

Trattamento e prevenzione delle recidive delle vaginiti

I patogeni associati alle cistiti, alle vaginosi batteriche, alle vaginiti aerobiche e da candida hanno la tendenza a formare biofilm, e questo spiega l'incompleta o assente risposta agli antibiotici e agli antifungini. È quindi opportuno che siano messe a punto strategie innovative per la prevenzione e il trattamento delle infezioni acute e croniche sostenute da biofilm

Cesare Maria Nava
Gianpiero Ricciardo
Monica Valieri

*Reparto Ostetricia-Ginecologia
 Istituto Clinico Beato Matteo - Vigevano*

Laura Speccher
*Servizio Igiene Pubblica
 ASL Milano 2- Melegnano*

Fabrizio Pregliasco
*Dipartimento di Scienze Biomediche
 per la salute
 Università degli Studi di Milano*

Secundo i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta, fino all'80% delle infezioni batteriche che colpiscono gli esseri umani nei Paesi occidentali è causato da biofilm, comunità strutturate di cellule batteriche spesso di specie diverse anche fungine, racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta e adesa a una superficie inerte o vivente.

Da quando Swidsinski et al. nel 2005 hanno indagato sulla composizione e sull'organizzazione spaziale della componente microbica associata all'epitelio vaginale, si è consolidato il concetto che i patogeni associati alle cistiti, alle vaginosi batteriche, alle vaginiti aerobiche e da candida hanno tutti la tendenza a formare biofilm, e questo spiega l'assente o incompleta risposta agli antibiotici e agli antifungini e l'alta presenza di forme morbose recidivanti uro-ginecologiche antibiotico-resistenti e tendenti alla cronicizzazione. I batteri, quando presenti in forma di biofilm, sono da 10 a 1000 volte più resistenti al trattamento antibiotico rispetto al fenotipo planctonico, e posseggono una naturale resistenza agli effettori della risposta immune.

Vi è tuttavia una limitata consapevolezza a livello clinico dell'importanza dei biofilm microbici e fungini nei processi infettivi e della più elevata farmaco-resistenza associata alla crescita microbica sessile. Esiste, infatti, nelle condizioni

suddette, una più lenta e ridotta penetrazione degli antibiotici dovuta alla loro difficoltà ad attraversare la matrice polisaccaridica del biofilm; una più alta frequenza di coniugazione fra i batteri, che promuove lo scambio di plasmidi contenenti geni codificanti per resistenze multiple agli antibiotici; l'insorgenza di fenotipi batterici resistenti agli antibiotici, per carenza di ossigeno e di nutrienti nelle zone più lontane dalla superficie del biofilm; un'attività antagonista di cataboliti microbici che interagendo con le molecole antibiotiche ne neutralizzano l'attività.

Inoltre il distacco di singoli batteri e aggregati (mono e multispecie) da un biofilm maturo funge da inoculo persistente, promuovendo nell'organismo nuovi siti di colonizzazione e dando luogo alle cosiddette infezioni polimicrobiche antibiotico-resistenti, a crescita sessile e tendenti alla cronicizzazione.

È quindi indispensabile la messa a punto di strategie innovative per la prevenzione e per il trattamento delle infezioni acute e croniche sostenute da biofilm, che devono mirare a bloccare l'adesione delle cellule batteriche sulla superficie epiteliale vaginale, prevenire la crescita microbica, inibire l'espansione dei patogeni, interferire con i sistemi di comunicazione intercellulari batteriche e disgregare le matrici polisaccaridiche già formate del biofilm.

Scopo del presente studio è quello

di valutare l'efficacia del *Lactobacillus acidophilus* e del *Lactobacillus sporogenes* associati a D-mannosio a NAC (N-Acetilcisteina) e a *Morinda citrifolia* nella formulazione farmaceutica lavanda vaginale (Ausilium, Deakos) nel trattamento e nella prevenzione delle recidive delle vaginosi batteriche e delle vaginiti aerobiche, mediante somministrazione intra-vaginale. Il preparato è una composizione di sostanze capaci di prevenire la formazione del biofilm, di bloccare la crescita microbica e di distruggere la membrana polimerica rendendo i patogeni finalmente eliminabili.

Dagli studi più recenti è risultato che la vaginite aerobica, insieme alla vaginosi batterica, rappresenta circa il 70% di tutte le vaginiti ed inoltre che queste due forme patologiche possono coesistere.

