



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
TPR-D-2015-0001**

Trichomonas vaginalis'in AKTİN GEN BÖLGESİ KULLANILARAK PCR-
RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) İLE
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ

SERPİL DEMİRAĞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. HATİCE ERTABAKLAR**

AYDIN-2015

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
TPR-D-2015-0001**

Trichomonas vaginalis’in AKTİN GEN BÖLGESİ KULLANILARAK PCR-
RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) İLE
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ

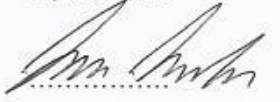
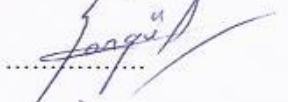
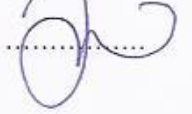
SERPİL DEMİRAĞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. HATİCE ERTABAKLAR**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Serpil Demirağ tarafından hazırlanan “Trichomonas vaginalis’in actin gen bölgesi kullanılarak PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ile moleküler tiplendirmesi ” başlıklı tez, 15/01/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Unvanı, Adı ve Soyadı :</u>	<u>Üniversitesi :</u>	<u>İmzası:</u>
Prof. Dr. Hatice Ertabaklar	Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof. Dr. Sarhan Sakarya	Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof. Dr. Bülent Bozdoğan	Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof. Dr. Songül Delibaş	Dokuz Eylül Üniversitesi	
Doç. Dr. Berna Korkmazgil	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tez, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülen “*Trichomonas vaginalis*’in aktin gen bölgesi kullanılarak PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ile moleküler tiplendirmesi” isimli tez projesi kapsamında hazırlanmıştır. Tez çalışması sırasında, ışık mikroskobu, santrifüj, vortex gibi alet ve malzemeler açısından, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı’nın olanaklarından yararlanılmıştır. Bu tez, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında TFP-12015 numaralı tez projesi olarak desteklenmiştir.

Trichomonas.vaginalis, tüm dünyada yaygın olarak görülen cinsel yolla bulaşan sıklıkla kadınlarda vajinit erkeklerde üretrit etkeni bir protozoondur. Trichomoniasis özellikle üreme çağında kadın sağlığına olumsuz etkileri bulunması nedeniyle halk sağlığı açısından oldukça önemlidir. Tanısında direkt ve dolaylı pek çok tanı yöntemi kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler yöntemler özellikle PCR, bir çok etkenin tanısında ve alt grupların tiplendirmesinde artan sıklıkta kullanılmaktadır. Parazitlerin tanısında, alttürlerin ve tür içi farklılıkların saptanmasında PCR’a dayalı RFLP gibi teknikler sıkça kullanılmaktadır. Aktin proteininin, parazitin biyolojik varyasyonu ile ilişkili olduğu ve yapılan çalışmalar tür içinde farklılıklar olabileceğini desteklediğinden çalışmamızda PCR-RFLP’de aktin geni, hedef bölge olarak seçilmiştir. Uluslararası literatürde bu konuda çok az çalışmaya rastlanmış olup ülkemizde henüz bu konuda bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, laboratuvarımıza gelen, dolayısıyla bölgemizdeki olgulardan izole edilen *Trichomonas vaginalis* izolatlarının PCR-RFLP ile tiplendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışma, ülkemizde bu konuda yapılan ilk çalışma olup bilimsel literature katkı sağlayacak ve bundan sonra yapılacak benzer çalışmalara öncülük edecektir.

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
KABUL ve ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tarihçe.....	1
1.2. Taksonomi.....	1
1.3. Yapı.....	1
1.3.1. Trofozoit.....	3
1.3.2. Beslenme ve hareket.....	3
1.4. Yaşam Döngüsü.....	3
1.5. Virülans.....	5
1.5.1. Aderans ve Adezinler.....	5
1.5.2. Hemoliz.....	6
1.5.3. Hücre Ayıran Faktör (CDF).....	6
1.5.4. Sitotoksik Moleküller.....	6
1.5.5. <i>T.vaginalis</i> RNA virüs.....	6
1.6. Tanı.....	7
1.6.1. Etyolojik Tanı.....	7
1. 6.1.1. Direkt Mikroskopik İnceleme.....	7
1. 6.1.2. Boyama.....	7
1.6.1.3. Kültür.....	7
1.6.2. Serolojik İnceleme.....	8
1.6.2.1. İndirekt Hemaglutinasyon Yöntemi (İHA).....	8
1.6.2.2. İndirekt Floresan Antikor Testi (İFA).....	8
1.6.3. Hızlı Tanı Testleri.....	8
1.6.4. Moleküler Testler.....	8
1.6.4.1. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	10
1.6.4.2. Trichomoniasis’de PCR Kullanımı.....	11

1.7. Epidemiyoloji.....	12
1.8. Klinik.....	12
1.9. Tedavi.....	14
1.9.1. Metranidazol Direnci ve Aktin Geni	15
1.10. Korunma	15
1.11. Amaç.....	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
2.1. İzolatlar	17
2.2. DNA İzolasyonu	17
2.3. <i>T. vaginalis</i> Aktin Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	17
2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	19
2.5. Restriksiyon Enzimleriyle Kesim.....	20
2.6. Sonuçların Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve RFLP Paternlerinin Belirlenmesi.....	20
2.7. Sekanslama ve Analiz.....	21
3. BULGULAR	22
3.1. PCR ve RFLP Bulguları.....	22
4. TARTIŞMA.....	37
5. SONUÇ.....	42
ÖZET	43
SUMMARY.....	44
6. KAYNAKÇA	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51
TEŞEKKÜR	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
bp:	Base pair
CDC:	Center for Disease Control
CDF:	Hücre Ayıran Faktör
CPLM:	Cysteine-Peptide-Liver-Maltose besiyeri
DAT:	Direkt Aglutinasyon Testi
DM:	Direkt mikroskopi
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP:	Deoxynucleoside triphosphate
ELISA:	Enzim Bağlı İmmünoabsorbent Testi (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)
HIV:	Human Immune Deficiency Virus
IFA:	İndirekt Floresan Antikor Testi
İHA:	İndirekt Hemaglutinasyon Testi
IPs:	İç primerler
OPs:	Dış primerler
PBS:	Phosphate Buffer Salin
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)
RNA:	Ribonükleik asit
SCS	Süksinil Koenzim-A Sentetaz
TVV:	<i>T. vaginalis</i> virüs
TYM:	Tripticase-Yeast Extract Maltose besiyeri
WHO:	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

TABLÖLAR

Sayfa

No

Tablo 1. Enzim kesimlerine göre örneklerin ayrıntılı paternleri.....	28
Tablo 2. Örneklerin PCR-RFLP'ye göre genotipleri.....	29
Tablo 3. Örnek 7, 11, 12,15 ve 16'nın sekans verilerine göre enzim kesim paternleri ve genotipleri.....	30
Tablo 4. Sekans sonuçları.....	32

ŞEKİLLER	Sayfa
No	
Şekil 1. İn vitro kültürde Giemsa ile boyanmış trofozoit görünümü.....	3
Şekil 2. <i>Trichomonas vaginalis</i> 'in yaşam döngüsü.....	4
Şekil 3. Örnek numaraları 1-4, 7, 11-16, 18-20 olan izolatların saflaştırma sonrası jel görüntüsü.....	22
Şekil. 4. Örnek numarası 1-4, 7 olan PCR ürünlerinin MseI ve RsaI enzimleriyle kesimiyle elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	23
Şekil 5. Örnek numarası 13-16, 18-20'ye ait PCR ürünlerinin MseI ve RsaI enzimleriyle kesimiyle elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	23
Şekil 6. Örnek numarası 5, 6, 8-10, 17 olan PCR ürünlerinin kesim öncesi bantları ve MseI ve RsaI enzimleriyle kesimiyle elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	24
Şekil 7. Örnek 11 ve 12'ye ait PCR ürünlerinin kesim öncesi bantları ve MseI ve RsaI enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	24
Şekil 8. Numarası 1-4, 7, 12, 13, 11, 20 olan örneklerin HindII enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü	25
Şekil 9. Örnek 5, 6, 8-10'un HindII enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	25
Şekil 10. Numarası 14-16, 18 olan örneklerin HindII enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	26
Şekil 11. Onyedili numaralı örneğin HindII, RsaI ve MseI enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü.....	26
Şekil 12. Referans sekansın http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php yazılımı kullanılarak RsaI ile kesim sonucu.....	30
Şekil 13. Numarası 15 olan örneğin http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php yazılımı kullanılarak RsaI ile kesim sonucu.....	31
Şekil 14. Numarası 16 olan örneğin http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php yazılımı kullanılarak RsaI ile kesim sonucu.....	31

1. GİRİŞ

1.1. TARİHÇE

İlk kez Donne tarafından 1836 yılında bulunan *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), ismi 1837’de aynı araştırmacı tarafından verilmiştir (Kuman ve Altıntaş, 1996). Thrix, Yunanca’da saç anlamına gelmektedir. Koelliker ve Scanzoni 1855 yılında kadınlarda %50 oranında enfeksiyonu görürken 1924 yılında Katsuma tarafından bir erkek idrarında saptanmıştır. Yine, 1927’de Capek tarafından bir erkek üretrit vakası bildirilmiştir (Merdivenci, 1981).

1.2. TAKSONOMİ (Schwebke ve Burgess, 2004)

- Domain: Eukarya
- Kingdom: Protista
- Subkingdom: Protozoa
- Phylum: Metamonada
- Subphylum: Mastigophora
- Class: Parabasilia
- Order: Trichomonadida
- Family: Trichomonadae
- Genus: *Trichomonas*
- Species: *T. vaginalis*

1.3. YAPI

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*), armut şeklinde olup canlı iken bir miktar şekil değiştirmektedir. Geniş kısmın ortasında kese şeklinde nükleus ve içinde “blefaroblast” denen kromatin tanecikleri mevcuttur. Bu taneciklerin her birinden dörder tane “kamçı” denen uzantılar çıkarak gövdenin dışında serbest olarak hareket ederler. Beşinci kamçı, membran boyunca uzanır ve membranla arasında “dalgalı zar” denen bağlar oluşur. Ayrıca, nükleustan başlayıp parazitin sivri ucundan dışarı çıkan “aksositol”, bu

oluşumun yanında mitokondriye benzer yapılar, nükleusla dalgalı zar arasında parabazal golgi cisimciği ve bir lif mevcuttur.

Aksositol ve golgi cisimle yanındaki lifin kinetosom üzerine yaslandığı ve yine kamçıların her birinin bir kinetosomdan çıktıkları görülmüştür. Kinetosomların içinde yoğun osmofilik granüller bulunmaktadır. Ayrıca, aksositol çevresinde mitokondriye benzeyen “hidrogenozom”ların olması nedeniyle diğer ökaryotlardan farklı yapıdadır (Saygı, 1998).

Nükleusu, büyük oval yapıda olup parazitin geniş olan kısmının ortasında bulunmaktadır. İçindeki yoğun plazma granüller barındırmaktadır. Dışta bir nükleus membranı ve onu çevreleyen endoplazmik retikulum bulunur. Parazit, çift katlı, fosfolipid yapısında, sıvı mozaik yapısı nedeniyle fagositoz yapılmasını sağlayan bir hücre membranına sahiptir. Bu sayede, fagositoz yoluyla kolayca beslenerek yaşamını sürdürebilir. Hücre membranının bir parçasıymış gibi, parazitin yarısına kadar uzanan dalgalı bir zar bulunmaktadır. Bu zarın altında ise, “Kosta” olarak adlandırılan bir oluşumda aralıklı çapraz bantlar görülebilir (Öncel ve Zeyrek, 2007).

1.3.1. Trofozoit

Kist formu olmayan parazitin tek formu trofozoit formudur. Boyutları, 10-25 mikron boy ve 5-10 mikron enindedir. Dördü ön, bir tanesi arka tarafta olmak üzere beş kamçısı vardır. İkiye bölünerek üremektedir. Dış etkenlere dayanıklı değildir ve suda bir saat içinde ölmektedir. İdrarda 24 saat, kirli eşyalarda 6 saat canlı kalabilmektedir (Öncel ve Zeyrek, 2007).



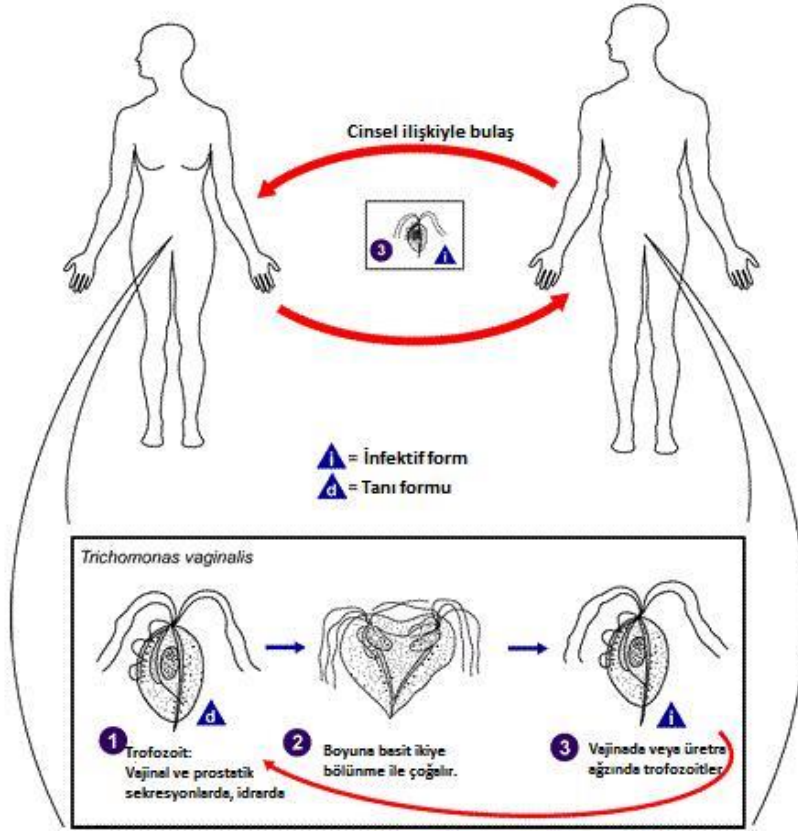
Şekil 1. in vitro kültürde Giemsa ile boyanmış trofozoit görünümü (<http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/gallery.html#trophs> adresinden 03/03/2015 tarihinde erişilmiştir)

1.3.2. Beslenme ve Hareket

Trichomonas vaginalis, kendi etrafında dönerek hareket etmektedir. Bunu dalgalı zar aracılığıyla gerçekleştirir. Ön kısımdaki kamçılar da bu hareketi hızlandırmaktadır. Dönüşü sırasında karşısına çıkan bakteri, virüs ve protozoa gibi canlıları, epitel hücresi, eritrosit, spermatoit gibi yapıları kamçıları yardımıyla yakalar ve fagositoz yoluyla alarak beslenir. Enerjisini, en çok vajen glikojeninden temin etmektedir. Bu suretle, üremeleri için vajen glikojenine ihtiyaç duyan *Lactobasillus acidophilus* üreyemez, vajen pH'sı alkaliye döner ve *T. vaginalis*'in üremesi için gerekli ortam oluşmuş olur (Heine ve McGregor 1993).

1.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ

Monoksen bir protozoon olup tek konağı insandır. Kist şekli bulunmamakta olup mevcut olan tek formu trofozoit formudur. Yaşam döngüsü son derece basit olarak nitelendirilebilir (Schwebke ve Burgess 2004). Trofozoit formuyla genellikle cinsel ilişkiyle bulaşmakta olup nadiren kontamine eşyalarla da bulaş görülebilmektedir. Yerleştiği organda ikiye bölünerek çoğalır. Bu sırada, yeni oluşan protozoalarda ikişer kamçı ve bir blefaroplast bulunmaktadır. Dalgalı zar, kosta ve parabazal cisim bir hücrede kalır. Yeni hücrelerde eksik olan kamçılar, dalgalı zar, kosta, parabazal cisim ve aksositil, blefaroplasttan çıkarak organeller tamamlanır (Öncel ve Zeyrek, 2007).



Şekil 2. *Trichomonas vaginalis*'in yaşam döngüsü (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> adresinden 02/01/2015 tarihinde ulaşılarak Türkçe'leştirilmiştir).

1.5. VİRÜLANS

Hemen her zaman bir hastalığa yol açmasa da, *T. vaginalis*, yerleştiği epitel hücrelerinde belirgin değişiklikler meydana getirmektedir. Ekstrasellüler bir parazit olup patogenezi multifaktöriyeldir. Ülkelere ve bölgelere göre farklı suşları olabileceği ve bunların da farklı virülans özelliklerine sahip olabileceği düşünülmektedir (Özcel ve Zeyrek 2007, Matini 2014).

Parazit mukoza üzerinde üreyerek epitel harabiyeti ve yangı oluşturmaktadır. Hücre içinde ödem meydana gelmekte ve yangı bölgesine lökositlerin de gelmesiyle hücrelerarası ödem de oluşmaktadır. Hatta kronik olgularda bu ödem nedeniyle, yüzeyel tabaka yerinden ayrılmakta ve akıntı meydana gelmektedir. Dolayısıyla denebilir ki, virülansındaki en önemli faktör, epitel hücrelerine olan aderansdır (Schwebke ve Burgess 2004, Ertabaklar ve Ertuğ, 2007). Parazitin hücre ve dokular üzerinde toksik etkisi olan bir enzim salgıladığı, dokularda nekroza kadar giden harabiyete yol açtığı bildirilmektedir (Özcel ve Zeyrek, 2007).

Trichomonas enfeksiyonunda sürüntü materyalinin boyanarak incelenmesi sırasında farklı görünümeler ortaya çıkabilmektedir. Bunlardan bir tanesi, epitel hücre dejenerasyonu iken bir diğeri malign görünümü andıran hücresel değişikliklerdir. Üçüncü görünüm ise, klasik yangı görünümü, bol lökosit ve histiyositlerdir.

Trichomonas vaginalis'in virulansı ve oluşturduğu hastalık şiddeti, hem parazite ait hem de konağa ait özelliklerle yakından ilişkilidir. Klinik tablo ve metronidazol direncinde suşların biyolojik özellikleri ve virulans farklılıklarının rol oynadığı düşünülmektedir (Hampl 2001). Yine, semptomatik ve asemptomatik hastalardan elde edilen suşların aralarında farklılık bulunduğu zimodem analizi ile tespit edilmiştir (Vohra 1991, Proctor 1988). Parazitin farklı serotip, enzim paterni ve değişen büyüme hızlarına sahip olduğu gösterilmiş olup adezyon, hemoliz ve sitotoksosite gibi virülans faktörleri tanımlanmıştır (Mendoza-Lopez, 2000).

