

FERNAND AIMÉ GUÉDOU

**ÉTUDE DES ANOMALIES DE LA FLORE VAGINALE : FACTEURS
DE RISQUE, PRÉDICTEURS DE LA RÉCURRENCE ET
ASSOCIATION AVEC L'INFECTION À VIH CHEZ DES
TRAVAILLEUSES DU SEXE RECRUTÉES DANS UN ESSAI
CLINIQUE EN INDE ET DANS DEUX PAYS AFRICAINS**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Épidémiologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE SOCIALE ET PRÉVENTIVE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

© Fernand Aimé Guédou, 2012

Résumé:

Objectifs : Le présent travail, qui a consisté en l'analyse secondaire des données provenant des travailleuses de sexe (TS) recrutées au niveau de 2 sites Africains et 2 sites Indiens, dans le cadre de l'essai clinique sur le gel vaginal de sulfate de cellulose, avait pour objectifs : 1) d'identifier les facteurs de risque de la flore vaginale intermédiaire (FVI) et de la vaginose bactérienne (VB), 2) d'étudier l'association entre les anomalies de la flore vaginale et l'infection à VIH, 3) d'identifier les prédicteurs de la récurrence de la VB.

Méthodes : L'étude comprend deux analyses transversales et une longitudinale. Les deux analyses transversales ont exploité les données sociodémographiques, comportementales et biologiques de la visite de dépistage de 1367 participantes. La première analyse transversale a combiné les régressions logistiques polytomique et dichotomique pour examiner les facteurs de risque de la FVI en rapport avec ceux de la VB tandis que la seconde analyse a utilisé la régression log-binomiale pour étudier l'association entre les anomalies de la flore vaginale et l'infection par le VIH. L'analyse longitudinale, quant à elle, a exploité les données de base et de suivi de 440 TS enrôlées dans l'essai clinique et a utilisé le modèle de risque proportionnel de Andersen-Gill pour identifier les prédicteurs de la récurrence de la VB.

Résultats : La FVI partage avec la VB, la plupart de ses facteurs de risque ou de protection et ceci supporte l'idée que les deux ne constituent qu'une seule et même maladie. Les facteurs de risque communs à la FVI et à la BV, et particulièrement ceux qui sont plus fortement associés à la FVI qu'à la VB, sont peu révélés par la régression dichotomique regroupant la FVI et la flore normale comme catégorie de référence. Par ailleurs, la FVI est associée à l'infection à VIH aussi fortement que la VB avec respectivement des rapports de prévalences ajustés (RP_a) = 1,56 [intervalle de confiance (IC) à 95%=1,22-1,98] et RP_a=1,48 (IC à 95%=1,20-1,84). Enfin, la douche vaginale récente et l'utilisation constante de condom avec le partenaire régulier se sont révélées être les principaux prédicteurs de la récurrence de la VB avec respectivement des rapports de taux d'incidence ajustés (RTI_a)= 1,30 (IC à 95%=1,02 – 1,64) et RTI_a=0,68 (IC à 95%=0,49 - 0,93).

Conclusion : La dichotomisation des anomalies de flore vaginale isolant la FVI de la VB mérite d'être reconsidérée. La FVI devrait être considérée au même titre que la VB et traitée en tant que telle dans les stratégies de prévention qui devraient mettre l'accent sur les méfaits de la douche vaginale et l'effet protecteur de l'utilisation constante de condom avec tous les types de partenaires sexuels.

Abstract:

Objectives: The present work consisted in the secondary analysis of data from female sex workers (FSW) recruited at two African and two Indian sites, in the context of a clinical trial on the cellulose sulfate vaginal gel, and had as objectives: 1) to identify risk factors for intermediate vaginal flora (IVF) and bacterial vaginosis (BV), 2) to study the association between vaginal flora abnormalities and HIV infection, 3) to identify predictors of recurrence of BV.

Methods: The study included two cross-sectional and one longitudinal analyses. Both cross-sectional analyses used socio-demographic, behavioral and biological data from the screening visit of 1367 participants. The first cross-sectional analysis combined the dichotomous and polytomous logistic regressions to examine risk factors for the IVF in connection with those for BV, while the second analysis used the log-binomial regression to investigate the association between abnormal vaginal flora and HIV. The longitudinal analysis used baseline and follow-up data from 440 FSW enrolled in the clinical trial and used Andersen-Gill proportional hazard model to identify predictors of BV recurrence.

Results: IVF shares most of its risk or protective factors with BV, and this supports the idea that both are parts of the same disease. Risk factors common to BV and FVI, and particularly those which are more strongly associated with IVF than with BV, are unlikely to be revealed by dichotomous regressions grouping IVF and normal flora as reference category. IVF was associated with HIV infection as strongly as BV with adjusted prevalence ratios (aPR) = 1.56 [95% confidence interval (CI) = 1.22 to 1.98] and aPR = 1.48 (95% CI = 1.20 to 1.84) respectively. Finally, recent vaginal douching and consistent condom use (CCU) with regular partner proved to be the main predictors of recurrence of BV with adjusted hazard ratio (aHR) = 1.30 (95% CI = 1.02 - 1.64) and aHR = 0.68 (95% CI = 0.49 to 0.93) respectively.

Conclusion: The dichotomization of abnormal vaginal flora isolating IVF from BV needs to be reconsidered. IVF should be considered alongside BV and treated as such in preventive strategies which should focus on the adverse effects of vaginal douching and the protective effect of CCU with all types of sexual partners.

Avant-propos (Remerciements et Contributions)

Remerciements

Je voudrais avant tout remercier le Professeur Michel Alary, non seulement pour l'encadrement scientifique mais aussi pour son soutien permanent à travers ses encouragements et les différents fonds et bourses d'études qu'il m'a aidé à obtenir et qui m'ont permis de mener à bien ma formation. Je le remercie particulièrement pour la confiance qu'il a toujours placée en moi en me confiant des responsabilités au niveau de ses activités de recherche sur le terrain. Je voudrais ici lui en témoigner toute ma gratitude car ceci me procure en outre, une opportunité unique d'échanges entre mes connaissances théoriques et pratiques. Mes remerciements vont à tout le personnel enseignant et administratif du département de médecine sociale et préventive, à tout le personnel scientifique et administratif de l'URESP, à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à ma formation et/ou à la réalisation de la présente thèse, en particulier Myrto Mondor et Simon Olivier Fournier, statisticiens de l'URESP qui, avec promptitude et dévouement, ont toujours su efficacement m'assister dans les analyses statistiques des données de mes travaux de thèse.

Je remercie les organismes qui m'ont soutenu financièrement pour ma formation, en particulier le Centre de recherche pour le développement international (CRDI) à travers l'initiative pour la recherche en santé mondiale (IRSM) et le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) à travers la bourse d'étudiant au doctorat liée à la bourse de chercheur national de mon Directeur de thèse.

Je remercie mon épouse Olga, mes enfants Meryll-Steve et Marie-Anne, pour leurs affections filiales, leurs encouragements, et surtout leur patience pour supporter tout ce moment où j'ai été physiquement absent. Qu'ils voient à travers cette thèse le fruit de nos souffrances communes. Je remercie tous mes frères et sœurs, et tous mes parents pour leur soutien.

À mon ami et frère Dismand Houinato, tes conseils m'ont toujours été d'un grand secours aux moments difficiles. Sois-en remercié.

A mes amis et compagnons Luc Béhanzin, Georges Batona et Jocelyn Akakpo, je vous remercie pour votre amitié et votre soutien qui ne m'ont jamais fait défaut.

A tout le personnel du Dispensaire des infections sexuellement transmissibles (DIST) à Cotonou au Bénin et à toutes les femmes qui ont accepté librement de participer à l'essai clinique sur le microbicide et dont j'ai pu exploiter les données pour cette thèse, je témoigne toute ma gratitude. Mes remerciements vont également aux organismes qui ont financé ou commandité l'essai clinique, l'USAID, la Fondation Bill & Melinda Gates et particulièrement CONRAD qui m'a permis d'exploiter ces données pour mes travaux de thèse. Je ne saurais oublier tous ceux avec qui j'ai collaboré aussi bien au niveau national qu'international dans le cadre de l'essai clinique. Enfin, je rends grâce à Mon Seigneur qui m'a toujours assisté à travers Son Esprit-Saint.

Contributions :

J'ai contribué à différents niveaux à la réalisation de la présente thèse.

J'ai eu l'opportunité de participer aux différentes réunions de co-chercheurs pour amendement du protocole de recherche de l'essai clinique randomisé et contrôlé qui a généré les données que j'ai utilisées pour la thèse. J'ai eu à coordonner, sous la supervision du Professeur Michel Alary et pour le site du Bénin, toutes les activités de terrains dont notamment les activités préparatoires, le recrutement des participants, la collecte des données, la revue des fiches de rapport de cas (FRC), la saisie des données et les rapports d'activités mensuels. J'ai été co-auteur pour la principale publication issue de cet essai clinique. En outre, dans le cadre spécifique de la présente thèse et toujours sous la supervision de mon Directeur de recherche, le Professeur Alary, j'ai eu à étudier les bases de données des 4 sites retenues pour l'étude, à rédiger le projet de recherche que j'ai soutenu, j'ai conduit toutes les analyses statistiques, rédigé les premières versions des trois articles présentés dans la thèse et dont je suis le principal auteur. Ces premières versions sont revues par mon Directeur de recherche et les corrections prises en compte avant leur soumission aux autres co-auteurs pour amendements. Chacun de ces co-auteurs avait aussi contribué à son niveau à la collecte des données.

Le premier article identifie et compare les facteurs de risques de la flore vaginale intermédiaire (FVI) à ceux de la vaginose bactérienne (VB) et trouve que les deux partagent presque les mêmes facteurs de risque. Cet article a été soumis au journal « Sexually Transmitted Diseases ».

Le second article étudie l'association entre les anomalies de la flore vaginale (FVI et VB) et le VIH. Il a confirmé l'existence de cette association et surtout trouvé que l'association du VIH avec la FVI était aussi forte que celle avec la VB. Cet article a été publié électroniquement par le journal « Sexually Transmitted Infections » le 24 Mai 2012.

Le troisième article étudie les prédicteurs de la récurrence de la VB et a retrouvé que la toilette vaginale et la non utilisation systématique de condom lors des rapports sexuels avec le partenaire régulier constituent les principaux prédicteurs de récurrence de la VB au sein de la population étudiée. Il a été soumis au journal « Journal of Infectious Diseases ».

Table des matières

Résumé:.....	ii
Abstract:.....	iii
Avant-propos (Remerciements et Contributions).....	iv
Liste des tableaux.....	xii
Introduction.....	1
1 Chapitre 1. Problématique, état des connaissances, pertinence et objectifs généraux de l'étude.....	2
1.1 Problématique.....	2
1.2 État des connaissances sur la vaginose bactérienne.....	3
1.2.1 Définition et diagnostic de la VB.....	3
1.2.2 Étiologie de la VB.....	4
1.2.3 Les facteurs de risque de la VB.....	5
1.2.4 Association entre la VB et les IST y compris le VIH.....	6
1.2.5 Traitement de la VB et la question de la récurrence.....	8
1.2.6 Prévalence de la VB au sein des TS.....	9
1.3 Pertinence et objectifs généraux de l'étude.....	9
1.3.1 Pertinence de l'étude.....	9
1.3.2 Objectifs généraux.....	11
2 Chapitre 2. Méthodologie.....	12
2.1 Type d'étude.....	12
2.2 Cadre et populations d'étude.....	12
2.2.1 Les sites d'étude.....	12
2.2.2 Sélection des participantes pour l'étude transversale.....	12
2.2.3 Sélection des participantes pour l'étude longitudinale.....	13
2.2.3.1 Les critères d'inclusion pour l'essai clinique:.....	13
2.2.3.2 Les critères d'exclusion pour l'essai clinique.....	13
2.2.3.3 Les critères d'éligibilité pour l'étude sur la récurrence de la VB.....	14

2.3	Processus de collecte des données	15
2.3.1	Processus de collecte des données pour l'étude transversale (visite de dépistage) .	15
2.3.1.1	Les données socio-démographiques, comportementales et médicales.....	16
2.3.1.2	Les données cliniques	16
2.3.1.3	Les échantillons biologiques.....	16
2.3.2	Processus de collecte des données de l'étude longitudinale (enrôlement et visites de suivi).....	17
2.3.2.1	Description de l'intervention de l'essai (pour l'étude longitudinale)	17
2.3.2.2	Les données comportementales et médicales.....	18
2.3.2.3	Les données cliniques	18
2.3.2.4	Les échantillons biologiques.....	19
2.3.3	Les procédures de laboratoire.....	19
2.3.3.1	Le test de grossesse hCG sur urine	19
2.3.3.2	Recherche des anticorps du VIH.....	19
2.3.3.3	Le test du VIH par la « polymerase chain reaction » (PCR)	20
2.3.3.4	Le test de la syphilis.....	20
2.3.3.5	La gonorrhée et la chlamydiae	20
2.3.3.6	La vaginose bactérienne.....	20
2.3.3.7	Trichomoniose et candidose	22
2.4	Assurance et contrôle de qualité.....	22
2.5	Analyse statistique.....	23
2.5.1	L'analyse statistique commune aux deux types d'étude: la description des caractéristiques de la population.....	23
2.5.2	Analyse pour les deux études transversales	24
2.5.2.1	Analyse des facteurs de risque des anomalies de la flore vaginale.....	24
2.5.2.2	Analyse de l'association entre les anomalies de la flore vaginale et le VIH	24
2.5.3	Analyse pour l'étude longitudinale	25

2.5.3.1	Définition de certains concepts et hypothèses.....	25
2.5.3.2	Variables et modèle utilisés.....	26
2.6	Les questions de puissance statistique	26
2.6.1	Étude transversale.....	26
2.6.2	Étude longitudinale	27
2.7	Considérations éthiques:.....	31
3	Chapitre 3. Intermediate Vaginal Flora and Bacterial Vaginosis as parts of the same disease continuum: findings from an exploratory analysis among female sex workers in Africa and India.	32
4	Chapitre 4. Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants screened for a randomized controlled trial.....	58
5	Chapitre 5. Behavioural and medical predictors of bacterial vaginosis recurrence among female sex workers: longitudinal analysis from a randomized controlled trial.....	78
6	Chapitre 6. Discussion générale et conclusion	108
6.1	La flore vaginale intermédiaire et la vaginose bactérienne comme parties du continuum de la même maladie : résultats d'une analyse exploratoire chez les travailleuses du sexe en Afrique et en Inde.	108
6.2	La flore vaginale intermédiaire est associée à la prévalence du VIH aussi fortement que la vaginose bactérienne dans une étude transversale sur les participantes dépistées dans le cadre d'un essai randomisé et contrôlé	111
6.3	Les prédicteurs comportementaux et médicaux de la récurrence de la vaginose bactérienne chez les travailleuses du sexe: analyse longitudinale des données d'un essai microbicide randomisé et contrôlé.....	112
6.4	Conclusion.....	116
	Références :	116
	Annexes.....	124
	Annexes 1: Les fiches de rapport de cas (questionnaires)	124
	Annexe 1.1 : Fiche (questionnaire) pour la visite de dépistage.....	124
	Annexe 1.2: Fiche (questionnaire) pour la visite de recrutement	126
	Annexe 1.3 : Fiche de vérification des critères d'éligibilité pour l'essai clinique.....	128

Annexe 1.4: Fiche (questionnaire) pour les visites de suivi.....	129
Annexe 1.5: Fiche pour les antécédents médicaux récents	130
Annexe 1.6: Fiche pour l'examen clinique	131
Annexe 1.7: Fiche pour les examens de laboratoire (prélèvements génitaux)	132
Annexe 1.8: Fiche pour examens de laboratoire (prélèvements sanguins)	133
Annexe 1.9: Fiche pour traitement concomitant.....	134
Annexe 1.10: Fiche pour la visite finale	135
Annexe 2: Les documents de réglementation éthique:.....	136
Annexe 2.1 : Approbation du comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School (Office of Research)	136
Annexe 2.2: Première réapprobation du comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School (Office of Research).....	137
Annexe 2.3: Deuxième réapprobation du comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School (Office of Research).....	138
Annexe 2.4: Approbation du comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec	139
Annexe 2.5 : Approbation du comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec pour un amendement au projet de recherche	140
Annexe 2.6 : Première réapprobation du comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec.....	141
Annexe 2.7 : Deuxième réapprobation du comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec en français	142
Annexe 2.8 : Deuxième réapprobation du comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec en anglais.....	143
Annexe 2.9 : Fiche de documentation d'approbation de comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec	144
Annexe 2.10 : Rapport de fin de projet au comité d'éthique du Centre hospitalier <i>affilié</i> universitaire de Québec (1/2)	145
Annexe 2.11 : Fiche de documentation d'approbation du Ministère de la santé publique du Bénin	147
Annexe 2.12 : Réapprobation annuelle du comité d'éthique de la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin).....	148

Annexe 2.13 : Exemption du comité d'éthique de l'Université Laval.....	149
Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (1/6)	150
Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (1/6)	156
Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (1/11)	162
Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (1/10)	173

Liste des tableaux

Chapitre 2

Tableau 1: Système de notation (0 à 10) des frottis vaginaux colorés au Gram^a 21

Tableau 2 : Calcul de la puissance pour la détection d'une association statistiquement significative entre la FVI ou VB et leurs potentiels facteurs de risque..... 28

Tableau 3: Calcul de la puissance pour la détection d'une association statistiquement significative entre la FVI ou la VB et l'infection à VIH. 29

Tableau 4: Calcul de la puissance pour la détection d'une association statistiquement significative entre la récurrence de la VB et ses prédicteurs potentiels. 30

Chapitre 3

Table 1: Characteristics of 1367 female sex workers screened at 2 African and 2 Indian sites prior to enrolment in a microbicide trial..... 47

Table 2: Association between vaginal flora abnormalities (as polytomous response variable) and demographical, behavioral and medical factors among 1367 female sex workers: bivariate analysis with control for study site 49

Table 3 : Association between vaginal flora abnormalities (as polytomous and then as dichotomous response variable) and demographical, behavioral and medical factors among 1367 female sex workers: bivariate analysis with control for study site 53

Table 4 : Final models for the multivariate analysis of risk factors of vaginal flora abnormalities (modelised as polytomous and then dichotomous response variable) among 1367 female sex workers screened at 2 African and 2 Indian sites 56

Chapitre 4

Table 1 :: Characteristics of 1367 female sex workers screened at two African and two Indian sites prior to enrolment in a microbicide trial..... 71

Table 2 : : Association between HIV and socio-demographic, behavioral and medical factors among 1367 female sex workers recruited at two African and two Indian sites: bivariate analysis (controlling for site for each factor) 73

Table 3: Results from the multivariate analyses of the association between vaginal flora abnormalities and HIV infection among 1367 female sex workers recruited at two African and two Indian sites.....	76
---	----

Chapitre 5 :

Table 1 : Baseline Characteristics of 440 Female Sex Workers followed-up in a Microbicide Trial at 2 African and 2 Indian Sites	95
---	----

Table 2 : Association between baseline characteristics and incidence of bacterial vaginosis recurrence among 440 female sex workers followed-up in a microbicide trial: hazard ratios (unadjusted vs. adjusted for the study site).....	96
---	----

Table 3 : Association between time-varying factors and incidence of bacterial vaginosis recurrence among 440 female sex workers followed-up in a microbicide trial: hazard ratios (unadjusted vs. adjusted for the study site).....	101
---	-----

Table 4 : Baseline and time-varying factors predicting bacterial vaginosis recurrence among 440 female sex workers followed-up in a microbicide trial: adjusted hazard ratios (Multivariate model)	104
---	-----

Introduction

Les anomalies de la flore vaginale consistent en des perturbations de la flore vaginale normale et caractérisées par un remplacement plus ou moins prononcé des lactobacilles par une variété de bactéries anaérobies et des mycoplasmes (1). Ces perturbations peuvent être de degré intermédiaire, correspondant à la flore vaginale intermédiaire (FVI), ou être plus profondes, constituant la vaginose bactérienne (VB). La VB est aujourd'hui l'infection génitale féminine la plus fréquente au monde (1), mais elle a une prédominance dans les pays en voie de développement. À côté de sa prévalence élevée, la VB est associée à plusieurs problèmes de santé importants tels que les infections génitales hautes (2, 3), l'accouchement prématuré (4-7), les avortements spontanés (8, 9), les échecs de fécondations in-vitro (10-13), et les infections sexuellement transmissibles incluant le VIH (14, 15).

Les deux défis majeurs que pose la VB à la communauté scientifique sont celui de son étiologie qui demeure jusqu'à présent énigmatique et celui de sa récurrence, le second pouvant même être la conséquence du premier. À défaut d'un traitement efficace, les stratégies de contrôle de la VB se limitent aujourd'hui à la prévention, ce qui nécessite une meilleure connaissance des facteurs de risque de la maladie et surtout de sa récurrence. Mais les études sur les facteurs de la récurrence de la VB sont rares car nécessitant un suivi relativement long avec des visites régulières et assez rapprochées. Par ailleurs, alors que l'attention a été depuis longtemps essentiellement portée sur la VB, des études récentes ont montré que les perturbations de niveau intermédiaire (FVI) sont également associées à certains des effets néfastes reconnus à la VB dont notamment l'infection par le VIH (16, 17). Il importe donc de s'assurer que les moyens préventifs mis en œuvre contre la VB sont aussi valables pour la FVI. La présente étude a donc comme objectifs d'examiner les facteurs de risques de la FVI par rapport à ceux de la VB, de confirmer l'association entre la FVI et l'infection par le VIH et de déterminer les facteurs prédictifs de la récurrence de la VB.

1 Chapitre 1. Problématique, état des connaissances, pertinence et objectifs généraux de l'étude

1.1 Problématique

La vaginose bactérienne (VB) est la plus fréquente des infections des voies génitales féminines à travers le monde et en particulier dans les pays en développement (1, 18). Sa prévalence se situe entre 9% et 18% dans les études cliniques effectuées au Royaume-Uni (18, 19), atteint 29% selon les enquêtes menées en population générale aux États-Unis (20), et dépasse 50% dans les populations rurales en Ouganda (21, 22). Mais à côté de sa prévalence, c'est le fardeau de la VB, en termes de santé publique, qui est plus préoccupant, faisant l'objet de nombreux débats et en particulier avec plus d'intérêt depuis l'avènement de l'infection à VIH. La première vague de ces débats était concentrée sur le rôle de la VB dans les infections des voies génitales hautes telles que le syndrome inflammatoire pelvien (SIP) (2, 3), et en particulier dans les issues défavorables de la conception et de la grossesse telles que les fausses couches, les menaces d'accouchements prématurés, la prématurité (4-6, 8, 9) ou les échecs de la fécondation in vitro (FIV) (10-13). La deuxième vague des débats se focalise sur le rôle de la VB dans la survenue ou l'évolution clinique des infections sexuellement transmissibles (IST) (trichomoniose, chlamydiae, gonococcie (14, 15, 23) et plus récemment Herpes Simplex Virus de type 2 (HSV-2) (24, 25) et infection par le VIH) (26-31).

Bien que l'effet causal de la VB sur les infections des voies génitales hautes ou les issues défavorables de la grossesse reste encore à être prouvé, son rôle comme facteur de risque dans l'acquisition du VIH par les femmes a récemment été fortement suggéré par certaines études prospectives (32, 33). En outre, des données supplémentaires soutiennent son rôle éventuel dans la transmission du VIH de la femme vers l'homme, du fait que les femmes infectées par le VIH et souffrant de VB excrètent beaucoup plus d'ARN du VIH dans leurs sécrétions vaginales que leurs homologues qui ne souffrent pas de VB (34-38). Ceci vient d'être confirmé par une étude prospective récente sur des couples séro-discordants qui a trouvé une association entre la VB et la transmission du VIH de la femme à l'homme avec un rapport de taux d'incidence (RTI) ajusté de 3,17 [intervalle de confiance (IC) à 95%=1,37-7,33] (39).

Par ailleurs, pendant longtemps, les études se sont polarisées sur la VB, accordant très peu d'attention à la FVI. Cette polarisation concerne aussi bien la recherche des effets adverses de la VB que celle de ses facteurs de risques. Et, à ce jour, il n'est pas connu si la FVI a les mêmes facteurs de risque que la VB. La faible attention accordée à la FVI se traduit également par la classification communément utilisée dans la plupart des études antérieures et regroupant la FVI et la flore vaginale normale comme catégorie de référence. Aussi, le caractère exclusivement biologique du diagnostic de la FVI ne fournit pas assez d'arguments pour sa prise en charge thérapeutique, d'autant plus que celle de la VB asymptomatique fait encore l'objet de vives controverses. Pourtant, des études récentes ont trouvé que la FVI était associée (16, 40-42), (et dans certains cas, aussi fortement que la VB) (41), à certains effets adverses associés à la VB et cités plus-haut. Il importe donc de confirmer ces associations par d'autres études et aussi de vérifier si les facteurs de risque de la FVI sont les mêmes que ceux de la VB.

1.2 État des connaissances sur la vaginose bactérienne

1.2.1 Définition et diagnostic de la VB

La vaginose bactérienne est un syndrome polymicrobien dans lequel les lactobacilles de la flore vaginale normale, en particulier ceux produisant du peroxyde d'hydrogène, sont remplacés par une variété de bactéries anaérobies et des mycoplasmes (1). La symptomatologie clinique de la VB est caractérisée par des pertes vaginales avec « odeur de poisson », des démangeaisons, des brûlures et des douleurs vaginales. Cependant, ces symptômes peuvent être rencontrés dans d'autres types d'infection vaginale. Plus de 50% des patientes sont asymptomatiques (43) et à ce jour aucun agent microbien unique n'a encore été isolé comme causant la VB. D'où la définition clinique proposée par Amsel et al. en 1983 (44) et qui demandait que trois des quatre critères suivants soient remplis:

- 1- pertes vaginales fluides, homogènes, uniformément adhérentes, blanches;
- 2- pH vaginal > 4,5;
- 3- odeur de poisson à l'addition d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10% aux sécrétions vaginales;
- 4- 20% de « clues cells » (cellules épithéliales dont les marges sont obscurcies par des bactéries) à l'examen microscopique des frottis vaginaux.

Plus tard, en 1991, Nugent et al. (45) ont renforcé le diagnostic microscopique par l'établissement d'un score basé sur le profil de la flore vaginale à la coloration de Gram : plus les lactobacilles sont rares et les bactéries polymorphes prédominantes, plus le score est élevé (voir tableau 1). Selon l'échelle, une flore vaginale est classée comme :

- normale lorsque le score est compris entre 0 et 3;
- intermédiaire pour un score entre 4 et 6;
- caractéristique de la vaginose bactérienne pour un score de 7 à 10 (49).

En utilisant le score de Nugent comme référence (Gold standard), la sensibilité et la spécificité de la méthode de Amsel sont respectivement de l'ordre de 35–56% et 96–99% (46, 47). La méthode basée sur la biologie moléculaire est pour le moment presque exclusivement utilisée dans le cadre de la recherche sur l'étiologie de la vaginose bactérienne et n'est pas encore largement validée pour son utilisation dans le diagnostic positif de la VB.

1.2.2 Étiologie de la VB

La cause réelle de la VB a longtemps échappé aux scientifiques et demeure encore inconnue. Les difficultés à identifier un seul agent étiologique de la VB ont conduit au consensus actuel temporaire d'une origine polymicrobienne. *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides* spp. et *Mycoplasma hominis* ont longtemps été considérés comme les principaux agents microbiens ou prédominants de la VB (48, 49). Toutefois, avec l'avènement de la biologie moléculaire, certains auteurs soutiennent que les espèces bactériennes prédominantes dans la VB sont plutôt certains anaérobies fastidieux (non cultivables). Ces agents microbiens fastidieux comprennent 3 bactéries du genre *Clostridiale* nommées «Bacterial vaginosis associated bacteria» (Bactéries associées à la vaginose bactérienne) types 1, 2 et 3 (BVAB1, 2, 3), *Peptoniphilus lacrymalis*, *Megasphaera* phylotype 2 et *Atopobium vaginae* (50-53).

Un argument supplémentaire utilisé par les défenseurs de ce point de vue est le fait que, à partir de leurs études, ces agents ont été ceux qui ont principalement disparu ou dont la concentration a diminué de façon substantielle chez les femmes guéries (par rapport aux femmes avec VB persistante) (54, 55).

Ainsi, tout en reconnaissant l'origine probablement polymicrobienne de la maladie, l'état actuel des connaissances concernant l'étiologie de la VB place de nouveaux microbes anaérobies fastidieux comme les agents les plus susceptibles d'être prédominants dans la maladie.

Cependant, il y a déjà un début de critique contre cette position d'autant plus que Hale et al. (56) estiment que les conclusions de l'une des études de référence ont été biaisées par l'utilisation de sécrétions vaginales libres (non prélevées directement sur la paroi vaginale). Ils ont argumenté que les sécrétions vaginales libres n'étaient pas le matériel approprié à prélever, car elles contiennent très peu le biofilm adhérent aux cellules épithéliales vaginales et qui est principalement composé de *G. vaginalis*. Ainsi, selon ces auteurs, *G. vaginalis* est toujours le principal agent de la VB. Il est donc nécessaire de standardiser les procédures d'échantillonnage et les méthodes de laboratoire pour parvenir à un consensus quant aux agents réellement prédominants. Néanmoins, quels que soient les agents prédominants, il resterait à démontrer s'ils ne constituent qu'une flore simplement colonisatrice associée à la survenue de la maladie ou s'ils déterminent réellement sa pathogénie, puisque celle-ci peut ne pas être liée à la prédominance quantitative.

En résumé, le nombre et le type d'agents microbiens considérés comme étant impliqués dans la VB est en constante évolution, mais à ce jour, aucun agent étiologique unique n'a donc été identifié. En ce qui concerne le diagnostic de la VB, la détection par PCR (polymerase chain reaction) d'une ou plusieurs espèces bactériennes fastidieuses est considérée comme un indicateur plus fiable de la VB que la détection des bactéries telles que *G. vaginalis* puisque que la première a une sensibilité de 95,9% et une spécificité de 93,7% contre respectivement 97,3% et 45,5% pour la dernière, en utilisant le score de Nugent comme référence (57).

1.2.3 Les facteurs de risque de la VB

De fortes associations ont été trouvées entre la VB et certains facteurs démographiques, comportementaux et biologiques, suggérant leur rôle comme facteurs de risque de la maladie. Mais le caractère transversal de la plupart de ces études constitue la principale réserve pour une telle interprétation (58-63). Cependant, certaines études récentes prospectives ont commencé à faire la lumière sur l'histoire naturelle de la VB et l'importance de certains facteurs de risque suspectés est devenue plus claire (64-68). Les douches vaginales, en particulier avec des tissus (morceaux de vêtements usés) ou du savon, les partenaires sexuels multiples, les changements ou acquisition de nouveaux partenaires sexuels, les rapports sexuels non protégés par le condom, le fait d'avoir des partenaires sexuels féminins, le milieu vaginal alcalin, les saignements génitaux et les rapports sexuels oro-génitaux, la consommation de tabac et d'alcool ont toujours été signalés

comme des facteurs de risque de la VB. D'autres facteurs sont encore en discussion. Il s'agit notamment de l'infection à VIH (26, 62) et des autres IST (HSV-2, trichomoniose) (24, 25); en revanche, la candidose génitale a été notée dans certaines études comme ayant un effet protecteur contre la VB (63, 68). La contraception hormonale serait également protectrice contre la VB et agirait par plusieurs mécanismes (69, 70). Les œstrogènes contenus dans les contraceptifs oraux augmenteraient le niveau de glycogène dans les cellules épithéliales vaginales. Ce glycogène serait ensuite transformé en acide lactique par les lactobacillus vaginaux, contribuant ainsi à maintenir le pH vaginal bas et à prévenir le développement des bactéries associées à la VB (69). Les contraceptifs à base de progestatifs réduiraient le flux menstruel, ce dernier s'étant révélé associé à un risque accru de VB (70).

1.2.4 Association entre la VB et les IST y compris le VIH

Plusieurs études ont montré une relation entre la VB et les IST, bien que le caractère transversal de la plupart d'entre elles exclût toute interprétation causale. Uma et al. ont trouvé chez les travailleuses du sexe (TS) à Chennai (Inde) que la VB était liée à une infection concomitante par le HSV-2 [risque relatif (RR) = 1,3, $p < 0,001$], le *Trichomonas vaginalis* (RR = 1,5; $P = 0,01$), le *Treponema pallidum* (RR = 2,8; $P < 0,001$) et le VIH (RR = 4,1; $P = 0,01$) (23). D'après une étude menée à Pittsburgh, les femmes ayant une VB étaient plus susceptibles d'avoir un test positif pour le *Neisseria gonorrhoeae* [rapport de cote (RC) = 1,7, IC 95%: 1,4 - 1,9] ou le *Chlamydia trachomatis* (RC = 3,4 IC 95%: 1,5 - 7,8), que celles ayant une flore vaginale normale (71). La combinaison de la VB avec la leucorrhée s'est également révélée être fortement liée à l'infection par le *N. gonorrhoeae* ou le *C. trachomatis* (RC = 3,8, IC 95%: 1,3 - 11,6) (72). Parmi les femmes fréquentant les cliniques des IST et de soins de santé primaires, Moi a constaté que la VB était positivement associée à la gonococcie et la chlamydie, mais négativement associée à la candidose et aux infections par les virus du papillome humain (VPH) (15). Quelques études prospectives suggèrent la direction de la causalité. Considérant les IST comme l'issue, une étude prospective chez les TS au Kenya a révélé que la VB prévalente était associée à un taux accru d'infection à *C. trachomatis* (RTI = 2,1, IC 95%: 1,1 - 3,8) et *T. vaginalis* (RTI = 8,0; IC 95% : 3,2 - 19,8) (25). En revanche, une étude multisite menée aux États-Unis n'a pas pu démontrer une association significative entre la VB et une infection gonococcique/chlamydiale incidente (RR ajusté = 1,52, IC 95%: 0,74 - 3,13) (73). Cependant, cette étude a montré une association entre la

VB au début de l'étude (baseline) et les infections gonococcique/chlamydiale concurrentes (RC ajusté = 2,83, IC 95% :1,81- 4,42) (73). Un fait intéressant est que cette relation transversale observée entre la VB et les infections gonococciques/chlamydiales concurrentes au départ a persisté pour les analyses transversales effectuées à toutes les visites de suivi. Considérant la VB comme issue, les auteurs de la première étude (25) ont également observé une association prospective entre l'infection prévalente à HSV-2 et les nouveaux épisodes de VB. De même, Nagot et al. (2007), ont trouvé chez les TS au Burkina Faso que l'infection prévalente à HSV-2 (RR = 1,73, IC 95%: de 1,12 - 2,65) et *T. vaginalis* (RR = 1,5, IC 95%: 1,0 - 2,3) étaient associées à la survenue subséquente de VB (24).

En ce qui concerne l'association entre la VB et le VIH, une étude transversale impliquant les TS Thaï a trouvé une association positive (RC = 4,0, IC 95% :1,7-9,4), mais seulement pour les VB diagnostiquées cliniquement et non pas sur la base de la coloration de Gram (74). Un rapport de prévalence de 1,40 de VB (IC 95% :1,05-10,87; $p = 0,026$) a été trouvé quant au statut VIH des femmes venant en consultations prénatales à un hôpital de référence au Cameroun (75). Une étude transversale communautaire en milieu rural à Rakai en Ouganda a trouvé que la flore vaginale anormale (score de Nugent ≥ 4) a été associée une prévalence élevée du VIH (RC = 1,5, IC 95%: 1,18 à 1,89 et 2,08, IC 95%: 1,48 à 2,94, respectivement pour la VB modérée et grave) (21). Toutefois, cette association n'a été trouvée que chez les femmes de moins de 40 ans. Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que, malgré le caractère transversal de l'étude, cette restriction de l'association aux jeunes femmes (chez qui l'infection à VIH était plus susceptible d'être récente) suggère que la VB peut augmenter la susceptibilité à l'infection à VIH (21). Une étude prospective a révélé une association entre la flore vaginale anormale et l'acquisition du VIH avec un RTI de 1,9 (IC 95%: 1,1-3,1) (32). Considérant la VB comme issue, Nagot et al. (2007) ont constaté que la séropositivité au VIH à l'entrée dans une étude était associée à un risque accru de VB incidente (RR = 1,76, IC 95%: 1,30 - 2,40) (24). En revanche, une étude longitudinale basée sur le statut VIH, a conclu que l'infection à VIH est susceptible d'augmenter le risque de VB prévalente ou persistante mais pas celui de VB incidente (26). De même, McClelland et al. n'ont pas trouvé une association significative entre le VIH et la VB incidente dans leur étude prospective (RTI = 1,1, IC 95%: de 0,9 - 1,3, $p = 0,3$) (76).

Toutes ces études ont ajusté pour les facteurs de risque communs de la VB et des IST. Enfin, une méta-analyse de 23 études, stratifiée selon le type d'étude et le niveau de risque de la

population, a conclu que la VB était constamment associée à un risque accru d'infection à VIH (33). L'estimé résumé des études d'incidence du VIH était RR = 1,61 IC 95%: 1,21 - 2,13. La forte hétérogénéité entre les études de prévalence ne permettait pas la sommation de leurs estimations. Elle a toutefois varié de 0,77 à 3,70 (33). Un fait intéressant était que cette association semblait plus forte chez les femmes enceintes.

1.2.5 Traitement de la VB et la question de la récurrence.

Les nitro-imidazoles (métronidazole et récemment tinidazole) et la clindamycine sont les médicaments antimicrobiens typiques utilisés pour traiter la VB, par voie orale ou locale. Cela découle du postulat de rôle principal des anaérobies dans sa pathogénie. Avec le métronidazole par voie orale pendant 7 jours ou le métronidazole vaginal pendant 5 jours, on observe une amélioration des symptômes chez 83% à 87% des femmes au bout de 2 à 3 semaines (77, 78). Bien que la réponse à court terme au traitement soit acceptable, la VB persiste ou réapparaît chez 11% à 29% des femmes à un mois (77-79) et les taux de récurrence à long terme dépassent 70% (80-82). En raison du taux élevé de récurrence, plusieurs études ont été menées pour examiner la sensibilité des bactéries associées à la VB aux antimicrobiens. Malheureusement, les méthodes utilisées dans ces études diffèrent au niveau des régimes (dose, voie d'administration et durée) ainsi que dans les critères d'évaluation (guérison clinique ou microbiologique, délai pour le test de guérison), ne permettant pas alors de tirer une conclusion solide (82-85). Néanmoins, les nitro-imidazoles semblent être le consensus actuel pour le traitement puisque, si la clindamycine a une plus grande activité que le métronidazole contre *G. vaginalis* et *A. vaginae*, elle est active sur tous les lactobacilles (principale composante de la flore vaginale normale) (86).

Une étude récente a révélé que la thérapie par le métronidazole, à la fois par voie orale et vaginale chez les femmes enceintes a entraîné une diminution significative des concentrations de la plupart des bactéries anaérobies associées à la VB, à l'exception de *Leptotrichia*, des espèces de *Sneathia* et des BVAB1 (87). La même équipe de recherche a retrouvé dans une autre étude (54) que la persistance de la VB est fortement corrélée avec la faible diminution de la concentration de certaines espèces de bactéries anaérobies, à savoir BVAB1, 2, 3, *Leptotrichia*, espèces de *Sneathia*, *A. vaginae* et la bactérie *Megasphaera*-like. Les auteurs ont indiqué que des études complémentaires sont en train d'être menées pour explorer le mécanisme de cet échec.

En attendant, les tentatives pour améliorer le taux de guérison et réduire la fréquence des récurrences sont de plus en plus orientées vers une plus longue exposition au traitement avec des régimes répétés (traitement présomptif périodique) ou prolongés (traitement suppressif), plutôt que la révision des produits, de la posologie ou la voie d'administration. Un essai randomisé a montré que l'administration mensuelle par voie orale de 2 g de métronidazole a réduit l'incidence de la VB (RR ajusté = 0,55, IC 95%: 0,49 à 0,63) (88). Certains auteurs suggèrent l'utilisation de lactobacilles probiotiques (seul ou comme adjuvant au métronidazole) (89-91).

Il apparaît donc que, à moins que la véritable cause de la VB soit identifiée, les scientifiques ne font qu'avancer à tâtons dans leur recherche d'un traitement efficace contre la maladie.

1.2.6 Prévalence de la VB au sein des TS.

Les données sur la prévalence de la VB chez les TS sont disparates avec une très large variation des chiffres. Ceci est dû en partie au problème de diagnostic, certaines études utilisant des critères de Amsel, d'autres le score de Nugent ou même des critères de biologie moléculaire. Les populations étudiées varient aussi, les participantes pouvant être à risque modéré ou élevé, symptomatiques ou non, infectées par le VIH ou non. Ainsi, des études impliquant des travailleuses du sexe en Afrique sub-saharienne ont trouvé des prévalences variant de 26% à 71% avec une majorité autour de 50% (24, 25, 68, 92). Les chiffres disponibles pour l'Inde varient de 13% à 45% (23, 93).

1.3 Pertinence et objectifs généraux de l'étude

1.3.1 Pertinence de l'étude

En Afrique au sud du Sahara, la VB affecte probablement 20 à 50% des femmes et les chiffres pourraient même atteindre 70% dans certains groupes particuliers tels que les travailleuses du sexe (TS) (92). Par conséquent, avec l'association retrouvée entre la VB et le VIH, même une légère augmentation du risque relatif de transmission et/ou d'acquisition du VIH par rapport à la VB serait traduite en un important risque attribuable à la VB au sein de cette sous-population. En outre, considérant le rôle des groupes-noyaux tels que les TS dans la dynamique de l'infection à VIH dans les pays en développement, notamment ceux à épidémie concentrée (94-96), une forte prévalence de la VB et en particulier sa fréquente récurrence au sein d'un tel groupe à haut risque

feraient de ce dernier, une source extrêmement puissante de réalimentation de l'épidémie de VIH dans ces pays. Intervenir sur la VB au sein des TS pourrait donc avoir un impact considérable sur la propagation de l'infection à VIH dans ces pays. Ainsi, comme certains auteurs l'ont déjà souligné (1, 33), le contrôle de la VB devrait être alors une priorité de santé publique dans ces pays.

Considérant que la flore vaginale intermédiaire (FVI) est également de plus en plus impliquée dans les effets néfastes reconnus à la VB, il faudra alors que les stratégies de contrôle de la VB, pour être efficaces, envisagent alors d'inclure la FVI. Ceci requiert alors une meilleure connaissance de cette dernière et en particulier de ses facteurs de risque. Ceci est d'autant plus important que dans les pays à ressources limitées où la prise en charge des infections génitales en général est essentiellement basée sur l'approche syndromique, le caractère exclusivement biologique du diagnostic de la FVI pourrait faire qu'elle évolue inaperçue et causant ainsi, à bas bruit, de sérieuses conséquences.

Mais dans les faits, le contrôle de la VB au sein des TS dans les pays en développement, constitue un défi unique parce que les mesures préventives proposées et qui visent les principaux facteurs de risque de la VB, tels que les douches vaginales et les multiples / nouveaux partenariats sexuels (97, 98), ne sont pas très acceptables pour cette population en raison de leurs activités et pratiques culturelles. D'où le traitement présomptif périodique proposé par certains auteurs (80, 88, 99, 100). Toutefois, le rapport coût-efficacité de cette stratégie est faible, en raison de la fréquence élevée de la récurrence (101, 102). À la lumière de ce qui précède, la compréhension des prédicteurs de la récurrence de la VB au sein des TS pourrait donc contribuer à cibler plus efficacement certains sous-groupes pour des actions préventives incluant le traitement présomptif, dans la perspective de la prévention du VIH. Mais à notre connaissance, les données sur la récurrence de la VB chez les TS sont rares en Afrique sub-saharienne et en Inde où se trouvent les quatre sites concernés par notre étude (Cotonou au Bénin, Kampala en Ouganda, Chennai et Mudhol/Jamkhandi en Inde). En outre, à ce jour, aucune donnée n'est publiée sur la VB au Bénin. La présente étude se propose donc de fournir des informations manquantes mais pourtant importantes quant à la pertinence du contrôle de la VB au sein des travailleuses du sexe comme une stratégie originale et jusqu'ici inexploitée de lutte contre l'épidémie de VIH dans les pays en développement.

Le but de cette étude est donc de déterminer les prévalences respectives de la FVI et de la VB, d'identifier leurs facteurs de risque, d'examiner leurs associations avec l'infection prévalente à VIH chez les travailleuses du sexe dépistées dans le cadre de l'essai de microbicide phase III commandité par CONRAD, VA, USA (103), et d'identifier les facteurs prédictifs de la récurrence de la VB chez les femmes enrôlées dans les 2 sites Africains et 2 sites Indiens.

1.3.2 Objectifs généraux

Les objectifs généraux de l'étude sont de :

- 1) Déterminer les prévalences respectives de la FVI et de la VB et identifier les facteurs associés à la FVI, en rapport avec ceux communément reconnus pour la VB. Nous allons étudier les facteurs de risque qui sont communs à la fois à la FVI et la VB et ceux qui leur sont éventuellement spécifiques. Nous allons également analyser l'implication de ces associations, quant à la catégorisation à adopter dans l'étude des facteurs de risque de la VB.
- 2) Etudier l'association entre les anomalies de la flore vaginale (FVI et VB) et l'infection à VIH. Ceci permettra de savoir la part de chacun des deux niveaux de perturbations de la flore vaginale dans l'association avec l'infection à VIH.
- 3) Identifier les facteurs prédictifs (y compris l'utilisation du gel vaginal de sulfate de cellulose) de la récurrence de la VB chez les TS enrôlées dans l'essai sur le sulfate de cellulose. Ceci permettra de mieux cibler les groupes à risque de récurrence pour des interventions préventives y compris le traitement présomptif périodique.

