

Studio dell'attività *in vitro* e *in vivo* dell'associazione clotrimazolo-metronidazolo: attività antimicotica e antibatterica *in vitro* ed efficacia nella terapia delle vaginiti/vaginosi

P.M. FURNERI¹, A. MANGIAFICO¹, S. CORSELLO², E. CAMMARATA¹, M. D'ARRIGO³, G. GINESTRA³, G. TEMPERA¹

RIASSUNTO: Studio dell'attività *in vitro* e *in vivo* dell'associazione clotrimazolo-metronidazolo: attività antimicotica e antibatterica *in vitro* ed efficacia nella terapia delle vaginiti/vaginosi.

P.M. FURNERI, A. MANGIAFICO, S. CORSELLO, E. CAMMARATA, M. D'ARRIGO, G. GINESTRA, G. TEMPERA

Nel presente studio la valutazione dell'efficacia microbiologica e clinica di una associazione metronidazolo + clotrimazolo (in rapporto quantitativo di 5:1) nella terapia topica di vaginiti miste (candidosi/vaginosi) è stata comparata con il grado di interferenza che tale chemioterapico può determinare sul mantenimento/ripristino del microbiota lattobacillare. Sono state studiate 20 donne con diagnosi clinica, microbiologicamente confermata, di vulvovaginite micotica e/o vaginosi. L'attività antimicrobica di clotrimazolo e metronidazolo è stata studiata su ceppi d'isolamento e di collezione. Entrambi i chemioterapici sono stati valutati singolarmente ed in associazione. Il clotrimazolo si è mostrato attivo nei confronti dei miceti saggiati sia da solo che in associazione con il metronidazolo. Come atteso, l'associazione delle due sostanze non migliora l'attività intrinseca del clotrimazolo. Sia clotrimazolo che metronidazolo sono risultati inattivi nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi aerobi; al contrario entrambi erano attivi nei confronti di *G. vaginalis*.

In tutte le pazienti studiate è stata riscontrata l'assenza di crescita dei patogeni isolati, sia alla prima visita dopo terapia, sia al follow-up. Il grado lattobacillare è ritornato normale a 30 giorni dalla fine della terapia. Non sono stati riportati casi di recidiva.

SUMMARY: *In vitro* and *in vivo* study of the activity of a combination of metronidazole + clotrimazole: antimycotic and antibacterial activity *in vitro* and efficacy in the treatment of vaginitis /vaginosis.

P.M. FURNERI, A. MANGIAFICO, S. CORSELLO, E. CAMMARATA, M. D'ARRIGO, G. GINESTRA, G. TEMPERA

In the present study the microbiological and clinical efficacy of a combination of metronidazole + clotrimazole (in a ratio of 5:1) in the topical treatment of mixed vaginitis (candidiasis/vaginosis) was compared with the degree to which this chemical agent can interfere with the maintenance/restoration of normal microbiota. Twenty women with a clinical diagnosis of mycotic vulvovaginitis and/or vaginosis, microbiologically confirmed, were studied. The antimicrobial activity of clotrimazole and metronidazole was studied in isolated and collection strains. Both chemical agents were assessed singly and in combination. Clotrimazole was found to be active against the mycetes tested, both on its own and in combination with metronidazole. As expected, combining the two substances did not improve the intrinsic activity of clotrimazole. Both clotrimazole and metronidazole were found to be inactive against Gram-positive and Gram-negative aerobes; conversely, both were active against *G. vaginalis*.

No growth of the isolated pathogens was observed in any of the patients studied, either at the first visit after treatment or at follow up. The lactobacillary grade had returned to normal 30 days after the end of treatment. No relapses were reported.

KEY WORDS: Metronidazolo - Clotrimazolo - Vaginite - Microbiota vaginale - Terapia.
Metronidazole - Clotrimazole - Vaginitis - Vaginal microbiota - Therapy.

Introduzione

Il costante incremento nella donna di infezioni ricorrenti di pertinenza uroginecologica ha determinato

un sempre più crescente interesse della ricerca internazionale verso l'habitat vaginale ed il mantenimento dell'omeostasi del suo microbiota.

