

## VAJİNAL LAKTOBASİLLER VE LAKTOBASİLLERİN TÜR AYIRIMINDA KLASİK YÖNTEMLER İLE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

VAGINAL LACTOBACILLI AND COMPARISON OF CLASSIC METHODS  
WITH POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE IDENTIFICATION OF  
LACTOBACILLUS SPECIES

*Şengül ALPAY KARAOĞLU\**, *İlknur TOSUN\*\**, *Ali Osman KILIÇ\*\**

**ÖZET:** Bu çalışmada, vajinal laktobasillerin tür tayinlerinin yapılması ve tür ayırımında klasik yöntemler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniklerine başvuran kadınlardan alınan vajinal sürüntü örnekleri standart mikrobiyolojik yöntemlerle incelenmiş ve ayrıca seçici laktobasil besiyerine inoküle edilmiştir. Toplam 200 kadının %59.5'inde normal vajinal flora, %31'inde bakteriyel vajinozis ve %9.5'inde vajinal kandidiyazis saptanmıştır. Bu kadınlardaki laktobasil izolasyon oranları ise sırasıyla %76.5, %45.2 ve %78.9 olarak bulunmuştur. Sürüntü örneklerinin 134'ünden (%67) izole edilen 160 fakültatif anaerob laktobasil suşunun %90.6'sı klasik yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Çalışmada en sık izole edilen türün *L.gasseri* (%40) ve *L.delbrueckii* (%18) olduğu belirlenmiştir. Tür tayininde klasik yöntemlerle PCR'nun karşılaştırılması 66 izolat için yapılabilmüş; bunların 58'i (%87.8) klasik yöntemlerle 7 tür içinde toplanmış ve 8 suş tanımlanamamışken, PCR ile tüm suşlar tanımlanarak 4 farklı tür içinde toplanmıştır. Kırkbeş izolat ise her iki yöntemle de aynı tür olarak tanımlanmış ve testler arası uyumun %68.2 olduğu saptanmıştır.

*Anahtar kelimeler: Vajinal laktobasiller, tanımlama testleri, polimeraz zincir reaksiyonu.*

**SUMMARY:** The aim of this study was to identify the vaginal lactobacilli in the species level and to investigate the concordance between classical methods and polymerase chain reaction (PCR) for the typing of these isolates. Vaginal swab samples which have been collected from women who were admitted to the outpatient clinics of Gynecology Department of our hospital, were examined by standard microbiological methods and additionally were inoculated into selective lactobacilli media. Of 200 subjects, 59.5% have had normal vaginal flora, 31%

\* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Rize Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize.

\*\* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

were diagnosed as bacterial vaginosis and 9.5% as vaginal candidiasis. The lactobacilli isolation rates of these groups were found 76.5%, 45.2% and 78.9%, respectively.

A total of 160 facultative anaerob *Lactobacillus* strains were isolated from 134 (67%) of the swab samples. Of these, 90.6% were identified into species level by classical methods, and the most frequently isolated species in our study was found as *L.gasseri* (40%), followed by *L.delbrueckii* (18%). The comparative study was performed only for 66 isolates, and 58 of them (87.8%) were grouped into 7 species while 8 have not been identified by classical methods, however, all of 66 isolates were successfully grouped into 4 species by PCR. Forty-five of 66 strains have been found to be identical by means of classical methods and PCR, and the concordance between the methods were found 68.2 percent.

*Key words: Vaginal lactobacilli, identification tests, polymerase chain reaction.*

## GİRİŞ

Laktobasillerin birçok türü çevrede, tahıllarda, süt, et, balık ve fermente ürünler ile insan ve hayvanların ağız, intestinal kanal, vajina ve diğer vücut bölgelerinde yaygın olarak bulunur<sup>1</sup>. Laktobasil türlerinden *Lactobacillus acidophilus*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.brevis* ve *L.salivarius* çoğunlukla insan ağız florasında, *L.acidophilus*, *L.fermentum* ve *L.salivarius* ince barsakta, *L.acidophilus*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.cellobiosus*, *L.crispatus*, *L.jensenii* ve *L.gasseri* ise daha çok vajinada yerleşir<sup>2</sup>.

