

Hoë voorkomskoeers van bakteriële vaginose en Chlamydia in 'n lae-inkomste, hoë-bevolkingsdigtheid gemeenskap in Kaapstad



Authors:

Katie S. Lennard^{1,2,3} 
 Smritee Dabee^{1,4} 
 Shaun L. Barnabas^{1,4} 
 Enock Havyarimana^{1,4}
 Shameem Z. Jaumdally^{1,4} 
 Gerrit Botha^{1,2,3}
 Nonhlanhla N. Mkhize⁵
 Linda-Gail Bekker^{1,6} 
 Glenda Gray^{7,8} 
 Nicola Mulder^{1,2,3} 
 Jo-Ann Passmore^{1,4,5} 
 Heather B. Jaspán^{1,4,9} 

Affiliations:

¹Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, South Africa

²Computational Biology Division, University of Cape Town, South Africa

³Department of Integrative Biomedical Sciences, University of Cape Town, South Africa

⁴Department of Pathology, University of Cape Town, South Africa

⁵National Health Laboratory Service, South Africa

⁶Desmond Tutu HIV Centre, University of Cape Town, South Africa

⁷Perinatal HIV Research Unit, University of the Witwatersrand, South Africa

⁸South African Medical Research Council, South Africa

⁹Seattle Children's Research Institute, Department of Pediatrics and Global Health, University of Washington, United States

Read online:



Scan this QR code with your smart phone or mobile device to read online.

Jong Suid-Afrikaanse vroue uit hulpbron-arm gemeenskappe staar verskeie uitdagings in die gesig in terme van hulle seksuele en reprodktiewe gesondheid. Hier beskryf ons die voorkoms van vaginale mikrobiota en seksueel oordraagbare infeksies (SOI's) onder 102; 16–22-jarige MIV-negatiewe Suid-Afrikaanse vroue uit 'n lae-inkomste, hoë-bevolkingsdigtheid gemeenskap in Kaapstad. Vaginale mikrobiota is met behulp van 16S rRNA amplicon volgorde-bepaling geprofileer; bakteriële vaginose (BV) status is met behulp van 'n Nugent-telling vasgestel; en SOI's is deur middel van 'n multipleks polimerase kettingreaksie bepaal. SOI's was algemeen, met 55% van die vroue wat ten minste een SOI gehad het; 41% wat met hoë-risiko menslike papillomavirus (MPV) besmet was, en 'n verdere 28% wat met laerisiko-MPV besmet was; 44% van die vroue was met Chlamydia besmet waarvan 16% een of meer addisionele SOI gehad het. BV persentasies was ook baie hoog met 55% van die vroue wat as BV-positief (Nugent-telling ≥ 7) geklassifiseer is, 7% as BV-intermediêr (Nugent-telling 3–6), en 38% as BV-negatief (Nugent-telling 0–2). Streptococcus (Streptococcus agalactiae), die grootste oorsaak van neonatale sepsis, was teenwoordig in 25% van die BV-positiewe vroue en 28% van die BV-negatiewe vroue, en was dus meer onder BV-negatiewe vroue. Chlamydia-infeksie sowel as BV kan reprodktiewe gesondheid nadelig beïnvloed en verhoog hierdie vroue se risiko vir die verkryging van MIV. Die voorkoms van veral Prevoetella amnii kan die MIV-risiko verhoog as gevolg van sy inflammatoriese kapasiteit. Laboratorium-gebaseerde toetsing vir SOI's (veral Chlamydia en Gonorrhoeae) blyk in hierdie gemeenskap geregverdig te wees, tesame met verdere monitering en/of behandeling van BV.

Navorsing korrelasie: Hierdie artikel is die vertaalde weergawe en is beskikbaar gestel om 'n breër lesersgroep te bereik. Die oorspronklike Engelse artikel is beskikbaar hier: <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1484>

High rates of bacterial vaginosis and Chlamydia in a low-income, high-population-density community in Cape Town. Young South African women, from resource-poor communities, face several sexual and reproductive health challenges. Here we describe the vaginal microbiota and sexually transmitted infection (STI) prevalence of 102; 16–22-year-old, HIV-negative South African women from a low-income, high-population-density community in Cape Town (CPT). Vaginal microbiota were profiled using 16S rRNA amplicon sequencing; bacterial vaginosis (BV) status was established using Nugent scoring; and STIs were determined by multiplex polymerase chain reaction. STIs were common, with 55% of women having at least one STI; 41% were infected with high-risk human papilloma virus (HPV) and a further 28% with low-risk HPV; 44% were infected with Chlamydia, 16% of whom had at least one additional STI. Similarly, BV rates were very high, with 55% of women classified as BV-positive (Nugent score ≥ 7); 7% as BV-intermediate (Nugent score 3–6) and 38% as BV-negative (Nugent 0–2). Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae), the leading cause of neonatal sepsis, was present in 25% of BV-positive women and 28% of BV-negative women, and was significantly more abundant among BV-negative women. Both Chlamydia infection and BV may adversely affect reproductive health and place these women at additional risk for HIV acquisition. The high abundance of Prevoetella amnii, in particular, may increase HIV risk, given its inflammatory capacity. Laboratory-based testing for STIs (Chlamydia and Gonorrhoeae in particular) appears to be warranted in this community, together with further monitoring and/or treatment of BV.

Research correlation: This article is the translated version, made available to provide access to a larger readership, of which the original English article is available here: <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1484>

Corresponding author: Katie Lennard, katieviljoen@gmail.com

Dates: Received: 09 Oct. 2017 | Accepted: 01 Nov. 2017 | Published: 12 Dec. 2017

How to cite this article: Lennard, K.S., Dabee, S., Barnabas, S.L., Havyarimana, E., Jaumdally, S.Z. & Botha, G. et al., 2017, 'Hoë voorkomskoeers van bakteriële vaginose en Chlamydia in 'n lae-inkomste, hoë-bevolkingsdigtheid gemeenskap in Kaapstad', *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 36(1), a1495. <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1495>

Copyright: © 2017. The Authors. Licensee: AOSIS. This work is licensed under the Creative Commons Attribution License.

Inleiding

Jong Suid-Afrikaanse vroue uit hulpbron-arm gemeenskappe staan verskeie uitdagings in die gesig in terme van hulle seksuele en reprodktiewe gesondheid. Die voorkomssyfer van MIV in tieners en jong vroue in Sub-Sahara Afrika is disproporsioneel hoog relatief tot hulle manlike eweknieë. Daar is verskeie faktore wat hiertoe kan bydra, insluitend die gebrek aan seksuele en reprodktiewe gesondheidsopvoeding, asook onvoldoende openbare gesondheidsdienste. Een belangrike addisionele risikofaktor vir MIV-besmetting wat klaarblyklik nie verband hou met gedrag nie, is genitale inflammasie (Masson et al. 2015). Verskeie faktore is as oorsake van genitale inflammasie voorgestel, insluitend bakteriële vaginose (BV) – gekenmerk deur verhoogde vaginale mikrobiële diversiteit en 'n afname in die proporsie Lactobacilli – en seksueel oordraagbare infeksies (SOI's). Hierdie faktore blyk interafhanklik te wees, aangesien BV geassosieer word met 'n verhoogde risiko van SOI-besmetting (Balkus et al. 2014; Gallo et al. 2012; Wiesenfeld et al. 2003), insluitend MIV (Atashili et al. 2008; Myer et al. 2005; Taha et al. 1998), en ook omgekeerd (Gallo et al. 2012). BV is meer algemeen in vroue van Afrika-afkoms in vergelyking met Europese vroue (Buvé et al. 2014; Ravel et al. 2010; Srinivasan et al. 2012), met 'n uiters hoë BV-voorkomssyfer in Suid-Afrika (34%–58%) in vergelyking met ander lande (Kenyon, Colebunders & Crucitti 2013).

