

Asemptomatik Kadınlarda Vajinal ve Rektal Laktobasillerin Tespiti ve İlişkilerinin Belirlenmesi

Detection of Vaginal and Rectal Lactobacilli in Asymptomatic Women and Determination of Relationships

Suna KIZILYILDIRIM¹, Fatih KÖKSAL²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Özet

Amaç: Laktobasiller kadınların vajinal sağlığında önemli bir rol oynar. Bakteriyel vajinosiz (BV), vajinal laktobasiller tükendiğinde veya çeşitli anaerobik bakteriler artığında ortaya çıkar. BV kadınlarda en sık görülen alt genital sistem yakınmasıdır. Bu çalışmada asemptomatik 40 kadından alınan vajinal (VSÖ) ve rektal sürüntü örnekleri (RSÖ) laktobasil türlerinin tespiti için değerlendirildi.

Gereç ve Yöntemler: Laktobasillerin karakterizasyonunda fenotipik (BD BBL CRYSTALTM ANR) yöntemi ve sekans bazlı RAPD-PCR kullanıldı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen kadınların 15'inde asemptomatik BV bulgularına sahip oldukları görüldü. Kristal yöntem ile kadınların vajen ve rektum sürüntü örneklerinden 111 laktobasil türü izole edildi. Bu izolatların 11 farklı türe ait olduğu görüldü. RAPD-PCR ile yapılan tiplendirmede ise 81 laktobasil türü izole edildi ve 9 farklı laktobasil türüne dağıldığı tespit edildi. RAPD-PCR sonuçları baz alındığında en sık izole edilen laktobasil türünün vajende 10 izolat, rektal bölgede 8 izolat ile *L. gasseri* olduğu görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak vajene kolonize olan laktobasil türlerinin rektum kökenli olabilecekleri düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel vajinosiz, RAPD, Laktobasiller.

Abstract

Objective: Lactobacilli play an important role in women's vaginal health. Bacterial vaginosis (BV) occurs when the vaginal lactobacilli are depleted or various anaerobic bacteria increase. BV is the most common lower genital tract complaint in women. In this study, vaginal (VSO) and rectal swab samples (RSO) taken from 40 asymptomatic women were evaluated for the detection of lactobacilli species.

Material and Methods: Phenotypic (BD BBL CRYSTAL ANR) method and sequence-based RAPD-PCR were used in the characterization of lactobacilli.

Results: It was observed that 15 of the women included in the study had asymptomatic BV findings. 111 lactobacil species were isolated from vaginal and rectal swab samples of women using crystal method. These isolates were found to belong to 11 different species. In the typing performed by RAPD-PCR, 81 lactobacillus species were isolated and it was determined that they were distributed to 9 different lactobacilli species. Based on the RAPD-PCR results, it was seen that the most frequently isolated lactobacillus species was *L. gasseri* with 10 isolates in the vagina and 8 isolates in the rectal region.

Conclusion: As a result, it was thought that the lactobacilli species colonized into the vagina may originate from the rectum.

Key words: Bacterial vaginosis, RAPD, Lactobacilli.

Yazışma Adresi: Suna KIZILYILDIRIM, Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

Telefon: 05443743458, Mail: sunakizilyildirim@sdu.edu.tr

ORCID No (Sırasıyla): 0000-0002-1039-8556, 0000-0003-0790-1525

Geliş Tarihi: 18.08.2020

Kabul Tarihi: 07.11.2020

DOI: 10.17517/ksutfd.780596

GİRİŞ

Vajen yüzlerce mikroorganizmaya ev sahipliği yapan canlı bir ekosistemdir. Vajen mikroflorası, karşılıklı ilişki içinde bulunan çok sayıda mikroorganizmayı barındırır ve kommensal bir denge içinde varlıklarını sürdürürler (1,2). Mikroorganizmalar arasındaki denge, vajen homeostazının korunması için oldukça önemlidir (3). Vajen mikroflorasının kompozisyonu, kadın ürogenital sistem enfeksiyonlarına karşı direncini veya duyarlılığını önemli ölçüde değiştirmektedir (2).