La constatazione, inoltre, della stretta correlazione tra alterazione del microbiota vaginale ed insorgenza di patologie urogenitali, quali vaginiti e cistiti, giustifica gli studi di interferenza dei chemioterapici sul microbiota lattobacillare, che rappresenta la principale difesa dell'habitat vaginale.

Le "vaginiti" sono tra le più comuni condizioni patologiche per le quali le donne ricorrono al ginecologo (1, 2). Nonostante le cause della "vaginite" possano es-

¹ Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche Università degli Studi di Catania

² Unità di Ginecologia dell'Ospedale S. Salvatore di Paternò, USL 3 di Catania

³ Dipartimento Farmacobiologico, Università degli Studi di Messina

Questo lavoro è stato finanziato da un contributo di Alfa Wassermann S.p.A. (Bologna, Italy)

© Copyright 2008, CIC Edizioni Internazionali, Roma

TABELLA 1 - CAUSE DI VAGINITI.

Tipi di vaginiti	Eziologia
Candidiasi vulvovaginali	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i>
Vaginosi batteriche	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mobiluncus</i> sp., <i>Bacteroides</i> sp.
Tricomoniasi	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Vaginiti atrofiche	Ipoestrogenismo
Irritazioni chimiche	Saponi, prodotti per l'igiene (tamponi, pannolini sanitari, profilattici in lattice)
Vaginiti allergiche	Sperma, lavande vaginali, prodotti per l'igiene (tamponi, pannolini sanitari, profilattici in lattice o spirali), tinture, allergeni inalati, esposizioni in ambito lavorativo
Corpi estranei con o senza infezioni o traumi	Tamponi, sistemi contraccettivi, pessario

sele le più varie (Tab. 1), e sebbene il termine "vaginite" sia usato spesso in maniera impropria, esse sono sovente riconducibili a due sole cause: l'atrofia delle mucose e l'infezione. Tra le forme più comuni d'infezione possiamo includere: la vaginosi batterica, la candidiasi vulvovaginale e la tricomoniasi. Generalmente, queste infezioni rispondono al trattamento, anche se per quanto attiene alla candidiasi vulvovaginale, sempre più spesso si riscontrano fenomeni di ricorrenza/resistenza in quelle pazienti in cui sono stati isolati ceppi di *Candida* spp non *albicans* (5-5).

Nel presente studio la valutazione dell'efficacia microbiologica e clinica di una associazione metronidazolo + clotrimazolo (in rapporto quantitativo di 5:1) nella terapia topica di vaginiti miste (candidosi/vaginosi) è stata comparata con il grado di interferenza che tale chemioterapico può determinare sul mantenimento/ ripristino del microbiota lattobacillare (6-9).

Materiali e Metodi

Pazienti

Sono state studiate 20 donne con diagnosi clinica, microbiologicamente confermata, di vulvovaginite micotica e/o vaginosi. Nel periodo dello studio non erano permessi i rapporti sessuali non protetti, e quelli protetti erano consentiti senza uso di lubrificanti e di spermicidi con azione chemioterapica.

Criteri di inclusione

- Pazienti ambulatoriali in età compresa tra 18 e 50

anni, con sintomi di leucorrea e/o senza altri sintomi (bruciore, dolore, arrossamento, lesioni della mucosa vaginale) e sospetta diagnosi di vulvovaginite

- Conferma microbiologica della vulvovaginite e/o vaginosi
- Pazienti negative al PAP test per malattie neoplastiche o infezioni virali
- Pazienti in grado di comprendere le informazioni loro fornite circa lo studio e la volontà di partecipare con la firma del modulo di consenso informato per l'iscrizione nello studio

Criteri di esclusione

- Donne affette da anomalie genitali
- Presenza di vulvovaginite da *Herpes simplex* e *Trichomonas vaginalis*
- Gravidanza
- Trattamenti vaginali o sistemici con antifungini/antibatterici effettuati fino a 15 giorni prima dell'inizio dello studio
- Pazienti precedentemente trattate con metronidazolo e clotrimazolo (5:1) nei mesi precedenti l'inizio dello studio
- Pazienti note per essere inaffidabili ad aderire al protocollo
- Pazienti diabetiche o pazienti affette da altre malattie sistemiche che potrebbero interferire con i risultati dello studio
- Pazienti che hanno rifiutato di firmare il modulo di consenso informato
- Pazienti sieropositive a HBV, HIV e HCV

Raccolta dei campioni patologici

I tamponi vaginali (TV) sono stati raccolti alla prima visita (T_0), a 7-10 giorni dalla fine della terapia (T_1) e al follow-up, cioè 30 giorni dalla fine della terapia (T_2). Oltre al tampone vaginale, ad ogni visita è stato fatto uno striscio vaginale per la valutazione del grado lattobacillare (6-10).