*Lactobacillus* cinsi Gram pozitif, çoğunlukla birbirine ekli, spor oluşturmeyen, mikroaerofilik veya anaerobik basillerdir. Laktobasiller buldukları florada, antimikrobiyal maddeler (bakteriosinler), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve karbonhidrat fermentasyonları sonucu laktik asit üreterek enfeksiyonlara karşı önemli bir bariyer oluştururlar<sup>1,2</sup>. Bu nedenle laktobasillerin iyi karakterize edilerek etkin bir şekilde tanımlanması, insan sağlığında bu bakterilerin ve diğer flora elemanlarının rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Laktobasillerin tanımlanmasında morfolojik, biyokimyasal ve son zamanlarda da moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Genetik yöntemlerden özellikle, DNA restriksiyon enzim analizleri, 16S rRNA gen dizisi ve PCR'a dayalı "Fingerprint" analizleri ile tür, alt tür ve suş tanımları yapılarak türler arasındaki filogenetik akrabalıklar ortaya konmaktadır<sup>3</sup>.

Bu çalışmada, vajinal floradan izole edilen laktobasillerin klasik yöntemlerle tanımlanması ve ayrıca tanımlamada standart biyokimyasal testlere dayanan klasik yöntemler ile DNA amplifikasyonuna dayanan PCR yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Eylül 1997- Eylül 1998 yılları arasında KTÜ Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniklerine başvuran 200 kadın dahil edildi. Hastalardan ikişer adet vajinal sürüntü örneği alınarak tiyoglikolatlı sıvı (Difco, Detroit, MI) besiyerine konuldu. Sürüntü örneklerden biri; pH ölçümü, direk mikroskopik

inceleme, Gram boyama ile inceleme ve %10 potasyum hidroksit (KOH) ile muamele sonucu amin kokusunun tespiti için kullanıldı<sup>4</sup>. Ayrıca KOH ile muamele edilen örneklerden direk preparat hazırlandı ve 400 büyütme altında incelendi.

Hastalara bakteriyel vajinozis tanısı, Nugent ve arkadaşlarının<sup>5</sup> tanımladıkları skorlama sistemine göre, vajinal kandidiyazis tanısı ise sürüntü örneklerinin mikroskopik incelemesinde pseudohif oluşumu gözlenmesine ve Sabouraud Dekstroz Agar'da (SDA, Difco) en az 20 ve üzeri maya kolonisi üremesine göre konuldu<sup>6</sup>.

Sürüntü örneklerinden diğeri, primer izolasyon için Lactobacilli MRS (deMan-Rogosa-Sharpe) agara (Difco) ekildi ve 37°C'de mumlu kavanozda 24-48 saat inkübe edildi. Üreyen bakterilerin koloni morfolojileri, Gram boyanma özellikleri ve katalaz testleri belirlendikten sonra, laktobasil olarak tanımlanarak saf kültürleri yapıldı. İzolatlar eskülin hidrolizi, 44°C'de üreme ve karbohidrat fermentasyon (sellobioz, galaktoz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, mellibioz, rafinoz, riboz, sükroz, trehaloz, glukoz, glikojen ve nişasta) testlerine göre tür düzeyinde tanımlandı<sup>2</sup>. Klinik izolatlar "TL" (Trabzon laktobasili) kod numaraları ile nitelendirildi ve saf kültürleri %20 gliserol ilave edilerek -70°C'de saklandı.

Kontrol olarak, 13 ayrı laktobasil ATCC suşu ve bu suşlara ait Gen Bankası'nda saklanmış 16S rDNA gen dizilerine göre hazırlanan primerler kullanıldı. ATCC suşları (*L.gasseri* ATCC 9857, *L.fermentum* ATCC 14931, *L.fermentum* ATCC 23271, *L.delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649, *L.delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, *L.jensenii* ATCC 25258, *L.casei* subsp. *casei* ATCC 27139, *L.reuteri* ATCC 23272, *L.vaginalis* ATCC 49540, *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L.plantarum* ATCC 14917, *L.ruminis* ATCC 25644 ve *L.acidophilus* ATCC 4356) University of Missouri, Kansas City'den temin edildi.