Hormonların etkisi ile vajen mikroflorası değişiklik göstermektedir (1). Prepubertal dönemde östrojen seviyesinin yetersizliğinden dolayı vajinal mikroflorada anaeroblar, *E. coli*, dipteroidler ve koagülaz negatif Staphylococci gibi mikroorganizmalar yer alırken, pubertal dönemde ise östrojen üretiminin artışıyla Laktobasiller hakim olmaktadır (2). Bu dönemde artan östrojen seviyeleri, vajen epitel hücrelerinde proliferasyon ve glikojen birikimini teşvik eder. Glikojen a-amilazı, maltoz, maltotrioz ve a-dekstrinlere katabolize edilir ve daha sonra Laktobasil türleri tarafından laktik aside metabolize edilir. Vajende biyomembran oluşturabilen çok sayıda Laktobasilin, laktik asidi metabolize ederek asidik ortam (pH, 3.5-4.5) oluşturulmasıyla diğer anerob patojen mikroorganizmalar baskılanır (2,4,5). Laktik asit üreterek sağlıklı vajinal ortam oluşturan Laktobasil türleri hidrogen peroksit, organik asitler ve bakteriyosinler gibi faydalı probiyotik ürünleri sentezlerler (6). Vajinal Laktobasiller, üreme sisteminde bazı patojenlere karşı geniş antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (7). Yapılan çalışmalarda, Laktobasil türleri tarafından metabolize edilen laktik asidin, servikovajinal epitel hücrelerinde güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların ve bulaşma riskini azalttığını göstermiştir (8). Bununla birlikte ürogenital sistem epiteline kolonize olan Laktobasillerin bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeleri üreterek patojenik bakterilere karşı koruduğu bildirilmiştir (5). Postmenapozal dönemde ise östrojen üretimindeki azalmaya paralel olarak Laktobasil türlerin sayısı azalır. Vajenin korunması kalker ve çok sayıda anaerob/aerob mikroorganizma türleri florada baskın hale geçerler (2).

Pubertal dönemde sık antibiyotik kullanımı, hormonal kontraseptifler, obezite, gebelik, diyabet, vajinal duş, sık seks eşi değiştirme, genç yaşta cinsel ilişki, iyi kurulanmama

gibi risk faktörlerinin etkisiyle vajenin fizyolojik özellikleri ve ekolojik yapısı bozulur (10,11). Başta laktobasiller olmak üzere laktik asit bakterilerinin sayısı hızla düşer. *Floraya G. vaginalis*, *Bacteroides*'ler ve *Provitella* türlerinden oluşan Gram-negatif anaerobik çomaklar, Gram-pozitif anaerobik koklar, kıvrık çomaklar, genital mikoplazmalar, *Atopobium*, *Dialister*, *Megasphare*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, *Mobiluncus* gibi fakültatif anaerob çomaklardan oluşan miks mikroorganizma toplulukları yerleşir (12). Vajinal mikroflorada baskın olan Laktobasillerin yerini alan zorunlu anaerobik ve fakültatif Gram negatif bakterileri polimikrobiyal flora oluşturarak BV'in gelişmesine zemin hazırlar (13).

Çalışmada; asemptomatik kadınların vajeni ile rektal florasında yerleşik Laktobasillerin izolasyonu, genotipik RAPD-PCR yöntemlerle vajinal ve rektal laktobasillerin tür tespiti ve ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmaya Sağlık Bakanlığı Adana Deri ve Zührevi Hastalıklar polikliniğine gelen, 40 kadına ait VSÖ ve RSÖ dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 20-50 yaş grubu olması şartı aranmıştır. Çalışmada araştırma etiği yönünden Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan izin alındı (Etik kurul sayı:8, Karar no:7, 03.05.2012) ve Helsinki Bildirisi kullarına uyuldu. Her hastadan rutin muayene esnasında Dacron swab ile vajenden 3, rektal bölgeden ise 1 sürüntü örneği alındı. Vajinal örnekler; vajen duvarına temas ettirilen eküvyonlar yardımıyla 360° yavaşça döndürülerek, rektal örnekler ise anal sfinkterin yaklaşık 1.5-2 cm ilerisinden duvar temasından yavaşça döndürülerek alındı. Vajinal örneklerden biri lam üzerine yayılarak sprey yardımı ile fikse edildi. Ardından mikroskopik değerlendirme için Gram boyası ile boyandı. Gram boyanan örnekler BV yönünden hem Amsel ve Nugent hem de Ison&Hay kriterleri (IHK) ile değerlendirildi (14). Ison&Hay kriterleri gerek BV gerekse laktobasil türlerini de içeren sağlıklı vajen florasını da dahil ettiği daha kapsamlı bir kriterleme olduğundan Amsel ve Nugent skorlamaya ek olarak çalışmada tercih edildi.