Trattamento

Le donne arruolate hanno ricevuto la terapia (metronidazolo-clotrimazolo, rapporto quantitativo di 5:1) sottoforma di ovuli vaginali da introdurre la sera per 6 giorni consecutivi. Per i 5 giorni successivi al primo giorno di trattamento, le pazienti hanno inoltre effettuato una lavanda vaginale al mattino dopo, utilizzando una soluzione vaginale contenente gli stessi principi attivi, nel medesimo rapporto quantitativo. Dopo la visita all'arruolamento erano previste ulteriori visite ginecologiche a 7-10 giorni e a 30 giorni (follow-up) dalla fine della terapia. In tutte le visite si è proceduto alla raccolta dei campioni per l'esame microbiologico e ad una valutazione clinica. La diagnosi di vaginosi batterica è stata inizialmente formulata sul-

la base dello schema di Amsel (11, 12) e successivamente confortata dall'esame microbiologico. La diagnosi di vulvovaginite micotica è stata basata inizialmente sulle evidenze cliniche e confermata successivamente dai dati microbiologici.

Indagini microbiologiche

Gli strisci vaginali, fissati e colorati con il metodo di Gram, sono stati esaminati con microscopio ottico a 100 ingrandimenti per valutare il grado lattobacillare (6-10) e/o la presenza di cellule di lievito e/o pseudoifite.

I tamponi vaginali sono stati seminati su terreni selettivi per la ricerca degli specifici patogeni. Gli isolati sono stati identificati mediante procedure standard. Le colonie di lieviti cresciute nei rispettivi terreni sono state analizzate inizialmente con il Germ-Tube Test (test di identificazione rapida per *C. albicans*). In particolare, una colonia di lievito è stata diluita in 2 ml di siero bovino fetale e la provetta è stata posta a 35°C per almeno 2 ore. Una goccia di questa sospensione è stata osservata al microscopio (40 X): la formazione di tubuli di germinazione nelle cellule fungine era indicativa di *C. albicans*. Tutti i ceppi isolati, sia quelli negativi sia quelli positivi al test di germinazione, sono stati anche identificati per mezzo di una tecnica enzimatica (API Candida, Biomerieux).

Dosaggio dell'attività *in vitro* di clotrimazolo e metronidazolo, da soli e in associazione

L'attività antimicrobica di clotrimazolo e metronidazolo è stata studiata su ceppi d'isolamento e di collezione. Entrambi i chemioterapici sono stati valutati singolarmente e in associazione. Il clotrimazolo è stato studiato da solo e in associazione con metronidazolo (5:1 metronidazolo-clotrimazolo). Inoltre, nella valutazione sui miceti è stato inserito come antibiotico di confronto l'econazolo. Sono stati studiati:

Miceti: 11 ceppi di *C. albicans*, 4 ceppi di *C. krusei*, 8 ceppi di *C. glabrata*, 5 ceppi di *C. parapsilosis*, 1 ceppo di *C. tropicalis*, 1 ceppo di *C. humicola*, 1 ceppo di *C. dubliniensis*, 1 ceppo di *S. cerevisiae*;

Batteri: 10 ceppi di *S. agalactiae*, 12 ceppi di *E. coli* (sono compresi *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218), 11 ceppi di *Enterococcus* spp. (è compresa *E. faecalis* ATCC 29212), 15 ceppi di *L. rhamnosus*, 10 ceppi di *L. acidophilus* e 1 ceppo di *L. plantarum*.

Il metodo per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici è stato quello delle microdiluzioni in brodo, utilizzando procedure standardizzate (13, 14). Inoltre, l'interazione (19) delle due molecole è stata studiata mediante checkerboard.

