

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

# Изучение чувствительности *Atopobium vaginae* к деквалиния хлориду

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 у женщин детородного возраста [3].

В настоящее время существуют два рекомендуемых метода лечения БВ: с применением метронидазола перорально и клиндамицина вагинально [4], при этом для обоих препаратов эффективность терапии в течение 1 мес составляет от 60 до 90% [5, 6]. Однако частота рецидивов БВ остается высокой, у 30-50% женщин рецидивы наблюдаются через 2-3 мес

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 базовой резистентностью к клиндамицину, которая составляла 17% и при повторных курсах терапии возрастала до 53% [7]. Кроме того, ряд авторов приводят

данные о резистентности *A. vaginae* к метронидазолу [8-10].

Поскольку клиническая и микробиологическая эффективность терапии БВ метронидазолом, клиндамицином, другими 5-нитроимидазолами не является полностью удовлетворительной и характеризуется высокой частотой рецидивов [3, 5-9], то альтернативные методы лечения,

такие как местное применение антимикробных препаратов широкого спектра действия и антисептиков, могли бы стать решением 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]. Его клиническая эффективность и безопасность 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) и по одному штамму *A. minutum* (CCUG 31167), *A. rimae* (CCUG 31168), *A. parvulum* (CCUG 32760), *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 были получены из банка культур университета Гетеборга, Швеция (CCUG).

Остальные изученные штаммы, выделенные клинически в ходе исследования в период с 2003 по 2010 годы (табл. 1), переносились в анаэробные условия (при температуре 37°C в течение ≥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 рРНК-генной последовательности.

### Микроразведенный 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 деквалиния хлорида в пределах 512-0,0625 мкг/мл была использована и тестирована в двух экземплярах.

Подготовленный *Brucella* agar, дополненный витамином К (1 мкг/мл), гемином (5 мкг/мл) и очищенной лошадиной кровью (5%) [10], перед использованием в течение 2 ч находился в анаэробной камере при температуре 37°C. Все штаммы *Atopobium spp.*

Продолжение на стр. 4.

Таблица 1. Значения МИК и МБК деквалиния хлорида для 4 видов рода *Atopobium*

Тест №	Вид	Штамм	МИК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)
ST1	<i>A. vaginae</i>	CCUG 44125	0,25	0,25
ST2	<i>A. rimae</i>	CCUG 31168	1	1
ST3	<i>A. vaginae</i>	FB101-3	0,5	0,5
ST4	<i>A. vaginae</i>	FB106b	<0,0625	<0,0625
ST5	<i>A. vaginae</i>	VMF0914COL43	<0,0625	<0,0625
ST6	<i>A. vaginae</i>	VMF0914COL13	<0,0625	<0,0625
ST7	<i>A. vaginae</i>	VMF0907TOL23	<0,0625	<0,0625
ST8	<i>A. vaginae</i>	PB2003/009-T1-4	<0,0625	<0,0625
ST9	<i>A. vaginae</i>	PB2003/017-T1-2	<0,0625	<0,0625
ST10	<i>A. vaginae</i>	BVS067	<0,0625	<0,0625
ST11	<i>A. vaginae</i>	CCUG 44258	0,0625	0,0625
ST12	<i>A. vaginae</i>	FB145-BA-14A	<0,0625	<0,0625
ST13	<i>A. vaginae</i>	FB106B	0,0625	0,0625
ST14	<i>A. vaginae</i>	FB158-CNA-2C	<0,0625	<0,0625
ST15	<i>A. vaginae</i>	FB160-CNAB-7A	<0,0625	<0,0625
ST16	<i>A. vaginae</i>	FB160-CNAB-7	<0,0625	<0,0625
ST17	<i>A. vaginae</i>	FB130-CNAB-2aD	0,5	0,5
ST18	<i>A. vaginae</i>	FB010-06	<0,0625	<0,0625
ST19	<i>A. vaginae</i>	CCUG 38953	<0,0625	<0,0625
ST20	<i>A. vaginae</i>	FB106C	0,0625	0,0625
ST21	<i>A. vaginae</i>	FB101-3C	<0,0625	<0,0625
ST22	<i>A. vaginae</i>	BVS068	0,5	0,5
ST23	<i>A. parvulum</i>	VMF1313W43	2	2
ST24	<i>A. parvulum</i>	VMF1620W23	2	2
ST25	<i>A. parvulum</i>	CCUG 32760	1	1
ST26	<i>A. minutum</i>	CCUG 31167	2	2
ST27	<i>A. vaginae</i>	FB101-2	<0,0625	<0,0625
ST28	<i>A. vaginae</i>	PB2003/189-T1-4	<0,0625	<0,0625

