

Trichomonas vaginalis'in Tanısında Konvansiyonel Yöntemlerin Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Metronidazol Direncinin Araştırılması

Comparison of Conventional Methods with Molecular Methods in the Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* and Investigation of Metronidazole Resistance

Yener ÖZEL¹(ID), İbrahim ÇAVUŞ^{2,4}(ID), Akın USTA³(ID), Gülhan VARDAR ÜNLÜ¹(ID), Ahmet ÖZBİLGİN²(ID), Mehmet ÜNLÜ¹(ID)

¹ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

¹ Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye.

² Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

² Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Türkiye.

³ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Balıkesir.

³ Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics, Balıkesir, Türkiye.

⁴ Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Manisa.

⁴ Manisa Celal Bayar University, Institute of Postgraduate Education, Manisa, Türkiye.

*Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP 2019-123 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**Bu çalışma, Uluslararası 22. Parazitoloji Kongresi (11-15 Ekim 2021, Aydın)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Özel Y, Çavuş İ, Usta A, Vardar Ünlü G, Özbilgin A, Ünlü M. *Trichomonas vaginalis*'in tanısında konvansiyonel yöntemlerin moleküler yöntemlerle karşılaştırılması ve metronidazol direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2023;57(4):625-638.

ÖZ

Trikomoniyaz, *Trichomonas vaginalis*'in etken olduğu ve cinsel yolla bulaşan parazit kaynaklı bir enfeksiyondür. Trikomoniyaz tanısında, duyarlılığı düşük olmakla birlikte, ucuz ve hızlı bir yöntem olan direkt mikroskopi (DM) tercih edilmektedir. Altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemleri ise, duyarlılığının yüksek olmasına karşın, deneyimli personel gereksinimi ve 2-7 gün içinde sonuç alınması nedeniyle ancak belirli merkezlerde uygulanabilmektedir. Bu çalışmada, *T.vaginalis*'in rutin tanısında kullanılan konvansiyonel mikroskopik ve kültür yöntemlerinin polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemiyle karşılaştırılması ve klinik örneklerden izole edilen *T.vaginalis* izolatlarında, metronidazol direnciyle ilişkili olduğu düşünülen nitroreduktaz gen bölgesindeki *ntr4* ve/veya *ntr6* gen polimorfizminin araştırılması amaçlanmıştır. Mart 2019-Ağustos 2021 tarihleri arasında, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran 200 hastanın jinekolojik muayenelerinde, vajina arka forniksten iki adet steril eküvyon ile vajinal sürüntü örneği toplanmıştır. İlk sürüntü örneği doğrudan mikroskopik inceleme, Giemsa boyama ve konvansiyonel PCR çalışması için kullanılmış; ikinci sürüntü örneği ise *T.vaginalis* kültürü için "trypticase-yeast-extract-maltose (TYM)" besiyerine alınmış ve 37 °C'de sekiz gün boyunca takip edilmiştir. Tüm örnekler *T.vaginalis* varlığı açısından, β-tubulin (*btub1*) gen bölgesine özgü primerler ve TYM besiyerinde üretilen *T.vaginalis* suşları metronidazol direnci açısından

nitroredüktaz gen bölgesine özgü primerler ile konvansiyonel PCR kullanılarak incelenmiştir. Metronidazol direnciyle ilişkili polimorfizm saptanan izolatlarla ayrıca ilaç direnç testi uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 200 hasta örneğinin sekizi (%4) hem kültür/boyama hem de PCR yöntemiyle pozitif bulunmuştur. Hastaların yaş ortalaması 39.9 iken *T.vaginalis* pozitif saptanan hastaların yaş ortalaması 41.8 olarak saptanmıştır. Hastalarda en sık rastlanan klinik bulguların, kötü kokulu vajinal akıntı (%36), kasık ağrısı (%21), vajinal kaşıntı (%19) ve idrar yaparken yanma (%18) olduğu tespit edilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen sekiz adet *T.vaginalis* izolatının üçünde, PCR ile metronidazol direnciyle ilişkili olduğu düşünülen *ntr6* gen polimorfizm varlığı gösterilmiştir. *ntr6* gen polimorfizmi tespit edilen üç izolatin, fenotipik olarak da metronidazole dirençli (MLK= 390 µM) olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, sekiz klinik izolattan üçünün sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle metronidazole dirençli olmasının yanı sıra *ntr6* gen polimorfizmi de göstermeleri, metronidazol direnciyle *ntr6* gen polimorfizmi arasında yakın bir ilişki olabileceği tezini desteklemektedir. Sonuç olarak, *T.vaginalis* tanısında, mikroskopi yöntemine ek olarak, kültür ve moleküler yöntemlerin de kullanılması, etkenin laboratuvar tanısının dahadoğru olmasına, metronidazol direncinin moleküler ve fenotipik olarak tespit edilebilmesine, ülkemizdeki metronidazol direnç oranlarının belirlenmesine ve tedavi protokollerinin bu veriler çerçevesinde güncellenmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: *T.vaginalis*; PCR; *Trichomonas* kültürü; TYM; metronidazol direnci.