1.5.1. Aderans ve Adezinler

Trichomonas vaginalis'e ait olan yüzey proteinleri (adezin) AP 65, AP 51, AP 33 ve AP 23, konak hücreyle parazit arasındaki etkileşimi düzenlemektedir (Arroyo, 1992). Aderansta rol oynayan proteinler yüzeyde yerleşmiştir. Parazit epitelle temas ettiğinde, yüzeyden salınan adezyon proteinleri artar. Adezyon moleküllerinin salınımını etkileyen bazı faktörler mevcuttur. Örneğin, ortamda yüksek oranda demir varsa, virülans artar ve demir düzeyi düşükse bu dört proteinin salınımı azalmaktadır. Bir diğer faktör ise laminindir. Laminin, epitelyum alt tabakasında bulunan bir glikoproteindir ve reseptörleri

makrofaj, bakteri ve kanser hücrelerinde de bulunmuştur (Özcel ve Zeyrek, 2007). Yine, *Trichomonas* yüzeyinde D-Laktoz ve N-asetil-D-glikozamin gibi lektin bağlayan karbonhidratların eritrosit hemolizi, hedef hücre fagositozu ve ilaç duyarlılığında rol oynadığı bilinmektedir. Parazitin yüzeyinde bulunan lektinin de adezyonda rol aldığı bildirilmektedir (Petrin, 1998).

1.5.2. Hemoliz

Parazitin ana lipid ve demir kaynağı, eritrositler olup eritrositlerin hemolizinde, sistein proteinazlar rol oynamaktadır. Özel bir reseptör üzerinden parazit eritrosite yapıştığında sistein proteinazlar salınır ve parazit hücreden ayrılır. Parazit, hücreden ayrıldığında da hücre lizisi meydana gelmektedir. *Trichomonas vaginalis*, sistein proteinazlar açısından en zengin protozoondur (Öncel ve Zeyrek 2007, Ertabaklar ve Ertuğ 2007).

1.5.3. Hücre Ayıran Faktör (CDF)

CDF, glikoprotein yapısında olup hücreleri öldürmeden ayırır. Üretimiyle klinik semptom ve hastalığın şiddeti yakından ilişkilidir. CDF üretimi artarsa, hastalık şiddeti de artmaktadır (Garber, 1991). Estrojenin bol olduğu ortamlarda üretiminin düşmesi, menstruasyon gibi estrojenin azaldığı durumlarda semptomların kötüleşmesini açıklar niteliktedir.

1.5.4. Sitotoksik Moleküller

Parazitin hedef hücre membranına sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Sitotoksik etkide yer alan faktörlerden biri eritrosit membranında por oluşturan moleküllerdir. Bir diğeri, parazit tarafından salınan Fosfolipaz A2 olup bu da yine eritrositleri parçalamakta ve fosfatidil kolini azaltmaktadır (Öncel ve Zeyrek 2007, Ertabaklar ve Ertuğ 2007).

1.5.5. *T. vaginalis* RNA virüs

Bir diğer virulans faktörü, *T. vaginalis* RNA virüs (TVV) denen bir virüstür. Çift zincirli olan bu virüsü, klinik izolatların %82 oranında taşıdığı tespit edilmiştir. Bu virüsün virulansta ne gibi bir rol oynadığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Suud ve Kapil, 2008).

1.6. TANI

Trichomoniasis, bakteriyel vajinozise benzemesi, birçok olguda semptomsuz olması nedeniyle tanısı zor olabilir (Stemmer ve ark., 2012). En kolay ve güvenilir yöntem, parazitin görülüp tanınmasıdır. Tanı, direkt veya indirekt yöntemlerle yapılabilir (Rein, 2000). Etyolojik ve serolojik tanı mümkündür.

1.6.1. Etyolojik Tanı

1.6.1.1. Direkt Mikroskopik İnceleme

Direkt mikroskopi (DM), parazitin mikroskop altında incelenmesidir. Vajinal akıntı, idrar sediment, prostat akıntısı gibi sıvılardan alınan örneklerden bir damla, bir damla serum fizyolojikle lam üzerine konarak karıştırılır. Üzerine lamel konarak en kısa zaman içinde mikroskop altında incelenir. Hareketsiz parazitleri harekete geçirmek amacıyla preparat üzerine bir damla %5'lik paraamino salisilik asit damlatılması yardımcı olabilir. Duyarlılık %40-70 arasında değişmektedir (Stemmer, 2012).

1.6.1.2. Boyama

Bir damla örnek lam üzerine konur ve yayma yapılır. Tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskopta immersiyon objektifiyle incelenir. Giemsa dışında, May Grünwald, Gram veya Papanicolaou yöntemleriyle de boyanabilir. Boyamayla, kamçı, nükleus, aksositil gibi organeller görülebildiğinden tanı kolayca konur. Parazit sayısı az olduğunda, besiyelerine de ekim yapılarak tanı desteklenebilir.

1.6.1.3. Kültür

Kronik enfeksiyon veya parazitin az olduğu durumlarda kullanılması DM ve kültür yöntemlerinin kullanılması tanıyı attırmaktadır. Üreme için en uygun sıcaklık 37°C olup parazitler en erken 9-12 saatte üreyebilmektedir. CPLM (Laktoz, Sistein, Karaciğer tozu veya ekstresi, Maltoz) Besiyeri ve Trypticase-Yeast Extract Maltose (TYM) Besiyeri en çok kullanılan besiyerlerindendir. Bunların dışında, VF Buyyon Besiyeri, Diamond TPS-1 gibi besiyerleri de kullanılabilir. Değişik besiyerlerinin kullanılışı kültür yönteminin %50-95 oranında hassas olduğu ve bu nedenle trichomoniosis tanısında altın standart olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Öncel ve Zeyrek, 2007).

1.6.2. Serolojik Testler

Trichomoniasis tanısında rutin olarak kullanılmamakla birlikte parazitin görülememesi, vajinal materyalin elde edilememesi durumlarında veya bilimsel araştırmalarda serolojik testler kullanılabilir.

1.6.2.1. İndirekt Hemaglutinasyon Yöntemi (İHA)

Bu yöntemde kullanılan antijen, kültürde üretilen parazitlerden elde edilmektedir. Daha sonra bu antijenlerle hazırlanan koyun eritrositleri kullanılarak İHA yöntemi çalışlabilmektedir. Eritrosit yüzeyindeki antijen, antikorlarla karşılaştığında, eritrositler birbirine yapışır ve hemaglutinasyon meydana gelir (Öncel ve Zeyrek, 2007).

1.6.2.2. İndirekt Floresan Antikor Testi (İFA)

Besiyerinden üretilmiş canlı parazitler üzerine serum fizyolojik konarak santrifüj edilir. Üç kez tekrardan sonra yıkanarak dipte kalan çöküntüden özel İFA lam çukurlarına birer damla konur ve üzerlerine birer damla aseton damlatılarak oda ısısında kurutulur. Böylece, antijen hazırlanmış olur. Bu antijenlerle trichomonas şüphesi olan kişilerin serumlarında antikor aranır (Öncel ve Zeyrek, 2007).

1.6.3. Hızlı Tanı Testleri

Son yıllarda, 10-60 dakika arasında sonuç verebilen ve Trichomonas antijenlerini veya nükleik asitlerini aramaya yönelik testler geliştirilmiştir (Hobbs ve Sena, 2013). Bunların arasında OSOM Trichomonas Rapid Test (Sekisui Diagnostics, ABD) ve Kalon Tv Lateks Aglutinasyon Testi (Kalon Biological, İngiltere), antijenlere yönelik testler iken; Affirm VPIII (Becton Dickinson, ABD) nükleik asit aramaya yönelik bir testtir. Duyarlılıkları %40-95 arasında değişirken, seçicilikleri yüksektir (%92-100) (Suud ve Kapil, 2008).

1.6.4. Moleküler Testler

Parazitlerin tanısında, DM ile görülememesi, az sayıda parazit varlığı, serolojik yöntemlere karşı çapraz reaksiyon oluşma riskinin olduğu durumlar, bu yöntemlerle aktif veya kronik enfeksiyon ayrımının yapılamaması gibi nedenler, araştırmacıları moleküler tanı yöntemlerine yöneltmektedir. Diğer tanı yöntemleriyle parazitin kendisi veya

kendisine karşı oluşan antikorlar aranmakta iken moleküler tanı yöntemlerinde parazitin nükleik asit gibi çok küçük bir parçasının aranmasına yönelik tekniklerin kullanılması söz konusudur. Yani, moleküler tanı yöntemlerinde, parazite ait olan DNA parçalarının bilinen DNA molekülleriyle araştırılması söz konusudur. Klasik moleküler tanı yöntemleri, sıvı faz hibridizasyonu, katı faz hibridizasyonu ve in situ hibridizasyon olup işaretlenmiş bilinen DNA moleküllerinin özgül olan nükleotid dizisine bağlanması ve görüntülenmesi esasına dayanmaktadır.

1980'lerde ısıya dayanıklı DNA polimerazın izolasyonu ve PCR (Polymerase Chain Reaction) yönteminin geliştirilmesiyle, genetik tiplendirme, karakterizasyon, tanıma, klinik teşhis ve filogenetik analiz için bir dizi moleküler araç kullanılabilir hale gelmiştir. Böylece, nükleik asitlerin spesifik amplifikasyonuna izin veren tetkiklere olanak sağlanmıştır (Monis, 2002). Parazite ait tek bir nükleik asidi gösterebilecek kadar güçlü olan PCR yöntemi, bir nükleik asit dizisinin in vitro olarak enzimatik bir şekilde çoğaltılması olarak, yani aslında, in vitro koşullarda yapılan bir tür DNA sentezi olarak tanımlanabilir (Bardaker ve Yenidünya, 2010).

Nükleik asit amplifikasyon teknikleri arasında PCR, nükleik sekansa dayalı amplifikasyon (NASBA) ve ligaz zincir reaksiyonu (LCR) sayılabilir. 1990'larda, restriksiyon enzim analizi ve PCR'ın birleşmesiyle RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ortaya çıkmış ve araştırmalarda genotiplendirmeye ait ek bilgiler elde edilmiştir (Hide ve Tait, 1991). Bu teknik, Echinococcus'tan Cryptosporidium'a kadar birçok parazitin karakterizasyonu için kullanılmıştır (Trauba, 2005). Ayrıca, yeni türlerin bulunmasına olanak sağlayarak taksonomik açıdan da bilgi vermektedir (Lymbery ve Thompson, 2012).

Duyarlılığı ve seçiciliği yüksek olan PCR yöntemi, kompleks genomlardan seçici amplifikasyonlara olanak verir. Bu teknikte, çift sarmallı genomik DNA şablonu ısıtmayla denatüre edildikten sonra oligonükleotid primerlerin kendilerini tamamlayan dizileri hibride etmesi için sıcaklık düşürülür. Böylece, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimiyle katalizlenerek her iki uca doğru DNA sentezlenir ve çift sarmallı ürünler ortaya çıkar. Bu sentez, otomatik bir ısı döngüsünde 20-40 kez tekrarlanır. Tekrarlayan analizlerle, milyonlarca DNA kopyası oluşturulabilir (Gasser, 2006).

Parazitolojide PCR tanı amacıyla, rekombinant DNA aşısı geliştirilmesi, immünoloji ve konak-parazit etkileşimlerinin araştırılması, sekans analizi, PCR-amplifiye edilmiş genin yüksek çözünürlüklü analizi gibi birçok alanda kullanılabilir. Son zamanlarda, DNA sekansı sonucu tüm genomların analizi, moleküler epidemiyoloji ve parazit tespitindeki

duyarlılığın artırılması için kullanılmaktadır. Temel PCR dışında RFLP, nested PCR, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), MT-PCR (Multiplex Tandam PCR), RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) ve GZ-PCR (Gerçek Zamanlı PCR) gibi teknikler vardır. Parazit identifikasyon ve diferansiyasyonunda RFLP ve RAPD gibi PCR'a dayalı teknikler sıkça kullanılmaktadır. Aynı zamanda, enfekte AIDS hastalarında parazitik enfeksiyonların tespitinde, enfeksiyona parazit ve konağın cevabının gen transkripsiyon değişiklikleriyle gösterilmesinde ve aşı adaylarındaki etkinliğin ölçümünde kantitatif PCR teknikleri kullanılabilir.

Uygulamada, PCR yöntemini gerçekleştirmek için DNA kalıbı dışında, primerler (DNA polimeraz için başlangıç noktası oluşturan 20 baz uzunluğunda kısa DNA dizileri), eşit miktarda 4 DNA bloğu (Adenin, Sitozin, Timin, Guanin) içeren nükleotidler (dNTP), DNA'yı yüksek ısıda denatüre eden Taq Polimeraz enzimi, optimal çevre koşullarını sağlayan, 8,3-8,8 pH'da reaksiyon tamponu, DNA polimeraz aktivitesi için gerekli bir kofaktör olan magnezyum (NTPlerle kompleks oluşturur) ve primerlerin DNA dizisine bağlanmasını arttıran potasyum klorür gereklidir. Aslında teknik, doğadaki DNA replikasyonuna benzer şekilde işler. Üç ana aşaması, 30-40 devir boyunca tekrarlayan denatürasyon, bağlanma ve ekstansiyondur (Gasser 2006, El-Din 2013).

1.6.4.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Homolog DNA sekanslarının spesifik restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi sonucu oluşan fragmanlardaki farklılıkların belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu amaçla yeteri kadar DNA elde etmek zor ve zaman alıcı olduğu için PCR ile hedef bölge çoğaltıldıktan sonra enzim kesimi gerçekleştirilebilmektedir.

Kriminal olaylarda DNA hücresinin kaynağını bulmada veya bir bireyin hastalık evresinin saptanmasında ya da RFLP bölgeleri arasındaki rekombinasyon oranlarını ölçerek genetik haritalama yapılmasında kullanılabilir. Avantajları arasında, pahalı olmaması, dizaynının kolay olması, fazla donanımlı personel ve alete gerek olmaması sayılabilir. Dezavantajı olarak, restriksiyon enzimleri tanıma bölgesine ihtiyaç duyması, bazı enzimlerin pahalı olması, bir enzim bölgesinde birden çok varyasyonun olduğu durumlarda tam bir genotiplendirmenin yapılamaması, aynı anda birkaç personele ihtiyaç duyulabilen zamanların olması, büyük miktarlarda uygulamanın zor olması sayılabilir (Rasmussen, 2012). Bu teknik, özellikle türe spesifik varyasyonların tespitinde çok değerlidir. Ayrıca, tür identifikasyonu ve diferansiyasyonunda da çok önemlidir. Tür

diferansiyasyonunda bir enzimle kesme yeterliyken, birbirine çok yakın türlerde ise birden çok enzim gerekebilir.

Bu tür rekombinant DNA'ya dayanan tekniklerin esası, DNA'nın laboratuvar ortamında manupile edilmesine dayanmaktadır (Sözen, 2010). Bu da büyük oranda enzimlerle mümkün olmaktadır. Bakterilerden izole edilen bu enzimler, restriksiyon enzimleri olarak adlandırılır ve DNA replikasyonu, transkripsiyonu, mutasyona uğramış DNA tamiri gibi birçok göreve katılır. Üç farklı grupta toplanan restriksiyon enzimleri 1200 civarındadır ve tümü de belli bir DNA dizisini tanır. Tip I ve III enzimler DNA'yı tanıma bölgelerinin dışından kestikleri için, Tip II enzimler rekombinant DNA teknolojilerinde daha çok kullanılmaktadır. Bu enzimler genellikle 4,5 veya 6 nükleotit uzunluğunda özgün tanıma dizilerine sahiptir. Bu grup, DNA'yı tanıma bölgelerinin içinden keser ve tanıma bölgeleri genellikle palindromiktir. Bu, DNA'nın bir kolunda 5'→3' yönündeki tanıma bölgesi dizisiyle tamamlayıcı koldaki 3'→5' tanıma bölgesi dizisiyle aynıdır anlamına gelmektedir. Tek kollu uçlar 3' veya 5' şeklinde olabilir ve "yapışkan uçlar" adını alır. Bu uçlar, birbirlerini tamamladıklarından bu bölgelerden tekrar birleşme olanağına sahiptir. Bu da, rekombinant DNA teknolojileri açısından çok önemlidir (Bardakçı ve Yenidünya, 2010).

1.6.4.2. Trichomoniasis'de PCR Kullanımı

Mikroskopiye oranla daha duyarlı olan PCR teknikleri, özellikle az miktarda parazit olduğunda veya miks enfeksiyonlarda faydalı olmaktadır. Genotiplerin dağılımın tespitinde yararlı olmakla kalmaz, ilaç direnci ve tedavi kontrolünde de bu tekniklerden yararlanılabilir. Böylece, parazit enfeksiyonlarının tanı ve tedavi yaklaşımlarını belirlemek daha kolay olmaktadır. Bu teknikler, klinik laboratuvarlarda *T. vaginalis* tanısında da giderek daha fazla kullanılmaktadır. Özellikle kültürün yapılamadığı durumlarda, referans laboratuara gönderilmesi gerekli olgular ve erkek hastalarda PCR tekniği daha yararlı olmaktadır. Ayrıca, canlı olmayan paraziti, fiksatif içinde veya kısmi hasarlı sekansların tespitinde kullanılabilir.

Riley ve ark, 1982 yılında Trichomoniasis tanısında TVA5 ve TVA6 primerlerini tanımlanmıştır (Riley, 1992) Daha sonra, Real Time PCR gibi geliştirilmiş yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Duyarlılığı yüksek primerler tanımlanması, DNA'ya dayalı yöntemlerin kullanılması, parazitler konusundaki araştırmalara yeni açılımlar katmıştır. Bu teknikler arasında, PCR-hibridizasyon, PCR-polimorfizm, RFLP ve RAPD sayılabilir.

Dolayısıyla, PCR ve RFLP gibi iki tekniğin birlikte kullanılması, bir gendeki minör varyasyonları bile gösterebilecektir. Bu iki yöntemin kombinasyonu, daha hızlı, yaygın ve her tür örneğin kullanılabileceği bir yöntem olması sebebiyle giderek daha artan sıklıkta kullanılmaktadır (Stemmer, 2012).

1.7. EPİDEMİYOLOJİ

Tüm dünyada yaygın görülen bir parazittir. Her yıl 250 milyon yeni vaka olduğu bildirilmektedir (Parent 2013). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), 3,7 milyon kadın ve erkeğin enfekte olduğu düşünülmektedir.

Değişik veriler mevcut olsa da, hemen tüm ülkelerde, özellikle polikliniğe başvuran kadınlar, gebeler, AIDS'li hastalar ve çok eşli kadınlarda yüksek oranlarda *T. vaginalis*'e rastlanmaktadır. Enfeksiyon daha çok üreme çağında yaygındır. Oral kontraseptif kullananlarda daha az görülmekte ve erkeklerde daha az bulgu verdiği için değişik oranlar verilmektedir.

Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda da, olgulara ve kullanılan yöntemlere (DM, kültür, boyama yöntemleri) bağlı olarak %3-72,3 arasında değişen oranlarda *T. vaginalis* saptandığı bildirilmektedir (Ayhan N 1996, Suay A 1995, Aksoy Ü 2002). İlimizde de hastalığın görüldüğü bilinmektedir. Aydın ilinde Ertabaklar ve ark. nın yaptığı bir çalışmada 220 vajinal akıntılı kadının DM ile %5,45'inde, kültür yöntemi ile %7,27'sinde *T. vaginalis* saptamışlar (Ertabaklar 2004); yine Ertabaklar ve ark. Aydın'da yaptıkları başka bir çalışmada ise, 102 vajinal sürüntü örneğinin üçünde DM ile (%2.94), beşinde TYM besiyeri (%4.90) ile ve beşinde PCR yöntemi (%4.90) ile *T. vaginalis* tespit ettiklerini bildirmişlerdi (Ertabaklar ve ark, 2011).

1.8. KLİNİK

İnsan vücudunda en çok kadınlarda vajene, sonra da vulva ve üretraya; erkekte ise, üretra, prostat ve epididimise yerleşerek hastalığa yol açmaktadır. Yaşamı için gerekli enerjiyi, genital sistem ve vajina epitel hücrelerinden alır. Asidik olan vajen pH'sının değişik nedenlerle alkaliye dönmesi *T. vaginalis*'in üremesi için uygun ortamı oluşturur ve mukozada vajinit gelişir. Epitel hücre sitoplazmasında vakuoller, hücre içi ödem ve keratinizasyon gözlenmekte olup mukoza mozaik görünümündedir. Parazitler, mukoza

üzerinde çoğalarak epitelde dejenerasyona yol açar. Kronik vakalarda, hücrelerarası ödem oluşur, yüzeyel tabaka erozyona uğrar ve yerinden ayrılır. Parazit genellikle doku içine girmez, ancak oluşturdıkları etkiyle nekroza kadar giden değişimler yapabilir. Kadın cinsiyet daha çok etkilenirken, erkekte genellikle belirti vermez. Örneğin, uzun dönem bir ilişkide kadından erkeğe bulaşma oranı yaklaşık %50 iken, enfekte erkekten kadına bulaşma oranı %85-100 olarak bildirilmiştir (Bowden ve Garnett, 2000).

Sürüntü materyali görünümüleri; epitel hücre dejenerasyonu, kronik olgularda ileri düzeyde dejenerasyon, malignite benzeri görünüm ve arka planda klasik iltihabi görünüm, lökosit, histiyosit ve nekrotik görünüm şeklinde olabilir.

Yenidoğanlarda pnömoniye sebep olabileceği bildirilmiştir (Özcel ve Zeyrek, 2007). Enfeksiyon oluşturma ve hastalığın şiddeti, konağa ve parazite ait faktörlerle ilişkilidir. Çeşitli klinik bulgularla veya asemptomatik olarak karşımıza çıkabilmektedir. Yerleştiği bölgeye göre de bulgular ve yakınmalar değişebilmektedir. Yakınma ve bulguların şiddeti, konak immün yanıtına da bağlıdır. Hormon düzeyleri, vajen florası, parazit miktarı ve suşun türünün de önemli olduğu düşünülmektedir. İnkübasyon süresi, 4-28 gün arasında değişmektedir. Genellikle, genital sistem skuamöz epitelini enfekte eder.

Akut enfeksiyonda, diffüz vajinit görülmektedir. Bol miktarda, sarı-yeşil, köpüklü ve mukopürülan bir akıntı mevcuttur. Belirtiler menstrüasyon dönemlerinde şiddetlenir.

Kronik enfeksiyonda belirtiler orta şiddetli olup kaşıntı, disparoni ve az miktarda mukuslu akıntı görülebilmektedir. Bu tür enfeksiyonun önemi, toplumda bu vakaların bulaş kaynağı olmasındadır.

Semptomsuz da olabilmektedir. Bu tür hastalar atlanabilmektedir, ancak bunların yarıya yakını da altı ay içinde semptomatik hale gelebilmektedir.

Vajinit en sık belirti iken vajen mukozasının ağaç çileği manzarasında olması çok az kadında saptanmaktadır. Bartolin bezleri nadiren enfekte olurken adneksit, salpenjit, endometrit, infertilite, düşük doğum ağırlığı, servikal erozyon gibi komplikasyonlar görülebilmekte olup HIV bulaş riskini arttırdığı da belirtilmektedir (Crucitti, 2008). Özellikle HIV (Human Immunodeficiency Virus) Tip I'in geçişini ve HIV ile enfekte hamilelerde lökosit ve makrofajları arttırarak bebeğin enfekte olma riskini arttırdığı bildirilmektedir (McClelland 2007, Sorvillo 2001, Sorvillo 1998). Ayrıca pelvik inflamatuvar hastalık ve tubal infertilite riskini arttırdığı düşünülmektedir (Cates 1993, Wilkinson 1999). Trichomoniasisin erken doğum ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin doğmasına da neden olduğu düşünülmektedir (Pastorek 1996, Cotch 1998).

Erkeklerin birçoğunda hastalık asemptomatik seyrederken genelde üretra, epididim veya prostata yerleşmesi nedeniyle prostatit, epididimit, üretrit belirtileri görülebilir. Penisten gelen beyaz akıntıda akla gelmelidir. Asemptomatik seyretmesi, bulaş açısından çok önemlidir. Akut hastalık görünümü pürülan bir üretrittir. Akıntı, dizüri, kaşıntı ve cinsel ilişki sonrası yanma görülebilir. Orta şiddetteki semptomatik hastalık, diğer üretritlerden ayrılmalıdır. Erkeklerdeki komplikasyonlar arasında, prostatit, epididimit ve infertilite sayılabilir.

İnfertilite, pelvik inflamatuvar hastalık, servikal ve prostat kanser gibi komplikasyonlarının da bulunduğu bildirilmektedir (Ibanez-Escribano, 2014).

1.9. TEDAVİ

Eşlerin birlikte tedavi edilmesi gerekmektedir. Nitroimidazol türevleri, en etkili ilaç grubudur. İlk tercih, metranidazoldür. Protozoaya pasif difüzyonla penetre olan ilaç, hücre içinde serbest radikallere dönüşerek hücre DNA'sına bağlanır. Böylece DNA replikasyonunu durdurarak hücre ölümüne neden olur. Oral alındığında tüm doku ve sıvılara geçer, karaciğerde metabolize edilir, safra ve idrarla atılır. Karaciğer yetmezliği olanlar ve hamilelerde dikkatli kullanılmalıdır. Yan etkileri arasında, bulantı, ağızda metalik tat, kusma, periferik nöropati, koordinasyon bozuklukları, baş dönmesi, baş ağrısı, karın ağrısı ve kramplar sayılabilir. Yedi günlük, günde iki kez 500mg veya günde üç defa 250'şer mg doz Metronidazol tedavisi önerilmektedir.

Seknidazol, bir diğer tercih edilen ilaçtır. Yan etkisi daha az görülmekle birlikte etki mekanizması metronidazol gibidir. Tek doz 500mg dört adet alınması bir diğer avantajıdır. Çocuklarda da 30mg/kg tek doz tercih edilmektedir. Bulantı nadiren görülebilir. Yine gebelikte ve emzirme sırasında kullanılmamalıdır. Warfarin tedavisi sırasında ve alkolle birlikte alınması da sakıncalıdır. Gebelerde, tek doz tedavi veya vajinal klotrimazol tedavisi uygulamasının sakıncalı olmayabileceği belirtilmektedir (CDC, 2010). Yine HIV'li hastalarda yedi günlük günde iki kez 500'er mg'lık Metranidazol tedavisi önerilmektedir. Neonatal enfeksiyonda ise, anneden geçen östrojenin etkisiyle tablonun oluştuğu, 3-6 hafta içinde enfeksiyonun gerilediği, ancak 6 haftadan uzun süren enfeksiyonlarda ilaç tedavisine gerek duyulduğu bildirilmektedir (Aksoy ve Özkoç, 2005).

Tinidazol ve ornidazol gibi ilaçlar da ikinci seçenek olarak kullanılabilir. İnatçı, tekrarlayan enfeksiyonlarda, metranidazolün vajinal klotrimazol gibi ilaçlarla kombinasyonu yararlı olabilir. Amfoterisin B türevi olan ve Hindistan'da kullanılan hamisin adı verilen organik bir bileşiğin metronidazol dirençli olgularda etkili olduğu

bildirilmektedir (Aksoy ve Özkoç, 2005). Yüksek doz oral ve vajinal tinidazol tedavisinin en az metranidazol kadar etkili olduğu ve metranidazol dirençli olgularda yüz güldürücü sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Sobel 2001). Paramomisin vajinal preparat, furazolidon ve mebendazol gibi ilaçlar da trichomoniasis tedavisinde kullanılabilecek diğer ilaçlar arasında sayılabilir.

Tedaviden sonra üçüncü ayda, hastaların tekrar kontrole çağırılması ve reenfeksiyon açısından incelenmesi önerilmektedir (CDC, 2010).

1.9.1. Metronidazol Direnci ve Aktin Geni

Trichomoniasis olgularında, 1962'den beri metronidazol'e direnç bildirilmektedir (Edwards 1993, Lossick 1996, Dombrowski 1987, Poppe 2001). *T. vaginalis* izolatlarının %2,5-5'inin metronidazole karşı değişen derecelerde direnci olduğu bildirilmektedir (Schwebke ve Burgess, 2004). Aktin proteini, sitoskeletonun ana komponenti olup, hücresel mobilite ve interaksiyonda önemli bir role sahiptir. Flagellattan ameboid forma dönüş gibi değişiklikler ve yüzey adezyonu bundan etkilenmektedir. Denebilir ki, Aktin proteini, prazitin biyolojik özelliklerinin varyasyonu ile ilgilidir. Çalışmalar, *T. vaginalis*'in genetik olarak çok çeşitli olduğunu göstermektedir. Aktinin ilaç direncinde etkisi olabileceği, dolayısıyla bu konuda yapılan çalışmalarda ayırıcı bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (Matini, 2014).

1.10. KORUNMA

Hastalık kaynağının enfekte kişiler olması nedeniyle korunma açısından kişisel önlemlerin etkisi büyüktür. Bunların arasında, cinsel yolla bulaşan hastalıkların korunmasında etkili kondom gibi yöntemlerin kullanılması, enfekte kişilerin eş ve partnerlerinin de tedavisi, akıntı görüldüğünde doktora başvurulması, kullanılan tuvalet, eşya ve kişisel malzemelerin temiz olması, havuzların temizlenmesi ve klorlanması sayılabilir. Kişisel korunma dışında, hekim ve sağlık personelinin bilgilendirilmesi, akıntı görüldüğünde trichomonas yönünden de araştırılması, halkın bilgilendirilmesi, genelev gibi yerlerde çalışan kişilerin düzenli kontrolü gibi önlemler alınması, hastalığın kontrolünde önemlidir.

Trichomonas vaginalis'e karşı çok çeşitli umut verici aşı çalışmaları olsa da, henüz etkili bir aşı bulunamamıştır (Ertabaklar ve Ertuğ, 2007).

1.11. AMAÇ

Tüm dünyada kozmopolit olarak görülen ve önemli sağlık sorunlarına neden olduğu bilinen *Trichomonas vaginalis*'in klinik, prognoz ve virulans, direnç açısından çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Ancak, bu çeşitliliğin nedenlerine yönelik yapılan çalışmalar fikir vermekle birlikte tam olarak açıklık kazanamamıştır. Bu çalışmada ilimizde vajinitli olgulardan izole edilen *Trichomonas vaginalis* örneklerinde aktin gen bölgesi kullanılarak PCR-RFLP ile moleküler tiplendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışma ülkemizde bu konuda yapılmış ilk araştırma olup ayrıca dünya literatüründeki çok az çalışmadan biridir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. İzolatlar

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda daha önce vajinitli olgulardan TYM besiyerinde izole edilerek -80°C'de saklanan 20 adet *T. vaginalis* izolatu kullanılmıştır. Elde edilen parazitler 1000-1500 devirde santrifüj edilerek PBS ile yıkandı ve elde edilen pellet -20°C'de DNA izolasyonu için saklandı.

2.2. DNA İzolasyonu

T. vaginalis genomik DNA'sı saklanan örneklerden High Pure PCR Template Preparation kiti (Roche Applied Science) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de Tris-EDTA solüsyonunda saklanmıştır.

2.3. *T. vaginalis* Aktin Genininin PCR ile Çoğaltılması

T.vaginalis Aktin geninin 1100 bp lik kısmı Nested-PCR yöntemiyle çoğaltıldı.

Reaksiyonlarda dış primer (OPs) olarak Tv8S, Tv9R ve iç primer (IPs) olarak da Tv10S, Tv11R kullanılmıştır.

Expand High Fidelity PCR System "Roche Life Science" kullanılarak Techne (TC-312) cihazında yapılan PCR karışımları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

I. PCR, bir örnek için 40 µl toplam hacimde:

	Stok	Final	Hacim
PCR Buffer (-MgCl ₂)	10X	X	4,00 µl
MgCl ₂	25 mM	3 mM	4,80 µl
dNTPs (Thermo Scientific)	25 mM	0,28 µM	0,45 µl
Primer Tv8S	10 µM	0,3 µM	1,20 µl
Primer Tv9R	10 µM	0,3 µM	1,20 µl
Taq polimeraz	3,5 U/µl	1,7 U	0,49 µl
Kalıp DNA			10 µl
Su (PCR grade)			17,87 µl
Toplam			40 µl

II. PCR, bir örnek için 50 µl toplam hacimde:

	Stok	Final	Hacim
PCR Buffer	10X	X	5,00 µl
MgCl ₂	25 mM	3 mM	6,00 µl
dNTPs (Thermo Scientific)	25 mM	0,28 µM	0,56 µl
Primer Tv10S	10 µM	0,3 µM	1,50 µl
Primer Tv11R	10 µM	0,3 µM	1,50 µl
Taq polimeraz	3,5 U/µl	1,7 U	0,49 µl
Kalıp DNA (I. PCR ürünü)			1 µl
Su (PCR grade)			33,95 µl
Toplam			50 µl

Reaksiyonlarda kullanılan OPs: Tv8S, Tv9R ve iç primerler IPs: Tv10S, Tv11R sekansları aşağıda verilmiştir.

Tv8S	5'-TCTGGAATGGCTGAAGAAGACG-3'
Tv9R	5'-CAGGGTACATCGTATTGGTC-3'
Tv10S	5'-CAGACACTCGTTATCG-3'
Tv11R	5'-CGGTGAACGATGGATG-3'

I. PCR için ön denatürasyon aşaması 95°C'de 5 dk, 10 döngü (94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn ve 72°C'de üç dk), final ekstensiyon ise 7 dk 72°C olarak ayarlanmıştır.

II. PCR için ön denatürasyon aşaması 95°C'de 5 dk, 30 döngü (94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn ve 72°C'de 3 dk 30 sn), final ekstensiyon ise 7 dk 72°C olarak ayarlanmıştır.

2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Nested PCR ile elde edilen ürünleri fenol- kloroform-izoamil alkol ve tuz ile çöktürme yöntemleriyle saflaştırıldı. İki ayrı reaksiyondan elde edilen II. PCR ürünleri mikrosantrifüj tüpünde toplandı ve elde edilen yaklaşık 100 µl ürüne aşağıdaki protokol uygulandı.

1. 1:1 oranında Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklendi.
2. 13.000 g de 5 dk santrifüj (Hettich Universal model 320 R) yapıldı.
3. Üst faz yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı.
4. 1:10 oranında KCH₃COO ve 1:1 isopropanol eklenerek vortekslendi.
5. Karışım -20°C'de bir gece bırakıldı.
6. Ertesi gün +4°C 'de 15 dk 15000g de santrifüj edildi.
7. Süpernatant pipetle alındıktan sonra pellete 200 µl %70 soğuk etanol eklendi ve karıştırıldı.
8. Maksimum hızda (15000g) +4°C 'de 15 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler bir gece oda sıcaklığında bırakıldı.
10. Ertesi gün 40 µl distile su ile ampikonlar çözüldü.

Saflaştırma sonrası elde edilen DNA örnekleri %3'lük agaroz jelde 100 V'da 45 dk yürütülmüş ve Infinity, Vilber Lourmat sistem ile görüntülenmiştir.

2.5. Restriksiyon Enzimleriyle Kesim

Saflaştırılan PCR ürünleri bekletilmeden aynı gün HindII (Thermo Scientific), MseI (Thermo Scientific) ve RsaI (Thermo Scientific, Fast Digest) enzimleriyle ayrı ayrı kesilmiştir. Tüm enzimlerde 1 saat inkübasyon yapılmış, ancak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda HindII ve RsaI 37°C’de, MseI enzim kesimi 65°C’de yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan enzimler ve özellikleri aşağıdadır:

Restriksiyon enzimi	Tanıdığı ve kestiği bölge
HincII (HindII)	5'...G T Y↓R A C...3' 3'...C A R↑Y T G...5'
MseI	5'-T↓TA A-3' 3'-A AT↑T-5'
RsaI	5'...G T↓A C...3' 3'...C A↑T G...5'

Bu aşamada kullanılan enzim ve diğer maddelerin miktarları aşağıda verilmiştir.

	Hacim
Enzim	1 µl
Enzim tamponu (10X)	2 µl
PCR ürünü	15 µl
dH ₂ O	2 µl
Toplam	20 µl

2.6. Sonuçların Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve RFLP Paternlerinin Belirlenmesi

Restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jelde 90 V'da 45 dk yürütülmüş ve Infinity, Vilber Lourmat sistem ile görüntülenmiştir. Bantların tahmini boyutları standart markerlara göre belirlenmiştir. Agaroz jel görüntülerine göre genotipler Crucitti ve ark.'nın bildirdiği tabloya göre belirlenmiştir.