Risultati

I risultati dello studio sono mostrati nelle Tabelle 2, 3, 4. Nella Tabella 2 sono riportati i risultati delle minime concentrazioni inibenti per i vari antimicrobici saggiati da soli e in associazione nei confronti di *Candida* spp. e *S. cerevisiae*. Il clotrimazolo si è mostrato attivo nei confronti dei miceti saggiati sia da solo sia in associazione con il metronidazolo. Come atteso, l'associazione delle due sostanze non migliora l'attività intrinseca del clotrimazolo, e ciò è stato confermato dagli esperimenti di checkerboard, che hanno dimostrato solo un effetto di indifferenza, cioè né antagonismo né sinergismo.

Sia clotrimazolo che metronidazolo sono risultati inattivi nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi aerobi (Tab. 3). Al contrario, metronidazolo si è mostrato attivo nei confronti di *G. vaginalis* (Tab. 3), e il miglioramento delle minime concentrazioni inibenti, quando associato al clotrimazolo, è dovuto alla maggiore concentrazione della sostanza e alla contemporanea attività di clotrimazolo.

TABELLA 2 - ATTIVITÀ ANTIMICOTICA DI CLOTRIMAZOLO, DA SOLO E IN ASSOCIAZIONE A METRONIDAZOLO, A CONFRONTO CON ECONAZOLO.

Ceppi (N.°)	Clotrimazolo			Metronidazolo			Clotrimazolo-Metronidazolo (1:5)			Econazolo		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
<i>C. albicans</i> ^a (11)	0,125	0,5	0,125 - 0,5	>64	>64	-	0,25	0,5	0,125 - 0,5	0,25	0,5	0,125 - 0,5
<i>C. krusei</i> ^b (4)	0,25	0,5	0,125 - 0,5	>64	>64	-	0,25	0,5	0,25 - 0,5	1	4	0,5 - 4
<i>C. glabrata</i> (8)	0,25	0,25	0,125 - 0,5	>64	>64	-	0,25	0,25	0,125 - 0,5	0,25	0,5	0,125 - 0,5
<i>C. parapsilosis</i> ^c (5)	0,125	0,125	0,125 - 0,25	>64	>64	-	0,125	0,125	0,125 - 0,5	1	1	0,5 - 1
<i>C. tropicalis</i>	0,5	0,5	-	>64	>64	-	0,5	0,5	-	4	4	-
<i>C. humicola</i>	0,125	0,125	-	>64	>64	-	0,125	0,125	-	2	2	-
<i>C. dubliniensis</i>	0,125	0,125	-	>64	>64	-	0,125	0,125	-	0,125	0,125	-
<i>S. cerevisiae</i>	0,25	0,25	-	>64	>64	-	0,125	0,125	-	0,5	0,5	-

^a È compreso il ceppo di *C. albicans* ATCC 90028

^b È compreso il ceppo di *C. krusei* ATCC 6258

^c È compreso il ceppo di *C. parapsilosis* ATCC 22059

TABELLA 3 - ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI CLOTRIMAZOLO DA SOLO E IN ASSOCIAZIONE A METRONIDAZOLO.

Ceppi (No.)	Clotrimazolo			Metronidazolo			Clotrimazolo-Metronidazolo (1:5)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
<i>S. agalactiae</i> (10)	>512	>512	-	>512	>512	-	>512	>512	-
<i>Enterococcus</i> spp. (11)	>512	>512	-	>512	>512	-	>512	>512	-
<i>E. coli</i> (12)	>512	>512	-	>512	>512	-	>512	>512	-
<i>G. vaginalis</i> (7)	0,25	0,5	0,125 – 0,5	0,125	0,25	0,125 – 0,5	<0,03	<0,03	-
<i>L. acidophilus</i> 10	>512	>512	-	>512	>512	-	>512	>512	-
<i>L. rhamnosus</i> (15)	>512	>512	-	>512	>512	-	>512	>512	-
<i>L. plantarum</i> (1)	>512	>512	-	>512	>512	-	>512	>512	-

TABELLA 4 - DATI MICROBIOLOGICI E GRADO LATTOBACILLARE AI VARI TEMPI DELLO STUDIO.

