

«مقایسه گاردنرلاواژینالیس» در افراد سالم و افراد مبتلا به واژینوز باکتریائی

دکتر کیومرث قاضی سعیدی دکتر عزت‌الله قائمی

The Comparative Study of Gardnerella Vaginalis in Healthy Women and in Patients with Bacterial Vaginosis

Abstract

For the investigation of the role of Gardnerella vaginalis in Bacterial vaginosis, we selected 100 women among the patients, who were attending a Gynecology clinic in Shahid Akbar Abadi Hospital. The patients who did not have trichomoniasis and candidiasis, had a composite of four clinical criteria as follow :

- 1) Vaginal discharge was homogenous
- 2) Vaginal discharge had A pH > 4.5
- 3) Vaginal discharge had an amine - like odor when mixed with 10% potassium hydroxide (or whiff test)
- 4) Vaginal discharge contained clue cells when examined the discharge on wet mount and Gram's stain smear.

Then , recovery and isolation of Gardnerella vaginalis results from this patients were compared with these results from 100 healthy women, who attended the hospital for routine yearly papsmear checkup or for family planning program, who were control group.

G.V was isolated from 88% of the patient and 34% from the control group on culture media as : HBT, PSD , chocolate agar.

Not only the prevalence was much higher in patient group, but also concentration of colonies were high too.

The results were reached through the semiquantitative cultural method. About 81.8% cases of G.V in patient group was isolated with 3 + or 4 + concentration, but in our control group only 33.3% had the same concentration.

The increase in the number of G.V in associated with a sharp decrease in Lactobacilli, which was isolated only from 23% of patient group.

Our results shows that G.V in Vagina dose not cause inflamatory reactions such as irritation, erythem , Also in the study of Gram's stain smear and wet mount tangible change in WBC number was not seen, but epithelial cells number relatively increased.

Use of IUD increase B.V since 68.6% IUD users were among the patient group.

We concluded that smear which stained by Gram's stain method provides us faster, better and less expensive results from culture method.

خلاصه

و تعیین روشهای مختلف در شناسایی ارگانیزم و بیماری پرداخته‌ایم.

مواد و روش کار

انتخاب افراد مورد مطالعه: نمونه‌ها از مراجعین به درمانگاه ژنیکولوژی و بخش بهداشت بیمارستان شهید اکبرآبادی تهران انتخاب شدند. معیار ما در انتخاب افراد مورد مطالعه وجود یا عدم وجود علائم و نشانه‌های زیر بوده است:

- ۱- وجود ترشحات هموزن: ترشحات شفاف، یکدست، بدون حالت‌های فولکولار و گرانولار که چسبندگی زیادی به دیواره‌های واژن دارد.

- ۲- وجود PH: PH ۴/۵: ترشحات با استفاده از نوار PH متر با دقت ۰/۵ واحد اندازه‌گیری شد.

- ۳- آزاد شدن بوی آمین یا بوی ماهی بعد از افزودن یک قطره محلول پتاس ۱۰٪ به ترشحات و اژینال (Whiff Test).

- ۴- وجود سلولهای اپی‌تلیال پوشیده شده از باسیلهای ریز گرم منفی یا گرم متغیر که باعث محو حاشیه سلول شد. و در حاشیه سلول بصورت ناخن جویده شده بنظر می‌رسد، روی سطح این سلول نیز بصورت گرانوله دیده می‌شود (Clue Cell).

زناتی که حداقل ۳ فاکتور از ۴ فاکتور را داشته‌اند به عنوان BV (بیمار) و زناتی که هیچکدام از علائم را نداشته و یا حداکثر یک علامت را داشته‌اند بعنوان سالم در نظر گرفته می‌شدند.

نمونه‌برداری: بعد از قرار دادن اسپیکولوم از ترشحات و اژینال در بخش خلفی طاق مهبل بوسیله سه سواب سر پنبه‌ای استریل نمونه‌برداری انجام می‌شد. سواب اول برای انجام تست آمین و مطالعه لام مرطوب (Wet mount) بکار می‌رفت. سواب دوم را روی یک اسلاید تمیز کاملاً چرخانده بطوریکه اسمیر یکدست تهیه شده و از آن برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده می‌شد. سواب سوم درون محیط انتقال (Stuart) تلقیح شده و در مدت کمتر از ۶ ساعت روی محیطهای مناسب کشت می‌شد.

