

BAKTERİYEL VAJİNOZİSİN LABORATUVAR TANISINDA GRAM BOYAMA YÖNTEMİNİN GEÇERLİLİĞİ*

VALIDITY OF GRAM STAINING TECHNIQUE
IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF BACTERIAL VAGINOSIS

*Pınar ZARAKOLU***, *Aslı TUNCER***, *K.Mahmut YILDIZ***

*Hakan AKBAYRAK***

ÖZET: Bu çalışmada çeşitli hastanelerin Kadın Hastalıkları Kliniklerinde vajinit tanısı almış 77 yetişkin kadının laboratuvarlarımıza ulaşan vajinal akıntı örnekleri bakteriyel vajinozis yönünden incelenmiştir. Örnekler direk mikroskopi ve kültür yöntemlerinin yanısıra Gram boyası ile boyanarak Nugent tarafından geliştirilen skorlama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Besiyeri olarak %5 insan kanlı Columbia Kolistin Nalidiksik Asit Agar (Columbia CNA agar, Oxoid, UK) kullanılmıştır. Gram boyalı preparatların değerlendirilmesi sonucu 17 hasta bakteriyel vajinozis tanısı almıştır. 17 hastanın 12'sinin direk mikroskopik inceleme bulguları Gram preparatlarla uyum gösterirken, 7'sinin kültüründe Gardnerella vaginalis üremiştir. Nugent tarafından geliştirilen skorlama yönteminin duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %85 bulunarak, bakteriyel vajinozisin laboratuvar tanısında geçerli bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel vajinozis, Gram boyama.

SUMMARY: In the present study, the vaginal discharge specimens of 77 adult women who were diagnosed as vaginitis in Gynecology Outpatient Clinics of different hospitals, were evaluated by Nugent criteria after Gram staining to determine the validity of this method. The specimens were also examined by direct microscopy and culture methods. Columbia Colistin Nalidixic Acid Agar (Columbia CNA, Oxoid, UK) medium with 5% human blood, was used for cultivation. Seventeen patients were reported as bacterial vaginosis with the interpretation of Gram stained preparations. The direct microscopic examination results of 12 specimens were similar to Gram preparation results, where Gardnerella vaginalis was isolated only in 7 of them. The sensitivity and the

* 8.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 6-10 Ekim 1997, Antalya'da sunulmuştur.

** Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara.

specificity of the vaginal Gram stain when evaluated by Nugent criteria in the laboratory diagnosis of bacterial vaginosis were found to be 100% and 85% respectively, so that can be used as a valid method.

Key words: Bacterial vaginosis, Gram stain.

GİRİŞ

Bakteriyel vajinozis tanısında Amsel kriterleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kriterler bol miktarda vajinal akıntı, vajen pH'sının ≥ 4.5 olması, vajinal sıvının %10-%20'lik KOH ile karıştırıldığı zaman balık kokusunun alınması ve vajinal akıntı örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde "clue cell" saptanmasıdır^{1,2}. Fakat klinik kriterlerin subjektif nitelik taşıması ve yeterince özgül olmaması nedeniyle laboratuvar tanısına gereksinim duyulmaktadır. Laboratuvar tanısında ise vajinozisin, tek bir etiyolojik ajandan çok, bir grup mikroorganizmanın birlikte etkili olduğu bir klinik sendrom olmasının anlaşılmasıyla, kültürden ziyade mikroskopik inceleme kullanılmaya başlanmıştır³. Direkt mikroskopik incelemede "clue cell" saptanmasında yaşanan teknik zorluklar Gram boyalı mikroskopik incelemeyi ön plana çıkarmıştır. Bu yöntemin duyarlılığının (%93-98), kültürden daha yüksek olduğu bildirilmektedir⁴.