2 Chapitre 2. Méthodologie

2.1 Type d'étude

La présente étude, utilisant les données collectées dans le cadre d'un essai randomisé contrôlé contre placebo en double aveugle de phase III, comprend deux parties:

- la partie transversale qui correspond à la phase de dépistage de l'essai clinique;
- la partie longitudinale qui correspond aux phases d'enrôlement et de suivi de l'essai clinique.

2.2 Cadre et populations d'étude

2.2.1 Les sites d'étude

De Juillet 2005 à Janvier 2007, 2985 travailleuses du sexe ont été dépistées dont 1428 enrôlées dans l'essai clinique randomisé contrôlé par placebo pour évaluer l'effet du gel vaginal de sulfate de cellulose 6% (SC 6%) sur la transmission de l'homme à la femme de l'infection à VIH (103).

Cinq sites, localisés en Afrique du Sud, en Ouganda, au Bénin et en Inde (2 sites), ont été impliqués dans cet essai commandité par CONRAD. Les femmes ont été recrutées au Conseil de recherches médicales de Durban en Afrique du Sud; à l'hôpital Mulago (Université de Makerere) à Kampala en Ouganda; dans une clinique communautaire et une clinique IST à Cotonou au Bénin, au centre de soins YRG à Chennai en Inde, et dans les cliniques de Mudhol et Jamkhandi dans l'état de Karnataka en Inde (en collaboration avec le Karnataka Health Promotion Trust de Bangalore).

Par souci de comparabilité des méthodes de laboratoire utilisées pour le diagnostic de la VB, la présente étude a été limitée aux participantes des sites de Cotonou, de Kampala, de Chennai et de Mudhol / Jamkhandi. Ces sites ont dépisté un total de 1508 femmes dont 822 ont été enrôlées dans l'essai clinique.

2.2.2 Sélection des participantes pour l'étude transversale

Les participantes potentielles ont été informées de l'étude par les pairs éducateurs et les assistants sociaux.

Pour l'étude transversale, nous avons inclus toutes les femmes qui s'étaient présentées comme potentielles participantes pour l'essai de CONRAD sur le SC 6%, qui étaient âgées de 18 ans ou plus et qui avaient donné leur consentement éclairé écrit pour le dépistage. Elles étaient au total 1508 pour les sites de Cotonou, de Kampala, de Chennai et de Mudhol / Jamkhandi. De celles-ci, 1367 avaient des données disponibles pour la vaginose bactérienne et ont donc été incluses dans les 2 études transversales.

2.2.3 Sélection des participantes pour l'étude longitudinale

Pour l'étude longitudinale, nous avons inclus les femmes qui répondaient aux critères d'admissibilité de l'essai clinique (voir la liste ci-dessous) et ont été effectivement enrôlées dans l'essai.

2.2.3.1 Les critères d'inclusion pour l'essai clinique:

- Avoir la volonté et être en mesure de donner son consentement éclairé pour l'enrôlement;
- Avoir au moins 18 ans,
- Avoir une moyenne d'au moins trois rapports sexuels par voie vaginale par semaine, avoir eu au moins trois partenaires sexuels différents au cours des trois derniers mois, et prévoir poursuivre ce comportement pour toute la durée de participation à l'étude;
- Accepter d'être randomisée ;
- Accepter d'utiliser le produit selon les directives de l'étude ;
- Accepter de respecter le calendrier de suivi et les procédures de l'étude ;
- Être séronégatives pour le VIH ;
- Accepter de ne pas utiliser un spermicide, un contraceptif ou un lubrifiant vaginal pendant l'étude.

2.2.3.2 Les critères d'exclusion pour l'essai clinique.

- Avoir des antécédents de réactions indésirables aux spermicides ou aux produits contenant du latex

- Etre enceinte ou anticiper un désir de grossesse au cours des 12 mois de participation
- Être un utilisateur connu de drogues injectables
- Être déjà participante d'un autre essai clinique ou avoir déjà participé ou avoir été dépistée pour la présente étude ;
- Toute condition (sociale ou médicale) qui, de l'avis de l'investigateur, rendrait la participation à l'étude dangereuse ou compliquerait l'interprétation des données.

Dans le cas où une participante avait une infection génitale curable (candidose, vaginose bactérienne, trichomoniose, syphilis, gonococcie ou chlamydiae) au moment du dépistage ou de l'enrôlement, elle était traitée le plus tôt possible (de préférence avec un traitement à dose unique et par voie orale si c'était au moment de l'enrôlement). Cependant, puisque l'objectif principal de l'étude parente était l'effet du gel sur l'infection à VIH, l'éligibilité à l'enrôlement était fondée sur la séro-négativité au VIH. Ainsi, certaines participantes étaient recrutées, soit tout en étant sous traitement, soit en attente de traitement pour ces infections génitales. Un total de 822 femmes a été enrôlé dans l'essai clinique sur les 4 sites retenus.

2.2.3.3 Les critères d'éligibilité pour l'étude sur la récurrence de la VB

L'établissement de ces critères a requis la définition de certains concepts et hypothèses.

Définition de concepts et hypothèses :

- Le statut de VB: Une femme était considérée comme ayant la VB à un moment donné si le score de Nugent obtenu à partir de l'écouvillon vaginal prélevé à ce moment-là était égal ou supérieur à 7, indépendamment des symptômes.
- VB traitée: Nous avons supposé qu'un épisode de VB était traité chaque fois qu'il y avait une documentation de la prescription et / ou de la fourniture de médicaments à la dose et la durée prescrites par les lignes directrices locales pour le traitement de la VB, lors de la visite où le prélèvement avait été fait (sur la base alors de l'approche syndromique) ou au prochain contact avec la femme.
- « traitement efficace de VB » : un traitement de VB était jugé efficace lorsqu'il correspond à l'un des régimes suivants :
 - métronidazole oral à la dose journalière d'au moins 800 mg pour au moins 5 jours;

- métronidazole en ovule vaginal de 500 mg par nuit pour au moins 5 jours ;
- tinidazole à la dose journalière d'au moins 1000 mg pour au moins 3 jours;
- tinidazole à la dose journalière d'au moins 2000 mg pour au moins 1 jour.

Ces différents régimes étaient aussi en conformité avec les directives de « British Association for Sexual Health & HIV (BASHH) 2006» en vigueur pendant l'étude (104).

- VB guérie : un épisode de VB est considéré guéri lorsqu'il est suivi d'un résultat négatif pour le test de VB (qu'un traitement soit objectivé ou non) ou traité comme décrit ci-dessus, la guérison étant considérée survenir dans ce dernier cas à partir du 7^{ième} jour du début du traitement.

Critères d'éligibilité pour l'étude sur la récurrence de la VB :

Une femme recrutée dans l'essai clinique est éligible pour l'étude sur la récurrence de la VB si elle rencontre les critères suivants :

- avoir eu, au cours de son suivi (y compris la visite pour l'enrôlement), au moins un épisode de VB suivi de:
 - o un « traitement efficace » de VB commencé il y a au moins 7 jours et par la suite au moins une visite au cours de laquelle le test de Nugent a été fait ;
 - o ou une visite au cours de laquelle un résultat négatif de VB a été obtenu.

Sur les 822 femmes recrutées dans l'essai clinique, 440 répondaient à ces critères d'éligibilité, constituant ainsi l'échantillon pour l'étude sur la récurrence de la VB.

2.3 Processus de collecte des données

2.3.1 Processus de collecte des données pour l'étude transversale (visite de dépistage)

Lors de la visite de dépistage, les femmes, après avoir donné un consentement éclairé écrit (pour le dépistage), subissaient un entretien et un examen gynécologique. Les échantillons biologiques étaient également recueillis.

2.3.1.1 Les données socio-démographiques, comportementales et médicales

Lors de la visite de dépistage, un questionnaire était administré aux participantes sur leur âge, l'état matrimonial, le nombre d'années de scolarité, la profession, la parité, l'utilisation de contraceptifs, la douche vaginale (le produit et la raison), les antécédents d'IST et les comportements sexuels tels que le nombre de partenaires sexuels masculins dans les 3 derniers mois (total et nouveaux), le nombre moyen de rapports sexuels vaginaux par semaine, et celui de la semaine dernière, l'utilisation du préservatif lors du dernier rapport vaginal et la pratique de rapports sexuels oraux et/ou anaux dans les 30 derniers jours.

2.3.1.2 Les données cliniques

Lors de la visite de dépistage, les participants subissaient un examen pelvien au spéculum suivi du palper bi-manuel. Le pH vaginal était mesuré par le clinicien en maintenant pendant quelques secondes une bande de pH (colorimétrique) contre la paroi latérale du vagin avec un écouvillon et en comparant ensuite la couleur obtenue à celles sur la fiche de lecture de pH qui était fournie avec les bandes colorimétriques. Les résultats étaient immédiatement transcrits sur les formulaires de rapport de cas (FRC) appropriés. Les échantillons cervico-vaginaux étaient recueillis pour leurs analyses au laboratoire.

2.3.1.3 Les échantillons biologiques

Lors de la visite de dépistage, le sang veineux, l'urine (pour test de grossesse), deux prélèvements endocervicaux et un prélèvement vaginal étaient recueillis. Le sang veineux était recueilli dans un tube ne contenant pas de l'EDTA (anticoagulant) pour la réalisation des tests de recherche d'anticorps de la syphilis et du VIH dans le sérum. Le frottis vaginal servait au diagnostic de la VB par la coloration de Gram, en utilisant le score de Nugent (45), ainsi que pour le diagnostic de la trichomoniose et de la candidose par l'examen microscopique à l'état frais. Les écouvillons cervicaux servaient au diagnostic de la gonococcie et de la chlamydie par la technique de Strand Displacement Amplification (SDA).

2.3.2 Processus de collecte des données de l'étude longitudinale (enrôlement et visites de suivi)

Lors de la visite d'enrôlement, les femmes constatées séronégatives au VIH lors de la visite de dépistage et qui avaient donné leur consentement éclairé et écrit pour l'enrôlement, subissaient un entretien, un examen gynécologique et fournissaient des échantillons biologiques. Les femmes enceintes n'étaient pas enrôlées dans l'essai clinique mais étaient référées à une clinique de soins prénataux appropriés.

Les femmes éligibles étaient randomisées de manière aveugle soit pour le gel actif (sulfate de cellulose) soit pour le gel placebo. Le gel devrait être utilisé avec le préservatif avant chaque rapport sexuel.

Une fois enrôlées dans l'essai, les femmes étaient invitées à venir à la clinique pour des visites de suivi mensuelles durant 12 mois. Les participantes qui avaient terminé leurs 12 visites de suivi ou qui, pour une raison quelconque et à tout moment de leur suivi, avaient abandonné, subissaient les procédures de la dernière visite. L'objectif principal de cette visite était de recueillir des échantillons sanguins et génitaux pour les critères de jugements de l'essai clinique.

2.3.2.1 Description de l'intervention de l'essai (pour l'étude longitudinale)

Les femmes éligibles pour l'essai clinique étaient randomisées pour recevoir soit le gel actif ou le placebo dans un ratio d'attribution de 1:1. Le gel était marqué avec 6 couleurs dont 3 pour le gel actif et 3 pour le placebo. Le placebo utilisé dans l'étude a été spécifiquement conçu pour n'avoir aucun effet sur la flore vaginale ou des agents pathogènes (y compris le VIH) et a été identique en apparence au gel du SC 6%. Les gels différaient sur un seul point - le gel actif avait un pH de 7,5 contre 4,4 pour le placebo. Le gel était livré dans des applicateurs opaques à usage unique et contenant 3,5ml du produit. Il était demandé aux femmes d'insérer le gel dans le vagin moins d'une heure avant chaque rapport sexuel vaginal et sur une période d'un an. Les femmes qui avaient un test de grossesse positif à l'une de leurs visites mensuelles étaient retirées de l'utilisation du produit jusqu'à la fin de l'état gravide, mais n'étaient pas retirées de l'essai. Les

femmes qui séroconvertissaient pour le VIH étaient également autorisées à poursuivre les visites de suivi.

A chaque visite, les femmes recevaient des conseils pour la réduction des risques, des préservatifs gratuits, et le traitement des IST curables, le cas échéant, conformément aux directives locales.

2.3.2.2 Les données comportementales et médicales

Ces données étaient recueillies par interview réalisée par des médecins ou des conseillers (pour les données comportementales). Lors de la visite d'enrôlement, le nombre de partenaires sexuels masculins au cours des 30 derniers jours, l'existence d'un partenaire principal ou non, le nombre de rapports sexuels par voie vaginale dans les 7 derniers jours avec les partenaires principaux, de même que celui avec les autres partenaires, et le nombre de rapports sexuels avec préservatifs étaient rapportés. Il était également demandé aux femmes si elles avaient eu des rapports sexuels anaux ou oraux au cours des trente derniers jours et si jamais elles avaient manqué d'utiliser le préservatif lors des rapports sexuels anaux ou oraux. La couleur du gel auquel une femme donnée avait été randomisée était documentée, ainsi que les traitements en cours.

Aux visites de suivi, les données comportementales étaient axées sur l'utilisation de produits intravaginaux autres que le gel d'étude (notamment dans le cadre de la douche vaginale) et le préservatif, l'utilisation correcte du produit à l'étude, le nombre de partenaires sexuels masculins au cours des 7 derniers jours, le nombre de rapports sexuels vaginaux au cours des 7 derniers jours, avec le partenaire principal et celui avec les autres partenaires et si le gel et / ou le préservatif avaient été utilisés, la pratique de rapports sexuels anaux et / ou oraux sans préservatif au cours des 30 derniers jours. En outre, des informations étaient collectées sur les médicaments utilisés, les nouveaux problèmes de santé ou l'aggravation des problèmes existants, les saignements génitaux autres que les menstruations.

2.3.2.3 Les données cliniques

Elles étaient recueillies par un examen physique effectué par des médecins formés. Les mêmes procédures cliniques que celles de la visite de dépistage étaient réalisées à l'enrôlement et aux visites de suivi pendant les mois 3, 6, 9 et 12.

2.3.2.4 Les échantillons biologiques

Utilisant un tube contenant de l'EDTA (anticoagulant), du sang veineux était recueilli à l'enrôlement et à la visite finale pour le test du VIH par PCR. Il était également recueilli lors des visites de suivi pour le test de confirmation en cas de résultat positif au test sérologique du VIH avec un premier échantillon. Le sang capillaire était recueilli par piqûre au doigt, aux visites de suivi pour les mois 1, 3, 6, 9 et 12 pour le dépistage rapide du VIH par sérologie. Un prélèvement au niveau du fond du vagin et deux prélèvements endocervicaux étaient recueillis lors de l'enrôlement et au cours des visites de suivi des mois 3, 6, 9 et 12. De l'urine était recueillie pour le test de grossesse à chaque visite mensuelle.

2.3.3 Les procédures de laboratoire

2.3.3.1 Le test de grossesse hCG sur urine

Le type de test de grossesse sur urine utilisé variait selon les sites d'étude. Il était réalisé selon les instructions du fabricant de chaque trousse utilisée.

2.3.3.2 Recherche des anticorps du VIH

Lors des visites de dépistage et d'enrôlement, le test de détection des anticorps anti-VIH était réalisé sur du sérum (à partir de sang du tube sans EDTA) ou sur du plasma (à partir du sang du tube avec EDTA) selon le cas et conformément aux directives nationales de dépistage du VIH ou les lignes directrices en place sur le site.

Aux visites de suivi des mois 1, 3, 6, 9, et à la dernière visite, le test de détection des anticorps anti-VIH était réalisé en utilisant un algorithme spécifiquement conçu pour l'étude et utilisant des tests rapides effectués soit sur le sang total (sang capillaire) ou sur le plasma (sang du tube avec EDTA). Les échantillons étaient testés d'abord avec Determine HIV 1/2, Laboratoires Abbott. Les résultats positifs devaient être confirmés par un second test rapide, SD Bioline VIH 1-2, Standard Diagnostics. Ce second test rapide pouvait également faire la distinction entre le VIH-1 et VIH-2. En cas de résultats discordants (premier test positif et deuxième test négatif), alors un troisième test rapide, Uni-Gold VIH recombinant, Trinity Biotech, était réalisé pour départager. Tous les tests étaient effectués selon les spécifications du fabricant.

Un échantillon était considéré comme positif aux anticorps anti-VIH si 2 tests rapides avaient donné des résultats positifs.

La participante n'était informée de sa séropositivité qu'après la reprise du test et confirmation du résultat positif sur un nouvel échantillon de sang obtenu de la participante. Le test de confirmation était réalisé avec le même algorithme de dépistage rapide décrit ci-dessus.

2.3.3.3 Le test du VIH par la « polymerase chain reaction » (PCR)

Le test du VIH par la PCR était effectué sur tous les échantillons de sang prélevés lors des visites finales et sur tous ceux qui étaient positifs pour la recherche d'anticorps anti-VIH. En outre, le test du VIH par la PCR était réalisé sur les échantillons de sang prélevés lors de la visite d'enrôlement pour les participantes qui séroconvertissaient dans les 3 mois suivant l'enrôlement.

Des pools d'au plus 24 échantillons de plasma étaient testés avec le test COBAS Ampliscreen test VIH-1, Roche Molecular Systems, conformément aux spécifications du fabricant.

2.3.3.4 Le test de la syphilis

Le test de la syphilis était effectué uniquement lors de la visite de dépistage, et donc pour l'étude transversale. Le « Rapid Plasma Reagin » (RPR) était réalisé en premier lieu et les échantillons, ayant un résultat positif étaient ensuite testés par le « Treponema pallidum hemagglutination » (TPHA). Les échantillons positifs par les deux tests (RPR et TPHA) étaient considérés comme positifs pour la syphilis. Ceux qui étaient positifs pour le test RPR mais négatifs pour le TPHA étaient re-testés lors de la visite suivante (environ 4 semaines plus tard) avec les deux tests ; si le RPR positif et le TPHA toujours négatif, le résultat final était négatif. Mais si le TPHA devenait positif, le résultat final était positif.

2.3.3.5 La gonorrhée et la chlamydiae

Les frottis endocervicaux étaient testés avec la technique de « Strand Displacement Amplification » (SDA) de Becton-Dickinson sur le système BDProbeTec ET selon les instructions du fabricant.

2.3.3.6 La vaginose bactérienne

Le frottis vaginal était utilisé pour le diagnostic de la VB, selon le système de score de Nugent (45). Le matériel sur la lame préparée à la clinique était fixé en passant la lame rapidement à travers une flamme d'un brûleur à gaz trois fois tout en gardant la face portant l'étalement tournée vers le haut et en évitant la surchauffe car cela désorganise les cellules (on devrait sentir la lame

légèrement chaude quand on la touche avec le dos du poignet). Après la coloration de Gram, la lame était examinée à un grossissement x1000 et en utilisant l'huile à immersion. La flore vaginale était décrite selon le score de Nugent.

Le système de score est composé de 3 éléments: les morphotypes des *Lactobacillus*, les morphotypes du *Gardnerella* et des *Bacteroides* spp et les bacilles incurvés à Gram variable. Les deux premiers éléments sont chacun marqués de 0 à 4 tandis que le troisième est marqué de 0 à 2. Le score total est obtenu en additionnant les scores des 3 éléments (tableau 1).

Pour valider la qualité du frottis, le technicien de laboratoire reportait la présence de cellules et les irrégularités éventuelles en général. Le technicien de laboratoire notait également si la lame n'était pas interprétable en raison de la présence du gel de l'étude.

Tableau 1: Système de notation (0 à 10) des frottis vaginaux colorés au Gram^a

Score pour chaque élément ^b	Morphotypes de <i>Lactobacilles</i>	Morphotypes de <i>Gardnerella</i> et <i>Bacteroides</i> spp.	Bacilles incurvés à Gram variable
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

^a : Les morphotypes sont notés comme le nombre moyen observé par champ microscopique au grossissement 1000 avec huile à immersion.

Note: Un moindre poids est attribué aux bacilles incurvés à Gram variable.

Le score total = lactobacilles + *G. vaginalis* et *Bacteroides* spp. + Bacilles incurvés.

^b : Quantification et attribution de score par élément :

0 = aucun morphotype présent

1+ = < 1 morphotype par champ présent

2+ = 1 à 4 morphotypes par champ présents

3+ = 5 à 30 morphotypes par champ présents

4+ = 30 ou plus morphotypes par champ présents.

Le score attribué par morphotype diminue avec la quantité de lactobacilles mais croît avec celle des autres morphotypes.

Interprétation du score de Nugent

0-3 = flore normale

4-6 = flore intermédiaire

7-10 = Vaginose bactérienne

2.3.3.7 Trichomoniase et candidose

Le frottis vaginal était utilisé pour le diagnostic de la trichomoniase et de la candidose par l'examen microscopique à l'état frais. Ce frottis était réalisé après celui pour le diagnostic de la VB. Pour certains sites où le laboratoire central était relativement éloigné, l'examen à l'état frais était réalisé à la clinique; lorsque le laboratoire était tout près, la microscopie directe était faite au laboratoire. Une goutte de liquide vaginal était placée à chacun des 2 bords se trouvant sur les largeurs de la lame, une était mélangée avec une goutte de solution saline, l'autre avec une goutte d'hydroxyde de potassium à 10% (KOH). Chaque préparation était recouverte d'une lamelle et examinée au microscope au grossissement 400. La préparation saline était examinée pour la recherche du *T. vaginalis*, et la préparation de KOH pour les cellules de levures et les pseudomycelia.

2.4 Assurance et contrôle de qualité

Pour chaque site, un moniteur local et 2 externes venant de Family Health International (USA) visitaient le site à un rythme respectivement mensuel et trimestriel et vérifiaient les données collectées.

Tout le personnel était formé sur le protocole, le manuel et les procédures de l'étude (en fonction de leurs domaines respectifs), sur les Bonnes pratiques cliniques (BPC) et en éthique de la recherche.

Plus spécialement, le personnel de laboratoire était formé dans la réalisation des tests du VIH, de SDA et du score de Nugent par un laboratoire central [Département de Microbiologie de l'Institut de Médecine Tropicale (IMT) d'Anvers, Belgique]. Les mesures d'assurance de qualité étaient également mises en œuvre; tous les cas d'infection par le VIH (sauf quatre dont les échantillons de sang n'étaient pas disponibles), tous les résultats positifs de SDA, et 10% de résultats négatifs pour le VIH et le SDA avaient été vérifiés à l'IMT à des fins de contrôle de la qualité. En outre, le personnel de l'IMT a eu deux visites de suivi sur les sites pour les activités de laboratoire, y compris la coloration de Gram et le score de Nugent. Comme résultat de toutes ces procédures de contrôle de qualité, aucune équivoque n'a été observée quant aux résultats des tests du VIH ou de ceux des autres des IST enregistrés dans la base de données utilisée pour la présente étude.

2.5 Analyse statistique

2.5.1 L'analyse statistique commune aux deux types d'étude: la description des caractéristiques de la population

La population de l'étude a été décrite selon les caractéristiques socio-démographiques et comportementales ainsi que selon les ISTs diagnostiquées, y compris le VIH au sein des femmes dépistées, celles enrôlées et celles non enrôlées.

Les variables continues présentant une distribution normale étaient décrites en utilisant des moyennes avec leurs écarts-types, tandis que celles dont la distribution n'était pas normale étaient décrites par leurs médianes ainsi que les valeurs minimales et maximales et les intervalles inter-quartiles. Les variables catégorielles ont été décrites en utilisant des proportions. Les moyennes étaient comparées en utilisant le test t de Student alors que les médianes étaient comparées en utilisant le test de Wilcoxon ou le test U de Mann-Whitney. Les proportions étaient comparées en utilisant le test chi-carré de Pearson ou le test exact de Fisher, selon le cas.

Bien que le type de régression utilisé diffère selon l'étude, les 3 analyses ont été d'abord effectuées en univariée, et les associations significatives au seuil de 0,20 ont été reprises en analyse multivariée. Le seuil de significativité utilisé pour les modèles multivariés était de 0,05.

2.5.2 Analyse pour les deux études transversales

2.5.2.1 Analyse des facteurs de risque des anomalies de la flore vaginale

Pour l'étude sur les facteurs de risque des anomalies de la flore vaginale à savoir la flore vaginale intermédiaire (FVI) et la VB, nous avons conduit une analyse exploratoire en comparant les résultats de la régression logistique polytomique multinomiale à ceux issus de la régression logistique dichotomique. La variable dépendante était le statut de la flore vaginale, classée selon le score de Nugent :

- en 3 catégories : flore vaginale normale (FVN) (catégorie de référence), flore vaginale intermédiaire (FVI) et vaginose bactérienne (VB) pour l'analyse polytomique ;
- en 2 catégories avec la FVI regroupée avec la FVN (modèle VB versus non-VB) ;
- en 2 catégories avec la FVI regroupée avec la VB (modèle flore vaginale anormale versus FVN).

Les variables indépendantes comprenaient les données socio-démographiques, comportementales et médicales qui ont été déjà rapportées dans la littérature comme potentiels facteurs de risque pour la VB.

2.5.2.2 Analyse de l'association entre les anomalies de la flore vaginale et le VIH

Pour l'étude transversale sur l'association entre les anomalies de la flore vaginale et l'infection par le VIH, la variable dépendante était le statut au VIH, dichotomisé selon les résultats de laboratoire en positif et négatif. La variable explicative était le statut de la flore vaginale classée en 3 catégories, telle que décrite dans la section ci-dessus. Les covariables étaient les données socio-démographiques, comportementales et médicales rapportées dans la littérature comme de potentiels confondants de la relation entre les anomalies de la flore vaginale et l'infection par le

VIH. La régression log-binomiale a été utilisée pour estimer la mesure d'association qui est le rapport de prévalence. Nous avons défini comme facteur confondant à retenir dans le modèle final multivarié, les variables dont le retrait entraînerait une variation relative d'au moins 10% de l'estimé de la mesure de l'association étudiée. Mais comme aucune covariable ne répondait à cette condition, nous avons retenu dans le modèle final avec la variable explicative, celles dont l'association avec le VIH était significative au seuil de 0.05.

2.5.3 Analyse pour l'étude longitudinale

2.5.3.1 Définition de certains concepts et hypothèses

Un résultat positif de VB a été défini comme un score de Nugent supérieur ou égal à 7. Le statut négatif des participantes pour la VB (statut de guérison) a été établi par un résultat de test négatif (score de Nugent <7) ou un « traitement efficace de VB » commencé il y a au moins 7 jours.

Une VB incidente a été définie comme un résultat positif de VB, obtenu lors d'une visite de suivi (planifiée ou non) soit au moins 7 jours après le début d'un « traitement efficace de VB » ou à la suite d'un résultat négatif BV.

Un cas d'incident de VB a été supposé survenir au point milieu entre la date de la dernière indication de statut négatif pour la VB et la date de la visite au cours de laquelle le cas incident de VB a été diagnostiqué.

Un épisode de VB a été défini comme un ou plusieurs résultats positifs consécutifs pour le test de VB et suivi d'une indication de guérison, marquant la fin de l'épisode. Un épisode de VB commence avec l'apparition d'une VB incidente, telle que définie ci-dessus, et finit soit au septième jour d'un « traitement efficace de VB » ou au point milieu entre la date du dernier résultat positif de l'épisode de VB et la date du premier résultat négatif au test de VB (dépendamment de ce qui survient le premier).

Une VB récurrente (VBR) a été définie comme une VB incidente (telle que décrite ci-dessus) survenant à la suite d'un résultat positif pour le test de VB obtenu lors d'une visite précédente (y compris la visite d'enrôlement dans l'essai clinique). Une participante peut avoir de multiples récurrences au cours de la période de suivi.

Période à risque: Les participantes ayant une VB précédente (VB index) étaient considérées à risque d'une VBR pour la période allant de la fin de l'épisode de la VB index au début du prochain épisode de VB, ou à la fin de leur suivi, dépendamment de ce qui survient le premier.

En cas de récurrences multiples de VB, les périodes entre les épisodes de VB ont été considérées comme des périodes à risque. Les participantes ne sont pas considérées comme étant à risque pendant la durée des épisodes de VB.

2.5.3.2 Variables et modèle utilisés

La variable dépendante était le temps à la récurrence. Les variables indépendantes comprenaient les données socio-démographiques, comportementales et médicales qui étaient déjà rapportées dans la littérature comme potentiels facteurs de risque pour la VB.

Le modèle de risque proportionnel de Andersen et Gill a été utilisé pour estimer le rapport de taux d'incidence (RTI) de la VBR (105). Ce type de modèle permet de traiter les événements répétés en tenant effectivement compte de tous les événements survenus chez chaque sujet et non plus seulement du premier événement.

2.6 Les questions de puissance statistique

2.6.1 Étude transversale

Les puissances statistiques pour détecter des associations statistiquement significatives entre les anomalies de la flore vaginale et leurs facteurs de risque potentiels (objectif 1) ont été calculées en utilisant la procédure « proc power » de SAS, avec l'option « twosamplefreq ». Ces puissances, pour un test bilatéral, ont été calculées avec une taille d'échantillon de 1367, en utilisant une erreur de type I de 0,05 et sont résumées dans le tableau 2. Selon les chiffres présentés dans ce tableau, pour la FVI, nous ne devrions pas avoir assez de puissance ($> 0,80$) pour détecter un rapport de cote (RC) se situant entre 0,75 et 1,5. Par contre, nous devrions pouvoir détecter les RC situés entre 0 et 0,50 et ceux ≥ 2.0 (pour les facteurs de risque / expositions dont la prévalence atteint au moins respectivement 20% et 10% dans la population étudiée).

Pour la VB, il est possible que nous n'ayons pas assez de puissance pour détecter les RC situés entre 0,75 et 1,25. Par contre nous devrions pouvoir détecter les RC situés entre 0 et 0,50 et ceux $\geq 1,5$ pour les expositions dont la prévalence atteint au moins respectivement 10% et 30%.

Les puissances calculées pour l'étude sur l'association entre les anomalies de la flore vaginale et le VIH sont présentées dans le tableau 3. Pour les rapports de prévalences (RP) de VIH se situant entre 0,75 jusqu'aux environs de 1 et des environs de 1 à 1,25, nous pourrions manquer de puissance pour les détecter pour les expositions dont la prévalence serait < 40% (pour la VB) ou < 50% (pour la FVI). Pour les RP $\leq 0,50$ ou $\geq 1,50$, nous aurions de puissance suffisante pour les détecter pour les expositions dont la prévalence atteindrait au moins 20% (aussi bien pour la FVI que pour la VB).

2.6.2 Étude longitudinale

Les puissances statistiques pour détecter une association significative entre la récurrence de la VB et ses prédicteurs potentiels (objectif 3) ont été estimées avec la procédure « proc power » de SAS avec l'option « twosamplesurvival ». Les résultats pour un test bilatéral sont présentés dans le tableau 3. Les chiffres de ce tableau indiquent que, pour les expositions dont la prévalence atteindrait 20% ou plus, nous devrions être en mesure de détecter les rapports de taux d'incidence se situant entre 0,5 jusqu'aux environs de 1 et des environs de 1 à 2,0. Mais pour les expositions dont la prévalence serait inférieure à 10%, nous pourrions peut-être manquer de puissance suffisante pour détecter des rapports de taux d'incidence se situant entre 0,75 et 1,25.

Tableau 2 : Calcul de la puissance pour la détection d'une association statistiquement significative entre la FVI ou VB et leurs potentiels facteurs de risque.

Scénarios de rapports de cotes de FVI ou VB	Scénarios de prévalence de l'Exposition						
		5%	10%	20%	30%	40%	50%
0,5	FVI	0,41	0,64	0,88	0,96	0,98	0,99
	VB	0,52	0,80	0,97	0,99	>0,99	>0,99
0,75	FVI	0,13	0,19	0,30	0,37	0,42	0,44
	VB	0,15	0,25	0,40	0,50	0,57	0,59
1,25	FVI	0,09	0,13	0,20	0,25	0,28	0,29
	VB	0,12	0,18	0,29	0,36	0,39	0,40
1,5	FVI	0,20	0,36	0,57	0,67	0,72	0,72
	VB	0,30	0,51	0,74	0,84	0,87	0,87
2,0	FVI	0,56	0,83	0,97	0,99	>0,99	>0,99
	VB	0,75	0,95	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99

Notes : Les chiffres en caractères gras sont les puissances suffisantes (en considérant le seuil typique de 0,80)
Les puissances ont été calculées pour un test bilatéral, avec une erreur de type I de 0,05.

Pour la FVI, on a utilisé un ratio de 58:100 (262 femmes avec FVI et 454 femmes avec FVN) et une taille totale de 716 pour les 2 catégories de femmes.

Pour la VB, on a utilisé un ratio de 143:100 (651 femmes avec VB et 454 femmes avec FVN) et une taille totale de 1105 pour les 2 catégories de femmes.

Tableau 3: Calcul de la puissance pour la détection d'une association statistiquement significative entre la FVI ou la VB et l'infection à VIH.

Scénarios de rapports de prévalence de VIH	Scénarios de prévalence de l'Exposition						
		5%	10%	20%	30%	40%	50%
0,5	FVI	0,43	0,71	0,95	>0,99	>0,99	>0,99
	VB	0,56	0,87	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
0,75	FVI	0,14	0,22	0,41	0,60	0,78	0,90
	VB	0,16	0,29	0,57	0,80	0,93	0,98
1,25	FVI	0,10	0,16	0,33	0,53	0,74	0,90
	VB	0,15	0,26	0,50	0,74	0,91	0,98
1,5	FVI	0,24	0,48	0,84	0,98	>0,99	>0,99
	VB	0,41	0,70	0,97	>0,99	>0,99	>0,99
2,0	FVI	0,67	0,95	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
	VB	0,88	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99

Notes : Les chiffres en caractères gras sont les puissances suffisantes (en considérant le seuil typique de 0,80)
Les puissances ont été calculées pour un test bilatéral, avec une erreur de type I de 0,05.

Pour le groupe de la FVI, l'effectif était 262 tandis que pour celui de la VB il était de 651, la FVN étant le groupe de référence avec un effectif de 454.

Tableau 4: Calcul de la puissance pour la détection d'une association statistiquement significative entre la récurrence de la VB et ses prédicteurs potentiels.

Scénarios de rapport de taux d'incidence	Scénarios de prévalence de l'Exposition					
	5%	10%	20%	30%	40%	50%
0,5	0,98	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
0,75	0,39	0,64	0,86	0,94	0,96	0,97
1,25	0,25	0,44	0,67	0,81	0,83	0,85
1,5	0,66	0,90	0,99	0,99	>0,99	>0,99
2,0	0,98	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99

Notes: Les chiffres en caractères gras sont les puissances suffisantes (en utilisant le seuil typique de 0,80). Le risque de récurrence de la VB est approximativement de 30,1% dans la population étudiée et est utilisée comme le risque exponentiel de survie de référence. La taille de l'échantillon (nombre de femmes enrôlées pour lesquelles les données sont disponibles pour la VB) est de 440. Le temps de recrutement (accrual time) était de 18 mois et la durée totale était de 20 mois. Le calcul était basé sur le test du log-rank bilatéral avec une erreur de type I fixée à 5%.

2.7 Considérations éthiques:

Le protocole de l'étude mère a été approuvé par le Comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School aux États-Unis (Annexes 1 à 3), celui de Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec (Annexes 4 à 10), et ceux des différents sites ayant collaboré à l'étude (Annexes 11 et 12). Tout le personnel impliqué dans l'essai clinique, y compris les agents communautaires, était formé en éthique de la recherche.

Toutes les données sont anonymes et les résultats sont publiés sous forme de données agrégées. Puisque les données qui nous ont été fournies par le promoteur de l'étude mère sont totalement anonymes, la présente étude a bénéficié de l'exemption de la présentation au comité d'éthique de la recherche de l'Université Laval (Annexe 13).

Le consentement éclairé écrit a été obtenu chez toutes les participantes à l'essai clinique, à la fois à la visite de dépistage (Annexes 14 et 15) et à celle pour l'enrôlement (Annexes 16 et 17) et leur compréhension de l'essai était revérifiée tout au long de son déroulement notamment en ce qui concerne l'utilisation des données liées au VIH et autres IST ou infections génitales.

3 Chapitre 3. Intermediate Vaginal Flora and Bacterial Vaginosis as parts of the same disease continuum: findings from an exploratory analysis among female sex workers in Africa and India.

Authors: Fernand A. Guédou, MD, MSc,*† Lut Van Damme, MD, PhD,‡ Jennifer Deese, MPH‡, Tania Crucitti, PhD,© Florence Mirembe, MD, PhD,¶ Suniti Solomon, MD,§ Marissa Becker, MD, PhD,# Michel Alary, MD, PhD,*†

Affiliations: *URESP, Centre de recherche FRSQ du CHA universitaire de Québec, Canada ; †Département de Médecine Sociale et Préventive, Université Laval, Québec (Québec) Canada; ‡FHI360, Durham, NC, USA; © Department of Microbiology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium ; ¶ Makerere University College of Health Sciences, Kampala, Uganda; § Y.R Gaitonde Center for AIDS Research and Education, Chennai, India; # Centre for Global Public Health, University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

(Lut Van Damme was formerly at CONRAD, Arlington, VA, USA)

Name and address for correspondence: Michel Alary, MD, PhD, URESP, Centre de recherche FRSQ du CHA Universitaire de Québec, Hôpital Saint-Sacrement, 1050, Chemin Sainte Foy, Québec (Québec) G1S 4L8, Canada

Tel: (418) 682 7387; Fax: 418 682 7949; email: malary@uresp.ulaval.ca.

Word counts: Short summary=30; Abstract= 249; Main text= 2712

Number of references = 30

Number of tables = 4; Number of figures = 0 (None)

La flore vaginale intermédiaire et la vaginose bactérienne comme parties du continuum de la même maladie : résultats d'une analyse exploratoire chez les travailleuses du sexe en Afrique et en Inde.

Cet article a été soumis au journal *Sexually Transmitted Diseases*

RÉSUMÉ:

Contexte: Plusieurs études récentes suggèrent que la flore vaginale intermédiaire (FVI) est associée à des effets néfastes de santé similaires à celles de la vaginose bactérienne (VB). Cependant, on ignore encore si la FVI et la VB partagent les mêmes facteurs de risque. Nous avons effectué une analyse transversale et exploratoire de données provenant de femmes dépistées avant l'enrôlement dans un essai sur les microbicides, afin d'estimer la prévalence de la VB et de la FVI et examiner leurs facteurs de risque respectifs.

Méthodes: Les participantes ont été interrogées, examinées et ont fourni des échantillons sanguins et génitaux pour le diagnostic de la FVI et de la VB (en utilisant le score de Nugent), et d'autres infections du tractus génital. Les régressions logistiques polytomique et dichotomique ont été utilisées et comparées dans l'estimation des rapports de cotes (RC) respectifs de la FVI et de la VB par rapport à chaque facteur de risque potentiel.

Résultats: Parmi les 1367 femmes, la prévalence de la VB et de la FVI étaient respectivement de 47,6% (IC à 95% = 45,0 à 50,3) et 19,2% (IC à 95% = 17,1 à 21,2). L'analyse multivariée polytomique de la FVI et de la VB a montré qu'elles étaient généralement associées avec les mêmes facteurs. Lorsque l'on compare les femmes ayant une FVI ou une VB à celles qui ont une flore vaginale normale (FVN), le VIH [RC ajusté (RCa) = 1,72, IC à 95% = 1,29 à 2,29], la gonorrhée (RCa = 1,77, IC

à 95% = 1,7 à 3,5) et la trichomonase (RCa = 2,62, IC à 95%= 1,55 à 4,65) étaient des facteurs de risque importants alors que la contraception hormonale (RCa=0,63, IC à 95%=0,45 à 0,89), le sexe anal (RCa=0,43, IC à 95%=0,19 à 0,92) et la candidose (RCa = 0,57, IC à 95% = 0,43 à 0,74) étaient protecteur. En revanche, l'âge inférieur à 20 ans (RCa = 1,83, IC à 95% = 1,08 à 3,15) et un nombre élevé d'actes sexuels (RCa = 1,51, IC à 95% = 1,03 à 2,22) étaient des facteurs de risque exclusifs de la VB, par rapport à la FVI et la FVN combinées.

Conclusion: Le fait que la FVI et la VB sont associées avec presque les mêmes facteurs soutient l'idée qu'elles représentent un continuum de la même maladie .

SHORT SUMMARY:

An exploratory cross-sectional analysis of data from female sex workers, using polytomous logistic regression found that intermediate vaginal flora has almost the same risk or protective factors as bacterial vaginosis.

ABSTRACT:

Background: Several recent studies suggest that intermediate vaginal flora (IVF) is associated with similar adverse health outcomes as bacterial vaginosis (BV). Yet, it is still unknown if IVF and BV share the same risk factors. We conducted a cross-sectional and exploratory analysis of data from women screened prior to enrolment in a microbicide trial, to estimate BV and IVF prevalence and examine their respective risk factors.

Methods: Participants were interviewed, examined and provided blood and genital samples for the diagnosis of IVF and BV (using Nugent score), and other reproductive tract infections. Both polytomous and dichotomous logistic regressions were used and compared in estimating IVF and BV respective odds-ratio (OR), in relation to each potential risk factor.

Results: Among 1367 women, BV and IVF prevalences were 47.6% (95%CI=45.0-50.3) and 19.2% (95%CI=17.1-21.2), respectively. Multivariate polytomous analysis of IVF and BV showed that they were generally associated with the same factors. When comparing women with IVF or BV to those

with a normal vaginal flora (NVF), HIV [adjusted OR (aOR)=1.72, 95%CI=1.29-2.29], gonorrhoea (aOR=1.77, 95%CI=1.07-3.05) and trichomoniasis (aOR=2.62, 95%CI=1.55-4.65) were significant risk factors, whereas hormonal contraception (aOR=0.63, 95%CI=0.45-0.89), anal sex (aOR=0.43, 95%CI=0.19-0.92) and candidiasis (aOR=0.57, 95%CI=0.43-0.74) were protective. In contrast, age <20 (aOR=1.83, 95%CI=1.08-3.15) and a large number of sexual acts (aOR=1.51, 95%CI=1.03-2.22) were exclusive risk factors for BV, when compared to IVF and NVF combined.

Conclusion: The fact that IVF and BV are associated with almost the same factors supports the concept that they represent a continuum of the same disease.

KEY WORDS:

Bacterial vaginosis; Intermediate vaginal flora; Risk factors; Female sex workers; Polytomous logistic regression.

INTRODUCTION

Bacterial vaginosis (BV) is a polymicrobial infection characterized by a depletion of lactobacilli, accompanied by intense overgrowth of commensal vaginal anaerobic bacteria (1). It is the most common female genital tract infection worldwide and is particularly prevalent in developing countries (1). BV prevalence ranges from 9% to 50% in the general population (2, 3) and may be as high as 70% in female sex workers (FSWs) (4). The current “gold standard” for BV diagnosis is the Nugent’s scoring system, grading vaginal flora as normal (NVF) with Nugent score (NS) = 0–3, intermediate (IVF) with NS = 4 - 6 or BV with NS = 7–10 (5).

The spectrum of adverse health outcomes associated with BV is consistently expanding. In addition to the well-known association of BV with upper genital tract infections (6) and unfavourable pregnancy outcomes (7-9), BV has also been associated with the acquisition of various sexually transmitted infections (STIs) including HIV (10-12). Some recent studies revealed that IVF may also be associated (and even as strongly as BV) with some of these adverse health outcomes (13, 14).

BV treatment is sub-optimal with a high rate of recurrence; therefore, preventive strategies are needed. A successful preventive intervention requires a good understanding of disease risk factors, particularly those that are susceptible to intervention. Though there is an important amount of data on BV risk factors, very little is known about the risk factors for IVF and whether they are similar to those of BV. Also, data on BV risk factors tend to be inconsistent. Since most of previous studies that investigated BV risk factors combined IVF and NVF as referent category, it is not known whether the relationship between IVF and some of these risk factors play a role in this inconsistency.

We used data from FSWs screened at two African and two Indian sites, prior to their enrolment in the phase III microbicide trial on the vaginal gel of Cellulose sulphate 6% (CS 6%) sponsored by CONRAD, VA, USA (15), to compare risk factors for BV and IVF, with special attention to the role of IVF in the determination of BV risk factors, considering the way the latter are commonly assessed.

METHODS AND MATERIALS

Settings, subjects and procedures

The CONRAD Cellulose Sulfate (CS) 6% trial involved five sites located in Durban (South Africa), Kampala (Uganda), Cotonou (Benin), Chennai and Mudhol/Jamkhandi (India). The present analysis was restricted to participants who were screened at the latter four sites to ensure comparability of laboratory methods used for BV detection. Participants were recruited at the Mulago Hospital (Makarere University) in Kampala, Uganda; at a community clinic and a clinic for STIs in Cotonou, Benin; at the YRG Care center in Chennai, India; and in clinics in Mudhol and Jamkhandi in Karnataka State, India. The study was approved by ethics committees of the Eastern Virginia School of Medicine (US) and of each collaborating center.

All participants were aged 18 years or older and provided written informed consent for the trial screening visit. At screening, a questionnaire on socio-demographics, current contraceptive use, intra-vaginal cleansing (products used and reason), past history of STIs and sexual behaviours was administered by trained health providers. Trained clinicians then performed a speculum and bimanual pelvic examination, measured the vaginal pH using pH reading strips,

collected two endocervical swabs (for gonorrhoea and chlamydia diagnosis) and one high vaginal swab (for BV, trichomoniasis (TV) and candidiasis diagnosis). Venous blood was taken for syphilis and HIV antibody testing and urine for pregnancy testing.

Vaginal flora abnormalities (BV and IVF) were described according to the Nugent's scoring system after Gram stain (5). Trichomoniasis and candidiasis were diagnosed microscopically on wet mount. The endocervical swabs were tested with the Strand Displacement Amplification technique, SDA BD ProbeTec ET CT/NG (Becton Dickinson, Sparks, Nevada, USA) for genital gonococcal and chlamydial infections. For syphilis diagnosis, Rapid Plasma Reagin test was first performed on serum specimens and reactive samples were analysed using a treponemal antibody test. Samples positive on both RPR and the treponemal antibody test were considered positive for syphilis. HIV antibody testing was performed using the national HIV testing guidelines in place at each study site. In general, two rapid assays were used (in series or in parallel) and a third as a tie breaker in case of discordant results. Pregnancy tests brands varied by site. All assays were conducted according to the manufacturers' instructions.