Laktobasil suşlarından kromozomal DNA eldesinde, bazı modifikasyonlar yapılarak Lewington ve arkadaşları<sup>7</sup> ile Klaenhammer<sup>8</sup>'in yöntemleri kullanıldı. DNA ekstraksiyonu için, laktobasillerin bir gecelik inkübasyonu ile taze kültürleri hazırlandı. Mid-log fazda %3 glisin ilavesi ile 2 saat daha inkübe edildikten sonra, 10 ml kültür süspansiyonu 7000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Hücreler 10 µg/ml lizozom içeren 500 µl STE tamponunda (%25 sükroz, 50 mM Tris HCL, 5 mM EDTA, pH:7.5) çözünerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra çöktürüldü ve pellet 500 µl lizis solüsyonu (50 mM Tris HCL, 5 mM EDTA, 50 mM glukoz, %3 SDS) içinde çözünerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Önce 1/1 oranında %3 NaCl ile tamponlanmış fenol, daha sonra kloroform-izoamilalkol (24:1) ile ekstraksiyonu yapılarak DNA izole edildi. İzolatlardan ve kontrol suşlardan elde edilen DNA'lar PCR ile çoğaltılarak agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu.

## B U L G U L A R

Çalışmada, 200 kadının 119'unda (%59.5) normal vajinal flora saptanırken, 62'sine (%31.0) bakteriyel vajinozis ve 19'una (%9.5) vajinal kandidiazis klinik tanısı konmuştur. Bu grupların laktobasil izolasyon oranları Tablo I'de görülmektedir.

İzole edilen 134 laktobasil suşunun klasik yöntemle yapılan tanımlamasında 9 farklı tür belirlenmiş, 8 izolat ise tanımlanamamıştır (Tablo II).

Tablo I: Çalışma Gruplarında Laktobasil İzolasyon Oranları

Grup* (Sayı)	Laktobasil İzolasyonu
	Sayı (%)
NVF (119)	91 (76.5)
BV (62)	28 (45.2)
VK (19)	15 (78.9)
<b>Toplam (200)</b>	<b>134 (67.0)</b>

\* NVF: Normal vajinal flora saptananlar, BV: Bakteriye vajinozisli ve VK: Vajinal kandidiazisli kadınlar.

Tablo II: Klasik Yöntemlerle Tanımlanan Laktobasil Türlerinin Gruplara Göre Dağılımları

Tür	Çalışma Grubu*			Toplam (%)
	NVF	BV	VK	
<i>L. gasseri</i>	42	17	6	65 (40.6)
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	12	4	4	20 (12.5)
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i>	5	2	2	9 (5.6)
<i>L. fermentum</i>	4	3	—	7 (4.4)
<i>L. acidophilus</i>	16	3	2	21 (13.1)
<i>L. coryniformis</i>	4	1	—	5 (3.1)
<i>L. jensenii</i>	8	2	1	11 (6.8)
<i>L. casei</i>	1	1	1	3 (1.8)
<i>L. vaginalis</i>	4	—	—	4 (2.5)
Tanımlanamayan	11	2	2	15 (9.4)
<b>Toplam</b>	<b>107</b>	<b>35</b>	<b>18</b>	<b>160** (100)</b>

\* NVF: Normal vajinal flora saptananlar, BV: Bakteriye vajinozisli ve VK: Vajinal kandidiazisli kadınlar.

\*\* Örneklerin 29'unda birden fazla (2 ya da 3) laktobasil türü tespit edilmiştir.

Çalışmada hem klasik yöntemlerle hem de PCR ile, 55 kadına ait 66 izolat tanımlamaya alınabilmiştir (Tablo III). Her iki yöntemle de kontrol suşların hepsi doğru olarak tanımlanırken, klinik izolatların 45'i (%68.2) aynı sonucu vermiştir (Tablo IV). İzolatların sadece PCR ile yapılan tür tayinleri dikkate alındığında ise 4 farklı tür içinde toplandıkları gözlenmiştir (Tablo V).

