante problema de saúde pública. No Brasil, segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), aproximadamente 1 milhão de pessoas apresentaram diagnóstico médico positivo para ISTs em 2019, representando 0,6% da população brasileira acima de 18 anos (1). Uma das ISTs mais prevalentes é a infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV) (2). O HPV é um vírus não envelopado, de estrutura icosaédrica, pertencentes à Família *Papillomaviridae*, sendo que atualmente já foram descritos mais de 200 tipos de HPV (3), dentre os quais cerca de 40 tipos apresentam afinidade pelo trato anogenital (4) e compreendem alguns tipos que estão envolvidos na etiologia de lesões neoplásicas.

Dessa forma, os HPV genitais são classificados em baixo e alto risco, de acordo com seu risco oncogênico. Os HPV-6 e 11 são os HPV de baixo risco oncogênico mais prevalentes e estão associados ao desenvolvimento de verrugas genitais. Já os HPV-16 e 18 são os mais prevalentes dos HPVs alto risco oncogênico e estão relacionados às lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo do útero (5). Embora outros fatores estejam associados ao desenvolvimento do câncer de colo de útero, como por exemplo a presença de coinfecções genitais e *status* imunológico do hospedeiro, a presença da infecção persistente pelo HPV de alto risco é reconhecida como causa necessária para o desenvolvimento de lesões precursoras do colo do útero (6).

Recentemente, tem sido proposto que, além do genótipo viral, o tempo de *clearance* do HPV, que é a eliminação das infecções por HPV, também pode sofrer influência de outros fatores, como dieta nutricional (7), uso de contraceptivos de progesterona (8), presença de coinfecções genitais (9) e composição da microbiota vaginal (10). Nesse sentido, foi demonstrado que a presença da vaginose bacteriana, que é a principal disbiose que acomete mulheres em idade reprodutiva, está associada tanto à prevalência da infecção pelo HPV, como também a uma diminuição significativa na taxa de *clearance* viral (11,12). Contudo, tais trabalhos se basearam em métodos microscópicos para a detecção da vaginose bacteriana, que, embora amplamente utilizados, não permitem avaliar e determinar de forma precisa a real composição bacteriana deste ambiente.

Até o presente momento, a literatura é escassa em trabalhos que testaram a associação entre o microbioma vaginal e a infecção pelo HPV. Embora a vaginose bacteriana esteja associada a uma grande diversidade bacteriana no ambiente vaginal, a espécie *Gardnerella*

vaginalis está presente em quase a totalidade dos casos (13). A *G. vaginalis* é uma bactéria cocobacilar anaeróbia, produtora de sialidase A e vaginolisina como fatores de virulência, sendo a primeira responsável pela degradação da barreira de células epiteliais vaginal, causando esfoliação e descamação do epitélio (14), e a segunda pela formação de poros nas células epiteliais vaginais, facilitando sua lise, sendo que ambos permitem a formação do biofilme (14,15).

A importante relação entre a infecção pelo HPV e a composição da microbiota vaginal, bem como as complicações associadas a essas condições, ressaltam a necessidade de se conhecer as características populacionais, em risco, para infecções persistentes de HPV. Desse jeito, a identificação de *G. vaginalis*, e sua associação com a eliminação ou persistência da infecção pelo HPV, permitirão a melhor compreensão da relação entre a microbiota vaginal e o desfecho da infecção pelo HPV.

2. OBJETIVO

Caracterizar e descrever dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos de mulheres com persistência de HPV de alto risco oncogênico (HPV16 e HPV18) na região de Botucatu.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

A população do estudo proposto envolveu a coorte de 73 mulheres incluídas no projeto intitulado “Prevalência de coinfecção e fatores associados ao Papilomavírus Humano (HPV) e à *Chlamydia trachomatis* em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção de Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil”. Tal projeto teve início em 2013, na Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), sob coordenação da Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (Parecer nr. 1.909.609). Foram consideradas para este presente estudo as mulheres com persistência de HPV que apresentaram positividade para o mesmo

genótipo de HPV16 e/ou HPV18 no momento da inclusão do estudo e na visita de *follow up* após 12 meses.