Numero	Età	TV - T ₀	LBG* - T ₀	TV - T ₁	LBG* - T ₁	T.V. - T ₂	LBG* T ₂
1	29	<i>G. vaginalis</i>	2b	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
2	28	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
3	32	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
4	29	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
5	44	<i>G. vaginalis</i>	3	Ass. crescita	2a	Ass. crescita	1
6	22	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
7	39	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
8	49	<i>C. albicans</i>	2b + cellule di lievito	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
9	23	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
10	40	<i>G. vaginalis</i>	3	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
11	40	<i>G. vaginalis</i>	2b	Ass. crescita	2a	Ass. crescita	1
12	50	<i>G. vaginalis</i>	2b	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
13	45	<i>C. albicans</i>	1 + cellule di lievito	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
14	50	<i>C. albicans</i>	1 + cellule di lievito	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
15	32	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
16	34	<i>C. albicans</i> + <i>G. vaginalis</i>	3 + pseudoife	Ass. crescita	2a	Ass. crescita	1
17	24	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
18	50	<i>C. glabrata</i> + <i>G. vaginalis</i>	3 + cellule di lievito	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1
19	37	<i>C. albicans</i> + <i>G. vaginalis</i>	3	Ass. crescita	2a	Ass. crescita	1
20	31	<i>C. albicans</i>	1 + pseudoife	Ass. crescita	1	Ass. crescita	1

*LBG 1: Predominanza del lattobacillo; LBG 2a: Predominanza del lattobacillo e presenza di altre popolazioni batteriche; LBG 2b: Diminuzione del lattobacillo e presenza di altre popolazioni batteriche; LBG 3: Assenza o scarsissima presenza del lattobacillo e presenza di altre popolazioni batteriche.

I risultati dello studio in vivo sono riportati nella Tabella 4. In tutte le pazienti studiate è stata riscontrata l'assenza di crescita dei patogeni isolati, sia alla prima visita dopo terapia sia al follow-up. Il grado lattobacillare è ritornato normale a 30 giorni dalla fine della terapia. Non sono stati riportati casi di recidive.

Discussione

L'attività antibatterica del metronidazolo si esplica esclusivamente nei confronti di batteri anaerobi responsabili di infezioni anche gravi. L'attività nei con-

fronti di *G. vaginalis* è stata riportata per la prima volta da Pfeifer et al. nel 1978 (20). Da allora sono stati pubblicati numerosi lavori che hanno evidenziato due differenti correnti di pensiero: da un lato i sostenitori dell'attività del farmaco, dall'altra coloro che dubitano della sua efficacia sia *in vitro* che *in vivo*, poiché generalmente più attivo sugli anaerobi di quanto lo sia sugli altri patogeni associati alla vaginosi (21). Nonostante tutto, l'uso del metronidazolo nella terapia della vaginosi garantisce una minore insorgenza di batteri resistenti, diminuendo il rischio della formazione di serbatoi vaginali di resistenza (22, 23). Inoltre, l'incidenza della resistenza al metronidazolo rimane bassa

(23), spesso non riscontrata. Infatti, se si conducesse una metanalisi dei lavori finora pubblicati alla luce dei nuovi break-point MIC per metronidazolo (16), le percentuali di resistenza si abbasserebbero. L'epidemiologia molecolare della resistenza a metronidazolo e i meccanismi che la determinano in *G. vaginalis* sono ancora da chiarire.

Il clotrimazolo è un noto antimicotico la cui attività è ben nota (24). Nell'uso topico, fra l'altro, ha dimostrato un più basso livello di effetti collaterali rispetto agli antimicotici a somministrazione orale (25). Il clotrimazolo è anche attivo su *G. vaginalis* (26), garantendo così anche una buona efficacia terapeutica nelle infezioni miste (27).

I risultati della sperimentazione *in vitro* hanno dimostrato (Tab. 2) che il clotrimazolo è più attivo dell'econazolo nei confronti di tutti i ceppi saggiati sia di isolamento sia di collezione. In particolare una maggiore attività è stata riscontrata nei confronti di ceppi "non albicans" (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. humicola*). L'associazione con il metro-

nidazolo, non attivo nei confronti dei funghi, non modifica l'attività intrinseca del farmaco.

Clotrimazolo e metronidazolo non hanno mostrato attività nei confronti dei batteri saggiati, ad eccezione di *G. vaginalis*. La buona attività di clotrimazolo nei confronti di *G. vaginalis*, conferma quanto riportato da Jones et al. (26). Le MIC di metronidazolo sono inferiori a quelle riportate da altri Autori (18, 22). L'associazione delle due molecole mostra un notevole effetto sinergico nei confronti proprio di *G. vaginalis*.