ABSTRACT

Trichomoniasis is a sexually transmitted parasitic infection caused by *Trichomonas vaginalis*. In the diagnosis of trichomoniasis, direct microscopy (DM) is preferred, which is a cheap and fast method, although it has low sensitivity. Culture methods, which are accepted as the gold standard, can only be applied in certain centers due to the need for experienced personnel and the ability to get results within 2-7 days, despite their high sensitivity. In this study, it was aimed to compare conventional microscopic and culture methods used in the routine diagnosis of *T.vaginalis* with polymerase chain reaction (PCR) method and to investigate *ntr4* and/or *ntr6* gene polymorphism in the nitroreductase gene region, which are thought to be associated with metronidazole resistance in *T.vaginalis* strains isolated from clinical specimens. Vaginal swab specimens were collected from the posterior fornix of the vagina with two sterile ecuvion sticks during the gynecological examinations of 200 patients who applied to the Balkesir University Health Practice and Research Hospital, Obstetrics and Gynecology Polyclinic between March 2019 and August 2021. The first swab sample was used for direct microscopic examination, Giemsa staining and conventional PCR analysis, while the second swab specimen was taken into trypticase-yeast-extract-maltose (TYM) medium for *T.vaginalis* culture and followed for eight days at 37 °C. All specimens were screened for the presence of *T.vaginalis* using primers specific to the β -tubulin (*btub1*) gene region and clinical isolates grown in TYM medium were examined for metronidazole resistance using primers specific for the nitroreductase gene region by using conventional PCR. Drug resistance test was also performed for the isolates in which polymorphism associated with metronidazole resistance was detected. Eight (4%) of 200 patient specimens were found positive by both culture/staining and PCR methods. The mean age of the patients included in the study was 39.9, while the mean age of the patients with positive *T.vaginalis* was 41.8. The most common clinical findings in the patients were foul-smelling vaginal discharge (36%), groin pain (21%), vaginal itching (19%), and burning sensation during urination (18%). In three out of eight *T.vaginalis* strains isolated from clinical samples, the presence of polymorphism in the *ntr6* gene, which is thought to be associated with metronidazole resistance, was demonstrated by PCR. It was observed that three isolates with *ntr6* gene polymorphism were phenotypically resistant to metronidazole (MLK= 390 µM). In this study, the fact that three of eight clinical isolates that were resistant to metronidazole by the broth microdilution method and as well as showing *ntr6* gene polymorphism supported the thesis that there might be a close relationship between metronidazole resistance and *ntr6* gene polymorphism. As a result, the use of culture and molecular methods in the diagnosis of *T.vaginalis*, in addition to the microscopy method, may contribute to a more accurate laboratory diagnosis of the agent, to detect metronidazole resistance molecularly and phenotypically, to determine metronidazole resistance rates in our country and to update treatment protocols within the framework of these data.

Keywords: *T.vaginalis*; PCR; *Trichomonas* culture; TYM; metronidazole resistance.