Nugent tarafından geliştirilen skorlama yöntemi ise Gram boyalı preparatların değerlendirilmesinde kullanılan yeni bir yöntemdir⁴. Çalışmamızda bu yöntemin geçerliliğini saptamak amacıyla vajinal akıntı örnekleri direkt mikroskopi ve kültür yöntemlerinin yanısıra Gram boyası ile boyanarak skorlama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Vajinal akıntı şikayetiyle çeşitli hastanelerin Kadın Hastalıkları Polikliniklerine başvuran ve klinik olarak vajinit tanısı alan 77 yetişkin kadının vajinal akıntı örnekleri bakteriyel vajinozis yönünden değerlendirmeye alındı. Örnekler direk olarak ve Gram boyalı mikroskopik inceleme ile kültür olmak üzere üç farklı yöntemle incelendi. Kültür için örnekler %5 insan kanlı Columbia Kolistin Nalidiksik Asit Agara (Columbia CNA, Oxoid, UK) ekildi. Ayrıca örneklerin Candida türleri ve Trichomonas vaginalis yönünden de araştırılması amacıyla Sabouraud Dekstroz Agar (Oxoid,UK) ve Diamond besiyerleri kullanıldı^{1,2,3}. Direkt mikroskopik incelemede; vajen florasında laktobasillerin varlığı, polimorfonükleer nötrofillerin (PMN) epitel hücrelerine oranı ve "clue cell" araştırıldı. Laktobasillerin predominant olması, PMN ve skuamöz epitel hücreleri oranının 1'i geçmemesi normal vajen florası olarak değerlendirildi. Özellikle küçük kokobasillerle çevrelenmiş epitel hücreleri "clue cell" olarak tanımlandı. "Clue cell" yanısıra florada laktobasillerin kaybolduğunun gözlenmesi ile bakteriyel vajinozis tanısı kondu^{1,3}. Gram boyalı preparatlar Nugent tarafından geliştirilen skorlama yöntemi ile değerlendirildi⁴. Bu değerlendirmede 3 farklı

bakteriyolojik yapının; Gram pozitif çomakların (laktobasiller), küçük Gram negatif ya da Gram değişken çomakların (Bacteriodes veya Gardnerella), kıvrık Gram negatif ya da değişken çomakların (Mobiluncus) florada varlığı araştırıldı. Değerlendirme kriterleri, skorları ve yorumu Tablo I'de sunulmuştur^{1,4}. Columbia CNA'da %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübasyon sonrasında toplu iğne başı büyüklüğünde opak, dar bir beta hemoliz zonu ile çevrili, katalaz ve oksidaz negatif koloniler Gardnerella vaginalis olarak tanımlandı².

Tablo I: Bakteriyel Vajinozis Tanısında Örneklerin Gram Boyama ile Değerlendirilmesi^{1,4}

Organizmanın Morfolojisi	Sayı/İmmersiyon Alanı	Skorlar*
Laktobasil benzeri Gram pozitif çomaklar	>30	0
	5-30	1
	1-4	2
	<1	3
	0	4
Mobiluncus benzeri Gram negatif kıvrık çomaklar	>5	2
	<1-4	1
	0	0
Gardnerella/Bakteriodes benzeri Gram değişken veya Gram negatif çomaklar	>30	4
	5-30	3
	1-4	2
	<1	1
	0	0

*0-3: Normal, 4-6: Test tekrarlanmalı, 7-10: Bakteriyel vajinozis.

BULGULAR

Gram boyalı preparatların değerlendirilmesi sonucu 17 hasta bakteriyel vajinozis tanısı almıştır. Bunların 12'sinin direkt mikroskopik inceleme bulguları Gram boyalı preparatlarla uyum göstermektedir. 7'sinin kültüründe Gardnerella vaginalis üremiştir. Bakteriyel vajinozisin laboratuvar tanısında kültür yöntemine göre Gram boyama yönteminin duyarlılığı %100, özgülüğü %85 bulunmuştur. Ayrıca kültürlerin değerlendirilmesi sonucunda bir olguda Trichomonas vaginalis, 7 olguda Candida albicans ürediği saptanmıştır. Vajinit etkenlerinin dağılımı Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II: Vajinit Etkenlerinin Dağılımı

	Gram boyama	Direkt mikroskopi	Kültür
Gardnerella vaginalis	17	12	7
Trichomonas vaginalis	—	1	1
Candida albicans	—	7	7

TARTIŞMA

Bakteriyel vajinozis vajinal akıntının en sık rastlanan nedenidir. Bunun yanısıra erken doğum eylemi ve üst genital sistem enfeksiyonları için önemli bir risk faktörü oluşu tanısının önemini ortaya koymaktadır^{3,5}.