Statistical methods

Continuous variables were described by their medians along with the inter-quartiles ranges (IQR). For categorical variables, proportions and their 95% confidence intervals were computed.

The measure of association used was the odds ratio (OR), which was estimated using vaginal flora abnormalities as the dependent variable and data on socio-demographics, sexual behaviour, medical history and current genital tract infections as independent variables. Based on the classification of the outcome variable (which is vaginal flora abnormalities), we constructed and compared three modeling methods:

- 1) polytomous multinomial logistic regression with vaginal flora abnormalities classified into three categories: BV ; IVF; NVF (reference category);
- 2) dichotomous logistic regression (named from now onward "non-BV model") with BV as the outcome compared to IVF and NVF combined as the reference category: BV vs. non-BV (IVF+ NVF);

3) dichotomous logistic regression (named from now onward “NVF model”) with BV and IVF combined as the outcome and using NVF as the reference category: (BV+IVF) vs. NVF.

For each of these three approaches, bivariate analyses (controlling for the study site) were first performed; covariates that were statistically significant at p-value < 0.20 were included in the multivariate models. Backward elimination based on Wald chi-square tests was done and variables with p-values < 0.05 were retained in the final models. Lastly, variables that were retained in each of these (interim) final models were added to the two other models such that all three final models contained the same covariates. Variables with p-value < 0.05 were considered as significantly associated with the considered vaginal flora abnormality.

Vaginal pH was not included in the analyses, as abnormal vaginal pH is a known consequence of BV (1). Statistical tests were two-tailed. Data were analysed with SAS software version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Characteristics of the study population

From July 2005 to January 2007, 1491 FSWs were screened at the four study sites. Data on vaginal flora abnormalities were available for 1367 (91.7%) of them and these were thus included in the present analysis. Their socio-demographic, behavioral and medical characteristics are summarized in table 1. BV and IVF overall prevalences were 47.6% (95%CI = 45.0 – 50.3) and 19.2% (95%CI= 17.1 - 21.2) respectively. The Mudhol/Jamkhandi site had the highest BV prevalence (63.3%) and Cotonou had the highest IVF prevalence (23.3%) (see Table 2). Women at the Chennai and Kampala sites had similar and lower BV prevalence, at around 42%.

Factors associated with vaginal flora abnormalities in bivariate analyses

Results from bivariate polytomous and dichotomous models (controlling for study site) are compared in table 3. From the dichotomous logistic regression with the “NVF model”, HIV, gonorrhoea, Chlamydia and trichomoniasis were positively and significantly associated with vaginal flora abnormalities (IVF and BV combined together) while hormonal contraception (compared to no contraception), anal sex in the past 30 days and vaginal candidiasis were negatively associated

to it. From the polytomous regression and for each of these factors, the associations with IVF and BV went in the same direction.

From the dichotomous logistic regressions with the “non-BV model”, the only variables positively associated with BV that did not emerge from the “NVF model” were younger age and high number of sexual acts in the last seven days, the latter with only borderline statistical significance. For both factors, the polytomous regression showed associations that went in the opposite direction for BV and IVF, without any statistical significance. The only factor negatively associated with BV not emerging from the “NVF model” was the fact of cohabiting with a man (only borderline significant). From the polytomous regression, the association between this factor went in the same direction for both BV and IVF, but was weaker for the latter and borderline significant for BV.

Factors associated with vaginal flora abnormalities in multivariate analyses

Results from multivariate polytomous and dichotomous models are presented in table 4. Factors which were significantly associated with vaginal flora abnormalities taken together (as assessed with the dichotomous “NVF model”) included HIV, gonorrhoea, trichomoniasis (for positive associations), hormonal contraception, anal sex in the past 30 days and candidiasis (for negative associations). From the polytomous models and for all these factors, their respective associations with IVF and BV went in the same direction.

In the dichotomous “non-BV model”, younger age and high number of sexual acts in the last seven days were also significantly associated with BV. For each of these factors, their association with IVF was in the opposite direction to that with BV, but not statistically significant.

DISCUSSION

In this cross-sectional study involving FSWs from two African and two Indian sites, we found overall prevalence rates of 47.6% and 19.2% for BV and IVF respectively. BV prevalences found at the Kampala and Cotonou sites were both within the range previously reported in the published literature among FSWs (26% to 71%) in African settings (4, 10, 11), as was the prevalence in Chennai as compared to data previously reported among Indian FSWs (13% to 45%)

(12, 16). In contrast, BV prevalence at the Mudhol/Jamkhandi site was, to our best knowledge, the highest one described so far among Indian FSWs. This may be due, at least partly, to the small sample size (49 participants) at this study site.

From the multivariate analysis, HIV, gonorrhea, trichomoniasis, hormonal contraception, anal sex in the previous 30 days and candidiasis were associated with both IVF and BV and were primarily revealed as risk (or protective) factors by the dichotomous “NVF model”. More interestingly, according to the “non-BV model”, HIV and trichomoniasis were not significant risk factors for BV, though they were significantly associated with BV in the polytomous model.

In contrast, being younger than 20 years and having at least 35 sexual acts in the last week were specifically associated with BV and were primarily revealed by the dichotomous “non-BV model”. This exploratory analysis showed thus that BV risk (or protective) factors which are as well associated with IVF, and particularly those which are more strongly associated with IVF than BV, may not be revealed, as they have commonly been assessed, using the “non-BV model”. This phenomenon may account, at least partly, for the inconsistency noted in data on BV risk factors. The approach in identifying BV risk factors needs thus to be reconsidered and standardized.

The current analysis suggests that HIV, gonorrhea and trichomoniasis are risk factors for both BV and IVF, while age younger than 20 years and having at least 35 sexual acts in the last week are risk factors specific to BV. In this analysis, hormonal contraception, candidiasis and anal sex are protective against both BV and IVF.

Several recent studies confirmed the relationship between vaginal flora abnormalities and HIV and showed that IVF may even be associated with HIV as strongly as BV (13, 14). In our study, gonococcal infection was significantly associated with IVF and BV, and chlamydial infection was as well, but only in the bivariate analysis. Brotman et al. (17) found in a longitudinal analysis, that BV was positively associated with incident genital gonorrhea, chlamydia and trichomoniasis, independently from other risk factors. In our study, BV appeared to be more common in women younger than 20 years, compared to women who were older (adjusted OR=1.80; 95%CI=1.00 – 3.33). Several previous studies (10, 18-20) similarly reported a decrease of BV risk with increasing age. Considering the role played by hormones in the occurrence of BV (21), this increased risk may be due to hormonal disturbances observed at the debut of women’s reproductive life (21). These

findings suggest that BV preventive interventions among FSWs should target younger women. This is further justified by the consistently growing number of young girls getting involved in sex work, particularly in developing countries (22, 23).

Having had 35 or greater sexual intercourses in the last seven days was significantly associated with BV, while the number of sexual partners in the last three months was not. This is in agreement with Verstraelen et al. (24) who found that sex frequency, and not number of sexual partners, is the critical risk factor for BV. Also in some other studies (21, 25, 26), sex frequency (or recent sex) was independently associated with BV.

There was an inverse association between hormonal contraception and BV. A protective effect of hormonal contraception has been reported in several studies (10, 11, 18, 25). Hormonal contraceptives may influence BV risk in different ways. Oestrogens contained in combined oral contraceptives increase glycogen level in vaginal epithelial cells. This glycogen is transformed into lactic acid by vaginal lactobacilli, contributing thereby to keeping the vaginal pH low and preventing the overgrowth of BV-associated bacteria (BVAB) (27). Progestin-only contraceptives may decrease the risk of abnormal vaginal microbiota by reducing menstrual bleeding (28), as the latter has proved to be associated with increased risk of BV (27). We also found that having had anal sex in the prior 30 days was protective against BV. Data on the relationship between BV and anal sex are still conflicting. Fethers et al. (29) did not find an association between anal sex and BV. However, a recent prospective study (30) found that women who acquired BV were more likely to have previous colonization of extravaginal reservoirs (anus and oral cavity) with some BVAB and less likely to have protective *Lactobacillus* species, suggesting that BVAB may be acquired vaginally from these extravaginal reservoirs. But the study's authors recognized that their findings may also reflect differences in innate immune response to colonizing bacteria at both vaginal and extravaginal mucosal sites. The protective effect of anal sex in our study may be due to the fact that in our study population a high proportion of anal intercourse was protected by condoms (66% and 80% for primary and other sexual partners respectively) (data not shown). It has also to be noted that anal sex was reported rarely (2.2%), which could impact on the validity of the statistical tests used to assess this association.

The inverse association between vaginal candidiasis and abnormal vaginal flora is the most consistently reported throughout the literature (10, 25). Yeast growth requires low pH, which is not compatible with bacterial vaginosis.

Besides its cross-sectional design, our study presents some other limitations. We were not able to assess the role of some established BV risk factors such as HSV-2 infection, smoking and alcohol consumption because they were not addressed in the questionnaire or tested for at the laboratory level. In addition, because of the high frequency (98%) of self-reported intra-vaginal cleansing practice in our study population, we were not able to ascertain whether this factor was associated with BV or IVF. Finally, there were several self-reported data (number of sexual partners, sex frequency, condom use), suggesting the possibility of residual confounding for some associations.

Nonetheless, the study presents several strengths including the large sample size, the use of the current gold standard for BV and IVF diagnosis (Nugent score) and the high level of the quality assurance system conferred by the clinical trial setting. A great particularity of the present paper is that it contributes to delineating the role of IVF in the determination of BV risk factors, as they have commonly been searched for. In addition, the use of the polytomous logistic regression with the multinomial approach (compared to the binomial approach) helped optimize the control for confounding. To our best knowledge, this is the first paper reporting the use of this approach to explore risk factors of vaginal flora abnormalities.

In summary, this study confirmed the high prevalence of BV among FSWs and found that IVF has almost the same risk or protective factors as BV and that they may represent a continuum of a single disease. It also showed however, that some factors seem to effect somewhat differently regarding these two stages of the disease and this might explain, at least partly, the inconsistency in some findings on BV risk factors. Appropriately designed prospective studies would help better disentangle risk factors of vaginal flora abnormalities.

Conflict of interest: None declared.

Sources of support and acknowledgement: The authors thank the research teams from all 4 study sites for their hard work in collecting and capturing data, the monitoring staff for their assistance in assuring data quality, Doug Taylor from FHI360 for statistical advice and Dr Thurman A R from CONRAD for reviewing early drafts of this article. The authors are particularly indebted to participants without whom this study would not have been possible.

The Cellulose sulphate clinical trial was sponsored by CONRAD (VA, USA) and co-funded by the United States Agency for International Development (USAID) and the Bill & Melinda Gates Foundation.

REFERENCES

1. Hillier SL, Mrazek-Benjamin EJ, Holmes KK, et al. Bacterial vaginosis. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, et al, eds. Sexually transmitted Diseases, 4th ed. New York, NY: MacGraw-Hill; 2008:737-68.
2. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis.* 2007;34:864-9.
3. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997;350:546-50.
4. Johnson LF, Coetzee DJ, Dorrington RE. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections in South Africa: a review. *Sex Transm Infect.* 2005;81:287-93.
5. 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;29:297-301.
6. Schwebke JR. Gynecologic consequences of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2003;30:685-94.
7. Hay PE. Bacterial vaginosis and miscarriage. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17:41-4.
8. McGregor JA, French JL, Parker R, et al. Prevention of premature birth by screening and treatment for common genital tract infections: results of a prospective controlled evaluation. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:157-67.
9. Eckert LO, Moore DE, Patton DL, et al. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2003;11:11-7.
10. McClelland RS, Richardson BA, Graham SM, et al. A prospective study of risk factors for bacterial vaginosis in HIV-1-seronegative African women. *Sex Transm Dis.* 2008;35:617-23.
11. Nagot N, Ouedraogo A, Defer MC, et al. Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex Transm Infect.* 2007;83:365-8.
12. Shethwala ND, Mulla SA, Kosambiya JK, et al. Sexually transmitted infections and reproductive tract infections in female sex workers. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52:198-9.
13. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, et al. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and HIV infection in women: individual participant data meta-analysis. *PLoS Med.* 2011;8:e1000416.
14. Guedou FA, Van Damme L, Mirembe F, et al. Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants

- screened for a randomised controlled trial. *Sex Transm Infect.* Published online first 2012 May 24;doi:10.1136/sextrans-2011-050319.
15. Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, et al. Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med.* 2008;359:463-72.
 16. Uma S, Balakrishnan P, Murugavel KG, et al. Bacterial vaginosis in female sex workers in Chennai, India. *Sex Health.* 2005;2:261-2.
 17. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis.* 2010;202:1907-15.
 18. Watts DH, Springer G, Minkoff H, et al. The occurrence of vaginal infections among HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women: longitudinal findings of the women's interagency HIV study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43:161-8.
 19. Vuylsteke BL, Ettiegne-Traore V, Anoma CK, et al. Assessment of the validity of and adherence to sexually transmitted infection algorithms at a female sex worker clinic in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Sex Transm Dis.* 2003;30:284-91.
 20. Bukusi EA, Cohen CR, Meier AS, et al. Bacterial vaginosis: risk factors among Kenyan women and their male partners. *Sex Transm Dis.* 2006;33:361-7.
 21. Brabin L, Fairbrother E, Mandal D, et al. Biological and hormonal markers of chlamydia, human papillomavirus, and bacterial vaginosis among adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2005;81:128-32.
 22. Silverman JG, Decker MR, Gupta J, et al. HIV prevalence and predictors among rescued sex-trafficked women and girls in Mumbai, India. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43:588-93.
 23. Mbassa MD DK, Kenmogne JB, Abanda NG. Commercial sexual exploitation of minor girls. A multifocal, exploratory and prospective study in Cameroon. *Med Trop* 2009:91-6.
 24. Verstraelen H, Verhelst R, Vanechoutte M, et al. The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. *BMC Infect Dis.* 2010;10:81.
 25. Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, et al. Higher-risk behavioral practices associated with bacterial vaginosis compared with vaginal candidiasis. *Obstet Gynecol.* 2005;106:105-14.
 26. Baisley K, Changalucha J, Weiss HA, et al. Bacterial vaginosis in female facility workers in north-western Tanzania: prevalence and risk factors. *Sex Transm Infect.* 2009;85:370-5.
 27. Rifkin SB, Smith MR, Brotman RM, et al. Hormonal contraception and risk of bacterial vaginosis diagnosis in an observational study of women attending STD clinics in Baltimore, MD. *Contraception.* 2009;80:63-7.

28. Miller L, Patton DL, Meier A, et al. Depomedroxyprogesterone-induced hypoestrogenism and changes in vaginal flora and epithelium. *Obstet Gynecol.* 2000;96:431-9.
29. Fethers K, Twin J, Fairley CK, et al. Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women. *PLoS One.* 2012;7:e30633.
30. Marrazzo JM, Fiedler TL, Srinivasan S, et al. Extravaginal reservoirs of vaginal bacteria as risk factors for incident bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2012;205:1580-8.

Table 1: Characteristics of 1367 female sex workers screened at 2 African and 2 Indian sites prior to enrolment in a microbicide trial

Characteristics	n with (%) or median with [IQR*]
Sites:	
Kampala	516 (37.7)
Chennai	355 (26.0)
Cotonou	447 (32.7)
Mudhol/Jamkhandi	49 (3.6)
Age in years	28 [23 - 35]
Completed years of school	6 [2 - 8]
Cohabiting with a man	288 (21.1)
Exerting an occupation other than commercial sex work	906 (66.3)
Currently used contraceptive^{† ‡}:	
None	840 (61.5)
Oral	72 (5.3)
Injectable	149 (10.9)
Intra-uterine device	11 (0.8)
Female sterilization	294 (21.5)
Number of sexual partners in the past 3 months	80 [25 – 270]
Average number of sexual acts per week	12 [5 – 25]
Number of sexual act in the past 7 days	8 [4 – 20]
Condom use at last sexual act [‡]	1061 (77.7)
Oral sex in the past 30 days	144 (8.3)
Anal sex in the past 30 days	30 (2.2)
Past history of STIs	615 (45.0)
Recent history (less than 6 months) of STIs [#]	362 (26.7)
Vaginal douching	1340 (98.0)
Vaginal pH	5 [5 - 6]
Irregular menstrual cycles [¶]	331 (24.4)
Current STIs and reproductive tract infections:	

HIV	369 (27.0)
Gonorrhoea [§]	111 (8.1)
Chlamydia [§]	80 (5.9)
Trichomoniasis	92 (6.7)
Candidiasis	421 (30.8)
Bacterial vaginosis	651 (47.6)
Intermediate vaginal flora	262 (19.2)
Syphilis [§]	82 (6.0)

*IQR =Inter-quartile range;

[†]: Women who reported condom as exclusive contraceptive method are combined with those using no contraceptive methods as almost all the women used condom primarily for STI/HIV prevention.

[‡]= missing data for 1 woman; [#]= missing data for 11 women; [¶]=missing data for 13 women; [§]=missing data for 3 women

Table 2: Association between vaginal flora abnormalities (as polytomous response variable) and demographical, behavioral and medical factors among 1367 female sex workers: bivariate analysis with control for study site

Factors	BV ^a prevalence (%)	IVF ^b vs. NVF ^c		BV vs. NVF		BV vs. IVF		
	by exposure level (N)	OR ^d and 95% CI ^e	p-value	OR and 95% CI	p-value	OR and 95% CI	p-value	
Sites								
Mudhol/Jamkhandi	63.27 (31/49)	0.70 (0.19- 2.02)	0.5413	2.13 (1.12-4.24)	0.0242	3.04 (1.16 – 10.46)	0.0416	
Cotonou	55.93 (250/447)	2.74 (1.89 - 4.00)	<0.0001	2.59 (1.92-3.52)	<0.0001	0.94 (0.67 – 1.32)	0.7384	
Chennai	42.54 (151/355)	1.23 (0.83 - 1.80)	0.2972	1.07 (0.79-1.44)	0.6586	0.87 (0.60 – 1.28)	0.4796	
Kampala (ref) :	42.44 (219/516)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
Age in 2 categories (years)								
< 20	59.09 (39/66)	0.69 (0.27 – 1.62)	0.4224	1.59 (0.91 – 2.87)	0.1092	2.30 (1.06 - 5.72)	0.0492	
≥ 20	47.04 (612/1301)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
Number of years in school								
≤ 6 years (ref)	49.87 (390/782)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
> 6 years	44.62 (261/585)	1.15 (0.84 - 1.58)	0.3938	0.93 (0.72 - 1.20)	0.5784	0.81 (0.60 - 1.09)	0.1660	
Living with a man								
Yes	40.97 (118/288)	0.96 (0.61 - 1.48)	0.8449	0.73 (0.51 - 1.03)	0.0749	0.76 (0.50 - 1.17)	0.2057	
No	49.40 (533/1079)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	1.00 - -	-	

Exerting an occupation besides sex work										
No (Ref.)	49.24 (227/461)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Yes	46.80 (424/906)	1.21 (0.83 - 1.78)	0.3189		1.19 (0.87 - 1.62)	0.2800		0.98 (0.69- 1.38)	0.8967	
Having ever been pregnant										
Yes	46.95 (585/1246)	1.47 (0.81 - 2.79)	0.2164		0.88 (0.57 - 1.34)	0.5494		0.60 (0.33 – 1.03)	0.0756	
No	54.55 (66/121)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Number of pregnancies *										
[0 - 4] (ref)	46.90 (553/1179)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
[5 - 12]	52.17 (96/184)	1.15 (0.72 - 1.82)	0.5405		1.29 (0.90 - 1.87)	0.1741		1.12 (0.74 – 1.71)	0.5991	
Number of vaginal deliveries (in categories) [§]										
0 (Ref.)	53.70 (138/257)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 1	46.16 (511/1107)	1.55 (1.02 - 2.41)	0.0447		0.94 (0.68 - 1.28)	0.6857		0.60(0.40 – 0.89)	0.0130	
Current contraceptive method [†]										
Female sterilization	43.88 (129/294)	1.12 (0.61 - 2.08)	0.7057		0.94 (0.59 - 1.49)	0.7922		0.84 (0.46 - 1.50)	0.5507	
Intra-uterine device	36.36 (4/11)	0.52 (0.07 - 2.55)	0.4484		0.42 (0.10 - 1.68)	0.2160		0.81 (0.16 - 5.94)	0.8136	
Hormonal	38.91 (86/221)	0.60 (0.38 - 0.96)	0.0348		0.60 (0.42 - 0.86)	0.0050		1.00 (0.63 - 1.60)	0.9879	
None (Ref.)	51.43 (432/840)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Number of sexual partners /last 3 months										
≥ 80 (median)	47.88 (327/683)	0.70 (0.48 - 1.03)	0.0680		0.83 (0.61 - 1.13)	0.2416		1.18 (0.84 - 1.66)	0.3371	
< 80	47.37 (324/684)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Number of new sexual partners /last 3 months										
< 50 (Ref.)	47.63 (321/674)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 50	46.19 (261/565)	0.89 (0.59 - 1.33)	0.5649		0.91 (0.66 – 1.26)	0.5706		1.02 (0.71 – 1.48)	0.8958	
Unknown (could not remember)	53.91 (69/128)	0.76 (0.40 - 1.46)	0.4125		0.76 (0.44 – 1.32)	0.3274		1.00 (0.58 – 173)	0.9954	

Number of sexual acts /last 7 days										
< 35 (Ref.)	46.80 (578/1235)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 35	55.30 (73/132)	0.64 (0.35 - 1.16)	0.1517		1.20 (0.80 - 1.84)	0.3796		1.87 (1.10 - 3.36)	0.0273	
Condom use at the last sexual act [†]										
Yes	46.75 (496/1061)	0.81 (0.56 - 1.18)	0.2634		0.79 (0.58 - 1.07)	0.1254		0.98 (0.69 - 1.37)	0.8935	
No	50.82 (155/305)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Having ever had an STI										
Yes	46.83 (288/615)	1.14 (0.83 - 1.57)	0.4049		0.88 (0.68 - 1.14)	0.3331		0.77 (0.57 - 1.04)	0.0858	
No	48.27 (363/752)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Recent history of STIs [®]										
Yes	48.34 (175/362)	1.00 (0.69 - 1.45)	0.9991		0.92 (0.68 - 1.24)	0.5776		0.92 (0.66 - 1.29)	0.6205	
No	47.38 (471/994)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Anal sex/ past 30 days										
Yes	36.67 (11/30)	0.21 (0.03 - 0.77)	0.0420		0.51 (0.23 - 1.11)	0.0953		2.39 (0.63 - 15.57)	0.2600	
No	47.87 (640/1337)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Oral sex/past 30 days										
Yes	43.86 (50/114)	1.23 (0.71 - 2.10)	0.4558		0.98 (0.62 - 1.55)	0.9195		0.79 (0.48 - 1.34)	0.3769	
No	47.96 (601/1253)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
HIV										
Present	52.03 (192/369)	1.95 (1.37 - 2.79)	0.0002		1.64 (1.23 - 2.20)	0.0009		0.84 (0.61 - 1.15)	0.2707	
Absent	45.99 (459/998)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-
Syphilis [§]										
Present	47.56 (39/82)	1.39 (0.72 - 2.64)	0.3163		1.15 (0.68 - 1.97)	0.5958		0.83 (0.46 - 1.55)	0.5435	
Absent	47.74 (612/1282)	1.00	-	-	1.00	-	-	1.00	-	-

Gonorrhea [§]									
Present	63.06 (70/111)	1.58 (0.82 - 3.04)	0.1643	2.35 (1.42 - 4.03)	0.0013	1.48 (0.89 - 2.57)	0.1452		
Absent	46.29 (580/1253)	1.00 - -		1.00 - -		1.00 - -			
Chlamydia [§]									
Present	61.25 (49/80)	1.18 (0.54 - 2.47)	0.6672	2.02 (1.17 - 3.60)	0.0136	1.71 (0.92 - 3.43)	0.1079		
Absent	46.81 (601/1284)	1.00 - -		1.00 - -		1.00 - -			
Trichomoniasis									
Present	53.26 (49/92)	3.22 (1.71 - 6.17)	0.0003	2.53 (1.47 - 4.55)	0.0012	0.79 (0.47 - 1.33)	0.3576		
Absent	47.22 (602/1275)	1.00 - -		1.00 - -		1.00 - -			
Candidiasis									
Present	39.90 (168/421)	0.55 (0.38 - 0.79)	0.0012	0.63 (0.48 - 0.83)	0.0009	1.14 (0.80 - 1.63)	0.4663		
Absent	51.06 (483/946)	1.00 - -		1.00 - -		1.00 - -			

^a: BV=Bacterial vaginosis; ^b: IVF= Intermediate vaginal flora; ^c: NVF= Normal vaginal flora; ^d: OR=Odds ratio (adjusted for site); ^e: CI=Confidence interval.

*= missing data for 4 woman; [†]= missing data for 1 woman; [©]= missing data for 11 women; [§]=missing data for 3 women.

Table 3 : Association between vaginal flora abnormalities (as polytomous and then as dichotomous response variable) and demographical, behavioral and medical factors among 1367 female sex workers: bivariate analysis with control for study site

Factors	Polytomous logistic models				Dichotomous logistic models			
	IVF ^a vs. NVF ^b		BV ^c vs. NVF		BV vs. (IVF+ NVF) ("Non-BV model")		(BV+IVF) vs. NVF ("NVF model")	
	OR ^c and 95% CI ^d	p-value	OR and 95% CI	p-value	OR and 95% CI	p-value	OR and 95% CI	p-value
Sites								
Mudhol/Jhamkandi	0.70 (0.19- 2.02)	0.5413	2.13 (1.12-4.24)	0.0242	2.34 (1.29 - 4.36)	0.0061	1.73 (0.93 - 3.40)	0.0955
Cotonou	2.74 (1.89 – 4.00)	<0.0001	2.59 (1.92-3.52)	<0.0001	1.72 (1.33 - 2.22)	<0.0001	2.63 (1.98 - 3.52)	<0.0001
Chennai	1.23 (0.83 - 1.80)	0.2972	1.07 (0.79 -1.44)	0.6586	1.00 (0.76 - 1.32)	0.9782	1.11 (0.84 - 1.47)	0.4445
Kampala (ref) :	1.00 -	-	1.00 -	-	1.00 -	-	1.00 -	-
Age <20 years	0.69 (0.27 – 1.62)	0.4224	1.59 (0.91 – 2.87)	0.1092	1.78 (1.07 - 3.01)	0.0281	1.33 (0.77 - 2.36)	0.3113
> 6 years in school	1.15 (0.84 - 1.58)	0.3938	0.93 (0.72 – 1.20)	0.5784	0.88 (0.71 - 1.10)	0.2743	0.99 (0.78 - 1.26)	0.9323
Living with a man	0.96 (0.61 – 1.48)	0.8449	0.73 (0.51 – 1.03)	0.0749	0.74 (0.54 - 1.01)	0.0591	0.79 (0.57 - 1.09)	0.1535
Having an occupation besides sex work	1.21 (0.83 – 1.78)	0.3189	1.19 (0.87 – 1.62)	0.2800	1.09 (0.84 - 1.42)	0.5103	1.19 (0.89 - 1.60)	0.2350
Having ever been pregnant	1.47 (0.81 – 2.79)	0.2164	0.88 (0.57 – 1.34)	0.5494	0.77 (0.52 - 1.12)	0.1761	0.99 (0.65 - 1.49)	0.9758
Number of pregnancies ≥ 5*	1.15 (0.72 – 1.82)	0.5405	1.29 (0.90 – 1.87)	0.1741	1.22 (0.89 - 1.67)	0.2192	1.25 (0.89 - 1.79)	0.2102
Number of vaginal deliveries ≥ 1	1.55 (1.02 – 2.41)	0.0447	0.94 (0.68 – 1.28)	0.6857	0.80 (0.61 - 1.05)	0.1101	1.07 (0.79 - 1.44)	0.6713

Current contraceptive method [†]									
Female sterilization	1.12 (0.61 – 2.08)	0.7057	0.94 (0.59 – 1.49)	0.7922	0.91 (0.60 - 1.38)	0.6519	0.99 (0.64 - 1.52)	0.9563	
Intra-uterine device	0.52 (0.07 – 2.55)	0.4484	0.42 (0.10 – 1.68)	0.2160	0.54 (0.14 - 1.83)	0.3342	0.45 (0.13 - 1.64)	0.2068	
Hormonal	0.60 (0.38 – 0.96)	0.0348	0.60 (0.42 - 0.86)	0.0050	0.71 (0.51 - 0.98)	0.0366	0.60 (0.43 - 0.84)	0.0026	
None (Ref.)	1.00 -	-	1.00 -	-	1.00 -	-	1.00 -	-	
Number of sexual partners /last 3 months ≥ 80	0.70 (0.48 – 1.03)	0.0680	0.83 (0.61 – 1.13)	0.2416	0.96 (0.74 - 1.25)	0.7703	0.79 (0.59 - 1.06)	0.1161	
Number of new sexual partners/last 3 months									
< 50 (Ref.)	1.00 -	-	1.00 -	-					
≥ 50	0.89 (0.59 – 1.33)	0.5649	0.91 (0.66 – 1.26)	0.5706	1.00 -	-	1.00 -	-	
Unknown (could not remember)	0.76 (0.40 – 1.46)	0.4125	0.76 (0.44 – 1.32)	0.3274	0.95 (0.72 - 1.26)	0.7452	0.90 (0.66 - 1.23)	0.5176	
					0.87 (0.56 - 1.35)	0.5338	0.76 (0.46 - 1.29)	0.3063	
Number of sexual acts /last 7 days ≥ 35	0.64 (0.35 – 1.16)	0.1517	1.20 (0.80 – 1.84)	0.3796	1.41 (0.97 - 2.04)	0.0723	1.04 (0.70 - 1.56)	0.8619	
Condom use at the last sexual act [†]	0.81 (0.56 – 1.18)	0.2634	0.79 (0.58 – 1.07)	0.1254	0.86 (0.66 - 1.11)	0.2554	0.79 (0.59 - 1.05)	0.1154	
Having ever had an STI	1.14 (0.83 – 1.57)	0.4049	0.88 (0.68 – 1.14)	0.3331	0.84 (0.67 - 1.05)	0.1198	0.95 (0.75 - 1.21)	0.6829	
Recent history of STIs [⊙]	1.00 (0.69 – 1.45)	0.9991	0.92 (0.68 – 1.24)	0.5776	0.92 (0.71 - 1.19)	0.5183	0.94 (0.71 - 1.25)	0.6770	
Anal sex/ past 30 days	0.21 (0.03 – 0.77)	0.0420	0.51 (0.23 – 1.11)	0.0953	0.72 (0.33 - 1.51)	0.3923	0.42 (0.20 - 0.89)	0.0236	
Oral sex/past 30 days	1.23 (0.71 – 2.10)	0.4558	0.98 (0.62 – 1.55)	0.9195	0.90 (0.60 - 1.34)	0.6055	1.05 (0.69 - 1.61)	0.8194	
HIV	1.95 (1.37 – 2.79)	0.0002	1.64 (1.23 – 2.20)	0.0009	1.24 (0.97 - 1.59)	0.0811	1.72 (1.31 - 2.28)	0.0001	
Syphilis [§]	1.39 (0.72 – 2.64)	0.3163	1.15 (0.68 – 1.97)	0.5958	1.02 (0.64 - 1.62)	0.9219	1.22 (0.75 - 2.02)	0.4311	
Gonorrhea [§]	1.58 (0.82 – 3.04)	0.1643	2.35 (1.42 – 4.03)	0.0013	1.91 (1.27 - 2.91)	0.0020	2.12 (1.30 - 3.60)	0.0035	
Chlamydia [§]	1.18 (0.54 – 2.47)	0.6672	2.02 (1.17 – 3.60)	0.0136	1.89 (1.19 - 3.06)	0.0079	1.77 (1.05 - 3.11)	0.0386	
Trichomoniasis	3.22 (1.71 – 6.17)	0.0003	2.53 (1.47 – 4.55)	0.0012	1.50 (0.98 - 2.32)	0.0639	2.73 (1.63 - 4.79)	0.0002	
Candidiasis	0.55 (0.38 – 0.79)	0.0012	0.63 (0.48 – 0.83)	0.0009	0.76 (0.59 - 0.98)	0.0347	0.60 (0.47 - 0.78)	0.0001	

^a: IVF= Intermediate vaginal flora; ^b: NVF= Normal vaginal flora; ^c: OR=Odds ratio (adjusted for site); ^d: CI=Confidence interval; ^e: BV=Bacterial vaginosis.
* = missing data for 4 woman; [†] = missing data for 1 woman; [Ⓢ] = missing data for 11 women; [§] = missing data for 3 women.

Table 4 : Final models for the multivariate analysis of risk factors of vaginal flora abnormalities (modelised as polytomous and then dichotomous response variable) among 1367 female sex workers screened at 2 African and 2 Indian sites

Factors	Polytomous logistic models				Dichotomous logistic models			
	IVF ^a vs. NVF ^b		BV ^e vs. NVF		BV vs. (NVF+IVF) ("Non-BV model")		(BV +IVF) vs. NVF ("NVF model")	
	OR ^c and 95% CI ^d	p-value	OR and 95% CI	p-value	OR and 95% CI	p-value	OR and 95% CI	p-value
Sites								
Mudhol/Jhamkandi	0.38 (0.10 - 1.19)	0.1194	1.59 (0.78- 3.37)	0.2137	2.17 (1.13 - 4.28)	0.0219	1.18 (0.59 -2.47)	0.6400
Cotonou	2.25 (1.47 –3.45)	0.0002	2.19 (1.55– 3.11)	<0.0001	1.56 (1.16-2.09)	0.0030	2.21 (1.59 - 3.07)	<0.0001
Chennai	0.99 (0.53 –1.85)	0.9857	1.16 (0.71 – 1.89)	0.5494	1.17 (0.76 - 1.80)	0.4736	1.11 (0.71 - 1.76)	0.6420
Kampala (ref)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Age < 20 years	0.89 (0.33 –2.12)	0.7946	1.80 (1.00 – 3.33)	0.0524	1.83 (1.08- 3.15)	0.0250	1.56 (0.88- 2.84)	0.1321
Number of sexual acts/last 7 days ≥ 35	0.76 (0.40 – 1.38)	0.3749	1.37 (0.89 – 2.14)	0.1560	1.51 (1.03- 2.22)	0.0352	1.19 (0.78- 1.83)	0.4189
Current contraceptive method [†]								
Female sterilization	1.34 (0.72 - 2.50)	0.3552	1.05 (0.65 - 1.69)	0.8487	0.95 (0.62 - 1.45)	0.8116	1.12 (0.71 - 1.75)	0.6264
Intra-uterine device	0.53 (0.07 - 2.72)	0.4763	0.35 (0.07 - 1.40)	0.1317	0.43 (0.11- 1.51)	0.1981	0.38 (0.10- 1.46)	0.1455
Hormonal	0.65 (0.40- 1.04)	0.0753	0.62 (0.43 - 0.90)	0.0110	0.71 (0.51 - 0.99)	0.0469	0.63 (0.45 - 0.89)	0.0078
None (Ref.)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Anal sex/ past 30 days	0.21 (0.03 - 0.77)	0.0416	0.53 (0.23 - 1.17)	0.1192	0.75 (0.34- 1.59)	0.4582	0.43 (0.19 - 0.92)	0.0319

HIV	1.98(1.37 - 2.86)	0.0003	1.62 (1.20-2.20)	0.0017	1.22 (0.95 - 1.57)	0.1189	1.72 (1.29 - 2.29)	0.0002
Gonorrhea [§]	1.25 (0.64 - 2.44)	0.5119	2.01 (1.19 - 3.49)	0.0107	1.80 (1.19 - 2.77)	0.0060	1.77 (1.07 – 3.05)	0.0306
Trichomoniasis	3.26 (1.71 - 6.31)	0.0004	2.39 (1.37 - 4.33)	0.0029	1.42 (0.92- 2.21)	0.1156	2.62 (1.55 - 4.65)	0.0005
Candidiasis	0.52 (0.36 - 0.75)	0.0005	0.59 (0.44 - 0.78)	0.0002	0.73 (0.56- 0.94)	0.0163	0.57 (0.43 - 0.74)	<0.0001

^a: IVF= Intermediate vaginal flora; ^b: NVF= Normal vaginal flora; ^c: OR=Odds ratio (adjusted for site); ^d: CI=Confidence interval; ^e: BV=Bacterial vaginosis.

[†]= missing data for 1 woman; [§]=missing data for 3 women.

4 Chapitre 4. Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants screened for a randomized controlled trial

Name and address for correspondence: Michel Alary, MD, PhD, Unité de Recherche en Santé des Populations (URESP), Centre Hospitalier *Affilié* Universitaire de Québec, Hôpital Saint-Sacrement, 1050, Chemin Sainte Foy, Québec (Québec) G1S 4L8, Canada

Tel: (418) 682 7387; Fax: 418 682 7949; email: malary@uresp.ulaval.ca

Authors: Fernand A. Guédou, MD, MSc,*† Lut Van Damme, MD, PhD,‡ Florence Mirembe, MD,¶ Suniti Solomon, MD,§ Marissa Becker, MD,# Jennifer Deese, MSc‡, Tania Crucitti, PhD,© Michel Alary, MD, PhD,*†

Affiliations: *Unité de Recherche en Santé des Populations, Centre Hospitalier *Affilié* Universitaire de Québec (Québec) Canada ; †Département de Médecine Sociale et Préventive, Université Laval, Québec (Québec) Canada; ‡Family Health International, Durham, NC, USA; ¶ Makerere University, Kampala, Uganda; § Y.R Gaitonde Center for AIDS Research and Education, Chennai, India; # Centre for Global Public Health, University of Manitoba, Winnipeg, Canada; © Department of Microbiology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

(Lut Van Damme was formerly at CONRAD, Arlington, VA, USA)

KEY WORDS: Bacterial vaginosis; Intermediate vaginal flora; HIV; Female sex workers; CONRAD Cellulose sulphate trial

Word count: 2465

La flore vaginale intermédiaire est associée à la prévalence du VIH aussi fortement que la vaginose bactérienne dans une étude transversale chez des participantes dépistées pour un essai contrôlé randomisé

Cet article a été publié électroniquement dans le journal Sexually transmitted Infections le 24 mai 2012.

RÉSUMÉ:

Objectif: Les auteurs ont analysé les données provenant de travailleuses du sexe (TS) dépistées avant leur participation à un essai de microbicide, afin d'examiner l'association entre les anomalies de la flore vaginale et l'infection par le VIH, avec un accent particulier sur le rôle de la flore vaginale intermédiaire (FVI) dans cette association.

Méthodes: Les données des sites de Kampala, Cotonou, Chennai et Mudhol / Jamkhandi ont été analysées. Les participantes ont été interviewées et ont fourni du sang pour le dépistage du VIH et de la syphilis par les anticorps, des échantillons génitaux pour le diagnostic des anomalies de la flore vaginale (en utilisant le score de Nugent) et d'autres infections des voies génitales. La régression log-binomiale a été utilisée pour estimer le rapport de prévalence du VIH (RP) par rapport à la vaginose bactérienne (VB) et la FVI.

Résultats: Parmi les 1367 femmes, la prévalence de la VB, de la FVI et du VIH étaient respectivement de 47,6% (IC à 95% = 45,0 à 50,3), 19,2% (IC à 95% = 17,1 à 21,2) et 27,0% (IC à 95% = 24,6 à 29,3). En analyse multivariée, en ajustant pour le site d'étude, l'âge, le nombre d'années de scolarité, la profession, la stérilisation féminine, le sexe oral, les antécédents d'IST, la gonorrhée et la candidose, la FVI a été significativement associée à l'infection à VIH avec un RP semblable à celui de la VB (RP ajusté (RPa) = 1,56 (IC à 95% = 1,22 à 1,98) et 1,48 (IC à 95% = 1,20 à 1,84) respectivement).

Conclusions: Bien que le caractère transversal de l'étude exclût toute interprétation directionnelle des résultats, les données laissent penser que la FVI peut être aussi importante que la VB dans

l'acquisition du VIH. Nous recommandons davantage de recherches prospectives afin de mieux comprendre le lien entre la FVI et l'acquisition du VIH.

ABSTRACT:

Objective: The authors analyzed data from female sex workers (FSWs) screened prior to participation in a microbicide trial, to examine the association between prevalent vaginal flora abnormalities and HIV infection, with special emphasis on the role of the intermediate vaginal flora (IVF) in this association.

Methods: Data from the Kampala, Cotonou, Chennai and Mudhol/Jamkhandi sites were analyzed. Participants were interviewed and provided blood for HIV and syphilis antibody testing, genital samples for the diagnosis of vaginal flora abnormalities (using Nugent score) and other reproductive tract infections. Log-binomial regression was used to estimate the HIV prevalence ratio (PR) in relation to IVF and bacterial vaginosis (BV).

Results: Among 1367 women, BV, IVF and HIV prevalences were 47.6% (95%CI=45.0–50.3), 19.2% (95%CI=17.1-21.2) and 27.0% (95%CI=24.6–29.3) respectively. In multivariate analysis, adjusting for study site, age, years of education, occupation, female sterilisation, oral sex, past history of STI, gonorrhoea and candidiasis, IVF was significantly associated with HIV infection with a PR similar to that of BV (adjusted PR=1.56 (95%CI=1.22-1.98) and 1.48 (95%CI=1.20-1.84) respectively).

Conclusions: Though the cross-sectional design of the study precludes directional interpretation of the findings, the data do suggest that IVF may be as important as BV in HIV acquisition. We recommend prospective research to better understand the association between IVF and HIV acquisition.

INTRODUCTION

Bacterial vaginosis (BV) is the most common cause of vaginal infection in women of reproductive age and is more prevalent in developing than developed countries.[1] Prevalence of BV is particularly high in female sex workers (FSWs), up to 70% in some reports.[2] The aetiological

agent of BV is still controversial, but the current consensus is that of a polymicrobial infection.[1] Typically, BV is clinically diagnosed by the Amsel's criteria[3] and biologically by Nugent's method.[4] The latter is the current gold standard for BV diagnosis and is based on a standardized scoring system grading vaginal flora as normal (Nugent score (NS) = 0-3), intermediate (NS = 4-6) and BV (NS = 7-10). This method has been validated and proved to have both high sensitivity and specificity as well as good inter-observer agreement.[4]

The association between BV and HIV infection was first reported in 1995.[5] Since that time, there has been accumulating evidence suggesting that BV is an important risk factor for HIV infection.[6-13] However, most studies that investigated this association classified BV into two categories (BV vs. non-BV) [5-7, 11-12, 14], and as such, little attention has been paid to the role of the intermediate level disturbance of the vaginal flora (IVF) in this association. The few studies that have examined this association using the three-level categorization of BV (with the normal flora category as reference) have found discrepant results. Some of these studies found a statistically significant increase of HIV risk with BV but not with IVF.[15-16] However in other studies, this increase was significant for both BV and IVF,[10, 17-18] but the extent to which these two levels of risk were different was not assessed. From a public health viewpoint, it is critical to understand the risk associated with both IVF and BV for maximal HIV prevention. A recent meta-analysis of individual-level patient data, including ten previous prospective studies conducted in six Eastern and Southern African countries, re-classified data on vaginal flora abnormalities from two (BV vs. non-BV) to three categories with the primary objective of analyzing the relationship between intra-vaginal practices and HIV acquisition.[19] This study found that both IVF and BV were significantly associated with an increased risk of HIV with respective adjusted hazard ratios of 1.41 (95% CI=1.12-1.79) and 1.53 (95%CI=1.24-1.89) when considering vaginal flora status as assessed at the visit before HIV seroconversion.

The present study used data from the screening visits of the CONRAD Cellulose Sulphate (CS) trial [20] to examine the association between HIV, IVF and BV.

MATERIALS AND METHODS

Settings, subjects and procedures

Detailed methods for the randomized trial are presented elsewhere.[20] Five sites located in Durban (South Africa), Kampala (Uganda), Cotonou (Benin), Chennai and Mudhol/Jhamkandi (India) participated in the trial. Due to some changes that occurred in the BV diagnosis procedures at the Durban site, the present analysis was restricted to participants screened at the other four sites. Women were recruited at the Mulago Hospital (Makerere University) in Kampala, Uganda; at a community clinic and a Sexually Transmitted Infections (STI) clinic in Cotonou, Benin; at the YRG Care center in Chennai, India; and in clinics in Mudhol and Jhamkandi in Karnataka State, India. The study was approved by ethics committees of each collaborating center.

All participants were aged 18 years or older and provided written informed consent. At the screening visit, trained health providers administered a questionnaire which captured information on participants' socio-demographics, sexual behaviours, current contraceptive method, intra-vaginal cleansing practices (product and reason) and history of STIs. A gynaecological examination was conducted including speculum and bimanual pelvic examination and vaginal pH measurement. Two endocervical swabs (for gonorrhoea and Chlamydia testing) and one high vaginal swab (for BV, trichomoniasis (TV) and candidiasis testing) were collected. Venous blood was taken for syphilis and HIV antibody testing, and urine for pregnancy testing.

Vaginal flora abnormalities were assessed by scoring a Gram stained smear according to Nugent.[4] Trichomoniasis and candidiasis were diagnosed microscopically on wet mount. The endocervical swabs were tested with the Strand Displacement Amplification technique, SDA BD ProbeTec ET CT/NG (Becton Dickinson, Sparks, Nevada, USA).

HIV antibody testing was performed according to national HIV testing guidelines. In general, two rapid assays were used (in series or in parallel) and a third as a tie breaker in case of discordant results.

For syphilis diagnosis, Rapid Plasma Reagin (RPR) test was performed and reactive samples were then further analysed using a treponemal antibody specific test. Samples reactive by both RPR and the treponemal antibody specific test were considered positive for syphilis.

The brand of pregnancy test varied among the study sites, but all used rapid assays. All the above mentioned tests were performed according to the manufacturer's instructions.

Statistical methods

Continuous variables were described by medians and inter-quartile ranges (IQR). Proportions were computed for categorical variables.