GİRİŞ

Trichomonas vaginalis, cinsel yolla bulaşan hastalıklardan sorumlu, dünyadaki en yaygın protozoon parazittir¹. Hastalık seyri, kadınlarda asemptomatikten (%50'ye kadar) ciddi sorunlar oluşturan şiddetli enfeksiyonlara kadar değişebilmektedir. Klasik semptomlar arasında, lokal ağrı ve tahrişe neden olan kötü kokulu bir akıntı bulunmaktadır. Parazit ayrıca kısırlık, plasental membranların erken yırtılması, erken doğum, düşük ağırlıklı bebek doğumu ve yenidoğan ölümü gibi ciddi sonuçlara yol açabilmektedir². İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunun hem erkek hem de kadınlarda *T.vaginalis* enfeksiyonuna yatkınlığı arttırdığı bildirilmiştir³. Bir başka çalışma, *T.vaginalis* enfeksiyonunun, insan papilloma virüs (HPV) enfeksiyonunu desteklediğini ve servikal neoplazi riskini arttırdığını göstermiştir⁴. Enfekte kadınların %25-50'sinde klinik belirtiler görülmemekle birlikte, menstrüasyon sırasında daha da kötüleşen semptomlar gelişebilmektedir⁵. Kadınların %2'sinde servikte "çilek görüntüsü" gözlenmektedir⁶. Sağlıklı yetişkin kadınlarda, vajinal pH= 4 civarındayken, enfeksiyon sırasında, pH≥ 7'ye yükselmektedir⁷. Menstrüasyon sırasında görülen adet kanaması yüksek demir konsantrasyonuna sahip zengin bir ortam oluşturduğu için *T.vaginalis*'in üremesine, vajinal epitel hücrelerine iyi derecede bağlanmasına ve sonuç olarak patogenezin kötüleşmesine neden olmaktadır⁸.

Tanı ve ilaç aktivitesinin değerlendirilmesinde de halen kullanılan direkt mikroskopik incelemeyle semptomatik kadınlar arasında değişen duyarlılıkta (%38-82) pozitiflik saptanmaktadır^{9,10}. *T.vaginalis*'in vajinal örnekten izolasyonu için Diamond, TYM veya Trichosel besiyeri gibi özel bir besiyeri ortamına gereksinim bulunmaktadır. Ancak, parazitin üretilmesi için kullanılan besiyerleri her laboratuvarında bulunmamakta ve inkübasyon süresinin yedi günü bulması tanı koyma süresini uzatmaktadır¹¹. Polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] tabanlı testler ile az sayıda hareketliliğini kaybetmiş parazit bulunan numunelerde bile yüksek duyarlılıkla tanı konabilmektedir¹².

5-nitroimidazol türevi ilaçlar trikomoniyaz tedavisinde ilk tercih olarak kullanılmaktadır. Metronidazol (α,β -hidroksietil-2-metil-5-nitroimidazol) 1959'da geliştirilmiş, 1960'larda ise trikomoniyaz tedavisi için onay almıştır. Bu ilaç, sistemik kullanım ile yüksek tedavi etkinliğine sahip olan tek ilaç olmuştur¹³. Tinidazol bir nitroimidazol türevi olup 1969 yılında kullanıma girmiştir. Tinidazol tedavisi metronidazole göre daha düşük doz gerektirmesine karşın ateş ve hafif yan etkiler gösterebilmektedir¹⁴. *T.vaginalis* suşları için tinidazolün minimum letal dozu metronidazolden daha düşüktür ve henüz tinidazol için direnç bildirilmemiştir¹⁵. Tekrarlayan veya dirençli trikomoniyaz enfeksiyonları yüksek metronidazol dozu ile daha uzun sürede tedavi edilebilmektedir. Ancak yüksek dozlarda ilaç kullanımı yan etkilerin artmasına ve direnç gelişimine neden olmaktadır¹⁶. Metronidazol direncinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber, bunun birkaç nokta mutasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir¹⁷.

Bu çalışmada, *T.vaginalis*'in rutin tanısında konvansiyonel yöntemler, kültür yöntemi ve PCR yönteminin hassasiyet, etkinlik ve verimlilik açısından karşılaştırılması, ayrıca TYM

besiyerlerinde üretilen *T.vaginalis* suşlarında metronidazol direncinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 06.02.2019 ve Karar No: E.6738).

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya Mart 2019-Şubat 2021 tarihleri arasında, vajinal akıntı şikayetiyle Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran 200 hasta dahil edildi.

Triptikaz Maya Ekstraktı Maltoz Besiyerinin Hazırlanması

Triptikaz Maya Ekstraktı Maltoz (TYM) besiyeri (pH= 6) otoklavlanarak, 45 °C'ye soğutuldu ve içine %10 inaktive at serumu, 100 U/mL penisilin ve 10 µg/mL gentamisin ilave edilerek ve 15 ml'lik vidalı kapaklı cam tüplere bölündü, +4 °C'de saklandı.