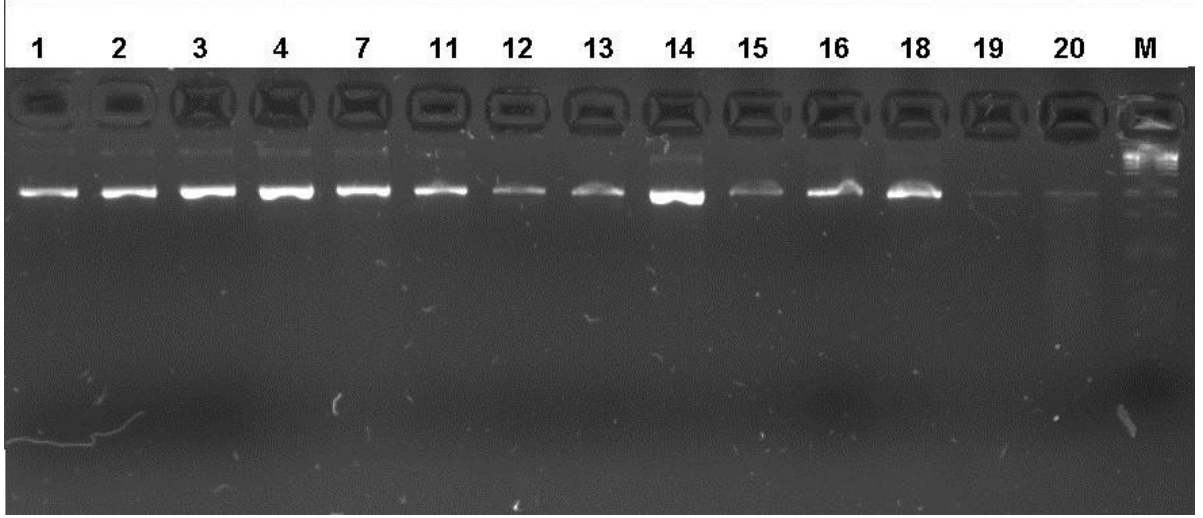
2.7. Sekanslama ve Analiz

İkinci PCR ürünlerinden 17 tanesi purifikasyon ve sekanslama için MedSanTek (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Sekanslama işlemi Tv10S ve Tv11R primerleriyle iki yönlü olarak yaptırılmıştır. Elde edilen sekanslar Bioedit (Ibis Biosciences) programı ClustalX (Thompson 1997) yazılımı ile alignment yapılarak aynı uzunluğa getirilmiş ve çalışmamızdaki referans olan Aktin geni (AF237734) ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca RFLP ile genotipi belirlenemeyen örneklerin sekansları <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php> (NewEngland Biolabs) web sitesine girilmiş ve kesim ürünleri sekansa göre araştırılmıştır (Vincze 2003).

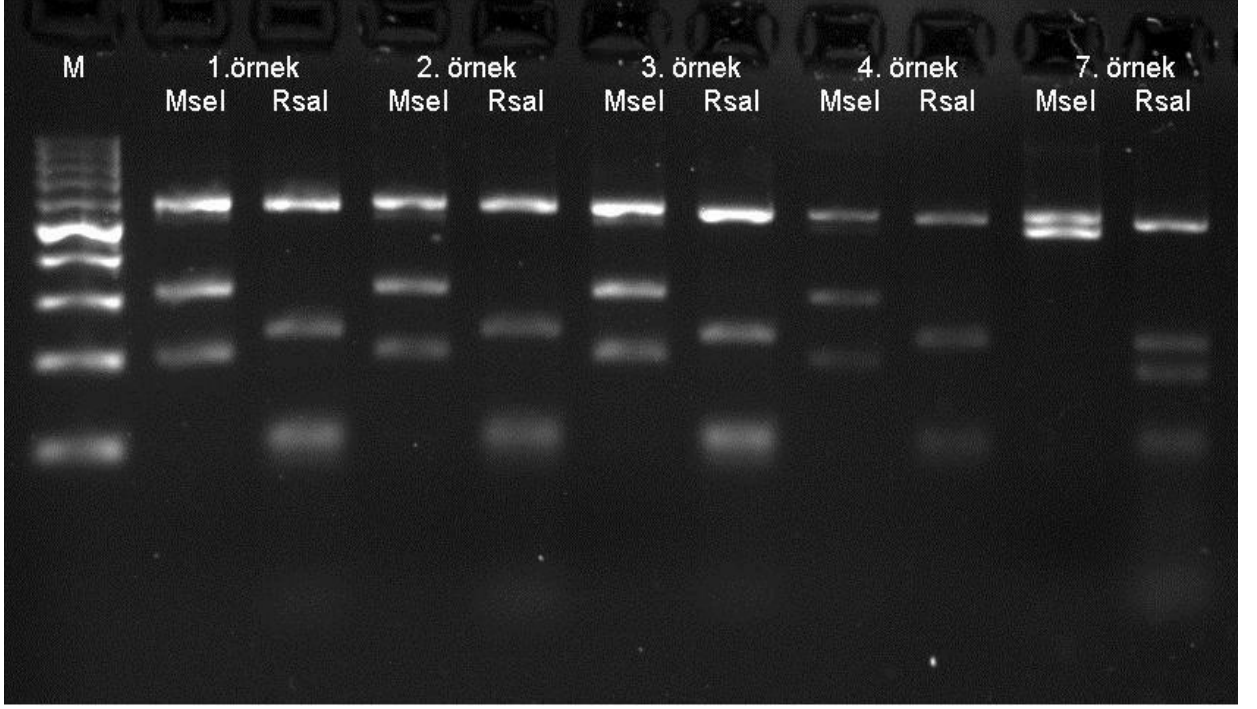
3. BULGULAR

3.1. PCR ve RFLP bulguları

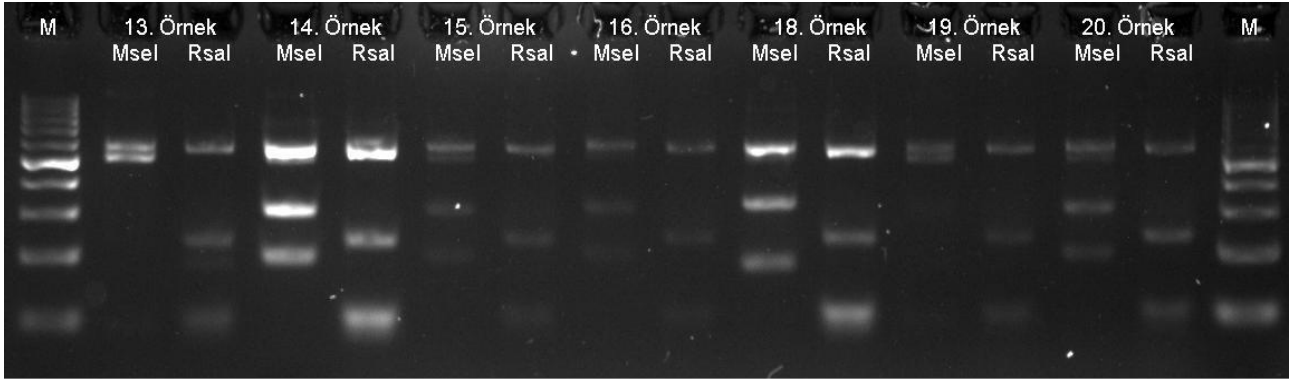
Yirmi örnekten elde edilen Nested PCR ürünleri fenol-kloroform izoamil alkol ve tuzla çöktürme yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra, HindII, MseI ve RsaI enzimleriyle kesilmiştir. Örneklerden elde edilen bantlara ait jel görüntüleri Şekil 3-11’de verilmiştir.



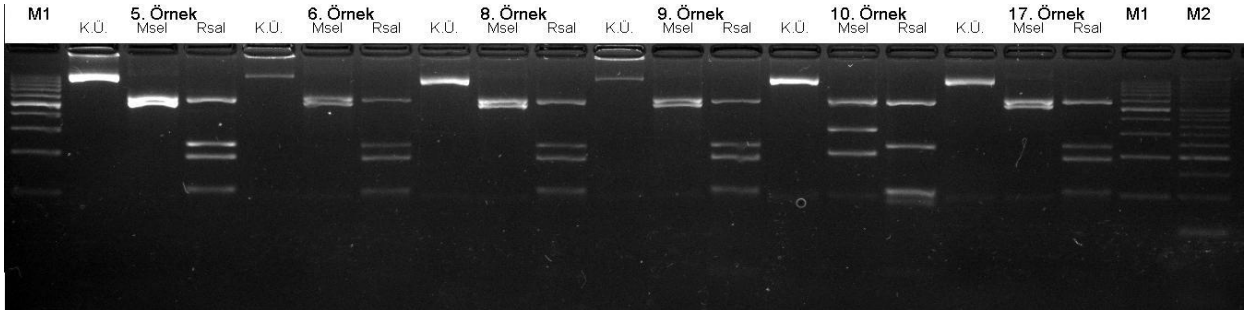
Şekil 3. Örnek numaraları 1-4, 7, 11-16, 18-20 olan izolatların saflaştırma sonrası jel görüntüsü (%2 agaroz Jel, 90 V, 30 dk)



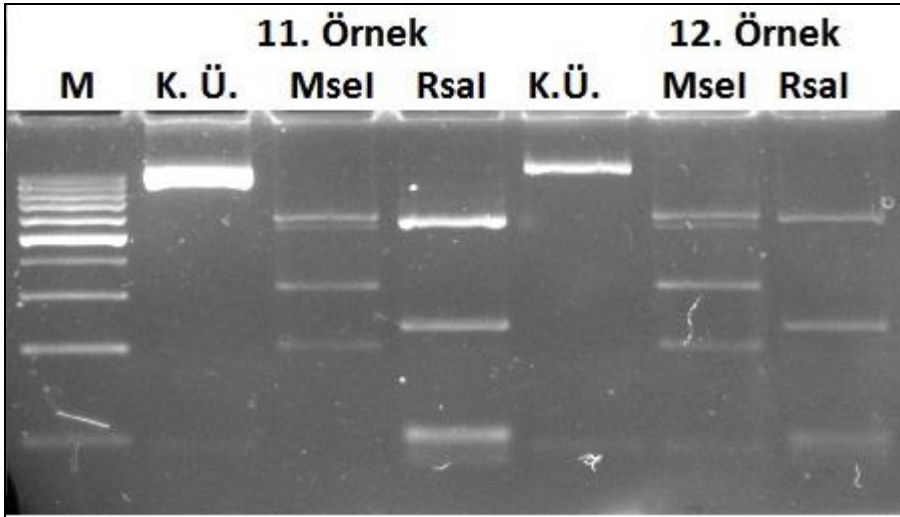
Şekil 4. Örnek numarası 1-4, 7 olan PCR ürünlerinin MseI ve RsaI enzimleriyle kesimiyle elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (%3 agaroz Jel, 90 V, 45 dk, M: 100bp (Fermentas))



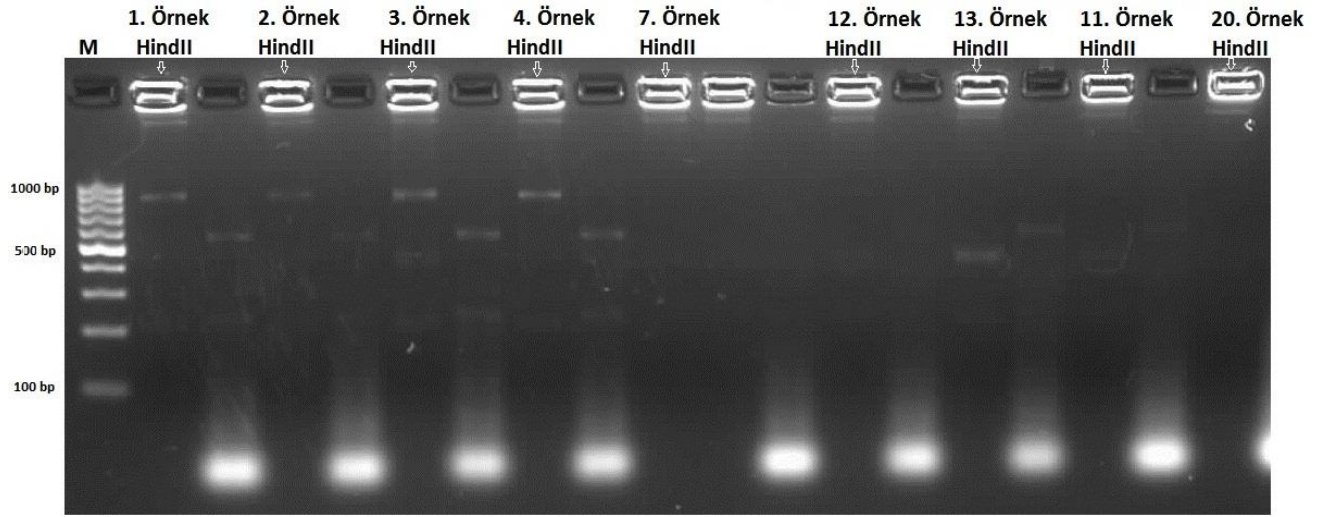
Şekil 5. Örnek numarası 13-16, 18-20'ye ait PCR ürünlerinin MseI ve RsaI enzimleriyle kesimiyle elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (%3 agaroz Jel, 90 V, 45 dk, M: 100bp (Fermentas))



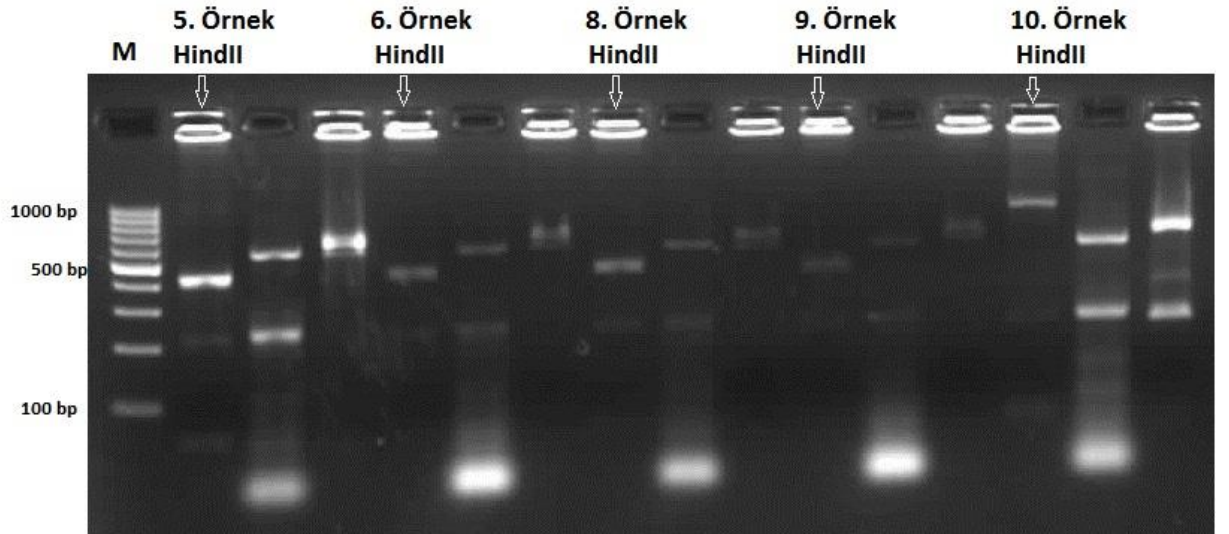
Şekil 6. Örnek numarası 5, 6, 8-10, 17 olan PCR ürünlerinin kesim öncesi bantları ve MseI ve RsaI enzimleriyle kesimiyle elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (%3 agaroz Jel, 90 V, 45 dk, KÜ: Kesilmemiş PCR ürünü, M1: 100bp (Fermentas), M2: 50 bp)



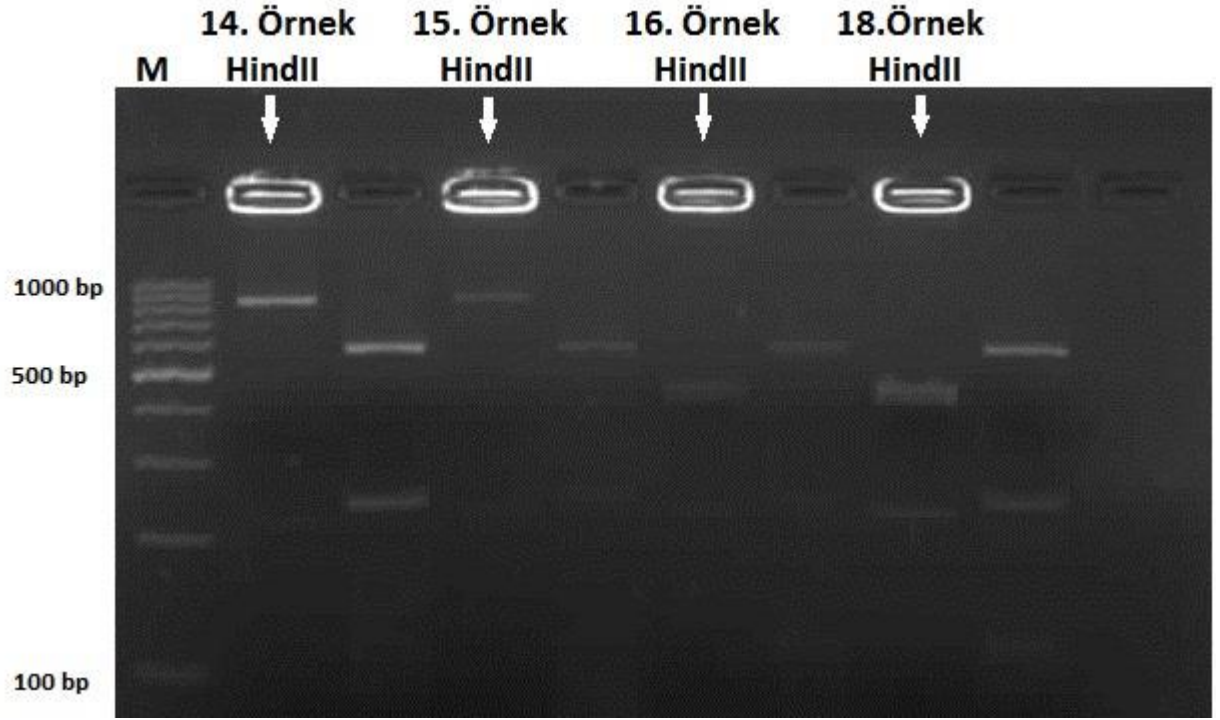
Şekil 7. Örnek 11 ve 12'ye ait PCR ürünlerinin kesim öncesi bantları ve MseI ve RsaI enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (%3 agaroz Jel, 90 V, 45 dk, KÜ: Kesilmemiş PCR ürünü, M: 100bp (Fermentas))



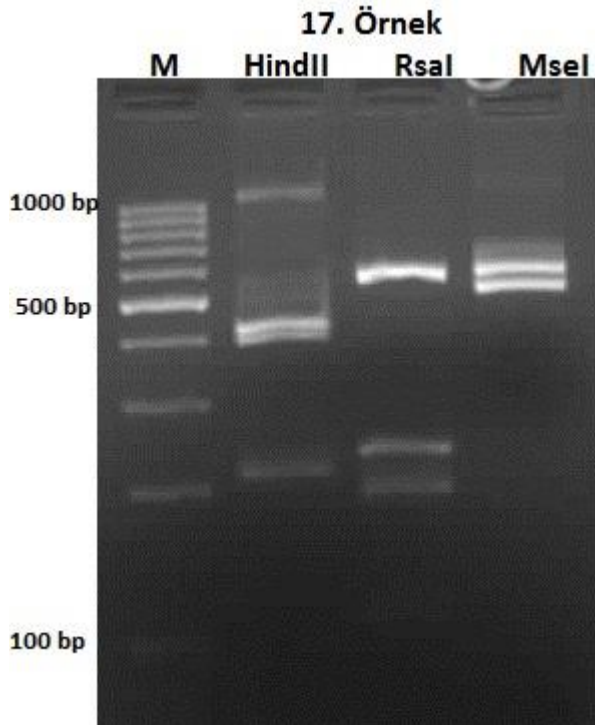
Şekil 8. Numarası 1-4, 7, 12, 13, 11, 20 olan örneklerin HindII enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (M: 100bp (Fermentas))



Şekil 9. Örnek 5, 6, 8-10'un HindII enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (M: 100bp (Fermentas))



Şekil 10. Numarası 14-16, 18 olan örneklerin HindII enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (M: 100bp (Fermentas))



Şekil 11. Onyedinci numaralı örneğin HindII, RsaI ve MseI enzimiyle kesimi sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü (M: 100bp (Fermentas))

İzolatların Aktin gen bölgesine yönelik PCR-RFLP ile genotipleri değerlendirilmiştir. Ayrıntılı bant paternleri detaylı olarak Tablo 1’de verilmiştir. Örneklerin 16 tanesinin (%80) mevcut paternlere göre genotipleri belirlenebilmiştir. Bunlardan altı tanesi Genotip E, altı tanesi Genotip G ve bir tanesi Genotip H olarak bulunmuştur. Bazı örneklerde mevcut paternlere uymayan yeni paternler saptanmış olup Y1 ve Y2 olarak adlandırılmıştır. Bir örnek Genotip H ve Genotip Y1, bir örnek de Genotip E ve Genotip Y2 olarak değerlendirilmiştir. Bir örnek ise Genotip A veya Genotip G olabileceği düşünülmüştür. Kalan iki örnek ise genotiplendirilememiştir (Tablo 2).