# Изучение чувствительности *Atopobium vaginae* к деквалиния хлориду

Продолжение. Начало на стр. 3.

высевали на Colombia agar и культивировали в течение 72 ч в анаэробной камере (BugBox, LedTechno, Neusden-Zolder, Бельгия) при температуре 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 удаляли. Оставшиеся 100 мкл бактериальной суспензии вносили в анаэробную камеру в 5 мл предварительно подготовленного *Brucella* агар 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 (Ахуген, Сан-Франциско, Калифорния). Планшет 1,1 содержал концентрации деквалиния

хлорида от 512 до 8 мкг/мл в рядах от А до G и не содержал препарата в ряде H. Планшет 1,2 содержал от 4 до 0,0625 мкг/мл деквалиния хлорида в рядах от А до G и не содержал препарата в ряде H.

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

Инокулированные планшеты инкубировали при соблюдении анаэробных условий при температуре 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 (рис.).

Из каждой лунки планшетов 1,1 и 1,2 высевали по 25 мкл раствора

на чашки с Colombia agar (то есть на твердую питательную среду без деквалиния хлорида) с последующим инкубированием в течение 72 ч в анаэробной камере при температуре 37°C для подтверждения наличия или отсутствия роста микроорганизмов и определения МБК.

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

## Результаты исследования и их обсуждение

Значения МИК и МБК 28 штаммов *Atopobium* для деквалиния хлорида приведены в таблице 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 последующем 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 38953 были сопоставимы с результатами, полученными в других исследованиях [8, 15] (табл. 2). МИК для метронидазола в отношении *B. fragilis* ATCC 25285 соответствовала ранее представленным результатам [15] (табл. 2).

Петерсен и соавт. (2002) оценивали терапевтическую эффективность 10 мг деквалиния хлорида в популяционном исследовании с участием 121 пациентки с различными вагинальными инфекциями (БВ, вульвовагинальный кандидоз, трихомониаз) по данным мониторинга клинических симптомов, pH влагалища и количества лактобацилл. 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, которое 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 о том, что деквалиния хлорид ингибирует и убивает клинические изоляты *A. vaginae* в концентрациях, аналогичных клиндамицину и значительно меньших, чем метронидазол [8, 15].**

## Литература

- Hillier S.L., Holmes K.K., Marrazzo J.M. Bacterial vaginosis. In Sexually transmitted diseases. 4 edition. Edited by: Holmes K.K. New York: McGraw-Hill; 2008: 737-68.
- Verhelst R., Verstraelen H., Claeys G., Verschraegen G., Delanghe J., Van Sinaey L., De Ganck C., Temmerman M., Vaneechoutte 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 K.A., Berman S.M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. MMWR Recomm Rep 2006, 55 (RR-11): 1-94.
- Bradshaw C.S., Morton A.N., Hocking J., Garland S.M., Morris M.B., Moss L.M., Horvath L.B., Kuzevska I., Fairley C.K. 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 P.G., Forsum U. Bacterial vaginosis—a disturbed bacterial flora and treatment enigma. APMIS 2005, 113: 305-316.
- Beigi R.H., Austin M.N., Meyn L.A., Krohn M.A., Hillier S.L. 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., Vaneechoutte M. Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. BMC Infect Dis 2006, 6: 51.
- Bradshaw C.S., Tabrizi S.N., Fairley C.K., Morton A.N., Rudland E., Garland S.M. 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 M.J., Maszta A., Aldridge K.E., Fortenberry J.D., Fidel P.L. Jr, Martin D.H. 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 E.E., Weissenbacher E.R., Hengst P., Spitzbart H., Weise W., Wolff F., Dreher E., Ernst U., Della Casa V., Pohl G., Graf F., Kaiser R.R. 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 E.R., Donders G., Unzeitig V., Martinez de Tejada B., Gerber S., et al. 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., Vaneechoutte M. In vitro activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. Clin Microbiol Infect 2010, 16: 470-472.
- Karlovsky J.A., Walky A.J., Adam H.J., Baxter M.R., Hoban D.J., Zhanel G.G. Prevalence of Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD Surveillance Study. Antimicrob Agents Chemother.