Hasta Örneklerinin Mikroskopik İncelemesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi için Hazırlanması

Hastaların jinekolojik muayenesi esnasında vajen arka fornixten iki adet pamuklu eküvyon ile sürüntü örnekleri alındı. Birinci sürüntü örneği 5 ml steril serum fizyolojik içeren tüpe konularak 30 sn vortekslenildi ve 1500 xg de beş dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı atılarak dipte kalan çökelti 0.5 ml serum fizyolojik ile sulandırıldı, iki ayrı steril tüpe 200 µl aktarılarak PCR için ayrıldı ve -20 °C'de saklandı. Kalan 100 µl ise direkt mikroskopik inceleme ve Giemsa boyama için ikişer adet lama yayıldı. Direkt inceleme için bir yayma ışık mikroskopunda 10x ve 40x büyütme ile hareketli *T.vaginalis* trofozoitlerinin varlığı açısından incelenirken, diğer yayma ise üç dk metanol ile fikse edilerek Giemsa ile boyanıp *T.vaginalis* trofozoitlerinin varlığı açısından 100x büyütme ile incelendi.

Trichomonas vaginalis Kültürü

Hastalardan alınan ikinci vajinal sürüntü örneği TYM besiyeri içine alındıktan sonra besiyeri sekiz gün boyunca 37 °C'de aerobik ortamda tutuldu ve iki günde bir trofozoit varlığı açısından kontrol edildi. Pozitif saptanan örnekler pasajlanarak üreyen parazitlerin logaritmik faza girmeleri sağlandı. Üretilen parazitler, metronidazol ilaç direnç testi ve DNA izolasyonu için -80 °C'de saklamaya alındı.

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Metronidazol Direncinin Belirlenmesi

Metronidazol direncinin belirlenmesinde in vitro sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı¹⁸. Steril düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropipların her bir kuyucuğuna 100 µl TYM besiyeri konularak metronidazolun son konsantrasyonu, 781.25-0.38 µg/mL olacak şekilde seri dilüsyonu yapıldı. Konsantrasyonu 1 X 10⁴ parazit/mL olarak ayarlanan parazit

süspansiyonu, 100'er µl kuyucuklara dağıtıldı. Kör (blank) ve pozitif kontrol için kuyucuklar ayrılan mikropiplerin 48 saat 37 °C'de inkübe edilmesini takiben parazit canlılığı ve Mik değerleri invert mikroskopta değerlendirildi. İzolatların metronidazole direnç ve duyarlık durumları, metronidazol dirençli *T.vaginalis* ATCC 50143 ve metronidazol duyarlı *T.vaginalis* ATCC 30188 suşları ile karşılaştırılarak belirlendi. Deneyler iki kez tekrarlandı.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, "High Pure PCR Template Preparation" kiti ile üretici firmanın protokolü kullanılarak yapıldı (Roche Applied Science). DNA izolasyonu için, her bir hasta örneğinden hazırlanan çökeltiden ve TYM besiyerinde üretilmiş *T.vaginalis* süspansiyonundan 200'er µl kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hasta numunelerinde *T.vaginalis* tespiti için, aşağıdaki dizileri verilen β-tubulin (*btub1*) gen bölgesine özgü primer çiftleri kullanıldı (Forward primer 5'- CAA CAC AAC AGC CTT CCG TG ve revers primer 5'- ACC TTC CTC GTC TTC TTC GC- 3'). PCR karışımı, 5 µl kalıp DNA, 1 µl forward primer, 1 µl revers primer, 12.5 µl 2X PCR Dye Masterix II (GMBiolab, Taiwan), 5.5 µl DNaz/RNaz içermeyen su ile hazırlandı. PCR amplifikasyon reaksiyonu, 94 °C'de beş dk ön denatürasyon sonrası 40 döngü; 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 60 °C'de 30 sn bağlanma, 72 °C'de 45 sn uzama ve 72 °C'de yedi dk sonlanma şeklinde PCR cihazında uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü ve oluşan ürünler UV altında görüntüledi.

TYM besiyerinde üretilen *T.vaginalis* suşlarından tekrar DNA izole edildi ve metronidazol direnciyle ilişkili olduğu düşünülen *ntr4* veya *ntr6* gen polimorfizminin saptanması için aşağıda dizileri verilen nitroredüktaz gen bölgesine özgü primer çiftleri kullanıldı^{17,19}.

ntr4Tv F 5'- ATG AGT GTC CTT AAG TGC ATC CAA- 3'

ntr4Tv R 5'- TTA GTC GGC ATA AAC TAC CTT AGA- 3'

ntr6Tv F 5'- CAT TGA ATT TAT TCG TTC AAA ATT- 3'

ntr6Tv R 5'- TTA TTC AAT GTA TGT AAC CTT TCT- 3'