La totale mancanza di attività nei confronti dei lattobacilli da parte di metronidazolo e clotrimazolo, sia da soli che in associazione, è un dato di peculiare importanza sull'impatto della terapia con le due sostanze nei confronti del microbiota vaginale "normale" (29, 30). Il microbiota vaginale è costituito da un'ampia varietà di generi e di specie, sia aerobi che anaerobi (31), con una predominanza dei lattobacilli, che pare rappresentare un fattore di controllo dello sviluppo in vagina degli altri microrganismi (31-35) (Fig. 1). È sempre più riconosciuto che tale microbio-

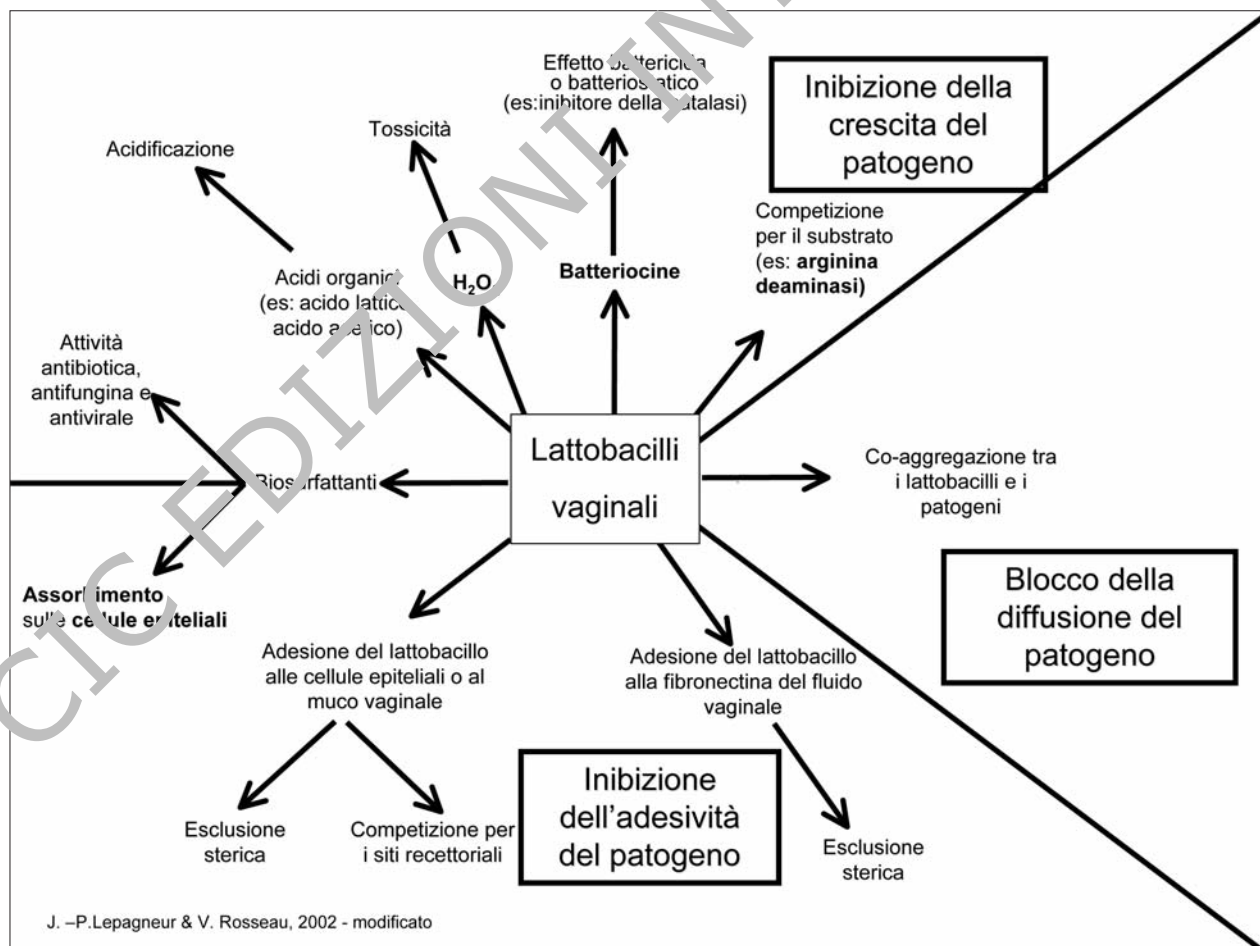


Fig. 1 - Meccanismi di protezione mostrati dai lattobacilli.