We used two types of vaginal flora abnormality categorization in the analysis: 1) two-level categorization (BV [NS=7-10] vs. non-BV [NS=0-6, referent]) and 2) three-level categorization (normal [NS=0-3, referent], IVF [NS=4-6] and BV [NS=7-10]). Prevalences of BV, IVF and HIV and respective 95% confidence intervals (CI) were computed.

Factors reported in the literature as potential HIV risk factors were selected for the regression analyses. Bivariate analyses of each potential risk factor and HIV, controlling for study site, were done first. Variables with p-values < 0.20 in bivariate analyses were included in a multivariate model along with variables identified in previous studies as potential confounding variables (regardless of p-value). We attempted to fit the multivariate model using backward selection of covariates with an a priori specified rule that covariates which resulted in > 10% change in the prevalence ratio would be retained. However, no variable by its removal resulted in a >10% change, therefore covariates with a p-value < 0.05 were retained in the final model. The significance level for testing associations was set at 0.05. All analyses were performed using log-binomial regression and effect estimates are reported as prevalence ratios. All statistical tests were two-tailed. Data were analysed with SAS version 9.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

RESULTS

From July 2005 to January 2007, 1491 women were screened at the four study sites. BV data were available for 1367 women and all were included in the present analysis. The characteristics of the 124 excluded women did not differ significantly from those of women included in the analysis (data not shown). The socio-demographic and behavioural characteristics of the women included are summarized in table 1.

Approximately 70% of the 1367 women were recruited at the two African sites and the remaining at the two Indian sites. The median age was 28 years (IQR=23-35) and the median number of

years of education was 6 (IQR=2-8). The median for reported numbers of sexual partners in the previous three months was 80 (IQR=25-270). The median numbers of sexual acts per week and in the week prior to screening were 12 (IQR=5-25) and 8 (IQR=4-20) respectively. One thousand and sixty-one (77.7%) women self-reported condom use at the last sexual act. Almost all participants (98.0%) practiced intra-vaginal cleansing and 615 (45.0%) reported a history of at least one STI.

Three hundred sixty-nine women were diagnosed with HIV, 651 with BV and 262 with IVF, giving prevalences of 27.0% (95%CI=24.7–29.4), 47.6% (95%CI=45.0–50.3) and 19.2% (95%CI=17.1–21.2) respectively. Trichomoniasis and candidiasis were present in 92 (6.7%) and 421 (30.8%) women respectively. Cervical swabs were obtained from 1364 women among whom, 111 (8.1%) were positive for gonorrhoea and 80 (5.9%) for Chlamydia. The prevalence of syphilis was 6.0% (82/1364).

In the analysis using dichotomous categorization of BV while controlling for study site, there was a marginal positive association between BV and HIV with a prevalence ratio (PR) =1.18 (95%CI=0.99–1.40) (table 2). In the analysis using three-level categorization of BV, the association with HIV was significant with PR= 1.58 (95%CI=1.23 - 2.03) and PR=1.43 (95%CI=1.15 - 1.77) for IVF and BV respectively vs. normal flora.

Other factors positively and significantly associated with HIV included a past history of STIs, recent history of STIs, gonorrhoea, older age and irregular menstrual cycles. Those factors that were significantly, but negatively, associated with HIV included having an occupation besides sex work, oral sex in the past 30 days, a higher level of education and female sterilisation.

In multivariate analysis (table 3), BV classified in two categories was significantly associated with HIV (adjusted PR=1.21, 95%CI=1.03–1.44). This association was stronger when the three-level categorisation was used with PR=1.56 (95%CI=1.22-1.98) and PR=1.48 (95%CI=1.20-1.84) respectively for IVF and BV. Other risk factors found to be significantly associated with HIV included study site, age, past history of STI, gonorrhoea and candidiasis for positive associations, and education, occupation, female sterilisation and oral sex for negative associations.

DISCUSSION

Among these high risk women aged 18 to 60 years, recruited at two African and two Indian sites, we estimated BV and HIV prevalence at 47.6% and 27.0% respectively. These figures confirmed the high prevalence of both infections among FSWs in Sub-Saharan Africa and India.[2, 14, 21-24] In addition, 19.2% of women were found to have an IVF.

HIV prevalence was significantly higher in women with IVF compared to women with normal flora as evidenced by the PR of 1.56 (95% CI=1.22-1.98). This resulted in a substantially higher HIV PR when using women with normal vaginal flora as the referent vs. using women without BV (combined normal flora and IVF) as the referent category. These results are consistent with some previous studies which also reported a significant association with IVF,[10, 17, 19] but discrepant from other studies that did not find a significant difference between normal flora and IVF as to HIV risk.[15-16] Our findings suggest that using NS < 7 as a reference to measure the increased risk of HIV related to BV could lead to underestimation. This is a biologically justified approach as it views IVF as a borderline stage of the same disease[25] and not a normal or “non-disease” state. Indeed, both IVF and BV are likely to be determined by the same risk factors and it is theoretically reasonable to hypothesize that women with IVF convert more frequently between IVF and BV than between IVF and normal flora.

Our findings differed from those of most previous studies in that the strength of the association we found with IVF was similar to that with BV.[6, 17-18, 26] To our knowledge, only van de Wijger et al.,[10] in their study involving women from Zimbabwe and Uganda, found a higher association with IVF for the Uganda study site. The varying findings on the relationship between IVF and HIV across studies may be due to different biological characteristics of IVF, including the microbial community types, the duration of the intermediate status and the distribution of women regarding extreme scores of the category. Alternatively, considering the high frequency of intra-vaginal cleansing practice in some populations (as observed in our study), recent intra-vaginal cleansing could affect the Gram stain scoring so that some women with BV may have been misclassified into the IVF category. If this were true, we would also expect an inflation of IVF cases; however, the prevalence of IVF in our study was not higher than those reported in previous studies. Also, in our study, Gram stained slides with little or no epithelial cells and/or

microorganisms or those with destroyed cells (because the swab was not properly rolled on the slide) were considered not suitable and thus not scored.

Indeed, the rapid fluctuation of the vaginal microbiota makes it difficult to disentangle the true difference, if any, in HIV risk associated with IVF vs. BV, even in prospective studies. Brotman et al. recently found that women may naturally move between the three categories in as little as three days.[27] Furthermore, half of the BV episodes diagnosed in this study lasted only for three days.[27] This observation suggests prospective studies assessing BV as risk factor for incident HIV should treat BV as a time-dependent variable.

Since our study was cross-sectional, the temporality of the associations we observed could not be established. The biological plausibility of the increased risk of HIV related to abnormal vaginal flora however has been well documented.[28-30] In addition, we were not able to collect data on some potential confounders such as *Herpes simplex virus type 2* (HSV-2) infection and alcohol consumption, although we do not suspect that they could fully explain the observed association. Self-reported variables included in our multivariate model, such as condom use at the last intercourse, number of sexual partners in the last three months and past history of STIs may have been subject to social desirability and/or memory bias resulting in possible misclassification. The latter would have led to residual confounding of the association between BV, IVF and HIV. Our study involved women at high risk of HIV and other cofactors of HIV and may therefore not be generalizable to women from the general population.

On the other hand, the study presents several strengths. Most importantly, the study result revealed that the association between IVF and HIV was as strong as that between BV and HIV in this study population, highlighting the need to pay more attention to IVF in regard to HIV risk. In addition, the study included FSWs from geographically diverse areas including West Africa, Eastern Africa and India. Because screening for STIs was a routine study procedure, we were able to control for STIs in our analyses. In addition, as part of a phase III clinical trial, this study benefited from a large sample size, use of the current gold standard for BV diagnosis (Nugent score) and research sites with well-trained research personnel and quality control procedures which contributed to data accuracy and comparability across sites. Finally, as the outcome of interest (HIV) was highly prevalent in our study population, the use of log-binomial regression to measure the association should well approximate the risk ratio (in comparison with logistic regression).

In summary, this study confirms the high prevalence of BV and HIV and the existence of a relationship between the two conditions among FSWs who are at high risk of acquiring and transmitting HIV, particularly in developing countries. In addition, the findings suggest that, compared to women with normal flora, those with IVF have a higher HIV prevalence similar to women with BV. There is a need for more prospective research, specifically designed to assess the causality of the association between vaginal flora abnormalities and HIV, with a special attention for the role of IVF in this association. This implies that the Nugent scoring system should be used (not Amsel's criteria) to enable delineation of the IVF and BV categories and that laboratory technicians should be adequately trained. Future studies may also focus on identifying specific (clinical or biological) features of IVF conducive to high risk for HIV and could develop an algorithm for selecting appropriate IVF cases for treatment.

Key messages:

- There was a statistically significant association between intermediate vaginal flora and prevalent HIV infection and this association was as strong as that between bacterial vaginosis and HIV.
- Using two-level categorization of BV (BV vs. non-BV) to examine the effect of vaginal flora abnormalities on HIV prevalence underestimates this effect.
- There is a need for prospective studies designed to assess the causality of the association between vaginal flora abnormalities and HIV infection.

Acknowledgements: The authors are particularly indebted to participants without whom this study would not have been possible. They also wish to recognize the valuable contribution of the research teams from all four study sites. The authors thank the monitoring staff for their assistance in assuring data quality, Doug Taylor from FHI360 for statistical advice and Dr Thurman A R from CONRAD for reviewing early drafts of this article.

Competing interest: None declared

Funding: The parent microbicide trial (Randomized Controlled Trial of 6% Cellulose Sulfate Gel and the Effect on Vaginal HIV Transmission)) was sponsored by CONRAD (VA, USA) and co-funded by the United States Agency for International Development (USAID) through agreement N° HRN-A-00-98-00020-00 and the Bill and Melinda Gates Foundation grant N° 655000.

Contributors: All authors were involved in the parent multicenter microbicide clinical trial that generated the data. For the present manuscript, Fernand A. Guédou (FAG) and Michel Alary (MA) conducted the statistical analyses and interpreted results. FAG wrote the first draft of the manuscript and MA revised it before further revision by other co-authors. In addition, Jennifer Deese (JD) and Marissa Becker (MB) edited the text. All authors revised and approved the present version of the manuscript.

REFERENCES:

1. Demba E, Morison L, van der Loeff MS, et al. Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in The Gambia, West Africa. *BMC Infect Dis* 2005;**5**:12.
2. Johnson LF, Coetzee DJ, Dorrington RE. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections in South Africa: a review. *Sex Transm Infect* 2005;**81**:287-93.
3. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;**74**:14-22.
4. 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**:297-301.
5. Cohen CR, Duerr A, Pruithithada N, et al. Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. *AIDS* 1995;**9**:1093-7.
6. Warren D, Klein RS, Sobel J, et al. A multicenter study of bacterial vaginosis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;**9**:133-41.
7. Myer L, Denny L, Telerant R, et al. Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: a nested case-control study. *J Infect Dis* 2005;**192**:1372-80.
8. Myer L, Kuhn L, Stein ZA, et al. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and women's susceptibility to HIV infection: epidemiological evidence and biological mechanisms. *Lancet Infect Dis* 2005;**5**:786-94.
9. Taha TE, Hoover DR, Dallabetta GA, et al. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS* 1998;**12**:1699-706.
10. van de Wijgert JH, Morrison CS, Brown J, et al. Disentangling contributions of reproductive tract infections to HIV acquisition in African Women. *Sex Transm Dis* 2009;**36**:357-64.
11. Fonck K, Kaul R, Keli F, et al. Sexually transmitted infections and vaginal douching in a population of female sex workers in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Infect* 2001;**77**:271-5.
12. Riedner G, Rusizoka M, Hoffmann O, et al. Baseline survey of sexually transmitted infections in a cohort of female bar workers in Mbeya Region, Tanzania. *Sex Transm Infect* 2003;**79**:382-7.
13. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, et al. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 2008;**22**:1493-501.
14. Nagot N, Ouedraogo A, Defer MC, et al. Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex Transm Infect* 2007;**83**:365-8.
15. Royce RA, Thorp J, Granados JL, et al. Bacterial vaginosis associated with HIV infection in pregnant women from North Carolina. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1999;**20**:382-6.
16. Reid SE, Dai JY, Wang J, et al. Pregnancy, contraceptive use, and HIV acquisition in HPTN 039: relevance for HIV prevention trials among African women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;**53**:606-13.
17. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997;**350**:546-50.

18. Moodley P, Connolly C, Sturm AW. Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *J Infect Dis* 2002;**185**:69-73.
19. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, et al. Intravaginal Practices, Bacterial Vaginosis, and HIV Infection in Women: Individual Participant Data Meta-analysis. *PLoS Med* 2011;**8**:e1000416.
20. Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, et al. Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med* 2008;**359**:463-72.
21. McClelland RS, Richardson BA, Graham SM, et al. A prospective study of risk factors for bacterial vaginosis in HIV-1-seronegative African women. *Sex Transm Dis* 2008;**35**:617-23.
22. Shethwala ND, Mulla SA, Kosambiya JK, et al. Sexually transmitted infections and reproductive tract infections in female sex workers. *Indian J Pathol Microbiol* 2009;**52**:198-9.
23. Uma S, Balakrishnan P, Murugavel KG, et al. Bacterial vaginosis in female sex workers in Chennai, India. *Sex Health* 2005;**2**:261-2.
24. Becker M, Stephen J, Moses S, et al. Etiology and determinants of sexually transmitted infections in Karnataka state, south India. *Sex Transm Dis* 2010;**37**:159-64.
25. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999;**180**:1863-8.
26. Jamieson DJ, Duerr A, Klein RS, et al. Longitudinal analysis of bacterial vaginosis: findings from the HIV epidemiology research study. *Obstet Gynecol* 2001;**98**:656-63.
27. Brotman RM, Ravel J, Cone RA, et al. Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sex Transm Infect* 2010;**86**:297-302.
28. Thurman AR, Doncel GF. Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. *Am J Reprod Immunol* 2011;**65**:89-98.
29. Mayer KH, Venkatesh KK. Interactions of HIV, other sexually transmitted diseases, and genital tract inflammation facilitating local pathogen transmission and acquisition. *Am J Reprod Immunol* 2011;**65**:308-16.
30. Kaushic C. HIV-1 infection in the female reproductive tract: role of interactions between HIV-1 and genital epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2011;**65**:253-60.

Licence statement: The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd to permit this article (if accepted) to be published in STI and any other BMJPG products and sub-licences such use and exploit all subsidiary rights, as set out in our licence <http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/licence-forms>

Table 1 :: Characteristics of 1367 female sex workers screened at two African and two Indian sites prior to enrolment in a microbicide trial

Characteristics	N (%) or median [IQR*]
Sites:	
Kampala	516 (37.7)
Chennai	355 (26.0)
Cotonou	447 (32.7)
Mudhol/Jhamkandi	49 (3.6)
Age in years	28 [23 - 35]
Completed years of school	6 [2 - 8]
Cohabiting with a man	288 (21.1)
Having an occupation other than sex work	906 (66.3)
Currently used contraceptive:	
None	31 (2.3)
Hormonal	221 (16.2)
Intra-uterine device	11 (0.8)
Female sterilization	294 (21.5)
Condom	809 (59.2)
Number of sexual partners in the past 3 months	80 [25 – 270]
Average number of sexual acts per week	12 [5 – 25]
Number of sexual acts in the past 7 days	8 [4 – 20]
Condom use at the last sexual act‡	1061 (77.7)
Oral sex in the past 30 days	114 (8.3)
Anal sex in the past 30 days	30 (2.2)
Past history of STIs	615 (45.0)
Recent history (less than 6 months) of STIs #	362 (27.0)
Intra-vaginal cleansing	1340 (98.0)
Vaginal pH	5 [5 - 6]
Irregular menstrual cycles ¶	331 (24.4)

Current STIs and reproductive tract infections:

HIV	369 (27.0)
Neisseria gonorrhoeae §	111 (8.1)
Chlamydia trachomatis §	80 (5.9)
Syphilis §	82 (6.0)
Trichomonas vaginalis	92 (6.7)
Vaginal Candida colonization	421 (30.8)

Vaginal flora abnormalities:

Bacterial vaginosis (NS= 7-10)†	651 (47.6)
Intermediate vaginal flora (NS =4-6)†	262 (19.2)
Normal vaginal flora (NS=0-3)†	454 (33.2)

*IQR =Inter-quartile range; ‡ = missing data for one woman; # = missing data for 11 women; ¶ =missing data for 13 women; § =missing data for three women; † NS=Nugent score

Table 2 : Association between HIV and socio-demographic, behavioral and medical factors among 1367 female sex workers recruited at two African and two Indian sites : bivariate analysis (controlling for site for each factor)

Factors	HIV prevalence by exposure level		PR* and 95% CI [†]	p-value
	n _i /N _i	(%)		
Site :				
Kampala (Ref)	167/516	(32.4)	1.00 –	–
Mudhol/Jhamkandi	23/49	(46.9)	1.45 (1.05 – 2.00)	0.02
Cotonou	123/447	(27.5)	0.85 (0.70 – 1.03)	0.10
Chennai	56/355	(15.8)	0.49 (0.37 – 0.64)	<0.0001
Age in years (continuous)	–	–	1.02 (1.00 – 1.03)	0.004
Age (5-year categories) :				
15-19 years (Ref.)	10/66	(15.1)	1.00 –	–
20-24 years	100/380	(26.3)	1.86 (1.03 – 3.37)	0.04
25-29 years	109/357	(30.5)	2.26 (1.25 – 4.08)	0.01
30-34 years	68/221	(30.8)	2.72 (1.49 – 4.97)	0.001
35-60 years	82/343	(23.9)	2.33 (1.27 – 4.29)	0.01
p-trend	–	–	–	0.005
Years in school (continuous)	–	–	0.95 (0.92 – 0.97)	<0.0001
Years in school (in categories):				
0-6 (Ref.)	240/782	(30.7)	1.00 –	–
7-12	124/548	(22.6)	0.69 (0.57 – 0.83)	0.0001
13-17	5/37	(13.5)	0.38 (0.17 – 0.87)	0.02
p-trend	–	–	–	<0.0001
Cohabiting with a man :				
Yes	51/288	(17.7)	0.78 (0.58 – 1.05)	0.11
No	318/1079	(29.5)	1.00 –	–
Having an occupation besides sex work:				
Yes	243/906	(26.8)	0.75 (0.59 – 0.95)	0.02
No	126/461	(27.3)	1.00 –	–

Intra-vaginal cleansing:

Yes	357/1340 (26.6)	0.79 (0.51 – 1.22)	0.28
No	12/27 (44.4)	1.00 –	–

Products used for intra-vaginal cleansing :

No intra-vaginal cleansing (Ref.)	12/27 (44.4)	–	–
Water	238/892 (26.7)	0.77 (0.49 – 1.20)	0.24
Soap	100/345 (29.0)	0.82 (0.52 – 1.29)	0.39
Antiseptics	14/69 (20.3)	0.97 (0.49 – 1.90)	0.92
Soap and Antiseptics	1/10 (10.0)	0.46 (0.07 – 3.16)	0.43
Others (Baking soda, Coca-Cola, traditional)	4/24 (16.7)	0.45 (0.17 – 1.23)	0.12

Vaginal pH :

≤ 4.7 (Ref.)	43/234 (18.4)	1.00 –	–
> 4.7	326/1133 (28.8)	1.25 (0.93 – 1.67)	0.14

Female sterilization ‡:

Yes	43/294 (14.6)	0.57 (0.38 – 0.84)	0.005
No	326/1072 (30.4)	1.00 –	–

History of irregular menstrual cycles #:

Yes	103/331 (31.1)	1.24 (1.02 – 1.48)	0.03
No	261/1023 (25.5)	1.00 –	–

Number of sexual partners in the past 3 months :

3-99 (Ref.)	169/731 (23.1)	1.00 –	–
≥ 100	200/636 (31.4)	1.13 (0.92 – 1.40)	0.23

Average number of vaginal sexual acts per week :

3-19 (Ref.)	205/843 (24.3)	1.00 –	–
20-220	164/524 (31.3)	1.07 (0.88 – 1.31)	0.47

Number of vaginal sexual acts in the past 7 days:

≥ 10	175/630 (27.8)	0.87 (0.72 – 1.05)	0.14
< 10 (Ref.)	194/737 (26.3)	1.00 –	–

Anal sex in the past 30 days:

Yes	5/30 (16.7)	0.74 (0.33 – 1.64)	0.46
No	364/1337 (27.2)	1.00 –	–

Oral sex in the past 30 days:

Yes	14/114 (12.3)	0.53 (0.32 – 0.88)	0.01
No	355/1253 (28.3)	1.00 –	–

Condom use at the last sexual act [‡]:				
Yes	291/1061 (27.4)	1.01 (0.81 – 1.25)	0.95	
No	78/305 (25.6)	1.00	–	–
Past history of STIs:				
Yes	198/615 (32.2)	1.51 (1.27 – 1.81)	<0.0001	
No	171/752 (22.7)	1.00	–	–
Recent history of STIs (< 6 months) [Ⓞ]:				
Yes	108/362 (29.8)	1.41 (1.15 – 1.73)	0.001	
No	258/994 (26.0)	1.00	–	–
Bacterial vaginosis:				
Present (NS= 7-10) [†]	192/651 (29.5)	1.18 (0.99–1.40)	0.07	
Absent (NS= 0-6) [†]	177/716 (24.7)	1.00	–	–
Vaginal flora abnormalities :				
Bacterial vaginosis (NS= 7-10) [†]	192/651 (29.5)	1.43 (1.15 - 1.77)	0.0012	
Intermediate vaginal flora (NS= 4-6) [†]	84/262 (32.1)	1.58 (1.23 - 2.03)	0.0003	
Normal vaginal flora (NS= 0-3) [†]	93/454 (20.5)	1.00	–	–
Syphilis [§]:				
Present	29/82 (35.4)	1.45 (1.07 – 1.95)	0.01	
Absent	339/1282 (26.4)	1.00	–	–
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> [§] :				
Present	52/111 (46.8)	1.68 (1.34 – 2.10)	<0.0001	
Absent	316/1253 (25.2)	1.00	–	–
<i>Chlamydia trachomatis</i> [§] :				
Present	23/80 (28.7)	0.97 (0.68 – 1.38)	0.86	
Absent	345/1284 (26.9)	1.00	–	–
<i>Trichomonas vaginalis</i> :				
Present	26/92 (28.3)	1.07 (0.76 – 1.49)	0.70	
Absent	343/1275 (26.9)	1.00	–	–
Vaginal Candida colonization :				
Present	118/421 (28.0)	1.10 (0.90 – 1.34)	0.37	
Absent	251/946 (26.5)	1.00	–	–

*PR=prevalence ratio (adjusted for site); [¶]CI=Confidence interval; [‡]= missing data for one woman; [#]=missing data for 13 women; [Ⓞ]= missing data for 11 women; [†] NS= Nugent score; [§]=missing data for three women.

Table 3: Results from the multivariate analyses of the association between vaginal flora abnormalities and HIV infection among 1367 female sex workers recruited at two African and two Indian sites

Variables	HIV prevalence by exposure level		Adjusted prevalence ratio		p-value
	n_i/N_i	(%)	APR ^a	95% CI ^b	
Bacterial vaginosis:					
Present (NS= 7-10) [†]	192/651	(29.5)	1.21	(1.03–1.44)	0.02
Absent (NS= 0-6) [†]	177/716	(24.7)	1.00	–	–
Vaginal flora abnormalities					
Normal vaginal flora (NS= 0-3) [†]	93/454	(20.5)	1.00	–	–
Intermediate vaginal flora (NS= 4-6) [†]	84/262	(32.1)	1.56	(1.22–1.98)	0.0003
Bacterial vaginosis (NS= 7-10) [†]	192/651	(29.5)	1.48	(1.20–1.84)	0.0003
BV ^c vs. Intermediate flora		–	0.95	(0.79–1.16)*	0.6347
Site :					
Kampala (Ref.)	167/516	(32.4)	1.00	–	–
Mudhol/Jhamkandi	23/49	(46.9)	1.16	(0.79–1.68)	0.45
Cotonou	123/447	(27.5)	0.64	(0.50–0.81)	0.0002
Chennai	56/355	(15.8)	0.54	(0.37–0.80)	0.002
Past history of STI:					
Yes	198/615	(32.2)	1.43	(1.20–1.69)	<0.0001
No	171/752	(22.7)	1.00	–	–
Having an occupation besides sex work:					
Yes	243/906	(26.8)	0.78	(0.62–0.98)	0.03
No	126/461	(27.3)	1.00	–	–
Female Sterilization ¶					
Yes	43/294	(14.6)	0.58	(0.39–0.86)	0.006
No	326/1072	(30.4)	1.00	–	–
Oral sex in the past 30 days:					
Yes	14/114	(12.3)	0.57	(0.35–0.95)	0.03
No	355/1253	(28.3)	1.00	–	–
Age (years):					
15 -19 (Ref.)	10/66	(15.1)	1.00	–	–

20-24	100/380 (26.3)	1.84 (1.02–3.32)	0.04
25-29	109/357 (30.5)	2.16 (1.20–3.89)	0.01
30-34	68/221 (30.8)	2.70 (1.49–4.90)	0.001
35-60	82/343 (23.9)	2.22 (1.21–4.05)	0.009
Years in school:			
0–6 (Ref.)	240/782 (30.7)	1.00 – –	
7–12	124/548 (22.6)	0.75 (0.63–0.91)	0.003
13-17	5/37 (13.5)	0.47 (0.21–1.06)	0.07
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>[‡]:			
Positive	52/111 (46.8)	1.50 (1.21–1.85)	0.0002
Negative	316/1253 (25.2)	1.00 – –	
Vaginal <i>Candida</i> colonization:			
Positive	118/421 (28.0)	1.27 (1.04–1.54)	0.02
Negative	251/946 (26.5)	1.00 – –	

^a APR= adjusted prevalence ratio; ^b CI = confidence interval; ^c BV= Bacterial vaginosis; [†] NS= Nugent score; [¶] = one missing value; [‡] = three missing values. * = Incremental prevalence ratio (BV vs. Intermediate flora)

The APR for BV vs. non-BV and that for BV vs. IVF were each obtained from a separate multivariate model, but including all other covariates presented in the present table.

5 Chapitre 5. Behavioural and medical predictors of bacterial vaginosis recurrence among female sex workers: longitudinal analysis from a randomized controlled trial

Authors: Fernand A. Guédou, MD, MSc,*† Lut Van Damme, MD, PhD,‡ Jennifer Deese, MPH‡, Marissa Becker, MD, PhD,# Tania Crucitti, PhD,© Florence Mirembe, MD, PhD,¶ Suniti Solomon, MD,§ Michel Alary, MD, PhD,*†

Affiliations: *URESP, Centre de recherche FRSQ du CHA universitaire de Québec, Canada ; †Département de Médecine Sociale et Préventive, Université Laval, Québec (Québec) Canada; ‡FHI360, Durham, NC, USA; # Centre for Global Public Health, University of Manitoba, Winnipeg, Canada. © Department of Microbiology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium ; ¶ Makerere University College of Health Sciences, Kampala, Uganda; § Y.R Gaitonde Center for AIDS Research and Education, Chennai, India;

(Lut Van Damme was formerly at CONRAD, Arlington, VA, USA)

Name and address for correspondence: Michel Alary, MD, PhD, URESP, Centre de recherche FRSQ du CHA Universitaire de Québec, Hôpital Saint-Sacrement, 1050, Chemin Sainte Foy, Québec (Québec) G1S 4L8, Canada

Tel: (418) 682 7387; Fax: 418 682 7949; email: malary@uresp.ulaval.ca.

Running title: Predictors of BV recurrence among FSW

Les prédicteurs comportementaux et médicaux de la récurrence de la vaginose bactérienne chez les travailleuses du sexe: analyse longitudinale des données d'un essai randomisé et contrôlé

Cet article a été soumis au journal « Journal of Infectious Diseases »

RÉSUMÉ:

Contexte: Les données sur les facteurs de risque de la vaginose bactérienne récurrente (VBR) sont encore rares. Nous avons utilisé les données provenant des travailleuses du sexe (TS) participant à un essai contrôlé randomisé sur un microbicide pour examiner les prédicteurs de la récurrence de la VB.

Méthodes: Les participantes ayant un épisode antérieur de VB et répondant à des critères spécifiques d'éligibilité ont été incluses dans l'analyse. Des données comportementales et médicales ont été recueillies chaque mois, tandis que les tests de laboratoire à la recherche des infections des voies génitales ont été effectués trimestriellement. Le modèle des risques proportionnels de Andersen-Gill a été utilisé, tant en analyse univariée qu'en multivariée, pour déterminer les facteurs prédictifs de la récurrence de la VB.

Résultats: 440 femmes ont été incluses et le taux d'incidence était de 20,8 récurrences/100 personnes-mois [intervalle de confiance (IC) à 95% = 18,1 à 23,4]. Dans l'analyse multivariée contrôlant pour le site d'étude, récent nettoyage vaginal tel que rapporté à l'inclusion [rapport de taux d'incidence ajusté (RTIa) = 1,30, IC à 95% = 1,02 à 1,64] augmente le risque de VBR, alors que l'utilisation constante du condom (UCC) avec le partenaire principal (RTIa = 0,68, IC à 95% = 0,49 à 0,93) et la candidose vaginale (RTIa = 0,70, IC à 95% = 0,53 à 0,93), toutes deux considérées comme variables dépendant du temps, étaient protectrices.

Conclusion: Cette étude confirme l'importance du counselling avec les TS souffrant de VBR sur les effets néfastes de nettoyage vaginal et les effets protecteurs de l'UCC avec tous les partenaires pour la prévention de la VBR. Il importe de conduire davantage d'études prospectives sur les facteurs de risque de la VBR.

ABSTRACT:

Background: Data on risk factors of recurrent bacterial vaginosis (RBV) are still scarce. We used data from female sex workers (FSWs) participating in a randomized controlled microbicide trial to examine predictors of BV recurrence.

Methods: Participants with previous BV episode and meeting specific eligibility criteria were included in the analysis. Behavioral and medical data were collected monthly while laboratory testing for genital tract infections were performed quarterly. The Andersen-Gill proportional hazards model was used to determine predictors of BV recurrence both in univariate and multivariate analyses.

Results: 440 women were included and the incidence rate for RBV was 20.8 recurrences/100 person-months [95% confidence interval (CI)=18.1–23.4]. In the multivariate analysis controlling for the study site, recent vaginal cleansing as reported at baseline [adjusted hazard-ratio (aHR)=1.30, 95%CI=1.02-1.64] increased the risk of RBV, whereas consistent condom use (CCU) with the primary partner (aHR=0.68, 95% CI=0.49-0.93) and vaginal candidiasis (aHR=0.70, 95% CI=0.53-0.93), both treated as time-dependent variables, were protective.

Conclusion: This study confirms the importance of counselling FSWs with RBV about the adverse effects of vaginal cleansing and the protective effects of CCU with all partners for the prevention of RBV. More prospective studies on risk factors of RBV are warranted.

KEY WORDS:

Bacterial vaginosis; Recurrence; Risk factors; Female sex workers; Microbicide trial

Words count: abstract = 196; main text= 3475

INTRODUCTION

Bacterial vaginosis (BV) is the most common vaginal infection in women of reproductive age. Its prevalence varies from 9% to 50% (1, 2) and may reach 70% among female sex workers (FSW) (3). Besides its high frequency, BV is associated with many adverse health outcomes (4-9) including pelvic inflammatory disease, unfavourable pregnant outcomes and recently HIV. Though it is increasingly clear that BV results from the replacement of the lactobacillus dominated normal flora by a predominantly anaerobic flora, no single causal agent has yet been identified. As a result, current treatment strategy aims at restoring the balance of the vaginal flora without specifically targeting any single causal agent. This may explain the high rate of treatment failure and recurrence that constitutes a major challenge for the clinical management and control of BV. Some authors (10-13), have suggested periodic presumptive treatment (PPT) as response to this challenge; however, the high recurrence rate makes the cost-effectiveness of this strategy questionable (14). Knowing predictors of BV recurrence may help identify subgroups in whom PPT may be more efficient and prevent BV recurrences and their subsequent adverse health outcomes.

The purpose of this study was to identify behavioural and medical predictors of BV recurrence among women who experienced a prior BV episode during their follow-up at two African and two Indian sites of a randomized controlled microbicide trial.

MATERIALS AND METHODS

The clinical trial

Settings and participants selection

We performed a secondary longitudinal analysis of data from HIV-negative FSWs enrolled in the cellulose sulphate (CS) trial, a double-blind randomized placebo-controlled trial evaluating the effect of 6% vaginal CS gel on HIV transmission and sponsored by CONRAD, Arlington, VA, USA. Participant recruitment, follow-up and laboratory methods are described elsewhere (15). Briefly, the trial recruited participants from five sites: Durban (South Africa); Kampala (Uganda) at the Mulago Hospital; Cotonou (Benin), at a community clinic and a clinic for sexually transmitted infections (STI); Chennai (India) at the YRG Care center; Karnataka state (India), at

Mudhol and Jamkhandi clinics. However, because of the occurrence of some local changes in the standardized method for BV laboratory diagnosis at the Durban site, and to ensure the comparability of our findings, the present analysis was restricted to participants from the latter four sites. Participants were FSWs who were 18 years or older, HIV seronegative, not pregnant and not desiring to become pregnant during their participation in the study. The study was approved by ethics committees of the Eastern Virginia School of Medicine (USA) and of each collaborating center.

Trial participants provided written informed consent. At the screening visit, a questionnaire was administered to consenting women by trained health providers, asking about their socio-demographics, current contraceptive use, intra-vaginal cleansing practices (products used and reason), past history of STI and sexual behaviours. Participants were then screened for HIV, syphilis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* and vaginal yeast. All procedures, with the exception of the baseline questionnaire, were repeated at the enrolment visit (occurred within 28 days of screening). At enrolment, eligible women were randomized to active or placebo vaginal gel and were instructed to use their gel before each sexual act for 12 months. The participants received intensive counselling about condom use and were provided free condoms at each visit. Monthly behavioural data were collected and pelvic exams with laboratory testing for HIV and other STI were performed quarterly. Follow-up was planned for 12 months, but the trial was closed prematurely following an interim analysis which suggested an increased risk of HIV among women in the active arm

Laboratory procedures

BV diagnosis was made by Gram stain according to the Nugent's scoring system (16). Trichomoniasis and candidiasis were diagnosed microscopically on wet mount. The endocervical swabs were tested with nucleic acid amplification tests for genital gonococcal and chlamydial infections. For syphilis diagnosis, blood samples were screened with Rapid Plasma Reagin (RPR) test and reactive samples were confirmed with a treponemal antibody test. At the screening and enrolment visits, HIV antibody testing was performed using the national HIV testing guidelines in place at each study site. For the follow-up visits, the study-specific algorithm was used. Pregnancy tests brands varied by site. All assays were conducted according to the

manufacturers' instructions. All curable genital tract infections which were diagnosed, including BV, were treated, regardless of symptoms.

Definitions of some concepts and study outcomes for the present study

BV treatment

For the purpose of the present study, a BV treatment was deemed "effective" if it consisted in one of the following regimens:

- Oral metronidazole at a daily dosage of ≥ 800 mg for at least 5 days;
- Vaginal ovule of metronidazole 500 mg per day for at least 5 days;
- Oral tinidazole at a daily dosage of ≥ 1000 mg for at least 3 days;
- Oral tinidazole ≥ 2000 mg per day for at least 1 day.

These regimens were in compliance with the 2006 UK guidelines for BV treatment (17).

Study outcomes

A positive BV result was defined as a Nugent score ≥ 7 . Participants were defined as BV negative if they had a negative test result (Nugent score < 7) or were treated for at least 7 days with an "effective BV treatment".

Incident BV was defined as a positive BV result obtained at a follow-up visit (whether scheduled or not) which was at least 7 days from the onset of "effective BV treatment", or following a negative BV result. A case of incident BV was assumed to have occurred at the midpoint between the date of the last negative BV result and the date of the visit at which the incident BV was diagnosed.

A BV episode was defined as one or multiple consecutive positive BV results starting with the occurrence of an incident BV, as defined above, and ending either at the seventh day of an "effective BV treatment" or at the midpoint between the date of the last positive result of the BV episode and the date of the first negative BV result (whichever came first). Recurrent BV (RBV) was defined as incident BV (as described above) following a positive BV result obtained at

a previous visit (including the enrolment visit). A participant could have multiple recurrences during the follow-up period.

At-risk period

Participants with prior BV (index BV) were considered at risk of a RBV for the period spanning from the end of the index BV episode to the beginning of the next BV episode, or to the end of their follow-up, whichever occurred first. In cases of multiple BV recurrences, periods between BV episodes were considered as at-risk periods.

Participant selection for the present analysis

The present analysis involved trial participants who, during follow-up (including the enrolment visit), had at least one BV episode, followed by:

- an “effective BV treatment” and at least one subsequent visit at which a Nugent test was performed or;
- a visit at which a negative BV result was obtained.

Statistical methods

Participants’ baseline and follow-up characteristics are presented as percentages (for categorical variables) or medians along with inter-quartile ranges (for continuous variables). Person-months at risk of RBV were computed and the RBV rate was obtained by dividing the number of RBV by the total number of person-months. The 95% confidence intervals (95% CI) were obtained for the rate by bootstrapping 1000 samples with replacement (non-parametric re-sampling) and combining with the percentile method (18). Variables reported in previous studies as potential predictors of RBV were selected for the analysis. These included socio-demographic characteristics, sexual behaviours, past history of, and current STI or reproductive tract infections.

Andersen-Gill proportional hazard models were used to identify independent predictors of RBV (as multiple events) by estimating hazard ratios (HR) (19). The 95% CI of the HR and the p-values based on these models were derived from robust sandwich variances to account for

intra-subject dependency attributable to the multiple recurrences that participants could experience (19).

Univariate models were fit with and without control for study site. Variables with p-value \leq 0.20 in the univariate models controlling for study site were selected to construct the initial (full) multivariate model. Backward selection was used and variables which reached a significance level of 0.05 were retained in the final multivariate model as predictors of BV recurrence. Proportionality and linearity hypotheses were verified for the models. Statistical tests were two-tailed. Data were analysed with SAS software version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Baseline socio-demographic, behavioural and biological characteristics of the participants

From July 2005 to January 2007, a total of 1491 women were screened and 822 were enrolled at the four study sites. Out of the 822, 440 women met the eligibility criteria for BV recurrence as described above and were included in the present analysis. Participants from Indian sites were combined together, mainly because of the small size of the Mudhol/Jamkhandi sample and this did not substantially alter the results. Baseline socio-demographic, behavioural and biological characteristics of the participants are summarized in table 1.

The median age of the study population was 28 years [inter-quartile range (IQR) =23-35] and the median number of years in school was 7 (IQR=3 - 9). One hundred and twenty-eight (29.1%) of the women reported an occupation besides commercial sexwork. The median number of sexual partners in the seven days preceding their study entry was 8 (IQR=4-21). Seventy-three (17.6%) reported recent (within 90 days) intra-vaginal-cleansing.

Incidence of RBV

Among the 440 women, 253 (57.5%) experienced at least one BV recurrence during follow-up: 165 had one recurrence; 64 had two; 18 had three and 6 had four (giving a total of 371 recurrences). The 371 BV recurrences occurred over a total at-risk-period of 1783.12 person-months (146.56 person-years), giving an incidence rate of 20.8 recurrences/100 person-months (95% CI=18.1 – 23.4) or 2.53 recurrences/person-year (95% IC=2.26 – 2.77).

Factors associated with RBV in univariate analysis

Baseline factors associated with RBV in univariate analysis

The baseline visit was that at which the first BV episode was diagnosed (including the enrolment visit). In univariate analysis without control for the study site, several baseline factors were significantly associated with RBV, as presented in table 2. For positive associations these include being older than 28 years, cohabiting with a man, exerting an occupation besides sex work, recent intra-vaginal cleansing [since the visit preceding that of baseline (for women with BV at the enrolment visit in the trial, the preceding visit was the screening visit)], having an STI history, having had oral or anal sex with other partners in the 30 days prior to the baseline visit (whether all acts or those without condom use). In contrast, having been to school for at least six years, consistent condom use (CCU) with the primary partner in the past seven days and surprisingly, higher number of sexual partners, were inversely associated with RBV. The use of intra-uterine device for contraception was positively associated with RBV, while hormonal contraception was negatively associated. But neither was statistically significant. Treatment group was not associated with BV recurrence. Lastly, none of the STI or reproductive tract infections (RTI) biologically diagnosed at baseline was significantly associated with RBV.

After controlling for study site, only recent intra-vaginal cleansing was significantly associated with RBV with an adjusted HR (aHR)=1.31, 95% CI=1.03 – 1.66.

Time-dependent factors associated with RBV in univariate analysis

Results from the univariate analysis of the associations between time-dependent variables and RBV are presented in table 3. Oral sex, whether with the primary or other partners (whether all acts or those without condom use) was significantly and positively associated with RBV. In contrast, CCU with the primary partner, the presence of a vaginal candidiasis in the at-risk period and high number of sexual partners in the past seven days were inversely associated with RBV. For CCU with the primary partner and the presence of candidiasis, the association remained significant after controlling for study site.

Factors associated with RBV in the multivariate analysis

Variables with p-value<0.20 in the univariate analysis controlling for study site were included in the multivariate model. Recent intra-vaginal cleansing as self-reported at the baseline visit was positively associated with RBV, whereas CCU with the primary partner in the past seven days and vaginal candidiasis in the at-risk period were protective (Table 4). In addition, study site remained significantly associated with RBV. None of the STI or genital tract infections, other than candidiasis, was significantly associated with RBV.

DISCUSSION

Among these 440 HIV sero-negative FSWs with a BV episode at baseline, we found that 253 (57.5%) have had at least one BV recurrence during their follow-up. The incidence rate was 20.8 recurrences/100 person-months (95% CI=18.1 – 23.4) or 2.53 recurrences/person-year (95% CI=2.26 – 2.77).

Most of prior studies on RBV looked only at the first recurrence, in the context of treatment regimen evaluation (20-23). Therefore, their primary outcome was the proportion of treated subjects experiencing at least one BV recurrence in a given post-treatment length of time. This makes it difficult to compare the RBV frequency in the present study to those previously reported.

The two studies which reported BV incidence as multiple events were sub-studies of the same trial that evaluated the effect of PPT on the incidence of vaginal infections (11). The first study, which was a secondary analysis focusing on the placebo group only, found a BV incidence rate of 361/100 person-years over the trial period (24). The second study evaluated the post-trial effect of the PPT (first 120 days post-trial) and found RBV incidence of 260/100 person-years (95% CI=199-340) and 358/100 person-years (95%CI=286-448) for the intervention and placebo groups, respectively (25). The RBV incidence of 253/100 person-years in the present study is somewhat lower than the three others, though only significantly for those from the placebo group (whether per- or post-trial). This discrepancy may be due to the fact that, unlike in the PPT or post-PPT studies where only symptomatic BV were treated, all microscopically

diagnosed BV in the current study were treated, regardless of the presence of symptoms. These studies may have thus reported several times some persisting untreated biological BV. Consequently we may rather be comparing incidence of “visits with recurrent BV diagnosis” to that of RBV.

In the multivariate analysis controlling for study site, recent vaginal cleansing was a risk factor for RBV, whereas CCU with the primary partner and vaginal candidiasis were protective.

While several previous cross-sectional or prospective studies found that intra-vaginal cleansing increased the risk of single BV, very few dealt with recurrent BV (24, 26, 27). Schwebke et al. reported that vaginal douching increased the risk of RBV (26), and the first sub-study on the PPT trial data found that the risk of RBV increased with vaginal washing frequency (p-value for trend=0.04) (24). These findings are consistent with our results, though we did not collect data on vaginal washing frequency. However, some studies found no association between vaginal douching and BV (21, 27). In fact, although vaginal washing is a common practice, the frequency, techniques, products used and circumstances vary from one individual to another, and from culture to culture. This might explain the inconsistencies in studies results.

Compared to women who reported inconsistent condom use with their primary partners in the previous seven days, those who reported CCU were significantly at lower RBV risk, and interestingly their aHR was similar to that of women with no primary partner or no sexual act with the latter. These results support the idea that consistent and proper use of condoms may be as effective as sexual abstinence in protecting against BV recurrence. The non-significance of the association between CCU with other sexual partners (clients) and RBV may be due to a lack of statistical power resulting from the high percentage of condom use (97.6%) reported for this subgroup of sexual partners. Several studies have shown that CCU can reduce BV recurrence (24, 26, 28, 29). However, Yotebieng et al. found that condom use was effective against single BV but not RBV (30). Unlike with a single BV episode, we did not find any association between STI or reproductive tract infections (except candidiasis) and RBV, and neither did Klatt et al. and Myer et al. (27, 31). However, in some studies, trichomoniasis was associated with RBV (24, 32).

Vaginal candidiasis (VC) during the follow-up (but not at baseline) was inversely associated with RBV, consistent with the results of McClelland et al. (24). The common explanation is that

the two conditions are incompatible as they are inversely related to vaginal pH. Another study found that VC often preceded a BV episode though they rarely coexisted (33). The reason of such a chronology remains unknown.

Finally, the study site exhibited a consistently strong association with BV recurrence, independently of all other factors, suggesting that RBV may be determined by a more complex network of site-specific unmeasured and probably interrelated factors. A striking finding in the current study is the overwhelming effect of the study site on the associations between investigated risk factors and RBV. With the exception of recent vaginal cleansing as self-reported at baseline, CCU with the primary partner and vaginal candidiasis (as time-dependent variables), all the associations which were initially significant lost their significance when controlled for study site. This suggests strong confounding by site due to a highly variable distribution of socio-demographic and medical variables across sites. Nevertheless, the univariate association between anal or oral sex (receiving penis in the mouth) and RBV deserves some attention.

The role of oral or anal sex in BV occurrence is supported by several studies (32, 34-36). In a recent prospective study (35), women with incident BV were more likely to have previous colonization of anus or oral cavity with BV-associated bacteria. In another study (34), the risk of periodontal disease was increased among women with BV (adjusted risk ratio = 1.23; 95% CI: 1.08-1.40). In the same study, the risk for periodontal disease was 1.28 times (95% CI: 0.97-1.69) greater for receptive oral sex (ROS) with an uncircumcised partner, compared with ROS with a circumcised partner (34).