Amies transport besiyeri içerisine alınan ikinci eküvyon laktobasil türlerinin izolasyonu için De Mann Rogosa Sharp (Oxoid, UK), domates salçalı agar besiyerine ekildi. Son alınan vajinal örneğe ise hasta başı stripler ve %10 KOH (Whiff) testi uygulanarak vajinal pH ve balık kokusunun varlığı araştırıldı. Rektal bölgeden alınan örnekler ise laktobasil türlerinin izolasyonu için De Mann Rogosa Sharp (Oxoid, UK),

Tablo 1.Ison&Hay kriterleri

Grade Ia	<i>L. crispatus</i> (oldukça dolgun, homojen basiller)
GradeIb	non- <i>L. crispatus</i> (zayıf, kısa veya uzun basiller)
GradeIab	non- <i>L. crispatus</i> + <i>L. crispatus</i> (düzensiz gram pozitif basiller)
GradeII	Laktobasil + BV ile ilişkili bakteriler (<i>G. vaginalis</i> , <i>Bactroides</i> , <i>Mobilincus</i> ...)
GradeIII	BV ile ilişkili bakteriler
GradeIV	Gram pozitif koklar

domates salçalı agar besiyerine ekildi. Vajen ve rektal sürüntü örneklerinden ekim yapılan besiyerleri anaerobik şartlarda (%10 H₂, %10 CO₂, %80 N₂) 37°C de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 0.5, 1 mm çapında, beyaz S tipi oksidaz ve katalaz aktivitesi negatif olan koloniler laktobasil yönünden değerlendirildi. Ardından laktobasil şüpheli koloniler Gram boyama ile morfolojik olarak incelendi. Gram pozitif basil morfolojisine sahip olan izolatlar laktobasil olma ihtimaline karşı Kristal (BD BBL CRYSTAL™ ANR) yöntemi kullanılarak fenotipik olarak tanımlandı. Laktobasil olduğu düşünülen kolonilerden öze yardımıyla alınıp serum fizyolojik ile 0.5 Mc Farland bulanıklık ayarlandıktan sonra BD BBL CRYSTAL™ ANR kite ekim yapıldı ve 37°C' de 18 saat inkübe edildi. Kit içerisinde hazır bulunan bazı aminoasitlerin laktobasiller tarafından kullanılmasıyla açığa çıkan renk oluşumu dikkate alındı ve Anaerob ID System bilgisayar programı kullanılarak koloniler tiplendirildi.

Laktobasil olduğu belirlenen izolatlar genotipik olarak RAPD-PCR ile tür düzeyinde tanımlandı. Laktobasil DNA ekstraksiyonu için mickle ekstraksiyon metodu kullanıldı. Saf kültürde üreyen laktobasil kolonilerinden öze yardımıyla alınan örnekler serum fizyolojik bulunan tüpler içine konularak karıştırıldı ve Mc Farland 5 bulanıklığına ayarlandı. Karışımdan 500 µl. epondorfa alınıp 8000g de 3 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı vepellet üzerine TE buffer eklenerek pipetaj yapıldı. Hazırlanan süspansiyon 100°C' de 10 dakika kaynatıldı. Süspansiyon içerisine 150 µl boncuk eklendi ve mickle da maksimum hızda 7 dakika lizis edildi. Daha sonra 12.000 g' de 10 dakika santrifüj edildi. 200 µl. süpernatant alındı ve - 20°C' de RAPD-PCR işlemine kadar bekletildi.

RAPD-PCR analiz için RAPD Ready-to-Go beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) kiti kullanıldı. RAPD analizi, reaksiyon karışımı; 25 pmol OMP1 primeri, 10 ng template DNA' dan 2µl ve 18µl distile su ile total hacim 25µl olarak tamamlandı. Amplifikasyon aşamaları thermal cycler cihazında (Bio-Rad, MJ mini thermal cycler), 94°C'de 5 dakika, 35°C'de 5 dakika, 72°C'de 5 dakika olmak üzere toplam 30 siklus ile 94°C'de 30 saniye, 35°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 5 dakika şeklinde gerçekleştirildi (15). RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılan amplikonlar, ABI 310 genetic analyzer cihazı ile kapiller elektroforeze tabii tutularak speaker bölge uzunluk polimorfizmlerine göre genotiplendirildi. Sonuçlar Genescan Analysis software, version 2.1 (Applied Biosystems) ile Dice kriterlerine göre değerlendirildi (16).