Sono, infatti, sempre più numerose le segnalazioni di infezioni miste su biofilm polimicrobici, composti sia da specie batteriche aerobiche e anaerobiche che da specie fungine, che creano notevoli problemi terapeutici.

Dal punto di vista eziopatogenetico la vaginosi batterica è caratterizzata da una drastica riduzione dei lattobacilli produttori di perossido di idrogeno con una eccessiva crescita di germi commensali quali *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* e di numerose specie di anaerobi quali *Mobiluncus peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium species*, tutte a crescita sessile.

Nelle vaginiti aerobiche, invece, alla diminuzione dei lattobacilli fa seguito l'aumento dei batteri aerobi di derivazione intestinale (*Escherichia coli* in primis, meno frequentemente *Staphylococcus pyogenes*, *Pseudomonas*, *Proteus*).

► Materiali e metodi

Per questo studio sono state reclutate 90 donne volontarie di età compresa tra i 22 e i 58 anni (media 40 anni), che lamentavano sintomi quali bruciore vulvo-vaginale, leucorrea maleodorante, prurito vulvare e presentavano segni di infiammazione vaginale. Tutti i soggetti avevano un pH vaginale >4.5 e un grado della flora lattobacillare IIb o III; assenza di terapia, non avevano avuto rapporti sessuali nelle 24 ore precedenti alla visita ginecologica.

Nelle vaginiti aerobiche, l'esame microscopico a fresco rivelava flora lattobacillare IIb o III, presenza di leucociti, di cellule parabasali, assenza di *clue cells*, flora batterica (da + a +++); in 30 pazienti con vaginosi batterica l'esame microscopico a fresco evidenziava flora lattobacillare IIb o III, presenza di *clue cells*, assenza di leucociti. Infine in 30 pazienti con forme miste, all'esame microscopico si osservava presenza di *clue cells*, di leucociti, di cellule parabasali, e in 12 casi ife e spore fungine, flora lattobacillare IIb o III, flora batterica da + a +++.

A ciascuna paziente è stata prescritta la seguente terapia:

- 1° ciclo: una lavanda vaginale/die per 8 giorni consecutivi con "Ausilium lavanda vaginale®"
- 2° ciclo: una lavanda vaginale/settimana per 8 settimane con lo stesso prodotto.

Sono stati effettuati un primo controllo alla fine del 1° ciclo terapeutico, uno dopo 4 settimane dall'inizio del trattamento, e un terzo una settimana dopo la fine del 2° ciclo terapeutico.

Tutte le donne arruolate sono state sottoposte ad esame microscopi-

co a fresco del secreto vaginale con microscopio a contrasto di fase ed a misurazione del pH del terzo interno della vagina.

Alla fine del 1° ciclo terapeutico è stato ripetuto un esame batteriologico a fresco. In assenza di remissione della sintomatologia è stato eseguito un tampone vaginale per la ricerca di *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e la misurazione del pH vaginale. La stessa procedura è stata adottata per il controllo dopo 4 settimane e alla fine del 2° ciclo.

► Risultati

Alla fine del 1° ciclo terapeutico 84 donne hanno presentato completa ricolonizzazione lattobacillare e 3 hanno presentato scarsa ricolonizzazione. In questi soggetti il tampone vaginale risultò positivo per *C. trachomatis* e venne prescritta doxiciclina 100 mg/ per 10 giorni con la prosecuzione del trattamento con la lavanda vaginale; al 2° controllo mostrarono completa ricolonizzazione lattobacillare. Tre pazienti sono state escluse perché non si sono presentate ai controlli successivi.

In tutte le donne il pH vaginale è ritornato a valori <4.5 e l'esame batteriologico a fresco si è negativizzato già al primo controllo.

Tutte le donne hanno riferito un deciso miglioramento di tutta la sintomatologia infiammatoria vaginale. Al 2° controllo dopo 4 settimane l'esame batteriologico a fresco è risultato negativo, il pH vaginale <4.5 e la presenza di flora lattobacillare ottimale. Identici risultati si sono ottenuti con i controlli alla fine del 2° ciclo.

► Discussione

Il presente studio ha dimostrato la capacità di *L. acidophilus* e di *L. sporogenes*, associati a D-mannosio a N-acetil-cisteina e a *M. citrifolia* di provvedere all'eradicazione batterica e alla ricolonizzazione lattobacillare dell'ambiente vaginale in donne con vaginosi batterica, con vaginite aerobica e con forme miste.