Önceleri mikrobiyoloji laboratuvarlarında vajinal akıntı örneklerinden *Gardnerella vaginalis* üretmek amacıyla kültür yapılırken artık bunun tanı değerinin çok az olduğu kabul edilmektedir². Zira bakteriyel vajinozisli kadınların %95'inden bu mikroorganizma izole edilmesine rağmen asemptomatik kadınlarda da %40'e varan oranda saptanmaktadır³. Günümüzde bu sendromun laboratuvar tanısında kültür yerine mikroskopik inceleme önerilmektedir^{4,6}. Ancak direk mikroskopik incelemede "clue cell" varlığının değerlendirilmesinde teknik zorluklar yaşanmaktadır⁷. Gram boyalı mikroskopik inceleme ise daha objektif bir yöntem olup preparatların saklanabilme ve tekrar incelenebilme özelliği ile yorumunun tekrarlanabilirliği direkt mikroskopik incelemeden daha güvenilirdir^{4,8}. Ayrıca "Clue cell" görünümünün değerlendirilmesi açısından da daha özgüldür. Bunun yanısıra *Mobiluncus* türleri -ki sıklıkla bu sendroma katıldığı bilinmektedir- kıvrık basil morfolojileri ile Gram boyalı preparatta kolaylıkla değerlendirilebilmektedir⁷. Çeşitli çalışmalarda klinik tanı ile vajinal sürüntü örneklerinin Gram boyamasının birbirine paralel sonuçlar verdiği gösterilmiştir^{7,9,10}.

Nugent tarafından geliştirilen skrolama yöntemi ise Gram boyalı preparatların değerlendirilmesinde kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu yöntemde subjektif bir kriter olan "clue cell" varlığı araştırılmamakta; laktobasillerin, *Mobiluncus* benzeri Gram negatif kıvrık basillerin, *Gardnerella* veya bazı anaerob bakterilere karşılık gelen Gram değişken ya da negatif kokobasillerin varlığı araştırılmaktadır. Bu yöntem laboratuvar tanısında standardizasyonu sağlamasıyla da önem taşımaktadır^{4,7,12}. Çalışmamızda, klinik olarak vajinit tanısı alan 77 kadının vajinal akıntı örneklerinin Gram ile boyanarak değerlendirilmesi sonucu 17 hasta bakteriyel vajinozis tanısı almıştır. Bu hastaların 12'sinin direkt mikroskopi bulguları Gram boyalı preparatlarla uyum gösterirken, 7'sinin kültüründe *Gardnerella vaginalis* üremiştir. Ayrıca 7 hastada *C.albicans*, 1 hastada da *T.vaginalis* vajinit etkeni olarak saptanmıştır. Verilerimize göre Nugent tarafından geliştirilen skrolama yönteminin duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %85 olarak tesbit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise bu yöntemin duyarlılığı %89, özgüllüğü %83 olarak saptanmış ve bakteriyolojik yapıların yoruma bağlı değişkenlik göstermeksizin değerlendirilebildiği, her laboratuvar şartında kolaylıkla uygulanabilecek bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür⁹.

Sonuç olarak, bakteriyel vajinozis tanısında Gram boyalı preparatların skrolama yöntemiyle saptadığımız yüksek duyarlılık ve seçicilik özelliği nedeniyle, pratikte uygulanabilir güvenli bir yöntem olduğunu ve bakteriyel vajinozisin yetersiz tanı metodları nedeniyle atlanabildiği durumları engelleyebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM: Unclassified or unusual but easily cultivated etiological agents of infectious disease, p.565-579. In: Baron EJ, Peterson LC, Finegold SM (Eds), Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 1994, 9th ed. Mosby Company, St.Louis.
2. Clarridge JE, Spiegel CA: Corynebacterium and miscellaneous irregular Gram positive rods, Erysipelothrix and Gardnerella, p.357-378. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 1995, 6th ed. Amer Soc Microb, Washington DC.
3. Rein MF: Vulvovaginitis and cervicitis, p.1074-1090. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (Eds), Principles and Practise of Infectious Disease. 1995, 4th ed. Churchill Livingstone, New York.
4. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991, 29: 297-301.
5. Sweet RL: Role of bacterial vaginosis in pelvic inflammatory disease. Clin Infect Dis 1995, 20 (2): 271-275.
6. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK: Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. J Clin Microbiol 1983, 18: 170-177.
7. Schwebke Jr, Hillier SL, Sobel JD et al: Validity of the vaginal Gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. Obstet Gynecol 1996, 88 (4): 573-576.
8. Akata F, Otkun M, Tatman-Otkun M ve ark: Bakteriyel vajinoz tanısında vajinal sürüntü örneklerinin Gram boyama yöntemi ile yorumunun tekrarlanabilirliği. Enfeksiyon Dergisi 1997, 11 (2): 113-117.
9. Faro S: Vaginitis: Diagnosis and management. Int J Fertil Menopausal Stud 1996, 41 (2): 115-123.
10. Priestley CJ, Kinghorn GR: Bacterial vaginosis. Br J Clin Pract 1996, 50(6): 331-334.
11. Eschenbach DA, Hillier S, Critchlow MS et al: Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1988, 3: 819-828.
12. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP et al: Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. Am J Obstet Gynecol 1992, 3: 938-944.