

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/02/2022.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Rafael Belleti

**Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante
da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação
com a taxa de *clearance* do Papilomavírus Humano
em mulheres imunocompetentes.**

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

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

**Botucatu
2020**

Rafael Belleti

Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação com a taxa de *clearance* do Papilomavírus Humano em mulheres imunocompetentes.

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

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

Botucatu
2020

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Belleti, Rafael.

Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação com a taxa de clearance do papilomavírus humano em mulheres imunocompetentes / Rafael Belleti. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Camila Marconi
Coorientador: Márcia Guimarães da Silva
Coorientador: Larissa Doddi Marcolino
Capes: 40103005

1. Papillomaviridae. 2. Neuraminidase. 3. *Gardnerella vaginalis*. 4. Estudos de coortes.

Palavras-chave: Clearance; *Gardnerella vaginalis*; HPV; Sialidase.

Dedico este trabalho a minha mãe e meu pai, Danistela e Júlio, por todo o amor incondicional, pelo apoio nas minhas escolhas e por serem os maiores orgulhos e exemplos da minha vida.

Dedico a meu irmão Bruno, pela pessoa maravilhosa que é, com quem eu cresci, amadureci e aprendi a partilhar.

Dedico a minha vó Yara, por sempre estar presente em toda minha vida. E também aos meus avós, Irene e Júlio, que embora não os tenha conhecido, sei que estariam felizes nesse momento.

Agradeço a Deus, por mais essa oportunidade e conquista na minha vida.

A minha orientadora Camila, que me acolheu desde o primeiro momento, e mesmo estando distante, sempre se manteve presente, seja pelo Skype ou pelos (muitos) áudios e e-mails.

A minha coorientadora Márcia, pela oportunidade e que me recebeu no laboratório de portas abertas, desde o primeiro pedido de estágio, e que eu tenho como exemplo de professora.

A minha coorientadora Larissa (Mams), que foi um anjo e uma mãe pra mim desde o primeiro dia, e se tornou em um dos maiores presentes que eu tive nesse período: uma grande amiga.

Ao meu alicerce desde meu primeiro dia em Botucatu, Júlia (Seri), Bárbara (Mafa) e Alessandra (Piga), por ter vocês em minha vida, desde o primeiro dia na Rep Our, e por toda a amizade durante todos esses anos.

A meu namorado Wagner, por todo o companheirismo, paciência, atenção, alegrias e lanches no “Punk” nesses últimos anos.

Aos amigos que estreitei laços graças ao laboratório, Giovana (Tucu), Júlia (Xorona), Mariana (Murta) e Jeniffer (Guenta), obrigado pela companhia, por todas as risadas no dia-dia e por todos os “bar do will”.

A todos os demais colegas do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-fetal, pela convivência e ensinamentos durante esse período.

Aos meus amigos da faculdade, especialmente Daniel (Coisinha) e Everson (Rolezero), por toda a amizade e convívio na melhor casa que tive em Botucatu.

Aos meus amigos de Mirassol, Bárbara e Bruno, que mesmo depois de tantos anos após o fim do ensino médio, a amizade ainda prevalece.

A todos da minha Família que me apoiaram e a Francisca, que cuidou de mim por toda a vida.

A todos os meus professores do ensino básico, que contribuíram para minha formação como profissional e como pessoa, especialmente aqueles que me marcaram e alguma forma: Niete, Ana Amélia, Zezé, Elza, Márcia, Sandra, Rita, Marcela, Angélica, Marcelo e Paulo. Muito obrigado.

Aos professores Fábian Zalazar, Fabián Tedeschi e a Universidad Nacional del Litoral, que tornaram meu curto intercâmbio na Argentina uma experiência incrível, por me receberem e acolherem muito bem. Assim como os amigos que fiz lá, graças

ao Pokémon, que se tornaram pessoas especiais pra mim.

À UNIPEX e ao laboratório VIDAVET, pela estrutura que permitiu a realização desse trabalho.

À secretária da pós-graduação, Vânia Soler, por todo amparo frente a toda a burocracia nesse tempo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa concedida que ajudou a me manter nesse período.