Menslike papillomavirus(MPV)-infeksies hou verdere gesondheidsgevaare in, aangesien hoë-risiko MPV-tipes oorsaaklik verbind is aan byna alle gevalle van servikale kanker. Servikale kanker het 'n voorkomskoers van ongeveer 30/100 000 in Sub-Sahara Afrika – vyf keer hoër as in ontwikkelde lande, soos Australië, waar MPV-inenting sedert 2007 beskikbaar is (Ferlay et al. 2015). In 2000 het die Suid-Afrikaanse Nasionale Departement van Gesondheid 'n nasionale servikale kanker siftingsbeleid ingestel wat vroue ouer as 30 toegang gee tot drie gratis Papanicolaou(Pap)-smere – een elke 10 jaar (Harries et al. 2009). In 2014 het die Suid-Afrikaanse Nasionale Departement van Gesondheid MPV-profilaktiese inenting in Suid-Afrikaanse openbare skole geïmplementeer vir alle graad 4-meisies nege jaar en ouer; dit het byna 'n halfmiljoen meisies geteiken.

Reprodktiewe en neonatale gesondheid verteenwoordig nog 'n groot kommer onder hierdie jong vroue, met 19% Suid-Afrikaanse vroue wat 'n tienerswangerskap (10–19 jaar oud) gehad het, waarvan 16% ongewens was (Mchunu et al. 2012). SOI's, soos Chlamydia, kan tot pelviere inflammatoriese siekte en onvrugbaarheid lei. Die risiko van 'n ektopiese swangerskap of 'n miskraam kan ook verhoog (Anschuetz et al. 2012; Baud et al. 2011; Gottlieb, Xu & Brunham 2013; Haggerty et al. 2010), veral as dit onbehandeld gelaat word. Verder is *S. agalactiae* (ook bekend as Groep B *Streptococcus* of GBS) die hoofoorsaak van neonatale sepsis, en indringende *S. agalactiae*-siekte is algemeen onder SA-babas (Madhi et al. 2003), met oordrag vanaf die moeder se genitale kanaal wat

'n groot risikofaktor vir vroeë siektes (in die eerste ses lewensdae) verteenwoordig (Edmond et al. 2012).

Hier beskryf ons die vaginale mikrobiota en voorkomskoers van SOI's onder 16–22-jarige MIV-negatiewe Suid-Afrikaanse vroue uit 'n lae-inkomste, hoë-bevolkingsdigtheid gemeenskap in Kaapstad, en beklemtoon die uitdagings wat hierdie vroue in die gesig staan in terme van hulle seksuele en reprodktiewe gesondheid.

Materiaal and metodes

Deelnemerseleksie en monsterversameling

MIV-negatiewe Suid-Afrikaanse vroue tussen die ouderdomme van 16 en 22 jaar is vanuit 'n lae-inkomste, hoë-bevolkingsdigtheid gemeenskap in Kaapstad gewerf as deel van die *Women's Initiative in Sexual Health* studie (WISH). Alle deelnemers 18 jaar en ouer het ingeligte toestemming gegee, terwyl instemming en ouerlike toestemming vir deelnemers jonger as 18 jaar verkry is. Jong vroue is gewerf as hulle MIV-negatief was, oor die algemeen gesond was, nie swanger was of gemenstrueer het tydens die steekproefneming nie, en wat nie in die vorige 48 h onbeskermd seks of uitspoeling gehad het nie. Bykomende uitsluitingskriteria was die gebruik van antibiotika gedurende die voorafgaande twee weke. Vir deelnemers wat slegs progestien inspuittbare voorbehoedmiddels gebruik, is studiebesoeke geskeduleer vir twee weke ná die inspuiting, of andersins gedurende die luteale fase van hulle menstruele siklus (tussen dag 14 en 28) indien hulle geen hormonale voorbehoedmiddels (HV's) gebruik nie of indien hulle orale HV's gebruik. Voordat die monsters ingesamel is, is die volgende gedoen: MIV-voortoets en -risikoverminderingsberading, 'n vinnige MIV-toets (Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo, Alere, Waltham, MA), 'n swangerskaptoets (*U-test Pregnancy strip*, Humor Diagnostica, Pretoria, Suid-Afrika), en 'n fisiese roetine-onderzoek. Genitale monsters is versamel deur 'n weggooibare menstruasiebeker (Softcup®) vir 'n uur oor die serviks te plaas en vaginale deppers (ná bekerverwydering) te neem vir SOI-toetsing, Nugent-telling en mikrobiome-analise. Vroue is longitudinaal vir 'n totaal van drie besoeke gevolg: elke twee maande as hulle *Norethisterone enanthate* (Net-EN), gekombineerde mondelinge voorbehoedmiddels of slegs versperring-tipe kontrasepsie gebruik, of elke drie maande as hulle Depot medroxyprogesterone acetate (DMPA) gebruik.

Seksueel oordraagbare infeksies en bakteriële vaginose toetse

Vulvovaginale deppers is versamel vir SOI-toetsing deur multipleks polimerase-kettingreaksie (PKR) (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, HSV-1 en -2, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum* en *Lymphogranuloma venereum*), soos voorheen beskryf (Lewis et al. 2012). Bloed is verkry vir die

vinnige MIV en HSV-2 serologiese toetse. Endo-servikale deppers is ingesamel vir MPV-opsoring en genotipering deur *Roche Linear Array* (Mbulawa et al.) ingedien. Die volgende MPV-tipes is as hoë-risiko MPV beskou: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 en 68 (Jacobs et al. 1997). Vir ontledings wat na SOI (enige) verwys, is vroue as positief beskou indien hulle minstens een van die SOI's (uitsluitend MPV) gehad het wat in hierdie studie getoets is. Laterale muur/posterior forniks deppers is vir die Nugent-telling ingesamel om monsters te klassifiseer as BV-negatief (Nugent 0–3), intermediêr (Nugent 4–6) of positief (Nugent 7–10); en vaginale pH is met behulp van kleurvaste aanwysers gemeet (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland).

Bakteriële 16S rRNS-geen multipleks polimerase-kettingreaksie amplifikasie en DNS-volgordebepaling

Alle monsters van die eerste besoek is gekies vir 16S rRNS-geen amplifikasie deur PKR met daaropvolgende ampikon-volgordebepaling. Die deppers is ontdooi, behandel met 'n mengsel van 'mutanolysin' (25kU/mL, Sigma Aldrich), lisosiem (450 kU/mL, Sigma Aldrich) en 'lysostaphin' (4kU, Sigma Aldrich), en dan meganies met 'n *BeadBeater* ontwig. Deoksiribonukleïensuur (DNS) is onttrek met behulp van die *MoBio PowerSoil* DNS-ekstraksiestel (MoBio, Carlsbad, CA). Die V4-streek van die 16S rRNS-geen is versterk deur gebruik te maak van gewysigde universele inleiers (Pearce, Hilt & Rosenfeld 2014): 515F (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG NNN NNG TGC CAG CMG CCG CGG TAA) en 806R (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GNN NNN GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT), en die kwaliteit is met *Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, Verenigde State) nagegaan. Saamgevoegde duplikaat monsters is met *AMPure XP* krale (Beckman Coulter, Brea, CA, Verenigde State) gesuiwer, en gekwantifiseer met behulp van die *Picogreen dsDNA* toets (Invitrogen, Carlsbad, CA, Verenigde State). Ampikone is in ekwimolêre hoeveelhede gekombineer, en gesuiwerde DNS-biblioteke bestaande uit ~100 saamgevoegde monsters se gepaarde-ent volgordebepaling is uitgevoer op 'n *Illumina MiSeq*-platform (300bp met V3-chemie gepaarde-ent).