ta vaginale abbia un'azione di protezione dagli agenti patogeni invasivi, compresi quelli responsabili di infezioni urinarie e di malattie sessualmente trasmesse (31, 32, 34-36).

Negli ultimi anni c'è stato un riconoscimento sempre maggiore sul ruolo dei lattobacilli nel mantenimento dell'omeostasi all'interno delle comunità microbiche vaginali e nella prevenzione della colonizzazione e dell'infezione causata da organismi patogeni (31-32, 34-36). Come detto in precedenza, i lattobacilli sono componenti importanti del microbiota vaginale; infatti, contribuiscono a respingere gli agenti patogeni invasivi e possono anche prevenire le infezioni sia della vagina sia del tratto urinario interferendo con

la colonizzazione dell'epitelio periuretrale da parte di uropatogeni come *E. coli* (31-36) (Fig. 1). Quindi, una perdita dei lattobacilli vaginali può predisporre le donne ad infezioni genito-urinarie (31-38).

In conclusione, parecchie strategie possono essere usate per diminuire il rischio di recidive e la colonizzazione vaginale da batteri resistenti. Quando si prescrive un trattamento per le vaginiti, la scelta degli agenti antimicrobici dovrebbe tenere conto non solo del loro spettro antimicrobico, ma anche dell'eventuale alterazione del microbiota aerobio ed anaerobio vaginale e rettale, che essi potrebbero causare. In base a queste considerazioni, l'uso di metronidazolo e clotrimazolo risulta appropriato.

Bibliografia

1. SOBEL JD. *Vulvovaginal candidosis*. Lancet. 2007; 369: 1961-71.
2. CORSELLO S, SPINILLO A, OSNENGO G, et al. *An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy*. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2003; 110: 66-72.
3. RINGDAHL EN. *Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis*. Am Fam Physician. 2000; 61: 3306-12, 3317.
4. SPINILLO A, CAPUZZO E, ACCIANO S, DE SANTOLC A, ZARA F. *Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis*. Am. J. Obstet. Gynecol. 1999; 180: 14-7.
5. PATEL DA, GILLESPIE B, SOBEL JD, et al. *Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study*. Am. J. Obstet. Gynecol. 2004; 190: 644-53.
6. SCHRÖDER K. *Zür pathogenese un klinik des vaginalen vaginal-biocoenose auf sechs grunbilder*. Zentralbl Gynekol 1921; 45: 1350-61.
7. DONDERS GGG. *Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears*. Infect Dis Obstet Gynecol. 1999; 171: 177-9.
8. DONDERS GGG, BOSMANS E, DE KEERSMAECKER A, VERECKEN A, VAN BULCK B, SPITZ B. *Pathogenesis of abnormal vaginal flora*. Am J Obstet Gynecol. 2000; 182: 872-9.
9. DONDERS GGG, VERECKEN A, BOSMANS E, DE KEERSMAECKER A, SALEMBIER G, SPITZ B. *Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis* BJOG 2002; 109(1): 34-43.
10. DONDERS GGG. *Definition and classification of abnormal vaginal flora* Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 2007; 21: 355-73.
11. AMEEL R, TOTTEN PA, SPIEGEL CA, CHEN K, ESHENBACH DA, HOLMES KK. *Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial epidemiological associations*. Am J Med 1983; 74: 14-22.
12. NUGENT RP, KROHN MA, HILLIER SA. *Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by standardised method of Gram stain interpretation*. J Clin Microbiol 1991; 29: 297-301.
13. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) *Eucast Discussion Document E.Dis 7.1*. CMI 2002; 9: 1-8.
14. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard - Seventh Edition*. CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
15. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement*. 2007; CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
16. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Seventh Edition*. CLSI document M11-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
17. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria: Approved Guideline*. CLSI document M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
18. DE BACKER E, VERHELST R, VERSTRAELEN H, CLAEYS G, VERSCHRAEAGEN G, TEMMERMAN M, et al. *Antibiotic susceptibility of Atopobium vaginae*. BMC Infectious Diseases 2006; 6:5.
19. HINDLER J. *Antimicrobial susceptibility testing*, p. 5.18.11-15.18.20. In H. D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1995.
20. PHEIFER TA, FORSYTH PS, DURFEE MA, POLLOCK HM, HOLMES KK. *Nonspecific vaginitis: role of Haemophilus vaginalis and treatment with metronidazole*. N Engl J Med. 1978; 298: 1429-34.
21. AUSTIN MN, MEYN LA, HILLIER SL. *Susceptibility of vaginal bacteria to metronidazole and tinidazole*. Anaerobe 2006; 12: 227-30.
22. 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: 1124-9.
23. AUSTIN MN, BEIGI RH, MEYN LA, HILLIER SL. *Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole*. J Clin Microbiol. 2005; 43:

- 4492-7.
24. SAWYER PR, BROGDEN RN, PINDER RM, SPEIGHT TM, AVERY GS. *Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy*. *Drugs*. 1975; 9: 424-47.
 25. SÖBEL JD, BROOKER D, STEIN GE, THOMASON JL, WERMELING DP, BRADLEY B, WEINSTEIN L. *Single oral dose fluconazole compared with conventional clotrimazole topical therapy of Candida vaginitis*. Fluconazole Vaginitis Study Group. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 172: 1263-8.
 26. JONES BM, GEARY I, LEE ME, DUERDEN BI. *Comparison of the in vitro activities of fenticonazole, other imidazoles, metronidazole, and tetracycline against organisms associated with bacterial vaginosis and skin infections*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33: 970-2.
 27. PÉPIN J, SOBELA F, KHONDE N, AGYARKO-POKU T, DIAKITÉ S, DESLANDES S, et al. *The syndromic management of vaginal discharge using single-dose treatments: a randomized controlled trial in West Africa*. *Bull World Health Organ*. 2006; 84: 729-38.
 28. GOLDSTEIN EJ, CITRON DM, MERRIAM CV, WARREN YA, TYRRELL KL, FERNANDEZ HT. *In vitro activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of Gardnerella vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 3995-6.
 29. AGNEW KJ, HILLIER SL. *The effect of treatment regimens for vaginitis and cervicitis on vaginal colonization by lactobacilli*. *Sex Transm Dis*. 1995; 22: 269-73.
 30. SIMOES JA, AROUTCHEVA AA, SHOTT S, FARO S. *Effect of metronidazole on the growth of vaginal lactobacilli in vitro*. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001; 9: 41-5.
 31. RICHTER SS, GALASK RP, MESSER SA, HOLLIS RJ, DIEKEMA DJ, PFALLER MA. *Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 2155-62.
 32. NWOKOLO NC, BOAG FC. *Chronic vaginal candidiasis. Management in the postmenopausal patient*. *Drugs Aging*. 2000; 16: 335-9.
 33. REDONDO-LOPEZ V, COOK RL, SOBEL JD. *Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora*. *Rev Infect Dis*. 1990; 12(5): 856-72.
 34. BORIS S, SUAREZ JE, VAZQUEZ F, BARBES C. *Association of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens*. *Infect. Immun* 1998; 66: 1985-1989.
 35. HOOTON TM, STAMM WE. *The vaginal flora and urinary tract infections*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. In: Mollby HLT, Warren JW, editors. *Urinary tract Infections*. Washington DC: ASM Press, 1996: 67-94.
 36. LEPARGNEUR JP, ROUSSEAU J V. *Protective role of the Doderlein flora*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2002; 31(5): 485-94.
 37. REID G. *Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection*. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 437S-443S.
 38. MCGROGARTY JA. *Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993; 6: 251-264.
 39. EDLUND C, NORD CE. *Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2000; 46 (suppl. S1): 41-48.
 40. HOOTON TM, SCHOLDS D, GUPTA K, et al. *Amoxicillin-clavulanate vs ciprofloxacin for the treatment of uncomplicated cystitis in women: a randomized trial*. *JAMA* . 2005; 293: 949-55.