BULGULAR

Çalışmada kadınların 30-39 (%52.5) yaş grubunda yoğunlaştıkları görüldü (**Tablo 2**)

Amsel-Nuget skorlama ve Ison&Hay kriterlerine göre artmış vajinal pH, gram yayma morfolojisi, KOH testi ve Clue cell varlığı BV tespiti için kriter olarak baz alındı. Çalışmaya dahil edilen kadınların 15 (% 37.5)'inde herhangi bir klinik yakınma olmamasına rağmen yapılan testler sonucunda asemptomatik BV'i işaret eden bulguların olduğu görüldü. Asemptomatik BV'li kadınların 5'inde sadece vajinal

pH'nın arttığı, 4 kadında ise hem artmış vajinal pH hem de KOH testinin pozitif olduğu ve İHK göre de Grade III'de yer aldığı görüldü (**Şekil 1-Tablo 3**).

Tablo 2. Kadınların yaş gruplarına dağılımı

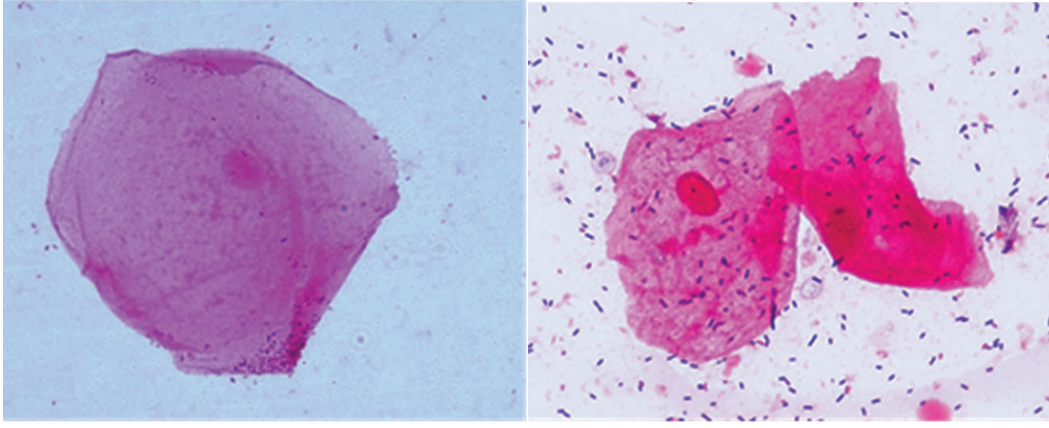
Yaş grupları	Sayı	%
20-29	13	32.5
30-39	21	52.5
40-50	6	15.0
TOPLAM	40	100

Tablo 3. Asemptomatik BV'li kadınların laboratuvar bulguları

Laboratuvar bulguları		Olgu	
		Sayı	%
pH değerleri >4.5		5	33.3
KOH +		1	6.7
İHK	GradeII	0	0
	GradeIII	2	13.3
	GradeIV	3	20
İHK + >bir bulgu	GradeIII	4	26.7
Toplam		15	100

Kadınların vajinal ve rektal sürüntü örneklerinden MRS ve Domatesli agar besiyerlerine yapılan inokülasyon sonucu üreyen kolonilerden morfolojik olarak laktobasillere benzer özelliğe sahip olanlar seçildi. Öze yardımı ile alınan örnekler mikroskopik morfolojilerini tespiti için lama yayılarak gram boyama ile boyandı. Gram pozitif basil morfolojisine sahip koloniler oksidaz ve katalaz yönünden test edildi. Oksidaz ve katalaz testleri negatif olan koloniler laktobasil olarak değerlendirildi. Bu kolonilerden MRS agar besiyerlerine pasajlar yapılarak ilk izolasyon şartları ve süresinde inkübasyona bırakıldı. Sonuç olarak vajen kültürlerinden izole edilen 64 suş ile rektum örneklerinden izole edilen 68 suşun laktobasiller ile uygun fenotip özellik gösterdiği tespit edildi. Bu suşların Kristal (BD BBL CRYSTAL™ ANR kit) ile yapılan fenotipik biyokimyasal analizleri sonunda ise vajen örneklerinin 59 (%70)'u ile rektal sürüntü örneklerinin 52 (77.5)'sinden izole edilen suşların laktobasil türleri olduğu belirlendi. Vajinal sürüntü örneklerinde en sık izole edilen türün de 14 örnekte tespit edilen *L. gasseri* olduğu, bunu 11 örnek ile *L. acidophilus*'ün izlediği görüldü (**Tablo 4**).