È inoltre di particolare interesse notare la scomparsa di spore e ife micotiche precedentemente rilevate in associazione a vaginite aerobica in 12 pazienti.

Sono, infatti, recentissime le prime pubblicazioni riguardanti la possibilità della *Candida* di sviluppare biofilm in vivo sull'epitelio vaginale, il che sottintende la particolare tenacia di questo patogeno al suo contenimento e all'eradicazione.

Le basi razionali della terapia con Ausilium lavanda vaginale® sono le seguenti. I lattobacilli mettono in atto una serie di meccanismi che proteggono la mucosa vaginale dall'aggressione di numerosi patogeni.

1. I biosurfattanti prodotti dai lattobacilli inibiscono l'adesione dei patogeni alle cellule vaginali, formando un biofilm "buono" che riveste la mucosa vaginale e la protegge dall'aggressione dei microrganismi responsabili delle infezioni.
2. I lattobacilli producono anche acidi organici (specialmente acido lattico) per mantenere il pH vaginale vicino a 4 e la maggior parte dei patogeni vaginali sono sensibili al pH acido. Producono anche sostanze ad attività antibatterica quali batteriocine, perossido di idrogeno e sostanze simili che inibiscono la crescita dei patogeni.
3. La co-aggregazione dei lattobacilli con i patogeni impedisce

l'accesso di questi ultimi ai recettori tissutali e la loro adesione all'epitelio, determinando da ultimo un'inibizione della colonizzazione dei ceppi patogeni.

4. L'enzima arginino-deaminasi inibisce la crescita dei batteri anaerobi patogeni associati alla vaginosi batterica e del *Trichomonas vaginalis*.
5. I lattobacilli sono degli immunostimolanti: infatti, la loro presenza stimola la produzione dei linfociti T Helper e dei monociti.

Il D-mannosio possiede un'elevata affinità per le lectine FimH presenti alla sommità dei pili di tipo 1 dell'*E. coli* e di molti altri batteri impedendone l'impianto sui recettori delle cellule dell'epitelio vaginale, prima tappa della vaginite aerobica e della formazione del biofilm e anzi facilitandone il distacco dalle pareti vaginali e la conseguente eliminazione. Il D-mannosio favorisce anche la ristrutturazione della mucosa vaginale garantendone così una maggiore protezione dagli insulti indotti dai batteri.

Le principali caratteristiche della NAC (N-acetilcisteina) sono l'inibizione dell'adesività batterica, l'interferenza con la sintesi dei biofilm, la disgregazione del biofilm maturo e consolidato per azione diretta sulla capsula polisaccaridica, l'azione antiossidante, antinfiammatoria e immunostimolante. La *M. citrifolia*, utilizzata come estratto dai frutti maturi, è ricca di xeronina e proxeronina. Gli studi hanno evidenziato che l'azione dell'inibizione selettiva della COX 2 da parte di *M. citrifolia* è comparabile a quella del celecoxib. All'attività antinfiammatoria e antidolorifica si associano anche proprietà antimicrobiche, antiossidanti e immunostimolanti.

L'uso dei lattobacilli probiotici per curare e prevenire le infezioni vagi-

nali, dopo i dati emersi dai recenti studi sulla loro efficacia, è diventata l'opzione terapeutica più accreditata, soprattutto se associati a D-mannosio e a NAC anche perché la natura polimicrobica delle vaginiti, e la presenza di biofilm rende estremamente variabile e spesso insoddisfacente la risposta alle varie terapie antibiotiche, il che, oltre a determinare un 50% di recidive crea sicuramente numerose resistenze batteriche e un'ulteriore alterazione dell'ecosistema vaginale.

Anche la vaginite da *Candida albicans* viene curata mediante l'alta produzione di perossido di idrogeno garantita dai lattobacilli i quali, inoltre competono con la candida per i nutrienti e ne inibiscono la colonizzazione. La loro efficacia è dimostrata anche sulla *Candida glabrata* ormai rinvenuta nel 20% dei casi e pure nelle infezioni miste per la presenza di altri microrganismi (effetto importante per l'aumentata presenza di patogeni resistenti agli azoli).

In conclusione, considerando che l'uso dei probiotici, per ristabilire la normale flora vaginale e per fornire una barriera competitiva antibatterica, sta diventando sempre più usuale, Ausilium lavanda vaginale® offre un importante nuovo presidio terapeutico per prevenire e curare le infezioni urogenitali e per mantenere efficiente l'ecosistema vaginale.