کشت ترشحات: برای جداسازی گاردنرلا و اژینالیس و تعیین تعداد نسبی آن در ترشحات دو گروه، سواب سوم روی محیطهای کشت Human Blood Bilayer Tween 80 Agar (۹) HBT یا Pepton - Starch - Dextrose Agar (۴) و شکلات آگار با روش کشت نیمه کمی یا Semiquantitative کشت می‌شد، در روش کشت نیمه کمی

برای بررسی نقش گاردنرلا و اژینالیس در ایجاد واژینوز باکتریایی، ترشحات واژن ۱۰۰ نفر از زنان بیمار مبتلا به واژینوز باکتریایی و ۱۰۰ نفر افراد سالم را با لام مرطوب، رنگ‌آمیزی گرم و کشت، مورد بررسی قرار داده و نتایج را با علائم بالینی و کلینیکی واژینوز باکتریایی مقایسه نمودیم.

ما توانستیم در ۸۸٪ از افراد بیمار، گاردنرلا و اژینالیس را جدا نمائیم در حالیکه فقط در ۳۴٪ از افراد سالم مورد مطالعه این ارگانیزم، ایزوله گردید. بعلاوه در اغلب موارد (۸۱/۸٪) کلونیزاسیون ارگانیزم در واژن بیماران بسیار بالاتر از افراد سالم بوده است. جداسازی گاردنرلا و اژینالیس با تراکم بالا از کشت با مشاهده «کلوسل» در لام مرطوب و رنگ‌آمیزی گرم و همچنین با وجود ترشحات هموزن خاکستری رنگ مطابقت نشان می‌دهد. زنان در گروه سنی ۳۰ - ۲۱ ساله، زناتی که ۱۰ - ۶ سال از ازدواج آنها گذشته و آنهایی که ۴ - ۳ فرزند دارند و همچنین زنان استفاده کننده از IUD بالاترین درصد مبتلایان به واژینوز باکتریایی را تشکیل می‌دهند.

مقدمه

گاردنرلا و اژینالیس باسیلهای ریز گرم منفی یا گرم متغیر پلئومرفی هستند (۱) که نخستین بار در سال ۱۹۵۳ توسط Leopold (۶) شرح داده شد، ۲ سال بعد گاردنر و دوکز ارتباط این ارگانیزم را با عفونتهای واژینال نشان دادند (۵). از آن زمان تحقیقات وسیعی در زمینه شناسایی این ارگانیزم و بیماری مرتبط به آن که امروزه بنام «واژینوز باکتریایی Bacterial vaginosis» خوانده می‌شوند، به عمل آمد که نتایج متفاوت در زمینه این ارگانیزم، نقش آن در ایجاد بیماری و علائم و عوارض بیماری بدست داده است. بعضی از محققین این ارگانیزم را به عنوان تنها عامل ایجاد بیماری (۵) مطرح می‌نمایند. و گروهی دیگر اذعان می‌دارند که گاردنرلا و اژینالیس بصورت سیمبیوز با ارگانیزم‌های دیگر مثل بیپوزیها ایجاد بیماری می‌کنند (۲، ۳، ۸ و ۱۰).

در این مطالعه با مقایسه زنان سالم و افراد دچار واژینوز باکتریایی به بررسی تغییرات میزان و فراوانی این ارگانیزم در دو گروه و اهمیت آن در ایجاد بیماری، شناسایی واژینوز باکتریایی

1. Gardnerella vaginalis

2. Bacterial vaginosis

تشکیل داده و بین دو گروه اختلاف معنی داری نشان می دهد
($P = ۳/۷۲$ ، $P = ۴/۰۹$).

استفاده از IUD بنظر می رسد که ریسک فاکتور ابتلاء به واژینوز باکتریائی باشد زیرا ۳۷٪ از زنان با BV و ۱۷٪ از زنان سالم استفاده کننده از IUD بوده اند ($P = ۳/۸$) ولی استفاده از سایر روشهای پیشگیری اختلاف معنی داری بین دو گروه نشان نمی دهد.