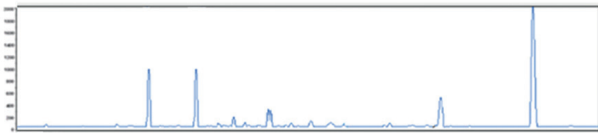
RAPD-PCR genotipik identifikasyon sonucunda; Kristal yöntem ile vajen örneklerinden laktobasil olarak tanımlanan 59 suşun 47'sinin (%79.66), rektal örneklerinden ise 52 suşun 34'ünün (%65.38) laktobasil türü olarak tanımlandığı görüldü. Bununla birlikte en sık izole edilen laktobasil türünün vajende 10 izolat, rektal bölgede 8 izolat ile *L. gasseri* olduğu, bunu vajende 11, rektal bölgede 5 izolat ile *L. casei*'nin izlediği tespit edildi (**Tablo 5, Şekil 2-3**).



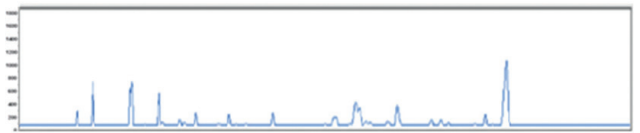
Şekil 1. Vajinal sürüntü örneklerinin direk mikroskopik görüntüsü

Tablo 4. Kristal yöntem ile tanımlanan laktobasil türleri ve örneklere dağılımı

Laktobasil türleri	VSÖ	RSÖ
<i>L. gasseri</i>	14	11
<i>L. acidophilus</i>	11	16
<i>L. casei</i>	9	5
<i>L. crispatus</i>	8	5
<i>L. rhamnosus</i>	4	4
<i>L. salivarius</i>	3	1
<i>L. vaginalis</i>	1	1
<i>L. helveticus</i>	2	0
<i>L. iners</i>	2	0
<i>L. jensenii</i>	3	4
<i>L. fermentum</i>	2	5
Toplam	59	52



Şekil 2. ABI310 ile tanımlanan *L. crispatus* RAPD-PCR pikleri



Şekil 3. ABI310 ile tanımlanan *L. gasseri* RAPD-PCR pikleri

Tablo 5. RAPD-PCR ile tanımlanan laktobasil türleri ve örneklere dağılımı

Laktobasil türleri	VSÖ	RSÖ
<i>L. gasseri</i>	10	8
<i>L. casei</i>	8	5
<i>L. crispatus</i>	7	3
<i>L. jensenii</i>	6	4
<i>L. acidophilus</i>	5	10
<i>L. rhamnosus</i>	4	4
<i>L. vaginalis</i>	3	0
<i>L. helveticus</i>	3	0
<i>L. iners</i>	1	0
Toplam	47	34

RAPD-PCR analizi ile sağlıklı 25 kadının hem vajen hem de rektal floralarında en az bir laktobasil türünün bulunduğu görüldü. Kadınların 17'sinde (%68) rektal floralarından tespit edilen bazı laktobasil türlerinin vajen florasında da yer aldığı görüldü. Böylece rektal florada bulunan laktobasil türlerinin komşuluk yoluyla vajen florasına geçebileceği düşünüldü. Kadınların 9'unda (%36) vajende tek bir laktobasil türü tanımlanırken, 1 kadında (%4) 3 farklı laktobasil türü, diğer kadınlarda (%60) ise iki farklı laktobasil türünün yer aldığı da görüldü. RAPD-PCR analizi ile sağlıklı 25 kadında tanımlanan laktobasil türlerinin yaş, izole edildikleri bölge ve Ison&Hay kriterlerine göre dağılımı **Tablo 6'da** gösterildi.

Asemptomatik BV 15 kadının RAPD-PCR analizi sonucunda ise KOH testi pozitif olan bir kadın ile vajen pH'sı

4.5'den büyük olan 2 kadında laktobasil türlerinin vajende kolonize olduğu, ancak rektal sürüntü örneklerde laktobasil türü bulunmadığı görüldü (**Tablo 7**).