Todas as participantes foram informadas quanto ao objetivo do estudo e, mediante a concordância em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexo 2). Dados acerca das características sociodemográficas, físicas, comportamentais, história ginecológica e queixas atuais, bem como achados clínicos no momento da inclusão das mulheres no estudo foram obtidos utilizando formulários padronizados para o estudo que foram preenchidos pelos pesquisadores e/ou pelo corpo clínico colaborador.

No momento da inclusão no estudo, foi realizado o exame especular, empregando-se o espéculo vaginal bivalve de Collin, esterilizado e isento de qualquer lubrificante, para coleta de conteúdo vaginal, com *swab* estéril, do terço médio da parede lateral, para posterior classificação da microbiota vaginal em exame microscópico corado pelo método de Gram, aplicando os critérios de Nugent et al (16), Dong et al. (17), Cibley & Cibley (18) e Ison & Hay (19). Amostras endocervicais foram obtidas por 3 rotações do *cytobrush* em 360º para a pesquisa da infecção por *C. trachomatis* e pelo HPV, bem como a determinação dos genótipos virais presentes na amostra. Finalmente, foram realizados lavados cérvico-vaginais utilizando 3mL de solução salina estéril para utilização na pesquisa do gene de *G. vaginalis*.

3.2 Detecção e tipagem de HPV

Os conteúdos cervicais coletados das mulheres foram acondicionados em tubo Falcon de 15 mL com 1000 uL da solução de Tris-HCl 50mM pH 8,5 EDTA 1mM pH 8,0 e armazenadas a -20ºC até o momento do processamento. O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit de extração de DNA AmpliLuteLiquid Media Extraction (Roche Molecular Systems, Inc.). A genotipagem de HPV, ou seja, identificação do genótipo de HPV destas amostras foi realizada empregando o kit Linear Array HPV genotyping tests (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Todas as amostras foram processadas conforme as instruções do fabricante.

Esta metodologia se baseia na amplificação de fragmento do DNA do vírus, utilizando os iniciadores PGMY09/11,37 que flanqueiam uma região do gene L1 do HPV. Após a amplificação do DNA do HPV foi realizada a genotipagem pelo método de hibridização com sondas oligonucleotidicas do kit Linear Array HPV genotyping (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Este método baseia-se na hibridização do produto amplificado com sondas específicas para 37 tipos de HPV que se encontram imobilizadas em uma tira de

genotipagem. Em seguida, a detecção foi feita por reação colorimétrica para identificação do tipo de HPV presente em cada amostra.

3.3. PCR em tempo real para detecção do gene de G. vaginalis

As reações foram realizadas em volumes finais de 12,5uL contendo 6,25uL de Maxima SYBR Green/ROX (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 0.375 uL de cada um dos *primers* F-GV1 e R-GV3 em concentração de 10uM e 2uL de amostra. A ciclagem foi padronizada em termociclador Line Gene K (Bioer, China) sob as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, recozimento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos seguida de etapa de dissociação: 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 minutos. Amostras com valor de temperatura de *melting* de 84ºC +/- 1ºC foram consideradas positivas para *Gardnerella vaginalis*.

4. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as características sociodemográficas, comportamentais e clínicas das participantes, segundo os grupos de estudo. A mediana de idade das pacientes incluídas no estudo foi de 28 anos, sendo que a maioria das mulheres não se identificavam como brancas (53,3%) e eram solteiras (54,8%) e apresentaram uma mediana de 11 anos de escolaridade.

Considerando as variáveis comportamentais, a maioria das pacientes reportou ter apenas um parceiro sexual no ano e fazer uso de contraceptivo hormonal (71,2%), porém, apenas 36,9% das pacientes utilizavam preservativo de modo consistente nas relações sexuais. A maior parte das mulheres incluídas no estudo eram fumantes (65,7%) e não faziam o consumo de álcool (57,6%) ou drogas (97,2%).