بررسی علائم و نشانه های بالینی در دو گروه نشان می دهد که ابتلاء به BV با وجود التهاب، خارش، سوزش و حساس شدن منطقه تناسلی همراه نیست ولی ترشحات بدبو (۸۴٪) و افزایش حجم ترشحات (۷۱٪) از بزرگترین مشکلات زنان مبتلا به BV بوده و در ۸۰٪ موارد زنان ترشحات خاکستری رنگ داشته اند (جدول ۱). نتایج کشت نیمه کمی (جدول ۲) نشان می دهد که گاردنرلاواژینالیس از ۸۸٪ افراد مبتلا به واژینوز باکتریائی و ۳۴٪ افراد سالم مورد مطالعه جدا شده است $P = ۹/۴$ در افراد بیمار در ۸۱٪ موارد G.V با تراکم بسیار بالا (+۴) جدا شده اند و در ۱۶ مورد دیگر میزان ارگانیزم کمتر از این مورد بوده است، در حالیکه در افراد سالم در عمده موارد (۶۴/۷٪) این ارگانیزم با تراکم پائین و در حضور تراکم بالائی از لاکتوباسیلها جدا شد و تنها ۱۲ مورد (۳۵/۳٪) میزان کولونیزاسیون گاردنرلاواژینالیس بالا بود. نتایج ما نشان داد که افزایش میزان فسور و جداسازی گاردنرلاواژینالیس با کاهش میزان لاکتوباسیلها همراه بوده است، بطوریکه تنها در ۲۳٪ از افراد با BV لاکتوباسیلها ایزوله گردیدند.

بحث

واژینوز باکتریائی از شایعترین و بی ازارترین علل میکروبی ایجاد کننده ترشحات واژینال غیرطبیعی می باشد. شاخص علائم این بیماری در مطالعه ما همانند مطالعات دیگران افزایش حجم ترشحات (۷۶٪) و بوی بد ترشحات (۸۱٪) می باشد. طول مدتی که بیماران از این عوارض رنج می بردند در بیماران مورد مطالعه ما بسیار زیاد بود یعنی ۷۴٪ از بیماران بیش از یکسال از وجود ترشحات رنج می بردند و ۴۱٪ بیش از یکسال، که نشان می دهد در بیماران مراجعه کننده وجود این ترشحات عمدتاً در درازمدت بصورت عادی جلوه گر شده و

سواب حاوی ترشحات واژینال را در ۲/۵ سانتی متر مکعب از یک کناره پلیت کشت می دادیم آنگاه با یک سواب سیمی که با شعله استریل شده بود آنرا در کناره دیگر پلیت کشت می دادیم (First Zone) سپس با لوپ سیمی که توسط شعله استریل شده بود از نمونه این قسمت روی کناره دیگر پلیت کشت می دادیم (Second Zone) و بهمین ترتیب تا منطقه چهارم عمل کشت انجام می گردید. میزان رشد بصورت زیر ارزیابی می شد: (۱+) = کمتر از ۱۰ کلنی در نخستین مرحله منطقه (First Zone).

(۲+) = بیش از ۱۰ کلنی در منطقه اول و کمتر از ۱۰ کلنی در منطقه دوم

(۳+) = بیش از ۱۰۰ کلنی در منطقه دوم و کمتر از ۱۰ کلنی در منطقه سوم

(۴+) = بیش از ۱۰ کلنی در منطقه سوم و مدت ۴۸ ساعت در اتو 37°C در حضور ۵٪ CO_2 اتوگذاری می شد.

