

Персистенция биопленок *Gardnerella Vaginalis* на вагинальном эпителии после стандартной терапии пероральным метронидазолом

А. Свидсински, В. Мендлинг, В. Лонинг-Баук и др.

Германия, Бельгия

Здоров'я України. Тематичний номер. Жовтень, 2016

Бактериальный вагиноз (БВ) – наиболее распространенная инфекция репродуктивного тракта у женщин детородного возраста. Помимо дискомфорта, БВ ассоциируется с рядом неблагоприятных акушерских и гинекологических исходов. Как состояние со сниженной колонизационной резистентностью БВ значительно повышает риск инфекций, передающихся половым путем, в частности гонореи, хламидиоза, генитального герпеса и ВИЧ-1. Кроме того, БВ способствует репликации и вагинальному шеддингу ВИЧ-1 и HSV-2, внося вклад в пандемию этих инфекций.

Несмотря на глобальную значимость проблемы БВ, эффективные подходы к лечению этой инфекции ограничены. Стандартные схемы, рекомендованные Центрами по профилактике и лечению заболеваний США (CDC), позволяют достичь излечения только в 60–70% случаев, а у 20–30% женщин в пределах 3 мес после выздоровления наблюдается рецидив. Это объясняется тем, что БВ характеризуется не только избыточным бактериальным ростом, но и присутствием плотной, тесно прикрепленной к слизистой оболочке вагины бактериальной биопленки, которая является облигатным признаком БВ и отсутствует у здоровых женщин. Бактериальные биопленки ассоциируются с различными резистентными инфекциями (например *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*). Биопленка является значимым механизмом вирулентности, который облегчает прикрепление бактерий к эпителиальным поверхностям, позволяет достигать значительно более высоких концентраций, чем в просветных жидкостях, а также механизмом подавления иммунитета, не позволяющим антимикробным агентам достигать бактерий, вследствие чего последние могут длительно персистировать в биопленке в виде латентных, не размножающихся колоний.

Целью настоящего исследования было изучить эффективность стандартной терапии пероральным метронидазолом в отношении эрадикации БВ-ассоциированной биопленки, а также персистенции и активности биопленки в период до 5 нед после лечения. Бактерии биопленки визуализировали с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), основанной на 16/23S рибосомальной ДНК (рДНК), при изучении вагинальных биоптатов, которые получали во время терапии и с однедельным интервалом после лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 18 женщин с БВ (средний возраст 26,3±5,8 года). Первичный диагноз БВ подтверждали клинически и микробиологически (критерии Amsel и Nugent соответственно). Для включения в исследование у пациентки должны были присутствовать 3 или 4 критерия Amsel (повышенные гомогенные выделения из влагалища, pH >4,5, наличие ключевых клеток при микроскопии и/или «рыбный» запах при добавлении 10% гидрохлорида калия)

при оценке Nugent >7 для окрашенного по Граму вагинального мазка.

После установления диагноза все женщины получали стандартную пероральную терапию метронидазолом 500 мг 2 р/сут в течение 7 дней. Участниц случайным образом распределили для дальнейших обследований на 3-й день лечения, на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й или 35-й день после лечения (по 3 пациентки в каждой точке времени). При обследовании перед биопсией оценивали статус вагинальной микрофлоры по данным микроскопии всячей капли, по клиническим критериям, микроскопии окрашенного по Граму мазка и с помощью культурального исследования. Затем из латеральной стенки среднего отдела свода получали биоптат (диаметром 1–3 мм) с последующей его фиксацией и получением парафиновых блоков. Микротомные срезы исследовали с помощью FISH с применением различных зондов.

У каждой пациентки оценивали следующие показатели: критерии Amsel и Nugent (статус микрофлоры), бактериальную плотность биопленки (бактериальное число, выраженное в единицах log¹⁰), бактериальное разнообразие биопленки (относительное содержание кластеров различных штаммов) и проницаемость биопленки (индикатор активности бактерий).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При первичном обследовании все пациентки (n=18) были позитивными по 4 критериям Amsel и имели среднюю оценку Nugent 9 баллов.

После завершения 7-дневного курса лечения у пациенток отсутствовали вагинальные выделения, «рыбный» запах и ключевые клетки на протяжении периода наблюдения, хотя у 9 из 15 женщин (60%) сохранялось умеренное повышение pH (рис. 1А). Отмечен статистически значимый тренд для вагинального pH в динамике наблюдения (p=0,002).

Оценка Nugent после завершения терапии оставалась на уровне <7. В то же время у 7 из 18 пациенток (47%) сохранялась промежуточная флора (оценка Nugent 4–6) без выраженного тренда (рис. 1В) в динамике наблюдения (p=0,422).

Количество бактерий, прикрепленных к вагинальному эпителию, существенно увеличивалось (p=<0,001) со временем (рис. 1С).