Статья печатается в сокращении. «Здоровье женщины», № 9 (105), 2015 г. BMC Research Notes 2012, 5: 151

Таблица 2. Сравнение МИК (мкг/мл) для клиндамицина и метронидазола в отношении *Atopobium vaginae* и *Bacteroides fragilis*

	<i>A. vaginae</i> CCUG 44258	<i>A. vaginae</i> CCUG 44125	<i>A. vaginae</i> CCUG 38953	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285
Метронидазол [Данное исследование] <sup>a</sup>	32	128	32	1
Метронидазол [15] <sup>b</sup>	4	8	16	1
Метронидазол [10] <sup>c</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; Институт клинических и лабораторных стандартов <sup>a</sup> – раствор с микроразведением; <sup>b</sup> – метод разведения агара; <sup>c</sup> – E-тест; \* – диапазон на основе МИК 232 клинических изолятов *B. fragilis* (типы штаммов включены не были).

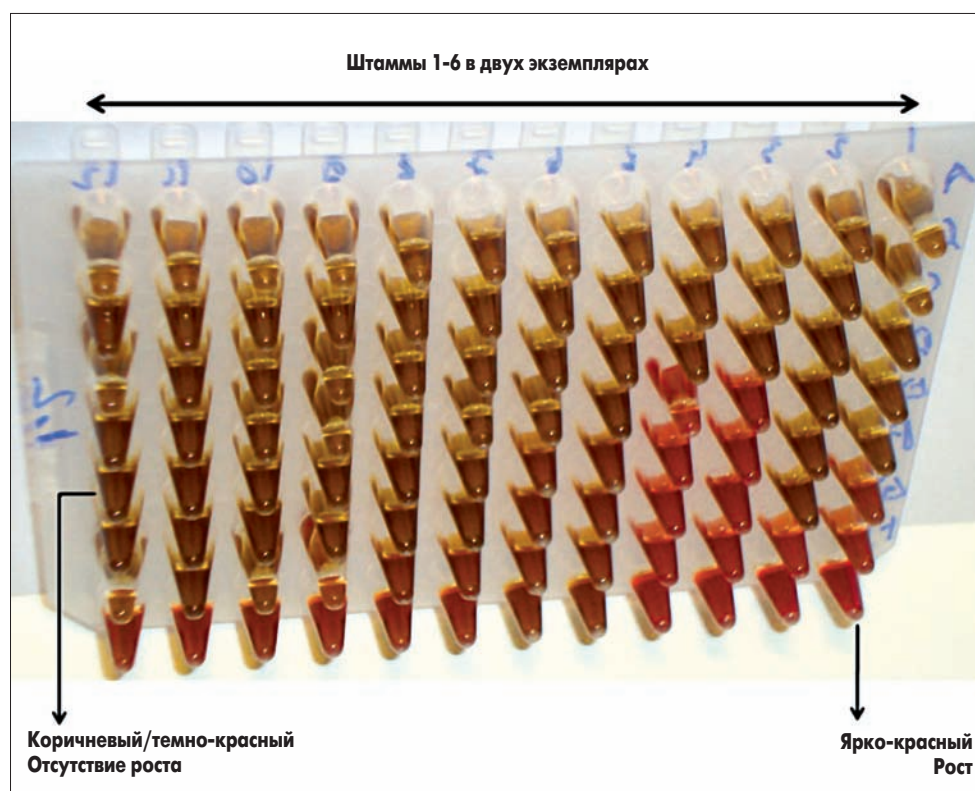


Рис. Титрационный 96-луночный микропланшет