## TARTIŞMA

Laktobasillerin birçok türü, üretken (reproductive) dönemdeki kadınların vajinal floralarında bol miktarda bulunmakta ve vajinal sağlığı korumada etkin rol oynamaktadırlar<sup>1</sup>. Laktobasillerin gerek diğer flora üyeleriyle gerekse fırsatçı patojen/patojen mikroorganizmalarla fizyolojik ve biyolojik etkileşimi, enfeksiyonların ortaya çıkmasında ve prognozunda önem taşımaktadır<sup>9,10</sup>. Dolayısıyla vajinal laktobasil popülasyonunun karakterizasyonu, bu etkileşimin daha ayrıntılı olarak ortaya konmasına olanak sağlamaktadır.

Tablo III: Her İki Yöntemle de Tanımlamaya Alınan 66 Klinik İzolat ve 13 Kontrol Suş

Laktobasil Türü (Sayı)	Klinik İzolatlar (TL)* ve Kontrol Suşlar
<i>L. gasseri</i> (44)	TL024, TL025a, TL025b, TL033a, TL038a, TL039b, TL041, TL049, TL054, TL056b, TL056c, TL060c, TL060d, TL067, TL072, TL073a, TL075b, TL076, TL083, TL085b, TL087, TL093c, TL101, TL108, TL109a, TL109c, TL110, TL125, TL132a, TL132b, TL135, TL136, TL137, TL138, TL139a, TL141, TL143a, TL145b, TL146, TL147, TL149, TL150b, TL152, ATCC 9857
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i> (10)	TL021, TL032a, TL1032b, TL039a, TL148a, TL102a, TL113, TL122b, TL143b, ATCC 9649
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> (2)	TL074b, ATCC 4979
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> (1)	ATCC 11842
<i>L. fermentum</i> (4)	TL018, TL129, ATCC 14931, ATCC 23271
<i>L. acidophilus</i> (3)	TL044a, TL065, ATCC 4356
<i>L. coryniformis</i> (1)	TL104
<i>L. jensenii</i> (1)	ATCC 25258
<i>L. casei</i> (1)	ATCC 27139
<i>L. vaginalis</i> (1)	ATCC 49540
<i>L. plantarum</i> (1)	ATCC 14917
<i>L. reuteri</i> (1)	ATCC 23272
<i>L. ruminis</i> (1)	ATCC 25644
Tanımlanamayan (8)	TL026, TL048b, TL074a, TL075a, TL084, TL088, TL114, TL127

\* Klinik izolatlara tarafımızdan verilen kod numaraları

Tablo IV: Her İki Yöntem İle Tanımlanan Klinik İzolatların Tür Dağılımı

Klasik tanı	PCR ile tanı							Toplam	
	Lgs	Lfr	Lva	Ldd	Ldl	Lac	Lco		NT
<i>L. gasseri</i> (Lgs)	43*								43
<i>L. fermentum</i> (Lfr)	1	1*							2
<i>L. vaginalis</i> (Lva)			-						-
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i> (Ldd)	5	1	3	-					9
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> (Ldl)	1				-				1
<i>L. acidophilus</i> (Lac)	1					1*			2
<i>L. coriniformis</i> (Lco)	1						-		1
Tanımlanamayan (NT)	7		1					-	8
<b>Toplam</b>	<b>59</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>66</b>

\* Her iki yöntemle de aynı tür olarak tanımlanmıştır.

Tablo V: Altmışaltı Klinik İzolat ve Dört Kontrol Suşun PCR İle Tür Dağılımları

Laktobasil Türü (Sayı)	Klinik İzolatlar ve ATCC Kontrol Suşları
<i>L. gasseri</i> (60)	TL024, TL025a, TL025b, TL026, TL032a, TL033a, TL038a, TL039a, TL039b, TL041, TL049, TL054, TL056b, TL056c, TL060c, TL060d, TL065, TL067, TL072, TL073a, TL074a, TL074b, TL075a, TL075b, TL076, TL083, TL084, TL085b, TL087, TL088, TL093c, TL101, TL102a, TL104, TL108, TL109a, TL109c, TL110, TL114, TL122b, TL125, TL0127, TL0129, TL132a, TL132b, TL135, TL136, TL137, TL138, TL139a, TL141, TL143a, TL143b, TL145b, TL146, TL147, TL149, TL150b, TL152, ATCC 9857
<i>L. vaginalis</i> (5)	TL021, TL032b, TL048b, TL0113, ATCC 49540
<i>L. fermentum</i> (3)	TL018, TL048a, ATCC 14931
<i>L. acidophilus</i> (2)	TL044, ATCC 4356