Sumário

1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	3
3. Revisão da Literatura.....	6
4. Referências Bibliográficas.....	13
5. Artigo Científico.....	20
6. Anexos.....	42

1. Resumo

A infecção cervical pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns nas mulheres sexualmente ativas. Os cerca de 40 genótipos de HPV genitais podem ser classificados em HPVs de baixo risco (lrHPV) e alto risco oncogênico (hrHPV). Os genótipos de hrHPV, principalmente os HPV16 e HPV18, quando persistentes, podem levar ao desenvolvimento do câncer de colo do útero e consequentemente à não eliminação viral (*clearance*). Outros fatores, além do genótipo viral, podem interferir para o *clearance* como, por exemplo, a presença de vaginose bacteriana, a principal alteração da microbiota vaginal em mulheres em idade reprodutiva. Dentre as espécies bacterianas relacionadas a vaginose, a *Gardnerella vaginalis* está presente em quase a totalidade dos casos. A *G. vaginalis* é responsável pela produção da enzima sialidase, um de seus fatores de virulência e está ligada a formação do biofilme, onde estudos recentes sugerem que seu gene codificador (GVSI) esteja associado a persistência do HPV. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar as cargas de *G. vaginalis* e a frequência do GVSI em amostras cérvico-vaginais de mulheres com HPV16 e/ou HPV18 persistente(s), com aquelas que fizeram o *clearance* no período de 11 meses após a infecção. De uma coorte de um estudo prévio, foram identificadas 462 mulheres HPV-positivas, das quais foram selecionadas 104 (22,5%) participantes que foram positivas para os genótipos HPV16 e/ou HPV18 no momento da inclusão. As amostras cérvico-vaginais foram obtidas no momento de inclusão e após o *follow-up*. A partir do resultado do HPV nos dois momentos, as participantes foram alocadas em dois grupos de estudo: “persistência” ou “*clearance*” do HPV. Foram utilizados lavados cérvico-vaginais para determinar a quantificação do gene 23s rRNA de *G. vaginalis* e a detecção de GVSI por PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Das 104 participantes, 31 (29,8%) eliminaram a infecção por HPV16, HPV18 e outros hrHPVs previamente detectados após 11 meses, enquanto 73 (70,2%) persistiram com pelo menos um dos dois genótipos. Observou-se que a carga de *G. vaginalis* cervico-vaginal no momento da inclusão foi maior no grupo persistência [9.4E+02 (0-3.0E+05) cópias/uL] quando comparada ao grupo *clearance* [4.4E+01 (0-7.7E+04) cópias/uL]

($p=0,03$). Não foi encontrada associação entre a positividade de GVSI no momento da inclusão com o desfecho da infecção por HPV16/HPV18 ($p=0,09$). Portanto, os achados em relação às cargas de *G. vaginalis* reforçam o efeito negativo da alteração da microbiota vaginal na eliminação da infecção cervical por HPV de alto risco, entretanto, a positividade para o gene codificante (GVSI) não parece estar associada à persistência do HPV16/HPV18 cervical.

Palavras-chave: HPV; *Gardnerella vaginalis*; sialidase; *clearance*.

2. Abstract

Cervical infection by human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infections (STIs) in sexually active women. The approximately 40 genital HPV genotypes can be classified into low-risk HPVs (lrHPV) and high oncogenic risk (hrHPV). The hrHPV genotypes, especially HPV16 and HPV18, when persistent, can lead to the development of cervical cancer and consequently no viral elimination (clearance). Other factors, in addition to the viral genotype, may interfere with clearance, such as, for example, the presence of bacterial vaginosis, the main change in the vaginal microbiota in women of reproductive age. Among bacterial species related to vaginosis, *Gardnerella vaginalis* is present in almost all cases. *G. vaginalis* is responsible for the production of the sialidase, one of its virulence factors and is associated to the formation of the biofilm, and recent studies have shown that its encoding gene (GVSI) could be associated with the persistence of HPV. Therefore, the aim of the study was to compare cervicovaginal loads of *G. vaginalis* and the prevalence of GVSI in women with persistent HPV16 and/or HPV18 infection with those who cleared the infection after 11 months. Of a previous study cohort of 462 HPV-positive women, we enrolled 104 (22.5%) participants who had positive baseline tests for HPV16 and/or HPV18. Upon cohort enrollment, participants answered a questionnaire for assessment of sociodemographic, behavioral and clinical data. Cervicovaginal samples were obtained at baseline and at the follow-up visit. Cervical samples were tested in the two time points for HPV genotyping. Based on the HPV status at follow up, we allocated the participants in the two study groups: HPV "persistence" or "clearance". It was used cervicovaginal fluids to determine the loads of *G. vaginalis* 23s rRNA gene and the detection of GVSI by quantitative real-time PCR (qPCR). Of the 104 participants, 31 (29.8%) cleared HPV16, HPV18 and hrHPVs infection previously detected after 11 months, while 73 (70.2%) persisted with at least one of the two genotypes. Higher baseline loads of *G. vaginalis* were observed in persistence group [$9.4\text{E}+02$ ($0\text{--}3.0\text{E}+05$) copies/uL] when compared to participants who cleared the infection [$4.4\text{E}+01$ ($0\text{--}7.7\text{E}+04$) copies/uL] ($p=0.03$). No association was found between baseline GVSI-positivity with HPV16/HPV18 infection outcome ($p=0.09$). Then, the present data reinforce the negative effect of the altered vaginal microbiota in the clearance of high-risk HPV cervical