HindII enzimiyle kesim sonucu bant görülmeyen ve MseI ile kesim sonucu birden fazla paterne ait bant saptanan örneklerin sekans verileri kullanılarak tüm enzimlerle tekrar değerlendirilmesi Tablo 4’de verilmiştir. Bu verilere göre yedinci örnek Genotip G, 11 ve 12. örnek Genotip H olarak değerlendirilmiştir. Onbeş ve 16. örneklerde RsaI enzim kesim ürününü mevcut paternlere tam olarak uymadığı için genotipi değerlendirilememiştir. Referans sekans EU076586’un, 15 ve 16. örneklerin RsaI ile kesimi Şekil 12,13 ve 14’de verilmiştir. Ondokuz ve yirmi numaralı örneklerin sekans verisi bulunmadığından değerlendirmeye alınamamıştır.

Tablo 1. Enzim kesimlerine göre örneklerin ayrıntılı paternleri

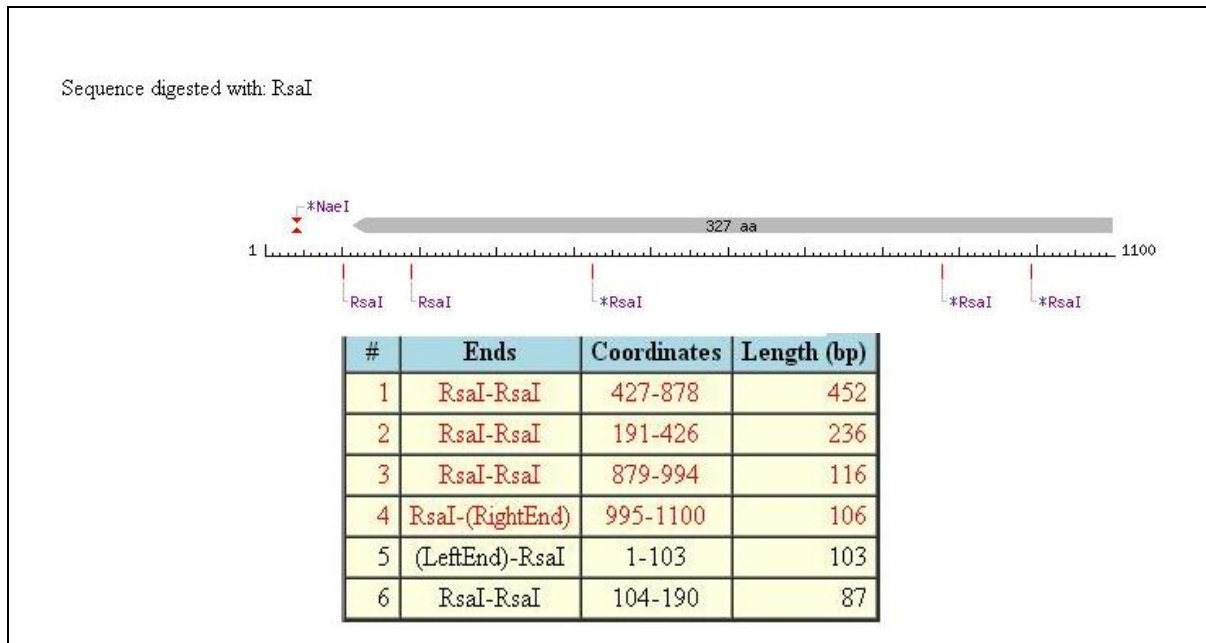
HindIII ile kesim		HindIII		Msel ile kesim				Msel				Rsal ile kesim				Rsal																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
-------------------	--	---------	--	----------------	--	--	--	------	--	--	--	----------------	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tablo 2. Örneklerin PCR-RFLP'ye göre genotipleri

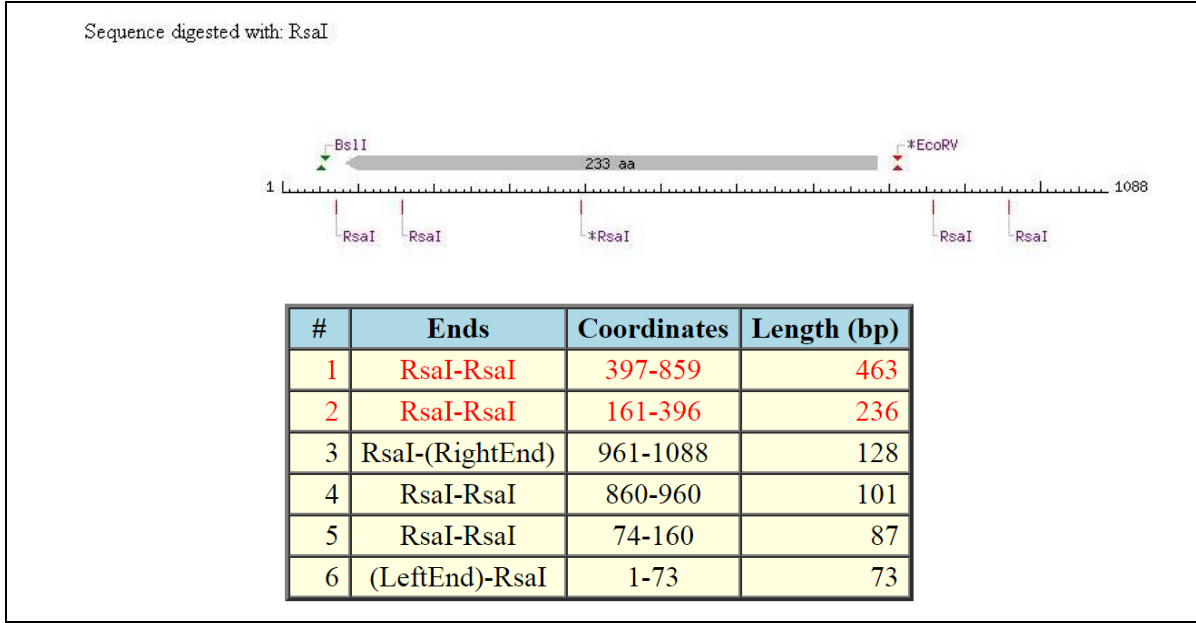
Referans	HindII	MseI	RsaI	Genotip
	1	1	1	A
	1	2	2	E
	2	1	1	G
	2	1	2	H
	2	1	3	I
	2	3	1	M
	2	3	2	N
	2	3	4	P
Örnek No.				
1	1	2	2	E
2	1	2	2	E
3	1	2	2	E
4	1	2	2	E
5	2	1	1	G
6	2	1	1	G
7		1	1	A veya G
8	2	1	1	G
9	2	1	1	G
10	1	2	2	E
11	2	1-2	2	H ve Y1*
12		1-2	2	Değerlendirilemedi
13	2	1	1	G
14	1	2	2	E
15	1	1-2	2	E ve Y2**
16	2	2	2	Y2**
17	2	1	1	G
18	2	2	2	Y2**
19		1	2	H
20		1-2	2	Değerlendirilemedi
* Y1=2-2-2 paterni				
**Y2 =1-1-2 paterni				

Tablo 3. Örnek 7, 11, 12,15 ve 16’nın sekans verilerine göre enzim kesim paternleri ve genotipleri

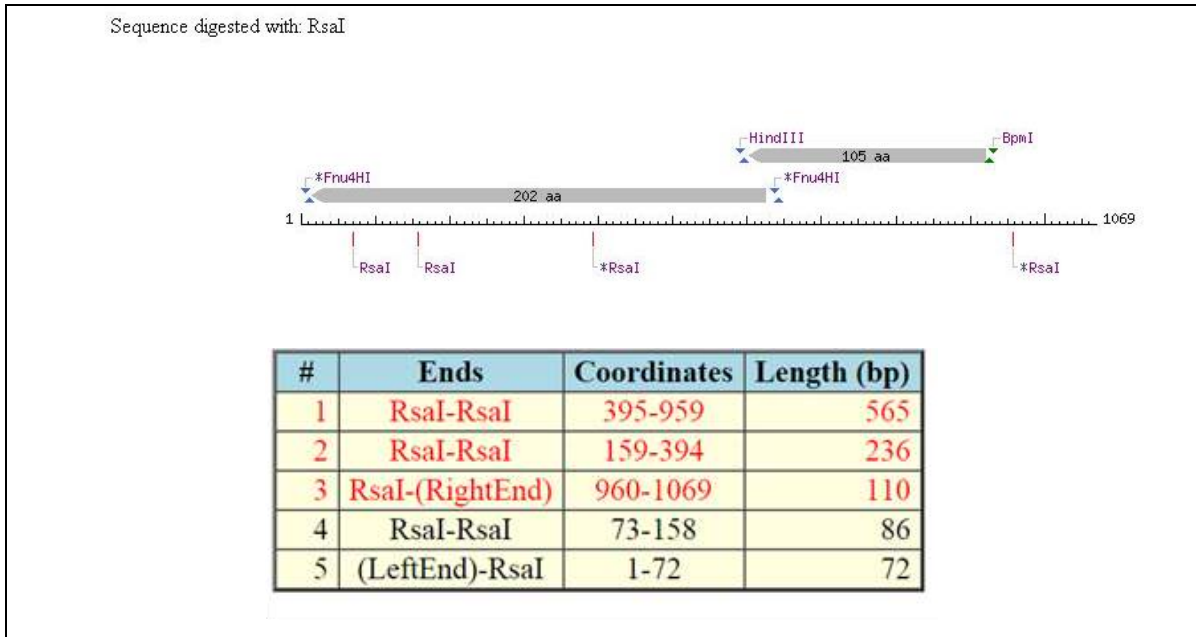
	HindII	MseI	RsaI	Genotip
7. Örnek	2	1	1	G
11. Örnek	2	1	2	H
12. Örnek	2	1	2	H
15. Örnek	1	2	*	
16. Örnek	1	1	*	
* Sekans verisi iyi olmağı için değerlendirilememiştir				



Şekil 12. Referans sekansın <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php> yazılımı kullanılarak RsaI ile kesim sonucu



Şekil 13. Numarası 15 olan örneğin <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php> yazılımı kullanılarak RsaI ile kesim sonucu



Şekil 14. Numarası 16 olan örneğin <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php> yazılımı kullanılarak RsaI ile kesim sonucu

On beş örneğe ait sekans verileri Crucitti ve ark tarafından GenBank'a girilmiş *T.vaginalis* Aktin genine (EU076586) göre dizilimi aşağıda verilmiştir. Sekanslar BLAST analizi yapıldığında *T.vaginalis* Aktin geni ile %98 ve/veya %99 benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Tablo 4. Sekans sonuçları

						
	5	15	25	35	45	55
EU076586	CAGACACTCG	TTATCGATAA	CGGCTCTGGT	ATGTGCAAGG	CCGGCTTCTC	TGGCGATGAA
3_	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGCGATGAA
4_	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGAA
5	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGAA
6	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGAA
7	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGA-
8	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGAA
9	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTG-TGGA
10	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGAA
11	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGCGATGA-
12	-----	-----	-----	-----	-----C	TGACGATGAA
13	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGCGATGGA
14	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGGA
15	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGCGATGGA
16	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTGATGAA
17	-----	-----	-----	-----	-----C	TGGTG-TGGG
						
	65	75	85	95	105	115
EU076586	GCCCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGCCCA	AAGTACAAAC	AACAATTAGT
3_	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGC-GACCA	AAGTACAAAC	AACAATTAGT
4_	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAGTACAAAC	AACAATTAGT
5	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAATACAAAC	AACAATTAGT
6	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAATACAAAC	AACAATTAGT
7	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAATACAAAC	AACAATTAGT
8	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAATACAAAC	AACAATTAGT
9	GCTCCACGCT	TGTGTTTTCC	CATCCGTTGT	TGGCAGTCCA	AATAC-AAAC	TACAATTAGC
10	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAGTACAAAC	AACAATTAGT
11	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCATCGT	TCACCGACCA	AAGTACAAAT	AACGCTTAGC
12	GCCCCACGCT	CTGT-TT--C	CATCCAGTGT	TGGCCGTCCA	AAGTACAAAC	A-CAATTAGT
13	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTCGT	TCACCGACCA	A-GTCCTAAT	TACAATTAGC
14	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAGTACAAAC	AACAATTAGT
15	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTGGT	TGGC-GACCA	AAGTACAAAT	AACAATTAGC
16	GCTCCACGCT	CTGT-TTTCC	CATCCGTTGT	TGGC-GACCA	AAGTACAAAC	AACAATTAGC
17	GCCCCACGCT	CTGTATTTC	CATCCGTTGT	TGGCCGTCCA	AAGGCCAAAC	TACAATTAGC
						
	125	135	145	155	165	175
EU076586	TGGTGGCAAC	GCCAAGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
3_	TGGTGGCAAC	GCCTAGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
4_	TGGTGGCAAC	GCCTTGAATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGGGTCTT
5	TGGTGGCAAC	GCCTAGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
6	TGGTGGCAAC	GCCT-GGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
7	TGGTGGCAAC	GCCA-GGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
8	TGGTGGCAAC	GCCTTGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
9	TGGTGG-GAC	GCCT-TGATG	TTTTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TG-TCCAAGG	CTGGTGTCTT
10	TGGTGGCAAC	GCCTAGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
11	TGGTGGCAAC	GCCT-TGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGTGCCAAGG	CTGGTGTCTT
12	TGGTGGCGAC	GCCAAGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTG-TGTCTT
13	TGGTGGGAAC	ATCTTGATGT	TCATTGTTGG	TGATGAAGCT	TG-TGTGATT	TCCTTGTCTT
14	TGGTGGCAAC	GCCTAGGATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCAAGG	CTGGTGTCTT
15	TGGTGGCAAC	GCCTTGGATG	TCATCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCATGG	CTGGTGTCTT
16	TGGTGGCAAC	GCCTTGAATG	TCTTCGTCGG	TGATGAAGCT	TGCTCCA-GG	CTGGGGTCTT
17	TGGTGGCAAG	GCCT-GAATG	TTTTTCGTCGG	TG-TGAAGCT	TG-TGTAAGG	CTGGTGTCTT
						
	185	195	205	215	225	235
EU076586	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
3_	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
4_	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGAAATGAT	AT-GGAAAAG
5	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
6	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGAA-TGAT	AT-GGAAAAG

7	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
8	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGAA-TGAT	AT-GGAAAAG
9	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGAA-TGAT	AT-GGAAAAG
10	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
11	CCTCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	CGTCAACAAC	TGGAA-TGAT	AT-GGAAAAG
12	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
13	CCTCCTCAAG	TACGCAATTG	AACACTGTTT	CGCCAACAAC	TAGAA-TGAT	GTTAGAAAAG
14	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
15	CCTCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGAA-TGAT	AT-GGAAAAG
16	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAT	TGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG
17	CATCCTCAAG	TACCCAATTG	AACACGGTAG	CGTCAACAAC	TGGGA-TGAT	AT-GGAAAAG

						
	245	255	265	275	285	295
EU076586	ATCTGGCACC	ACACATTTTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
3_	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
4	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
5	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
6	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
7	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
8	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
9	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CATCGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
10	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
11	ATCTGGCACC	ACAAATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
12	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
13	ATCTTCCTTC	CCAACCTCGA	TATCGAACTT	CGTGATGACG	CCGCAGAGCG	CCCTGTTCTT
14	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
15	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
16	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCTT
17	ATCTGGCACC	ACACATTCTA	CAACGAACTT	CGTGTGACC	CAACAGAGCA	CCCAGTTCAT

						
	305	315	325	335	345	355
EU076586	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
3_	CTTACAGAAG	CCCCACTTAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
4	CTTACAGAAG	CCCCACTTAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
5	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
6	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
7	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
8	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
9	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
10	CTTACAGAAG	CCCCACTTAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
11	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
12	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
13	CTTATCGAAG	CCCATATCAA	CCAAGAGTCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
14	CTTACAGAAG	CCCCACTTAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
15	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAGAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
16	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAAAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC
17	CTTACAGAAG	CCCCACTCAA	CCCAGAGGCT	AACCGTGAGA	AAATGATCTC	CCTCATGTTC

						
	365	375	385	395	405	415
EU076586	GACACATTCA	ACGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
3_	GACACATTCA	ACGCCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
4	GACACATTCA	ACGCCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
5	GACACATTCA	ACGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
6	GACACATTCA	ATGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
7	GACACATTCA	ATGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
8	GACACATTCA	ATGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
9	GACACATTCA	ATGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
10	GACACATTCA	ACGCCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
11	GACACATTCA	ACGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
12	GACACATTCA	ACGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
13	GACACATTCA	AAGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATACAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
14	GACACATTCA	ACGCCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
15	GACACATTCA	ACGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
16	GACACATTCA	ACGCCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC
17	GACACATTCA	ATGTCCCATC	CTTCTATGTC	GGCATCCAGG	CTGTTCTTTT	CCTCTACTCC