روش شناسائی گاردنرلاواژینالیس: ایجاد همولیز روی محیط HBT، هیدرولیز نشاسته روی محیط PSDA و ایجاد کلنی های ریز سر سوزنی روی شکلات آگار، از کلیه کلنی های مشکوک رنگ آمیزی گرم بعمل می آمد و باسیلهای ریز گرم منفی که گاه آرایش حروف چینی را بخود می گرفتند بعنوان مشکوک به گاردنرلا در نظر گرفته می شد و تست های تشخیص دیگر مثل عدم همولیز خون گوسفند، عدم تحمل تلوریت، نداشتن آنزیمهای اکسیداز و کاتالاز، حساس بودن به وجود آب اکسیژنه، توانائی هیدرولیز هیپورات سدیم و نشاسته، تخمیر فندهای گلوکز و نشاسته و عدم تخمیر قند رافینوز برای تشخیص قطعی انجام می شد. (۱، ۳، ۴ و ۹)

نتایج

براساس علائم چهارگانه ذکر شده ۱۰۰ نفر از مراجعین به درمانگاه ژنیکولوژی بعنوان BV و ۱۰۰ نفر از زنانی که برای پیشگیری از باروری یا بررسی سالیانه پاپ اسمیر به بخش بهداشت بیمارستان مراجعه می نمودند، بعنوان سالم انتخاب شدند، عمده مراجعین در هر دو گروه در گروه سنی ۳۰ - ۲۱ سالگی بودند (۵۹٪ افراد بیمار و ۴۴٪ افراد سالم)، مدت زمان ازدواج و تعداد زایمان از شرایط مساعد کننده ابتلاء به BV بوده و زنانی که ۱۰ - ۶ سال ازدواج آنها گذشته و ۴ - ۳ زایمان داشته اند، بیشترین درصد مبتلایان به واژینوز باکتریائی را

اگر چه واژینوز باکتریایی بخودی خود خطر چندانی ندارد ولی مشخص شده که این بیماری و گاردنرلا واژینالیس می‌تواند منجر به بروز عفونت ادراری، آندومتریت‌های قبل و بعد از زایمان، کاهش وزن نوزادان و ... گردد (۷ و ۱۱) که ضرورت شناسایی این عفونت در کارهای روتین آزمایشگاهی را بخصوص در زمان بارداری و در عفونتهای ادراری طولانی مدت مشخص می‌نماید. یعنی زنانی که ترشحات زیاد و بدبوی واژینال دارند باید حداقل در لام مرطوب و رنگ آمیزی گرم به جستجوی کلوسل و باسیلهای ریز گرم منفی همراه افزایش در تعداد کل میکروبها در لام میکروسکوپی گشته و با برآورد میزان لاکتوباسیلهای و بررسی عدم وجود تریکوموناس واژینالیس در ترشحات بعنوان مشکوک به واژینوز باکتریایی اقدام به درمان نمود. در صورت ضرورت کشت ترشحات باید روی محیط حاوی خون انسان (مثل HBT) انجام شود زیرا با توجه به وجود میکروبیهای مختلف در فلور واژن باید با استفاده از آنتی‌بیوتیکهای مختلف مثل کلیستین، نالیدیکسیک اسید و آمفوتریسین B و ماده تیونین ۸۰ محیط را برای گاردنرلا واژینالیس اختصاصی نمود و از طرفی مشخص شده که گاردنرلا واژینالیس روی محیط با خون انسان ایجاد همولیز ظریف B می‌نماید ولی قادر به همولیز خون گوسفند نیست. نمونه باید حداقل ۴۸ ساعت در جای شمع‌ی اتوگذاری شوند تا امکان رشد گاردنرلا واژینالیس مهیا شود.

یا درمانهای نامناسب باعث باقی ماندن عفونت در این افراد شده است. اگر چه هر ۴ علامت که برای انتخاب افراد BV در نظر گرفته شد دارای حساسیت بالا بوده‌اند ولی وجود $PH = 4/5$ و آزاد شدن بوی ماهی مختص این بیماری نبوده و در سایر عفونتهای واژینال مثل تریکومونیا نیز مشاهده می‌گردد. نتایج ما نشان داد که وجود کلوسل و ترشحات هموزن با ایزولاسیون گاردنرلا واژینالیس به تعداد زیاد ارتباط مستقیم و واضح دارد، یعنی می‌توان اذعان داشت که وجود ترشحات هموزن خاکستری رنگ و مشاهده تعداد زیاد کلوسل (بیش از ۱۵٪) در اسمیر مستقیم تهیه شده از ترشحات واژینال زنان می‌تواند تا حدود زیادی با جداسازی گاردنرلا واژینالیس (۴۰) از کشت روی محیطهای اختصاصی همراه باشد و آنرا می‌توان مصادف با ابتلاء به واژینوز باکتریایی قلمداد نموده و اقدام به درمان نمود.