The primary limitation of the current study resides in assuming for some BV episodes (in the absence of test of cure) that BV treatment, as administered per local guidelines, became effective seven days from the onset of the treatment. Some persistent BV may have thus been taken as RBV and this would have resulted in an overestimation of the incidence of RBV. However the setting of the cure timeline of 7 days was based on the cure (Nugent score <7) rate of 80% to 90% generally reported in the literature for the same duration regarding the treatment regimens selected for our analysis (37). Because of the relatively long periodicity of BV testing (3 months) we may have missed some BV episodes. Also, some established BV risk factors, such as HSV-2 infection, smoking and alcohol consumption could not be included in the analysis because no data were collected about them in the trial. There were also several self-

reported data, suggesting the possibility of residual confounding for some associations. Finally, the current analysis did not cover biological predictors of RBV such as the presence and/or concentration of some specific BV related micro-organisms.

Nonetheless, this study presents several strengths. The primary one is the use of Andersen-Gill proportional risk modeling which allows for repeated events. To our best knowledge, the present study is the third analysis (after the first two by McClelland et al. (24, 38)) and the largest one that has used this approach to investigate predictors of RBV. Also, the consideration of BV clinical features to work out the at-risk period, instead of using the whole follow-up period, prevents underestimation of the RBV incidence. Like with other infectious diseases, the subject is not at risk for another BV episode until the previous resolves and this should be considered when calculating the person-time at risk (which was not done in previous studies). Other strengths include the large sample size, the use of the current gold standard for BV diagnosis (Nugent score) and the high level of the quality assurance system conferred by the clinical trial setting.

In summary, from this longitudinal analysis of data from a randomized clinical trial, we report a relatively high rate of RBV, though lower than in some previous studies (24, 25), among FSWs HIV seronegative at baseline. Some common risk factors for a single BV episode were associated with RBV while others were not. Predictors of RBV were primarily behavioural, particularly unprotected sex with primary sex partner and recent intravaginal cleansing. It is thus important to counsel high-risk women with RBV about the adverse effects of vaginal cleansing and the protective effects of condom use with all types of partners.

The study site exhibited a consistently strong association with RBV suggesting that research on risk factors of this condition may need to be as well approached as a socio-cultural environmental issue. Finally more prospective studies, specifically designed to identify risk factors of RBV are still warranted.

FOOTNOTES:

Conflict of interest: None of the authors has any conflict of interest to declare .

Funding: The Cellulose sulphate clinical trial was sponsored by CONRAD (VA, USA) and co-funded by the United States Agency for International Development (USAID) [HRN-A-00-98-00020-00] and the Bill & Melinda Gates Foundation [# 655000].

Acknowledgement: The authors thank the research teams from all 4 study sites for their hard work in collecting and capturing data, the monitoring staff for their assistance in assuring data quality, Doug Taylor from FHI360 for statistical advice and Dr Thurman A R from CONRAD for reviewing early drafts of this article. The authors are particularly indebted to participants without whom this study would not have been possible.

Prior presentation: The information in the present manuscript has never been presented at any conference or scientific meeting.

Corresponding author: Michel Alary, MD, PhD, URESP, Centre de recherche FRSQ du CHA Universitaire de Québec, Hôpital Saint-Sacrement, 1050, Chemin Sainte Foy, Québec (Québec) G1S 4L8, Canada

Tel: (1) (418) 682 7387; Fax: (1) 418 682 7949; email: malary@uresp.ulaval.ca.

REFERENCES

1. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis.* 2007;34:864-9.
2. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997;350:546-50.
3. Johnson LF, Coetzee DJ, Dorrington RE. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections in South Africa: a review. *Sex Transm Infect.* 2005;81:287-93.
4. Eckert LO, Moore DE, Patton DL, Agnew KJ, Eschenbach DA. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2003;11:11-7.
5. Joesoef MR, Wiknjosastro G, Norojono W, et al. Coinfection with chlamydia and gonorrhoea among pregnant women and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS.* 1996;7:61-4.
6. Gallo MF, Macaluso M, Warner L, et al. Bacterial vaginosis, gonorrhoea, and chlamydial infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a longitudinal analysis of possible causal links. *Ann Epidemiol.* 2012;22:213-20.
7. Guedou FA, Van Damme L, Mirembe F, et al. Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants screened for a randomised controlled trial. *Sex Transm Infect.* Published online first 2012 May 24;doi:10.1136/sextrans-2011-050319.
8. Cohen CR, Lingappa JR, Baeten JM, et al. Bacterial Vaginosis Associated with Increased Risk of Female-to-Male HIV-1 Transmission: A Prospective Cohort Analysis among African Couples. *PLoS Med.* 2012;9:e1001251.
9. McGregor JA, French JI, Parker R, et al. Prevention of premature birth by screening and treatment for common genital tract infections: results of a prospective controlled evaluation. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:157-67.
10. Kaul R, Kimani J, Nagelkerke NJ, et al. Monthly antibiotic chemoprophylaxis and incidence of sexually transmitted infections and HIV-1 infection in Kenyan sex workers: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291:2555-62.
11. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, et al. Improvement of vaginal health for Kenyan women at risk for acquisition of human immunodeficiency virus type 1: results of a randomized trial. *J Infect Dis.* 2008;197:1361-8.
12. Schwebke JR, Desmond R. A randomized trial of metronidazole in asymptomatic bacterial vaginosis to prevent the acquisition of sexually transmitted diseases. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:517 e1-6.

13. Sobel JD, Ferris D, Schwebke J, et al. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:1283-9.
14. Meltzer MC, Desmond RA, Schwebke JR. Association of *Mobiluncus curtisii* with recurrence of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.* 2008;35:611-3.
15. Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, et al. Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med.* 2008;359:463-72.
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;29:297-301.
17. British Association for Sexual Health and HIV CEG. National guideline for the management of bacterial vaginosis (2006). Available at <http://www.bashh.org/documents/62/62.pdf>. Accessed 16 August 2012.
18. Carpenter J, Bithell J. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat Med.* 2000;19:1141-64.
19. Andersen PK, Gill, RD. Cox's regression model for counting processes: a large sample study. *Ann Stat.* 1982;10:1100-20
20. Bradshaw CS, Pirotta M, De Guingand D, et al. Efficacy of oral metronidazole with vaginal clindamycin or vaginal probiotic for bacterial vaginosis: randomised placebo-controlled double-blind trial. *PLoS One.* 2012;7:e34540.
21. Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis.* 2006;193:1478-86.
22. Chen JY, Tian H, Beigi RH. Treatment considerations for bacterial vaginosis and the risk of recurrence. *J Womens Health.* 2009;18:1997-2004.
23. Larsson PG, Brandsborg E, Forsum U, et al. Extended antimicrobial treatment of bacterial vaginosis combined with human lactobacilli to find the best treatment and minimize the risk of relapses. *BMC Infect Dis.* 2011;11:223.
24. McClelland RS, Richardson BA, Graham SM, et al. A prospective study of risk factors for bacterial vaginosis in HIV-1-seronegative African women. *Sex Transm Dis.* 2008;35:617-23.
25. Balkus JE, Jaoko W, Mandaliya K, et al. The posttrial effect of oral periodic presumptive treatment for vaginal infections on the incidence of bacterial vaginosis and *Lactobacillus* colonization. *Sex Transm Dis.* 2012;39:361-5.
26. Schwebke JR, Desmond RA. A randomized trial of the duration of therapy with metronidazole plus or minus azithromycin for treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis.* 2007;44:213-9.

27. Klatt TE, Cole DC, Eastwood DC, Barnabei VM. Factors associated with recurrent bacterial vaginosis. *J Reprod Med.* 2010;55:55-61.
28. Smart S, Singal A, Mindel A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect.* 2004;80:58-62.
29. Thulkar J, Kriplani A, Agarwal N, Vishnubhatla S. Aetiology and risk factors of recurrent vaginitis and its association with various contraceptive methods. *Indian J Med Res.* 2010;131:83-7.
30. Yotebieng M, Turner AN, Hoke TH, Van Damme K, Rasolofomanana JR, Behets F. Effect of consistent condom use on 6-month prevalence of bacterial vaginosis varies by baseline BV status. *Trop Med Int Health.* 2009;14:480-6.
31. Myer L, Kuhn L, Denny L, Wright TC, Jr. Recurrence of symptomatic bacterial vaginosis 12 months after oral metronidazole therapy in HIV-positive and -negative women. *J Infect Dis.* 2006;194:1797-9.
32. Brotman RM, Erbeling EJ, Jamshidi RM, Klebanoff MA, Zenilman JM, Ghanem KG. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007;20:225-31.
33. Hay PE, Ugwumadu A, Chowns J. Sex, thrush and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS.* 1997;8:603-8.
34. Zabor EC, Klebanoff M, Yu K, et al. Association between periodontal disease, bacterial vaginosis, and sexual risk behaviours. *J Clin Periodontol.* 2010;37:888-93.
35. Marrazzo JM, Fiedler TL, Srinivasan S, et al. Extravaginal reservoirs of vaginal bacteria as risk factors for incident bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2012;205:1580-8.
36. Schwebke JR, Richey CM, Weiss HL. Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *J Infect Dis.* 1999;180:1632-6.
37. Larsson PG. Treatment of bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS.* 1992;3:239-47.
38. McClelland RS, Lavreys L, Katingima C, et al. Contribution of HIV-1 infection to acquisition of sexually transmitted disease: a 10-year prospective study. *J Infect Dis.* 2005;191:333-8.

Table 1 : Baseline Characteristics of 440 Female Sex Workers followed-up in a Microbicide Trial at 2 African and 2 Indian Sites

<i>Characteristics</i>	<i>n with (%) or median with [IQR*]</i>
Sites:	
Kampala	167 (37.9)
Cotonou	140 (31.8)
Indian sites (Chennai and Mudhol/Jamkhandi)	133 (30.2)
Age in years	28 [23 - 35]
Completed years of school	7 [3 -9]
Cohabiting with a man	94 (21.4)
Exerting an occupation other than commercial sex work	128 (29.1)
Currently used contraceptive:	
None	255 (57.9)
Oral	29 (6.6)
Injectable	35 (7.9)
Intra-uterine device	3 (0.7)
Female sterilization	118 (26.8)
Having a primary partner	331 (75.2)
Number of sexual partners in the past 7 days †	8 [4 – 21]
Percentage of sexual act with primary partner using condom 100% ‡	97 (46.6)
Percentage of sexual act with other partners using condom 100% ¶	361 (97.6)
Oral or anal sex in the past 30 days with primary partner ©	15 (5.8)
Oral or anal sex in the past 30 days with primary partner without condom ©	10 (4.2)
Oral or anal sex in the past 30 days with other partners #	22 (5.0)
Oral or anal sex in the past 30 days with other partners without condom #	8 (1.4)
History of STI at baseline	321 (72.9)
Recent intra-vaginal cleansing (within 90 days) @	73 (17.6)
Irregular menstrual cycles	97 (22.0)
Laboratory diagnosis of STI or reproductive tract infections at baseline:	
Gonorrhoea §	27 (6.2)
Chlamydia §	28 (6.4)
Trichomoniasis ¥	20 (4.6)
Candidiasis ¥	112 (25.6)

*IQR =Inter-quartile range; †= missing data for 29 woman; ‡= The denominator excludes 207 women who reported not having a primary partner with whom they had sex in the last 7 days and 25 other who did not report on condom use; ¶ = The denominator excludes 44 women who reported not having sex with other partners in the last 7 days and 26 other who did not report on condom use; ©The denominator excludes 74 who reported not having a primary partner and 25 others who did not report on a anal or oral sex; # =The denominator excludes 27 who did not report on a anal or oral sex. §= missing data for 3 woman; ¥= missing data for 2 women; @= missing data for 25 women.

Table 2 : Association between baseline characteristics and incidence of bacterial vaginosis recurrence among 440 female sex workers followed-up in a microbicide trial: hazard ratios (unadjusted vs. adjusted for the study site)

Baseline Factors	Incidence rate of BV recurrence (per 100 person-months) by exposure level (NR*/person-months)	Unadjusted HR§ with 95% CI¶	p-value	HR§ (adjusted for study site) with 95% CI¶	p-value
Sites					
Chennai/Mudhol/Jamkhandi	39.5 (142/359.57)	5.27 (3.90 – 7.12)	<0.0001	-	-
Cotonou	28.9 (160/553.93)	3.69 (2.76 – 4.94)	<0.0001	-	-
Kampala (ref)	7.9 (69/869.62)	1.00 -	-	-	-
Age (years; continuous)	-	1.03 (1.01 – 1.04)	0.0004	0.99 (0.97 - 1.00)	0.1452
Age (category):					
≥28 years (median)	25.8 (196/760.83)	1.52 (1.19 – 1.94)	0.0009	0.83 (0.64 - 1.07)	0.1476
<28 years	17.1 (175/1022.28)	1.00 -	-	1.00 -	-
Number of years in school (continuous)	-	0.99 (0.95 – 1.03)	0.6279	1.02 (0.98 - 1.05)	0.2832
Years in school (category):					
≥ 6 years	16.8 (151/900.52)	0.67 (0.52 – 0.86)	0.0015	1.05 (0.84 - 1.32)	0.6427
< 6 years	24.9 (220/882.60)	1.00 -	-	1.00 -	-

Living with a man							
Yes	31.9 (95/297.70)	1.75 (1.35 – 2.26)	<0.0001	0.99 (0.73 - 1.32)	0.9227		
No	18.6 (276/1485.42)	1.00 - -		1.00 - -	-		
Exerting an occupation besides sex work							
Yes	26.9 (123/457.67)	1.44 (1.10 - 1.89)	0.0076	0.89 (0.68 - 1.15)	0.3612		
No (Ref.)	18.7 (248/1325.45)	1.00 - -		1.00 - -	-		
Having ever been pregnant							
Yes	21.3 (354/1659.72)	1.55 (0.89 – 2.71)	0.1201	1.16 (0.73 - 1.83)	0.5249		
No	13.8 (17/123.40)	1.00 - -		1.00 - -	-		
Current contraceptive method							
Female sterilization	38.2 (121/316.67)	2.21 (1.69 – 2.90)	<0.0001	0.99 (0.66 - 1.51)	0.9934		
Intra-uterine device	37.9 (4/10.55)	2.16 (0.90 – 5.15)	0.0837	1.14 (0.56 - 2.34)	0.7215		
Injectable	11.8 (18/152.70)	0.66 (0.39 - 1.13)	0.1308	1.21 (0.69 - 2.10)	0.5095		
Oral	13.1 (18/137.25)	0.73 (0.41 - 1.29)	0.2800	0.98 (0.57 - 1.70)	0.9577		
None (Ref.)	18.0 (210/1165.95)	1.00 - -		1.00 - -	-		
Recent intra-vaginal cleansing reported at baseline							
Yes	32.3 (112/347.20)	1.75 (1.34 - 2.28)	<.0001	1.31 (1.03 - 1.66)	0.0279		
No	18.5 (246/1326.27)	1.00 - -		1.00 - -	-		
Number of sexual partners /last 7days (Continuous)							
		- 0.98 (0.97 - 0.99)	0.0003	0.99 (0.99 - 1.00)	0.4145		
Number of sexual partners /last 7 days:							
≥ 8 partners (median)	14.9 (159/1067.18)	0.49 (0.39 – 0.63)	<0.0001	0.89 (0.67 - 1.18)	0.4079		
< 8 partners	29.6 (212/715.93)	1.00 - -		1.00 - -	-		

Having a primary partner						
Yes	21.6 (289/1337.92)	1.18 (0.88 – 1.59)	0.2679	0.98 (0.75 - 1.27)	0.8825	
No	18.4 (82/445.20)	1.00 - -	-	-	-	
CCU‡ with primary partner in the past 7 days:						
Yes	17.3 (83/479.37)	0.68 (0.48 – 0.96)	0.0277	0.77 (0.56 – 1.07)	0.1236	
No (ref.)	28.7 (134/466.28)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
No primary partner or no sexual act with him	18.4 (154/837.47)	0.74 (0.55 – 0.99)	0.0459	0.97 (0.74 - 1.28)	0.8564	
CCU‡ with other partners in the past 7 days:						
Yes	20.3 (329/1620.65)	0.49 (0.19 – 1.28)	0.1467	0.86 (0.34 – 2.18)	0.7505	
No (ref.)	25.1 (19/75.70)	1.00 - -	-	-	-	
No sexual act with other partners	26.5 (23/86.77)	0.62 (0.22 – 1.71)	0.3556	0.96 (0.35 – 2.59)	0.9340	
History of STI						
Yes	27.0 (176/651.55)	1.53 (1.14 - 2.05)	0.0046	1.13 (0.86 - 1.47)	0.3864	
No	17.2 (195/1131.57)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
Anal /oral sex with primary partner/ past 30 days						
Yes	29.2 (14/47.97)	1.30 (0.70 - 2.42)	0.4018	0.72 (0.38 - 1.34)	0.3011	
No (Ref)	22.3 (292/1311.10)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
Did not have primary partner	16.5 (52/314.40)	0.74 (0.52 - 1.04)	0.0800	0.99 (0.73 - 1.33)	0.9381	
Anal /oral sex with primary partner without condom						
Yes	29.9 (9/30.08)	1.34 (0.68 - 2.65)	0.3951	0.78 (0.41 - 1.50)	0.4594	
No (Ref)	22.3 (297/1328.98)	1.00 - -	-	1.00 - -	-	
Did not have primary partner	16.5 (52/314.40)	0.73 (0.52 - 1.03)	0.0766	1.01 (0.74 - 1.35)	0.9931	

Anal /oral sex with other partners/past 30 days						
Yes	46.4 (28/60.32)	2.26 (1.60 - 3.18)	<.0001	1.20 (0.82 - 1.74)	0.3434	
No (Ref)	20.7 (330/1591.95)	1.00 -	-	1.00 -	-	
Anal /oral sex with other partners without condom						
Yes	47.3 (10/21.15)	2.19 (1.08 - 4.44)	0.0298	1.17 (0.57 - 2.38)	0.6671	
No anal or oral sex with other partners (Ref.)	21.3 (348/1631.12)	1.00 -	-	1.00 -	-	
History of irregular menstrual cycles						
Yes	22.3 (78/349.37)	1.09 (0.80 - 1.48)	0.5733	1.11 (0.84 - 1.47)	0.4708	
No	20.4 (293/1433.75)	1.00 -	-	1.00 -	-	
Treatment group						
Active gel	21.5 (178/828.88)	1.07 (0.84 - 1.38)	0.5753	0.97 (0.77 - 1.21)	0.7645	
Placebo	20.2 (193/954.23)	1.00 -	-	1.00 -	-	
Gonorrhea						
Present	26.3 (31/117.82)	1.32 (0.81 - 2.12)	0.2618	1.27 (0.81 - 2.00)	0.30271	
Absent	20.3 (336/1650.72)	1.00 -	-	1.00 -	-	
Chlamydia						
Present	13.4 (18/134.65)	0.63 (0.34 - 1.15)	0.1319	1.07 (0.62 - 1.85)	0.8035	
Absent	21.4 (349/1633.88)	1.00 -	-	1.00 -	-	
Trichomoniasis						
Present	16.4 (14/85.27)	0.76 (0.35 - 1.62)	0.4720	0.90 (0.50 - 1.62)	0.7339	
Absent	21.2 (357/1686.95)	1.00 -	-	1.00 -	-	

Candidiasis

Present	21.8 (85/389.47)	1.05 (0.80 - 1.39)	0.7130	0.97 (0.72 - 1.31)	0.8678
Absent	20.7 (286/1382.75)	1.00	-	1.00	-

*NR =number of recurrences; § HR=Hazard ratio; ¶ =CI=Confidence interval; ‡ CCU=Consistent condom use (100% of sexual acts)

Table 3 : Association between time-varying factors and incidence of bacterial vaginosis recurrence among 440 female sex workers followed-up in a microbicide trial: hazard ratios (unadjusted vs. adjusted for the study site)

Time-varying Factors	Incidence rate of BV recurrence (per 100 person-months) by exposure level (NR*/person-months)	HR§ and 95% CI [¶]	p-value	HR§ (adjusted for study site) with 95% CI [¶]	p-value
Number of sexual partners/past 7 days (continuous)	-	0.99 (0.98-0.99)	0.0142	0.99 (0.99-1.00)	0.4145
CCU‡ with primary partner in the past 7 days:					
yes	18.8 (73/387.27)	0.58 (0.42-0.80)	0.0010	0.67 (0.49-0.93)	0.0153
No (ref.)	32.3 (113/349.28)	1.00 -	-	1.00 -	-
No primary partner or no sexual act with him	17.6 (183/1039.67)	0.54 (0.42-0.71)	<0.0001	0.69 (0.53-0.88)	0.0032
CCU‡ with other partners in the past 7 days:					
yes	18.8 (319/1457.60)	0.84 (0.41-1.72)	0.6353	1.33 (0.58-2.20)	0.7269
No (ref.)	24.9 (6/24.07)	1.00 -	-	1.00 -	-
No sexual act with other partners	16.0 (44/274.95)	0.62 (0.29-1.36)	0.2380	0.96 (0.47-1.97)	0.9077

Oral sex with primary partner/past 30 days							
yes	45.2	(11/24.35)	2.07 (1.24-3.47)	0.0054	1.10 (0.64 - 1.90)	0.7298	
No	21.7	(324/1495.87)	1.00 - -		1.00 - -	-	
No primary partner	13.8	(36/261.38)	0.62 (0.42-0.93)	0.0195	0.92 (0.65-1.28)	0.6094	
Oral sex without condom with primary partner/past 30 days							
yes	46.8	(9/19.22)	2.24 (1.36-3.70)	0.0015	1.20 (0.71-2.03)	0.4934	
No	21.7	(326/1501.00)	1.00 - -		1.00 - -	-	
No primary partner	13.8	(36/261.38)	0.62 (0.42-0.92)	0.0190	0.92 (0.66-1.28)	0.6183	
Oral sex with other partners/past 30 days							
yes	35.6	(17/47.72)	1.70 (1.16-2.50)	0.0062	0.86 (0.56-1.32)	0.4930	
No	20.6	(353/1711.97)	1.00 - -		1.00 - -	-	
Oral sex without condom with other partner/past 30 days							
yes	45.1	(4/8.87)	2.23 (0.90-5.52)	0.0824	1.19 (0.46-3.04)	0.7193	
No	20.9	(366/1750.82)	1.00 - -		1.00 - -	-	
Gonorrhea in the at-risk-period							
Present	24.5	(17/69.42)	1.18 (0.75-1.86)	0.4813	1.45 (0.87-2.416)	0.1482	
Absent	20.7	(354/1713.70)	1.00 - -		1.00 - -	-	
Chlamydia in the at-risk-period							
Present	16.1	(12/74.40)	0.77 (0.43-1.37)	0.3688	1.12 (0.67-1.87)	0.6720	
Absent	21.0	(359/1708.72)	1.00 - -		1.00 - -	-	

Trichomoniasis in the at-risk-period							
Present	15.7	(8/50.85)	0.73 (0.33-1.61)	0.4393	0.80 (0.37-1.71)	0.5589	
Absent	20.9	(363/1732.27)	1.00	-	-	1.00	-
Candidiasis in the at-risk-period							
Present	15.6	(86/552.65)	0.68 (0.53-0.87)	0.0025	0.69 (0.53-0.91)	0.0095	
Absent	23.2	(285/1230.47)	1.00	-	-	1.00	-

*NR =number of recurrences; § HR=Hazard ratio; ¶ CI=Confidence interval; ‡ CCU=Consistent condom use (100% of sexual acts)

Table 4 : Baseline and time-varying factors predicting bacterial vaginosis recurrence among 440 female sex workers followed-up in a microbicide trial: adjusted hazard ratios (Multivariate model)

Factors	HR§ and 95% CI [¶]	p-value
Study sites:		
Chennai/Mudhol/Jhamkandi	4.83 (3.49 – 6.68)	<0.0001
Cotonou	3.16 (2.30 - 4.33)	<0.0001
Kampala (Ref.)	1.00 -	-
CCU‡ with primary partner in the past 7 days:		
No	1.00 -	-
Yes	0.68 (0.49 - 0.93)	0.0169
No primary partner or no sexual act with him	0.72 (0.56 - 0.92)	0.0085
Recent intra-vaginal cleansing (as reported at baseline)	1.30 (1.02 - 1.64)	0.0322
Candidiasis in the at-risk-period	0.70 (0.53 - 0.93)	0.0130

§ HR=Hazard ratio; ¶ CI=Confidence interval; ‡ CCU=Consistent condom use (100% of sexual acts)

6 Chapitre 6. Discussion générale et conclusion

6.1 La flore vaginale intermédiaire et la vaginose bactérienne comme parties du continuum de la même maladie : résultats d'une analyse exploratoire chez les travailleuses du sexe en Afrique et en Inde.

Cette étude a confirmé la prévalence élevée de la vaginose bactérienne (47,6%) chez les travailleuses du sexe (TS) en Afrique sub-saharienne et en Inde. En outre, 19,2% des femmes avaient une flore vaginale intermédiaire (FVI).

Les analyses multivariées ont montré que le VIH, la gonorrhée, la trichomoniose, la contraception hormonale, les rapports sexuels anaux dans les 30 jours précédents et la candidose vaginale ont été associés à la fois à la flore vaginale intermédiaire et à la VB, et ont été principalement révélés comme facteurs de risque (ou facteurs protecteurs) par le modèle dichotomique comparant le risque combiné des 2 niveaux de perturbations à celui de la flore vaginale normale utilisé comme référence. Il est surtout important de remarquer que, selon le modèle dichotomique utilisant les femmes sans VB (donc ayant la flore vaginale intermédiaire ou la flore vaginale normale) comme référence, le VIH et la trichomoniose n'étaient pas des facteurs de risque significatifs pour la VB, alors qu'ils l'étaient dans le modèle polytomique où la catégorie de référence était plutôt la flore vaginale normale.

En revanche, avoir moins de 20 ans et avoir eu au moins 35 actes sexuels dans la dernière semaine ont été spécifiquement associés à la VB (mais pas à la flore vaginale intermédiaire) dans le modèle polytomique et ont été principalement révélés par le modèle dichotomique utilisant la catégorie des femmes sans VB comme référence. Cette analyse exploratoire a ainsi montré que les facteurs de risque ou facteurs protecteurs de la VB qui sont également associés avec la flore vaginale intermédiaire, et particulièrement ceux qui sont plus fortement associés à la flore vaginale intermédiaire qu'à la VB pourraient ne pas être révélés comme facteurs de risque (ou protecteurs) de la VB, par la méthode communément utilisée et qui est celle du modèle dichotomique regroupant les sujets avec flore vaginale intermédiaire et ceux avec flore vaginale normale comme catégorie de référence. Ceci pourrait alors expliquer, ne serait-ce que partiellement, la divergence

observée entre les résultats de certaines études qui ont exploré ces associations. Tout se passe comme si pour un facteur de risque (ou protecteur) donné, la force de son effet pour faire passer le sujet d'un niveau de perturbation de la flore vaginale à un autre peut varier significativement. Ainsi, par exemple, un facteur de risque donné pourrait beaucoup plus accélérer le passage du niveau de la flore vaginale normale à celui de la flore vaginale intermédiaire qu'il ne le fasse pour le passage du niveau de ce dernier à celui de VB.

Plusieurs études récentes ont confirmé la relation entre les anomalies de la flore vaginale et le VIH et ont montré que la flore vaginale intermédiaire peut même être associée avec le VIH aussi fortement que la VB (16, 17). Dans notre étude, l'infection gonococcique était significativement associée à la flore vaginale intermédiaire et la VB, et l'infection à chlamydia l'était également, mais seulement dans l'analyse bivariée. Brotman et al. (68, 106), dans une analyse longitudinale, ont trouvé que la VB était positivement associée à la gonorrhée, la chlamydiase et la trichomoniose incidentes, indépendamment des autres facteurs de risque. Dans notre étude, la VB était plus fréquente chez les femmes de moins de 20 ans, comparativement aux femmes qui étaient plus âgées (RC ajusté = 1,80, IC 95% = 1,00 à 3,33). Plusieurs études antérieures (68, 107-109) ont également signalé une diminution du risque de VB avec l'âge. Considérant le rôle joué par les hormones dans la survenue de la VB (110), cette augmentation du risque peut être due à des perturbations hormonales observées au début de la vie reproductive des femmes (110). Selon Cauci (111), comparativement à la période d'intense activité reproductive, le risque de la VB serait élevée aux deux périodes extrêmes de la vie reproductive de la femme (période pubertaire et ménopause) au point où la courbe reliant l'âge au risque de VB aurait l'allure d'un «U». Mais la faible proportion de femmes de plus 50 ans dans notre population d'étude ne nous a pas permis d'observer cette augmentation de risque dans cette tranche d'âge.

Avoir eu 35 ou plus des rapports sexuels au cours des sept derniers jours était significativement associé à la VB, tandis que le nombre de partenaires sexuels au cours des trois derniers mois ne l'était pas. Selon Verstraelen et al. (112), la fréquence des rapports sexuels, et non le nombre de partenaires sexuels, est le facteur de risque critique pour la VB. Dans certaines études antérieures (59, 110, 113), la fréquence des rapports sexuels (ou l'histoire de rapports sexuels récents) était indépendamment associée à la VB. Ces résultats semblent supporter l'hypothèse selon laquelle la VB serait une maladie sexuellement induite ou majorée (« sexually enhanced disease ») (114)

plutôt qu'une maladie sexuellement transmissible. Selon cette hypothèse, l'acte sexuel ne ferait que créer les conditions favorables au développement de la maladie, à partir des germes préexistants chez la femme, et non par le transfert de germes du partenaire sexuel masculin (114).

Il y avait une association inverse entre la contraception hormonale et la VB. L'effet protecteur de la contraception hormonale a été rapporté dans plusieurs études (24, 59, 68, 107). Les contraceptifs hormonaux peuvent influencer le risque de la VB de différentes manières. Les oestrogènes contenus dans les contraceptifs oraux combinés augmentent le niveau de glycogène dans les cellules épithéliales vaginales. Ce glycogène est transformé en acide lactique par les lactobacilles vaginaux, contribuant ainsi à maintenir le pH vaginal bas et à prévenir la prolifération de bactéries associées à la VB (BV-associated bacteria « BVAB ») (69). Les contraceptifs progestatifs peuvent diminuer le risque d'une flore vaginale anormale par la réduction des saignements menstruels (70), ces derniers s'étant révélés être associés à un risque accru de VB (69). Nous avons également constaté que les relations sexuelles anales au cours des 30 jours précédents avaient un effet protecteur contre la VB. Les données sur la relation entre la VB et les rapports sexuels anaux sont encore contradictoires. Fethers et al. (115) n'ont pas trouvé d'association entre les rapports sexuels anaux et la VB. Cependant, une récente étude prospective (116) a constaté que les femmes qui ont acquis la VB étaient plus susceptibles d'avoir une colonisation antérieure de réservoirs extravaginaux (anus et cavité buccale) avec certaines BVAB et moins susceptibles d'avoir le *Lactobacillus crispatus*, ce qui suggère que les BVAB peuvent être acquises par voie vaginale à partir de ces réservoirs extravaginaux. L'effet protecteur du rapport sexuel anal (RSA) dans notre étude peut être dû au fait qu'une proportion élevée des RSA était protégée dans notre population d'étude (respectivement 66% et 80% pour les partenaires sexuels réguliers et les autres partenaires sexuels) (données non présentées). Par ailleurs, les RSA sont relativement peu courantes en Afrique, comme l'a témoigné la faible fréquence de 2,2% rapportée dans l'étude.

Il ressort de cette analyse exploratoire que la plupart des facteurs de risque (ou protecteurs) de la VB le sont également pour la FVI, même si certains de ces facteurs se comportent quelque peu différemment au niveau des deux types de perturbations qui constituent en fait des degrés de la même maladie.

6.2 La flore vaginale intermédiaire est associée à la prévalence du VIH aussi fortement que la vaginose bactérienne dans une étude transversale sur les participantes dépistées dans le cadre d'un essai randomisé et contrôlé

Les prévalences du VIH, de la VB et de la FVI ont été estimées respectivement à 27,0%, 47,6% et 19,2% au sein des TS étudiées.

Comparativement aux femmes avec une flore vaginale normale, celles qui avaient une FVI avaient une prévalence du VIH qui était significativement plus élevée, comme en témoigne le rapport de prévalence (RP) de 1,56 (IC à 95% = 1,22 à 1,98). Nos résultats suggèrent que l'utilisation d'une catégorie « non-VB » (combinant la FVI et la flore normale) comme référence pour mesurer le risque de VIH lié à la VB pourrait conduire à une sous-estimation. Et il s'agit là d'un résultat biologiquement justifié car la FVI devait être considérée comme un stade de la même maladie et non un état normal ou de « non-maladie ». En effet, comme l'ont suggéré les résultats de l'étude présentée dans le chapitre 3, la FVI partage la plupart des facteurs de risque (ou protecteurs) de la VB et il est donc théoriquement raisonnable de supposer que les femmes ayant une FVI fluctuent plus souvent entre la FVI et la VB plutôt qu'entre la FVI et la flore normale.

En fait, avec la fluctuation rapide de la flore vaginale, il est difficile de différencier le risque de VIH associé à la FVI de celui associé à la VB, même dans des études prospectives. Ceci conduit à questionner la relation causale entre une VB analysée comme donnée de base et une infection à VIH incidente. A cet effet, deux études antérieures (16, 41) ont trouvé que plus les visites auxquelles le diagnostic de FVI ou de VB et celui de l'infection à VIH sont proches, plus les estimés des rapports de risque de FVI et VB (pour le VIH) sont proches. Les études futures sur l'association entre les anomalies de la flore vaginale (FVI et VB) et le VIH devraient donc traiter ces deux expositions comme une variable dépendant du temps.

Si les preuves de l'association entre la FVI et le VIH continuent de s'accumuler, il s'avèrerait important, dans la perspective de la lutte contre le VIH, d'envisager une stratégie de contrôle de la VB qui devrait aussi inclure la FVI. Nous anticipons que le volet thérapeutique d'une telle stratégie pourrait rencontrer des difficultés à cause du caractère essentiellement asymptomatique de la FVI. Mais faudra-t-il attendre qu'une exposition qui se trouve associée à des conséquences aussi sérieuses que l'infection à VIH, soit symptomatique pour envisager de la traiter?

6.3 Les prédicteurs comportementaux et médicaux de la récurrence de la vaginose bactérienne chez les travailleuses du sexe: analyse longitudinale des données d'un essai microbicide randomisé et contrôlé

Cette étude a montré que 253 (57,5%) des 440 TS avec au moins un épisode de VB ont eu au moins une récurrence de VB au cours de leur période de suivi de 4 mois en moyenne. Le taux d'incidence était de 20,8 récurrences/100 personnes-mois (IC à 95% = 18,1 à 23,4) ou 2,53 récurrences / personne-année (IC à 95% = 2,26 à 2,77).

Dans l'analyse multivariée, une récente douche vaginale était un facteur de risque pour la VB récurrente (VBR), alors que l'utilisation constante de condom avec le partenaire principal et la candidose vaginale étaient protectrices.

Bien que plusieurs études antérieures transversales ou prospectives aient constaté que la douche vaginale augmente le risque de l'épisode isolé de VB, très peu ont traité de la VBR (68, 100, 117). Schwebke et al. ont signalé que les douches vaginales accroissent le risque de VBR (100), comme l'étude sur les données de l'essai sur le traitement présomptif périodique (TPP) a constaté que le risque de VBR augmente avec la fréquence de la douche vaginale (valeur p pour la tendance = 0,04) (68). Ces résultats sont cohérents avec le nôtre. Cependant, certaines études n'ont trouvé aucune association entre cette pratique et la VB (81, 117). Il est à noter qu'à cause des instructions régulières données aux participantes lors des visites mensuelles et déconseillant la douche vaginale, la proportion de femmes ayant déclaré pratiquer la douche vaginale à l'entrée dans l'essai clinique (98,0%) a considérablement diminué pour n'être que 17,6% à l'entrée dans l'étude sur la VBR. Ceci pourrait aussi expliquer que nous n'ayons pas trouvé d'association entre la douche vaginale et la VB dans la première étude (chapitre 3) qui a porté sur les femmes dépistées mais que nous l'ayons trouvée dans la troisième étude (chapitre 5) qui a porté sur les femmes recrutées dans l'essai clinique.

Comparativement aux femmes qui n'utilisaient pas systématiquement le préservatif avec leurs partenaires réguliers dans les 7 jours précédents, celles qui le faisaient avaient un risque de VBR significativement inférieur. Un élément important de nos résultats est que le risque de VBR chez les femmes ayant déclaré utiliser le condom de façon systématique avec leurs partenaires réguliers était similaire à celui des femmes sans partenaire régulier ou n'ayant pas eu d'acte sexuel

avec ce dernier. Ces résultats appuient l'idée que l'utilisation correcte et systématique du préservatif peut être aussi efficace que l'abstinence sexuelle dans la protection contre la VBR. Parmi les femmes ayant déclaré n'avoir pas eu de rapports sexuels avec leurs partenaires réguliers, il y en avait qui avaient pourtant eu des rapports sexuels avec les autres partenaires sexuels (clients) et le fort taux d'utilisation de condom (97,6%) rapporté pour ces derniers explique probablement la similarité entre les deux rapports de risque. Ce même fort taux d'utilisation de condom chez les clients expliquerait le manque de significativité de l'association entre ce facteur et la VBR pour ce qui concerne les rapports sexuels avec les clients. Plusieurs autres études ont montré que l'utilisation systématique de condom peut réduire le risque de VBR (63, 68, 100, 118). Toutefois, Yotebieng et al. ont trouvé dans leur étude que le préservatif était efficace contre la VB isolée mais pas la VBR (119). Contrairement à ce qui est rencontré avec l'épisode isolé de VB, comme cela a été le cas dans la première étude, nous n'avons pas trouvé d'association entre les infections génitales (à l'exception des candidoses) et la VBR. La pratique courante de la prise en charge syndromique de ces infections dans les sites de l'étude pourrait conduire à un traitement systématique de ces infections (qui sont relativement moins récidivantes que la VB) chez ces femmes régulièrement traitées pour VBR. Klatt et al. et Myer et al. n'en ont aussi pas trouvé dans leur étude respective (117, 120). Cependant, dans certaines études, la trichomoniose était positivement associée à la VBR (68, 121). Dans notre étude, elle y était plutôt négativement associée, quoique de façon non significative. Ceci supporte l'hypothèse qu'elle aurait indirectement bénéficié du traitement répété par les imidazolés, en lien avec la récurrence de la VB.

La contraception hormonale et le sexe anal étaient significativement et négativement associés avec VB prévalente (dans le chapitre 3), mais pas avec la VBR. Ceci pourrait s'expliquer par la diminution notable de la proportion de femmes rapportant ces pratiques dans l'échantillon qui a fait l'objet de l'étude sur la VBR.

Une constatation frappante dans cette étude (et dans une certaine mesure dans les deux autres études) est l'effet écrasant du site d'étude sur les associations entre les facteurs de risque étudiés et la VBR. Ceci suggère un effet confondant important par le site en raison d'une répartition très variable de facteurs sociodémographiques et médicaux entre les sites d'étude.

Toutefois, l'association entre le sexe anal ou oral (réception du pénis dans la bouche) et la VBR mérite une certaine attention bien qu'elle n'ait été significative qu'en analyse univariée. En effet, plusieurs études antérieures ont montré que le risque de RBV est plus élevé chez les femmes pratiquant le sexe oral (63, 121, 122). De plus, une étude récente (116) a montré que l'anus et la cavité buccale représentent des réservoirs extra-vaginaux des bactéries associées à la VB. Le rapport sexuel oral précédant souvent celui vaginal (en cas de pratique des deux types de relation) il y a des chances que des germes d'origine buccale soient transférés par le partenaire sexuel vers la cavité vaginale. Cependant, d'autres auteurs (122) ayant retrouvé une association entre les péri-odontites et la VB ont pensé aussi à un facteur immunologique sous-jacent de l'hôte, favorisant la présence de ces germes spécifiques au niveau de ces sites (bouche, vagin et anus), et pas nécessairement leur transfert entre ces sites. Mais les deux mécanismes peuvent aussi coexister.

Enfin, il aurait été plus cohérent que les anomalies de la flore vaginale aient été traitées en trois catégories comme dans les deux premières études. Mais la complexité de la méthode d'analyse statistique utilisée (Modèle de Andersen-Gill) ne nous l'a pas permis.

6.4 Conclusion

En somme, ces trois études nous ont permis de confirmer que la fréquence des anomalies de la flore vaginale (FVI et BV) et de l'infection à VIH demeure élevée au sein des travailleuses du sexe en Afrique sub-Saharienne et en Inde, qu'aussi bien la FVI que la VB sont associées à l'infection à VIH, et que la FVI pourrait être associée à l'infection à VIH aussi fortement que la VB. Elles nous ont permis également de savoir que la FVI partage avec la VB, la plupart de ses facteurs de risque (ou protecteurs), bien que la force de l'effet de ces facteurs puisse varier, et que la FVI et la VB pourraient être considérées comme parties du continuum de la même maladie. Ces études ont révélé que certains facteurs de risque communs à la FVI et la VB, et en particulier ceux plus fortement associés à la FVI que la VB pourraient ne pas être identifiés par l'approche communément utilisée qui dichotomise les anomalies de la flore vaginale en isolant la FVI de la VB. Ces études ont aussi confirmé une incidence assez élevée de la vaginose bactérienne récurrente au sein des travailleuses du sexe avec comme principaux prédicteurs de récurrence, la douche vaginale récente et l'absence d'utilisation systématique du condom lors des rapports sexuels avec le partenaire régulier.

Il ressort donc de ces résultats que non seulement le contrôle de la vaginose bactérienne au sein des travailleuses du sexe devrait être une composante importante des stratégies de lutte contre le VIH dans les pays en développement notamment ceux à épidémie concentrée, mais aussi que, pour être efficaces, ces stratégies devront prendre en compte la FVI, au même titre que la VB, et que la composante comportementale de ces stratégies devrait insister, entre autres, sur les méfaits de la douche vaginale et l'effet protecteur de l'utilisation systématique de condom avec tous les types de partenaires. L'utilisation de la dichotomisation isolant la FVI de la VB dans l'étude des facteurs de risque et des conséquences de la vaginose bactérienne mérite d'être reconsidérée. Enfin des études prospectives sont nécessaires pour approfondir les analyses sur la pertinence et les moyens de la prise en compte de la FVI dans la prise en charge clinique et surtout thérapeutique des anomalies de la flore vaginale, notamment à cause de son caractère presque asymptomatique.

Références :

1. Mayaud P. Tackling bacterial vaginosis and HIV in developing countries. *Lancet*. 1997;350:530-1.
2. Miller L, Thomas K, Hughes JP, Holmes KK, Stout S, Eschenbach DA. Randomised treatment trial of bacterial vaginosis to prevent post-abortion complication. *Br J Obstet Gynecol*. 2004;111:982-8.
3. Schwebke JR. Gynecologic consequences of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2003;30:685-94.
4. Oakeshott P, Kerry S, Hay S, Hay P. Bacterial vaginosis and preterm birth: a prospective community-based cohort study. *Br J Gen Pract*. 2004;54:119-22.
5. Guaschino S, De Seta F, Piccoli M, Maso G, Alberico S. Aetiology of preterm labour: bacterial vaginosis. *Br J Obstet Gynecol*. 2006;113 Suppl 3:46-51.
6. De Seta F, Sartore A, Piccoli M, Maso G, Zicari S, Panerari F, et al. Bacterial vaginosis and preterm delivery: an open question. *J Reprod Med*. 2005;50:313-8.
7. Lamont RF, Nhan-Chang CL, Sobel JD, Workowski K, Conde-Agudelo A, Romero R. Treatment of abnormal vaginal flora in early pregnancy with clindamycin for the prevention of spontaneous preterm birth: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205:177-90.
8. Hay PE. Bacterial vaginosis and miscarriage. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17:41-4.
9. Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:431-7.
10. Liversedge NH, Turner A, Horner PJ, Keay SD, Jenkins JM, Hull MG. The influence of bacterial vaginosis on in-vitro fertilization and embryo implantation during assisted reproduction treatment. *Hum Reprod*. 1999;14:2411-5.
11. Wilson JD, Ralph SG, Rutherford AJ. Rates of bacterial vaginosis in women undergoing in vitro fertilisation for different types of infertility. *Br J Obstet Gynecol*. 2002;109:714-7.
12. Eckert LO, Moore DE, Patton DL, Agnew KJ, Eschenbach DA. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2003;11:11-7.
13. Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ*. 1999;319:220-3.
14. Joesoef MR, Wiknjosastro G, Norojono W, Sumampouw H, Linnan M, Hansell MJ, et al. Coinfection with chlamydia and gonorrhoea among pregnant women and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS*. 1996;7:61-4.
15. Moi H. Prevalence of bacterial vaginosis and its association with genital infections, inflammation, and contraceptive methods in women attending sexually transmitted disease and primary health clinics. *Int J STD AIDS*. 1990;1:86-94.
16. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, Egger M, Francis SC, van de Wijgert JH, et al. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and HIV infection in women: individual participant data meta-analysis. *PLoS Med*. 2011;8:e1000416.
17. Guedou FA, Van Damme L, Mirembe F, Solomon S, Becker M, Deese J, et al. Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-

- sectional study of participants screened for a randomised controlled trial. *Sex Transm Infect.* Published online first 2012 May 24;doi:10.1136/sextrans-2011-050319.
18. Lamont RF, Morgan DJ, Wilden SD, Taylor-Robinson D. Prevalence of bacterial vaginosis in women attending one of three general practices for routine cervical cytology. *Int J STD AIDS.* 2000;11:495-8.
 19. Morris M, Nicoll A, Simms I, Wilson J, Catchpole M. Bacterial vaginosis: a public health review. *Br J Obstet Gynecol.* 2001;108:439-50.
 20. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis.* 2007;34:864-9.
 21. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997;350:546-50.
 22. Wawer MJ, Sewankambo NK, Serwadda D, Quinn TC, Paxton LA, Kiwanuka N, et al. Control of sexually transmitted diseases for AIDS prevention in Uganda: a randomised community trial. Rakai Project Study Group. *Lancet.* 1999;353:525-35.
 23. Uma S, Balakrishnan P, Murugavel KG, Srikrishnan AK, Kumarasamy N, Cecelia JA, et al. Bacterial vaginosis in female sex workers in Chennai, India. *Sex Health.* 2005;2:261-2.
 24. Nagot N, Ouedraogo A, Defer MC, Vallo R, Mayaud P, Van de Perre P. Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex Transm Infect.* 2007;83:365-8.
 25. Kaul R, Nagelkerke NJ, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, Macdonald KS, et al. Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections. *J Infect Dis.* 2007;196:1692-7.
 26. Jamieson DJ, Duerr A, Klein RS, Paramsothy P, Brown W, Cu-Uvin S, et al. Longitudinal analysis of bacterial vaginosis: findings from the HIV epidemiology research study. *Obstet Gynecol.* 2001;98:656-63.
 27. Myer L, Denny L, Telerant R, Souza M, Wright TC, Jr., Kuhn L. Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: a nested case-control study. *J Infect Dis.* 2005;192:1372-80.
 28. Myer L, Kuhn L, Stein ZA, Wright TC, Jr., Denny L. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and women's susceptibility to HIV infection: epidemiological evidence and biological mechanisms. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:786-94.
 29. Warren D, Klein RS, Sobel J, Kieke B, Jr., Brown W, Schuman P, et al. A multicenter study of bacterial vaginosis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2001;9:133-41.
 30. Taha TE, Gray RH, Kumwenda NI, Hoover DR, Mtima-valye LA, Liomba GN, et al. HIV infection and disturbances of vaginal flora during pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1999;20:52-9.
 31. Taha TE, Hoover DR, Dallabetta GA, Kumwenda NI, Mtima-valye LA, Yang LP, et al. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *Aids.* 1998;12:1699-706.
 32. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis.* 1999;180:1863-8.
 33. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS.* 2008;22:1493-501.

