

Gardnerella vaginalis'in Sekiz Epidemiyolojik Biotipinin Epitel Hücrelerine Adherens Özelliklerinin Belirlenmesi*

Fetiye KOLAYLI(**), Faruk AYDIN(***), Aynur KARADENİZLİ(**), Murat ERTÜRK(****)

(*)X.Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresinde (Adana, 2001) sunulmuştur.

(**) KOÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

(***)KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

(****) OMÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

ÖZET

Bu çalışmada Gardnerella vaginalis'in sekiz epidemiyolojik biyotipinin epitel hücrelerine adhere olma özellikleri incelenerek sık izole edilen biyotiplerin % adherens indekslerinde farklılık olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sağlıklı kadınlardan alınan vajinal epitel hücreleri yıkandıktan sonra G.vaginalis'in sekiz epidemiyolojik biyotipi ile inkübe edilmiş ve her bir biyotipin % adherens indeksleri hesaplanmıştır. Birden sekize doğru her bir biyotipin % adherens indeksleri sırasıyla; 18, 27, 14, 5, 24, 36, 4 ve 8 olarak belirlenmiştir. Biyotipler, % adherens indekslerinin yakınlıklarına göre gruplandırıldığında, biyotip 1, 2, 3, 5 ve 6 bir grupta, biyotip 4, 7, ve 8 ayrı bir grupta yer almakta olup, bu iki guruba ait adherens indeksleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı grup içinde yer alan biyotiplerin adherens indeksleri arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Gardnerella vaginalis, biyotip, adherens

SUMMARY

Determination of Adherence Properties to Epitel Cells of Eight Biotypes of Gardnerella vaginalis

In this study, it was aimed to determine the differences between percentage adherence indexes of most frequently isolated eight biotypes of Gardnerella vaginalis to epithelial cells.

The epithelial cells, provided by healthy women, were incubated with eight biotypes of G.vaginalis and percentage adherence indexes were calculated. Adherence index of each biotype from 1 to 8 was found as 18, 27, 14, 5, 24, 36, 4 and 8 in order. Biotypes 1,2,3,5, 6 and biotypes 4, 7, 8 were placed in two different groups according to their adherence indexes. The differences between adherence indexes of two groups were statistically significant. Adherence indexes of biotypes, in each group, were not found statistically significant.

Key words: Gardnerella vaginalis, biotype, adherence

GİRİŞ

Gardnerella vaginalis bakteriyel vaginozlu (BV) kadınların vajinal sürüntü örneklerinden en sık izole edilen mikroorganizmadır (1,2). BV'de kanıt hücresi varlığının tanı koydurucu olması Gardner ve Dukes (3)'den beri bu bakterinin adhezyon özelliğinin ilgi çekmesine neden olmuştur. Kanıt hücreleri skuamöz epitel hücreleridir ve G. vaginalis benzeri bakterilerle kaplıdır. Çoğunlukla vajinal örneklerde bulunur, bununla beraber kadınların mesanesinden aspire edilen idrarda da saptanabilir.

Hatta semende, üretral akıntılarda, endoüretal sürüntü örneklerinde de görülebildikleri bildirilmiştir (4).

Bir çok infeksiyon hastalığında olduğu gibi G. vaginalis'in epitel hücrelere adhezyonu BV'nin patogeneğinde önemli adımlardan biri olarak düşünülmektedir. Çalışmamızda G. vaginalis'in sekiz farklı epidemiyolojik biyotipinin adherens özellikleri incelenerek % adherens indeksleri arasında farklılık olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

G.vaginalis'in Üretilmesi: Piot ve ark.(5) önerdiği şekilde biyotiplendirilen G.vaginalis'in sekiz biyotipi nalidik asit ilaveli Columbia agar besiyerinde (CNA) CO₂'li etüvde 37°C 'de 24-48 saat inkübe edilerek üretilmiştir.