نتایج ما نشان داد که جداسازی گاردنرلا واژینالیس با کاهش در تعداد لاکتوباسیلهای همراه می‌باشد، اگر چه مکانیسم این تغییر در فلور میکروبی واژن زنان مشخص نیست و فاکتورهای پاتوژنیسته گاردنرلا واژینالیس که باعث کاهش تعداد لاکتوباسیلهای می‌گردد هنوز شناسایی نگردیده است ولی این ارتباط معکوس نشان می‌دهد که گاردنرلا واژینالیس می‌تواند بعنوان عامل پاتوژن و عامل مولد واژینوز باکتریایی قلمداد گردد.

جدول ۱: بررسی علائم و نشانه‌های بالینی در ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه (بیمار و سالم)

علائم و نشانه‌ها	علائم										علائم و نشانه‌ها			
	ترشح بدبو	درد زیر شکم	مقاربت دردناک	خارش	حساس شدن منطقه	سوزش	التهاب	خاکستری	بندب	زرد		زرد	رنگ ترشح	حجم ترشح
بالینی	۸۴	۴۱	۲۱	۱۳	۷	۹	۸۰	۱۲	۱۵	۱۹	۷۱	۱۰	۲	۳۳
گروههای مورد مطالعه														
بیماران (BV) n = ۱۰۰														
سالم n = ۱۰۰	۱۹	۱۷	۱۰	۳	۱	۲	۶	۸۴	۱۰	۶	۹	۸۵	۰	۶

جدول ۲: میزان رشد نیمه کمی گاردنرلاواژینالیس در افراد سالم و افراد با BV (۲۰۰ مورد)

گروه‌های مورد مطالعه رشد نیمه کمی	بیمار n = ۱۰۰	سالم n = ۱۰۰	جمع
+۱	۱	۱۴	۱۵
+۲	۱۵	۸	۲۳
+۳	۱۶	۴	۲۰
+۴	۵۶	۸	۶۴
جمع	۸۸	۳۴	۱۲۲

می‌باشد و در زنانی که در آنها G.V با تراکم ۱ + جدا می‌گردد اصولاً ترشحات هموزن وجود ندارد. نتایج جدول شماره ۴ نشان می‌دهد که استفاده از روشهای ساده مثل لام مرطوب و رنگ آمیزی گرم ترشحات واژینال دارای ارزش تشخیصی بالا در شناسایی بیمارانی مبتلا به واژینوز باکتریائی می‌باشد که اساس آن بر وجود Clue Cell باسیلهای ریز گرم منفی و گرم متغیر عدم وجود تریکوموناس واژینالیس، عدم وجود یا کم بودن لاکتوباسیلهای و گلبولهای سفید استوار است.

جدول شماره ۳ ارتباط علائم بالینی را با رشد نیمه کمی GV در افراد مبتلا به واژینوز باکتریائی و سالم نشان می‌دهد، همانطوریکه مشاهده می‌گردد، در تمام مواردی که GV با تراکم +۴ دیده می‌شود کلوسل نیز در لام مرطوب و رنگ آمیزی گرم دیده می‌شود که ارتباط قوی بین این ارگانسیم و ایجاد کلوسل را مشخص می‌کند. از میان سایر علائم بالینی، جداسازی G.V با وجود $\text{pH}_{\text{V}} 4/5$ (۷۶/۲٪)، قسمت آمین مثبت (۷۵/۴٪) و وجود ترشحات هموزن (۶۵٪) در ارتباط می‌باشد ولی مطالعه دقیقتر جدول نشان می‌دهد که وجود ترشحات هموزن فقط در صورت وجود درصد بالائی از گاردنرلا امکان پذیر

جدول ۳: ارتباط علائم بالینی با رشد نیمه کمی گاردنرلا در کلیه افراد سالم و بیمار (تعداد ۱۱۲)