infection through the assessment of *G. vaginalis* loads. Positivity for sialidase-encoding *G. vaginalis* does not seem to be associated with persistence of cervical HPV16/HPV18.

Key words: HPV; *Gardnerella vaginalis*; Sialidase; clearance.

Revisão de Literatura

3. Revisão de Literatura

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae*, caracterizado por ser não envelopado, constituído por um capsídeo de simetria icosaédrica, que engloba uma molécula de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8000 bp(1). O genoma do HPV é dividido em três regiões. A primeira delas é uma região regulatória (LCR, *long control region*) que contém a origem de replicação do DNA e, portanto, responsável pelo início do ciclo viral. A próxima região é a precoce que codifica 6 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que possuem ação enzimática ou reguladora no ciclo viral. Dentre essas, merecem destaque as proteínas E6 e E7, que inativam, respectivamente, os supressores tumorais p53 e pRB da célula infectada, estando envolvidas diretamente na imortalização dessas células e, portanto, no desenvolvimento de neoplasias(2–4). Finalmente, os genes da região tardia (*late*) que codificam as duas proteínas que compõe o capsídeo viral, a L1 e L2, altamente imunogênicas, utilizadas na produção de vacinas profiláticas(4). O HPV é um vírus epiteliotrópico, ou seja, sua infecção ocorre pela camada basal do epitélio a partir de micro lesões, e após migrar para as camadas intermediárias do epitélio, se replica, podendo levar ao aparecimento de lesões proliferativas(5).

Atualmente, são descritos mais de 100 genótipos de HPV que infectam o homem, dentre os quais 40 tem afinidade para o epitélio da região anogenital, onde alguns tipos estão envolvidos na etiologia de lesões neoplásicas(1). Dessa forma, a classificação dos HPV genitais é feita de acordo com seu potencial oncogênico, divididos em genótipos de baixo (lrHPV) ou intermediário risco e alto risco (hrHPV) oncogênico, sendo este responsável por 5% de todos os cânceres diagnosticados anualmente no mundo(6–9). Em relação aos lrHPV, destacam-se os HPV6 e HPV11, associados ao desenvolvimento de verrugas

genitais. Já os HPV16 e HPV18 são associados ao maior período de persistência da infecção levando ao desenvolvimento das lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo do útero, sendo responsáveis por 70% dos casos de carcinomas epidermóides e mais de 80% dos adenocarcinomas do colo do útero(10–13).

As infecções por HPV genitais são, em geral, de caráter transitório, visto que a maioria das infecções é eliminada (*clearance*) pelo sistema imunológico do hospedeiro num período de 1 a 2 anos(14), entretanto, algumas infecções permanecem, pela presença da infecção por hrHPV(8). A literatura é consistente ao demonstrar que o HPV16 apresenta os períodos de infecção mais longos, mesmo quando comparado aos demais HPV de alto risco oncogênico(15). Um estudo na Holanda com mulheres entre 16 e 29 anos mostrou uma persistência de 58,1% pelo HPV16 e 39,6% pelo HPV18 após um período de 12 meses(16). Além disso, também foi apontado que a presença de múltiplos genótipos de HPV atrasa o tempo de *clearance*(17).

