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

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

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 1-недельным интервалом после лечения.

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 менее распространенных штаммов, таких 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 Atopobium как основных компонентов биопленки (зонд Ato-Cy3, связывающийся с Atopobium, – оранжевый цвет; зонд GardV-Cy5, связывающийся с Gardnerella, – красный цвет). Контрокрашивание проведено DAPI (синий цвет).

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 последующих 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 висячей 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 $\log^{10}$), бактериальное разнообразие биопленки (относительное содержание кластеров различных штаммов) и проницаемость биопленки (индикатор активности бактерий).

Результаты

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. 1A). 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. 1B) в динамике наблюдения (p=0,422).

Количество бактерий, прикрепленных к вагинальному эпителию, существенно увеличивалось (p≤0,001) со временем (рис. 1C).

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 меченными FISH олигонуклеотидными зондами, резко снизился после лечения; средняя проницаемость биопленки составляла 1%. На рисунке 2A 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 рисунке 2B показаны выраженные слои

Продолжение на стр. 8.

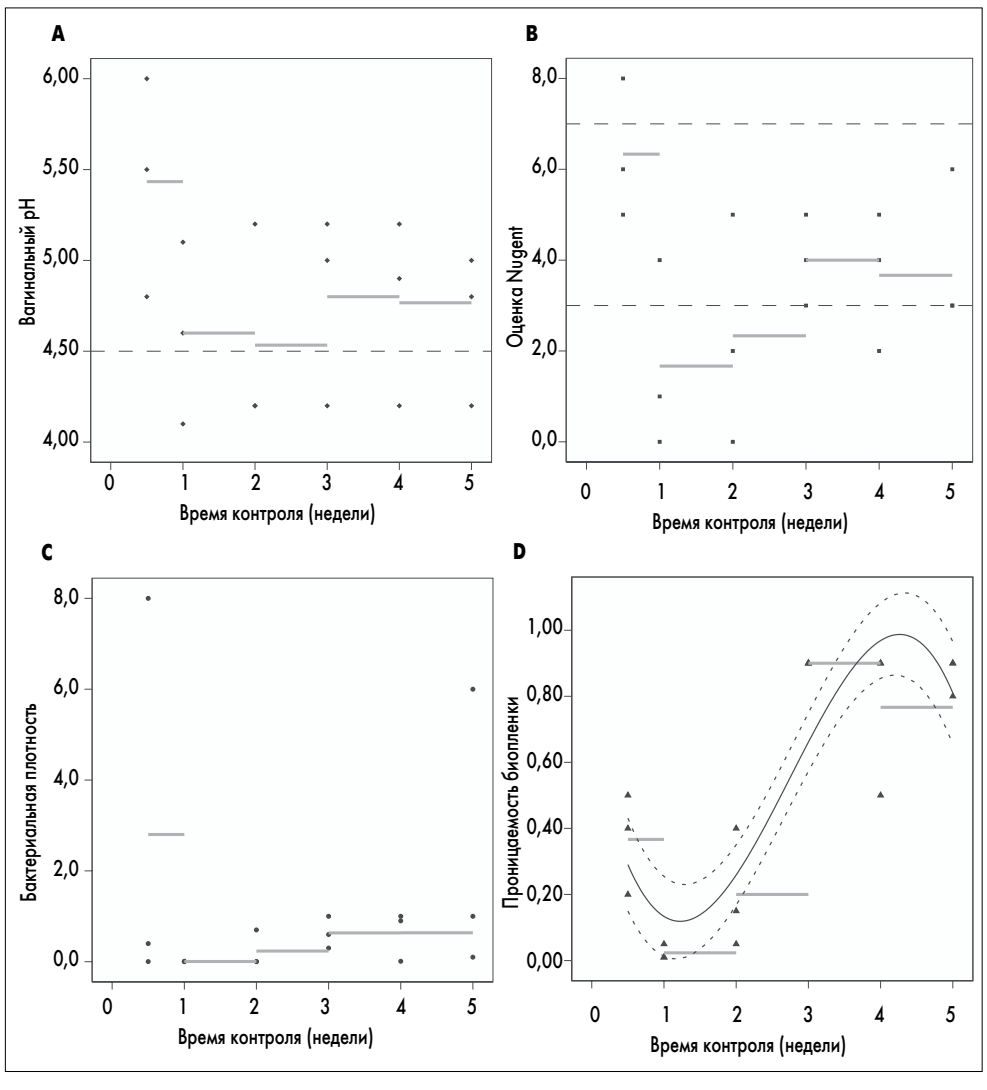

Рис. 1. Вагинальный pH, средняя оценка Nugent, бактериальное число и проницаемость биопленки, оцениваемые с 1-недельными интервалами после лечения БВ метронидазолом

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.

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

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

Продолжение. Начало на стр. 7.

конгломератов *G. vaginalis* и *A. vaginae* на вагинальном 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.

Комментарий

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о персистировании 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 обструктивную 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, заключенных 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 соавт. 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***

Анкета читателя

Здоров'я України
МЕДИЧНА ГАЗЕТА

Заполните анкету и отправьте по адресу:

Медична газета «Здоров'я України», 03035, г. Киев, ул. Механизаторов, 2.

Укажите сведения, необходимые для отправки тематического номера «Гинекология, акушерство, репродуктология»

Фамилия, имя, отчество .....
.....
.....
Специальность, место работы .....
.....
Индекс .....
город .....
село .....
район ..... область .....
улица ..... дом .....
корпус ..... квартира .....
Телефон: дом. .....
раб. .....
моб. .....
E-mail: .....

* Я добровольно передаю указанные в анкете персональные данные ТОВ «Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя». Также даю согласие на их использование для получения от компаний (ее связанных лиц, коммерческих партнеров) изданий, информационных материалов, рекламных предложений, а также на включение моих персональных данных в базу данных компании, неограниченное во времени хранение данных.

Подпись _____

Нам важно знать ваше мнение!

Понравился ли вам тематический номер «Гинекология, акушерство, репродуктология»? .....
.....

Назовите три лучших материала номера .....

1. .....

2. .....

3. .....

Какие темы, на ваш взгляд, можно поднять в следующих номерах? .....
.....
.....
.....

Публикации каких авторов вам хотелось бы видеть? .....
.....

Хотели бы вы стать автором статьи для тематического номера «Педиатрия»? .....

На какую тему? .....
.....

Является ли наше издание эффективным для повышения вашей врачебной квалификации? .....
.....