گاردنرلا واژینالیس	Clue Cell		pH		نوع ترشح		تست آمین	
	+	-	>4/5	<4/5	هموزن	غیر هموزن	+	-
+۱	۱ (۶/۳)	۱۴ (۹۳/۷)	۱ (۶/۳)	۱۴ (۹۳/۷)	- (۱۰)	۱۵ (۱۰۰)	۲ (۱۰/۳)	۱۳ (۸۹/۷)
+۲	۱۳ (۵۶/۵)	۱۰ (۳۴/۵)	۱۵ (۶۳/۲)	۸ (۳۴/۸)	۶ (۲۶/۲)	۱۷ (۷۳/۸)	۱۵ (۶۳/۲)	۸ (۴۳/۸)
+۳	۲ (۹۰)	۲ (۱۰)	۱۸ (۹۰)	۲ (۱۰)	۱۵ (۸۵)	۵ (۱۵)	۱۹ (۹۵)	۱ (۱۵)
+۴	۶۴ (۱۰۰)	۰ (۰)	۵۹ (۱۲/۱)	۵ (۷/۹)	۵۸ (۹۰/۶)	۶ (۹/۴)	۵۶ (۸۷/۵)	۸ (۱۲/۵)
جمع	۹۶ (۷۹/۷)	۲۶ (۲۱/۳)	۹۳ (۷۶/۲)	۲۹ (۲۳/۸)	۷۹ (۶۵)	۴۳ (۳۵)	۹۲ (۷۵/۴)	۳۰ (۲۴/۶)

جدول ۴: مقایسه نتایج حاصل از روشهای مختلف در شناسائی و اژینوز باکتریائی

کشت		رنگ گرم		لام مرطوب		روشها
-	+	-	+	-	+	
۱۲	۸۸	۴	۹۶	۹	۹۱	بیمار (n = ۱۰۰)
۶۶	۳۴	۹۰	۱۰	۹۱	۹	سالم (n = ۱۰۰)

References

- 1 - Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Second Edition Williams and Wilkins Baltimore, Vol.1,2, 1986.
- 2 - Chen, K.; Forsyth, P; et al : Amine content of vaginal fluid from untreated patient with nonspecific vaginitis. J.Clin. Inves. 63 : 828 - 835 , 1979
- 3 - Collee, J.C.; Dugid , J.P. ; Fraser, A.G. and Marmion, B.P. :Practical Medical Microbiology Thirteenth Edition. Churchill livingston, U.K. 1989.
- 4 - Dunkelber, W.; Skaggs. R; et al. : Method for Isolation and Identification of Corynebacterium vaginalis. Appl. Microb. 19: 47 - 52 , 1970.
- 5 - Gardner, H.L. Duckes, C.D. : Haemophilus vaginalis vaginitis . A newly defined specific infection previously classified nonspecific vaginitis. Am. J. Obstet . Gynecol, 69 : 962 - 976 , 1955.
- 6 - Leopold, D.S. "Here to fore undescribed organism isolated form the genitourinary system. U.S. Armed Forces. Med. J. 4 : 263 - 266, 1953.
- 7 - Martius, J.; Krohn, M.A.: et al : Relationships of vaginal lactobacillus species cervical chlamydia trichomatis and bacterial vaginosis to preterm birth. Obstet & Gynecol, 7 : 89 - 95 , 1988.
- 8 - Speigel, C.A., Eschenbach, D, et al : Anaerobic Bacteria in non specific vaginitis. N Engl. J Med. 303 : 601 -7, 1980.
- 9 - Tollen. P.A. Amsel R. et al. Selective Differential Human Blood Biulyer Media for Isolation of Grandnerella vaginalis J Clin Microb 15 : 141 - 147 1982.
- 10 - Vetere, A. Borrello, S.P. et al : Characterisation of anaerobic curved Rod (Mobilumcus spp) Isolated from the urogenital tract. J. Med Microb 23 , 1989.
- 11 - Walts, D.H. Krohn, M.A.; et al : Bacterial vaginosis as a risk factor for post cesarean endometritis Obstet. & Gynecol 75 : 52 - 58 , 1990.