TVK3 5'- ATT GTC GAA CAT TGG TCT TAC CCT C- 3'

TVK7 5'- TCT GTG CCG TCT TCA AGT ATG C- 3'

PCR karışımı, 5 µl kalıp DNA, 10 µM her bir primerden, 12.5 µL PCR "Quantitech Master Mix (Qiagen, Almanya)", 5.5 µL DNaz/RNaz su ile hazırlandı. PCR amplifikasyon reaksiyonu, 95 °C'de 15 dk ön denatürasyon sonrası 40 döngü (95 °C'de 20 sn denatürasyon, 60 °C'de 60 sn bağlanma, 72 °C'de 60 sn uzama) ve 72 °C'de yedi dk sonlanma olarak PCR cihazında uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü ve oluşan ürünler UV altında görüntüledi.

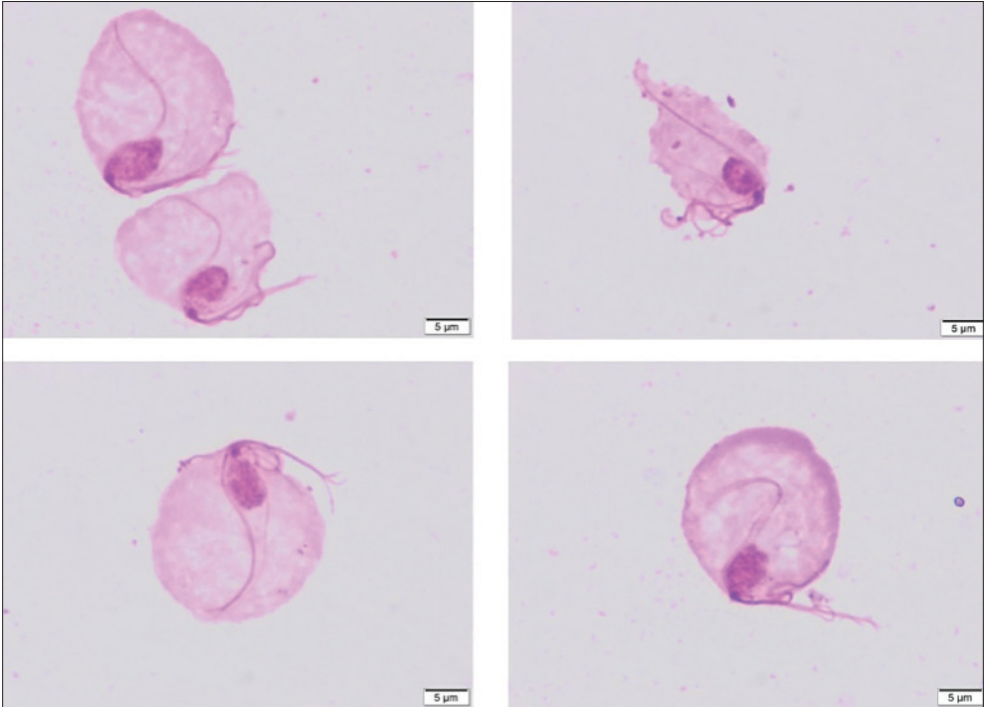
BULGULAR

Bu çalışmaya Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine Mart 2019-Şubat 2021 tarihleri arasında ayakta başvuran 18 yaş ve üzeri 200 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması 39.9 olarak bulunurken, *T.vaginalis* açısından pozitif saptanan hastaların yaş ortalaması ise 41.8 olarak saptanmıştır. Hastalarda en sık görülen klinik semptomlar kötü kokulu akıntı (%36), kasık ağrısı (%21) vajinal kaşıntı (%19) ve idrar yaparken yanma (%18) olarak tespit edilmiştir.

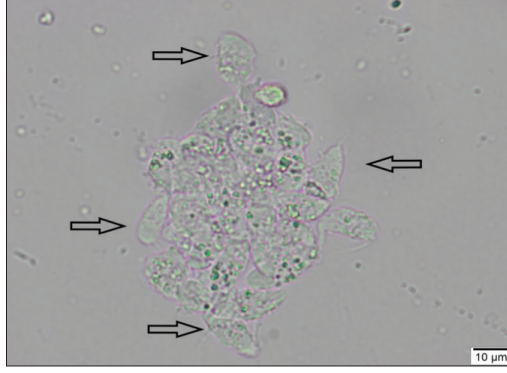
Çalışmaya dahil edilen 200 sürüntü örneğinin sekizinde (%4) hem direkt mikroskopik incelemede hem de Giemsa boyalı preparatlarda *T.vaginalis* trofozoitleri saptanmıştır. Direkt mikroskopik incelemede hareketli trofozoit yapıların görülmesi, Giemsa boyalı incelemede ise kamçı, yarım dalgalanan zar ve hücre çekirdeğinin görülmesi ile tanı konulmuştur (Şekil 1).