						
	425	435	445	455	465	475
EU076586	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
3_	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
4_	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
5	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
6	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
7	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
8	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
9	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
10	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
11	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
12	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
13	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
14	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
15	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
16	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA
17	TCTGGCCGTA	CAACAGGTAT	CGTTTTTCGAT	GCTGGTGATG	GTGTTTCCCA	CACAGTTCCA

						
	485	495	505	515	525	535
EU076586	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
3_	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
4_	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
5	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
6	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
7	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
8	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
9	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
10	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
11	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
12	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
13	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
14	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
15	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
16	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT
17	ATTTACGAAG	GCTACTCCCT	TCCACACGCC	ATCATGAGAC	TTAACCTCGC	TGGCCGTGAT

						
	545	555	565	575	585	595
EU076586	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
3_	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
4_	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
5	CTTACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
6	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
7	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
8	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
9	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
10	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
11	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
12	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
13	CTCACAGCCT	GAATGTCCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
14	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
15	CTCACAGCCT	GGATGGCCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGGA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
16	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC
17	CTCACAGCCT	GGATGGTCAA	GCTTCTCACA	GAGCGTGGCA	ATGCTTTCAA	CACAACAGCC

						
	605	615	625	635	645	655
EU076586	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
3_	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
4_	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
5	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
6	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
7	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
8	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
9	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA

10	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
11	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
12	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
13	GATAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGACGCCC	TCGACTTCGA
14	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
15	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGACGCCC-	TCGACTTCGA
16	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCGCCC-	TCGACTTCGA
17	GAAAAGGAAA	TCGTTTCGTGA	CATCAAGGAG	AAGCTTTGCT	ATGTCACCC-	TCGACTTCGA

						
	665	675	685	695	705	715
EU076586	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
3_	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAATTACA	CACTTCCAGA
4_	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAATTACA	CACTTCCAGA
5	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
6	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
7	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
8	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
9	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
10	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAATTACA	CACTTCCAGA
11	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
12	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
13	TGCTGAAATG	AAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA
14	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAATTACA	CACTTCCAGA
15	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAAATACA	CACGTCCAGA
16	TGCTGAA-TG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAATTACA	CACTTCCAGA
17	TGCTGAAATG	GAGAAGGCCG	CTACAGACTC	CTCCATCAAC	GTCAACTACA	CACTTCCAGA

						
	725	735	745	755	765	775
EU076586	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
3_	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
4_	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
5	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
6	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
7	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
8	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
9	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
10	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
11	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
12	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
13	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GGAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
14	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
15	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
16	TGGCAACGTC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC
17	TGGCAACATC	ATCACAAATCG	GCAATGAGCG	CTTCCGCTGC	CCAGAAATGC	TCTTCAAGCC

						
	785	795	805	815	825	835
EU076586	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
3_	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
4_	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
5	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
6	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
7	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
8	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
9	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
10	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
11	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
12	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
13	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
14	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
15	ATACTTCGAT	GGTATGGA-T	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
16	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA
17	ATACTTCGAT	GGTATGGAAT	ACGATGGTAT	CGACAAGACA	CTCTTCGACT	CCATCATGAA

....					
845	855	865	875	885	895

EU076586	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTACTTTCT	GGTGGCACAA
3	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
4	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
5	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
6	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
7	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
8	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
9	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTTA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
10	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
11	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGTTATCAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
12	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
13	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTTA-CAT	CGTCCTTTCT	G-TGTCACAA
14	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
15	GAGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTTA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTG-TACAA
16	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTTCT	GGTGGCACAA
17	GTGCGATATC	GATGTTTCGTA	AGGATCTCTA	CGCTAA-CAT	CGTTCTTCT	GGTGGCACAA

						
	905	915	925	935	945	955
EU076586	CAATGTTCCA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
3	CAATGTTCAA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACGAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
4	CAATGTTCAA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACGAGGAAAA	TCACAGCTCT	TGCTC-ACCA
5	CAATGTTCAA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
6	CAATGTTCCA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
7	CAATGTTCCA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
8	CAATGTTCCA	GG-CATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
9	CAATGTTCCA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG--AAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
10	CAATGTTCAA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
11	CAATGTTCCA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACGAG-CAAA	TCACAGCTCT	TGCTC-ACCA
12	CAATGTTCCA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
13	CAATGTTCCA	GGACATCGCC	GAACGTCTTG	ACGAG-CAAA	TCACAGCTCT	CGCTCT-CCA
14	CAATGTTCAA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-GAAA	TCACAGCTCT	TGCTCCACCA
15	CAATGTTTCAT	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG--AAA	TCACGTCTCT	TGCTCTACCA
16	CAATGTTCAA	GGGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-AAAA	TCACAGCTCT	TGCTC-ACCA
17	CAATGTTCCA	GAGCATCGCC	GAACGTCTTG	ACAAG-CAAA	TCACAGCGCT	TGCTCCACCA

						
	965	975	985	995	1005	1015
EU076586	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TCGCCCCAG-	-AAGAGCGTA	AGT-ACGCT-	GTTTGGGTGC
3	ACAATGAA-G	ATCAAGATCG	TTGCTCCAG-	-AAGAGCGTA	AGT-ACGCT-	GTTTG-----
4	ACCATGAA-G	GTCAAGATCG	TTGCTCCAG-	-ACGAGCGTA	AGTTACGCC	GTTTG-----
5	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TTGCTC-AG-	-A-GAGCGTA	AGT-ACGC-	GTTTG-----
6	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TCGCCC--A-	-GAGAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
7	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TCGCCCC-A-	-GAGAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
8	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TCGCCCCAG-	-AAGAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
9	ACACTGAA-G	GTCAAGATCG	TCGCCTCAG-	-AAGAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
10	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TTGCTCCAG-	-A-GAGCGTA	AGT-ACGC-	GTTTG-----
11	ACAATGAA-G	ATCAAGATCG	TCGCCCCAG-	-A-GAGCGTA	AGT-ACGC-	GTTTG-----
12	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TCGCCCCAG-	-AAGAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
13	ACCATGAAAG	ATCAAGATCG	TCGCCCCGC	CACGAGCGTA	-GT-ACTGCT	GTTTG-----
14	ACAATGAA-G	GTCAAGATCG	TTGCTCCAG-	-A-GAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
15	ACCATGAA-G	GTCAAGATCG	TGGCTCCAG-	-A-GAGCGTA	AGT-ACTGCT	GTTTG-----
16	ACCATGAA-G	GTCAAGATCG	TTGCTCCAG-	-A-GAGCGTA	AGT-ACGCC-	GTTTG-----
17	ACAATGAA-G	ATCAAGATCG	TCGCCCCAC-	-AACAGCGTA	ATT-ACTCC-	GTTTG-----

Onbeş ve 16. örneklerin sekanslarında arka plan oldukça kalabalık olduğu için sekansın güvenilir olmadığı düşünülmektedir. Sekanslama çift yönlü yapılmış ancak her iki enzimle de benzer karışık arka planlı sekanslar elde edilmiştir. Bu nedenle sekansa göre RsaI enzim kesimindeki sonuçların değerlendirilmesi yapılmamıştır. Çünkü sekansta görülebilecek yer değiştirme ve insersiyonlar enzim kesimini tamamen etkileyebilmektedir.

4. TARTIŞMA

Tüm dünyada yaygın bir hastalık etmeni olan *Trichomonas vaginalis*, oldukça önemli bir protozoon olup en sık görülen viral olmayan vajinit etkenidir. Özellikle cinsel aktif çağdaki kadın ve erkekleri etkilemekte ve her yıl 180 milyon olgunun görüldüğü bildirilmektedir. Trichomoniasis cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyon olup pelvik enflamatuvar hastalığa, hamilelikte ise erken membran rüptürüne, erken doğuma ve düşük doğum ağırlıklı bebeğe sebep olabilmekte, son yıllarda ise HIV geçişini iki kat daha fazla oranda kolaylaştırdığı belirtilmektedir (Bowden ve Garnett 2000, Schwebke ve Burgess 2004, Ibanez-Escribano, 2014).

Gelişmekte olan ülkelerde daha fazla görülmekte olup ülkemizde de değişik gruplarda yapılan çalışmalarda olgulara ve kullanılan yöntemlere (direkt mikroskopi, kültür, boyama yöntemleri, PCR) bağlı olarak sıklığı %3-72,3 arasında değişik oranlarda saptandığı bildirilmektedir (Ertabaklar, 2004, Ayhan 1996, Suay 1995, Aksoy 2002). İlimizde de hastalığın görüldüğü bilinmektedir. Aydın ilinde Ertabaklar ve ark 220 vajinal akıntılı kadının DM ile %5,45'inde, kültür yöntemi ile %7,27'sinde *T.vaginalis* saptamışlardır (Ertabaklar, 2004). Yine Ertabaklar ve ark Aydın'da yaptıkları başka bir çalışmada 102 vajinal sürüntü örneğinin üçünde DM ile (%2.94), beşinde TYM besiyeri (%4.90) ve beşinde PCR yöntemi (%4.90) ile *T. vaginalis* saptadıkları bildirilmiştir (Ertabaklar 2011).

Trichomoniasis tanısında direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler de bunlardan biridir. Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde direkt mikroskopi ile %3,4-40,3, kültürle %3-73,3, sitolojik preparatla %0,9 ve idrar mikroskopisinde %0,2 olarak tespit edildiği belirtilmiştir (Akdemir 2010). Kültür altın standart olarak kabul edilse de, deneyimli personele ihtiyaç olması ve sonucun en az iki gün sonra verilebilmesi gibi nedenlerle kullanımı kısıtlanmaktadır. Özellikle, komplikasyonların önlenmesi, yarıya yakın olgunun asemptomatik olması nedeniyle bulaşın hızlı olması, dolayısıyla kısa sürede sonuç verecek yöntemlere yönelinmiştir. Direkt yöntemlerden DM, pratik gibi görünse de, parazitin tanınması açısından deneyimli kişilere ihtiyaç duyulmakta olup duyarlılığı da %60-80 olarak bildirilmektedir (Johnston ve Mabey, 2008). Olguların atlanması nedeniyle DM'nin kültür yöntemiyle birlikte kullanılması önerilmektedir (Ertabaklar 2004 ve Çulha 2006). Tüm bu dezavantajlar nedeniyle kısa sürede sonuç verecek moleküler yöntemlere ilgi artmıştır.

Parazitoloji alanında, PCR yönteminin birçok alanda önemli gelişmelere katkıda bulunduğu bilinmektedir. Örnek olarak, rekombinant DNA aşısı çalışmaları, immünoloji ve konak-parazit etkileşimi, PCR-amplifiye gen araştırmalarını verebiliriz. Direkt mikroskopiye göre, özellikle az sayıda parazitin bulunduğu veya miks enfeksiyonlarda daha iyi duyarlılığa sahip olması en önemli avantajıdır (El-Din, 2013).

Trichomoniasis tanısında genel olarak moleküler yöntemlere ait %69,5-100 arasında değişen duyarlılık ve %84-100% arasında değişen seçicilik oranları tanımlanmıştır (Polat 2011, El-Din, 2013 ve Ertabaklar, 2011).

Trichomonas vaginalis'in benzer biyolojik özelliklerini taşıyan türlerinin genetik farklılıkları üzerine yapılmış çok fazla çalışma bulunmadığı gibi, endobiontların (mycoplasma ve *Trichomonas vaginalis* virus=TVV) dağılımı da tam olarak bilinmemektedir. Klinik tabloda, prognoz ve metronidazol duyarlılığı gibi özelliklerdeki farklılıkların, suşların biyolojik özellikleri ve virulans farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Hampl V 2001). Semptomatik ve asemptomatik hastalardan elde edilen suşların aralarında farklılıklar olduğu zimodem analizi ile tespit edilmiştir (Vohra H 1991, Proctor EM 1988). Kriger ve ark. (Kriger 1985), Amerika'da farklı bölgelerden elde ettikleri suşlarda antijenik farklılıkları göstermişler; Hampl V ve ark.(2001) 8 ülkeden elde edilen 20 farklı *Trichomonas vaginalis* örneğini RAPD yöntemi ile inceleyerek aralarındaki filogenetik benzerlikleri araştırmışlardır. Genetik ağacın, metronidazol direnci ve mikoplasma taşıyıcılığını yansıtıyorken; virülans, coğrafik dağılım ve TVV enfeksiyonunu yansıtmadığını tespit etmişlerdir (Hampl 2001). Stiles ve ark (2000), hastalığın epidemiyolojisini daha iyi anlamak amacı ile Missisipi'den elde edilen 31 *T. vaginalis* örneğini HSP70 RFLP yöntemi ile araştırmışlar ve moleküler olarak 10 farklı alt tip belirlediklerini bildirmişlerdir. Ancak, metronidazol direnci ile RFLP alt tipleri arasında bir ilişki saptamamışlardır (18). Snipes ve ark (2000) ise, 109 *T. vaginalis* örneğini rDNA'nın ITS (Internal transcribed spacer) bölgesini PCR ile çoğaltarak incelemişler, 16 örnekte C66 ITS mutasyonu saptamışlar ve bu grupta dirence daha çok rastlanmasından dolayı direncin mutasyonlara bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Bu tür çalışmalar ile metronidazol direncine ait moleküler bir işaret bulunabilmesinin, tedavi stratejilerinde önemli olduğunu düşündüklerini belirtmişlerdir (Snipes 2000).

Bizim çalışmamızda kullandığımız PCR-RFLP yönteminin, ilaç direnci araştırmalarında, tedavi takibinde, parazitik enfeksiyonlara genetik duyarlılık araştırmalarında, patogeneze ve immün cevabın daha iyi anlaşılmasında önemli katkılar sağladığı düşünülmektedir. Nerdeyse tek dezavantajı pahalı olması olan moleküler yöntem

kullanmanın yararlarından biri de, parazitin tiplendirmesinin yapılabilmesidir. Pahalı olması rutin incelemelerdeki kullanımını kısıtlasa da, son yıllarda giderek artan bir sıklıkta, özellikle araştırma alanında hastalık evrelemesinden kriminal vakalara kadar birçok alanda kullanılmakta olup özellikle miks enfeksiyonların tanısında veya parazitlerin hem tanı hemde genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. (El-Din, 2013).

Çalışmamızda kullanılan PCR-RFLP yönteminde, hedef bölge olarak aktin geni seçilmiştir. Aktin, bitki ve hayvanlarda bulunan flaman yapısında bulunan bir protein olup kas kasılması ve harekette önemli rol oynamaktadır. *Trichomonas vaginalis* konak hücreye temas edince kamçılı formdan ameboid forma geçer ve temas bölgesinde psödopodlar çıkar (Bricheux 1997). Bu özelliğin, parazitin virülansı ile yakından ilişkili olduğu ve hücre hasarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Arroyo 1993). Dolayısıyla, aktinin parazitin patogeneğinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Hedefin 1100bp seçilmesi de önemlidir, zira aktin genin gerçek uzunluğundan sadece 28bp kadar kısadır (Crucitti 2008). Enzim sayısı fazlaştıkça, genotiplendirmenin daha hassas olduğu belirtilmektedir (Crucitti 2008, Matini 2014). Aktin gen bölgesini hedefleyen üç ayrı enzimin seçilmiş olması, her bir enzime yönelik değişik paternler ve her üç enzimin birlikte değerlendirilmesiyle farklı patern kombinasyonları oluşmuştur. Bu da, genotip farklılıklarının daha iyi anlaşılmasını sağladığı düşünülmüştür. Örnek 11,12, 15, 20'de MseI ile kesim sonucu iki paterne ait bantlar görülmüştür. Bu durumun olası nedenlerinin olguların iki farklı suşla enfekte olmaları veya kontaminasyon olabileceği düşünülmüştür. Ancak 11. ve 12. örneklerin PCR'ları ve enzim kesimleri tekrarlanmış yine benzer sonuçlar alınmıştır. Bu durum bu örneklerde iki farklı suşun bulunduğu ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Çeşitli parazitlerde uygulanmış olmasına rağmen, *Trichomonas vaginalis* konusunda bu şekilde yapılmış sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılabilmektedir. Parazitin genotipik farklılıklarının virülans, prognoz, ilaç direnci ve semptomlarla ilişkili olup olmadığı araştırılmaktadır (Hampl 2001, Stiles 2000). Stiles ve ark., HSP70 geni ile yaptıkları çalışmada on farklı RFLP patern alt tipi belirlemişler, metranidazol direnci ve RFLP alt tipleri arasında herhangi bir korelasyona rastlamamışlardır (2000). Aynı örneklerde farklı genotiplere rastlamışlar ve bunun çevrelerindeki farklı genotip parazitlere veya farklı partnerlerle ilişkiye bağlamışlardır. Metranidazol direncinin mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Kazemi ve ark., ITS1 fragmanında mutasyon saptanan iki olgunun semptomatik ve tedavi almayan olgular olduğunu bildirmiştir (2010). Çalışmamızda, izolatların ait olduğu hastaların özgeçmişleri, çalışmanın amacı dışında olduğundan

araştırılmamıştır. Bu konuyla ilgili, klinik ve fenotipik özelliklerle genotipi karşılaştıran ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Trichomonas vaginalis izolatlarında aktin gen bölgesini hedefleyen PCR-RFLP ile yapılmış sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışma 2008 yılında Crucitti ve ark. tarafından yapılmıştır. Benzer bir çalışmada ise aynı gen bölgesini hedefleyen PCR-SSCP (PCR-Single Stranded Conformational Polymorphism) yöntemi ile 2014’de Matini ve ark tarafından yapılmıştır. Crucitti ve ark. Kongo ve Zambia’da 160 izolat üzerinde yaptıkları çalışmada, nested PCR ile 151 izolatu amplifiye edebilmişler ve bu tekniğin duyarlılığını %94,4 olarak bildirmişlerdir (2008). Biz 20 izolatumuzun tümünü nested PCR yöntemiyle amplifiye edebildik. Daha fazla izolatla yapılacak çalışmalarda bu oranın değişip değişmeyeceği kontrol edilebilir. Crucitti ve ark., aynı çalışmada HindII enzimiyle yapılan işlem sonucu iki farklı bant paterni (1 ve 2), MseI ile yapılan işlem sonucu üç farklı bant paterni (1,2 ve 3) ve RsaI enzimiyle yapılan kesim sonucu ise dört farklı bant paterni (1,2,3 ve 4) tespit etmişlerdir. RFLP paternleri ve nükleotid sekansları dikkate alındığında 15 farklı nükleotid değişikliği gözlenmiştir. Bu üç enzimin kesim işlemleri sonucunda oluşan kombinasyonlar sonucunda ise, sekiz farklı genotip (A, E, G, H, I, M, N ve P) tanımlanmıştır. Kongo’da Genotip E en sık görülmekte iken, Zambia’da Genotip G en sık olarak bulunmuştur. Ayrıca, Zambia’da miks enfeksiyonlar görülürken, Kongo’da görülmediği bildirilmiştir. Farklı bölgelerde yaşayan olgulardan elde edilen izolatlarda antijenik farklılıklar olduğu gösterilmiştir (Kriger 1985). Dolayısıyla, bu iki bölgede farklı genotiplerin ortaya çıkması beklenen bir sonuç olarak düşünülebilir.