Тем не менее наиболее значимым результатом было время-зависимое изменение проницаемости биопленки (p=0,007). Как показано на рисунке 1D, процент окрашенных 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) бактерий в биопленке, связанных с мечеными FISH олигонуклеотидными зондами, резко снизился после лечения; средняя проницаемость биопленки составляла 1%. На рис. 2А показан ограниченный доступ окрашенных DAPI бактерий к *Gardnerella*-специфическим FISH-зондам во время лечения метронидазолом. После лечения проницаемость биопленки прогрессивно увеличивалась (p<0,001) и составила 15% через 2 нед и 90% по окончании наблюдения. На рис. 2В показаны окрашенные слои конгломератов *G. vaginalis* и *A. vaginae* на ва-

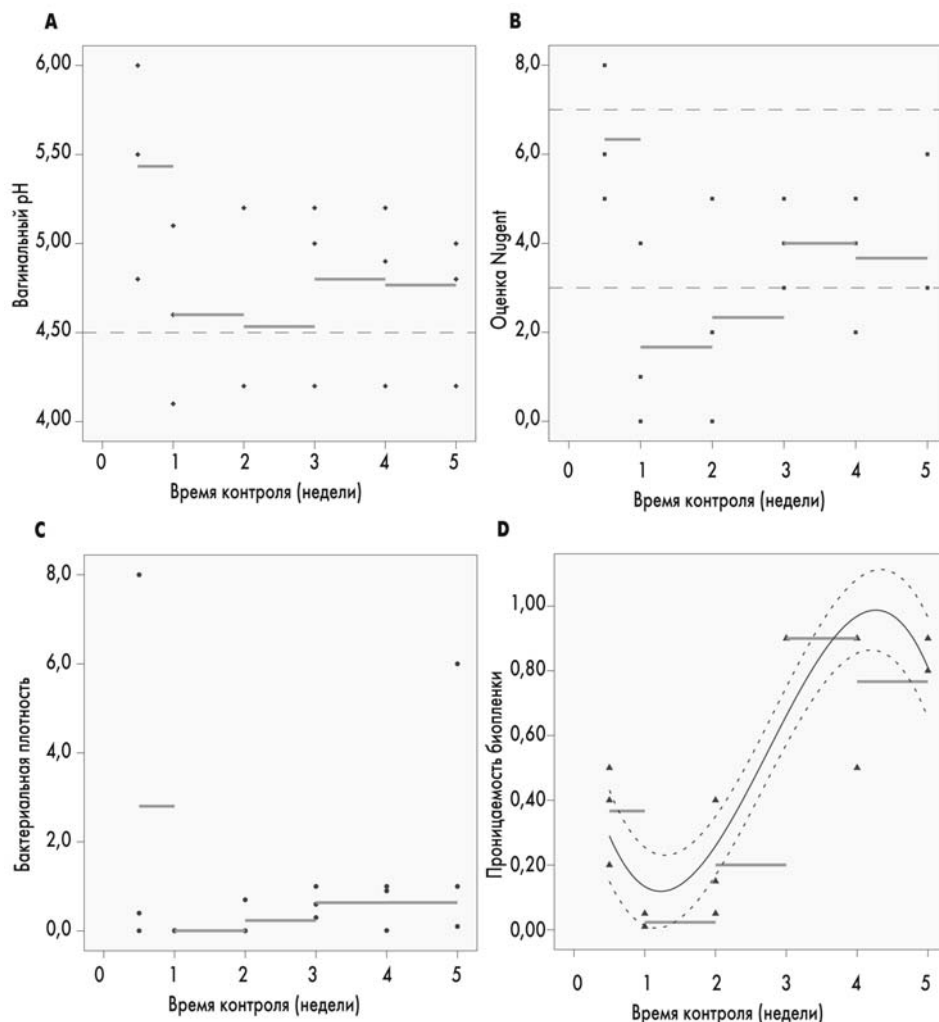


Рис. 1. Вагинальный pH, средняя оценка Nugent, бактериальное число и проницаемость биопленки, оцениваемые с однонедельными интервалами после лечения БВ метронидазолом:

A. Точки = пациентки; горизонтальные линии – средний вагинальный pH в каждой точке времени; референтная линия на оси Y – пограничное значение pH 4,5.

B. Точки = пациентки; горизонтальные линии – средняя оценка Nugent в каждой точке времени; референтные линии на оси Y – пограничные значения оценки Nugent 3 и 7 соответственно.

C. Точки = пациентки; горизонтальные линии – среднее бактериальное число в каждой точке времени.

D. Точки = пациентки; горизонтальные линии – средняя проницаемость в каждой точке времени; сплошная линия – среднеквадратичный тренд; пунктирные линии – 95% доверительный интервал

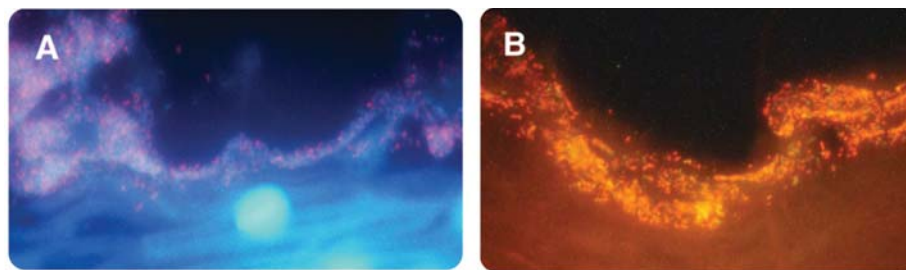


Рис. 2. FISH-микроскопия бактериальной биопленки во время и после лечения метронидазолом:

A. Бактериальная биопленка (оригинальное увеличение 400) на 3-й день лечения метронидазолом; обильная, плотно прикрепленная бактериальная биопленка окрашена в голубой цвет, красная флуоресценция соответствует кластерам Gardnerella (зонд GardV-Cy5). Общая проницаемость биопленки для универсального зонда Eub 338 относительно низкая на этой стадии лечения (20%), поэтому только небольшая часть бактерий в биопленке гибридизируется с зондом для *G. vaginalis* (GardV) как основным компонентом, чего не наблюдается для таких штаммов, как *A. Vaginae*.

B. Обильная бактериальная биопленка (оригинальное увеличение 400) на 35-й день. Бактериальная биопленка полностью восстановилась. Проницаемость биопленки для универсального зонда Eub 338 составляет 90%; наблюдаемые интенсивные флуоресцентные сигналы являются следствием гибридизации бактерий из кластеров Gardnerella и Atorobium как основных компонентов биопленки (зонд Ato-Cy3, связывающийся с Atorobium, – оранжевый цвет; зонд GardV-Cy5, связывающийся с Gardnerella, – красный цвет). Контрокрашивание проведено DAPI (синий цвет)

гинальном эпителии уже через 4 нед после отмены терапии. У всех пациенток основным компонентом биопленки были бактерии, принадлежащие кластеру *Gardnerella*. Бактерии кластера *Atopobium* дали позитивные гибридизационные сигналы у половины пациенток и составили 5–40% бактерий биопленок. Бактерии кластеров *Lactobacilli* и *Bacteroides* присутствовали менее чем у половины женщин и составляли незначительную фракцию биопленки (<10%).

Таким образом, на протяжении 3 нед после клинически успешной стандартной терапии БВ у всех обследованных пациенток наблюдалось выраженное накопление БВ-ассоциированных бактерий (*Gardnerella* и *Atopobium*) в прикрепленной к вагинальному эпителию биопленке.

Интересно, что все изоляты *G. vaginalis* были чувствительны к метронидазолу по данным стандартного тестирования методом 50-мкг дисков.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о персистенции нарушений вагинальной экосистемы после эпизода клинически вылеченного БВ. Биопленки аккумулируют большое количество бактерий и включают персистирующие кластеры *G. vaginalis* и в меньшей степени *A. vaginae*, недоступные для препарата выбора. Несмотря на относительно непродолжительное время наблюдения, с высокой вероятностью можно предположить, что персистирующая биопленка является причиной рецидивов БВ.

В многочисленных исследованиях установлено, что бактериальные биопленки играют значимую роль при резистентных бактериальных инфекциях (таких, как эндокардит, средний отит, периодонтит, хронический простатит и др.) и осложненных хронических состояниях, которые включают воспалительные заболевания кишечника, хроническую obstructивную болезнь легких и муковисцидоз. Биопленка, образованная штаммами *G. vaginalis*, была впервые обнаружена с помощью электронной микроскопии при БВ в качестве плотной ткани, прочно прилегающей к вагинальному эпителию и состоящей из бактериальных клеток, заключен-

ных внутри сетки из полисахаридных волокон. Позднее, в процессе проведения вагинальной биопсии методом флуоресцентной гибридизации *in situ* бактериальных рДНК, мы предположили, что наличие биопленки играло главную роль в развитии БВ.

Биопленка объясняет так называемый парадокс метронидазола при лечении БВ, состоящий в несоответствии высокой чувствительности штаммов *Gardnerella in vitro* и низкой клинической эффективности лечения. Например, в исследовании Beigi и соавторов чувствительность анаэробных вагинальных культур к метронидазолу, определяемая через 3 мес после завершения лечения, составила >99%, что резко контрастирует с частотой клинического излечения при использовании этого препарата. Повышение дозы и/или длительности терапии метронидазолом для преодоления персистенции *G. vaginalis* не является адекватной опцией, поскольку повышенные дозы препарата значительно подавляют индигенные лактобациллы, а как известно, сохранение и восстановление вагинальных лактобацилл является критическим для выздоровления при БВ в ходе лечения стандартной дозой метронидазола.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о целесообразности изменения диагностики БВ, поскольку наличие биопленки как активного резервуара *G. vaginalis* не всегда сопровождается традиционными индикаторами нарушенной микрофлоры влагалища. Кроме того, очевидна необходимость пересмотра стандартов лечения БВ с заменой метронидазола другими, более эффективными препаратами или комбинациями.

Список литературы находится в редакции.

Статья печатается в сокращении.

Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V. et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2008; 198 (1): 97.e1-6.

Перевел с англ. Алексей Терещенко



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 et al. 2012 BMC Research Notes 2012, 3:151 <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/3/151>. ** Інструкція до лікарського засобу Флуомізин

Самолікування може бути шкідливим для вашого здоров'я

Це мій дім!



Рецидивуючий кандидоз?
Зверніть увагу на кишечник!



swiss standard