Hastalardan alınan 200 sürüntü örneğinin sekizinde (%4) *T.vaginalis* üremesi gözlenmiştir. Hareketli trofozoit varlığı, TYM besiyerlerinden her gün kontrol preparatları hazırlanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (Şekil 2).

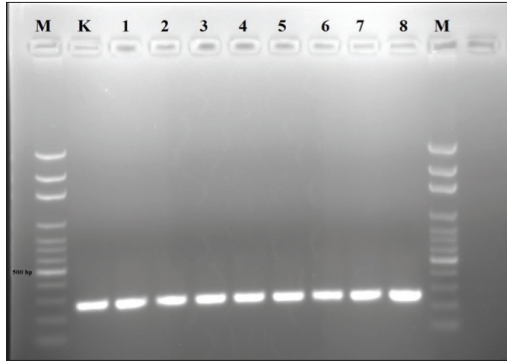
Hastalara ait 200 adet vajinal sürüntü örneğinin sekizinde (%4) PCR yöntemiyle *T.vaginalis* varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 1. Giemsa boyalı preparatta *T.vaginalis* trofozoitleri.



Şekil 2. TYM besiyerinde üremiş ve kümeleşmiş *T.vaginalis* trofozoitleri.



Şekil 3. PCR ile *T.vaginalis* pozitif saptanan örneklerin jel görüntüsü.

M: Moleküler belirteç, K: Pozitif kontrol, 1 numaralı sütun: TV-2 izolati, 2 numaralı sütun: TV-26 izolati, 3 numaralı sütun: TV-48 izolati, 4 numaralı sütun: TV-55 izolati, 5 numaralı sütun: TV-58 izolati, 6 numaralı sütun: TV-66 izolati, 7 numaralı sütun: TV-68 izolati, 8 numaralı sütun: TV-78 izolati.

Tanı yöntemlerine göre *T.vaginalis*'in pozitiflik oranı karşılaştırıldığında, incelenen 200 adet hasta örneğinde direkt mikroskopi, Giemsa boyama, kültür ve PCR yöntemleriyle sekiz adet (%4) *T.vaginalis* pozitifliği saptanmıştır (Tablo I).

Hasta örneklerinden üretilen *T.vaginalis* izolatlarının metronidazol direnci, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Metronidazol direnç durumu, dirençli ve duyarlı *T.vaginalis* referans suşları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Sekiz klinik *T.vaginalis* izolatının üçü metronidazole dirençli bulunmuştur. Klinik izolatlara ve referans suşlara ait MİK ve minimum letal konsantrasyon (MLK) değerleri Tablo II'de verilmiştir.

ntr4 ve/veya *ntr6* gen polimorfizm varlığı konvansiyonel PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kültür ile üretilen *T.vaginalis* izolatlarından elde edilen DNA örnekleri özgül pri-

Tablo I. *T.vaginalis* Pozitif Örneklerin Yöntemlere Göre Dağılımı

Örnek No	Direkt İnceleme	Giemsa Boyama	Kültür	PCR
TV-2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-26	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-48	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-55	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-58	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-66	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-68	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TV-78	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo II. Metronidazol için Saptanan MİK ve MLK Değerleri

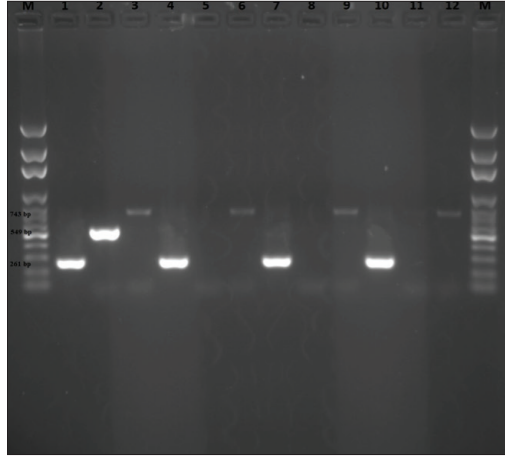
Örnek No	MİK (µM)	MLK (µM)	Fenotip
TV-2	3	12	Duyarlı
TV-26	48	390	Dirençli
TV-48	6	12	Duyarlı
TV-55	3	12	Duyarlı
TV-58	6	12	Duyarlı
TV-66	48	390	Dirençli
TV-68	48	390	Dirençli
TV-78	6	24	Duyarlı
TV ATCC 50143	48	390	Dirençli
TV ATCC 30188	6	24	Duyarlı