Yine, aktin gen bölgesini hedef olarak yapılan diğer çalışmada ise Matini ve ark.’nın çalışmasıdır. İran’da iki ayrı şehirde jinekoloji kliniklerine başvuran hastalarda yapılan bu çalışmada araştırmacılar, PCR-SSCP (PCR-Single Stranded Conformational Polymorphism) yöntemini 950 örnekten elde edilen izolatlarda uygulamışlar ve yedi farklı genotip belirlemişlerdir (2014). Yapılan sekans çalışmasında, beş polimorfik bölge tespit etmişler, ancak bu bölgelerin hiçbirinde amino asit substitisyonu tespit etmemişlerdir. Ayrıca, hiç miks enfeksiyona rastlanmadığı belirtilmektedir.

Bizim çalışmamızda ise, Genotip G ve E aynı sayıda bulunmuş olup miks tip örneklere de rastlanmıştır. Ayrıca, Crucitti ve ark.’nın çalışmasında tanımlanan genotiplere ek olarak iki farklı patern bulunmuş olup bunlara Y1 ve Y2 adı verilmiştir.

Bu çalışma ile ilk kez ülkemizdeki genotipler tanımlanmıştır. Bu araştırma, ülkemizde bu konuda yapıldığı bilinen ilk çalışma olup daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmüştür. İzolat sayısı artırılarak ve başka bölgelerle karşılaştırma

yapılarak ÷lkemize özgü *T. vaginalis* genotiplerinin belirlenmesi bundan sonraki hedef olarak gör÷lm÷ştür. Ayrıca genotipler ile parazitin vir÷lans, ilaç direnci, klinik görünüm, prognoz gibi özellikleri arasındaki ilişkiye açıklık getirebileceğı düşün÷lm÷ştür.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, *Trichomonas vaginalis*'in bulaş, klinik ve virulans özelliklerinin incelenmesinde PCR-RFLP yönteminin kullanılabileceği düşünülmüştür. Parazitin önemli bir gen bölgesi olan aktin geninin, potansiyel bir belirteç olarak kullanılabileceği kanatine varılmıştır. Bu çalışma, ülkemizde bu konuda yapılan ilk çalışma olup bulunan sonuçların, ileride yapılacak çalışmalara ışık tutması açısından yararlı olduğu düşünülmektedir. Daha önce tanımlanan genotiplere ek olarak iki farklı genotip tanımlanmıştır. Ülkemizde farklı bölgelerden elde edilen izolatlar ile bu tür bir çalışma yapılırsa bölgesel farklılıklar olup olmadığı da değerlendirilebilecektir.

ÖZET

Trichomonas vaginalis'in Aktin gen bölgesi kullanılarak PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ile moleküler tiplendirmesi

Trichomonas vaginalis, trichomoniasis hastalığının etkeni olup, özellikle kadınlarda daha fazla görülen, cinsel yolla bulaşan ve asemptomatik olabilen, vajinit ve servisitte yol açan bir protozoondur. *T. vaginalis* enfeksiyonu hamilelikte membranların erken rüptürü, düşük doğum ağırlıklı bebek ve erken doğum gibi komplikasyonlara sebep olabilmektedir. Enfeksiyonun diğer önemli yanı HIV (human immunodeficiency virüs) dahil diğer cinsel yolla bulaşan etkenlerin bulaşında kolaylaştırıcı rolü olmasıdır. Parazitin sık görülmesine karşın genetik değişkenlikleri, virülans ve ilaç direnci vb gibi diğer özellikleri tam olarak bilinmemektedir. *Trichomonas vaginalis*'in proteinleri, polisakkaritleri ve izoenzim profili genotipik farklılıklarının olduğunu göstermekle birlikte, günümüze kadar yapılan virülans gibi biyolojik farklılıklarını anlama çalışmaları tam olarak başarılı olamamıştır.

Bu çalışmada Aydın İlinden izole edilen *T. vaginalis* izolatlarının aktin gen bölgesinden seçilen primerler ile PCR-RFLP yöntemi ile moleküler olarak tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarında daha önce izole edilerek kriyoprezerve edilerek saklanan 20 *T. vaginalis* izolatı bu yöntem ile moleküler olarak tiplendirilmesi yapılmış, iki belirgin genotip saptanmıştır.

Bu konuda ülkemizde yapılmış çalışma bulunmadığından bu çalışma ilktir ve coğrafik farklılıkları tanımlayabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: PCR, RFLP, genotiplendirme, *Trichomonas vaginalis*

SUMMARY

Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* with PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) by using Actin gene region

Trichomonas vaginalis is the agent pathogen of Trichomoniasis, a sexually transmitted disease that can cause asymptomatic or symptomatic vaginitis and cervicitis. In pregnancy, *T. vaginalis* infection may result in complications such as, premature rupture of membranes, preterm labor or low birth weight. It also can facilitate the transmission of other sexually transmitted disease agents including HIV. Although *T. vaginalis* is common, its properties like genetic variability, virulence or drug resistancy are not completely understood. Genotypic differences of the parasite are assumed regarding its proteins, polysaccharides and isoenzyme profile, but studies on understanding biological differences such as virulence could not have been totally accomplished.

In this study, *T. vaginalis* isolates were processed with PCR-RFLP technique using actin gene site and molecular typing of the parasite was aimed. Twenty *T. vaginalis* isolates (which were isolated and cryopreserved before) were used and two major genotypes were determined. This is the first study on this subject with PCR-RFLP method by using actin gene and further studies are needed in order to define geographical differences.

Keywords: PCR, RFLP, genotyping, *Trichomonas vaginalis*

6. KAYNAKÇA

- 1- Akdemir C, Keskin N, Çoksüer H. Kütahya’da vajinal akıntılı olgularda *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığının klasik mikroskopi ve DNA hibridizasyon yöntemleriyle araştırılması. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2010;6(4):161-166
- 2- Aksoy Ü, Özkoç S. Barsak ve genital protozoon hastalıklarında tedavi. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed. Akısü Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayınları, No:20, İzmir, 2005. Sf:33-51
- 3- Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol 1992;6(7):853-862
- 4- Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF. Signaling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. Mol Microbiol 1993;7: 299–309
- 5- Bardaker F, Yenidünya AF. Moleküler biyoloji teknikleri I: nükleik asit analiz teknikleri. Moleküler Biyoloji. 2. Baskı. Ed. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Nobel Yayınları No:1170, Ankara, 2010. Sf:521-555
- 6- Bowden FJ, Garnett GP. *Trichomonas vaginalis* epidemiology: parameterising and analysing a model of treatment interventions. Sex Transm Inf 2000;76:248–256
- 7- Bricheux G, Brucherolle G. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. FEMS Microbiol Lett 1997;153:205–213
- 8- Cates W, Joesoef RJ, M. Goldman. Atypical pelvic inflammatory disease: can we identify clinical predictors? Am J Obstet Gynecol, 1993;169:341-346
- 9- Cotch MF, Pastorek JG II, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA, Krohn MA, Klebanoff MA, Rao AV, Rhoads GG. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. Sex Transm Dis, 1998;24:353-360
- 10- Crucitti T, Abdellati S, Van Dyck E, Buve A. Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism. Clin Microbiol Infect, 2008;14:844–852

- 11-Çulha G, Hakverdi AU, Zeteroğlu Ş, Duran N. Vajinal akıntı ve kaşıntı şikayeti olan kadınlarda *Trichomonas vaginalis* yaygınlığının araştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg 2006;30(1):16-18
- 12- Dombrowski M, Brown W, Bronsteen R. Intravenous therapy of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Obstetric and Gynecology, 1987;69:524-525
- 13- Edwards D. Review. Nitroimidazole drugs- action and resistance mechanism. Mechanism of action. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1993;31:9-20
- 14-El-Din SAS. Polymerase Chain Reaction Techniques: Applications in Parasitic Diseases PUJ 2013;6(1):19-34
- 15-Ertabaklar H, Ertuğ S, Kafkas S, Odabaşı AR, Karataş E. Vajinal Akıntılı Olgularda *Trichomonas vaginalis* Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2004;28(4):181-184
- 16-Ertabaklar H, Ertuğ S. Trichomoniasis ve immünolojisi. Tıbbi ve Veteriner İmmünoparazitoloji. Ed. Özcel MA, İnci A, Turgay N ve Koroğlu E. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No:21. İzmir, 2007. Sf:82-92
- 17-Ertabaklar H, Caner A, Doşkaya M, Demirtaş LO, Toz SÖ, Ertuğ S, Guruz Y. Trichomoniasis tanısında polimeraz zincir reaksiyonu ile mikroskopi ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg 2011;35:1-5
- 18-Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Rousseau G. Effect of beta-estradiol on production of the cell detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1991;29:1847-1849
- 19-Gasser RB. Molecular tools—advances, opportunities and prospects. Veterinary Parasitology, 2006;136:69–89
- 20-Hampl V, Vanacova S, Kulda J, Felgr J. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis* strains BMC Evolutionary Biology, 2001;1:11
- 21-Heine P, McGregor JA. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. Clin Obstet Gynecol 1993;36:137-144
- 22-Hide G, Tait A. The molecular epidemiology of parasites. Experientia, 1991;47:128-142
- 23-Hobbs MM, Sena AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infect 2013;89(6):434-438
- 24-Ibanez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Aran VJ, Escario JA, Gomez-Barrio A, Alderete JF. Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in

- Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among *Trichomonas* species. *Parasitology International* 2014;63:427-431
- 25- In vitro kültürde Giemsa ile boyanmış trofozoit görünümü (<http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/gallery.html#trophs> adresinden erişilmiştir)
- 26- Johnston VJ, Mabey DC. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:56–64
- 27- Kazemi F, Hooshyar H, Zareikar B, Bandehpour M, Arbabi M, Talari S, Alizadeh R, Kazemi B. Study on ITS1 gene of Iranian *Trichomonas vaginalis* by molecular method. *Iranian J Parasitol* 2010;5(4):9-14
- 28- Kreiger JN, Holmes KK, Spence Mr, Rein MF, McCormack WM, Tam MR. Geografic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the immunofluoresence technique. *Journal of Infectious Disease* 152: 1985; 978-984
- 29- Kuman A, Altıntaş N. Protozoan Hastalıkları. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1996, sf:71-78
- 30- Life Cycle (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> adresinden erişilerek Türkçe’leştirilmiştir)
- 31- Lossick SG, Muler M, Gorrel TE. In vitro drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis. *Journal of Infectious Disease*. 1986;153:948-955
- 32- Lymbery AJ, Thompson RCA. The molecular epidemiology of parasite infections: Tools and applications. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2012;181:102–116
- 33- Matini M, Rezaie S, Mohebbi M, Maghsood AH, Rabiee S, Fallah M, Rezaeian M. Genetic Identification of *Trichomonas vaginalis* by using the Actin Gene and molecular based methods. *Iranian J Parasitol*, 2014;9(3):329-335
- 34- McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* 2007;195:698–702
- 35- Mendoza-Lopez M, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Ruiz-Tachiquin ME, Ortega-Lopez J, Arroyo R. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000;68(9):4907-4912

- 36-Merdivenci A. Medikal Parazitoloji Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul 1981, sf:120-130
- 37-Monis PT, Andrews RH, Saint CP. Molecular biology techniques in parasite ecology. International Journal for Parasitology, 2002;32:551–562
- 38-Özcel MA, Zeyrek FY. Trichomoniasis. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:22, İzmir 2007, Sf:431-447
- 39-Parent KN, Tagaki Y, Cardone G, Olson NH, Ericsson M, Yang M, Lee Y, Asara JM, Fichorova RN, Baker TS, Nibert ML. Structure of a protozoan virus from the human genitourinary parasite *Trichomonas vaginalis*. mBio 2013;4(2):1-11 (<http://mbio.asm.org/content/4/2/e00056-13.full.pdf+html> adresinden erişilmiştir).
- 40-Pastorek JG II, Cotch MF, Martin DH, Eschenbach DA. Clinical and microbiological correlates of vaginal trichomoniasis during pregnancy. Clin Infect Dis, 1996;23:1075-1080
- 41-Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 1998;11:300-317
- 42-Polat E, Sirekbasan S, Yıldırım Z, Bağdatlı Y, Çepni İ, Çift T, Baltalı ND. İstanbul’da kadın hastalıkları hastaları ile hayat kadınlarında *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığının on yıl önceki oranla karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2011;35:68-71
- 43-Poppe WAJ. Nitroimidazole-resistant vaginal trichomoniasis treated with paramomycin. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001;96:119-120
- 44-Proctor EM, Naaykens W, wong Q, Bowie WR. Isoenzyme patterns of isolates of *Trichomonas vaginalis* from Vancouver. Sex. Transm Dis. 1988; 15: 181-185
- 45-Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis-Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. Gel Electrophoresis - Principles and Basics içinde. Ed. Dr. Sameh Magdeldin. InTech, 2012 (<http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restrictionfragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te> adresinden ulaşılmıştır)
- 46-Rein MF. *Trichomonas vaginalis*. Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases Volume 2 içinde. Fifth edition. Churchill Livingstone, 2000. Sf:2894-2898

- 47-Riley DE, Roberts MC, Takayama T, Krieger JN. Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1992;30(2):465-472
- 48-Saygı G. *Trichomonas vaginalis* ve ürogenital trichomoniosis. Temel Tıbbi Parazitoloji içinde. 1998, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas. Sf:44-47
- 49-Schwebke JR, Burgess D. Clinical Microbiology Reviews, 2004;17(4):794–803
- 50-Sexually transmitted diseases treatment guidelines. (<http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/vaginal-discharge.htm#a2> adresinden erişilmiştir)
- 51-Sobel JD, Nyirjesy P, Brown W. Tinidazole therapy for metranidazole-resistant vaginal trichomoniasis. CID 2001;33:1341-1346
- 52-Sorvillo F, Kerndt P. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission.Lancet, 1998; 351: 213-214
- 53-Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and American-Africans. Emerging Infectious Diseases, 2001; 7(6): 927-932
- 54-Sözen E, Yıldırım A, Arslanyolu M, Parmaksız İ. Rekombinant DNA teknolojisi. Moleküler Biyoloji. 2. Baskı. Ed. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Nobel Yayınları No:1170, Ankara, 2010. Sf:471-519
- 55-Stemmer SM, Adelson ME, Trama JP, Dorak MT, Mordechai E. Detection Rates of *Trichomonas vaginalis*, in Different Age Groups, Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. Journal of Lower Genital Tract Disease, 2012;16(4): 352-357
- 56-Stiles JK, Shah PH, Xue L, Meade JC, Lusbauh WB, Cleary JD, Finley RW. Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by HSP70 restriction fragment length polymorphism. Am J Trop Med Hyg, 2000;62(4):441–445
- 57-Suud S, Kapil A. An update on *Trichomonas vaginalis*. Indian J Sex Transm Dis 2008; 29:7-14
- 58-Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997 Dec 15;25(24):4876-82
- 59-Traub RJ, Monis PT, Robertson ID. Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. International Journal for Parasitology, 2005;35:1295–1307
- 60-Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes Nucleic Acids Res, 2003;3:3688-3691

- 61- Vohra H, Sharma P, Sofi BA, Gupta I, Ganguly NK, Mahajan RC, Malla N. Correlation of zymodeme patterns, virulanse and drug sensitivitiy of *Trichomonas vaginalis* isolates from women. *Indian J Med Res* 1991; 93:33-39
- 62- Wilkinson D, Abdool Karim SS, Harrison A, Lurie M, Colvin M, Connolly C, Sturm AW. Unrecognized sexually transmitted infections in rural South African women: a hidden epidemic. *Bull World health Organ* 1999;77:22-28
- 63- WHO. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates 2001 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_HIV_AIDS_2001.02.pdf?ua=1 adresinden ulaşılmıştır)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı: DEMİRAĞ

Adı: SERPİL

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı
AYDIN

GSM:05309716136

Doğum Yeri: Burdur

Doğum Tarihi: 07/01/1967

Cinsiyeti: Kadın

Eğitim Durumu

Eğitim Kurumu

Yıllar

Tıp Eğitimi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

1985-1991

Asistanlık Eğitimi: Ankara Numune Eğitim ve

Aralık 1995-Ocak 2000

Araştırma Hastanesi

Fellowship: Virginia Commonwealth University,

2001

Faculty Development Program, ABD

Cancer Prevention Summer School, NCI, ABD

2002

Çalıştığı Kurumlar

Kurum	Yıllar	Unvan
Ankara Dr. Muhittin Ülker Acil Travmatoloji Hastanesi	1991 - 1995	Mecburi Hizmet, Pratisyen Hekim
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Isparta	2000-2004	Yard.Doç.Dr., Anabilim Dalı Başkanı, Kurucu
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği AD, Aydın	2004-2006	Yard. Doç. Dr.
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği AD, Aydın	2006-2011	Doç.Dr.
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği AD, Aydın	2011-	Prof. Dr.