Nas características clínicas, a maioria reportou queixa de corrimento anormal no momento da coleta (63%) e foram negativas para *Trichomonas vaginalis* (95,9%) e *Chlamydia trachomatis* (89%). Quanto a análise microscópica do conteúdo vaginal corado pelo método de gram e classificação da microbiota pelos critérios de Nugent, a maioria das mulheres apresentou o diagnóstico de vaginose bacteriana, seguido de microbiota normal e microbiota intermediária. Além disso, a maioria das mulheres com persistência de HPV de alto risco oncogênico foram positivas para a presença de *Gardnerella vaginalis* (78,1%).

Tabela 1. Dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos das participantes do estudo

Características da população		**N=73**
Idade		28 (17-50)
Etnia		
	Branca	34 (46,5%)
	Não-branca	39 (53,5%)
Estado civil		
	Casada/vivendo com o parceiro	33 (45,2%)
	Solteira	40 (54,8%)
Escolaridade		11 (2-17)
N° de parceiros sexuais (por ano)		1 (0-4)
Preservativo		
	Sim	27 (36,9%)
	Não	46 (63,1%)
Contraceptivo hormonal		
	Sim	52 (71,2%)
	Não	21 (28,8%)
Tabagista		
	Sim	48 (65,7%)
	Não	25 (34,3%)
Álcool		
	Sim	31 (42,4%)
	Não	42 (57,6%)
Drogas		
	Sim	2 (2,8%)
	Não	70 (97,2%)
Queixa de corrimento		

Sim	46 (63%)
Não	27 (37%)
Trichomonas vaginalis	
Sim	3 (4,1%)
Não	70 (95,9%)
Chlamydia trachomatis	
Sim	8 (11%)
Não	65 (89,0%)
Diagnóstico microcópico (Nugent)	
Normal (escore 0 a 3)	31 (42,4%)
Intermediária (escore 4 a 6)	5 (6,8%)
Vaginose bacteriana (escore >6)	37 (50,8%)
Positivo para *G. vaginalis*	
Sim	57 (78,1%)
Não	16 (21,9%)

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo visou caracterizar e descrever a população de mulheres acometidas pela persistência do HPV de alto risco oncogênico. Os conhecimentos acerca das características sociodemográficas e clínicas dessas pacientes são de grande importância para direcionar novas políticas públicas de cuidado e atenção, assim como servir como estratégia para intervenções mais eficientes para minimizar os impactos no sistema de saúde, bem como promover melhor qualidade de vida para as pacientes.

Acerca das variáveis comportamentais, apesar da maiorias das mulheres do estudo relatarem ter apenas um parceiro sexual no ano, a maioria não fazia uso de preservativo nas relações sexuais, dessa forma, a persistência do HPV nessas mulheres pode ser explicada pelo fato de que os preservativos representam uma barreira na transmissão do vírus, sendo que o

não uso contínuo nas relações sexuais pode levar a uma contínua exposição ao HPV (20). Além disso, o hábito tabagista também esteve presente na maioria da população do estudo. Trabalhos apontam que o hábito de fumar pode ter efeito carcinogênico local e comprometer o sistema imunológico da paciente, facilitando a persistência do vírus e até mesmo afetar negativamente a progressão do patogênese viral para uma neoplasia cervical (21, 22).