Çalışmada bir diğer bulgu ise Kristal yöntem ile fenotipik olarak laktobasil olduğu tespit edilen 111 izolatın sadece 81'i RAPD-PCR ile laktobasil olarak tanımlanması idi. Kristal yöntemi baz alındığında RAPD-PCR'in duyarlılığı % 72.97 oranında olduğu görüldü. Ayrıca Kristal sonuçları ile RAPD-PCR sonuçları arasında diğer türlerin sayısı ve lokalizasyon dağılımları arasında da bazı uyumsuzluklar olduğu görüldü. Kristal yöntem ile *L. salivarius* ve *L. fermentans* olarak tanımlanan izolatların RAPD-PCR'da karşılıklarının olmadığı, yani tanımlanmadıkları görüldü. Bu bağlamda RAPD-PCR'in spesifitesinde güvenilirlik problemi olduğu görüldü.

Tablo 6. Sağlıklı kadınlarda RAPD-PCR ile tanımlanan laktobasil türleri

Yaş	Vajen	Rektal	Kriterler
20-29	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	Ib
20-29	<i>L. gasseri, L. casei</i>	<i>L. jensenii</i>	Ib
20-29	<i>L. gasseri, L. crispatus</i>	<i>L. casei, L. jensenii</i>	Iab
20-29	<i>L. acidophilus, L. jensenii</i>	<i>L. acidophilus, L. gasseri</i>	Ib
20-29	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	Ib
20-29	<i>L. crispatus, L. casei</i>	<i>L. crispatus, L. casei</i>	Iab
20-29	<i>L. helveticus</i>	<i>L. jensenii</i>	Ib
20-29	<i>L. casei, L. rhamnosus</i>	<i>L. casei, L. acidophilus</i>	Ib
20-29	<i>L. gasseri, L. casei</i>	<i>L. acidophilus, L. gasseri</i>	Ib
30-39	<i>L. gasseri, L. jensenii</i>	<i>L. acidophilus, L. jensenii</i>	Ib
30-39	<i>L. crispatus</i>	<i>L. acidophilus, L. crispatus</i>	Ia
30-39	<i>L. jensenii, L. iners</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Ib
30-39	<i>L. gasseri, L. casei, L. rhamnosus</i>	<i>L. gasseri, L. acidophilus</i>	Ib
30-39	<i>L. rhamnosus, L. jensenii</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Ib
30-39	<i>L. gasseri, L. helveticus</i>	<i>L. gasseri, L. acidophilus</i>	Ib
30-39	<i>L. gasseri, L. vaginalis</i>	<i>L. gasseri</i>	Ib
30-39	<i>L. crispatus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Ia
30-39	<i>L. casei, L. helveticus</i>	<i>L. casei</i>	Ib
30-39	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	Ib
30-39	<i>L. vaginalis</i>	<i>L. casei</i>	Ib
30-39	<i>L. jensenii, L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	Ib
30-39	<i>L. casei, L. rhamnosus</i>	<i>L. casei, L. rhamnosus</i>	Ib
40-50	<i>L. gasseri, L. vaginalis</i>	<i>L. gasseri</i>	Ib
40-50	<i>L. gasseri</i>	<i>L. gasseri</i>	Ib
40-50	<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>	Ia

Tablo 7. Asemptomatik BV'li kadınlardan izole edilen laktobasil türleri

Yaş grupları	Laktobasil türü	Lab. bulguları
20-29 yaş	<i>L. crispatus</i>	pH >4.5
30-39 yaş	<i>L. gasseri, L. acidophilus</i>	pH >4.5
30-39 yaş	<i>L. jensenii, L. crispatus</i>	KOH

TARTIŞMA

BV tüm dünyada en sık karşılaşılan vajinal yakınmadır. Kötü kokulu vajinal akıntı, kaşıntı, yanma hissi ile karakterize non-enflamatuvar klinik tablodur. BV'nin etyolojisi, sağlıklı vajende görülen koruyucu laktobasillerde azalma buna karşılık çoğu iyi tanımlanmamış anaerob bakterilerde önemli kantitatif artış karakteristiktir (17).