Epitel Hücrelerinin Hazırlanması: Vajinal epitel hücreleri hamile olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, menstüral siklusu düzenli, 20-40 yaşları arasında sağlıklı kadınlardan alınmıştır. Klinik muayene, vajinal örneklerden hazırlanan nativ preparatın incelenmesi ve Gram boyalı preparatın değerlendirilmesi sonucunda enfeksiyonun olmadığı belirlenmiştir.

Vajinal mukozadan alınan epitel hücreleri fosfat tamponu (PBS) içerisinde biriktirilmiştir. Hücre süspansiyonu üç kez PBS ile yıkanarak 1 ml PBS içerisinde çözülmüştür. Bire-bir oranda % 0.1 trypan blue ile boyanarak canlı hücre sayısı belirlenmiş ve 10⁵ hücre/ml olacak şekilde PBS ile sulandırılmıştır.

Adherens Deneyi: Bakteri adherensi çeşitli araştırmacıların metodlarının küçük modifikasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir (6, 7). Sekiz deney tüpü içerisine 10⁵ /ml olacak şekilde epitel hücreleri konmuş, üzerine her biyotip için 10⁸ /ml bakteri ilave edilerek 35°C' de 100 rpm'de bir saat inkübe edilmiştir. 5 mm çapında filtreden (Whatman sellüloz filtre kağıdı) süzülerek beş kez 10'ar ml PBS'le yıkanmıştır. Filtre kağıdı alınıp lam üzerine yapıştırılıp çekilmiş, preparat havada kurutularak metanolle tespit edilmiştir. Bir dakika metilen mavisi ile boyanıp ışık mikroskopunda incelenmiştir. Her biyotip için dört veya daha fazla bakterinin adhere olduğu 20 epitel hücresi sayılarak ortalamaları alınmış ve aşağıdaki formüle göre % adhezyon indeksi belirlenmiştir.

$$\% \text{ Adherens İndeksi} = \frac{\text{Total epitel hücre sayısı} \times \text{Epitel hücresine adhere olan bakteri sayısı}}{\text{Total bakteri sayısı}} \times 100$$

İstatistik Analiz : Sonuçlar Ki-kare testi ile analiz edilmiştir.

BULGULAR

Biyotiplerin adhezyon indekslerine bakıldığında; biyotip 1'in % 18, biyotip 2'nin % 27, biyotip 3'ün % 14, biyotip 4'ün % 5, biyotip 5'in % 24, biyotip 6'nın % 36, biyotip 7'nin % 4, biyotip 8'in de % 8 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo1: G.vaginalis biyotiplerinin adherens indeksleri

Adherens indeksi (%)	G.vaginalis biyotipleri							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	18	27	14	5	27	36	4	8

Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında biyotiplerin adherens indeksleri arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($\chi^2=64.78$, $p:0.00000$). Sekiz biyotip, adherens indekslerinin yakınlıklarına göre gruplandırıldığında Biyotip 1, 2, 3, 5 ve 6 bir grup altında toplanıp adherensleri arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir ($\chi^2=15.95$, $p:0.00312219$). Aynı şekilde biyotip 4, 7, 8'in bir grup altında toplanıp adherens indeksleri arasında istatistiksel farkın olmadığı saptanmıştır ($\chi^2=1.62$, $p:0.44457244$). Biyotipler adherens indekslerine göre sıralandıklarında en iyi adhezyonun biyotip 6 (%36), 2 (%27), 5 (%24)'de olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA

G. vaginalis'in nonspesifik vajinitte tek başına etken olup olmadığı hala tartışılırken, bakteriyel vaginozlu kadınların vajinal akıntılarında "kanıt hücrelerinin" varlığı araştırmacıları G. vaginalis'in adherens özelliklerinin belirlenmesi yönünde çalışmaya yöneltmiştir. İlk olarak Edmunds (8) G.vaginalis'in hemagglütinasyon özelliğini bildirmiştir. Mardh ve Weström (7) G. vaginalis'in epitel hücrelere adhere olduğunu göstermiş, daha sonra birçok araştırmacı G. vaginalis'in adherensi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır (6, 9, 10, 11, 12, 13). Scott ve ark. (9) G. vaginalis'in epitel hücrelerine ve eritrositlere adheransını elektron mikroskobu ile incelediklerinde bakterinin epitel hücrelerine dış fibriller tabakası aracılığı ile adhere olurken eritrositlere fimbriyaları ile yapıştığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda G. vaginalis'in farklı biyotipleri arasında adherens indeksleri açısından farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Biyotip 6, 2, 5, 1 ve 3' ün epitel hücrelerine adhezyon kapasiteleri biyotip 8, 4 ve 7'ye göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde farklı olarak belirlenmiştir. Scott ve ark.'nın (10) yaptıkları çalışmada izole ettikleri 105 G. vaginalis suşunu adherens indeksine göre gruplandırmış ve gruplar arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.

Biyotip 1, 2 ,3, 5 ve 6'nın adherens indeksinin diğer biyotiplere oranla yüksek olması, bu biyotiplerin en sık izole edilen biyotipler içinde olması açısından dikkat çekmektedir. Villegas ve ark. (14) yaptıkları bir çalışmada BV'li kadınların cinsel partnerlerinin semen örneklerinde % 50 oranında G.vaginalis'i izole etmişler ve üretra epitel hücrelerine adhezyonun kadınların reinfeksiyonunun nedeninin açıklanmasında önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan son çalışmalarda G.vaginalis'in Human IDV tip I'in ekspresyonunu artırdığı ve bu olayın biyotipler arasında farklılık gösterdiğinin bildirilmesi bu bakterinin adhere olma yeteneği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hillier SL, Krohn MA, Watts PH, Walner HP, Eschenbach DA: Microbiologic efficacy of intravaginal clindamycin cream for the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 76: 407 (1990).
2. Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D, Schoenknecht F, Holmes KK: Anaerobic bacterial nonspecific vaginitis.

N Engl J Med 303:601 (1980).

3. Gardner HL , Dukes CH: Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as "nonspecific" vaginitis. *Am J Obst Gynecol* 69:962 (1955).
4. Catlin BW: Gardnerella vaginalis, characteristic, Clinical consideration and controversies. *Clin Microbiol Reviews* 5: 213 (1992).
5. Piot P, Von Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK: Biotypes of Gardnerella vaginalis. *J Clin Microbiol* 15:19 (1994).
6. Peeters M, Piot P: Adhesion of Gardnerella vaginalis to vaginal epithelial cells, variables affecting adhesion and inhibition by metronidazole. *Genitourin Med* 61: 391 (1985).
7. Mardh PA, Weström L: Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 13: 661 (1976).
8. Edmunds PN: The biochemical, serological and hemagglutinating reaction of "Haemophilus vaginalis". *J Pathol Bacteriol* 83: 411 (1962).
9. Scott TG, Curran B, Smyth CJ: Electron microscopy of adhesive interaction between Gardnerella vaginalis and vaginal epithelial cells, Mc Coy cells and human blood cells. *J Gen Microbiol* 135 :475 (1989).
10. Scott TG, Smyth CJ, Keane CT: In vitro adhesiveness and biotype of Gardnerella vaginalis strains in relation to the occurrence of clue cells in vaginal discharges. *Genitourin Med* 63: 47 (1987).
11. Scott TG, Curran B, Smyth CJ: Haemagglutination and tissue culture adhesion of Gardnerella vaginalis. *J Gen Microbiol* 133: 1999 (1997).
12. Boustouller YL, Jhonson AP: Resistance of Gardnerella vaginalis to bactericidal activity of human serum. *Genitourin Med* 62:380 (1986).
13. Ison CA, Easmon CSF: Studies on the mechanism of adhesion of Gardnerella vaginalis to human erythrocytes. *Scand J Urol Nefrol* 86: (Suppl) 191 (1984).
14. Villages H, Arias F, Flores E, Casonova G, Karchmer S: Ultrastructural characteristics of Gardnerella vaginalis infection in the heterosexual couple. *Arch Androl* 39: 147 (1997).