Çalışmamızda, vajinal sürüntü örneği incelenen 200 kadının %59.5'inde normal flora (NF) saptanırken, %31'inde bakteriyel (BV) ve %9.5'inde kandidal vajinit (KV) belirlenmiştir. Bu kadınlardaki laktobasil izolasyon oranları ise sırasıyla %76.5, %45.2 ve %78.9'dur. Normal floraya sahip 28 (%23.5) ve KV'li 4 (%21.1) kadından alınan örneklerin Gram boyalı preparatlarında laktobasil görülmesine rağmen, iki kez tekrar edilen kültürlerinde laktobasillerin üretilmemesi, bu türlerin zorunlu anaerob olabileceğini düşündürmüştür. Laktobasil üretilmeyen BV'li 34 (%54.8) kadının ise Gram boyalı preparatlarında da laktobasil görülemediği. Yapılan çalışmalarda, KV'li kadınlarda laktobasil popülasyonunda bir azalmanın olmadığı, ancak vajinal floranın bozulduğu, BV'li kadınlarda ise laktobasillerin sayıca azaldığı belirtilmektedir<sup>9-11</sup>.

Çalışmada 200 sürüntü örneğinin 134'ünden (%67) toplam 160 fakültatif anaerob laktobasil suşu izole edilmiştir. Örneklerin %14.5'inde (29/200) iki ya da üç farklı laktobasil türü saptanmıştır. Bu suşlar öncelikle klasik yöntemlerle tanımlanmış ve en sık rastlanan türün *L. gasseri* (%40.6) olduğu, bunu *L. delbrueckii* (%18.1) ve *L. acidophilus* (%13.1)'un izlediği görülmüştür (Tablo II).

*L. acidophilus* ve *L. fermentum* vajinal floranın dominant türleri olarak bilinmektedir<sup>2</sup>. Buna karşın Giorgi ve arkadaşlarının<sup>12</sup> yapmış oldukları çalışmada, *L. gasseri*, *L. jensenii* ve *L. crispatus* türleri vajinal floradan en sık izole edilen türler olmuş, ancak *L. fermentum* izole edilememiştir. Mc Groarty ve arkadaşları<sup>13</sup> ise, en sık rastladıkları türün *L. jensenii* olduğunu ve bunu sırasıyla *L. casei*, *L. acidophilus* ve *L. gasseri* türlerinin izlediğini bildirmektedirler. Antonio ve arkadaşları<sup>10</sup> 302 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada, laktobasil izolasyon oranlarının %71 olduğunu, en sık *L. acidophilus* (%15) ve *L. gasseri* (%5) türlerine rastladıklarını ve kadınların %8.3'ünden en az iki farklı laktobasil türü izole ettiklerini ifade etmektedirler.

Bilindiği gibi, son yıllarda tanısal mikrobiyolojide nükleik asit dizi analizi ya da amplifikasyonuna dayalı hızlı moleküler yöntemler, klasik yöntemlerin yerini almaya