Yabancı Dili: İngilizce

1. **Aydın S**, Yaris F, Sahin EM, Ozer C ve Ozkomur E. Students' perceptions of their undergraduate medical education. Saudi Med J 2005;26:1484-1486.
2. **Aydın S**, Koseoglu T ve Agalar C. Patient satisfaction at the 18th month of a two-day quadruple Helicobacter pylori eradication therapy. MEJFM 2005;3:7-9.
3. **Aydın S**, Hatirli Y ve Ersoy F. Total quality management for Turkish primary care: current status and suggestions. MEJFM 2005;3:12-14.
4. Aydın V, **Aydın S**. Outcome measurement after lumbar disc surgery. Turkish Neurosurgery 2005;15(1):4-11.
5. **Aydın S**, Yavuz T, Duver H ve Kutsal A. Quality of life in the elderly after coronary bypass surgery. Int Heart J 2006;47:59-65.
6. **Aydın S**, Yaris F, Ozcakil A, Agalar C. Most common infections and antibiotic prescribing habits of residents: experience of three university hospitals. Turk J Med Sci 2005;35:169-78.
7. **Aydın S**. Domestic violence experiences among medical students in 2 universities. Saudi Med J 2006;27:125-127.
8. Agalar C, Cakmak A, Demirdal T, **Aydın S**, Kapuagasi A. Hepatitis A, B, C and E prevalence in Ankara between 0-20 ages and risk factors. Calicut Medical Journal 2006; 4(2):e3.
9. **Aydın S**, Gemalmaz A. What do Residents Know About Patient's Right, Informed Consent and Euthanasia? ME-JAA 2007;4(5):6-9.
10. Özçakır A, **Aydın S**. Complementary/ Alternative Medicine Use in Primary Care. Research J Med Sci 2007;1(1):21-25.
11. **Aydın S**, Yavuz T, Yavuz S, Ağalar C, Ağalar F. Role of education on the attitudes of nurses to human deficiency virus (HIV)/Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients in Isparta, Turkey. ME-JN 2007;1(2):3-6.
12. Kara İH, **Aydın S**, Gemalmaz A, Aktürk Z, Yaman H, Bozdemir N, Kurdak H, Sitmapinar K, Devran Sencar I, Başak O, Akdeniz M, Işildar H, Burgut E, Ozcan S, Akça U, Dağdeviren N, Ungan M. Habitual Tea Drinking and Bone Mineral Density in Postmenopausal Turkish Women: Investigation of Prevalence of Postmenopausal Osteoporosis in Turkey (IPPOT Study). Int. J. Vitam Nutr Res 2007;77(6):389-397.

13. Gemalmaz A, **Demirag S**. Domestic violence experiences of university students. TJFMPC 2008;1(3):26-28.
14. Gemalmaz A, **Aydın S**, Şensoy N. Reproductive/Sexual Health Knowledge, Opinions And Attitudes Of University Students. Middle East J Fam Med 2008;6(1):17-22.
15. Gemalmaz A, **Aydın S**, Başak O, Dişçigil G, Karul A. Prevalence of the Metabolic Syndrome in a Rural Turkish Population: Comparison and Concordance of Two Diagnostic Criteria. Turk J Med Sci 2008;38(2):159-165.
16. **Aydın S**, Bozkaya AO, Mazıcıoğlu M, Gemalmaz A, Özçakır A, Öztürk A. What influences herbal medicine use?-prevalence and related factors. Turk J Med Sci 2008;38(5):455-63.
17. Asirdizer M, Yavuz S, **Demirag SA**, Tatlısumak E. Do regional risk factors affect crude suicidal mortality rates in Turkey? Adli Tıp Dergisi 2009;23(2):1-10.
18. Asirdizer M, Yavuz S, **Aydın SD**, Dizdar G. Suicides in Turkey between 1996-2005 general perspective. Am J Forensic Med Pathol 2010;31(2):1-8.
19. **Demirag SA**, Gemalmaz A, Ozkan S, Nayir T. Risk reduction in patients: can primary and secondary prevention affect the coronary risk groups? Middle East J Fam Med 2010;8(2):10-12.
20. **Aydın S**, Gemalmaz A, Nayir T, Ozkan S. Which predicts the cardiovascular risk best in the elderly metabolic syndrome patients: *ATPIII or IDF*? Turk J Med Sci 2011;41(1):125-129.
21. Erel O, **Demirag SA**, Katkıcı U. Homicide and suicide in the elderly: data from Aydın. Turk J Geriatrics 2011;14(4):306-310.
22. Erel O, **Demirag SA**, Dirlik M, Cingöz G. Evaluation of traumatic findings in decomposed bodies in Aydın. Turk J Trauma Emerg Surg 2011;17(4):340-343.
23. Akan H, Izbirak G, Kaspar EÇ, Kaya ÇA, **Aydın S**, Demircan N, Bucaktepe PG, Ozer C, Sahin HA, Hayran O. Knowledge and attitudes towards complementary and alternative medicine among medical students in Turkey. BMC Complementary and Alternative Medicine 2012;12:115-121.
24. **Demirağ SA**. Herbal Medicine and Cancer Prevention: Myth or Not? OA Alternative Medicine 2013;1(2):16 (invited critical review).

2- Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **Aydın S**, Olgun G. Anne sütü verme eğilimi ve bırakma nedenleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2000; 7(3): 16-18
2. **Aydın S**, Köseoğlu T. Helicobacter pylori eradikasyonunda kısa süreli uygulanan dörtlü tedavinin etkinliği, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2000; 7(4): 14-18
3. **Aydın S**, Olgun G. Anne sütü verme eğiliminin yaş, eğitim durumu ve sosyo-ekonomik düzeye göre dağılımı, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2000; 7(3): 30-32
4. **Aydın S**, Yarış F. Uzmanlık öğrencilerinin poliklinikte antibiyotik kullanımına yaklaşımları, Klimik Dergisi 2002; 15(2): 59-61
5. **Aydın S**. Ana-Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Merkezine başvuran çocuklarda barsak parazitleri sıklığı, Klimik Dergisi 2002; 15(2): 54-55
6. **Aydın S**. Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğimizde yatan hastalarda sigara–enfeksiyon ilişkisi, Klimik Dergisi 2002; 15(1): 29-30
7. **Aydın S**, Yavuz T, Düver H, Kutsal A. 65 Yaş üstü hastalarda koroner bypass operasyonlarının yaşam kaliteleri üzerine erken dönem etkisinin SF-36 testi ile tespiti. Geriatri 2002; 5(2): 64-67
8. **Aydın S**. Editöre Mektup-2. Geriatri 2002; 5(4): 161
9. Hastalar hekimleri değerlendiriyor: EUROPEP ölçeği. DEU Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 16(3):153- 160
10. **Aydın S**, Özkömür E. Askeri Tıp Akademisi öğrencilerinin tıp eğitimine birinci basamak sağlık hizmetleri açısından yaklaşımı. Tıp Eğitimi Dünyası 2003; 11: 2-6
11. Yavuz S, **Aydın S**. Zehirlenme olgularının profili. Toksikoloji Dergisi 2003; 1(1): 47-52
12. **Aydın S**, Hatırlı Y. Birinci basamak sağlık hizmetlerinde toplam kalite yönetimi. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 2003; 7(3): 131-134
13. Yıldırım M, **Aydın S**. Aile Hekimliği'nde oral ülserlere yaklaşım. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 2003; 7(4): 171-176
14. **Aydın S**. Uzmanlık öğrencilerinin antibiyotik kullanım ölçütleri. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 2004; 8 (1): 24-29
15. Yavuz S, **Aydın S**. Birinci basamak sağlık hizmetlerinde adli olgu ve raporlar. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 2004; 8 (1): 30-33

16. **Aydın S.** Birinci basamakta psikiyatrik değerlendirme ölçeklerinin kullanımı. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 2005;9:26-31
17. **Demirağ SA.** Aile Planlaması-I. Türkiye’de Aile Hekimliği 2007;1(3):3-7
18. **Demirağ SA.** Aile Planlaması-II. Türkiye’de Aile Hekimliği 2007;1(4):4-8
19. **Demirağ SA,** Gemalmaz A, Kalak Ö. Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar. Aile Hekimliği Aktüel Bilimsel Tıp Dergisi 2008;2(2):19-23
20. Erel Ö, **Demirağ SA.** Hekimlik ve Yasalar I: hekimin yetki ve sorumlulukları. Aile Hekimliği Dergisi 2009;3(3):60-63
21. Erel Ö, **Demirağ SA.** Hekimlik ve Yasalar II: tıbbi uygulama hataları (malpraktis). Aile Hekimliği Dergisi 2009;3(5):44-46
22. **Demirağ SA,** Gemalmaz A, Erel Ö, Demirağ F. Çocuk İstismarı-1: Türkiye’de çocuk olmak: Yasalar ne kadar koruyor? Aile Hekimliği Dergisi 2009;3(5):48-54
23. **Demirağ SA,** Gemalmaz A, Erel Ö, Aydın V. Çocuk İstismarı-2:Çocuk istismarı ve şiddeti: Nasıl tanınır? Nasıl korunur? Aile Hekimliği Dergisi 2009;3(6):50-55
24. Erel Ö, **Demirağ SA,** Dirlik M, Cingöz G. Aydın’da bozulmuş cesetlerdeki travmatik bulguların değerlendirilmesi. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2011;17(4):340-343
25. **Demirağ SA.** Kronik hastalıklar ve yaşam kalitesi. Sağlıklı Yaşam Tarzı Dergisi 2009;1(2):58-65
26. **Demirağ SA.** Kişisel bakış açısı önemli mi? Geriatriye yaşam kalitesi kavramı. Geriatri ve Geriatrik Nöropsikiyatri 2009;özel sayı (8.Ulusal Geriatri Kongresi):57-59
27. **Demirağ SA.** Birinci Basamakta kronik ağrı ve yönetimi. Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2011;2(2):57-60.
28. **Demirağ SA.** Antiparaziter aşı çalışmaları. Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2011;2(5):43-6
29. **Demirağ SA.** Bitkiler kimin tarafında: Birinci basamakta sağlıklı beslenme ve bitkisel tıp. Türkiye Klinikleri 2014;5(4):62-65
30. **Demirağ SA.** Aile hekimliği pratiğinde yasal sorunlar: Genel bir bakış. Türkiye Klinikleri 2014;5(1):1-3

3- Kitaplarda Bölümler

Çeviri

1. **Aydın S.** Hematopoez ve hematopoetik yetmezlik. Cecile Essentials of Medicine, 7. Baskı, Nobel Yayınevi, İstanbul, 2008
2. **Aydın S.** Anksiyete Bozuklukları. Current Aile hekimliği Tanı ve Tedavi. 2. Basım. Güneş tıp Kitabevi, Ankara, 2011. Sf: 585-596.
3. **Demirağ SA.** Yaşlı istismarı ve ihmali. Aile Hekimliği Başucu Kitabı içinde. Ed. Ercan E. Selen Yayıncılık, 2012, Sf: 437-41

Özgün

1. **Aydın S,** Kurdak H. Hasta-hekim görüşmesi. Aile doktorları için kurs notları-I. Aşama içinde, 55-61, T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2004
2. Bilgel N, **Aydın S.** Aile doktorluğunda temel epidemiyolojik ve istatistiksel kavramlar. Aile doktorları için kurs notları-I. Aşama içinde, 121-36, T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2004
3. Şensoy N, Gemalmaz A, **Demirağ SA.** Hepatopankreatobiliyer hastada klinik muayene ve araştırma. Hapatopankreatobiliyer Cerrahi. Ed. Polat C. Nobel Yayınevi, 2010, Sf: 31-41
4. **Demirağ SA.** Yaşlı istismarı ve ihmali. Aile Hekimliği Başucu Kitabı içinde. Ed. Ercan E. Selen Yayıncılık, 2012, Sf: 437-41
5. Gemalmaz A, **Demirağ S.** Yeterliçe dayalı beceri değerlendirme araçları. Temel Eğitim Becerileri içinde. Ed. Beşer E, Okyay P. ADÜSEM Yayınları, 2012, Sf: 77-85

Çeviri Editörü

Basak O, **Demirag SA.** Taylor Handbook of Family Medicine. Ankara 2011, Publication of Turkish Family Physicians Association.

4-Uzmanlık tezi:

“Helicobacter pylori eradikasyonunda dörtlü ilaç tedavisinin etkinliği”

Ağustos 1999, Ankara

5-Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

1. **Aydın S**, Olgun G, Yavuz S. Breastfeeding among nurses and midwives as a maternal attitude. Poster. Proc. 1st International and 5th National Nursing Education Congress, Istanbul, 2001.
2. **Aydın S**, Olgun G, Yavuz S. Usage of family planning methods among nurses and midwives in Isparta. Poster. Proc. 1st International and 5th National Nursing Education Congress, Istanbul, 2001.
3. Yavuz S, Yavuz T, **Aydın S**, Ağalar C, Ağalar F. The Approach of the nurses to patients with AIDS. Poster. Proc. 1st International and 5th National Nursing Education Congress, Istanbul, 2001.
4. **Aydın S**, Yavuz T, Duver H, Kutsal A. Functional status outcomes after cardiac surgery. Poster. Proc. International Symposium on Progress in Cardiovascular Surgery, Roma, Italian Federation of Cardiology, Milan, 2001.
5. **Aydın S**, Koseoglu T, Yaylı G. Patient satisfaction at the 18th month of a two-day quadruple Helicobacter pylori eradication therapy. Poster. Proc. 2nd International Meeting on Antimicrobial Chemotherapy in Clinical Practice, Italy, Pharmacotherapy 2001;21:357-358, ACCP, Boston.
6. Yaylı G, **Aydın S**. Asymptomatic bacteriuria in school children in a developing country. Poster. Proc. 2nd International Meeting on Antimicrobial Chemotherapy in clinical practice, Italy, Pharmacotherapy 2001;21:388-90, ACCP, Boston.
7. **Aydın S**, Yaris F, Ozer C, Sahin EM, Akturk Z ve Dagdeviren N. Oral. Medical Students: Perspectives on Primary Care in Turkey. Proc. WONCA EUROPE 2002 ESGP/FM Conference, 37, RCGP, London, 2002.
8. **Aydın S**, Hatirli Y, Yaris F. Can Total Quality Management impact the primary healthcare in Turkey? Poster. Proc. WONCA EUROPE 2002 ESGP/FM Conference, 728, RCGP, London, 2002.
9. Akturk Z, Dagdeviren N, Sahin EM, Ozer C, Yaman H, Goktas O, Filiz TM, Topsever P, Onganer E, **Aydın S**, Yaris F ve Maras İ. Patients evaluate Family Practice: Turkey results of EUROPEP. Poster. Proc. 2nd EQUIP Conference, Lisbon, EQUIP, 2002.

10. **Aydın S**, Yaris F. Antibiotic prescribing attitudes of residents. Oral. Proc. European General Practice Research Workshop/Network Meeting, Ankara, 2003.
11. **Aydın S**, Yaris F. Opinions of students on medical education and primary care in Turkey. Poster. Proc. WONCA EUROPE 2003, 9th European Society of General Practice/Family Medicine Regional Conference, 235, Slovenia Family Medicine Society, Ljubljana, 2003.
12. Yaris F, Dikici M, **Aydın S**. Smoke-related cancers in Turkey and developed countries. Poster. Proc. The First Regional Meeting of the Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, Izmir, 2003.
13. Arviş H, **Aydın S**, Gemalmaz A, Başak O. Factors related to contraceptive choices. Poster. WONCAEUROPE, İstanbul, 2008.
14. Ergun Y, Gemalmaz A, **Aydın S**, Başak O. Quality of life and related factors in osteoporosis. Poster. WONCAEUROPE, İstanbul, 2008.
15. Erel O, Alacam HO, **Demirag S**, Dirlik M, Ozkok MS, Katkıcı U. Examination of refugee deaths in Aydın. Poster. 4.Mediterranean Academy of Forensic Sciences Meeting, Antalya, 2009.
16. Şensoy N, Gemalmaz A, **Demirağ SA**. A study on AIDS related knowledge, attitude and behaviour of the university students in Turkey. Poster. 19. WONCA WORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
17. Gemalmaz A, **Aydın SD**, Elveren C. Antenatal care and related factors in women who delivered in Aydın Maternity Hospital. Oral presentation. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
18. Gemalmaz A, **Demirag SA**, Bozkaya AO, Şensoy N. Brief educational intervention improves primary care physicians' knowledge of menopause. Oral. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
19. **Demirag SA**. Breastfeeding attitudes of nurses and midwives in Turkey. Oral. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
20. **Demirag SA**, Gemalmaz A, Bozkaya AO, Özçakır A. Quality of life in the elderly: data from a nursing home. Oral. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.

21. **Demirag SA**, Gemalmaz A, Şahin M. Contraception choices of nurses in Turkey: does education affect attitudes? Oral. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
22. Gemalmaz A, **Demirag SA**, Bozkaya AO. Osteoporosis screening in nursing home residents. Oral. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
23. Ozcakil A, Sadıkoğlu G, **Aydın S**, Bilgel N, Sakarya SA. Nurses: the bridge between doctors and patients in complementary and alternative medicine. Oral. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
24. **Demirag SA**, Gemalmaz A, Erel O, Özçakır A. Stop domestic violence: international research workshop for identifying and responding. WORKSHOP. 19. WONCAWORLD Conference, Cancun-Mexico, 2010.
25. Yener OF, Artıran FI, Aydoğan U, Akturk Z, **Aydın SD**, Dikici M, Yaris F. Perceptions of medical students about the family medicine and primary health care services. Oral. 17th WONCA Europe, Poland 2011.
26. Erel Ö, Alaçam HÖ, **Demirağ S**, Dirlik M, Özkök MS, Katkıcı U. Examination of refugee deaths in Aydın. 4.Mediterranean Academy of Forensic Sciences Meeting. Poster. Antalya, 2009 .

6-Tez danışmanlığı

- Özkan Ş. “SDÜ Aile Hekimliği ve Check-up Polikliniği’ne başvuran hastalarda kardiyovasküler risk faktörlerinin araştırılması”. 2003-2006.
- Arviş H. “Aydın Doğumevi aile planlaması polikliniğine başvuran kadınların kontraseptif yöntem seçimi ve etkileyen faktörler.” 2005-2007
- Kalak Ö. “Doğumevi’ne başvuran kişilerin aile planlaması danışmanlığı konusundaki düşünceleri.” 2005-2007
- Sancaktar Ö. “Uzmanlık eğitimi programlarıyla ilgili gelişmelerin aile hekimliği asistanlarının kendi eğitimlerine bakışları ve gelecekle ilgili beklentileri üzerine etkisi.” 2011-2013

7- Projeler

- TAHMOPA, Türkiye Aile Hekimleri Menopozda Osteoporoz Prevelansı Araştırması projesi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı projesi, proje yürütücüsü, 2005
- Türkiye’de tamamlayıcı ve alternatif tedavi sıklığı. Erciyes Üniversitesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı projesi, proje yürütücüsü, 2005-2007
- Deneysel Siyatik Sinir Ezilme Yaralanmasında Nicergolinin Akut dönem Etkilerinin Değerlendirilmesi. 2010- Araştırmacı
- Trichomonas vaginalis’in Aktin gen bölgesi kullanılarak PCR- RFLP (Restriction fragment lenght polymorphism) ile Moleküler tiplendirmesi (Tez Projesi). Araştırmacı, 2011-

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez aşaması sırasında bilgilerinden yararlandığım, eğitimime büyük katkıları olan tez hocam Hatice Ertabaklar başta olmak üzere, hocalarım Sema Ertuğ ve Bülent Bozdoğan'a, zaman, sabır ve emeklerini esirgemeyen Erdoğan Malatyalı ve Serçin Özlem Çalışkan'a, doktora süresince tanıma mutluluğuna eriştiğim Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı ailesine, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline, aileme ve çocuklarıma, bugünlere ulaşmamda katkıda bulunan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.