L'associazione con D-mannosio e NAC rende questa formulazione efficace e unica per la cura e la prevenzione delle recidive di tutti i tipi di vaginiti, delle cistiti da risalita, per la prevenzione delle malattie sessualmente trasmesse e delle complicanze di natura ostetrica. Da ultimo è importante sottolineare che il trattamento è stato molto ben tollerato e in nessun caso ha determinato effetti collaterali indesiderati.

Bibliografia

- Aparna MS, Yadav S. Biofilm: microbes and disease. *Braz j Inf Dis* 2008; 12: 526-30.
- Atassi F. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus Johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *ALFEMS Microbiol Lett* Mar 2010; 304: 29-38
- Basarw S, et al. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni)fruit. *Phytother Res.* 2010; 24: 38-42.
- Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2000; 2: 543-6.
- Bouckaert J, et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitor the *Escherichia coli* FimH adhesion. *Mol Microbiol* 2005; 55: 441-55.
- Cadieux PA, et al. *Lactobacillus*-by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia Coli*. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 Suppl 6: 13-8.
- Chandra J, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001; 183: 5385-94.
- Crepin S, et al. Decreased expression of type 1 fimbriae by a pst mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection. *Infect Immun* 2012; 80: 2802-15. Epub 2012 jun 4
- Cusumano CK, et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3: 109-115.
- Dalton T, et al. An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS One* 2011; 6 :e27317. Epub 2011 Nov 4.
- Donders GG, et al. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 872–878.
- Donders GG, et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109: 1-10.
- Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007, 21: 355-373.
- Donelli G. Biofilm Microbici Multispecie. *Laboratorio Biofilm Microbici 2010 IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma.*
- Falagas ME, et al. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 266-72.
- Falagas ME, et al. Probiotics for the treatment of woman with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol Infect.* 2007; 13: 657-64.
- Furneri PM, Blandino G. L'impatto degli antibiotici sulle comunità microbiche. *Dipartimento di Scienze Microbiologiche Università di Catania* 2010.
- Harriott MM, Lilly EA. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 2010; 156 (Pt 12): 3635-44. doi: 10.1099/mic.0.039354-0.
- Hummelen R, et al. Vaginal microbiome and epithelial gene array in postmenopausal Women with moderate to severe dryness. *PLoS One* 2011; 6: e 26602 Epub 2011 Nov 2.
- Jiang X, et al. Antiadhesion Therapy for Urinary Tract Infections. *J Med Chem* 2012, 55: 4700-4713.
- Klein T, et al. FimH antagonists for the oral treatment of urinary tract infection: from design and synthesis to in vitro and in vivo evaluation. *J Med Chem* Dec 2010; 53: 8627-41.
- Kohler GA, Reid G. Probiotic Interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2012: 2012, Article ID 636474, 14 pages doi:10.1155/2012/636474.
- Lasaro MA, et al. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol*, 2009; 75: 246-51.
- MacMillan A, et al. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Human Microbiology and Probiotic* London Ontario 2011.
- Marchese A, et al. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E.coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agent* 2003; 22 (Suppl 2): 95-100.
- Martinez J, et al. Type 1 Pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO* 2000; 19: 2803-2812.
- Moreira CG, et al. Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilm. *FEMS Microbiol Lett.*2003; 226: 79-85.
- Naves P, et al. Effect of human serum albumin, ibuprofen and N-acetylcysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Hosp Infect* 2010; 76: 165-70.
- Nguyen D, et al. Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. *Brad Science* 2011; 334: 982-986
- Pratt LA, et al. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella motility, chemotaxis and type 1 pili. *Mol Microbiol*, 1998; 30: 285-93.
- Saunders S, et al. Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilm. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 2007; 55: 138-142.
- Scharemborg M, et al. Target Selectivity of FimHAntagonists. *J Med Chem* 2012; 55: 9810-16.
- Swidsinski A, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*2005; 106: 1013-1023.
- Swidsinski A, et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 97, e1–6.
- Vicariotto F. I probiotici in ginecologia. *Phytogyn* 2011: vol. II, N. 4.
- Wang MY, et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 23: 1127-41.
- Wellens A, et al. Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. *J PLoS one* 2008; 3: e2040.
- Zanetti S, et al. Azione inibente di N-Acetilcisteina sulla formazione di biofilm da parte di un ceppo di *Klebsiella Pneumoniae*. Sezione di Microbiologia sperimentale Università Degli Studi di Sassari Istituto di Microbiologia "A.Gemelli" Roma.
- Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 2010; 10:140.