Contudo, além do genótipo viral, o tempo de *clearance* do HPV pode ser influenciado por outros fatores como: dietas pobres em nutrientes, uso de absorventes internos, contraceptivos de progesterona, presença de outro vírus como o da imunodeficiência humana (HIV)(18,19) e presença de coinfeções, relacionadas ao ambiente vaginal, como as endocervicites causadas pela *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*. A literatura mostra que a infecção cervical pela *Chlamydia trachomatis* é co-fator para o desenvolvimento de lesões HPV-induzidas(20). Um estudo recente analisou a presença de HPV e a citologia oncológica com a coinfeção por *C. trachomatis*, no qual foi encontrada uma carga maior de DNA desta bactéria associada a presença do HPV, e, quando considerada a citologia juntamente às mulheres com *C.*

trachomatis e HPV, elas possuíam um risco muito maior de ter um citologia alterada(21). Além do mais, apesar de estudos mais escassos, já foi apontado que mulheres com *T. vaginalis* possuem maior risco na aquisição de HPV de alto risco(22).

Ainda nesse contexto, vale destacar a principal alteração do ambiente vaginal, a vaginose bacteriana, que é caracterizada como a principal disbiose da microbiota vaginal, onde a microbiota predominantemente lactobacilar Gram positiva é substituída por uma microbiota cocobacilar Gram positiva e Gram negativa(23). O padrão ouro para seu diagnóstico é o descrito por Nugent(24), baseado na avaliação morfológica de esfregaços vaginais corados pelo método de Gram e classificadas de acordo com um escore, sendo de 0-3, microbiota normal, 4-6, microbiota intermediária e 7-10, vaginose bacteriana. A partir disso, alguns estudos foram realizados para determinar o papel dessa microbiota no contexto das infecções pelo HPV(25,26), onde foi demonstrado que a presença da vaginose bacteriana está associada tanto à prevalência da infecção pelo vírus, como também a uma diminuição significativa na taxa de *clearance* viral(27,28). Porém, esses estudos foram baseados nesses métodos microscópicos, que, embora amplamente utilizados, não permitem avaliar e determinar de forma precisa a real composição bacteriana deste ambiente.

Para estabelecer a composição bacteriana presente em um ambiente, a evolução dos métodos moleculares, como as técnicas de sequenciamento de nova geração, contribuiu pela determinação do microbioma local. Nesse sentido, Ravel et al.(29), em 2011, caracterizaram pela primeira vez o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva. Tais autores verificaram que, apesar da grande diversidade microbiana presente nesse ambiente, o microbioma vaginal de todas as mulheres podem ser

agrupadas em 5 tipos de comunidades bacterianas vaginais (*community-state type*, CST), conforme predominância de determinadas espécies. Do total, 4 são caracterizadas pelo predomínio de *Lactobacillus* sp: CST-I (*Lactobacillus crispatus*), CST-II (*L. gasseri*), CST-III (*L. iners*) e CST-V (*L. jensenii*). Na comunidade bacteriana vaginal remanescente, a CST-IV, a predominância de espécies de lactobacilos é substituída por uma maior diversidade de espécies bacterianas, onde se encontra a maioria dos casos de vaginose bacteriana e na qual estudos mostram que a prevalência é maior dentre as mulheres com HPV persistente(30).

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(31), sendo o primeiro microrganismo associado à vaginose bacteriana(32). Para sua classificação, Santiago et al.(35), a partir de métodos de análise de restrição de DNA ribossomal (ARDRA), detectou a presença de três genótipos de *G. vaginalis* diferentes. Posteriormente, Ahmed et al.(33) realizou uma nova classificação, pelo pirossequenciamento, onde foram identificados 4 subgrupos (1 a 4). Em 2016, mais um achado, usando sequenciamento de Sanger do gene CPN60, confirmou a existência dos 4 subgrupos, classificados como A, B, C e D, equivalente aos grupos 4, 2, 1 e 3, respectivamente(33,34). Por fim, ainda mais recente, um outro estudo partir da hibridização de DNA-DNA (dDDH) e da identidade média de nucleotídeos (ANI), identificou, a partir de 10 linhagens de *G. vaginalis*, 3 novas espécies genômicas de *Gardnerella* sp., que com base na classificação de Ahmed et al.(33), o grupo 4 contém 2 espécies descritas como *G. leopoldii* e *G. swidsinskii*, o grupo 2 contém 3 espécies, descritas como *G. piovii* e o grupo 1 possui duas espécies, descrita como *G. vaginalis*(38).

A participação de *G. vaginalis* no desfecho do HPV não está muito bem consolidada(32). Dois estudos brasileiros demonstraram achados não congruentes, ambos realizados por reação em cadeia polimerase (PCR), sendo um realizado na Bahia, de 2017, que mostrou a associação da presença dessa bactéria no ambiente vaginal com a presença de lesões cervicais, enquanto outro mais recente, realizado no Paraná, mostrou que somente a bactéria *G. vaginalis* não estaria associada as lesões precursoras do câncer do colo de útero(36,37).