34. Cu-Uvin S, Hogan JW, Caliendo AM, Harwell J, Mayer KH, Carpenter CC. Association between bacterial vaginosis and expression of human immunodeficiency virus type 1 RNA in the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;33:894-6.
35. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *J Infect Dis*. 2005;191:25-32.
36. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F, Maserati R, Polatti F, De Santolo A. Factors associated with nucleic acids related to human immunodeficiency virus type 1 in cervico-vaginal secretions. *Br J Obstet Gynecol*. 2001;108:634-41.
37. Wang CC, McClelland RS, Reilly M, Overbaugh J, Emery SR, Mandaliya K, et al. The effect of treatment of vaginal infections on shedding of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 2001;183:1017-22.
38. Zariffard MR, Sha BE, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Relationship of U1 cell HIV-stimulatory activity to bacterial vaginosis and HIV genital tract virus load. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005;21:945-8.
39. Cohen CR, Lingappa JR, Baeten JM, Ngayo MO, Spiegel CA, Hong T, et al. Bacterial Vaginosis Associated with Increased Risk of Female-to-Male HIV-1 Transmission: A Prospective Cohort Analysis among African Couples. *PLoS Med*. 2012;9:e1001251.
40. Moodley P, Connolly C, Sturm AW. Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *J Infect Dis*. 2002;185:69-73.
41. van de Wijgert JH, Morrison CS, Brown J, Kwok C, Van Der Pol B, Chipato T, et al. Disentangling contributions of reproductive tract infections to HIV acquisition in African Women. *Sex Transm Dis*. 2009;36:357-64.
42. Reid SE, Dai JY, Wang J, Sicalwe BN, Akpomemie G, Cowan FM, et al. Pregnancy, contraceptive use, and HIV acquisition in HPTN 039: relevance for HIV prevention trials among African women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53:606-13.
43. Woodrow N, Lamont RF. Bacterial vaginosis: its importance in obstetrics. *Hosp Med*. 1998;59:447-50.
44. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*. 1983;74:14-22.
45. 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;29:297-301.
46. Gratacos E, Figueras F, Barranco M, Ros R, Andreu A, Alonso PL, et al. Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram stain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur J Epidemiol*. 1999;15:913-6.
47. Mastrobattista JM, Bishop KD, Newton ER. Wet smear compared with gram stain diagnosis of bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women. *Obstet Gynecol*. 2000;96:504-6.
48. Hillier SL, Critchlow CW, Stevens CE, Roberts MC, Wolner-Hanssen P, Eschenbach DA, et al. Microbiological, epidemiological and clinical correlates of vaginal colonisation by *Mobiluncus* species. *Genitourin Med*. 1991;67:26-31.
49. Holst E, Wathne B, Hovelius B, Mardh PA. Bacterial vaginosis: microbiological and clinical findings. *Eur J Clin Microbiol*. 1987;6:536-41.
50. Josey WE, Schwebke JR. The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment. *Int J STD AIDS*. 2008;19:152-4.

51. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1899-911.
52. Marrazzo JM. Elusive aetiology of bacterial vaginosis. Do lesbians have a clue? *Sex Transm Infect*. 2007;83:424-5.
53. Marrazzo JM, Koutsky LA, Eschenbach DA, Agnew K, Stine K, Hillier SL. Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. *J Infect Dis*. 2002;185:1307-13.
54. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2009;47:721-6.
55. Marrazzo JM, Thomas KK, Fiedler TL, Ringwood K, Fredricks DN. Relationship of specific vaginal bacteria and bacterial vaginosis treatment failure in women who have sex with women. *Ann Intern Med*. 2008;149:20-8.
56. Hale LP, Swidsinski A, Mendling W. Bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 2006;354:202-3.
57. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3270-6.
58. Ashraf-Ganjoei T. Risk factors for bacterial vaginosis in women attending a hospital in Kerman, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 2005;11:410-5.
59. Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, Morris MB, Moss LM, Fairley CK. Higher-risk behavioral practices associated with bacterial vaginosis compared with vaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*. 2005;106:105-14.
60. Ness RB, Hillier SL, Richter HE, Soper DE, Stamm C, McGregor J, et al. Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. *Obstet Gynecol*. 2002;100:765.
61. Schwebke JR, Desmond RA, Oh MK. Predictors of bacterial vaginosis in adolescent women who douche. *Sex Transm Dis*. 2004;31:433-6.
62. Aboud S, Msamanga G, Read JS, Mwatha A, Chen YQ, Potter D, et al. Genital tract infections among HIV-infected pregnant women in Malawi, Tanzania and Zambia. *Int J STD AIDS*. 2008;19:824-32.
63. Smart S, Singal A, Mindel A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect*. 2004;80:58-62.
64. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Andrews WW, Schwebke JR, Zhang J, et al. A longitudinal study of vaginal douching and bacterial vaginosis--a marginal structural modeling analysis. *Am J Epidemiol*. 2008;168:188-96.
65. Brotman RM, Ghanem KG, Klebanoff MA, Taha TE, Scharfstein DO, Zenilman JM. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis: a pilot study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:628 e1-7.
66. Hutchinson KB, Kip KE, Ness RB. Condom use and its association with bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated vaginal microflora. *Epidemiology*. 2007;18:702-8.
67. Hutchinson KB, Kip KE, Ness RB. Vaginal douching and development of bacterial vaginosis among women with normal and abnormal vaginal microflora. *Sex Transm Dis*. 2007;34:671-5.
68. McClelland RS, Richardson BA, Graham SM, Masese LN, Gitau R, Lavreys L, et al. A prospective study of risk factors for bacterial vaginosis in HIV-1-seronegative African women. *Sex Transm Dis*. 2008;35:617-23.

69. Rifkin SB, Smith MR, Brotman RM, Gindi RM, Erbeling EJ. Hormonal contraception and risk of bacterial vaginosis diagnosis in an observational study of women attending STD clinics in Baltimore, MD. *Contraception*. 2009;80:63-7.
70. Miller L, Patton DL, Meier A, Thwin SS, Hooton TM, Eschenbach DA. Depomedroxyprogesterone-induced hypoestrogenism and changes in vaginal flora and epithelium. *Obstet Gynecol*. 2000;96:431-9.
71. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis*. 2003;36:663-8.
72. Steinhandler L, Peipert JF, Heber W, Montagno A, Cruickshank C. Combination of bacterial vaginosis and leukorrhea as a predictor of cervical chlamydial or gonococcal infection. *Obstet Gynecol*. 2002;99:603-7.
73. Ness RB, Kip KE, Soper DE, Hillier S, Stamm CA, Sweet RL, et al. Bacterial vaginosis (BV) and the risk of incident gonococcal or chlamydial genital infection in a predominantly black population. *Sex Transm Dis*. 2005;32:413-7.
74. Cohen CR, Duerr A, Pruithithada N, Ruggao S, Hillier S, Garcia P, et al. Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. *AIDS* 1995;9:1093-7.
75. Mbu ER, Kongnyuy EJ, Mbopi-Keou F, Tonye RN, Nana PN, Leke RJ. Gynaecological morbidity among HIV positive pregnant women in Cameroon. *Reprod Health*. 2008;5:3.
76. McClelland RS, Lavreys L, Katingima C, Overbaugh J, Chohan V, Mandaliya K, et al. Contribution of HIV-1 infection to acquisition of sexually transmitted disease: a 10-year prospective study. *J Infect Dis*. 2005;191:333-8.
77. Hanson JM, McGregor JA, Hillier SL, Eschenbach DA, Kreutner AK, Galask RP, et al. Metronidazole for bacterial vaginosis. A comparison of vaginal gel vs. oral therapy. *J Reprod Med*. 2000;45:889-96.
78. Livengood CH, 3rd, McGregor JA, Soper DE, Newton E, Thomason JL. Bacterial vaginosis: efficacy and safety of intravaginal metronidazole treatment. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:759-64.
79. Hillier SL, Lipinski C, Briselden AM, Eschenbach DA. Efficacy of intravaginal 0.75% metronidazole gel for the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*. 1993;81:963-7.
80. Sobel JD, Ferris D, Schwebke J, Nyirjesy P, Wiesenfeld HC, Peipert J, et al. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:1283-9.
81. Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, Garland SM, Morris MB, Moss LM, et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis*. 2006;193:1478-86.
82. Sanchez S, Garcia PJ, Thomas KK, Catlin M, Holmes KK. Intravaginal metronidazole gel versus metronidazole plus nystatin ovules for bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1898-906.
83. Thomas KK, Sanchez S, Garcia PJ, Holmes KK. Why do different criteria for 'cure' yield different conclusions in comparing two treatments for bacterial vaginosis? *Sex Transm Dis*. 2005;32:526-30.
84. Livengood CH, 3rd, Ferris DG, Wiesenfeld HC, Hillier SL, Soper DE, Nyirjesy P, et al. Effectiveness of two tinidazole regimens in treatment of bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 2007;110:302-9.

85. Schmitt C, Sobel JD, Meriwether C. Bacterial vaginosis: treatment with clindamycin cream versus oral metronidazole. *Obstet Gynecol.* 1992;79:1020-3.
86. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M, et al. Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. *BMC Infect Dis.* 2006;6:51.
87. Mitchell CM, Hitti JE, Agnew KJ, Fredricks DN. Comparison of oral and vaginal metronidazole for treatment of bacterial vaginosis in pregnancy: impact on fastidious bacteria. *BMC Infect Dis.* 2009;9:89.
88. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, Chohan V, Lavreys L, Mandaliya K, et al. Improvement of vaginal health for Kenyan women at risk for acquisition of human immunodeficiency virus type 1: results of a randomized trial. *J Infect Dis.* 2008;197:1361-8.
89. Bolton M, van der Straten A, Cohen CR. Probiotics: potential to prevent HIV and sexually transmitted infections in women. *Sex Transm Dis.* 2008;35:214-25.
90. Tsvetkov K, Vasileva P, Petkova U. [Probiotics in the treatment and prevention of bacterial vaginosis relapses]. *Akush Ginekol (Sofia).* 2007;46 Suppl 2:41-4.
91. Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus GR-1* and *RC-14* with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect.* 2006;8:2772-6.
92. Johnson LF, Coetzee DJ, Dorrington RE. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections in South Africa: a review. *Sex Transm Infect.* 2005;81:287-93.
93. Shethwala ND, Mulla SA, Kosambiya JK, Desai VK. Sexually transmitted infections and reproductive tract infections in female sex workers. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52:198-9.
94. Alary M, Lowndes CM. The central role of clients of female sex workers in the dynamics of heterosexual HIV transmission in sub-Saharan Africa. *AIDS.* 2004;18:945-7.
95. Lowndes CM, Alary M, Meda H, Gnintoungbe CA, Mukenge-Tshibaka L, Adjovi C, et al. Role of core and bridging groups in the transmission dynamics of HIV and STIs in Cotonou, Benin, West Africa. *Sex Transm Infect.* 2002;78 Suppl 1:i69-77.
96. Cote AM, Sobela F, Dzokoto A, Nzambi K, Asamoah-Adu C, Labbe AC, et al. Transactional sex is the driving force in the dynamics of HIV in Accra, Ghana. *AIDS.* 2004;18:917-25.
97. Demba E, Morison L, van der Loeff MS, Awasana AA, Gooding E, Bailey R, et al. Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in The Gambia, West Africa. *BMC Infect Dis.* 2005;5:12.
98. Holzman C, Leventhal JM, Qiu H, Jones NM, Wang J. Factors linked to bacterial vaginosis in nonpregnant women. *Am J Public Health.* 2001;91:1664-70.
99. Kaul R, Kimani J, Nagelkerke NJ, Fonck K, Ngugi EN, Keli F, et al. Monthly antibiotic chemoprophylaxis and incidence of sexually transmitted infections and HIV-1 infection in Kenyan sex workers: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291:2555-62.
100. Schwebke JR, Desmond RA. A randomized trial of the duration of therapy with metronidazole plus or minus azithromycin for treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis.* 2007;44:213-9.
101. Meltzer MC, Desmond RA, Schwebke JR. Association of *Mobiluncus curtisii* with recurrence of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.* 2008;35:611-3.
102. Nagaraja P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26:155-7.
103. Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, Guedou F, Solomon S, Becker ML, et al. Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med.* 2008;359:463-72.

104. British Association for Sexual Health and HIV CEG. National guideline for the management of bacterial vaginosis (2006); Available at: <http://www.bashh.org/documents/62/62.pdf>. Accessed on 20 August 2012.
105. Andersen PK, Gill, RD. Cox's regression model for counting processes: a large sample study. *Ann Stat.* 1982;10:1100-20
106. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis.* 2010;202:1907-15.
107. Watts DH, Springer G, Minkoff H, Hillier SL, Jacobson L, Moxley M, et al. The occurrence of vaginal infections among HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women: longitudinal findings of the women's interagency HIV study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43:161-8.
108. Vuylsteke BL, Ettiegne-Traore V, Anoma CK, Bandama C, Ghys PD, Maurice CE, et al. Assessment of the validity of and adherence to sexually transmitted infection algorithms at a female sex worker clinic in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Sex Transm Dis.* 2003;30:284-91.
109. Bukusi EA, Cohen CR, Meier AS, Waiyaki PG, Nguti R, Njeri JN, et al. Bacterial vaginosis: risk factors among Kenyan women and their male partners. *Sex Transm Dis.* 2006;33:361-7.
110. Brabin L, Fairbrother E, Mandal D, Roberts SA, Higgins SP, Chandiok S, et al. Biological and hormonal markers of chlamydia, human papillomavirus, and bacterial vaginosis among adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2005;81:128-32.
111. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, et al. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2147-52.
112. Verstraelen H, Verhelst R, Vaneechoutte M, Temmerman M. The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. *BMC Infect Dis.* 2010;10:81.
113. Baisley K, Changalucha J, Weiss HA, Mugeye K, Everett D, Hambleton I, et al. Bacterial vaginosis in female facility workers in north-western Tanzania: prevalence and risk factors. *Sex Transm Infect.* 2009;85:370-5.
114. Verstraelen H. Bacterial vaginosis: a sexually enhanced disease. *Int J STD AIDS.* 2008;19:575-6.
115. Fethers K, Twin J, Fairley CK, Fowkes FJ, Garland SM, Fehler G, et al. Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women. *PLoS One.* 2012;7(2):e30633.
116. Marrazzo JM, Fiedler TL, Srinivasan S, Thomas KK, Liu C, Ko D, et al. Extravaginal reservoirs of vaginal bacteria as risk factors for incident bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2012;205:1580-8.
117. Klatt TE, Cole DC, Eastwood DC, Barnabei VM. Factors associated with recurrent bacterial vaginosis. *J Reprod Med.* 2010;55:55-61.
118. Thulkar J, Kriplani A, Agarwal N, Vishnubhatla S. Aetiology & risk factors of recurrent vaginitis & its association with various contraceptive methods. *Indian J Med Res.* 2010;131:83-7.
119. Yotebieng M, Turner AN, Hoke TH, Van Damme K, Rasolofomanana JR, Behets F. Effect of consistent condom use on 6-month prevalence of bacterial vaginosis varies by baseline BV status. *Trop Med Int Health.* 2009;14:480-6.
120. Myer L, Kuhn L, Denny L, Wright TC, Jr. Recurrence of symptomatic bacterial vaginosis 12 months after oral metronidazole therapy in HIV-positive and -negative women. *J Infect Dis.* 2006;194:1797-9.

121. Brotman RM, Erbelding EJ, Jamshidi RM, Klebanoff MA, Zenilman JM, Ghanem KG. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007;20:225-31.
122. Zabor EC, Klebanoff M, Yu K, Zhang J, Nansel T, Andrews W, et al. Association between periodontal disease, bacterial vaginosis, and sexual risk behaviours. *J Clin Periodontol.* 2010;37:888-93.

Annexes

Annexes 1: Les fiches de rapport de cas (questionnaires)

Annexe 1.1 : Fiche (questionnaire) pour la visite de dépistage

FSN	FORMTYPE	SCREEN
CONRAD CS Phase 3 Study		
Screening Form		
1. Study Number:	9 8 4 5	STUDY
2. Center Number:		CN CSHP_CENTER
3. Screening Number:		PN
4. Date of Visit:	/ /	CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
5. ID # of person completing form:		SCID
6. Participant signed the screening consent form ...		0=No CSHP_NOYES SCDOUCHE 1=Yes → Specify:
7. How old are you in years? ...	SCAGE	a. What do you use? SCDOUCHO _____ Q16ACOD1-Q16AWORK b. Why do you douche? SCYDOUCO _____ Q16BCOD1-Q16BWORK
If less than 18, participant is not eligible for study. Complete FINAL form after completing this form.		
8. What is your marital status? ...	SCMAR	1=Not currently married, not living with man 2=Not currently married, living with man 3=Married, not living with man 4=Married, living with man CSHP_MARITAL
9. How many years of school have you completed? ...	SCEDU	17. Have you ever had an STI? ... SCSTI
10. What is your occupation? ...	SCOCC	0=No CSHP_NOYES 1=Student 2=Trade/commerce 3=Professional 4=Domestic 5=Other → specify: SCSTIO Q17CODE1-Q17WORK
11. Have you ever been pregnant? ...	SCPRG	How many different men have you had vaginal sex with in the last 3 months?
12. Date last pregnancy ended	/ /	SC3MEN (Item SC3MEN was changed to a length of 4 in Clintrial production.)
13. Parity status	a. Pregnancies (total number) SCNPREG	18. If fewer than 3 times, participant is not eligible. Complete FINAL form after completing this form.
	b. Vaginal deliveries (including stillbirths) SCNVGDEL	19. How many of these men whom you had vaginal sex with in the last 3 months were new sexual partners? SC3NEW
14. Have you ever used a spermicide? ...	0=No SCSPERM 1=Yes CSHP_NOYES	(Item SC3NEW was changed to a length of 4 in Clintrial production.)
15. Current contraceptive use CSHP_NOYES (A-F)	(Answer 0=NO or 1=YES for each)	20. On average, how many times do you have vaginal sex in a week (7 days)?
	a. Oral. SCORAL	SCAVGSEX (Item SCAVGSEX was changed to a length of 3 in Clintrial production.)
	b. Injectables. SCINJ	If less than 3 times, participant is not eligible. Complete FINAL form after completing this form.
	c. IUD. SCIUD	21. How many times did you have vaginal sex in the last 7 days? SC7SEX
	d. Condom. SCCON	(Item SC7SEX was changed to a length of 3 in Clintrial production.)
	e. Female sterilization. SCFS	22. The last time you had vaginal sex, did you use a condom? SCCLT
	f. Other → Specify: SCOTH	0=No 1=Yes CSHP_NOYES
	Q15CODE1-Q15WORK	
16. Do you douche (wash inside your vagina)?		
Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____		
SCREENING FORM, CONRAD Study C03-0907/PHI Study 9645, Version 3.1, Revised 01 MAR 2006		

FSN

FORMTYPESCREEN

23. Have you had anal sex (penis in anus) or oral sex
(penis in mouth) in the past 30 days?.....|____|

- 0=No
- 1=Yes (anal)
- 2=Yes (oral) **CSHP_NYSEX**
- 3=Yes (both anal and oral)

SCANOR

Annexe 1.2: Fiche (questionnaire) pour la visite de recrutement

FSN	FORMTYPEENROL												
CONRAD CS Phase 3 Study													
Enrollment Form													
1. Study Number:	9 8 4 5 STUDY												
2. Center Number:	CN CSHP_CENTER												
3. Screening Number:	PN												
4. Date of Visit:	/ / CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE day month year												
5. ID # of person completing form:	ENID												
6. Has the participant signed the enrollment consent form?	ENCONSEN 0=No → STOP. Participant must be consented. CSHP_NOYES 1=Yes												
7. Randomization number	ENRANDOM												
<div style="text-align: right; color: black; font-weight: bold;">MASKED</div> <p>8. Color assignment ENCOLOR </p> <p>1=Blue 2=Orange CSHP_COLOR 3=Green 4=Yellow 5=Purple 6=Brown</p>													
9. Are you currently using any medications?.....	ENMED 0=No CSHP_NOYES 1=Yes → Complete CON Form(s) for each medication. Specify FSN(s) of CON Form(s): ENCTFSNO _____												
10. IN THE LAST 30 DAYS, with how many different men have you had vaginal sex?	EN30MEN												
11. Do you have a primary partner?.....	ENPRIMPT 0=No CSHP_NOYES 1=Yes												
Complete the following with regard to VAGINAL sex acts. Enter '00' where applicable.													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="background-color: #e0e0e0;">In the past 7 days: How many</th> <th style="background-color: #e0e0e0;">With Primary Partner</th> <th style="background-color: #e0e0e0;">With Other Partners</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>12. Vaginal sex acts</td> <td>EN7SEXP </td> <td>EN7SEXO </td> </tr> <tr> <td>13. Vaginal sex acts using a new condom</td> <td>EN7CONP </td> <td>EN7CONO </td> </tr> </tbody> </table>		In the past 7 days: How many	With Primary Partner	With Other Partners	12. Vaginal sex acts	EN7SEXP	EN7SEXO	13. Vaginal sex acts using a new condom	EN7CONP	EN7CONO			
In the past 7 days: How many	With Primary Partner	With Other Partners											
12. Vaginal sex acts	EN7SEXP	EN7SEXO											
13. Vaginal sex acts using a new condom	EN7CONP	EN7CONO											
(Items EN7SEXP, EN7SEXO, EN7CONP and EN7CONO were expanded in Clinical Production area to a length of 3.)													
Complete the following with regard to ANAL and ORAL sex. Enter 0=No or 1=Yes in each box.													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="background-color: #e0e0e0;">In the past 30 days: did you ever have</th> <th style="background-color: #e0e0e0;">With Primary Partner</th> <th style="background-color: #e0e0e0;">With Other Partners</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>14. Anal sex</td> <td>EN30ASXP </td> <td>EN30ASXO </td> </tr> <tr> <td>15. Anal sex without using a new condom</td> <td>EN30ACNP </td> <td>EN30ACNO </td> </tr> <tr> <td>16. Oral sex</td> <td>EN30OSXP </td> <td>EN30OSXO </td> </tr> </tbody> </table>		In the past 30 days: did you ever have	With Primary Partner	With Other Partners	14. Anal sex	EN30ASXP	EN30ASXO	15. Anal sex without using a new condom	EN30ACNP	EN30ACNO	16. Oral sex	EN30OSXP	EN30OSXO
In the past 30 days: did you ever have	With Primary Partner	With Other Partners											
14. Anal sex	EN30ASXP	EN30ASXO											
15. Anal sex without using a new condom	EN30ACNP	EN30ACNO											
16. Oral sex	EN30OSXP	EN30OSXO											
Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____													

FSN

FORMTYPEENROL

17. Oral sex without using a new condom	EN30OCNP __	EN30OCNO __
	CSHP_NOYES (14-17)	CSHP_NOYES (14-17)

<i>Initials of person completing form:</i> _____	<i>Date (dd/mm/yy):</i> _____
--	-------------------------------

Annexe 1.3 : Fiche de vérification des critères d'éligibilité pour l'essai clinique

* Refer to Protocol or Study Manual for definitions of Relatedness

FORMTYPEIE

CONRAD CS Phase 3 Study

Eligibility Criteria

1. Study Number: | 9 | 8 | 4 | 5 | STUDY
2. Center Number: | | | | | CN CSHP_CENTER
3. Screening Number: | | | | | PN
4. Date of visit: | | | / | | | / | | | | | CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
 day month year
5. ID # of person completing form: | | | IEID

Instructions: Answer each question with 0=NO or 1=YES

CSHP_NOYES (6-16)

INCLUSION CRITERIA

6. Signed enrollment consent form... IECONSEN | |
7. Age 18 years or older.. IEAGE| |
8. HIV negative.. IEHIV| |
9. Has an average of at least three vaginal sex acts per week, had at least three different male partners in the last 3 months, and expects to continue this behavior for the duration of the study IESEX| |
10. Willing to participate in the study as required by the protocol.. IEPART| |

EXCLUSION CRITERIA

11. Pregnant or anticipates a desire for pregnancy during period of study participation. IEPREG| |
12. History of adverse reaction to spermicides or products containing latex. IESENS| |
13. Known intravenous drug abuser. IEDRUG| |
14. Participating in another clinical trial. IEPTOTH.....| |
15. Prior participation in this study. IEPRIOR| |
16. Any condition which, in the opinion of the investigator, would make study participation unsafe or would complicate data interpretation. IEUNSAFE| |

If any of items 6-10 are answered "no" then complete a FINAL form and do not enroll the participant.

If any of items 11-16 are answered "yes" then complete a FINAL form and do not enroll the participant.

Initials of person completing form: _____	Date (dd/mm/yyyy): _____
---	--------------------------

Annexe 1.4: Fiche (questionnaire) pour les visites de suivi

* Refer to Protocol or Study Manual for definitions of Relatedness

FORMTYPEFU

CONRAD CS Phase 3 Study

Follow-up Visit

1. Study Number: | 9 | | 8 | | 4 | | 5 | STUDY
2. Center Number: | | | | | | CN CSHP_CENTER
3. Screening Number: | | | | | | PN
4. Date of Visit: | | | | / | | | | / | | | | | | CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
day month year
5. ID # of person completing form: | | | | FUID
6. Follow-up visit (01-12) FUVNUM| | |
7. Has participant experienced a new medical problem or worsening of an existing problem since last visit?... FUMEDPRB| | |
0=No CSHP_NOYES
1=Yes → Specify FSN(s) of completed AE Form(s): FUAEFSNO
8. Has participant experienced any genital bleeding other than menses since the last visit?| | |
0=No CSHP_NOYES FUGB
1=Yes → Complete AE and IMB Forms.
FSN(s) of AE Form(s): FUGBFSNO
FSN(s) of IMB Form(s): FUIMFSNO
9. Has participant used any intravaginal products other than study product since last visit? FUINVAG| | |
0=No CSHP_NOYES CSHP_NOYES (A-E)
1=Yes → Read each answer choice to participant and answer each item with 0=No or 1=Yes
a. Other spermicide. FUOSPRM| | |
b. Non-study condom. FUNSCON| | |
c. Tampons. FUTAMP| | |
d. Douche. FUDOUCHE| | |
e. Other → Specify: FUOTHO ___FUOTH | | |
Q9CODE1-Q9WORK
10. Has participant taken any new medications since her last visit?..... FUMED| | |
0=No CSHP_NOYES
1=Yes → Specify FSN(s) of completed CON Form(s): FUCTFSNO
11. Has participant had problems using the gel since her last visit?.. FUPGL| | |
0=No CSHP_NOYES
1=Yes → Specify: FUPGLO
Q11CODE1-Q11WORK
If the problems were adverse events, please ensure item 7 is correct.
12. How many different men has the participant FU7MEN had vaginal sex with in the last 7 days? | | | |
(Item FU7MEN was changed to 3 in length in production.)
13. Participant status FUPDISP CSHP_PTSTAT....| | |
1=Continue to next scheduled follow-up visit
2=Discontinued at this visit → Complete FINAL form

Complete the following with regard to VAGINAL sex acts. Enter '00' where applicable.

In the past 7 days: How many	With Primary Partner	With Other Partners
14. Vaginal sex acts	FU7SEXP	FU7SEXO
15. Vaginal sex acts using a new study gel, but no new condom	FU7GLP	FU7GLO
16. Vaginal sex acts using a new condom, but no new study gel	FU7CONP	FU7CONO
17. Vaginal sex acts using both a new study gel and new condom	FU7GLCNP	FU7GLCNO

(Items FU7SEXP, FU7SEXO, FU7GLP, FU7GLO, FU7CONP, FU7CONO, FU7GLCNP, FU7GLCNO were changed to 3 in length in production.)

Complete the following with regard to ANAL and ORAL sex. Enter 0=No or 1=Yes in each box.

In the past 30 days: Did you ever have	With Primary Partner	With Other Partners
18. Anal sex	FU30ASXP	FU30ASXO
19. Anal sex without using a new condom	FU30ACNP	FU30ACNO
20. Oral sex	FU30OSXP	FU30OSXO
21. Oral sex without using a new condom	FU30OCNP	FU30OCNO

CSHP_NOYES (18-21)

CSHP_NOYES (18-21)

Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____

Annexe 1.5: Fiche pour les antécédents médicaux récents

FSN

FORMTYPEMEDHIST

CONRAD CS Phase 3 Study

Recent Medical History

1. Study Number: | 9 | | 8 | | 4 | | 5 | STUDY
2. Center Number: | | | | | | | | CN CSHP_CENTER
3. Screening Number: | | | | | | | | PN
4. Date of Visit: | | | | / | | | | / | | | | | | | | CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
day month year
5. ID # of person completing form: | | | | MHID

Respond to items 6-12 with reference to the past 12 months.

6. Has participant had any allergies? MHALLER | | | |
 0=No
 1=Yes → Specify: _____ MHALLERO _____
 _____ Q6CODE1-Q6WORK _____

If allergic to spermicide or latex, do NOT enroll and complete FINAL form.

7. Has participant had any dermatological problems?..... MHDERM | | | |
 0=No
 1=Yes → Specify: _____ MHDERMO _____
 _____ Q7CODE1-Q7WORK _____

8. Has participant had any episodes of vulvar dermatitis?..... MHVULV | | | |
 0=No
 1=Yes

9. Has participant had any UTIs?... MHUTI..... | | | |
 0=No → Skip to item 11
 1=Yes

10. Number of UTIs ... MHNUTI | | | |

11. Has participant had any other urological problems?..... MHUROL | | | |
 0=No
 1=Yes → Specify: _____ MHUROLO _____
 _____ Q11CODE1-Q11WORK _____

CSHP_NOYES (6-9, 11-15)

12. Has participant had any gynecological problems?..... MHGYNP | | | |
 0=No
 1=Yes → Specify: _____ MHGYNPO _____
 _____ Q12CODE1-Q12WORK _____

13. Has participant had a **history** of irregular menses? MHIRREG | | | |
 0=No
 1=Yes → Specify: _____ MHIRREGO _____
 _____ Q13CODE1-Q13WORK _____

14. Has participant **ever** had any reproductive tract surgery, including tubal sterilization?.... | | | |
 0=No MHRTS
 1=Yes → Specify: _____ MHRTSO _____
 _____ Q14CODE1-Q14WORK _____

15. **In the past 6 months**, has participant had any STIs?..... MH6STI | | | |
 0=No
 1=Yes → Specify STIs: _____ MH6STIO _____
 _____ Q15CODE1-Q15WORK _____

Initials of person completing form: _____

Date (dd/mm/yy): _____

Annexe 1.6: Fiche pour l'examen clinique

FSN

FORMTYPEEXAM

CONRAD CS Phase 3 Study

Exam Form

1. Study Number: STUDY
2. Center Number: CN CSHP_CENTER
3. Screening Number: PN
4. Date of Visit: / / CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
day month year
5. ID # of person completing form: EXID
6. Visit type..... EXVTYP
 - 1=Screening CSHP_VISIT
 - 2=Enrollment
 - 3=Follow-up → Specify month (01-12)..... EXFUVNM
 - 4=Unscheduled → Specify reason: EXVTYPO Q6CODE1-Q6WORK_
7. Urine pregnancy test..... EXPGTEST CSHP_PNND
 - 1=Positive → If already enrolled, specify FSN of PIF Form: EXPFFSNO
 - 2=Negative
 - 9=Not done → If scr, enr or a regular follow-up, specify reason: EXPGTESO Q7CODE1-Q7WORK_
8. Vaginal Ph..... EXPH
9. Trichomoniasis..... EXTRIC CSHP_PNND
 - 1=Positive → If already enrolled, specify FSN of AE Form: EXA1FSNO
 - 2=Negative
 - 9=Not done → If visit scr, enr or visit 3, 6, 9 or 12, specify reason: EXTRICO Q9CODE1-Q9WORK_
10. Candidiasis..... EXCAND CSHP_PNND
 - 1=Positive → If already enrolled, specify FSN of AE Form: EXA2FSNO
 - 2=Negative
 - 9=Not done → If visit scr, enr or visit 3, 6, 9 or 12, specify reason: EXCANDO Q10CODE1-Q10WORK_
11. Pelvic exam performed at this visit..... EXPELV
 - 1=Yes → Complete table below CSHP_NOYES
 - 0=No → If scr, enr or visit 3, 6, 9 or 12, specify reason and skip to initials: EXPELVO Q11CODE1-Q11WORK_

Site	Response*	If Abnormal, specify abnormality (and side, if appropriate)
12. Vulva EXVULV	<input type="text"/>	EXVULVO Q12CODE1-Q12WORK
13. Vagina EXVAG	<input type="text"/>	EXVAGO Q13CODE1-Q13WORK
14. Cervix EXCERV	<input type="text"/>	EXCERVO Q14CODE1-Q14WORK
15. Uterus EXUTER	<input type="text"/>	EXUTERO Q15CODE1-Q15WORK
16. Adnexa EXADNE	<input type="text"/>	EXADNEO Q16CODE1-Q16WORK
17. If other site → Specify: EX17O Q17SCOD1-Q17SWORK EXOTH17 <input type="text"/>		EXOTH17O Q17CODE1-Q17WORK
18. If other site → Specify: EX18O Q18SCOD1-Q18SWORK EXOTH18 <input type="text"/>		EXOTH18O Q18CODE1-Q18WORK

* 1=Normal, 2=Abnormal, 3=Not applicable, or 9=Not done. Leave 17 and 18 blank if no "other" sites.

Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____

CSHP_RESPONSE (12-18)

Annexe 1.7: Fiche pour les examens de laboratoire (prélèvements génitaux)

FSN

FORMTYPELAB

CONRAD CS Phase 3 Study

Laboratory Tests Form

1. Study Number: | 9 | 8 | 4 | 5 | STUDY
2. Center Number: | | | | | | | | CN CSHP_CENTER
3. Screening Number: | | | | | | | | PN
4. Visit Date: | | | | / | | | | / | | | | | | | | CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
day month year
5. ID # of person completing form: | | | | LABID
6. Visit type..... LABVTYP| | | |
 1=Screening CSHP_VISIT
 2=Enrollment
 3=Follow-up visit number → Specify | | | | If visit 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 or 11, specify reason → LABFUVNM
 _____ Q63CODE1-Q63WORK LABVTYPO _____
- 4=Unscheduled → Specify reason: _____ Q64CODE1-Q64WORK LABUVO _____
7. Gram Stain specimen collected at this visit LABGRAM| | | |
 0=No → If visit 3, 6, 9 or 12, specify reason: _ Q7CODE1-Q7WORK LABGRAMO _____
 1=Yes
 2=Inadequate specimen CSHP_NYIS
 If no specimen or inadequate specimen, skip to item 9
8. Nugent Score (See Protocol for definitions)..... LABNUG| | | |
9. Gonorrhea test result..... LABGON| | | |
 1=Positive → Give treatment. If already enrolled, specify FSN of CON Form: | | | | | | | |
 2=Negative CSHP_PNIN LABGFSNO
 3=Inhibition
 9=Not done → If visit 3, 6, 9 or 12, specify reason: _ Q9CODE1-Q9WORK LABGONO _____
10. Chlamydia test result..... LABCHLAM| | | |
 1=Positive → Give treatment. If already enrolled, specify FSN of CON Form: | | | | | | | |
 2=Negative CSHP_PNIN LABCFNSO
 3=Inhibition
 9=Not done → If visit 3, 6, 9 or 12, specify reason: _ Q10CODE1-Q10WORK LABCHLAO _____

Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____

Annexe 1.8: Fiche pour examens de laboratoire (prélèvements sanguins)

* Refer to Protocol or Study Manual for definitions of Relatedness

FORMTYPEBLOOD

CONRAD CS Phase 3 Study

Blood Tests Form

1. Study Number: | 9 | | 8 | | 4 | | 5 | STUDY
2. Center Number: | | | | | | | | CN CSHP_CENTER
3. Screening Number: | | | | | | | | PN
4. Sample date | | | | / | | | | / | | | | / | | | | | CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE
day month year
5. ID # of person completing form: | | | | | BLID
6. Visit type*... BLVTYP | | | |
1=Screening CSHP_VISIT
2=Enrollment BLFUVNM
3=Follow-up number → Specify: | | | |
If visit 2, 4, 5, 7, 8, 10 or 11 specify reason:
BLVTYP30_Q63CODE1-Q63WORK _____
4=Unscheduled test visit → Specify reason:
BLVTYP40_Q64CODE1-Q64WORK _____
7. Specimen for syphilis test collected and analyzed... BLSYPH | | | |
1=Yes CSHP_NOYES
0=No → Skip to item 10. If screening visit, specify reason: BLSYPHO
_____ Q7CODE1-Q7WORK _____
8. RPR Syphilis test result.. BLRPR | | | |
1=Positive 2=Negative CSHP_PNI (Restricted)
9. TPPA Syphilis test result.. BLTPPA .. | | | |
CSHP_PNND
1=Positive 2=Negative 9=Not done
10. HIV sample collected and analyzed BLHIV. | | | |
1=Yes CSHP_NOYES
0=No → If visit 1, 3, 6, 9 or 12, specify reason and skip to initials: BLHIVO Q10CODE1-Q10WORK_ _____
If this is Screening or Enrollment, answer item 11 and then skip to initials. Otherwise skip to item 12.
11. Screening or Enrollment HIV result.. BLSEHIV | | | |
1=Positive → Do NOT enroll, complete FINAL form
2=Negative CSHP_PNI
3=Indeterminate
12. Determine rapid test... BLRAPID | | | |
1=Positive 2=Negative 3=Not valid
CSHP_PNNV
13. SD Bioline rapid test..... BLSDBRT | | | |
1=Positive (HIV-1) 4=Negative
2=Positive (HIV-2) 5=Not valid
3=Positive (HIV) 9=Not done
CSHP_PONNVND
14. Unigold rapid test... BLUNIRT | | | |
1=Positive
2=Negative CSHP_PNNVND
3=Not valid
9=Not done
15. Final result of initial rapid testing BLFRIRT ... | | | |
1=Positive 2=Negative CSHP_PNI (Restricted)
If result is Negative, skip to initials
16. Confirmatory sample collected and analyzed | | | |
CSHP_NOYES BLCONF
1=Yes → Specify date sample was collected:
| | | | / | | | | / | | | | / | | | |
BLCONDAY BLCONMTH BLCONYR BLCONDAT
day month year
0=No → Specify reason and skip to initials:
BLCONFO Q16CODE1-Q16WORK _____
17. Confirmatory Determine rapid test. BLCDRT .. | | | |
1=Positive 2=Negative 3=Not valid CSHP_PNNV
18. Confirmatory SD Bioline rapid test.. BLCSDBRT | | | |
1=Positive (HIV-1) 4=Negative
2=Positive (HIV-2) 5=Not valid
3=Positive (HIV) 9=Not done
CSHP_PONNVND
19. Confirmatory Unigold rapid test.. BLCURT | | | |
1=Positive
2=Negative CSHP_PNNVND
3=Not valid
9=Not done
20. Final result of confirmatory rapid testing** BLFRRT | | | |
1=Positive 2=Negative CSHP_PNI (Restricted)
If not positive, report discrepancy to CONRAD

* If this is the final visit, make sure that a sample for HIV PCR is obtained.

** If month 1 or month 3 rapid test result is confirmed positive, have enrollment sample analyzed for HIV with PCR.

Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____

Annexe 1.9: Fiche pour traitement concomitant

FSN	FORMTYPECON
CONRAD CS Phase 3 Study	
Concomitant Therapy	
1. Study Number:	9 8 4 5 STUDY
2. Center Number:	CN CSHP_CENTER
3. Screening Number:	PN
4. Date of Visit:	/ / CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE day month year
5. ID # of person completing form:	CTID
6. FSN of form reporting this therapy:	CTFSN
7. Describe therapy that was administered:	CTTHERO ___ Q7CODE1-Q7WORK _____ _____ _____
If therapy was NOT a medication, skip to item 10	
8. If therapy was a medication, what was the route of administration?.....	CTMED
01=Intravenous	07=Inhalation
02=Intramuscular	08=Ocular
03=Oral	09=Transdermal
04=Rectal	10=Topical
05=Vaginal	11=Subcutaneous
06=Nasal	12=Other → Specify Q8CODE1-Q8WORK ___ CTMEDO
9. Average daily dose taken (including units):	_____ CTDOSEO
10. Reason for therapy	CTREAS
1=Adverse Event(s), including STIs <u>other</u> than NG, CT or HIV	CSHP_REAS
2=Pre-existing condition → Specify:	CTREPEO _____ Q102COD1-Q102WORK _____
3=Preventative therapy → Specify:	CTREPTO _____ Q103COD1-Q103WORK _____
4=Treatment for NG, CT, or HIV	
11. Date therapy started.....	/ / CTSTDAY CTSTMTH CTSTYEAR CTSTDATE day month year
Or code '1' in this box if therapy was ongoing when participant entered the study.....	CTONIN
12. Date therapy ended.....	/ / CTSPDAY CTSPMTH CTSPYEAR CTSPDATE day month year
Or code '1' in this box if therapy will continue throughout the study.....	CTONEX
	CSHP_CTONEX
Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____	

Annexe 1.10: Fiche pour la visite finale

FSN	FORMTYPEFINAL
CONRAD CS Phase 3 Study	
Final Status	
1. Study Number:	_9_ _8_ _4_ _5_ STUDY
2. Center Number:	_ _ _ _ _ _ _ _ _ CN CSHP_CENTER
3. Screening Number:	_ _ _ _ _ _ _ _ _ PN
4. Discontinuation Date:	_ _ _ _ / _ _ _ _ / _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ CONDAY CONMTH CONYEAR CONDATE <small>day month year</small>
5. ID # of person completing form:	_ _ _ _ _ _ _ _ _ FIID
6. Final status.....	FISTAT _ _ _ _ _ _ _ _ _
1=Not enrolled → Specify reason and skip to Investigator's Statement:	_____ FISTATO _____ _____ Q6CODE1-Q6WORK _____
2=Discontinued before final scheduled follow-up visit	CSHP_STATUS
3=Lost to follow-up → Skip to Investigator's Statement	
4=Completed final scheduled follow-up visit → Skip to item 8	
7. Reason for early discontinuation.....	FIDISC CSHP_DISC _ _ _ _ _ _ _ _ _
1=Protocol deviation → Specify:	_____ FIDIPVO ___ Q71CODE1-Q71WORK _____
2=Medical reason, not related to study product → Specify reason, complete AE form and specify FSN of AE form	_____ FID2MRRO ___ Q72CODE1-Q72WORK _____ FAE2FSNO AE FSN _ _ _ _ _ _ _ _ _
3=Medical reason, related to study product → Specify reason, complete AE form and specify FSN of AE form	_____ FID1MRRO ___ Q73CODE1-Q73WORK _____ FAE3FSNO AE FSN _ _ _ _ _ _ _ _ _
4=Participant request following HIV seroconversion	
5=Participant request, not related to study product and/or procedures → Specify:	___ FID5PRO _____ _____ Q75CODE1-Q75WORK _____
6=Participant request, related to study product and/or procedures → Specify:	___ FIDIPRO _____ _____ Q76CODE1-Q76WORK _____
7=Other → Specify:	_____ FIDISCO _____ _____ Q77CODE1-Q77WORK _____
8. Post-discontinuation visit required.....	FIPOSTFU CSHP_NOYES _ _ _ _ _ _ _ _ _
0=No → Skip to Investigator's Statement	
1=Yes → Specify reason:	_____ FIPDVO ___ Q8CODE1-Q8WORK _____
9. Scheduled date of post-discontinuation visit.....	_ _ _ _ _ / _ _ _ _ _ / _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ FIDAY FIMTH FIYEAR FIDATE <small>day month year</small>
INVESTIGATOR'S STATEMENT	
I have reviewed all data contained on the data collection forms for this participant and have verified that the contents are consistent with observations and source records. They accurately reflect the condition of the subject before, during, and at the completion of the study.	
___ CSHP_NOYES ___ FISIGN _____	_ _ _ _ _ / _ _ _ _ _ / _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ <small>day month year</small>
Principal Investigator (or designee) Signature	
Initials of person completing form: _____ Date (dd/mm/yyyy): _____	

Annexe 2: Les documents de réglementation éthique:

Annexe 2.1 : Approbation du comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School (Office of Research)



EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL
OFFICE OF RESEARCH
FAIRFAX HALL, SUITE 510-512
721 FAIRFAX AVENUE
NORFOLK, VIRGINIA 23507-2000

TELEPHONE (757) 446-8480
FAX (757) 446-8449

April 7, 2005

RE: IRB # 04-09-FB-0206

Principal Investigator: Lut Van Damme, M.D., M.Sc., Ph.D.