başlamıştır. Çalışmamızda da, klinik laktobasil izolatlarının tür tayininde klasik yöntemler (KY) ile PCR yönteminin karşılaştırılması amaçlanmış ve karşılaştırılabilen 66 suşun 58'i KY ile 7 tür içinde toplanırken, 8'i tanımlanamamıştır. Buna karşın 66 suşun hepsi PCR ile 4 farklı tür içinde toplanmış ve KY ile tanımlanamayan izolatlardan 7'si *L.gasseri*, 1'i *L.vaginalis* olarak tiplendirilmiştir (Tablo IV ve V). KY ve PCR ile 43 *L.gasseri*, 1 *L.fermentum* ve 1 *L.acidophilus* olmak üzere toplam 45 izolat aynı şekilde tanımlanmış ve yöntemler arasındaki uyumun %68.2 olduğu görülmüştür (Tablo IV). KY ile izolatların %31.8'inin (21/66), PCR'dan farklı türler olarak tanımlanması, bu yöntemlerin sübjektif değerlendirme özelliğinin hatayı mümkün kılabileceğini düşündürmektedir. Zira türlerin, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>2</sup> 'de verilen karbonhidrat test sonuçlarında değişkenliğin ( $\pm$ ) mevcudiyeti, sonuçların zayıf pozitif/pozitif ya da negatif olarak yorumlanabilmesine ve sınıflandırmada güçlükler neden olabilmektedir. Hata oranının azaltılması için tiplendirmede kullanılan test kriterlerinin artırılması, fenotipik testlerle ayırd edilemeyen tür ya da alt türlerin DNA karakterizasyonunun moleküler yöntemlerle yapılmasının gerektiği bildirilmektedir<sup>2,10,14</sup>.

Sonuç olarak, çalışma grubumuzda vajinal floradan laktobasil izolasyon oranı %67 olarak belirlenmiş, en sık rastanan türlerin *L.gasseri*, *L.delbruekii* ve *L.acidophilus* olduğu saptanmış ve laktobasil türlerinin –özellikle de birbirine yakın türlerin– tanımlamasında basit klasik testlerin yetersiz kalabileceği, bu amaçla moleküler yöntemlerin daha uygun olduğu kanısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Golman G: *Streptococcus* and *Lactobacillus*, pp: 148-153. In: Parker MT, Collier LH, Duerden BI (Eds), Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 1990, 8<sup>th</sup> ed. London, Melbourne, Auckland.
2. Kandler O, Weiss N: Regular, nonsporng Gram positive rods, pp: 1208-1225. In: Sneath AP, Mair NS, Sharpe MS, Holt JG (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986, Williams and Wilkins, Baltimore.
3. Vandamme P, Pot GM, De Vos P, Kersters K, Swings J: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiol Rev 1996, 60: 407-438.
4. Catlin BW: *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, clinical considerations, and controversies. Clin Microbiol Rev 1992, 5: 213-237.
5. 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.
6. Tünger A, Tümbay E, Çapanoğlu R: Vajinal kandidozunda tek doz 600 mg izokonazol nitrat vaginal tablet uygulamasının klinik ve mikolojik etkinliği. İnfeksi Derg 1998, 12: 89-92.
7. Lewington J, Greenmay SD, Spillane BJ: Rapid small scale isolation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. Lett Appl Bacteriol 1987, 5: 51-52.
8. Kleanhammer TR: A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Current Microbiol 1984, 10: 23-28.
9. Eschenbach DA: Vaginal infection. Clin Obstet and Gynecol 1983, 26: 186-202.
10. Antonio MAD, Hawes SE, Hillier SL: The identification of vaginal *Lactobacillus* species and demographic and microbiologic characteristic of women colonized by these species. J Infect Dis 1999, 180: 1950-1956.
11. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Robinson DT: Bacterial vaginosis in pregnancy: Distribution of bacterial species in different Gram-stain categories of the vaginalis flora. J Med Microbiol 1996, 45: 120-126.

12. Giorgi A, Torriani S, Dellaglio F, Bo G, Stola E, Bernuzzi L: Identification of vaginal lactobacilli from asymptomatic women. *Microbiologica* 1987, 10: 377-384.
13. McGroarty JM, Tomeczek L, Pond DG, Reid G, Bruce AW: Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species: Correlation with susceptibility to the spermicidal compound nonoxynol-9. *J Infect Dis* 1992, 165: 1142-1144.
14. Pot B, Hertel C, Ludwig W, Descheemaeker P, Kersters K, Schleifer KH: Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasserii* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide hybridization. *J Gen Microbiol* 1993, 139: 515-517.