Dessa forma, para entender o papel da *G. vaginalis* nesse cenário, vale destacar um de seus fatores de virulência, que é a capacidade de algumas de suas linhagens de produzir e liberar a enzima sialidase, com características patogênicas ao ambiente vaginal(38), que tem como função hidrolisar o ácido siálico das células epiteliais do hospedeiro, expondo sítios de ligação que facilitam a adesão de *G. vaginalis* ao epitélio(39–42).

O modelo aceito atualmente de vaginose bacteriana mostra que esta adesão inicia a formação do biofilme, tendo suas camadas mais internas formadas pela interação com a *Prevotella bivia*, também produtora de sialidase(23). A presença de biofilmes associados à vaginose bacteriana propicia uma proteção dos microrganismos que os compõe da ação do peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas secretadas em condições normais pelos *Lactobacillus* sp.. Além do papel importante na consolidação dos biofilmes vaginais, as moléculas de ácido siálico, liberadas pela ação das sialidases, podem ser utilizadas no metabolismo energético da bactéria(43), ou ainda podem recobrir a superfície bacteriana, dificultando a fagocitose(41,44). Além disso, estudos já demonstraram que as sialidases possuem capacidades imunomoduladoras, sendo

capazes de diminuir a viscosidade do conteúdo cérvico-vaginal e exercer ação hidrolítica nas imunoglobulinas A presentes na secreção cervical(39,45).

Portanto, as bactérias *G. vaginalis* sialidases-produtoras possuem um papel importante pela capacidade de modular a resposta imunológica local. Um estudo avaliou a atividade de sialidase em mulheres com lesões cervicais, comparadas a mulheres saudáveis, e nele foi mostrado que a atividade de sialidase era maior na infecção bacteriana quando comparada a infecção fúngica e ao controle negativo, e também havia uma atividade maior nas mulheres com carcinoma intraepitelial cervical, quando comparada a mulheres com outras neoplasias(46). Contudo, esse estudo não avaliou as espécies bacterianas e os genótipos de HPV envolvidos, o que sugere a necessidade de mais investigações acerca do envolvimento desses agentes nessa patogênese.

Os resultados publicados por Di Paola et al.(30), em agosto de 2017, mostraram que mulheres com infecção persistente por HPV de alto risco, no período de um ano, apresentaram uma maior carga do gene codificante da sialidase de *G. vaginalis* e uma maior frequência da CST-IV, mesmo em um número amostral limitado. Em contraste, outro achado que analisou o microbioma, mostrou que os altos níveis de *G. vaginalis* estavam associados ao grupo que fez o *clearance* do HPV no período de 2 anos, em relação ao grupo que persistiu e ao controle negativo(47).

Por isso, considerando a importância dos achados recentes, é fundamental que se estabeleça a relação da *G. vaginalis*, assim como sua capacidade como produtora de sialidase, para as taxas de *clearance* do HPV cérvico-vaginal. Para isso, a quantificação de *G. vaginalis* e a detecção de sialidase, bem como a 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.

4. Referências

1. Hausen H zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 1996;1288(2):F55–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304419X96000200>
2. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002;89(2):213–28.
3. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129–36.
4. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* [Internet]. 1989;8(13):4099–105. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=401588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13.
6. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118(12):3030–44.
7. Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol*. 2009;8(7):1–5.
8. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2002;55(4):244–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1769629>

-
9. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(9):1654–63.
 10. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):3–13.
 11. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621–32.
 12. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518–27.
 13. Bogani G, Taverna F, Lombardo C, Borghi C, Martinelli F, Signorelli M, et al. Retrospective study of the influence of HPV persistence on outcomes among women with high-risk HPV infections and negative cytology. *Int J Gynecol Obstet*. 2017;138(1):62–8.
 14. Ginindza TG, Dlamini X, Almonte M, Herrero R, Jolly PE, Tsoka-Gwegweni JM, et al. Prevalence of and associated risk factors for high risk human papillomavirus among sexually active women, Swaziland. *PLoS One*. 2017;12(1):1–18.
 15. Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP, Kelsall G, Du Berger R, Ferenczy A, et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(5):1149–56.
 16. van der Weele P, van Logchem E, Wolffs P, van den Broek I, Feltkamp M, de Melker H, et al. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *J Clin Virol* [Internet]. 2016;83:6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.020>
 17. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, et al.