Sağlıklı asemptomatik kadına ait vajinal ve rektal sürüntü örneğini değerlendirdiğimiz ve birden fazla sellektif besiyeri kullandığımız çalışmamızda kadınların 28 (%70)'inde en az bir laktobasil türü izole edildi. Laktobasillerin fenotipik özelliklerine göre tiplendirilmesinde yöntemlerin sensitivite ve spesifitelerindeki düşüklükten kaynaklanan problemler bu bakteriler ile ilgili çalışmaların en önemli handikapıdır. Nitekim bizim çalışmamızda fenotipik karakterlerine göre laktobasillere benzeyen 64'ü vajen kökenli olmak üzere toplam 132 izolatomuz vardı. Kristal yöntemi ile bu suşlardan yine 59'u vajen örneklerine ait olmak üzere 111'inin laktobasil türleri olduğunu ve bunların 11 tür içerisinde dağıldıkları görüldü. Oysa RAPD-PCR ile yaptığımız genotipleme bu 111 suştan sadece 81'inin laktobasil oldukları ve majör 9 tür içerisinde dağıldıkları görüldü. Kadınların her ne kadar tamamı her hangi bir klinik yakınmaya sahip değilse de 15 (% 37.5)'i laboratuvar bulgularına göre asemptomatik BV tanımına giriyordu. Bu kadınlardan sadece 3 (%20)'ünde vajinal floradan laktobasil türleri izole edildi.

RAPD-PCR ile elde edilen sonuçlar baz alındığında; vajen örneklerinden en yüksek oranda izole edilen türün 10 suş ve %35.7'lik oran ile *L. gasseri* olduğu görüldü. Bunu %28.5 ile *L. casei* ve %25 ile *L. crispatus* izledi. Rektal sürüntü örneklerinde ise en sık karşılaşılan laktobasil türü %35.7 ile *L. acidophilus* olup, bunu % 28.6 ile *L. gasseri* ve % 17.8 ile *L. casei*'nin izlediği görüldü. Genel olarak sağlıklı 25 kadının hem vajen hem de rektal floralarında en az bir laktobasil türünün bulunduğu görüldü. Kadınların %68'inde vajen ve rektumda aynı tür laktobasillerin kolonize oldukları tespit edildi. Vajene kolonize olan benzer laktobasil türlerinin rektum kökenli olabileceği kanısına varıldı.

Famularo ve arkadaşları sağlıklı kadınların vajinal florasında *L. acidophilus*, *L. crispatus* ve *L. jensenii*'yi en yaygın vajinal laktobasil türleri olarak tanımlamışlardır (18). Antonio ve arkadaşları çalışmalarında vajende en sık *L. crispatus* (% 31) ardından sırası ile *L. jensenii* (% 23), *L. iners*'in (% 15) takip ettiği, *L. crispatus*'un (% 16) aynı zamanda rektumdan en sık izole edilen Laktobasillus türü olduğu bunu *L. jensenii* (% 10), *L. gasseri*'nin (% 10) takip ettiğini bildirmişlerdir (19). Gustafsson ve ark. pubertal dönemdeki kadınlarda vajende en sık tespit edilen türlerin sırasıyla *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, rektumda *L. plantarum*, *L. vaginalis*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* olduğu buna karşılık postmenopozal dönemdeki kadınlarda ise vajende en sık *L. gasseri* ve *L. crispatus* olduğu, rektumda ise *L. plantarum*, *L. gasseri* türlerinin daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir (20). Petricevic ve arkadaşları sağlıklı postmenopozal kadınların vajen sme-

arlerinde *L. delbrueckii* baskın olduğunu, hem vajen hem de rektumda *L. casei* türünün baskın olduğunu bildirmişlerdir (21). Çalışmamızda en yaygın görülen laktobasil türlerinin yapılan bu çalışmalarla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bununla birlikte Antonio ve arkadaşları çalışmalarında 58 kadında iki veya daha fazla Laktobasillus türünü tespit etmeleriyle, çalışmamızdaki sürüntü örneklerinde birden fazla türün görülmesiyle benzemektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Kılıç ve arkadaşları ABD ve Türkiye'deki kadınlardan izole edilen laktobasiller arasında en yaygın izole edilen türlerin yaklaşık olarak eşit düzeylerde *L. gasseri*, *L. crispatus* ve *L. jensenii* olduğu gösterilmiştir (22). Aslım ve arkadaşı Türk kadınlarının vajinal floralarından izole ettikleri suşlar arasında en yaygın bulunan suşun *L. gasseri* (%21) olduğunu rapor etmişlerdir (23). Ülkemizde yapılan çalışmalar olduğu gibi çalışmamızda da vajinal florada en yaygın suşun *L. gasseri* olması görülmesi ile benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda vajinal ve rektal bölgede aynı laktobasil türlerinin bulunması kolonize olan türler arasında komşuluk ilişkisi olabileceği, 15 kadında klinik yakınmaları olmamasına rağmen laboratuvar bulgularına dayanarak vajinal ekosistemlerinin bozuk olduğu ve asemptomatik BV konusunun önemsenmesi gerektiği düşünüldü. Ayrıca Kapililler elektroforez yöntemi ile modifiye edilmiş RAPD-PCR yönteminin laktobasillerin tanı ve identifikasyonunda fenotipik yöntemlerde yaşanan sensitivite ve spesifite problemini ortadan kaldırarak laktobasiller ile ilgili daha geniş gruplarda ve sağlıklı verilerin elde edildiği epidemiyolojik çalışmaların önünü açabilecek bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çıkar çatışması ve finansman beyanı