This form provides additional information to the "Amendment Assessment by the investigator" form that accompanies this letter. The amendment assessment is the official document that confirms IRB review and type of approval and includes the IRB#, study title, summary of the changes, IRB stamp that includes approval and expiration dates, and an appropriate chair, vice-chair or IRB member signature.

- Protocol Identifier: FINAL v1.1 Protocol #C03-090, Dated March 18, 2005 Date Submitted: March 28, 2005
- Consent Forms: Model Screening Informed Consent Form, FINAL v1.1 Dated: March 18, 2005
Model Enrollment and Specimen Storage Consent Form, FINAL v1.1 Dated: March 18, 2005
- This approval was signed by the Chair of the First Thursday Board on April 5, 2005.
- Please remember that prompt reporting to the IRB of proposed changes in a research activity (e.g., changes to the protocol, consent form(s), advertisements, or other study-related material) is required. In addition, the changes must be reviewed and approved by an EVMS IRB before the changes can be initiated except when necessary to eliminate apparent immediate hazards to the subject.*

Eastern Virginia Medical School (EVMS) has a Federal wide Assurance (FWA 00003956) from OHRP. The Human Research Review Boards (IRB 0000460 and IRB 0001345) are registered with OHRP and are in compliance with 45 CFR 46, 21 CFR 50, and 21 CFR 56.

Please reference the IRB number, principal investigator and study title in any correspondence regarding this protocol.

Thank you for your continued cooperation with the Institutional Review Board.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "Betsy C. Conner".

Betsy C. Conner, CIP
IRB Manager

Annexe 2.2: Première réapprobation du comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School (Office of Research)



EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL
POST OFFICE BOX 1980
NORFOLK, VIRGINIA 23501-1980

TELEPHONE (757) 446-5600

September 20, 2005

RE: IRB # 04-09-FB-0206

Principal Investigator: Lut Van Damme, M.D.



This form provides additional information to the "Continuing Review or Notification of Closure Form" that accompanies this letter. The continuing review form is the official document that confirms IRB review and type of approval and includes the IRB#, study title, IRB stamp that includes approval and expiration dates, and an appropriate chair, vice-chair or IRB member signature.

- Completed Continuing Review Form
- Consent Form: Screening Consent, Version 4.0 Dated: September 12, 2005
Enrollment and Specimen Storage Consent, Version 4 Dated: September 12, 2005
- You have satisfied the Human Subjects Protection and EVMS HIPAA Investigator Training requirements.
 You have completed an Investigator Assurance
- This Continuing Review was reviewed at the **convened Board** meeting on **September 1, 2005**.
- This approval was signed by the Chair of the First Thursday Board on **September 15, 2005**.
- Please remember that prompt reporting to the IRB of proposed changes in a research activity (e.g., changes to the protocol, consent form(s), advertisements, or other study-related material) is required. In addition, the changes must be reviewed and approved by an EVMS IRB before the changes can be initiated *except* when necessary to eliminate apparent immediate hazards to the subject.

Eastern Virginia Medical School (EVMS) has a Federalwide Assurance (FWA 00003956) from OHRP. The Human Research Review Boards (IRB 00000460 and IRB 00001345) are registered with OHRP and are in compliance with 45 CFR 46, 21 CFR 50, and 21 CFR 56.

Please reference the IRB number, principal investigator and study title in any correspondence regarding this protocol.

Thank you for your continued cooperation with the Institutional Review Board.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Betsy C. Connor".

Betsy C. Connor, CIP
IRB Manager

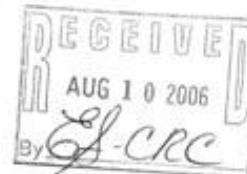
BC/bd
083106

Annexe 2.3: Deuxième réapprobation du comité d'éthique de Eastern Virginia Medical School (Office of Research)

**EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL
OFFICE OF RESEARCH SUBJECTS PROTECTIONS
INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
AND
INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE**

August 8, 2006

Lut Van Damme, M.D., Ph.D.
c/o Suzanne Murphy, MPH
CONRAD
1611 North Kent Street, Suite 806
Arlington VA 22209



RE: IRB # 04-09-FB-0206

Principal Investigator: Lut Van Damme, M.D., Ph.D.

This form provides additional information to the "Continuing Review or Notification of Closure Form" that accompanies this letter. The continuing review form is the official document that confirms IRB review and type of approval and includes the IRB#, study title, IRB stamp that includes approval and expiration dates, and an appropriate chair, vice-chair or IRB member signature.

- Completed Continuing Review Form
- Consent Form: Screening Consent, Version 5.0 Dated: March, 2006
Enrollment and Specimen Storage Consent, Version 5.0 Dated: March, 2006

Please remember that a signed written consent form is not a substitute for discussion but should be an educational process including a full explanation of the study while allowing time for questions prior to signing. The subject's signature is considered verification of the investigator's explanation of the research prior to, not after, initiation of the research. Also, all changes, including the use of additional subjects, require IRB approval before initiation.

- This Continuing Review was reviewed at the convened Board meeting on August 3, 2006.
- Your protocol expiration date is August 2, 2007. Continuing review reports are due 60 days prior to protocol expiration.
- Please remember that prompt reporting to the IRB of proposed changes in a research activity (e.g., changes to the protocol, consent form(s), advertisements, or other study-related material) is required. In addition, the changes must be reviewed and approved by an EVMS IRB before the changes can be initiated except when necessary to eliminate apparent immediate hazards to the subject.

Eastern Virginia Medical School (EVMS) has a Federalwide Assurance (FWA 00003956) from OHRP. The Human Research Review Boards (IRB 00000460 and IRB 00001345) are registered with OHRP and are in compliance with 45 CFR 46, 21 CFR 50, and 21 CFR 56.

Please reference the IRB number, principal investigator and study title in any correspondence regarding this protocol.

Thank you for your continued cooperation with the Institutional Review Board.

Sincerely,


Betsy C. Conner, CIP
IRB Manager

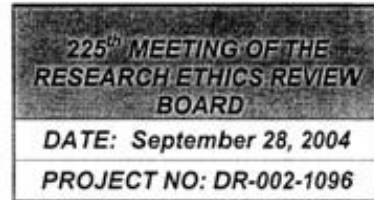
BCC/bd

721 FAIRFAX AVENUE, SUITE 512
POST OFFICE BOX 1980 NORFOLK, VA 23501-1980
TELEPHONE: (757) 446-8423 FAX: (757) 624-2275
IRB-INFO@EVMS.EDU and IACUC@EVMS.EDU

Annexe 2.4: Approbation du comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec



Hôpital du Saint-Sacrement



APPROVAL OF A RESEARCH PROJECT

Centres hospitaliers de soins
généralistes, spécialisés
et ultra-spécialisés

Hôpital du Saint-Sacrement
1050, chemin Sainte-Foy
Québec G1S 4L8
(418) 682-7511

Hôpital de l'Enfant-Jésus
1401, 18^e Rue
Québec G1J 1Z4
(418) 649-0252

Investigators : Dr. Michel Alary et al.

DR-002-1096

Project : Randomized controlled trial of 6% cellulose sulfate gel and the effect on vaginal HIV transmission (Protocol C03-090)

After careful examination of all the information submitted, the Research Ethics Review Board - Hôpital du Saint-Sacrement du CHA - has approved the above-mentioned research project (Protocol version 1.0 dated May 17, 2004) for all the Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec. This research project is approved until **September 30, 2005**.

The Research Ethics Review Board must be notified of any modification to this project or any additional information acquired involving patient selection, means of obtaining informed consent or treatment-related risk occurring beyond the date of this approval. The Board will then reassess the project and give new approval before these changes are implemented. Furthermore, any serious adverse event that occurs either at our location or in another participating centre must be immediately reported in writing to the President of this Ethics Review Board. The investigator must also provide a personal assessment of the event stating if, in his opinion, this event is treatment-related, this is a new and up-to-now unknown risk, if participating subjects should be informed of accrued risk and if an amendment to the informed consent form is necessary for future recruitment.

The original consent form signed by the patient must be kept in the investigator's files, and one copy given to the participant.

The membership of Research Ethics Review Board complies with the membership requirements defined in the Food and Drug Regulations (Division 5) and carries out its functions in a manner consistent with *Good Clinical Practice*.

Approved full board with a majority of REB members present at the time of the meeting.

François Pouliot, president ad interim

Andrée Béland, registered nurse
Véronique Moulin, Ph.D., LOEX
André Tourigny, M.D.
René-Michel Tremblay, gastro-enterologist

Jacques Côté, lay representative
Hélène Otis, M.D., physician
Geneviève Tremblay, pharmacist
Thomas van Lier, lay representative

Marie Leblanc, lawyer
François Pouliot, ethicist,
president ad interim
Sylvie Villeneuve, pharmacist

Annexe 2.5 : Approbation du comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec pour un amendement au projet de recherche



Hôpital du Saint-Sacrement

233rd MEETING OF THE
RESEARCH ETHICS REVIEW
BOARD
DATE: May 17, 2005
PROJECT NO: DR-002-1096

**APPROVAL OF AN AMENDMENT
TO A RESEARCH PROJECT**

Centres hospitaliers de soins
généralistes, spécialistes
et ultra-spécialistes

Hôpital du Saint-Sacrement
100, chemin Sainte-Foy
Québec G1S 4L8
(418) 682-7511

Hôpital de l'Enfant-Jésus
1401, 1^{er} Rue
Québec G1J 1Z4
(418) 649-0252

Investigators : Dr. Michel Alary et al.

DR-002-1096

Project : Randomized controlled trial of 6% cellulose sulfate gel and the effect on vaginal HIV transmission (Protocol C03-090)

After careful examination of all the information submitted, the Research Ethics Review Board - Hôpital du Saint-Sacrement du CHA - approves the amendment to the above-mentioned research project in your correspondence dated May 13, 2005 (Protocol version 1.1 dated March 18, 2005; consent form by the resolution 2005HSS-233-20). This modified research project is approved by the Board until its normal annual reapproval date.

The Research Ethics Review Board must be notified of any modification to this project or any additional information acquired involving patient selection, means of obtaining informed consent or treatment-related risk occurring beyond the date of this approval. The Board will then reassess the project and give new approval before these changes are implemented. Furthermore, any serious adverse event that occurs either at our location or in another participating centre must be immediately reported in writing to the President of this Ethics Review Board. The investigator must also provide a personal assessment of the event stating if, in his opinion, this event is treatment-related, this is a new and up-to-now unknown risk, if participating subjects should be informed of accrued risk and if an amendment to the informed consent is necessary for future recruitment.

The original consent form signed by the patient should be kept in the investigator's files, and one copy given to the participant.

The membership of Research Ethics Review Board complies with the membership requirements defined in the Food and Drug Regulations (Division 5) and carries out its functions in a manner consistent with *Good Clinical Practice*.

Approved full board with a majority of REB members present at the time of the meeting.

François Pouliot, Chair

Andrée Béland, registred nurse
Marie Leblanc, lawyer
François Pouliot, ethicist, president

Jacques Côté, lay representative
Véronique Moulin, Ph.D, LOEX
Jean Roulier, lay representative
René-Michel Tremblay, MD gastro-enterologist

Chantal Gagnon, pharmacist
Hélène Otis, MD, physician
André Tourigny, MD
Sylvie Villeneuve, pharmacist

Annexe 2.6 : Première réapprobation du comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec



Hôpital du Saint-Sacrement

ANNUAL REAPPROVAL OF A RESEARCH PROJECT

Investigators : Dr. Michel Alary et al.

DR-002-1096

Centres hospitaliers de soins
généralistes, spécialisés
et adhésopécialisés

Hôpital du Saint-Sacrement

1050, chemin Sainte-Foy
Québec G1S 4L3
(418) 682-7511

Project : Randomized controlled trial of 6% cellulose sulfate gel and the effect on vaginal HIV transmission (Protocol C03-090)

After careful examination of all the information submitted, the Research Ethics Review Board – Hôpital Saint-Sacrement – has reapproved the above-mentioned research project for one year.

Hôpital de l'Enfant-Jésus

5451, 10^e Rue
Québec G1J 1C4
(418) 682-0252

As a reminder, the Research Ethics Review Board must be notified of any modification to this project or any additional information acquired involving patient selection, means of obtaining informed consent or treatment-related risk occurring beyond the date of this approval. The Board must reassess the project and give its approval before these changes are implemented. Furthermore, the Research Ethics Review Board must be notified within 48 working hours of any serious adverse event that could have a causal relationship with the study medication, that occurred in a research project approved by the Research Ethics Review Board and involving participants recruited in our establishment. The investigator must also provide a personal assessment of the event stating if, in his opinion, this event is treatment-related, this is a new and up-to-now unknown risk, if participating subjects should be informed of accrued risk and if an amendment to the informed consent form is necessary for future recruitment. Finally, the Research Ethics Review Board must be informed of the enrolment completion date for the above mentioned project.

Research Ethics
Review Board

Biomedical Scientific Expertise

André Béland, B.Sc. M.D.
Charlène Gagnon, B.Pharm. M.Sc.
Véronique Madin, Ph.D.
Yolaine Ode, M.D.
André Turgeon, M.D.
Rena-Michèle Tremblay, M.D.
Sylvie Villeneuve, B.Pharm. D.Ph.

A copy of the patient information and consent form carrying the approval stamp of the Research Ethics Review Board must be used when recruiting the participants. The original consent form signed by the patient must be kept in the investigator's files, and one copy given to the participant.

Legal Expertise

Marie-Liesse, LL.B.

Ethics Expertise

François Pouliot, M.D. Ph.D.

Community Representative

Jacques Gibe
Jean Poulin

The membership of Research Ethics Review Board complies with the membership requirements defined in the Food and Drug Regulations (Division 5) and carries out its functions in a manner consistent with Good Clinical Practice.

This research project has been reapproved until **September 30, 2006** full board at the 235th regular meeting held September 20, 2005 with a majority of REB members present at the time of the meeting.

François Pouliot, president

Annexe 2.7 : Deuxième réapprobation du comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec en français



Hôpital du Saint-Sacrement

RÉAPPROBATION ANNUELLE D'UN PROJET DE RECHERCHE

Chercheurs : *Dr Michel Alary et al.*

DR-002-1096

Projet : *Essai randomisé contrôlé de l'effet du gel de sulfate de cellulose 6% sur la transmission vaginale du VIH – Site du Bénin. (Protocole C03-090)*

Centres hospitaliers de soins
généralistes, spécialistes
et ultraspécialisés

Hôpital du Saint-Sacrement
150, chemin Sainte-Foy
Québec G1S 4L8
(418) 683-7511

Hôpital de l'Enfant-Jésus
1401, 1^{er} Rue
Québec G1J 1Z4
(418) 649-0252

Comité d'éthique de la recherche

Expertise scientifique
biomédicale

Christel Dagen, B.Pharm, M.Sc.
Suzanne Lachance, B.Sc. et
Mariane Lalant, B.Pharm, M.Sc.
Veronique Houler, PhD
Helene Ols, MD
André Tourigny, MD
René-Michel Tremblay, MD

Expertise juridique

Marique Perron, M.Sc., LL.L.
Expertise en éthique
François Pouliot, M.D., PhD

Représentation de la
collectivité

Jacques Côté
Jean Roulier

Après avoir examiné les informations qui lui ont été soumises, le sous-comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Saint-Sacrement a réapprouvé pour un an le projet de recherche ci-haut mentionné.

En guise de rappel, le sous-comité d'éthique de la recherche doit être informé advenant toute modification, ou l'obtention de toute nouvelle information, qui surviendraient à une date ultérieure à celle de la présente approbation et qui comporteraient des changements dans le choix des sujets, dans la manière d'obtenir leur consentement ou dans les risques encourus. Le CÉR doit réévaluer et donner son approbation avant l'entrée en vigueur de ces changements. De plus, le sous-comité doit être informé dans les 48 heures ouvrables de tout événement indésirable grave ayant un lien possible avec la médication à l'étude, survenu dans le cadre d'un projet de recherche approuvé par le sous-comité et impliquant des participants recrutés dans notre centre. Le chercheur doit y joindre son évaluation personnelle de la situation, en précisant s'il s'agit, selon lui, d'un événement relié à l'étude et/ou d'un risque jusque-là inconnu. Il devra également préciser si les patients déjà inscrits doivent en être informés et si une modification au formulaire de consentement est nécessaire pour les nouveaux sujets. Finalement, le sous-comité doit être informé de la fin du recrutement pour le projet de recherche ci-haut mentionné.

Une copie du formulaire de consentement portant le sceau d'approbation du sous-comité doit obligatoirement être utilisée lors du recrutement des participants. Le formulaire de consentement portant la signature originale de chacun des sujets de recherche doit être conservé dans les dossiers du chercheur et une copie remise au participant.

La composition du sous-comité d'éthique de la recherche est conforme aux exigences définies à ce sujet dans le Règlement sur les aliments et drogues (Division 5) et le sous-comité assume son rôle en conformité avec les Bonnes pratiques cliniques.

Ce projet de recherche a été réapprouvé jusqu'au **30 septembre 2007** lors de la 246^e réunion régulière tenue le 27 septembre 2006 en présence de la majorité des membres du sous-comité d'éthique de la recherche.


François Pouliot, président

Annexe 2.8 : Deuxième réapprobation du comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec en anglais



Hôpital du Saint-Sacrement ANNUAL REAPPROVAL OF A RESEARCH PROJECT

Investigators : Dr. Michel Alary et al.

DR-002-1096

Project : Randomized controlled trial of 6% cellulose sulfate gel and the effect on vaginal HIV transmission (Protocol C03-090)

Centres hospitaliers de soins généraux, spécialisés et ultraspécialisés

Hôpital du Saint-Sacrement
120, chemin Sainte-Foy
Québec G1S 4L8
(418) 643-7511

Hôpital de l'Enfant-Jésus
1401, 1^{er} rue
Québec G1J 1S4
(418) 643-0252

Research Ethics Review Board

Biomedical Scientific Expertise

Chantal Gagnon, B.Pharm. M.Sc.
Suzanne Lachance, B.Sc. Inf.
Mikaela Lafont, B.Pharm. M.Sc.
Véronique Mounin, PhD
Hélène Ota, MD
André Thourgy, MD
René-Michel Tremblay, MD

Legal Expertise

Monique Perron, M.Sc., LL.L.

Ethics Expertise

François Pouliot, M.D., PhD

Community Representation

Jacques Gagné
Jean Pouliot

After careful examination of all the information submitted, the Research Ethics Review Board – Hôpital Saint-Sacrement – has reapproved the above-mentioned research project for one year.

As a reminder, the Research Ethics Review Board must be notified of any modification to this project or any additional information acquired involving patient selection, means of obtaining informed consent or treatment-related risk occurring beyond the date of this approval. The Board must reassess the project and give its approval before these changes are implemented. Furthermore, the Research Ethics Review Board must be notified within 48 working hours of any serious adverse event that could have a causal relationship with the study medication, that occurred in a research project approved by the Research Ethics Review Board and involving participants recruited in our establishment. The investigator must also provide a personal assessment of the event stating if, in his opinion, this event is treatment-related, this is a new and up-to-now unknown risk, if participating subjects should be informed of accrued risk and if an amendment to the informed consent form is necessary for future recruitment. Finally, the Research Ethics Review Board must be informed of the enrolment completion date for the above mentioned project.

A copy of the patient information and consent form carrying the approval stamp of the Research Ethics Review Board must be used when recruiting the participants. The original consent form signed by the patient must be kept in the investigator's files, and one copy given to the participant.


The membership of Research Ethics Review Board complies with the membership requirements defined in the Food and Drug Regulations (Division 5) and carries out its functions in a manner consistent with *Good Clinical Practice*.

This research project has been reapproved until **September 30, 2007** full board at the 246th regular meeting held September 27, 2006 with a majority of REB members present at the time of the meeting.

François Pouliot, president

Annexe 2.9 : Fiche de documentation d'approbation de comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec

**IRB Approval Documentation
CHA
Benin, #10164**

Name of study protocol	Phase 3 Randomized Controlled Trial of 6% Cellulose Sulfate Gel and the Effect on Vaginal HIV Transmission			
Protocol identification number	Study #C03-090/ #9845			
Investigators	Dr. Michel Alary Dr. Fernand Aimé Guédou			
Date of IRB review				
Documents submitted to IRB:	English	French	Approved	Not Approved
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protocol (version 1.1, 18 March 05) ▪ Stamped screening informed consent form (version 1.1, 18 March 05) ▪ Stamped enrollment informed consent form (version 1.1, 18 March 05) ▪ Instructions for use (version 1.1, 18 March 05) ▪ CS overview (from the study manual version 1.0, dated May 20, 2005) ▪ Flip Chart (version dated 27 July 05 and version dated 28 July 05) ▪ Illustrations for gel use (version 1.0, 22 March 05 and version dated 2 June 05) 	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IRB decision	<input checked="" type="checkbox"/> Approved <input type="checkbox"/> Approval Pending <input type="checkbox"/> Not approved			Date: <u>20 09 2005</u> (dd/mm/yy)
IRB certification/registration/statement of compliance	IRB00001506 – FWA00004683			
Signature of IRB Chair	 François Pouliot			
Expiration date of approval	September 30, 2006			
Other comments				

Annexe 2.10 : Rapport de fin de projet au comité d'éthique du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec (1/2)



COMITÉ D'ÉTHIQUE DE LA RECHERCHE

Ce document est : (S.V.P. cochez)

- une **DEMANDE DE RÉAPPROBATION ANNUELLE**
 ou un **RAPPORT DE FIN DE PROJET**

Chercheurs : **Dr. Michel Alary et al.**

DR-002-1096

Projet : **Essai randomisé contrôlé de l'effet du gel de sulfate de cellulose 6% sur la transmission vaginale du VIH – Site du Bénin.**

1. L'étude est-elle exactement la même depuis sa dernière approbation par le sous-comité en 2006 ?

Oui Non (Si non, expliquer la(les) modification(s))

Etude terminée prématurément. Voir toute la correspondance au sujet de ce projet avec nous de la dernière année

2. Date où le recrutement a débuté: juillet 2005

3. Le 2006-09-27 00:00:00, vous aviez fourni les informations suivantes. Veuillez svp compléter le tableau suivant

	Total CHA	Majeurs	Mineurs	Inaptes	Total Étude Bénin	Retraits dans le CHA	Abandons dans le CHA
2006-09-27 00:00:00	0	0	0	0	196	1	0
CUMULATIF (depuis le début de l'étude)	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>238</i>	<i>8</i>	<i>0</i>

4. Y a-t-il eu des sujets retirés de l'étude dans le CHA? *site de Bénin*

Oui Principale raison: Quelques sujets ont quitté le Bénin ou quitté la prostitution

Non

5. Y a-t-il eu des sujets qui ont abandonné dans le CHA?

Oui Principale raison: _____

Non _____

Annexe 2.10 : Rapport de fin de projet au comité d'éthique du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec (2/2)

majeure ou inattendue qui vous n'avez pas encore déclaré, difficulté de recrutement, ambiguïtés, etc.)

Non Oui Si oui, expliquez:

Il y a eu correspondance récente: étude arrêtée après analyse préliminaire suspectant effet nuisible potentiel au produit

7. Combien de temps encore prévoyez-vous que l'étude se poursuivra? Terminée le 31/03/07

8. Au cours de la dernière année, y a-t-il eu des changements dans les connaissances qui affecteraient la pertinence de cette étude: Non Oui

Si oui, expliquez: _____

9. Détailler les non-respects au protocole survenus durant l'année :

Nombre de patients concernés : Il y a eu correspondance au cours de la dernière année

Types de non-respect : _____

Nombre de chaque type de non-respect : _____

10. Autres renseignements à communiquer: _____

11. Ce projet fait-il l'objet d'un certificat de déontologie à l'Université Laval ?

Oui Non Si oui, fournir le numéro du certificat (SIRUL) _____


Note : Nous vous rappelons qu'il est de la responsabilité du chercheur d'aviser par écrit la secrétaire du CÉR afin que le certificat de déontologie soit complété.

Signature du chercheur principal : [Signature] Date : 9 août 2007

Veillez retourner ce formulaire complété, accompagné de l'ORIGINAL DU DERNIER FORMULAIRE DE CONSENTEMENT APPROUVÉ PAR LE SOUS-COMITÉ à:
Marielle Roberge, Comité d'éthique de la recherche
Bureau JS1-04 - Hôpital du Saint-Sacrement du CHA

Annexe 2.11 : Fiche de documentation d'approbation du Ministère de la santé publique du Bénin

**IRB Approval Documentation
Ministry Of Health
Benin, #10164**

Name of study protocol	Phase 3 Randomized Controlled Trial of 6% Cellulose Sulfate Gel and the Effect on Vaginal HIV Transmission			
Protocol identification number	FHI Study #C03-090/ #9845			
Investigators	Dr. Michel Alary Dr. Fernand Aimé Guédou			
Date of IRB review	23 Mai 2005			
Documents submitted to IRB:	English	French	Approved	Not Approved
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protocol (version 1.1, 18 March 05) ▪ Stamped screening informed consent form (version 1.1, 18 March 05) ▪ Stamped enrollment informed consent form (version 1.1, 18 March 05) ▪ Instructions for use (version 1.1, 18 March 05) 	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
IRB decision / MOH decision	<input checked="" type="checkbox"/> Approved <input type="checkbox"/> Approval Pending <input type="checkbox"/> Not approved		Date: <u>23/05/05</u> (dd/mm/yy)	
IRB certification/registration/statement of compliance	Not applicable			
Signature of IRB Chair / MOH				
Expiration date of approval	23/05/06			
Other comments	Néant			

Annexe 2.12 : Réapprobation annuelle du comité d'éthique de la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

Cotonou, le 26 juin 2006

FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

COMITE D'ETHIQUE

Ré-approbation annuelle du Projet d'étude

« Essai randomisé contrôlé de l'effet du gel de Sulfate de Cellulose 6% dans la transmission vaginale du VIH »

Nous, soussignés, accusons réception de la correspondance du 15 Juin 2006 émanant du Coordonnateur du site de Bénin pour l'étude ci-dessus mentionnée et faisant le point sur les dix (10) premiers mois de conduite de ladite étude et sollicitant le renouvellement de son approbation.

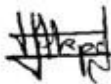
Vu que ladite étude se conduit sous l'égide de la «Bonne Pratique Clinique » de la Conférence Internationale pour l'Harmonisation (ICH E6 - 3.1.4) dont l'une des exigences est le renouvellement annuel de l'approbation du protocole de l'étude,

Vu que le Comité d'Éthique de la Faculté des Sciences de la Santé ne pourrait se réunir avant l'expiration de l'approbation en cours,

Vu enfin qu'à travers les diverses correspondances que nous avons eues de la Coordination locale de l'Étude jusqu'à présent, ainsi que le rapport joint à la requête, il n'a été noté ni d'actes de violation des principes éthiques de la recherche, ni des écarts notoires du protocole de recherche, ni d'actes ou d'évènements compromettant le bien-être des participantes,

Nous autorisons la poursuite de ladite étude en attendant la prochaine réunion du Comité d'Éthique.

Vu le Doyen



Professeur César AKPO

Le Président



Professeur P. A. Léon MEDJI

Annexe 2.13 : Exemption du comité d'éthique de l'Université Laval

De : Josée Leblond
Date d'envoi : 23 octobre 2009 10:20
À : Fernand Aïme Guedou
Objet : Confirmation de l'exemption de votre projet de recherche

Monsieur,

Le présent courriel a pour but de vous confirmer l'exemption, par le CÉRUL du projet de recherche intitulé : *Prevalence of bacterial vaginosis and predictors of its recurrence among high risk women participating in the conrad cellulose sulfate (CS) Phase III prevention trial* réalisé dans le cadre de votre doctorat en épidémiologie.

Donc, pour ce qui est de l'éthique de la recherche, votre dossier est en règle.

Je vous souhaite une très belle journée.

Josée Leblond, secrétaire de gestion
Comités d'éthique de la recherche
Maison M.-J.-Brophy, local 205
2241, chemin Sainte-Foy
Université Laval
Québec (Québec) G1V 0A6
Téléphone (418) 656-2131 poste 13162
Télécopieur ... (418) 656-2840

Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (1/6)

PROJET D'APPUI À LA LUTTE CONTRE LE SIDA EN AFRIQUE DE L'OUEST / SIDA 3

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT AU DEPISTAGE

Titre: Essai Randomisé Contrôlé de l'effet du Gel de Sulfate de Cellulose 6% sur la Transmission Vaginale du VIH

Commanditaire: CONRAD
1611 North Kent Street, Suite 806
Arlington, Virginia 22209
USA

CONRAD reçoit ses fonds du Gouvernement des Etats-Unis et de donateurs privés.

Site : Bénin

Clinique : Dispensaire IST = 1 ; Waly Diop = 2 / _ / (Encercler la clinique et aussi écrire le chiffre correspondant dans le casier)

Investigateurs: Prof. Michel Alary (Investigateur principal)
Unité de recherche en santé des populations
Centre hospitalier affilié universitaire de Québec,
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, CANADA

Dr Fernand Guédou (Co-investigateur)
Chercheur Associé au Groupe de Recherche, d'Action et de Formation en
Epidémiologie et Développement (GRAFED) Cotonou
Consultant au Projet SIDA3-Bénin
Cotonou BENIN

Prof. Sévérin Anagonou (Co-investigateur)
Professeur de Bactériologie -Virologie
à la Faculté des Sciences de la Santé
Université d'Abomey-Calavi
Chef du Service de Microbiologie du Centre National Hospitalier et
Universitaire (CNHU) de Cotonou (Bénin)

INTRODUCTION

Ce formulaire de consentement contient des informations sur l'étude ci-dessus. Afin de s'assurer que vous avez toutes les informations sur le dépistage (sélection des participantes) pour cette étude, nous vous demandons de lire (ou de vous faire lire) ce

Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (2/6)

formulaire de consentement. Si vous décidez de vous porter volontaire pour cette étude, on vous demandera aussi de la signer ou d'y apposer votre marque devant un témoin. Nous vous remettrons une copie signée de ce formulaire. Il s'agit d'une étude de recherche qui ne comprend que des personnes qui ont décidé de participer. Veuillez prendre votre temps pour prendre votre décision et n'hésitez pas à poser toutes questions que vous souhaiteriez poser.

INFORMATIONS SUR L'ÉTUDE

Quelle est la raison de cette étude et de la visite de dépistage?

Cette étude vise à conduire une recherche sur un nouveau gel vaginal « candidat ». Un gel candidat signifie qu'il n'a pas encore été approuvé par les autorités pour une distribution sur le marché. Le gel contient du sulfate de cellulose (SC). La raison de l'étude sur le sulfate de cellulose est qu'on cherche à savoir si le gel de SC peut protéger les femmes de l'infection par le VIH, l'infection gonococcique et chlamydiale à travers les relations sexuelles vaginales.

Cette visite de dépistage se justifie par le fait qu'on veut savoir si vous pouvez participer à l'étude sur le Sulfate de Cellulose. Il y a beaucoup de raisons pour lesquelles les femmes ne peuvent pas participer à l'étude. Par exemple, si vous êtes enceinte, séropositive ou si vous avez moins de 18 ans.

Pourquoi vous demande-t-on de participer?

Vous êtes invitée à participer à cette étude parce que vous avez eu au moins trois partenaires différents au cours de ces trois derniers mois et vous avez en moyenne trois actes sexuels vaginaux par semaine. Vous pensez qu'il y a des chances que vous continuiez d'avoir ce comportement pendant la période au cours de laquelle vous prendrez part à l'étude, c'est-à-dire 12 mois après votre prochaine visite. Tout changement de comportement de votre part n'entraînera pas l'arrêt de votre participation à l'étude.

Ce comportement vous met à risque de contracter le VIH. Certaines des femmes qui feront partie de cet essai seront infectées par le VIH à cause de ce comportement.

Informations sur l'infection par le VIH, gonococcique et chlamydiale

Le VIH est le virus qui cause le SIDA. Il n'y a pas de traitement curatif. Une manière très importante de propagation du VIH est l'acte sexuel. Les infections gonococciques et chlamydiales se propagent aussi par les relations sexuelles. Elles peuvent être soignées avec des médicaments. La meilleure manière de prévenir les infections VIH, gonococcique et chlamydiale, c'est de ne pas avoir de relations sexuelles. Si vous avez des relations sexuelles, votre risque de contracter le VIH, la gonococcie et le chlamydia est plus faible si vos partenaires sexuels utilisent des condoms chaque fois que vous avez des relations sexuelles. Avoir des partenaires multiples augmente votre risque de contracter le virus. Les relations sexuelles par l'anus exposent à un risque plus élevé d'infection que les relations vaginales.

Informations générales sur le produit de l'étude

Nous allons faire une étude pour voir si le SC peut protéger les femmes des infections VIH, gonococcique et chlamydiale causées par les relations sexuelles vaginales. Le SC est un gel qui est appliqué dans le vagin avant les relations sexuelles. **Nous ne savons**

Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (3/6)

pas si le SC peut prévenir les infections VIH, gonococcique ou chlamydiale. C'est la raison pour laquelle nous faisons cette étude. Dans les premières études, les femmes qui ont utilisé le gel jusqu'à quatre fois par jour pendant deux semaines n'ont eu aucun problème de santé, à part quelques cas d'irritation. Dans une petite étude chez les hommes, le SC était sans risque pour une application sur leurs pénis.

Combien de personnes participeront à l'étude et combien de temps l'étude va-t-elle durer?

Environ 2600 femmes seront recrutées dans différents pays. L'étude va durer un peu plus de deux ans dans chaque centre. Chaque femme sera priée d'utiliser le gel de l'étude et des condoms pour chaque acte sexuel vaginal pendant un an, de revenir à la clinique chaque mois et de subir le test du VIH.

Les femmes qui participent seront affectées à l'un des deux gels: CS ou placebo. Seul le hasard déterminera le gel que chaque femme va recevoir. Ni vous, ni le personnel ne saura quel gel vous utiliserez. Nous savons que le gel placebo n'a pas d'effet sur l'infection par le VIH, l'infection gonococcique ou chlamydiale. Vous recevrez des informations plus détaillées si vous pouvez participer à l'étude.

Quel est votre rôle dans cette visite de dépistage?

Si vous acceptez d'être dépistée pour l'étude, vous devez:

- signer cette fiche de consentement (ou y apposer votre empreinte digitale devant un témoin)
- être disposée à répondre à quelques questions sur vous-même et sur votre comportement sexuel
- Avoir une séance de conseils sur le test VIH qui sera pratiqué
- vous laisser prélever du sang (7 ml, l'équivalent d'une cuillère à thé) à l'intérieur du coude pour un test du VIH et de la syphilis
- donner votre urine pour un test de grossesse
- subir un examen gynécologique (vos parties intimes) pendant lequel des échantillons seront prélevés pour un test de recherche d'une infection quelconque.

Vous devez revenir à la clinique de l'étude dans l'intervalle de 4 semaines. Vous ne pouvez pas faire partie de l'étude sur le SC si vous avez le VIH ou si vous êtes enceinte. Le personnel discutera des autres raisons pour lesquelles on ne peut pas participer à l'étude. Nous n'allons pas traiter le VIH, mais nous allons vous proposer une séance avec un conseiller et vous référer à une structure clinique appropriée. Nous allons vous traiter pour toute infection sexuellement transmise (IST) guérissable. Cela comprend les infections gonococcique et chlamydiale. Nous allons vous demander d'utiliser des condoms chaque fois que vous aurez des relations sexuelles. Nous allons vous donner des condoms et vous montrer comment les utiliser. Nous allons vous demander d'utiliser seulement les condoms que nous allons vous fournir. Si vous manquez de condoms avant votre rendez-vous pour prendre vos résultats, vous pouvez revenir à cette clinique pour en avoir. Nous n'allons vous offrir aucune autre méthode contraceptive. Nous allons conserver votre prélèvement sanguin pour un autre test éventuel.

Quels sont les risques éventuels pour vous à être dépistée pour cette étude?

Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (4/6)

Risque lié au prélèvement sanguin et à l'examen gynécologique

Il y a un risque de s'évanouir, de s'infecter, d'avoir des contusions, une inflammation et des douleurs à l'endroit où le sang a été prélevé.

Vous pouvez connaître un certain inconfort lors de l'examen gynécologique.

Risque lié à la connaissance des résultats du test

Vous pouvez être en colère et mécontente si vous vous rendez compte que vous êtes infectée par le VIH ou toute autre IST.

Quels sont les avantages éventuels que vous pouvez tirer de cette visite de dépistage?

Nous allons vous donner des condoms gratuits et vous montrer comment les utiliser.

Nous allons vous examiner et vous traiter gratuitement pour toute infection génitale guérissable. Vous pouvez discuter avec un conseiller de l'étude. Il/elle peut vous aider à avoir des réponses à vos questions sur l'étude et sur votre santé.

Que se passera-t-il si vous décidez de ne pas participer à l'étude?

Vous êtes libre de décider si vous voulez participer à cette étude ou non. Votre décision de ne pas participer n'affectera pas les soins de santé que vous devez normalement recevoir. Veuillez seulement dire au docteur ou au personnel de la recherche/clinique pourquoi vous ne souhaitez pas participer à l'étude.

Qu'en est-il de la confidentialité?

Nous allons protéger les informations vous concernant et sur votre participation à cette recherche autant que nous pouvons le faire. Votre nom ne figurera sur aucun rapport. Cependant, le personnel de CONRAD, de FHI, de Food and Drug Administration des Etats-Unis, des Conseils Institutionnels et de l'USAID peuvent avoir besoin de regarder vos données.

Allez-vous recevoir une indemnisation pour cette visite de dépistage?

Vous allez recevoir 2 000 FCFA lors de cette visite pour avoir donné de votre temps, pour le désagrément et les frais de transport.

Cela va-t-il vous coûter quelque chose?

Il n'y a pas de coûts à votre charge pour votre participation à cette étude. CONRAD paye les investigateurs pour la conduite de l'étude et toutes les dépenses liées à l'étude.

Que se passera-t-il si vous avez un problème ou d'autres questions?

Si vous avez un problème qui serait à votre avis, lié à votre participation à cette recherche ou si vous avez des questions, veuillez appeler **Dr Fernand Guédou au téléphone 21 31 49 27 ou 90 94 71 58**. Si vous avez besoin d'aide, nous pouvons vous référer à un endroit où vous aurez peut-être à payer.

Que se passera-t-il si vous êtes malade ou si vous avez un problème de santé?

Veuillez téléphoner au **21 31 49 27 ou 90 94 71 58** ou revenir immédiatement à la clinique, à tout moment pendant l'étude si vous:

- tombez malade, ou
- pensez être enceinte, ou
- pensez avoir une IST ou

Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (5/6)

- avez d'autres préoccupations concernant votre santé.

Si vous êtes malade ou si vous avez un problème de santé directement causé par votre participation à cette recherche, vous n'aurez pas à payer pour les visites pour voir le docteur de la recherche/personnel de la clinique. Si vous avez une autre maladie quelconque, vous devrez payer pour votre traitement. Si vous avez besoin d'aide, nous allons vous référer à d'autres cliniques où vous aurez peut-être à payer.

Quels sont vos droits en tant que participante?

Cette recherche a été examinée et approuvée par les CI de CONRAD et du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec (Canada) ainsi que par le Comité d'éthique national du Bénin. Un Conseil Institutionnel (CI) ou un Comité d'Éthique (CE) est un comité qui examine les études de recherche afin d'aider à protéger les participants. Si vous avez des questions sur vos droits en tant que participante à cette recherche vous pouvez contacter un membre de la clinique et éventuellement **Professeur Ayité Léon MEDJI, Président du Comité d'Éthique de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, Service d'ORL au Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU) de Cotonou, Bénin. Tel : 21 30 01 55 / 21 30 06 56 ; Poste 5004.**

Annexe 2.14 : Formulaire de consentement au dépistage en français (6/6)

CONSENTEMENT DE LA PARTICIPANTE

Le document ci-dessus décrivant les avantages, les risques et les procédures de dépistage pour l'étude sur le sulfate de cellulose m'a été lu et expliqué. L'occasion m'a été donnée de poser toutes les questions sur la recherche et des réponses m'ont été données à ma satisfaction. J'accepte de participer en tant que volontaire.

Date

Signature ou marque de la participante

Nom en lettres d'imprimerie de la
participante

Si les participantes ne peuvent pas lire le formulaire elles-mêmes, un témoin (pas le membre du personnel qui a obtenu le consentement) doit signer ici:

J'étais présent (e) pendant tout le processus de consentement éclairé avec le volontaire. Toutes les questions du volontaire ont eu des réponses et le volontaire a accepté de participer à la recherche.

Date

Signature du témoin

Nom en lettres d'imprimerie du témoin

Je certifie que la nature et l'objet, les avantages éventuels et les risques possibles liés à la participation au dépistage pour l'étude sur le SC ont été expliqués à la personne nommée ci-dessus.

Date

Signature de la personne qui a obtenu le consentement

Nom de la personne qui a obtenu le consentement

Une copie signée de cette fiche de consentement a été remise à la participante.

Initiales:

Date:

Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (1/6)

PROJET D'APPUI À LA LUTTE CONTRE LE SIDA EN AFRIQUE DE L'OUEST / SIDA 3

SCREENING CONSENT FORM

Title: Randomized Controlled Trial of 6% Cellulose Sulfate Gel and the Effect on Vaginal HIV Transmission

Sponsor:

CONRAD
1611 North Kent Street, Suite 806
Arlington, Virginia 22209
USA

CONRAD receives its funds from the US government and from private donors.

Site : Benin

Clinic: Dispensaire IST = 1 ; Waly Diop = 2 / _ / (Please circle the appropriate clinic and write the corresponding number in the case)

Investigators: Prof. Michel Alary (Principal Investigator)

Unité de recherche en santé des populations
Centre hospitalier affilié universitaire de Québec,
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, CANADA

Dr Fernand Guédou (Co-investigator)

Research Associate at « Groupe de Recherche, d'Action et de Formation
en Epidémiologie et Développement » (GRAFED) Cotonou
Consultant at Projet SIDA3-Benin
Cotonou BENIN

Prof. Sévérin Anagonou (Co-investigateur)

Professeur de Bactériologie - Virologie
à la Faculté des Sciences de la Santé
Université d'Abomey-Calavi
Chef du Service de Microbiologie du Centre National Hospitalier et
Universitaire (CNHU) de Cotonou (Bénin)

Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (2/6)

Introduction

This consent form contains information about the study named above. In order to be sure that you have all information about being screened for this study, we are asking you to read (or have read to you) this consent form. If you decide to volunteer for this study you will also be asked to sign it or make your mark in front of a witness. We will offer you a signed copy of this form. This is a research study that only includes people who choose to take part. Please take your time to make your decision and feel free to ask any question you may have.

What is the reason for the study and the screening visit?

This study is researching a new investigational vaginal gel. An investigational gel means that it has not been approved yet by the authorities for distribution on the market. The gel contains cellulose sulfate (CS). The reason for the cellulose sulfate study is to determine whether the CS gel can protect women from getting infected with HIV, gonococcal and chlamydial infection, through vaginal sex.

The reason for this screening visit is to determine whether you can be in the Cellulose Sulfate Study. There are many reasons why women cannot be part of the study; e.g. if you are pregnant, HIV positive or younger than 18 years.

Why are you being asked to take part?

You are invited to participate in this study because you have had at least three different partners in the last three months and you have an average of three vaginal sexual acts per week. You think that it is likely that you will continue this behavior for the period you will be in this study, that is, for 12 months. We will not discontinue you from the study if you change your behavior.

This behavior puts you at risk of getting HIV. Some of the women who will be in this trial will become infected with HIV because of this behavior.

Information about HIV, gonococcal and chlamydial infection

HIV is the virus that causes AIDS. There is no cure. A very important way for HIV to spread is during sex. Gonococcal and chlamydial infections also spread during sex. They can be cured with medicines. The best way to prevent HIV, gonococcal and chlamydial infections is not having sex. If you have sex, your risk of HIV, gonococcal and chlamydial infections is smaller if your sex partners use condoms every time you have sex. Multiple partners increase your risk of becoming infected. Sex in the anus has a much higher risk of getting you infected than vaginal sex.

General information about the study product

We will be doing a study to see if CS can protect women from getting HIV, gonococcal and chlamydial infection through vaginal sex. CS is a gel that is put into the vagina before sex. **We do not know if CS will prevent HIV, gonococcal or chlamydial infection.** This is why we are conducting the study. In earlier studies women who used the gel up to four times a day for two weeks did not have any health problems, except for some cases of irritation. In a small study among men, CS was safe to put on their penises.

Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (3/6)

How many people will take part in the study and how long will the study last?

About 2,600 women will be recruited in different countries. The study will last a little bit longer than two years in each center. Each woman will be asked to use the study gel and condoms for each vaginal sexual act for one year, to come back to the clinic every month and to be tested for HIV.

Women who participate will be assigned to one of two gels: CS or placebo. Only chance will determine which gel each woman will receive. Neither you nor the staff will know which gel you will be using. We know that the placebo gel does not have any effect on HIV, gonococcal or chlamydial infection. You will receive more detailed information if you can participate in the study.

What is your part for this visit?