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, MLK: Minimum letal konsantrasyon, ATCC: American type culture collection, µM: Mikromolar.

merler kullanılarak polimorfizm açısından incelenmiş ve üç adet *T.vaginalis* izolatında *ntr6* polimorfizmi pozitif iken tümünde *ntr4* gen polimorfizmi negatif tespit edilmiştir (Şekil 4). Metronidazol direnciyle ilişkili olduğu düşünülen *ntr6* polimorfizmi pozitif saptanan üç *T.vaginalis* izolatı, aynı zamanda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle de metronidazole dirençli bulunmuştur (Tablo III).

TARTIŞMA

Trichomonas vaginalis, 1836 yılında Donné tarafından semptomları olan kadınların vajinal sıvısında tanımlanmıştır. Direkt mikroskopik inceleme yönteminin duyarlılığı değişken olup semptomatik kadınlarda duyarlılıkları %38-82 arasında değişmektedir⁹. Vajinal sıvıdan yapılacak kültür işlemleri, TYM, CPLM, Diamond, Trichosel veya InPouch besiyerlerinin kullanılmasını gerektirmektedir. Kültür yönteminin duyarlılığı yüksek olsa da, kültür besiyerlerinin komplike olması ve *T.vaginalis*'in üremesi için yedi güne ihtiyaç olması gibi bazı dezavantajları vardır²⁰. *T.vaginalis*'in tanısında kullanılan yöntemlerin



Şekil 4. Klinik izolatlarda *ntr6* gen polimorfizmi. M: Moleküler belirteç, 1. sütun: TV pozitif kontrol, 2. sütun: *ntr4* pozitif kontrol, 3. sütun: *ntr6* pozitif kontrol, 4-7-10. sütunlar sırasıyla TV-2, TV-66 ve TV-68 izolatları için referans bantlar, 6-9-12. sütunlar sırasıyla TV-2, TV-66 ve TV-68 izolatlarındaki *ntr6* varlığını gösteren referans bantlar.

Tablo III. Metronidazol Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması

Örnek No	<i>ntr4</i>	<i>ntr6</i>	MİK (µM)	MLK (µM)	Fenotip	Genotip
TV-2	Negatif	Negatif	3	12	Duyarlı	Duyarlı
TV-26	Negatif	Pozitif	48	390	Dirençli	Dirençli
TV-48	Negatif	Negatif	6	12	Duyarlı	Duyarlı
TV-55	Negatif	Negatif	3	12	Duyarlı	Duyarlı
TV-58	Negatif	Negatif	6	12	Duyarlı	Duyarlı
TV-66	Negatif	Pozitif	48	390	Dirençli	Dirençli
TV-68	Negatif	Pozitif	48	390	Dirençli	Dirençli
TV-78	Negatif	Negatif	6	24	Duyarlı	Duyarlı
TV ATCC 50143	Pozitif	Pozitif	48	390	Dirençli	Dirençli
TV ATCC 30188	Negatif	Negatif	6	24	Duyarlı	Duyarlı

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, MLK: Minimum letal konsantrasyon, ATCC: 'American type culture collection', µM: Mikromolar.

kiyaslandığı bazı ulusal çalışmalar Tablo IV'te özetlenmiştir. 2005-2022 yılları arasında yapılan bu çalışmalarda *T.vaginalis* saptanma sıklığı %1.9-10 arasında değişmektedir²¹⁻²⁹. *T.vaginalis*'in tanısında PCR-dışı yöntemler karşılaştırıldığında, genellikle kültür yönteminin mikroskopi yöntemine kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu, PCR yönteminin de dahil edildiği çalışmalarda ise PCR'nin diğer iki yöntemden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir^{22,23,25,26,29}. Ülkemizde *T.vaginalis* prevalansına yönelik olarak, 2020 yılından sonra yöntemsel karşılaştırmaların yapıldığı çalışmaların az sayıda