-
- Long-term persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *J Infect Dis.* 2011;203(6):814–22.
18. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: A population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158(5):486–94.
 19. Adler D, Wallace M, Bennie T, Abar B, Sadeghi R, Meiring T, et al. High Risk Human Papillomavirus Persistence Among HIV-infected Young Women in South Africa. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2015;33:219–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.02.009>
 20. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines . *J Infect Dis.* 2002;185(3):324–31.
 21. Ji Y, Ma XX, Li Z, Peppelenbosch MP, Ma Z, Pan Q. The Burden of Human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* Coinfection in Women: A Large Cohort Study in Inner Mongolia, China. *J Infect Dis.* 2019;219(2):206–14.
 22. Menon S, Broeck D Vanden, Rossi R, Ogbe E, Harmon S, Mabeya H. Associations Between Vaginal Infections and Potential High-risk and High-risk Human Papillomavirus Genotypes in Female Sex Workers in Western Kenya. *Clin Ther* [Internet]. 2016;38(12):2567–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.10.005>
 23. Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, Tamhane A, Chattopadhyay D, Cerca N, et al. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis.* 2019;220(9):1399–405.
 24. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is

-
- improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297–301.
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(3):213–20.
 26. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNairn D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997;350(9077):546–50.
 27. Gillet E, Meys JFA, 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 [Internet].* 2011;11(1):10. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/10>
 28. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011;2011.
 29. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(SUPPL. 1):4680–7.
 30. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, et al. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>
 31. Marconi C, Donders GG, Parada CMGL, Giraldo PC, Da Silva MG. Do *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? *Sex Transm Infect.* 2013;89(2):167–73.

-
32. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1955;69(5):962–76.
 33. Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Chernes TL, et al. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. *J Bacteriol.* 2012;194(15):3922–37.
 34. Schellenberg JJ, Jayaprakash TP, Gamage NW, Patterson MH, Vaneechoutte M, Hill JE. *Gardnerella vaginalis* subgroups defined by *cpn60* sequencing and sialidase activity in isolates from Canada, Belgium and Kenya. *PLoS One.* 2016;11(1):1–12.
 35. Vaneechoutte M, Guschin A, Van Simaey L, Gansemans Y, Van Nieuwerburgh F, Cools P. Emended description of *Gardnerella vaginalis* and description of *gardnerella leopoldii* sp. Nov., *gardnerella piovii* sp. nov. and *Gardnerella swidsinskii* sp. nov., with delineation of 13 genomic species within the genus *Gardnerella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(3):679–87.
 36. Amorim AT, Marques LM, Campos GB, Lobão TN, de Souza Lino V, Cintra RC, et al. Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–12.
 37. Suehiro TT, Malaguti N, Damke E, Uchimura NS, Gimenes F, Souza RP, et al. Association of human papillomavirus and bacterial vaginosis with increased risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2019;29(2):242–9.
 38. Hardy L, Jespers V, Van Bulck M Den, Buyze J, Mwambarangwe L, Musengamana V, et al. The presence of the putative *Gardnerella vaginalis* sialidase A gene in vaginal specimens is associated with bacterial vaginosis biofilm. *PLoS One.* 2017;12(2):1–11.
 39. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, Bick JL, Peipert JF, Allsworth JE, et al. Hydrolysis

-
- of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin a (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J Biol Chem*. 2012;287(3):2079–89.
40. Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J*. 2009;26(3):231–45.
 41. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1253(1):16–36.
 42. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*. 2005;106(5):1013–23.
 43. Severi E, Hood DW, Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*. 2007;153(9):2817–22.
 44. Harvey HA, Swords WE, Apicella MA. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun*. 2001;16(3):257–62.
 45. Lewis WG, Robinson LS, Gilbert NM, Perry JC, Lewis AL. Degradation, foraging, and depletion of mucus sialoglycans by the vagina-adapted actinobacterium *Gardnerella vaginalis*. *J Biol Chem*. 2013;288(17):12067–79.
 46. Dasari S, Rajendra W, Valluru L. Evaluation of microbial enzymes in normal and abnormal cervicovaginal fluids of cervical dysplasia: A case control study. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 47. Arokiyaraj S, Seo SS, Kwon M, Lee JK, Kim MK. Association of cervical microbial community with persistence, clearance and negativity of Human Papillomavirus in Korean women: a longitudinal study. *Sci Rep [Internet]*. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33750-y>