Ná demultipleksing is die rou DNS basisvolgordes soos volg voorverwerk: basisvolgordes vir beide rigtings (vorentoe en agtertoe) is met behulp van *usearch7* (Edgar 2010) saamgevoeg, met 'n maksimum van drie onpare toegelaat; saamgevoegde basisvolgordes is gefilter volgens kwaliteit met behulp van *usearch7* (basisvolgordes met E-tellings groter as 0.1 is weggegooi); inleier-sekwensies is met behulp van 'n verpersoonlikte *Python* teks verwyder; saamgevoegde, gefiltreerde basisvolgordes is by 250bp afgestomp. Hierna is sekvensies gededupliseer terwyl die vlak van replikasie vir elke ry met behulp van *usearch7* aangeteken is. Die gededupliseerde sekvensies is volgens oorfloed (hoogste tot laagste) gesorteer en *de novo* in operasionele taksonomiese eenhede (OTE's) gegroepeer teen 97% similariteit met behulp van *usearch7*. Chimeriese

sekwensies is met behulp van UCHIME (Edgar et al. 2011) opgespoor (in die GOLD-databasis), en verwyder. Individuele frekwensies is aan die spesifieke identifiseerders toegewys, met 'n 97% opeenvolgingidentiteit drumpel. Taksonomiese aanwysing is uitgevoer in QIIME 1.8.0 (Caporaso et al. 2010) met behulp van die RDP-klassifiseerder (by die standaard vertrouenspeil van 0.5) teenoor die Greengenes 13.8 verwysingstaksonomie vir 97% opeenvolgingidentiteit. Om die resolusie van spesievlakke te verhoog, het ons ons verteenwoordigende *de novo* OTE sekvensies in die verpersoonlikte taksonomiese databasis van Fettweis et al. (2012) opgesoek, en het BLAST soektogte teen die NCBI nukleotied-databasis uitgevoer, soos voorheen beskryf.

Monsters met ≥ 5000 basisvolgordes is vir verdere analise geselekteer. Die OTE-tabel is gestandaardiseer om verskille in totale hoeveelheid basisvolgordes tussen verskillende monsters in ag te neem, en verder gefiltreer sodat elke OTE ten minste 10 tellings in minstens 2% van die monsters moes hê of 'n relatiewe oorfloed van minstens 0.001% moes hê.

Statistiese analise

Alle stroomaf statistiese analise is in R uitgevoer, met behulp van die volgende pakkette: *phyloseq* (McMurdie & Holmes 2013) vir beta-diversiteitsontledings, *metagenomeSeq* (Paulson et al. 2013) vir differensiaal-oorfloedtoetsing, *vegan* (Oksanen et al. 2016) vir NMDS en RDA analise (Gaujoux 2014) vir geannoteerde hittekaarte. Verskille in mikrobiële samestelling tussen groepe van belang is geassesseer met behulp van *metagenomeSeq* se 'MRfulltable' funksie met 'n verpersoonlikte filter om betekenis te bepaal: saamgevoegde taksa is aansienlik anders as hulle 'n veelvoud verandering (beta-koëffisiënt) van ≥ 1.25 getoon het, 'n aangepaste *p*-waarde van ≤ 0.05 en as minstens een van die twee groepe wat vergelyk is $\geq 20\%$ van die monsters met die gegewe OTE/takson gehad het, óf die resultaat van die Fisher eksakte toets was beduidend (ná meervoudige toetsregstellings [MT]). OTE's is eers op die laagste beskikbare taksonomiese vlak saamgevoeg (m.a.w. tellings is opgesom vir OTE's met *Lactobacillus* as die laagste beskikbare taksonomiese annotasie, terwyl OTE's met addisionele spesievlak annotasie, bv. *L. iners*, eerder op spesievlak opgesom is).

Resultate

Altesaam 149 MIV-negatiewe 16–22-jarige vroue is uit 'n lae-inkomste, hoë-bevolkingsdigtheid gemeenskap in Kaapstad gewerf. Van die 115 vroue vir wie 16S rRNS-geen ampikon-volgordebepaling uitgevoer is (a.g.v. die beskikbaarheid van deppers en voldoende DNS), het 102 die volgordebepaling se kwaliteitsbeheer geslaag (>5000 basisvolgordes/monster). Hier beskryf ons hierdie 102 vroue se mikrobiotiese profiele, SOI-voorkomssyfer en ander faktore wat van toepassing is op seksuele en reprodktiewe gesondheid (Tabel 1).

TABEL 1: Deelnemer-opsomming ($N = 102$).

| Kenmerk | Kaapstad | |
|-----------------------------------|-------------|----|
| | <i>N</i> | % |
| Mediaan ouderdom | 18 | - |
| BV-voorkomssyfer | | |
| <i>BV-positief</i> | 56 | 55 |
| <i>BV-intermediêr</i> | 7 | 7 |
| <i>BV-negatief</i> | 39 | 38 |
| Nugent-telling (gemiddeld) | 5.5 | - |
| SOI (enige) [†] | 56 | 55 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 45 | 44 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 14 | 14 |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | 6 | 6 |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 4 | 4 |
| HSV-2 | 6 | 6 |
| MPV-risiko | | |
| <i>Hoog</i> | 42 | 41 |
| <i>Laag</i> | 29 | 28 |
| <i>Negatief</i> | 31 | 31 |
| Hormonale voorbehoedmiddel | | |
| <i>DMPA</i> | 19 | 19 |
| <i>Implanon</i> | 8 | 8 |
| <i>Net-En</i> | 70 | 68 |
| <i>OKP</i> | 4 | 4 |
| <i>NuvaRing</i> | 1 | 1 |
| Etnisiteit[‡] | | |
| <i>Xhosa</i> | 94 | 99 |
| <i>Zulu</i> | 1 | 1 |
| LMI (gemiddeld) | 25.4 | - |

[†], Ander SOI's wat getoets is (HSV-1, *H. ducreyi*, *T. pallidum* en *L. venereum*) is nie in enige van die vroue bespeur nie; MPV is nie in die klassifikasie van SOI (enige) ingesluit nie; [‡], Etniese inligting was nie beskikbaar vir sewe van die vroue nie.
SOI, seksueel oordraagbare infeksie; MPV, menslike papilloma virus; LMI, liggaamsmassa-indeks.

Die mediaan ouderdom was 18 jaar en vroue was byna uitsluitlik van isiXhosa-herkoms (99%). Die SOI-voorkomssyfer was uiters hoog met 55% van die vroue wat met minstens een SOI gediagnoseer is deur middel van PKR. Die meerderheid van die infeksies het bestaan uit *C. trachomatis* (44%), gevolg deur *N. gonorrhoeae* (14%), *T. vaginalis* (6%), HSV-2 (6%) en *M. genitalium* (4%). Ander SOI's waarvoor getoets is (HSV-1, *H. ducreyi*, *T. pallidum* en *L. venereum*) is nie in enige van hierdie vroue aangetref nie. SOI mede-infeksies was veelvuldig: 17% van die vroue was met twee of meer SOI's besmet (Tabel 2). BV-voorkomssyfers was ook baie hoog, met 55% van die vroue wat as BV-positief (Nugent-telling ≥ 7) geklassifiseer is, 7% as BV-intermediêr (Nugent-telling 3–6), en 38% as BV-negatief (Nugent-telling 0–2). BV-positiewe vroue was meer geneig om *Chlamydia* te hê (52% van BV-positiewe teenoor 38% van BV-negatiewe vroue was met *Chlamydia* besmet), maar hierdie verhouding was nie betekenisvol nie, en daar was ook geen beduidende assosiasie met die voorkoms van een of meer SOI's of BV nie. Al 102 vroue was op HV's, met die meerderheid wat die slegs-progestien inspuibare Net-En (68%) of DMPA (19%) gebruik het.