If you agree to be screened for the study, you must:

- sign this consent form (or make your mark in front of a witness)
- be willing to answer some questions about yourself and your sexual behavior
- have a counseling session on being tested for HIV
- have blood (7 ml, like a tea spoon) taken from your inner elbow for an HIV and syphilis test
- give urine for a pregnancy test
- have a pelvic exam (your inner parts) during which samples to test for an infection will be taken

You must come back to the study clinic within 4 weeks. You cannot be in the CS Study if you have HIV or if you are pregnant. The staff will discuss the other reasons why one cannot be in the study. We will not treat HIV, but we will offer you a session with a counselor and refer you to a clinical facility in the neighborhood. We will treat you for any curable sexually transmitted infection (STI). This includes gonococcal and chlamydial infection. We will ask you to use condoms each time you have sex. We will give you condoms and teach you how to use them. We ask you to use only the condoms that we provide. If you run out of condoms before your appointment for getting your results, you can return to this clinic and get more. We will not provide any other method of contraception. We will store your blood sample for possible later testing.

What are your possible risks of being screened for this study?

Risk related to blood drawing and pelvic examination

. There is a risk of fainting, infection, bruising, swelling, and pain at the site of blood drawing.

You may experience some discomfort if you have a pelvic exam

Risk related to knowing test results

You may feel angry and upset if you get to know that you are infected with HIV or any other STI.

What are your possible benefits of this visit?

Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (4/6)

We will give you free condoms and show you how to use them. We will examine you and treat you for any of the curable genital infections for free. You may speak with a study counselor. He or she may help you with questions about the study and your health.

What if you decide not to be in the study?

You are free to decide if you want to be in this study. Your decision to not participate will not affect the health care you would normally receive. Please tell the research doctor/clinic staff why you do not wish to participate.

What about confidentiality?

We will protect information about you and your taking part in this research to the best of our ability. Your name will not be in any reports. However, the staff of CONRAD, FHI, the United States Food and Drug Administration, the Institutional Review Boards, and the United States Agency of International Development may need to look at your records.

Will you receive a compensation for this screening visit?

You will receive 2 000 FCFA at this visit for your time, inconvenience and transportation costs.

Are there any costs for you?

There are no costs for you for participating in this study. CONRAD pays the investigators for conducting the study and for all study-related expenses.

What if you have a problem or have other questions?

If you have a problem that you think might be related to taking part in this research or any questions about the research, please call **Dr Fernand Guédou at telephone 21 31 49 27 or 90 94 71 58**. If you need more help, we may give you a referral where you may have to pay.

What if you get sick or have a health problem?

Please phone **21 31 49 27 or 90 94 71 58** or come back to the clinic right away, at any time during the study, if you:

- get sick, or
- think you are pregnant, or
- think you may have a STI, or
- have other concerns about your health.

If you are sick or have a health problem as a direct result of your participation in this research, you will not have to pay for visits to see the research doctor/clinic staff. If you have any other illness, you will have to pay for your treatment. If you need more help, we will refer you to other clinics, where you may have to pay.

What are your rights as a participant?

This research has been reviewed and approved by the IRB of CONRAD, the IRB of the

Centre hospitalier affilié universitaire de Québec (CANADA) and a national ethics

Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (5/6)

committee in Benin. An IRB is a committee that reviews research studies in order to help protect participants. If you have any questions about your rights as a research participant you may contact a member of the staff at the clinic and possibly **Professeur Ayité Léon MEDJI, Président du Comité d’Ethique de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, Service d’ORL au Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU) de Cotonou, Bénin. Tel : 21 30 01 55 / 21 30 06 56 ; Poste 5004.**

Annexe 2.15 : Formulaire de consentement au dépistage en anglais (6/6)

VOLUNTEER AGREEMENT

The above document describing the benefits, risks and procedures for the screening for the cellulose sulfate study has been read and explained to me. I have been given an opportunity to have any questions about the research answered to my satisfaction. I agree to participate as a volunteer.

Date

Signature or mark of volunteer

Printed name of volunteer

If volunteers cannot read the form themselves, a witness (not the staff member who obtained the consent) must sign here:

I was present throughout the entire informed consent process with the volunteer. All questions from the volunteer were answered and the volunteer has agreed to take part in the research.

Date

Signature of witness

Printed name of witness

I certify that the nature and purpose, the potential benefits, and possible risks associated with participating in the screening for the CS study have been explained to the above individual.

Date

Signature of person who obtained consent

Printed name of person who obtained consent

A signed copy of this consent form was given to the participant.

Initials:

Date:

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (1/11)

**PROJET D'APPUI À LA LUTTE CONTRE LE SIDA EN
AFRIQUE DE L'OUEST / SIDA 3**

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT AU RECRUTEMENT
ET A LA CONSERVATION DES ECHANTILLONS**

Titre: Essai Randomisé Contrôlé de l'effet du Gel de Sulfate de Cellulose 6% sur la Transmission Vaginale du VIH

Commanditaire: CONRAD
1611 North Kent Street, Suite 806
Arlington, Virginia 22209
USA

CONRAD reçoit ses fonds du gouvernement des Etats-Unis et de donateurs privés.

Site : Bénin

Clinique : Dispensaire IST = 1 ; Waly Diop = 2 / _ / (Encercler la clinique et aussi écrire le chiffre correspondant dans le casier)

Investigateurs: Prof. Michel Alary (Investigateur principal)
Unité de recherche en santé des populations
Centre hospitalier affilié universitaire de Québec,
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, CANADA

Dr Fernand Guédou (Co-investigateur)
Chercheur Associé au Groupe de Recherche, d'Action et de Formation en
Epidémiologie et Développement (GRAFED) Cotonou
Consultant au Projet SIDA3-Bénin
Cotonou BENIN

Prof. Sévérin Anagonou (Co-investigateur)
Professeur de Bactériologie -Virologie
à la Faculté des Sciences de la Santé
Université d'Abomey-Calavi
Chef du Service de Microbiologie du Centre National Hospitalier et
Universitaire (CNHU) de Cotonou (Bénin)

INTRODUCTION

Ce formulaire de consentement contient des informations sur l'étude citée ci-dessus. Afin d'être sûrs que vous êtes informée sur votre participation à cette étude, nous vous demandons de lire (ou de vous faire lire) ce formulaire de consentement. Si vous

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (2/11)

décidez de participer à cette étude, nous allons vous demander de la signer ou d'y apposer votre marque devant un témoin. Nous allons aussi vous demander si vous acceptez qu'on conserve vos prélèvements pour une future recherche. Nous allons vous remettre une copie signée de ce formulaire. Il s'agit d'une étude de recherche qui ne comprend que des personnes ayant décidé d'y participer. Veuillez prendre votre temps pour prendre une décision et n'hésitez pas à poser toute question que vous souhaiteriez poser.

INFORMATIONS SUR L'ÉTUDE

Quelle est la raison de cette étude et de la visite de recrutement?

Cette étude vise à conduire une recherche sur un nouveau gel vaginal « candidat ». Un gel candidat signifie qu'il n'a pas encore été approuvé par les autorités pour une distribution sur le marché. Le gel contient du sulfate de cellulose (SC). La raison de l'étude sur le sulfate de cellulose est qu'on cherche à savoir si le gel de SC peut protéger les femmes de l'infection par le VIH, l'infection gonococcique et chlamydiale transmises par les relations sexuelles vaginales.

Pourquoi vous demande-t-on de participer?

Vous êtes invitée à participer à cette étude parce que vous avez eu au moins trois partenaires différents au cours de ces trois derniers mois et vous avez en moyenne trois actes sexuels vaginaux par semaine. Vous pensez qu'il y a des chances que vous continuiez d'avoir le même comportement pendant la période au cours de laquelle vous prendrez part à l'étude, c'est-à-dire pendant 12 mois. Tout changement de comportement de votre part n'entraînera pas l'arrêt de votre participation à l'étude. Ce comportement vous met à risque de contracter le VIH. Certaines des femmes qui feront partie de cet essai seront infectées par le VIH à cause de ce comportement.

Les raisons pour lesquelles vous ne pouvez pas participer à cette étude sont : avoir moins de 18 ans ; avoir une moyenne de moins de trois actes sexuels vaginaux par semaine et ne pas avoir eu au moins trois partenaires différents au cours des trois derniers mois ou si vous pensez que votre comportement sexuel va changer ; être séropositive ; ne pas pouvoir respecter les calendriers et les procédures de visites de l'étude ; s'injecter soi-même des drogues ; si vous êtes allergique aux condoms ou aux spermicides ; si vous voulez avoir un enfant au cours des 12 prochains mois ; si vous faites déjà partie d'un autre essai ou si l'investigateur pense que votre participation peut vous mettre à risque.

Informations sur l'infection par le VIH, les infections gonococcique et chlamydiale

Le VIH est le virus qui cause le SIDA. Une manière très importante de propagation du VIH est l'acte sexuel et il n'y a pas de traitement curatif. Les infections gonococcique et chlamydiale se propagent aussi par les relations sexuelles. Elles peuvent être soignées avec des médicaments. La meilleure manière de prévenir les infections VIH, gonococcique et chlamydiale, c'est de ne pas avoir de relations sexuelles. Si vous avez des relations sexuelles, votre risque de contracter le VIH, la gonococcie et le chlamydia est plus faible si vos partenaires sexuels utilisent des condoms chaque fois que vous avez des relations sexuelles. Avoir des partenaires multiples augmente votre risque de contracter le virus. Les relations sexuelles par l'anus exposent à un risque plus élevé d'infection que les relations vaginales.

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (3/11)

Informations générales sur le produit de l'étude

Nous faisons une étude pour voir si le SC peut protéger les femmes des infections VIH, gonococcique et chlamydiale causées par les relations sexuelles vaginales. Le SC est un gel qui est appliqué dans le vagin avant les relations sexuelles. **Nous ne savons pas si le SC peut prévenir les infections par le VIH, gonococcique ou chlamydiale.** Il est possible que le SC évite la grossesse mais nous n'en sommes pas certains et nous ne connaissons pas les effets et l'innocuité du gel sur la grossesse. Vous devez avoir un test de grossesse négatif avant d'entrer dans cette étude. Si vous devenez enceinte pendant l'étude, vous devez immédiatement en informer le docteur ou l'infirmière de l'étude. On mettra fin à votre utilisation du gel de l'étude et nous allons vous demander de continuer les visites cliniques mensuelles. Le clinicien de l'étude discutera avec vous de vos choix. Nous n'allons prendre en charge aucune dépense liée à votre grossesse.

Nous allons comparer le SC à un gel placebo dans cette étude. Un placebo est un gel inactif qui ressemble en tous points au gel de SC, mais ne contient aucun médicament. Nous savons que le gel inactif ne protège pas les femmes de l'infection par le VIH, de l'infection gonococcique ou chlamydiale ou de la grossesse. Les condoms peuvent prévenir une grossesse et peuvent réduire votre risque d'infection VIH, gonococcique ou chlamydiale. C'est la raison pour laquelle il est important d'essayer d'utiliser les condoms avec le gel chaque fois que vous avez des relations sexuelles. Nous allons vous donner des condoms gratuits. Nous allons vous apprendre comment utiliser le gel et les condoms. Nous vous conseillons fortement d'éviter les relations sexuelles anales.

Il y aura six (6) groupes dans l'étude. Les femmes de trois (3) groupes vont utiliser le SC. Les femmes des trois (3) autres groupes vont utiliser le placebo. La moitié des femmes va utiliser le SC et la moitié le placebo. Un ordinateur va choisir votre groupe. Tous les gels viendront dans des applicateurs. Tous les applicateurs ont la même apparence. Vous ne saurez pas quel gel vous utilisez. Aucun membre du personnel de l'étude ne saura quel groupe sera choisi pour vous. Pour participer à cette étude, vous devez accepter d'utiliser le gel que l'ordinateur aura choisi pour vous. Il est important que vous utilisiez seulement les gels qui vous seront remis. Vous ne devez pas utiliser des gels donnés à quelqu'un d'autre ou donner vos gels à qui que ce soit.

Vous pouvez continuer votre hygiène vaginale normale de routine. Nous recommandons que si vous vous lavez le vagin, vous utilisiez seulement de l'eau et que vous essayiez de ne pas utiliser d'autres produits intra-vaginaux pendant votre participation à cette étude, sauf les tampons périodiques et autres produits que vous utilisez pendant vos règles.

Combien de personnes participeront à l'étude et combien de temps l'étude va-t-elle durer?

Environ 2600 femmes seront recrutées dans différents pays. L'étude va durer environ deux à trois ans dans chaque centre. Chaque femme sera priée d'utiliser le gel de l'étude et des condoms pour chaque acte sexuel vaginal pendant un an, de revenir à la clinique chaque mois et de subir le test du VIH.

Quel est votre rôle dans cette visite?

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous devez venir pour une visite programmée chaque mois pendant 12 mois.

Il est très important que vous ne manquiez aucune de ces visites.

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (4/11)

Visite de Recrutement

A la visite d'aujourd'hui, vous allez :

- signer cette fiche de consentement (ou y apposer votre empreinte digitale devant un témoin)
- subir un examen gynécologique (vos parties intimes) pendant lequel des échantillons seront prélevés pour le diagnostic d'une infection éventuelle.
- Avoir une séance de conseils sur le test du VIH
- vous laisser prélever du sang (7 ml, l'équivalent d'une cuillère à thé) à la face interne du coude pour un test du VIH
- donner votre urine pour un test de grossesse
- donner des informations sur votre contact
- recevoir votre gel et vos condoms pour l'étude

Nous allons vous donner le gel que l'ordinateur a choisi pour vous. Vous devez utiliser un applicateur de gel et un condom chaque fois que vous avez des relations sexuelles vaginales. Si vous n'êtes pas en mesure d'utiliser un condom, prenez soin d'utiliser votre gel. Nous allons vous montrer comment utiliser le gel et les condoms. Vous ne pouvez pas utiliser le gel dans votre anus ou dans votre bouche.

Si votre stock de gel ou de condoms s'épuise avant votre prochaine visite, veuillez revenir à la clinique pour en avoir.

Visites de Suivi

Il est très important que vous veniez à chaque visite mensuelle. Le personnel de l'étude vous donnera d'autres condoms et d'autres gels à chacune des visites. Veuillez retourner au bureau de l'étude si vous manquez de condoms ou de gels avant les rendez-vous programmés. Nous vous prions d'utiliser seulement les condoms et les gels que nous vous donnons. Nous vous prions de ne pas mettre d'autres produits dans votre vagin, sauf quand vous avez vos règles. Si vous utilisez d'autres produits dans votre vagin, veuillez le dire au personnel de l'étude.

A chaque visite de suivi :

- On vous posera des questions sur votre comportement sexuel, sur l'utilisation du gel et des condoms et sur tous problèmes que vous pourriez avoir
- Vous aurez une séance de conseils pour une sexualité sans risque
- Vous remettrez de l'urine pour un test de grossesse
- On vous demandera de fournir un prélèvement vaginal que vous aurez fait vous-même pour un futur test
- On vous demandera si les informations sur votre contact restent valables.

Lors de la première, troisième, sixième et neuvième visite, nous allons prélever un peu de sang en vous piquant le doigt, pour faire un test du VIH. Nous allons vous dispenser une séance de conseils avant et après le test du VIH. Si votre résultat de test VIH devient positif, un conseiller s'entretiendra avec vous et vous serez référée pour une prise en charge, des conseils et des soins. L'investigateur vous donnera des détails sur votre prise en charge. Vous pouvez continuer à participer à l'étude.

Tous les trois mois :

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (5/11)

- On vous posera des questions pour voir si vous vous souvenez des informations que nous vous avons données à votre entrée dans l'étude. Ce dont vous ne vous souvenez pas vous sera expliqué. Vous pouvez toujours venir à la clinique pour poser des questions concernant cette étude.
- Vous aurez un examen gynécologique et des échantillons seront prélevés pour détecter toute infection, y compris l'infection gonococcique et chlamydiale.

A la dernière visite, nous allons encore prélever du sang à la face interne de votre coude (7ml, équivalent du contenu d'une cuillère à thé) pour un test de VIH.

Quels échantillons allons-nous conserver et comment allons-nous les utiliser ?

Nous allons conserver vos échantillons sanguins et les prélèvements vaginaux que nous vous avons demandé de fournir à chaque visite de suivi.

Vos échantillons ne seront utilisés que pour rechercher des preuves supplémentaires d'infection par le VIH ou d'autres agents infectieux, des atteintes causés par l'infection ou la réponse de votre organisme à l'infection (tel que l'examen des cellules, des protéines et autres éléments chimiques dans votre corps). Les tests peuvent aussi inclure l'examen de vos gènes (ADN), étant donné qu'ils pourraient affecter votre réaction à la maladie de manières importantes. Vos gènes pourraient vous rendre plus ou moins sensible au risque d'infection, vos réactions à l'infection ou au traitement plus fortes ou plus faibles, ou faire progresser le VIH plus rapidement ou plus lentement. Aucun autre type de test génétique ne sera fait par quiconque sur votre sang conservé sans vous avoir d'abord expliqué le test et obtenu votre permission.

Les chercheurs n'envisagent pas de vous contacter ou de contacter votre médecin traitant avec les résultats des tests effectués sur vos échantillons. La raison en est que les tests de recherche sont souvent faits avec des procédures expérimentales, si bien que les résultats d'une étude de recherche ne sont pas généralement utiles pour prendre des décisions ou pour gérer votre santé. Si une situation rare se présentait où les chercheurs décident qu'un résultat spécifique de test fournirait des informations importantes pour votre santé, les chercheurs en informeront votre docteur de l'étude et celui-ci essayera d'entrer en contact avec vous. Si vous souhaitez être contactée pour ce type de résultat de test, vous devez donner au docteur ou à l'infirmière de l'étude tout changement dans votre adresse et/ou numéro de téléphone.

Vos échantillons sanguins et autres ne seront pas vendus ou utilisés directement pour produire des produits commerciaux. Les études de recherche utilisant vos échantillons seront examinées par un comité dans une institution de chercheurs (Conseil Institutionnel).

Nous allons conserver vos échantillons pendant dix ans, suite à quoi, ils seront détruits. Seuls les chercheurs autorisés auront accès aux échantillons et ils n'auront aucune information qui vous identifie.

Quels sont les risques éventuels pour vous de participer à cette étude?

Risque lié à l'examen gynécologique et au prélèvement sanguin

Il y a un risque de s'évanouir, de s'infecter, d'avoir des contusions, une inflammation et des douleurs à l'endroit où le sang a été prélevé.

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (6/11)

Vous pouvez connaître un certain inconfort lors de l'examen gynécologique.

Risque lié à l'utilisation du gel

Vous pouvez avoir une irritation sur vos parties intimes causée par le gel. L'utilisation du gel peut augmenter le risque de développer une infection par des levures ou autre infection vaginale. Les symptômes comprennent des démangeaisons, des pertes et/ou une odeur. Vous pouvez aussi avoir de petits saignements en utilisant le gel. Vous pouvez toujours venir à la clinique entre les visites si vous avez ces effets secondaires. Si vos tests de recherche d'une infection sont positifs, vous recevrez un traitement gratuit.

Si vous devenez enceinte pendant l'étude, nous allons mettre fin à votre utilisation du gel car nous ne connaissons pas l'effet sur l'enfant que vous porterez. Nous allons vous demander de suivre toutes les autres procédures. L'investigateur discutera avec vous de vos options si vous devenez enceinte. Nous allons demander votre permission pour être informés de l'issue de votre grossesse. Nous allons vous fournir des condoms masculins pendant l'étude, mais pas d'autres méthodes contraceptives.

Tout produit que vous pouvez mettre dans votre vagin ou le simple fait d'avoir des relations sexuelles peuvent causer des lésions et certaines de ces lésions peuvent augmenter votre risque de devenir séropositive pour le VIH.

Dans une petite étude sur 36 hommes, le SC était sans risque pour une application sur le pénis. Cependant, il y a une petite chance que votre partenaire homme se sente un peu mal à l'aise, qu'il ait des démangeaisons, ou une irritation quand vous utilisez le gel. Vos partenaires sexuels peuvent se fâcher si vous utilisez le gel. Nous vous demandons de signaler ce genre de choses au personnel de l'étude. Si vous souhaitez discuter de votre participation avec un (des) partenaire(s) masculins, veuillez le faire. Vous pouvez aussi l'amener ou les amener à la clinique pour parler au personnel.

Il peut y avoir des effets secondaires que nous ne connaissons pas.

Risque lié à la connaissance des résultats du test VIH

Vous pouvez être en colère et désespérée si vous vous rendez compte que vous êtes infectée par le VIH ou toute autre IST pendant votre participation à l'étude. Si vous devenez séropositive, vous pouvez rester dans l'étude si vous le souhaitez. Nous allons traiter gratuitement toute IST guérissable et vous référer pour toute autre prise en charge ; si vous devenez séropositive, l'investigateur vous donnera les détails concernant votre prise en charge.

Quels sont les avantages éventuels de participer à cette étude?

Nous allons vous donner des condoms gratuits et vous montrer comment les utiliser. Nous allons vous examiner tous les trois mois et vous traiter gratuitement pour toute IST guérissable. Vous pouvez discuter avec un conseiller de l'étude. Il/elle peut vous aider à avoir des réponses à vos questions sur l'étude et sur votre santé.

Votre participation à cette recherche apportera des avantages à la société en répondant à une question importante de recherche à savoir si le gel de SC peut prévenir le VIH, l'infection gonococcique et chlamydiale chez les femmes.

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (7/11)

Quel traitement allez-vous recevoir ?

Nous allons traiter toute IST guérissable, y compris l'infection gonococcique et chlamydiale. Nous prendrons en charge tout état qui constitue une conséquence directe de votre participation à cet essai. Si vous devenez séropositive, vous pourrez parler à l'un des conseillers de l'étude qui pourra vous aider à discuter des questions que vous pouvez vous poser. Nous allons vous référer pour une prise en charge et vous donner toute information qui peut vous aider. L'investigateur peut vous donner les détails sur la manière dont on va s'occuper de vous. Nous n'allons pas traiter une autre maladie ou état qui ne serait pas lié(e) à cette étude et nous n'allons pas non plus payer pour la contraception, sauf le condom masculin.

Que se passera-t-il si vous décidez de ne pas participer à l'étude ou de mettre fin à votre participation ?

Vous êtes libre de décider si vous voulez participer à cette étude ou non. Vous pouvez arrêter votre participation quand vous le voulez. Votre décision n'affectera pas les soins de santé que vous deviez normalement recevoir. Nous souhaiterions que vous nous informiez si vous voulez arrêter votre participation et nous vous prions de venir à la clinique pour les procédures finales.

Vous pouvez décider de participer à l'étude mais de ne pas avoir vos échantillons conservés au-delà de la durée de l'étude elle-même. Dans ce cas, vous n'avez pas besoin de donner un prélèvement vaginal lors des visites de suivi. Si vous décidez maintenant que vos échantillons peuvent être conservés, vous pouvez par la suite changer d'avis à tout moment. Contactez l'infirmière ou le docteur de l'étude et vos échantillons seront détruits (après l'achèvement total de l'étude).

Nous allons vous demander de quitter l'étude si :

- Le docteur ou le personnel de l'étude pense que cela est préférable pour vous,
- L'étude est arrêtée ou
- Vous êtes en dessous de l'âge approuvé pour participer à l'étude.

Nous vous informerons si nous apprenons quelque chose de nouveau concernant le SC et qui pourrait affecter votre choix de rester dans l'étude.

Qu'en est-il de la confidentialité ?

Nous allons protéger les informations concernant vous-même et votre participation à cette recherche autant que nous pouvons le faire. Vos échantillons seront étiquetés avec un code seulement. Cependant, le personnel de CONRAD, de FHI, de la FDA, des Conseils Institutionnels et de l'USAID peuvent avoir besoin de regarder vos données.

Que se passera-t-il si vous ne pouvez pas venir à un rendez-vous ou si vous manquez un rendez-vous ?

Si vous savez que vous ne pourrez pas venir à un rendez-vous, veuillez en informer le personnel et il reprogrammera le rendez-vous. Si vous manquez un rendez-vous déjà fixé, un membre du personnel tentera de vous contacter par les moyens que vous avez acceptés

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (8/11)

quand vous avez commencé à participer. Le membre du personnel vous demandera si vous voulez toujours participer à la recherche et programmera une autre visite. Lorsque ce contact sera effectué, vous ne serez pas identifiée comme une participante à ce projet de recherche.

Allez-vous recevoir une indemnisation pour cette visite de recrutement?

Vous allez recevoir 2 500 FCFA lors de cette visite.

Pour les 11 visites mensuelles et la visite finale, votre indemnisation se fera de la façon suivante :

- De visite 1 à visite 3 : 3000 FCFA par visite ;
- De visite 4 à visite 6 : 3500 FCFA par visite ;
- De visite 7 à visite 9 : 4000 FCFA par visite ;
- De visite 10 à visite 11 : 4500 FCFA par visite ;
- Si vous achevez l'étude, vous recevrez 5000 FCFA lors de votre dernière visite à 12 mois, pour un total de 48 000 FCFA.

Cet argent vous est donné pour votre temps, pour le désagrément et les frais de transport. Vous ne serez pas payée pour les visites non-programmées.

Vous n'aurez pas de compensation supplémentaire pour la conservation de vos échantillons.

Cela va-t-il vous coûter quelque chose?

Il n'y a pas de coûts à votre charge pour votre participation à cette étude. CONRAD paye les investigateurs pour la conduite de l'étude et toutes les dépenses liées à l'étude.

Que se passera-t-il si vous avez un problème ou d'autres questions?

Si vous avez un problème qui serait, à votre avis, lié à votre participation à cette recherche ou si vous avez des questions, veuillez appeler **Dr Fernand Guédou au téléphone 21 31 49 27 ou 90 94 71 58**. Si vous avez besoin d'aide, nous pouvons vous référer à un endroit où vous aurez peut-être à payer.

Que se passera-t-il si vous êtes malade ou si vous avez un problème de santé?

Veuillez téléphoner au **21 31 49 27 ou 90 94 71 58** ou revenir immédiatement à la clinique, à tout moment pendant l'étude si vous:

- tombez malade, ou
- pensez être enceinte, ou
- pensez avoir une IST ou
- avez d'autres préoccupations concernant votre santé.

Si vous êtes malade ou si vous avez un problème de santé directement causé par votre participation à cette recherche, vous n'aurez pas à payer pour les visites pour voir le docteur de la recherche/personnel de la clinique. Si vous avez une autre maladie quelconque, vous devrez payer pour votre traitement. Si vous avez besoin d'aide, nous allons vous référer à d'autres cliniques où vous aurez peut-être à payer.

Vos droits en tant que participante

Cette recherche a été examinée et approuvée par les CI de CONRAD, du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec (Canada) ainsi que par le Comité d'éthique

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (9/11)

national du Bénin. Un Conseil Institutionnel (CI) ou Comité d’Ethique (CE) est un comité qui examine les études de recherche afin d’aider à protéger les participants. Si vous avez des questions sur vos droits en tant que participante à cette recherche vous pouvez contacter un membre de la clinique et éventuellement **Professeur Ayité Léon MEDJI, Président du Comité d’Ethique de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, Service d’ORL au Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU) de Cotonou, Bénin. Tel : 21 30 01 55 / 21 30 06 56 ; Poste 5004.**

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (10/11)

CONSENTEMENT DE LA PARTICIPANTE (ETUDE)

Le document ci-dessus décrivant les avantages, les risques et les procédures de la recherche intitulée Essai randomisé contrôlé de l'effet du Gel de Sulfate de Cellulose 6% sur la transmission vaginale du VIH m'a été lu et expliqué. L'occasion m'a été donnée de poser toutes les questions sur la recherche et les réponses m'ont donné satisfaction. J'accepte de participer en tant que volontaire.

Date

Signature ou marque de la participante

Nom en lettres d'imprimerie de la
participante

Si les participantes ne peuvent pas lire le formulaire elles-mêmes, un témoin (pas le membre du personnel qui a obtenu le consentement) doit signer ici:

J'étais présent (e) pendant tout le processus de consentement éclairé avec le volontaire. Toutes les questions du volontaire ont eu des réponses et le volontaire a accepté de participer à la recherche.

Date

Signature du témoin

Nom en lettres d'imprimerie du témoin

Je certifie que la nature et l'objet, les avantages éventuels et les risques possibles liés à la participation à l'étude sur le SC ont été expliqués à la personne nommée ci-dessus.

Date

Signature de la personne qui a obtenu le consentement

Nom de la personne qui a obtenu le consentement

Une copie signée de cette fiche de consentement a été remise à la participante.

Initiales:

Date:

Annexe 2.16 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en français (11/11)

**CONSENTEMENT DE LA PARTICIPANTE
(CONSERVATION DES ECHANTILLONS)**

Le document ci-dessus y compris la description de la gestion des échantillons dans la recherche intitulée Essai randomisé contrôlé de l'effet du Gel de Sulfate de Cellulose 6% sur la transmission vaginale du VIH m'a été lu et expliqué. L'occasion m'a été donnée de poser toutes les questions sur la recherche et des réponses m'ont été données à ma satisfaction. J'accepte que des prélèvements soient faits sur moi à des fins de conservation et de tests pour une recherche future. Mes échantillons seront détruits après dix ans.

-----Oui-----Non

Date

Signature ou marque de la participante

Nom en lettres d'imprimerie de la
participante

Si les participantes ne peuvent pas lire le formulaire elles-mêmes, un témoin (pas le membre du personnel qui a obtenu le consentement) doit signer ici:

J'étais présent (e) pendant tout le processus de consentement éclairé avec le volontaire sur l'obtention et la conservation des échantillons. Toutes les questions du volontaire ont eu des réponses et le volontaire a accepté que les échantillons prélevés sur lui soient traités comme décrit ci-dessus.

Date

Signature du témoin

Nom en lettres d'imprimerie du témoin

Je certifie que le traitement et la conservation des échantillons dans le cadre de cette étude sur le SC ont été expliqués à la personne nommée ci-dessus.

Date

Signature de la personne qui a obtenu le consentement

Nom de la personne qui a obtenu le consentement

Une copie signée de cette fiche de consentement a été remise à la participante.

Initiales:

Date:

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (1/10)

PROJET D'APPUI À LA LUTTE CONTRE LE SIDA EN AFRIQUE DE L'OUEST / SIDA 3

ENROLLMENT AND SPECIMEN STORAGE CONSENT FORM

Title: Randomized Controlled Trial of 6% Cellulose Sulfate Gel and the Effect on Vaginal HIV Transmission

Sponsor:

CONRAD
1611 North Kent Street, Suite 806
Arlington, Virginia 22209
USA

CONRAD receives its funds from the USA government and from private donors.

Site : Benin

Clinic: Dispensaire IST = 1 ; Waly Diop = 2 / _ / (Please circle the appropriate clinic and write the corresponding number in the case)

Investigators: Prof. Michel Alary (Principal Investigator)
Unité de recherche en santé des populations
Centre hospitalier affilié universitaire de Québec,
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, CANADA

Dr Fernand Guédou (Co-investigator)
Research Associate at « Groupe de Recherche, d'Action et de Formation en Epidémiologie et Développement » (GRAFED) Cotonou
Consultant at Projet SIDA3-Benin
Cotonou BENIN

Prof. Sévérin Anagonou (Co-investigateur)
Professeur de Bactériologie -Virologie
à la Faculté des Sciences de la Santé
Université d'Abomey-Calavi
Chef du Service de Microbiologie du Centre National Hospitalier et
Universitaire (CNHU) de Cotonou (Bénin)

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (2/10)

Introduction

This consent form contains information about the study named above. In order to be sure that you are informed about being in this study, we are asking you to read (or have read to you) this consent form. If you decide to be in this study, you will also be asked to sign it or make your mark in front of a witness. We will also ask if you agree that we store your samples for future research. We will offer you a signed copy of this form. This is a research study that only includes people who choose to take part. Please take your time to make a decision and feel free to ask any question you may have.

What is the reason for the study?

This study is researching a new investigational vaginal gel. An investigational gel means that it has not been approved yet by the authorities for distribution on the market. The gel contains cellulose sulfate (CS). The reason for the cellulose sulfate study is to determine whether the CS gel can protect women from getting infected with HIV, gonococcal and chlamydial infection, through vaginal sex.

Why are you being asked to take part?

You are invited to participate in this study because you have had at least three different partners in the last three months and you have an average of three vaginal sexual acts per week. You think that it is likely that you will continue this behavior for the period you will be in this study, that is, for 12 months. We will not discontinue you from the study if you change your behavior.

This behavior puts you at risk of getting HIV. Some of the women in this trial will become infected with HIV because of this behavior.

Reasons why you cannot be in this study are: being younger than 18 years; have an average of less than three vaginal sex acts per week and not had at least three different partners in the last three months or when you think your sexual behavior will change; being HIV positive; not being able to keep to the study visit schedules and procedures; inject yourself with drugs; if you are allergic to condoms or spermicides; if you want to have a child within the next year; if you are in another trial or if the investigator thinks your participation may be unsafe.

Information about HIV, gonococcal and chlamydial infection

HIV is the virus that causes AIDS. An important way for HIV to spread is during sex and there is no cure. Gonococcal and chlamydial infections are also spread during sex, and can be cured with medicines. The best way to prevent HIV, gonococcal and chlamydial infections is not having sex. If you have sex, your risk of HIV, gonococcal and chlamydial infections is smaller if your sex partners use condoms for every sexual act. Multiple partners increase your risk of becoming infected. Sex in the anus has a much higher risk of getting you infected than vaginal sex.

General information about the study and the study products

We are doing a study to see if CS can protect women from getting infected with HIV, gonococcal and chlamydial infection through vaginal sex. CS is a gel that is put into the vagina before sex. **We do not know if CS can prevent HIV, gonococcal and**

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (3/10)

chlamydial infection. It is possible that CS may prevent pregnancy but we are not certain and we do not know the effects and safety of the gel during pregnancy. You must have a negative pregnancy test before you join this study. If you become pregnant during the study you should tell your study doctor or nurse right away. Your study gel will be stopped, we will ask you to continue the monthly clinic visits and the study clinician will discuss your choices with you. We will not cover any expenses related to the pregnancy.

We will compare CS with a placebo gel in this study. A placebo is an inactive gel that looks and feels like the CS gel, but does not contain any medicine. **We know that the inactive gel does not protect women from HIV, gonococcal or chlamydial infection, or pregnancy.** Condoms can prevent pregnancy and can reduce your risk of HIV, gonococcal and chlamydial infection. That is why it is important to try to use condoms with the gel each time you have sex. We will give you free condoms. We will teach you how to use the gel and the condoms. We strongly advise you to refrain from having anal sex.

There will be six (6) groups in the study. Women in three (3) of the groups will use CS. Women in the other three (3) groups will use the placebo. Half the women will use CS, and half the women will use the placebo. A computer will choose your group. All the gels will come in applicators. All applicators will look the same. You will not know which gel you are using. None of the study staff will know which group will be chosen for you. To be in this study you must agree to use the gel the computer selects for you. It is important that you use only the gels given to you. You should not use gels given to someone else or give your gels to anyone.

You may continue your normal routine for vaginal hygiene. We recommend that if you wash your vagina, you use water only, and that you try not to use other intravaginal products while you are in this study, except for tampons and other devices that you use during your monthly periods.

How many people will take part in the study and how long will the study last?

About 2,600 women will be recruited in different countries. The study will last for about two-three years in each center. Each woman will be asked to use the study gel and condoms for each vaginal sexual act for one year, to come back to the clinic every month and to be tested for HIV.

What is your part in the study?

If you decide to be in the study, you must come for a scheduled visit each month for 12 months. It is very important you do not miss any of these visits.

Enrollment Visit

At today's visit, you will:

- sign this consent form (or make your mark in front of a witness)
- have a pelvic (your inner parts) examination during which samples for the diagnosis of an infection will be taken
- have a counseling session on HIV testing

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (4/10)

- have blood (7 ml, like a teaspoon) taken from your inner elbow for an HIV test
- give urine for a pregnancy test
- give your contact information
- receive your study gel and condoms

We will give you the gel that the computer has chosen for you. You should use one applicator of gel and a condom each time you have vaginal sex. If you are unable to use a condom, be sure to use your gel. We will show you how to use the gel and the condoms. You may not use the gel in your anus or in the mouth.

If you run out of gel or condoms before your next visit, please return to the clinic to get more.

Follow-Up Visits

It is very important that you come to each monthly visit. Study staff will give you more condoms and gels at each of the visits. Please return to the study office if you run out of condoms or gels before your scheduled appointments. We ask that you use only the condoms and gels that we give you. We ask that you do not put other products in your vagina, except when you have your period. If you do use other products in your vagina, please tell the study staff.

At each follow-up visit you will:

- be asked some questions about your sexual behavior, gel and condom use and about any problems you may have
- have a safer sex counseling session
- give urine for a pregnancy test
- be asked to provide a self-collected vaginal swab for future testing
- be asked if your contact information is still correct

At the first, third, sixth and ninth follow-up visits, we will take a little blood by pricking your finger to do an HIV test. We will give you a counseling session before and after the HIV test. If your HIV result becomes positive, a counselor will talk to you and you will be referred for support, advice and care. The investigator will give you details on how your care will be looked after. You may continue your participation in the study.

Every three months you will:

- be asked questions to see whether you still remember the information we gave you when you started in the study. Whatever you do not remember will be explained to you. You may always come to the clinic and ask any question you may have with regard to this study.
- have a gynecological examination and samples will be taken to detect any infection, including gonococcal and chlamydial infection.

At the last visit we will again take blood from your inner elbow (7 ml, like a teaspoon) for an HIV test.

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (5/10)

Which samples will we store and how will we use them?

We will store your blood samples and the swabs that we asked you to provide at each follow-up visit.

Your samples will only be used to look for additional evidence of infection with HIV or other infectious agents, damage caused by infection, or your body's response to infection (such as examining cells, proteins, and other chemicals in your body). Tests may also include examining your genes (DNA), since they might affect your response to disease in important ways. Your genes might make you more or less susceptible to becoming infected, your responses to infection or to treatment stronger or weaker, or make HIV progress more rapidly or slowly. No other kinds of genetic test will be done by anyone on your stored blood without first explaining the test to you and obtaining your permission.

The researchers do not plan to contact you or your regular doctor with any results from tests done on your stored samples. This is because research tests are often done with experimental procedures, so the results from one research study are generally not useful for making decisions on managing your health. Should a rare situation come up where the researchers decide that a specific test result would provide important information for your health, the researchers will notify your study doctor and your study doctor will try to contact you. If you wish to be contacted with this type of test result, you must give the study doctor or nurse any change to your address and/or phone number.

Your blood or other samples will not be sold or used directly to produce commercial products. Research studies using your samples will be reviewed by a committee at the researcher's institution (an Institutional Review Board).

We will store your samples for ten years, after which they will be destroyed. Only approved researchers will have access to the samples and they will not have any information that identifies you.

What are the possible risks of being part of this study?

Risk related to pelvic exam and blood drawing

There is a risk of fainting, infection, bruising, swelling, and pain at the site of blood drawing.

You may experience some discomfort if you have a pelvic exam

Risk related to gel use

You may experience irritation at your private parts from the gel. Use of the gel may increase the chance that you develop a yeast infection or another vaginal infection. Symptoms include itching, discharge and/or odor. You may also experience some minor blood loss when using the gel. You may always come to the clinic between visits if you experience such side effects. If your tests for an infection are positive, you will receive treatment free of charge.

If you become pregnant during the study, we will stop your gel use since we do not know the effect on the unborn child. We will ask you to follow all the other procedures. The investigator will discuss with you all your options when you are pregnant. We will ask your permission to be informed of your pregnancy outcome. We will provide male condoms during the study but no other contraceptive methods.

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (6/10)

Any product that you put in your vagina or simply having sex may cause lesions and some of these lesions may increase your risk of becoming HIV infected.

In a small study of 36 men, CS was safe to put on the penis. However, there is a small chance that your male partner may have some discomfort, itching, or irritation when you use the gel. Your sexual partners may become upset when you use the gel. We ask that you report any such events to the study staff. If you would like to discuss your study participation with (a) male partner(s), please do so. You may also bring him to the clinic to talk to the staff.

There may be side effects that we do not know.

Risk of knowing test results

You may feel angry and distressed if you become infected with HIV, or any other sexually transmitted infection (STI) while in the study. When you become HIV positive, you may stay in the study if you wish. We will treat any curable STI for free and refer for support and care; if you become HIV positive the investigator will give you the details with regard to your care.

What are your possible benefits of taking part in this study?

We will give you free condoms and show you how to use them. We will examine you every three months and treat any curable STI for free. You may speak with a study counselor. He or she may help you with questions about the study and your health.

Your participation in this research will benefit society by answering an important research question about whether CS gel can prevent HIV, gonococcal and chlamydial infection in women.

Which treatment you will receive?

We will treat any curable STI, including gonococcal and chlamydial infection. We will take care of any condition that is a direct consequence of your participation in this trial. If you become HIV positive, you will be able to speak to one of the study counselors who can help you with questions you may have. We will refer you for support and care and give any other information that may help you. The investigator will give you the details on how you will be taken care of. We will not treat any other disease or condition not associated to this study, nor will we pay for contraception, except for the male condom.

What if you decide not to be in the study or stop your participation?

You are free to decide if you want to be in this study. You may stop your participation whenever you wish. Your decision will not affect the health care you would normally receive. We would like you to let us know if you want to stop your participation and to come to the clinic for the final procedures.

You may decide to participate in the study but not to have your samples stored beyond the duration of the study itself. In this case, you do not need to give a swab at the follow-

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (7/10)

up visits. If you decide now that your samples may be stored, you may change your mind at any time. Contact the study nurse or doctor and your samples will be destroyed (after total study completion).

We will ask you to leave the study if:

- the study doctor or staff feels it is best for you,
- the study is stopped, or
- you were below the approved age for being in the study.

We will tell you if we learn something new about CS that could affect your choice to stay in the study.

What about confidentiality?

We will protect information about you and your taking part in this study to the best of our ability. You will not be named in any reports. Your samples will be labeled with a code only. However, the staff of CONRAD, Family Health International, the United States Food and Drug Administration and USAID may sometimes look at your research records.

What if you cannot come to an appointment or missed an appointment?

If you know you will not be able to come to an appointment, please let the staff know and they will reschedule the appointment. If you miss a scheduled appointment, a staff member will try to contact you in the way you approved when you started your participation. The staff member will ask if you still want to take part in the research and schedule another visit. When this contact is made you will not be identified as being in this research.

Will you receive a compensation for being in this study?

You will receive 2 500 FCFA at this visit.

For your 11 scheduled monthly and the final visits, your compensations will be as follows:

- From visit 1 to visit 3: 3000 FCFA per visit;
- From visit 4 to visit 6: 3500 FCFA per visit;
- From visit 7 to visit 9: 4000 FCFA per visit;
- From visit 10 to visit 11: 4500 FCFA per visit;
- If you complete the study, you will receive 5 000 FCFA at your final 12-month study visit for a total of 48 000 FCFA.

This money will cover your time, inconvenience and transportation costs. You will not get payment for unscheduled visits.

You will not get any additional compensation for the storage of your samples.

Are there any costs for you?

There are no costs for you for participating in this study. CONRAD pays the investigators for conducting the study and for all study-related expenses.

What if you have a problem or have other questions?

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (8/10)

If you have a problem that you think might be related to this study or any questions about the study, please call **Dr Fernand Guédou** at telephone **21 31 49 27** or **90 94 71 58**. If you need more help, we may give you a referral where you may have to pay.

What if you get sick or have a health problem?

Please phone **21 31 49 27** or **90 94 71 58** or come back to the clinic right away, at any time during the research, if you:

- get sick, or
- think you are pregnant, or
- think you may have a STI, or
- have other concerns about your health.

If you are sick or have a health problem due to your participation in this research, you will not have to pay for visits to see the research doctor or staff. If you have any other illness, you will have to pay for your treatment. If you need more help, we will refer you to other clinics, where you may have to pay.

Your rights as a participant

This research has been reviewed and approved by IRB of CONRAD, the IRB of the Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec (CANADA) and a national ethics committee in Benin. An IRB is a committee that reviews research studies in order to help protect participants. If you have any questions about your rights as a research participant you may contact a member of the staff at the clinic and possibly **Professeur Ayité Léon MEDJI, Président du Comité d’Ethique de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, Service d’ORL au Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU) de Cotonou, Bénin. Tel : 21 30 01 55 / 21 30 06 56 ; Poste 5004.**

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (9/10)

VOLUNTEER AGREEMENT (STUDY)

The above document describing the benefits, risks and procedures for the research titled 6% Cellulose Sulfate Gel Study for the effect on vaginal HIV transmission has been read and explained to me. I have been given an opportunity to have any questions about the research answered to my satisfaction. I agree to participate as a volunteer.

Date

Signature or mark of volunteer

Printed name of volunteer

If volunteers cannot read the form themselves, a witness (not the staff member who consented the participant) must sign here:

I was present throughout the entire informed consent process with the volunteer. All questions from the volunteer were answered and the volunteer has agreed to take part in the research.

Date

Signature of witness

Printed name of witness

I certify that the nature and purpose, the potential benefits, and possible risks associated with participating in this research have been explained to the above individual.

Date

Signature of person who obtained consent

Printed name of person who obtained consent

A signed copy of this consent form was offered to the participant.

Initials: _____ Date: _____

Annexe 2.17 : Formulaire de consentement au recrutement et à la conservation des échantillons en anglais (10/10)

VOLUNTEER AGREEMENT (SAMPLES STORAGE)

The above document including the description of the handling of specimens in the study research titled 6% Cellulose Sulfate Gel Study for the Effect on Vaginal HIV Transmission has been read and explained to me. I have been given an opportunity to have any questions answered to my satisfaction. I agree to have samples taken for the purpose of storage and testing for future research. My samples will be destroyed after ten years.

_____ Yes

_____ No

Date

Signature or mark of volunteer

Printed name of volunteer

If volunteers cannot read the form themselves, a witness (not the staff member who consented the participant) must sign here:

I was present throughout the entire session on specimen handling with the volunteer. All questions from the volunteer were answered and the volunteer has agreed to have her samples processed as described above.

Date

Signature of witness

Printed name of witness

I certify that the specimen handling for this research study has been explained to the above individual.

Date

Signature of person who obtained consent

Printed name of person who obtained consent

A signed copy of this consent form was offered to the participant.

Initials:

Date: