

# Изучение чувствительности *Atopobium vaginae* к деквалиния хлориду

Guido Lopes dos Santos Santiago<sup>1</sup>, Philipp Grob<sup>2</sup>, Hans Verstraelen<sup>3</sup>, Florian Waser<sup>2</sup>, Mario Vaneechoutte<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Bacteriology Research, Faculty Medicine & Health Sciences, University of Ghent, De Pintelaan 185, Ghent 9000, Belgium

<sup>2</sup>Medinova AG, Eggbuehlstrasse 14, Zurich 8052, Switzerland

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, De Pintelaan 185, Ghent, Belgium

BMC Research Notes 2012, 5:151

**История вопроса.** *Atopobium vaginae* и *Gardnerella vaginalis* являются основными маркерами бактериального вагиноза. Целью исследования было определение диапазонов минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) для антибактериальных веществ широкого спектра действия и антисептика деквалиния хлорида по отношению к 28 штаммам микроорганизмов, принадлежащих к 4 видам рода *Atopobium*, а именно *A. vaginae*, *A. minutum*, *A. rimaе* и *A. parvulum*.

**Методы.** МИК определялась в специальной среде с микро-разведением.

**Результаты.** МИК и МБК деквалиния хлорида для *Atopobium* spp. варьировали между <0,0625 и 2 мкг/мл.

**Выводы.** Исследование показало, что деквалиния хлорид ингибирует и убивает клинически изолированные штаммы *A. vaginae* в концентрациях, подобных клиндамицину и меньших, чем при использовании метронидазола.

Бактериальный вагиноз (БВ) является полимикробным состоянием, при котором лактобациллы перестают быть преобладающей частью микрофлоры влагалища, а количество анаэробов, таких, как *Atopobium vaginae* и *Gardnerella vaginalis*, возрастает [1, 2]. БВ является наиболее распространенной причиной вагинальных выделений среди женщин детородного возраста [3].

На данный момент существуют два рекомендуемых метода лечения БВ: с применением метронидазола перорально и клиндамицина вагинально [4], при этом для обоих препаратов эффективность терапии на протяжении одного месяца составляет от 60% до 90% [5, 6]. Однако частота рецидивов БВ остается высокой, у 30–50% женщин рецидивы наблюдаются через 2–3 месяца после проведенной терапии, а у 50–70% – в течение 6–12 мес [3, 5, 6]. Существуют данные о резистентности БВ-ассоциированных анаэробных бактерий к метронидазолу (1%) по сравнению с 17% базовой резистентностью к клиндамицину, которая возросла до 53% при повторных курсах терапии [7]. Кроме того, ряд авторов приводят данные о резистентности *A. vaginae* к метронидазолу [8–10].

Поскольку клиническая и микробиологическая эффективность терапии БВ метронидазолом, другими 5-нитроимидазолами и клиндамицином не является полностью удовлетворительной, характеризуется высокой частотой рецидивов [3, 5–9], то альтернативные методы лечения, такие, как местное применение антимикробных препаратов широкого спектра действия и антисептиков, могли бы предложить решение для нивелирования возможной резистентности к антибиотикам.

Одним из таких антисептиков является деквалиния хлорид, который имеет широкий спектр бактерицидной активности против аэробных и анаэробных бактерий, а также дрожжевых грибов [11], клиническая эффективность и безопасность которого при лечении БВ и других вагинальных инфекций, была установлена ранее [12–14].

**Цель исследования:** определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) деквалиния хлорида для штаммов микроорганизмов рода *Atopobium*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Бактериальные штаммы*

Три штамма *A. vaginae* (CCUG 44258, CCUG 44125 и CCUG 38953<sup>T</sup>) и по одному штамму *A. minutum* (CCUG 31167), *A. rimaе* (CCUG 31 168), *A. parvulum* (CCUG 32760), *Bacteroides fragilis* ATCC 25285<sup>T</sup> были получены из банка культур университета Гетеборга, Швеция (CCUG).

Остальные изученные штаммы были выделены клинически в ходе исследования в период с 2003 по 2010 г. (табл. 1), переносились в анаэробные условия (при 37 °C в течение не менее 3 дней) и культивировались с использованием Colombia agar (Becton Dickinson (BD), Erembodegem, Бельгия), Schaedler agar (BD) или Tryptic Soy Agar (BD) с добавлением 5% овечьей крови. Все штаммы были идентифицированы с помощью 16S рПНК-геной последовательности.

### *Микро-разведений раствор для анализа*

10 240 мкг/мл исходного раствора деквалиния хлорида готовили путем растворения 102,4 мг деквалиния хлорида в 10 мл воды, прошедшей высокоэффективную жидкостную хроматографию. Деквалиния хлорид растворяли с помощью ультразвука (Labsonic 1510, В. Брауэра Melsungen, Germany) в течение 5 мин при 150 Вт и инкубации на водяной бане (37°C) в течение 2 ч.

Серия разведений в пределах 512 мкг/мл – 0,0625 мкг/мл деквалиния хлорида была использована и протестирована в двух экземплярах.

Подготовленный Brucella agar был дополнен витамином К (1 мкг/мл), геминном (5 мкг/мл) и очищенной лошадиной кровью (5%) [10] и перед использованием в течение 2 ч находился в анаэробной камере при 37°C. Все штаммы *Atopobium* spp. высевали на Colombia agar и культивировали в течение 72 ч в анаэробной камере (BugBox, LedTechno, Heusden-Zolder, Бельгия) при 37°C. Каждый штамм суспендировали в физиологическом растворе до 1-й плотности по McFarland ( $3 \times 10^8$  cfu/ml), 1 мл полученной суспензии центрифугировали в течение 5 мин при 7000 дж, затем 900 мкл суспензии удалялись. Оставшиеся 100 мкл бактериальной суспензии вносили в 5 мл предварительно подготовленного Brucella agar в анаэробной камере при температуре 37°C с получением конечной нагрузки  $6 \times 10^6$  КОЕ/мл (колониеобразующая единица/мл) и гомогенизировали.

Для каждого из шести штаммов были использованы два титрационных 96-луночных микропланшета (Axugen, Сан-Франциско, Калифорния). Планшет 1,1 содержал концентрации деквалиния хлорида от 512 мкг/мл до 8 мкг/мл в рядах от А до G и не содержал препарат в ряде H.

Планшет 1,2 содержал от 4 мкг/мл до 0,0625 мкг/мл деквалиния хлорида в рядах от А до G и не содержал препарат в ряде H.

Значения МИК и МБК деквалиния хлорида для 4 видов рода *Atopobium*

Тест №	Вид	Штамм	МИК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)
ST1	<i>Atopobium vaginae</i>	CCUG 44125	0,25	0,25
ST2	<i>Atopobium rimae</i>	CCUG 31168	1	1
ST3	<i>Atopobium vaginae</i>	FB101-3	0,5	0,5
ST4	<i>Atopobium vaginae</i>	FB106b	<0,0625	<0,0625
ST5	<i>Atopobium vaginae</i>	VMF0914COL43	<0,0625	<0,0625
ST6	<i>Atopobium vaginae</i>	VMF0914COL13	<0,0625	<0,0625
ST7	<i>Atopobium vaginae</i>	VMF0907COL23	<0,0625	<0,0625
ST8	<i>Atopobium vaginae</i>	PB2003/009-T1-4	<0,0625	<0,0625
ST9	<i>Atopobium vaginae</i>	PB2003/017-T1-2	<0,0625	<0,0625
ST10	<i>Atopobium vaginae</i>	BVS067	<0,0625	<0,0625
ST11	<i>Atopobium vaginae</i>	CCUG 44258	0,0625	0,0625
ST12	<i>Atopobium vaginae</i>	FB145-BA-14A	<0,0625	<0,0625
ST13	<i>Atopobium vaginae</i>	FB106B	0,0625	0,0625
ST14	<i>Atopobium vaginae</i>	FB158-CNA-2C	<0,0625	<0,0625
ST15	<i>Atopobium vaginae</i>	FB160-CNAB-7A	<0,0625	<0,0625
ST16	<i>Atopobium vaginae</i>	FB160-CNAB-7	<0,0625	<0,0625
ST17	<i>Atopobium vaginae</i>	FB130-CNAB-2aD	0,5	0,5
ST18	<i>Atopobium vaginae</i>	FB010-06	<0,0625	<0,0625
ST19	<i>Atopobium vaginae</i>	CCUG 38953T	<0,0625	<0,0625
ST20	<i>Atopobium vaginae</i>	FB106C	0,0625	0,0625
ST21	<i>Atopobium vaginae</i>	FB101-3C	<0,0625	<0,0625
ST22	<i>Atopobium vaginae</i>	BVS068	0,5	0,5
ST23	<i>Atopobium parvulum</i>	VMF1313W43	2	2
ST24	<i>Atopobium parvulum</i>	VMF1620W23	2	2
ST25	<i>Atopobium parvulum</i>	CCUG 32760	1	1
ST26	<i>Atopobium minutum</i>	CCUG 31167	2	2
ST27	<i>Atopobium vaginae</i>	FB101-2	<0,0625	<0,0625
ST28	<i>Atopobium vaginae</i>	PB2003/189-T1-4	<0,0625	<0,0625

Колонки двух 96-луночных планшетов были заполнены 100 мкл бактериальной суспензии с *Brucella* agar.

Инокулированные планшеты инкубировали при соблюдении анаэробных условий при 37°C, результаты оценивали через 48 и 72 ч.

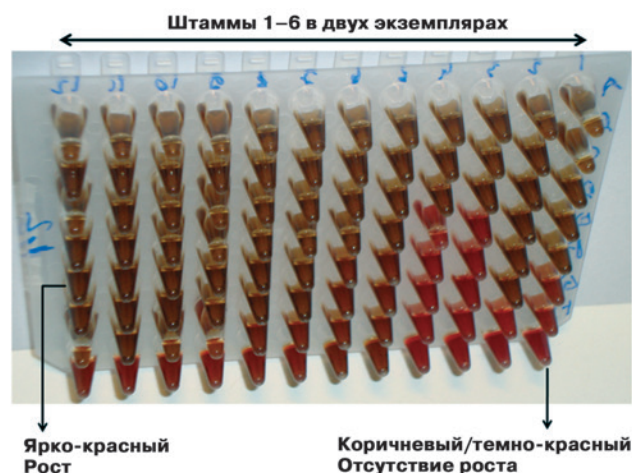
Конечная точка МИК была определена как наименьшая концентрация деквалиния хлорида, которая ингибирует видимый рост тест-образцов. Коричневые, темно-красные лунки рассматривались как лунки без роста бактерий, лунки ярко-красного цвета считались лунками с ростом (рисунок).

Из каждой лунки планшетов 1,1 и 1,2 высевали по 25 мкл раствора на чашки с *Colombia* agar (т.е. твердую питательную среду без деквалиния хлорида) с последующим инкубированием в течение 72 ч в анаэробной камере при 37°C для подтверждения наличия или отсутствия роста микроорганизмов и определения МБК.

Клиндамицин и метронидазол также тестировали с соблюдением анаэробных условий для определения МИК для *A. vaginae* CCUG 44258, CCUG 44125, CCUG 38953T и *B. fragilis* ATCC 25285T.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значения МИК и МБК 28 штаммов *Atopobium* для деквалиния хлорида приведены в табл. 1.



Величины МИК и МБК для деквалиния хлорида были определены в диапазоне <0,0625–2 мкг/мл со значением МИК-90 в 2 мкг/мл.

Посевы из всех лунок, в которых на основе цвета (ярко-красный цвет) был определен рост бактерий, при последую-

Сравнение МИК (мкг/мл) для клиндамицина и метронидазола в отношении *A. vaginae* и *B. fragilis*

Исследования	<i>Atopobium vaginae</i> CCUG 44258	<i>Atopobium vaginae</i> CCUG 44125	<i>Atopobium vaginae</i> CCUG 38953T	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285T
Метронидазол [Данное исследование] <sup>a</sup>	32	128	32	1
Метронидазол [15] <sup>b</sup>	4	8	16	1
Метронидазол [10] <sup>a</sup>	NT	NT	> 32	NT
Клиндамицин [Данное исследование] <sup>a</sup>	< 0,0625	< 0,0625	< 0,0625	<0,0625
Клиндамицин [8] <sup>c</sup>	< 0,016	< 0,016	< 0,016	NT
Клиндамицин [16] <sup>a,*</sup>	NT	NT	NT	≤0,25 – > 16

МИК: минимальная ингибирующая концентрация; NT: не тестировалось.

<sup>a</sup>Институт клинических и лабораторных стандартов, раствор с микроразведением; <sup>b</sup>метод разведения агара; <sup>c</sup>Е-тест\*

Диапазон на основе МИК 232 клинических изолятов *B. fragilis* (типы штаммов не были включены).

щем культивировании на твердой питательной среде без деквалиния хлорида показали рост бактерий.

Посевы из лунок, в которых визуальная оценка показала отсутствие роста (коричневый темно-красный цвет ростовой среды в лунке) при последующем культивировании на твердой питательной среде без деквалиния хлорида соответственно не показали роста.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что значения МИК аналогичны МБК, то есть деквалиния хлорид оказывает не только бактериостатическое, но и бактерицидное действие.

МИК для клиндамицина и метронидазола в отношении *A. vaginae* CCUG 44258, 44125 и 38953T были сопоставимы с результатами, полученными других исследованиях [8, 15] (табл. 2). МИК для метронидазола в отношении *B. fragilis* ATCC 25285T соответствовала ранее представленным результатам [15] (см. табл. 2).

Петерсен и соавторы (2002) оценивали терапевтическую эффективность 10 мг деквалиния хлорида в популяционном исследовании с участием 121 пациентки с различными вагинальными инфекциями (бактериальный вагиноз, вульво-вагинальный кандидоз, трихомониаз) по данным мониторинга клинических симптомов, рН влагалища и количества лакто-

бацилл. Авторами отмечен положительный эффект деквалиния хлорида в отношении восстановления экосистемы влагалища и хорошая переносимость препарата при минимальном числе побочных эффектов [13].

Вместе с уже изученным широким спектром антибактериальной активности *деквалиния хлорида* в отношении различных микроорганизмов, ассоциированных с развитием БВ (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp.) [11, 12], наши данные относительно чувствительности *A. vaginae* к *деквалиния хлориду* подтверждают возможность использования препарата в качестве альтернативного метода лечения БВ и вагинальных инфекций.

Изменение цвета среды, который мы наблюдали при росте бактерий или его отсутствии, было эффективно для определения концентраций МИК, при этом в других публикациях, которые касались определения значений МИК, данный метод ранее не упоминался.

## ВЫВОДЫ

Полученные данные позволили сделать вывод, что *деквалиния хлорид* ингибирует и убивает клинические изоляты *A. vaginae* в концентрациях, подобных клиндамицину и меньших, чем метронидазол [8, 15].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hillier SL, Holmes KK, Marrazzo JM: Bacterial vaginosis. In Sexually transmitted diseases. 4 edition. Edited by: Holmes KK. New York: McGraw-Hill; 2008:737-68.
- Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vanechoutte M: Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. BMC Microbiol 2004, 4:16.
- Verstraelen H, Verhelst R: Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 2009, 7:1109-1124.
- Workowski KA, Berman SM: Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. MMWR Recomm Rep 2006, 55(RR-11):1-94.
- Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, Garland SM, Morris MB, Moss LM, Horvath LB, Kuzevska I, Fairley CK: 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, 193:1478-1486.
- Larsson PG, Forsum U: Bacterial vaginosis-a disturbed bacterial flora and treatment enigma. APMIS 2005, 113:305-316.
- Beigi RH, Austin MN, Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL: Antimicrobial resistance associated with the treatment of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 2004, 191(4):1124-1129.
- De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M, Vanechoutte M: Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. BMC Infect Dis 2006, 6:51.
- Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM: The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. J Infect Dis 2006, 194:828-836.
- Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH: Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis 2004, 4:5.
- Della Casa V, Noll H, Gonser S, Grob P, Graf F, Pohl G: Antimicrobial activity of dequalinium chloride against leading germs of vaginal infections. Arzneimittelforschung 2002, 52:699-705.
- Strecker M, Kokemohr H, Teucher T, Schmitz H: Antiseptika gegen vulvovaginitiden. TW Gynäkologie 1993, 6:409-412.
- Petersen EE, Weissenbacher ER, Hengst P, Spitzbart H, Weise W, Wolff F, Dreher E, Ernst U, Della Casa V, Pohl G, Graf F, Kaiser RR: Local treatment of vaginal infections of varying etiology with dequalinium chloride or povidone iodine. A randomised, double-blind, active-controlled, multicentric clinical study. Arzneimittelforschung 2002, 52:706-715.
- Weissenbacher ER, Donders G, Zeinzeitig V, Martinez de Tejada B, Gerber S, Hалаька М, Льярлек J, Fluomizin Study Group: A comparison of dequalinium chloride vaginal tablets (fluomizin) and clindamycin vaginal cream in treatment of bacterial vaginosis: single blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. Gynecol Obstet Invest.
- De Backer E, Dubreuil L, Brauman M, Acar J, Vanechoutte M: In vitro activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. Clin Microbiol Infect 2010, 16:470-472.
- Karlowsky JA, Walkty AJ, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, Zhanel GG: Prevalence of Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD Surveillance Study. Antimicrob Agents Chemother.



# Флуомізин

деквалінію хлорид 10 мг

- доведена ефективність по відношенню до *Atorobium vaginae* та інших збудників бактеріального вагінозу\*
- дозволений до застосування у всіх триместрах вагітності\*\*



Флуомізин. Реєстраційне посвідчення № UA/1852/01/01 від 22.08.14. Реклама лікарського засобу, перед застосування ознайомтесь з інструкцією та проконсультуйтеся з лікарем.

\* Susceptibility testing of *Atorobium vaginae* for dequalinium chloride. Guido Lopes dos Santos Santiago at al. 2012 BMC Research Notes 2012, 5:451 (<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/151>). \*\* Інструкція до лікарського засобу Флуомізин



Самолікування може бути шкідливим для вашого здоров'я



# Ekobiol®

## ІМУНОБІОТИК для застосування у гінекології



-  *Сприяє відновленню місцевого імунітету піхви та загального імунітету організму*
-  *Підвищує ефективність комплексної терапії вагінітів та сальпінгоофоритів\**