Bu çalışmada çıkar çatışması yoktur ve TF2012 YL6 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Roberto RR, Hassan SS, Gajer P, Tarca A.L, Fadros D.W, Nikita L. et al The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2014; 2:4.
2. Amabebe E. and Anumba D.O.C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front. Med* 2018; 5:181.
3. Gaspar C, Donders G.G, Oliveira R.P, Queiroz J.A, Tomaz C, Oliveira J.M et al. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Expr* 2018; 8:153.
4. Mitchell C, Srinivasan S, Zhan X, Wu M, Reed S, Guthrie K et al. Associations between serum estrogen, vaginal microbiota and vaginal glycogen in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215: S827.

5. Smith SB & Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol* 2016; 595: 451.
6. Fosch SE, Ficooseco CA, Macèsin A, Cocucci S, Macias MEFN and Perazzi BE. Contraception: Influence on Vaginal Microbiota and Identification of Vaginal Lactobacilli Using MALDI-TOF MS and 16S rDNA Sequencing. *The Open Microbiology Journal* 2018; 12, 218-229.
7. O'Hanlon DE, Come RA and Moench TR. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration. *BMC Microbiology* 2019; 19:13.
8. Tachedjian G, O'Hanlon DE & Ravel J. The implausible "in vivo" role of hydrogen peroxide as an antimicrobial factor produced by vaginal microbiota. *Microbiome* 2018; 6: 29.
9. Yen S, Shafer MA, Monacada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. *Obstet Gynecol* 2003; 102:927-933.
10. Murphy K & Mitchell CM. The interplay of host immunity, environment and the risk of bacterial vaginosis and associated reproductive health outcomes. *J Infect Dis* 2016; 214:29.
11. Bautista CT, Wurapa E, Sateren WB, Morris S, Hollingsworth B, Sanchez JL. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil Med Res* 2016; 3: 4.
12. Dols J A.M, Smit Pieter W, Kort Remco, Reid Gregor, Schuren F.H.J, Tempelman H et al. Microarraybased identification of clinically relevant vaginal bacteria in relation to bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2011; 204(4): 305.
13. Onderdonk AB, Delaney ML & Fichorova RN The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29: 223-238.
14. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002; 78(6):413-415.
15. VanDaele S, Vanechoutte M, Boeck K, Knoop C, Malfroot A, Lebecque P et al. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in colonised cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2006; 28(4):740-747.
16. Baele M, Baele P, Vanechoutte M, Storms V, Butaye P, Devriese LA et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4201-4207.
17. Veer C, Houdt RV, Dam AV, Vries H, Sylvia Bruisten. Accuracy of a commercial multiplex PCR for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology* 2018; 67:1265-1270.
18. Famularo G, Pieluigi M, Coccia R, Mastroiacovo P, Simone C. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. *Medical Hypotheses* 2001; 56(4): 421430.
19. Antonio MAD, Rabe LK, Hillier SL. Colonization of the Rectum by *Lactobacillus* Species and Decreased Risk of Bacterial Vaginosis. *JID* 2005;192.
20. Gustafsson RJ, Ahrné S, Jeppsson B, Benoni C, Olsson C, Stjernquist M et al. The *Lactobacillus* flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC Women's Health* 2011; 11:17.
21. Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Sandhofer MJ, Krondorfer I, Kneifel W, H. Kiss. Differences in the vaginal lactobacilli of postmenopausal women and influence of rectal lactobacilli. *Climacteric* 2013; 16:356-361.
22. Kılıç AO, Pavlova SI, Alpay Ş, Kılıç SS, Tao L. Comparative study of vaginal *Lactobacillus* phages isolated from women in the United States and Turkey: Prevalance, morphology, host range and DNA homology. *Clin. Dian. Lab. Immun* 2001; 8:31-39.
23. Aslım B, Kılıç E. Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. *Jpn. Infect. Dis* 2006; 59: 249-253.