Já com relação as características clínicas, a maioria das pacientes foram negativas para outras ISTs pesquisadas no estudo (*Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*), o que difere de outros trabalhos que demonstram que a presença de outras ISTs, principalmente a *C. trachomatis*, está associada à persistência do HPV (23, 24). Esse achado pode estar associado com o baixo número de parceiros sexuais, o que reduz a chance de aquisição de outras ISTs. Já com relação ao diagnóstico da microbiota vaginal, a maioria das mulheres apresentou a condição de vaginose bacteriana (VB), uma disbiose caracterizada pela redução ou ausência de *Lactobacillus* spp. juntamente com o aumento da abundância de espécies bacterianas anaeróbias facultativas gram variáveis (25). Estudos apontam que a presença de VB diminui as chances de *clearance* do HPV de alto risco e que, portanto, tratar essa disbiose de grande importância para aumentar as chances de eliminação do vírus (26). Uma das principais espécies bacterianas presentes na VB, predominantemente presente no estudo, é a *Gardnerella vaginalis*. (27), que possui vários fatores de virulência. Por exemplo, a sialidase, que provoca a degradação da barreira de células epiteliais vaginal, causando esfoliação e descamação do epitélio (28), além de comprometem a barreira imunológica ao hidrolisar a imunoglobulina A, facilitando assim, a aquisição de ISTs (29).

Portanto, estudos que caracterizam a população de mulheres acometidas pela persistência de HPVs de alto risco oncogênico são de grande relevância para futuras estratégias de intervenção e para o correto manejo e orientação das pacientes, visam entregar melhorias na qualidade de vida das mulheres e o *clearance* viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021/maio/cerca-de-1-milhao-de-pessoas-contrairam-infeccoes-sexualmente-transmissiveis-no-brasil-em-2019
2. Pathak P, Pajai S, Kesharwani H. A Review on the Use of the HPV Vaccine in the Prevention of Cervical Cancer. Cureus. 2022 Sep 2;14(9):e28710. doi: 10.7759/cureus.28710. PMID: 36211088; PMCID: PMC9529156.
3. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol. 2005 Mar;32 Suppl 1:S1-6. doi: 10.1016/j.jcv.2004.10.021.
4. Carvalho NS, Silva RJCD, Val ICD, Bazzo ML, Silveira MFD. Brazilian Protocol for Sexually Transmitted Infections 2020: human papillomavirus (HPV) infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2021 May 17;54(suppl 1):e2020790. doi: 10.1590/0037-8682-790-2020.
5. Zhou Y, Shi X, Liu J, Zhang L. Correlation between human papillomavirus viral load and cervical lesions classification: A review of current research. Front Med (Lausanne). 2023 Feb 21;10:1111269. doi: 10.3389/fmed.2023.1111269.
6. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. Int J Gynaecol Obstet. 2021 Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):28-44. doi: 10.1002/ijgo.13865.
7. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Agrifoglio O, Scalisi A, Agodi A. The Association of Dietary Patterns with High-Risk Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: A Cross-Sectional Study in Italy. Nutrients. 2018 Apr 11;10(4):469. doi: 10.3390/nu10040469. PMID: 29641467; PMCID: PMC5946254.
8. Fischer S, Kuebler U, Abbruzzese E, Breymann C, Mernone L, Ehlert U. Endogenous oestradiol and progesterone as predictors of oncogenic human papillomavirus (HPV) persistence. BMC Cancer. 2022 Feb 5;22(1):145. doi: 10.1186/s12885-022-09247-3. PMID: 35123443; PMCID: PMC8818138.
9. Ntuli L, Mtshali A, Mzobe G, Liebenberg LJ, Ngcapu S. Role of Immunity and Vaginal Microbiome in Clearance and Persistence of Human Papillomavirus Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jul 7;12:927131. doi: 10.3389/fcimb.2022.927131. PMID: 35873158; PMCID: PMC9301195.
10. Shi W, Zhu H, Yuan L, Chen X, Huang X, Wang K, Li Z. Vaginal microbiota and HPV clearance: A longitudinal study. Front Oncol. 2022 Oct 24;12:955150. doi: 10.3389/fonc.2022.955150.
11. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. BMC Infect Dis. 2011 Jan 11;11:10. doi: 10.1186/1471-2334-11-10.

12. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, Shah KV, Sobel JD. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. Infect Dis Obstet Gynecol. 2011;2011:319460. doi: 10.1155/2011/319460. Epub 2011 Aug 16.

13. Elnaggar JH, Lammons JW, Taylor CM, Toh E, Ardizzone CM, Dong A, Aaron KJ, Luo M, Tamhane A, Lefkowitz EJ, Quayle AJ, Nelson DE, Muzny CA. Characterization of Vaginal Microbial Community Dynamics in the Pathogenesis of Incident Bacterial Vaginosis, a Pilot Study. Sex Transm Dis. 2023 Apr 17. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001821.

14. Castro J, Jefferson KK, Cerca N. Genetic Heterogeneity and Taxonomic Diversity among Gardnerella Species. Trends Microbiol. 2020 Mar;28(3):202-211. doi: 10.1016/j.tim.2019.10.002. Epub 2019 Nov 4.

15. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, Pleckaityte M. Prevalence and distribution of Gardnerella vaginalis subgroups in women with and without bacterial vaginosis. BMC Infect Dis. 2017 Jun 5;17(1):394. doi: 10.1186/s12879-017-2501-y.

16. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 1991 Feb;29(2):297-301. doi: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991.

17. Dong M, Wang C, Li H, Yan Y, Ma X, Li H, Li X, Wang H, Zhang Y, Qi W, Meng K, Tian W, Wang Y, Fan A, Han C, Donders GGG, Xue F. Aerobic Vaginitis Diagnosis Criteria Combining Gram Stain with Clinical Features: An Establishment and Prospective Validation Study. Diagnostics (Basel). 2022 Jan 13;12(1):185. doi: 10.3390/diagnostics12010185.

18. Cibley LJ, Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. Am J Obstet Gynecol. 1991 Oct;165(4 Pt 2):1245-9. doi: 10.1016/s0002-9378(12)90736-x.

19. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. Sex Transm Infect. 2002 Dec;78(6):413-5. doi: 10.1136/sti.78.6.413.

20. Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, Westenend PJ, Meijer CJ. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. Int J Cancer. 2003 Dec 10;107(5):811-6. doi: 10.1002/ijc.11474.

21. World Health Organization. Tackling NCDs: 'best buys' and other recommended interventions for the prevention and control of non-communicable diseases. World Health Organization; 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. https://apps.who.int/iris/handle/10665/259232.

22. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. ISRN Obstet Gynecol. 2011;2011:847684. doi: 10.5402/2011/847684. Epub 2011 Jul 14.

23. Ghasemian E, Harding-Esch E, Mabey D, Holland MJ. When Bacteria and Viruses Collide: A Tale of Chlamydia trachomatis and Sexually Transmitted Viruses. Viruses. 2023 Sep 19;15(9):1954. doi: 10.3390/v15091954.

24. Bhatla N, Puri K, Joseph E, Kriplani A, Iyer VK, Sreenivas V. Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - a pilot study. Indian J Med Res. 2013 Mar;137(3):533-9.

25. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. Clin Microbiol Rev. 2016 Apr;29(2):223-38. doi: 10.1128/CMR.00075-15.

26. Guo YL, You K, Qiao J, Zhao YM, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. Int J STD AIDS. 2012 Aug;23(8):581-4. doi: 10.1258/ijsa.2012.011342.

27. Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. J Infect Dis. 2014 Aug 1;210(3):338-43. doi: 10.1093/infdis/jiu089. Epub 2014 Feb 7.

28. Castro J, Jefferson KK, Cerca N. Genetic Heterogeneity and Taxonomic Diversity among Gardnerella Species. Trends Microbiol. 2020 Mar;28(3):202-211. doi: 10.1016/j.tim.2019.10.002. Epub 2019 Nov 4.

29. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, Bick JL, Peipert JF, Allsworth JE, Lewis AL. Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. J Biol Chem. 2012 Jan 13;287(3):2079-89. doi: 10.1074/jbc.M111.278135. Epub 2011 Dec 1.