Vaginale mikrobiota profilering

Ongekontroleerde groepering van mikrobiota profiele toon 'n sterk ooreenstemming tussen verhoogde mikrobiële diversiteit deur die 16S rRNA-geen amplicon-

TABEL 2: Frekwensieverdeling van seksueel oordraagbare infeksies ($N = 102$), waar 1 = positief en 0 = negatief, bv. 8% van vroue is met *Chlamydia trachomatis* sowel as *Neisseria gonorrhoeae* gediagnoseer.

| <i>Chlamydia trachomatis</i> | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | <i>Trichomonas vaginalis</i> | <i>Mycoplasma genitalium</i> | HSV-2 | Frekwensie (N) |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|----------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |

volgordebepaling en BV-status (Figuur 1). Onder die BV-negatiewe vroue was *L. iners* of *L. crispatus* verreweg die volopste taksa, met aansienlik minder diverse vaginale mikrobiota in vergelyking met BV-positiewe (1.6e-7) of BV-intermediêre ($p = 0.03$) vroue. BVAB1 was die volopste spesie in 32% van die BV-positiewe en BV-intermediêre vroue, gevolg deur *G. vaginalis* (17%), *Prevotella* (16%), *Megasphaera*, *L. Iners* (10%) en *L. crispatus* (5%) (sien Figuur 2).

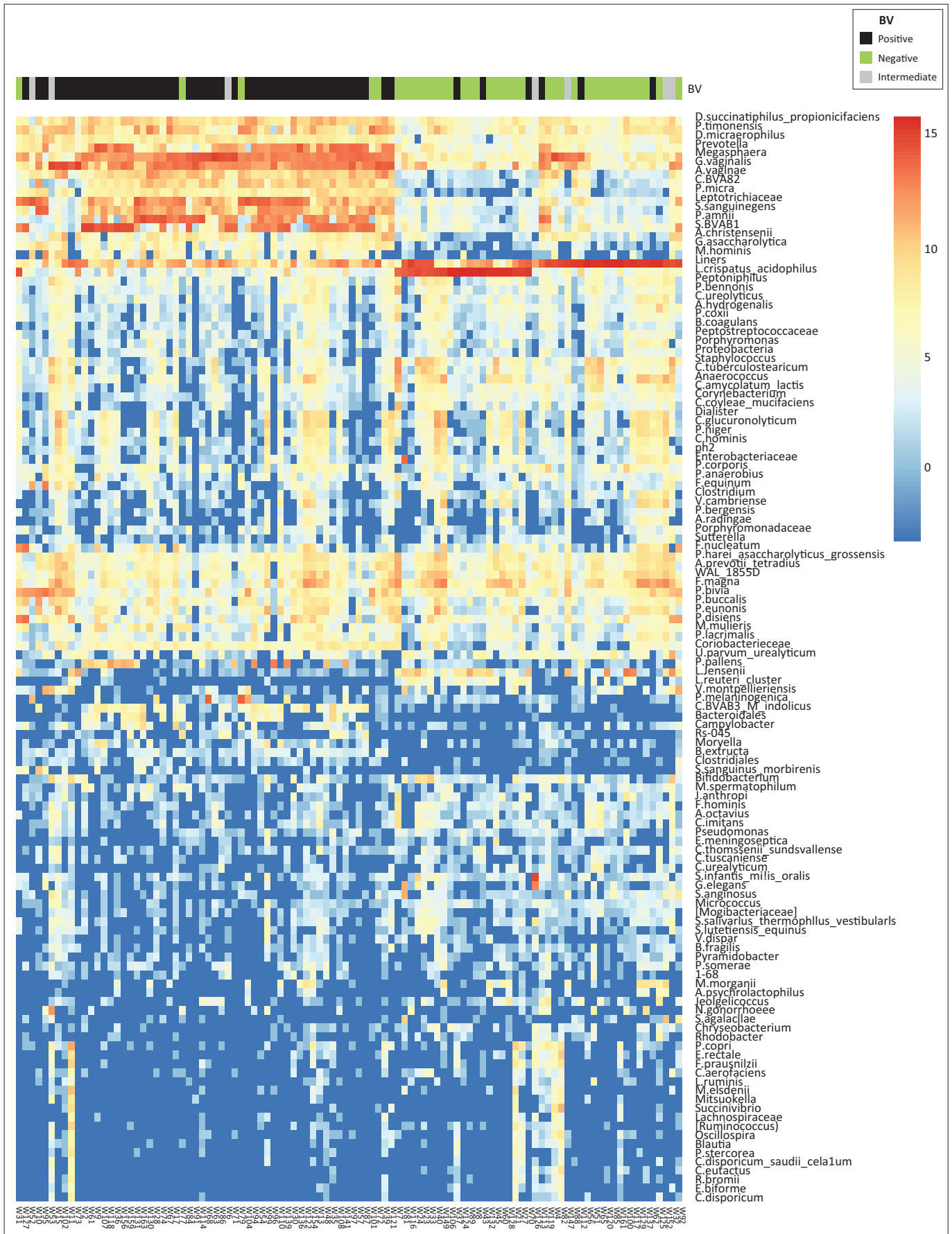
Deur ons verpersoonlikte taksonomiese annotasie pyplyn te gebruik, kon ons alle Lactobacilli tot op spesievlak oplos. Die teenwoordige spesies was: *L. iners*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. ruminis*, *L. coleohominis*, *L. jensenii*, en *L. delbrueckii*. *Prevotella* is ook deur verskeie spesies verteenwoordig: 12 van die 19 *Prevotella* OTE's kon op spesievlak opgelos word, waarvan *P. amnii*, *P. bivia*, *P. timonensis*, *P. disiens* en *P. pallens* saam verantwoordelik was vir $\geq 50\%$ van die *Prevotella*-tellings in 68% van die BV-positiewe en -intermediêre vroue (Figuur 2), terwyl *Prevotella* van onbekende spesies $\geq 50\%$ in 'n verdere 27% van die BV-positiewe/-intermediêre vroue uitgemaak het.

Differensiaal-oorvloedtoetsing tussen BV-positiewe versus BV-negatiewe vroue lewer 41 beduidende taksa (Figuur 3). Soos verwag, was BVAB1, BVAB2, BVAB3, *G. vaginalis*, *Megasphaera* en verskeie *Prevotella*-spesies meer volop in BV-positiewe vroue. Lactobacilli, insluitend *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. jensenii*, *L. iners* en *L. delbrueckii*, was aansienlik meer volop in BV-negatiewe vroue.

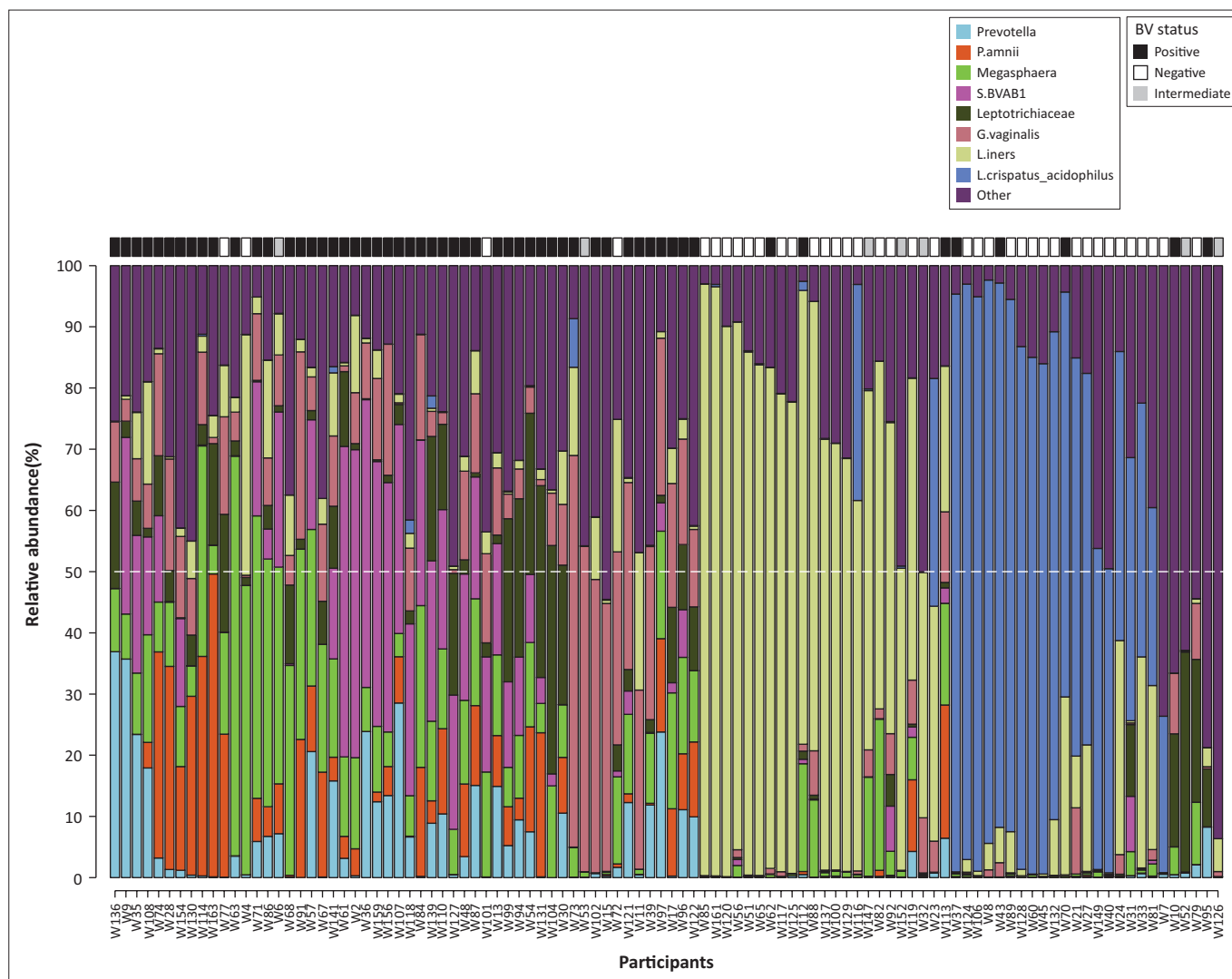
Die voorkoms van Groep B *Streptococcus* is uit 16S rRNA-geen amplicon-volgordebepaling bepaal: 25% van BV-positiewe vroue en 28% van BV-negatiewe vroue is deur *S. agalactiae* gekoloniseer wat aansienlik meer volop onder BV-negatiewe vroue was (beta koëffisiënt = 1.4, aangepaste p -waarde = 0.02) (sien Figuur 4).

Bespreking

Hier beskryf ons die voorkomssyfers van SOI en BV en die vaginale mikrobiota profiele van 16–22-jarige vroue uit 'n hulppbron-arm gemeenskap in K. Hierdie vroue het uiters hoë



FIGUUR 1: Hittekaart van die volopste taksa (rye) geïdentifiseer deur 16S rRNA-geen mikrobiomprofiling, gebruik ongekontroleerde hiërgiese klassifisering met behulp van Bray-Curtis indeks in alle monsters (kolomme). Operasionele taksonomiese eenhede (OTE's) is saamgesmelt teen die laagste beskikbare taksonomiese annotasie nadat seidsame en minder volop OTE's uitgesluit is (met 'n vereiste van ten minste 20 tellings in minstens 30% van die monsters vir 'n gewee OTE).

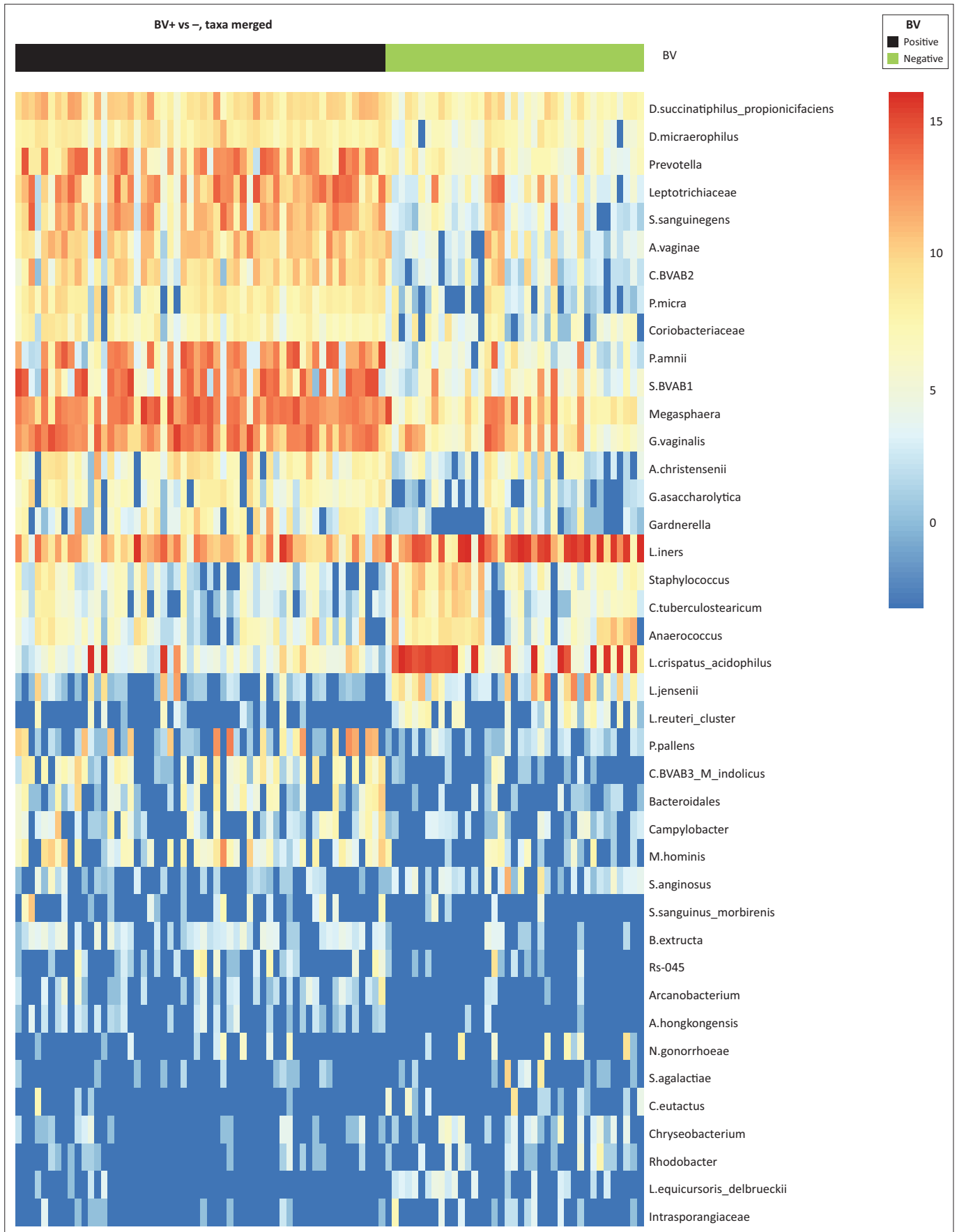


FIGUUR 2: 'n Kolomgrafiek-opssomming van die individuele mikrobiota profile, met saamgestelde kolomme wat volgens die dominante taksa gegroepeer is en georden volgens die afnemende deel van die dominante takson. Die swart, wit en grys bokse aan die bokant dui onderskeidelik op bakteriële vaginose (BV+), BV-negatiewe en BV-intermediêre status.

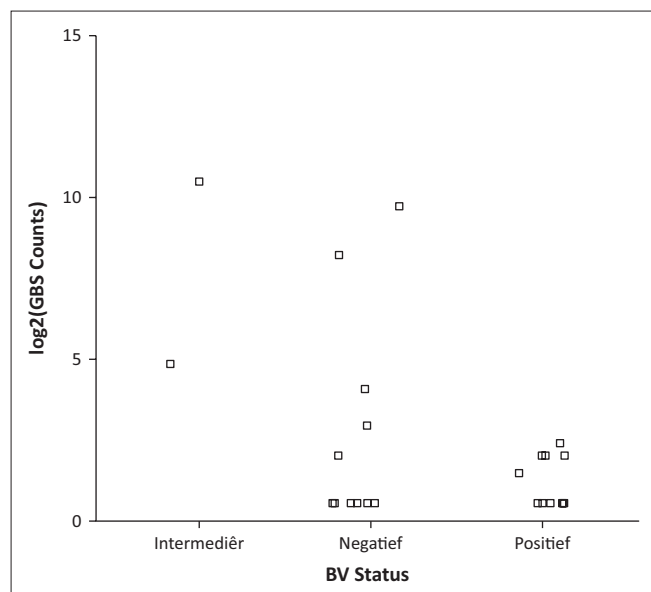
SOI-voorkomssyfers (55%). Hoë-risiko MPV is in 41% van die vroue aangetref, met 'n verdere 28% met lae-risiko MPV. 'n Verbysterende 44% van die vroue was met Chlamydia besmet, waarvan 16% minstens een addisionele SOI gehad het. Die Chlamydia-infeksiesyfer onder hierdie vroue is aansienlik hoër as wat onder jong seksueel aktiewe vroue uit ander dele van SA gerapporteer is, insluitend die landelike streke van KwaZulu-Natal (25%) (Kleppa et al. 2015) en 'n ander gebied in Kaapstad (15%) (Menezes et al. 2017). Die bestuur van SOI's bly problematies in ontwikkelende lande waar laboratorium-gebaseerde toetse dikwels nie beskikbaar is nie en waar die kwaliteit van SOI-versorging tekortskiet (in terme van beskikbaarheid van medisyne, nakoming van SOI-riglyne, kondoomvoorsiening en MIV-berading [Kohler et al. 2017]). Volgens die SA Departement van Gesondheid se riglyne (Department of Health 2015), kwalifiseer vroue vir SOI-behandeling gebaseer op 'n kombinasie van demografiese eienskappe, simptome en/of kliniese waarnemings, waar SOI-behandeling 'n kombinasie *metronidazole*, *azithromycin* en *ceftriaxone* behels (Peters et al. 2014). Chlamydia is gewoonlik asimptomaties, wat die meeste vroue in SA met Chlamydia-

infeksies dus onbehandeld laat. Aanhoudende Chlamydia-infeksies kan egter tot onvrugbaarheid en pelvisiese inflammatoriese siekte lei, asook die risiko van 'n ektopiese swangerskap en miskraam verhoog (Anschuetz et al. 2012; Baud et al. 2011; Gottlieb et al. 2013; Haggerty et al. 2010). Chlamydia word ook met 'n verhoogde risiko van MIV-verkryging (Buckner et al. 2016) geassosieer wat die behoefte aan strengere SOI-sifting in hierdie gemeenskap verder beklemtoon.

BV-positiewe vroue was meer geneig om met Chlamydia besmet te wees, maar hierdie verhouding was nie betekenisvol nie, en daar was ook geen beduidende assosiasie met die voorkoms van een of meer SOI's of BV nie. Vorige verslae dui op 'n positiewe verband tussen samevallende Chlamydia/Gonorrhoea en BV (Wiesenfeld et al. 2003). Hierdie assosiasie is egter nie altyd in 'n deursnee-opname duidelik nie, maar eerder longitudinaal waar insident BV geassosieer word met 'n verhoogde risiko van insident Gonorrhoea/Chlamydia by 'n opvolgbesoek, en ook omgekeerd (Gallo et al. 2012).



FIGUUR 3: 'n Hittekaart van taksa wat aansienlik differensieel volop en/of gereeld voorkom in BV- positiewe teenoor BV-negatiewe vroue (aangepaste p -waarde ≤ 0.05 , koëffisiënt ≥ 1.25 , taksa teenwoordig in $\geq 20\%$ van die monsters in minstens een van die twee groepe wat vergelyk word); monsters (kolomme) is gesorteer volgens BV-klassifikasie; hittekaartskaal: \log_2 -getransformeerde gestandaardiseerde tellings.



FIGUUR 4: Groep B. *Streptococcus* voorkoms gestratifiseer volgens BV-status.

Bakteriële vaginose voorkomssyfers in SA is oor die algemeen uiters hoog (34%–58%) relatief tot ander lande (Kenyon et al. 2013). Hierdie studie het dit bevestig met 55% van die vroue wat BV-positief was. Soos in ander omgewings, het vroue met Nugent-tellings >7 baie uiteenlopende vaginale mikrobiota. Soortgelyk aan vorige studies oor vroue van Afrika-afkoms, het hierdie BV-positiewe vroue gereeld vaginale mikrobiota gehad, oorheers deur BVAB1, *Prevotella*, *G. vaginalis* of *L. iners* (Fettweis et al. 2014).

Ons was in staat om verskeie *Prevotella* OTE's op spesievlak op te los. *P. amnii* sowel as *P. bivia* is met genitale inflammasie (Anahtar et al. 2015; Gosmann et al. 2017; Lennard et al. 2017) en BV geassosieer. In hierdie studie het *P. bivia*-vlakke egter nie volgens BV-status of inflammasie verskil nie. Fettweis et al. (2014) het voorheen berig dat *P. amnii* meer algemeen in Afrika-Amerikaanse vroue voorkom in vergelyking met vroue van Europese afkoms wat die hoë voorkomssyfers van *P. amnii*-kolonisasie kan verduidelik wat hier gesien word. In kommersiële sekswerkers in Oos-Afrika is *P. timonensis* egter meer algemeen as *P. amnii* (Schellenberg et al. 2011). Kolonisering deur *P. amnii* blyk dus besonder algemeen in hierdie studiepopulasie te wees waar alle vroue deur verskillende vlakke van *P. amnii* gekoloniseer is (ongeg hulle BV-status), in vergelyking met slegs 10% en 50% van BV-negatiewe en -positiewe vroue in die studie deur Srinivasan et al. (in 'n studiebevolking waar 34% van deelnemers swart mense was [Srinivasan et al. 2012]). Dit is egter nie duidelik of hierdie verskille toegeskryf kan word aan ras, geografiese ligging of tegniese aspekte nie.

Groep B *Streptococcus* (GBS) kolonisasiesyfers wissel baie – dit word aangetref in ~12%–22% van vroue in ontwikkelde en ontwikkelende lande (Stoll & Anne 1998), met voorkomssyfers van 0% en 23% onder onderskeidelik adolessente en volwasse Suid-Afrikaanse vroue (Cools et al. 2016). Ons het geen verskil in die frekwensie van GBS-kolonisasie per BV-status gevind nie. BV-negatiewe vroue

gekoloniseer deur GBS het egter aansienlik hoër vlakke van GBS gehad in vergelyking met BV-positiewe vroue. Daar is voorheen getoon dat GBS-oorvloed positief geassosieer word met 'n verhoogde risiko van nadelige geboorte uitkomst. Cools et al. (2016) het bevind dat BV-negatiewe vroue meer gereeld deur GBS gekoloniseer is; Ekström et al. (2013) het 'n nie-beduidende toename in die frekwensie van GBS-kolonisasie in BV-negatiewe (23.5%) in vergelyking met BV-positiewe vroue (17%) gerapporteer terwyl Srinivasan et al. (2012) geen verskil gevind het nie. In ons studie was nie-Groep B *Streptococcus S. anginosus* ook aansienlik meer volop in BV-negatiewe vroue.

Ten slotte: daar is 'n hoë voorkoms van SOI's onder jong vroue tussen 16 en 22 jaar in hierdie hulpbron-arm gemeenskap in Kaapstad – veral Chlamydia en hoë-risiko MPV, sowel as BV. Chlamydia-infeksie sowel as BV kan reprodutiewe gesondheid nadelig beïnvloed en hierdie vroue teen addisionele risiko vir MIV-verkryging plaas. Die oorvloed van *P. amnii* in besonder kan MIV-risiko verhoog gegewe sy inflammatoriese vermoë. Laboratorium-gebaseerde toetse vir SOI's (veral Chlamydia en Gonorrhoeae) tesame met verdere monitering en/of behandeling van BV, blyk in hierdie gemeenskap geregtig te wees.

Etiese oorweging

Goedkeuring vir die studie is vanaf die Navorsingsetiek-komitee van die Universiteit van Kaapstad verkry.

Erkenning

Ons bedank die WISH studiespanne, veral Pinky Ngobo, Nozipho Hadebe, Janine Nixon, en al die jong vroue wat aan die studie deelgeneem het. Ons bedank prof. Lynn Morris, David Lewis, Venessa Maseko en Raveshni Durgiah van die Nasionale Instituut vir Oordraagbare Siektes vir hulle hulp met steekproefverwerking. Berekeninge is uitgevoer met behulp van fasiliteite wat deur die Universiteit van Kaapstad se ICTS High Performance Computing-span voorsien is: <http://hpc.uct.ac.za>.

Hierdie studie is ondersteun deur toelaes vanaf die Europese en Ontwikkelende Lande Kliniese Proewe Vennootskap (EDCTP), Strategic Primer subsidie [SP-2011-41304-038] en die Suid-Afrikaanse Departement van Wetenskap en Tegnologie [DST/CON 0260/2012]. Katie S. Lennard word deur die Nasionale Navorsingstigting en die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns ondersteun. Heather B. Jaspán is gedeeltelik deur K08HD069201 ondersteun. S.L.B. is deur die HIV Vaccine Trials Network SHAPe Program, die Fogarty Foundation en die Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad (MNR) ondersteun. S.D. is deur die Nasionale Navorsingstigting van Suid-Afrika ondersteun. Die Desmond Tutu HIV Foundation erken ook die ondersteuning van ViiV-gesondheidsorg in hul YouthShield-program. Perinatale MIV-navorsingseenheid is deur befondsing van die Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad ondersteun.

Mededingende belange

Die skrywers verklaar dat hulle geen finansiële of persoonlike verhouding(s) het wat hulle onvanpas beïnvloed het in die skryf van hierdie artikel nie.

Outeursbydrae

H.B.J., J.A.P., K.L. het die kohort gewerf. G.G., S.L.B., L.G.B. het die eksperimente uitgedink ontwerp. S.D., S.B., E.H., S.Z.J. het die data geanaliseer. K.L., S.D., J.A.P., G.B. het die laboratorium eksperimente uitgevoer, en K.L., J.A.P., H.B.J., S.L.B., S.D., L.G.B., E.H., N.M., N.N.M., S.Z.J., G.G., G.B. het die manuskrip geskryf.

Literatuurverwysings

- Anahar, M.N., Byrne, E.H., Doherty, K.E., Bowman, B.A., Yamamoto, H.S., Soumillon, M. et al., 2015, 'Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract', *Immunity* 42, 965–976. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.019>
- Anschuetz, G.L., Asbel, L., Spain, C.V., Salmon, M., Lewis, F., Newbern, E.C. et al., 2012, 'Association between enhanced screening for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae and reductions in sequelae among women', *Journal of Adolescent Health* 51, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2011.11.002>
- Atashili, J., Poole, C., Ndumbe, P.M., Adimora, A.A. & Smith, J.S., 2008, 'Bacterial vaginosis and HIV acquisition: A meta-analysis of published studies', *AIDS* 22(12), 1493–1501. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283021a37>
- Balkus, J.E., Richardson, B.A., Rabe, L.K., Taha, T.E., Mgodi, N., Kasaro, M.P. et al., 2014, 'Bacterial vaginosis and the risk of trichomonas vaginalis acquisition among HIV-1-negative women', *Sexually Transmitted Diseases* 41, 123–128. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000075>
- Baud, D., Goy, G., Jatou, K., Osterheld, M.C., Blumer, S., Borel, N. et al., 2011, 'Role of Chlamydia trachomatis in miscarriage', *Emerging Infectious Diseases* 17, 1630–1635. <https://doi.org/10.3201/eid1709.100865>
- Buckner, L.R., Amedee, A.M., Albritton, H.L., Kozlowski, P.A., Lacour, N., McGowin, C.L. et al., 2016, 'Chlamydia trachomatis infection of endocervical epithelial cells enhances early HIV transmission events', *PLoS One* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146663>
- Buvé, A., Jespers, V., Crucitti, T. & Fichorova, R.N., 2014, 'The vaginal microbiota and susceptibility to HIV', *Aids* 28, 2333–2344. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303> <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000432>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. et al., 2010, 'QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data', *Nature Methods* 7, 335–336.
- Cools, P., Jespers, V., Hardy, L., Crucitti, T., Delany-Moretlwe, S., Mwaura, M. et al., 2016, 'A multi-country cross-sectional study of vaginal carriage of group B streptococci (GBS) and Escherichia coli in resource-poor settings: Prevalences and risk factors', *PLoS One* 11, 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148052>
- Department of Health, 2015, *Sexually transmitted infections management guidelines 2015*, Department of Health, Republic of South Africa, pp. 4–26.
- Edgar, R.C., 2010, 'Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST', *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C. & Quince, C., Knight, R., 2011, 'UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection', *Bioinformatics* 27, 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Edmond, K.M., Kortsalioudaki, C., Scott, S., Schrag, S.J., Zaidi, A.K., Cousens, S. et al., 2012, 'Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: Systematic review and meta-analysis', *Lancet* 379, 547–556. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61651-6)
- Ekström, L., Adolfsson, A., Ericson, H., Poutakidis, G. & Charonis, G., Larsson, P.-G., 2013, 'Vaginal flora and urinary and vaginal group B streptococci in early pregnancy', *Gynecology* 1, 5. <https://doi.org/10.7243/2052-6210-1-6>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M. et al., 2015, 'Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012', *International Journal of Cancer* 136, E359–E386.
- Fettweis, J.M., Paul Brooks, J., Serrano, M.G., Sheth, N.U., Girerd, P.H., Edwards, D.J. et al., 2014, 'Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry', *Microbiology* 160, 2272–2282.
- Fettweis, J.M., Serrano, M.G., Sheth, N.U., Mayer, C.M., Glascock, A.L., Brooks, J.P. et al., 2012, 'Species-level classification of the vaginal microbiome', *BMC Genomics* 13, S17.
- Gallo, M.F., Macaluso, M., Warner, L., Fleenor, M.E., Hook, E.W., Brill, I. et al., 2012, 'Bacterial Vaginosis, Gonorrhoea, and Chlamydia Infection Among Women Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic: A Longitudinal Analysis of Possible Causal Links', *Annals of Epidemiology* 22, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2011.11.005>
- Gaujoux, R., 2014, *Generating heatmaps for Nonnegative Matrix Factorization*, viewed n.d., from <http://nmf.r-forge.r-project.org/vignettes/heatmaps.pdf>
- Gosmann, C., Anahar, M.N., Handley, S.A., Walker, B.D., Virgin, H.W., Kwon, D.S. et al., B.A., 2017, 'Lactobacillus-deficient cervicovaginal bacterial communities are associated with increased HIV acquisition in young South African women', *Immunity* 46, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.013>
- Gottlieb, S.L., Xu, F. & Brunham, R.C., 2013, Screening and treating chlamydia trachomatis genital infection to prevent pelvic inflammatory disease, *Sexually Transmitted Diseases* 40, 1. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31827bd637>
- Haggerty, C.L., Gottlieb, S.L., Taylor, B.D., Low, N., Xu, F. & Ness, R.B., 2010, 'Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women', *The Journal of Infectious Diseases* 201, 134–155. <https://doi.org/10.1086/652395>
- Harries, J., Moodley, J., Barone, M.A., Mall, S. & Sinanovic, E., 2009, 'Preparing for HPV vaccination in South Africa: Key challenges and opinions', *Vaccine* 27, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.033>
- Jacobs, M. V., Snijders, P.J., Helmerhorst, T.J., Meijer, J. & Walboomers, J.M., 1997, 'A general primer GP5+ / GP6 + -mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings', *Journal of Clinical Microbiology* 35, 791.
- Kenyon, C., Colebunders, R. & Crucitti, T., 2013, 'The global epidemiology of bacterial vaginosis: A systematic review', *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 209, 505–523. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.05.006>
- Kleppa, E., Holmen, S.D., Lillebø, K., Kjetland, E.F., Gundersen, S.G., Taylor, M. et al., 2015, 'Cervical ectopy: Associations with sexually transmitted infections and HIV. A cross-sectional study of high school students in rural South Africa', *Sexually Transmitted Infections* 91, 124–129. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2014-051674>
- Kohler, P.K., Marumo, E., Jed, S.L., Mema, G., Galagan, S., Tapia, K. et al., 2017, 'A national evaluation using standardised patient actors to assess STI services in public sector clinical sentinel surveillance facilities in South Africa', *Sexually Transmitted Infections* 93, 2016–2023. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2016-052930>
- Lennard, K., Dabee, S., Barnabas, S.L., Havyarimana, E., Blakney, A., Jaumdally, S.Z. et al., 2017, 'Prevalence and associations of genital ulcer and urethral pathogens in men presenting with genital ulcer syndrome to primary health care clinics in South Africa', *Sexually Transmitted Diseases* 39, 880–885. <https://doi.org/10.1128/AI.00410-17>
- Lewis, D.A., Müller, E., Steele, L., Sternberg, M., Radebe, F., Lyall, M. et al., 2012, 'Prevalence and associations of genital ulcer and urethral pathogens in men presenting with genital ulcer syndrome to primary health care clinics in South Africa', *Sexually Transmitted Diseases* 39, 880–885. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318269cf90>
- Madhi, S.A., Radebe, K., Crewe-Brown, H., Frasch, C.E., Arakere, G., Mokhachane, M. et al., 2003, 'Burden of invasive Streptococcus agalactiae disease in South African infants', *Annals of Tropical Paediatrics* 23, 15–23. <https://doi.org/10.1179/000349803125002814>
- Masson, L., Passmore, J.S., Liebenberg, L.J., Werner, L., Baxter, C., Arnold, K.B. et al., 2015, 'Genital inflammation and the risk of HIV acquisition in women', *Clinical Infectious Diseases* 61(2), 1–10. <https://doi.org/10.1093/cid/civ298>
- Mchunu, G., Peltzer, K., Tutshana, B. & Seutlwadi, L., 2012, 'Adolescent pregnancy and associated factors in South African youth', *African Health Sciences* 12, 426–434. <https://doi.org/10.4314/ahs.v12i4.5>
- McMurdie, P.J. & Holmes, S., 2013, 'Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data', *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Menezes, L.J., Pokharel, U., Sudenga, S.L., Botha, M.H., Zeier, M., Abrahamsen, M.E. et al., 2017, 'Patterns of prevalent HPV and STI co-infections and associated factors among HIV-negative young Western Cape, South African women: The EVRI trial', *Sexually Transmitted Infections* 93, 2016–2023. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2016-053046>
- Mkhize, N.N., Bekker, L.-G., Lewis, D.A., Gray, G., Mulder, N., Passmore, J.-A.S. et al., 2017, 'Microbial composition predicts genital tract inflammation and persistent bacterial vaginosis in adolescent South African women', *Infection and Immunity* 149, 1–17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00410-17>
- Myer, L., Denny, L., Telerant, R., de Souza, M., Wright, T.C. & Kuhn, L., 2005, 'Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: A nested case-control study', *Journal of Infectious Diseases* 192, 1372–1380. <https://doi.org/10.1086/462427>
- Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., Hara, R.B.O. et al., 2016, 'Vegan: Community ecology package. R package vegan, vers. 2.2-1', World Agroforestry Centre United Nations Avenue, Gigiri.
- Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C. & Pop, M., 2013, 'Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys', *Nature Methods* 10, 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>
- Pearce, M.M., Hilt, E.E. & Rosenfeld, A.B., 2014, 'The female urinary microbiome: A comparison of women with and without urgency urinary incontinence', *mBio* 5(4), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01283-14>
- Peters, R.P.H., Dubbink, J.H., Van der Eem, L., Verweij, S.P., Bos, M.L.A., Ouburg, S. et al., 2014, 'Cross-sectional study of genital, rectal, and pharyngeal Chlamydia and Gonorrhoea in women in rural South Africa', *Sexually Transmitted Diseases* 41, 564–569.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S.K., McCulle, S.L. et al., 2010, 'Vaginal microbiome of reproductive-age women', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) 108, 4680–4687.
- Schellenberg, J.J., Links, M.G., Hill, J.E., Dumonceaux, T.J., Kimani, J., Jaoko, W. et al., 2011, 'Molecular Definition of Vaginal Microbiota in East African Commercial Sex Workers', *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4066–4074. <https://doi.org/10.1128/AEM.02943-10>

Srinivasan, S., Hoffman, N.G., Morgan, M.T., Matsen, F.A., Fiedler, T.L., Hall, R.W. et al., 2012, 'Bacterial communities in women with Bacterial Vaginosis: High resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria', *PLoS One* 7(6), e37818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037818>

Stoll, B.J. & Anne, S., 1998, 'Maternal carriage of group B streptococci in developing countries', *The Pediatric Infectious Disease Journal* 17.6, 499–503. <https://doi.org/10.1097/00006454-199806000-00013>

Taha, T.E., Hoover, D.R., Dallabetta, G.A., Kumwenda, N.I., Mtimavalye, L.A, Yang, L.P. et al., 1998, 'Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: Association with increased acquisition of HIV', *AIDS* 12, 1699–1706. <https://doi.org/10.1097/00002030-199813000-00019>

Wiesenfeld, H.C., Hillier, S.L., Krohn, M.A., Landers, D.V. & Sweet, R.L., 2003, 'Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection', *Clinical Infectious Diseases* 36, 663–668. <https://doi.org/10.1086/367658>