Tablo IV. *T.vaginalis* Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırıldığı Çalışmalar

Yazar	Yıl	Çalışmanın Yapıldığı Yer	Hasta Sayısı/TV (+) Hasta Sayısı	<i>T.vaginalis</i> Sıklığı	Mikroskopi	Kültür	PCR
Öztan ve ark. ²¹	2005	Manisa	233/11	4.7%	Direkt: 11	TYM: 11	(-)
Tamer ve ark. ²²	2008	Kocaeli	128/12	9.4%	Direkt: 7	TYM: 12 CPLM: 9	(-)
Keleştimur ve Kaplan ²³	2010	Elazığ	157/6	3.8%	Direkt: 3	TYM: 5	(-)
Keşli ve ark. ²⁴	2012	Konya	70/6	9%	Direkt: 6 Giemsa: 6	(-)	(-)
Akyıldız ve ark. ²⁵	2017	Sivas	100/4	4%	(-)	CPLM:4 TM: 4 Inpouch: 4	(-)
Doğan ve Gitmez ²⁶	2019	Eskişehir	406/35	8.6%	Direkt: 28 Giemsa: 27	CPLM: 31	35
Yazısız ve ark. ²⁷	2020	Antalya	215/4	1.9%	Direkt: 4	TM: Üreme yok	4
Karakoç ²⁸	2021	İstanbul	262/6	%2	Direkt: 6	(-)	(-)
Turan Faraşat ve ark. ²⁹	2022	Manisa	100/10	%10	Direkt: 6 Giemsa: 6	TYM: 6	10
Bu çalışma	2023	Balıkesir	200/8	4%	Direkt: 8 Giemsa: 8	TYM: 8	8

TYM: 'Tripticase yeast medium', CPLM: 'Cystine peptone liver infusion maltose', TB: *Trichomonas* buyyon.

olmasının COVID-19 pandemisinin yarattığı olumsuz şartlara bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ancak pandemi süreci birçok laboratuvarın moleküler alt yapısının gelişmesine de katkı sağlamıştır. Bu nedenle, içinde *T.vaginalis*'in de bulunduğu, pek çok enfeksiyon etkeninin hızlı ve yüksek duyarlılıkta tanımlanabildiği sendromik multipleks PCR kitlerinin kullanımındaki artışın bu gelişmeye bağlı olduğu düşünülebilir. Bozdemir ve arkadaşları tarafından yapılan HIV pozitif 76 erkek, 14 kadın hastada cinsel yolla bulaşan enfeksiyon etkenlerinin (CYBE) multipleks PCR ile araştırıldığı bir çalışmada³⁰, hastaların hiçbirinde *T.vaginalis* saptanmamıştır. Benzer şekilde, Ayaz ve arkadaşları³¹ tarafından HIV pozitif 158 erkek hastaya ait örneklerde CYBE etkenleri multipleks PCR ile araştırılmış ancak *T.vaginalis* tespit edilmemiştir. Bu çalışmada kullandığımız tüm yöntemler ile aynı örnekler pozitif bulunmuş olup *T.vaginalis* sıklığı %4 olarak saptanmıştır. Tüm yöntemler ile aynı sonucun elde edilmesinin, tecrübeli personel ve hassas çalışma protokollerinin uygulanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak daha fazla sayıda klinik örnek üzerinde yapılacak çalışmalarda, duyarlılık bakımından yöntemler arasında farklılık olabileceği tahmin edilmektedir. Basit, ucuz ve hızlı bir yöntem olan mikroskopi, tecrübeli personel varlığında oldukça etkili olmakla birlikte kültür ve PCR yöntemiyle desteklendiğinde tanı

hassasiyeti önemli ölçüde artabilir. Kültür ile parazitin üretilmesi de ayrıca ilaç direnç testleri ve diğer araştırmalar için avantaj sağlayacaktır.

Trikomoniyazın tedavisinde metronidazol ve tinidazol gibi nitroimidazol bileşikleri uzun süredir kullanılmakta olup yakın zamanda seknidazol de FDA tarafından onaylanmıştır³². Tinidazolün yüksek maliyeti nedeniyle tedavide ilk tercih metronidazoldür¹³. Metronidazol, anaerobik ve mikroaerofilik bakteriler ile *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* ve *T.vaginalis* gibi protozoonların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır^{33,34}. Dirençli *T.vaginalis* olguları 1962'den beri bildirilmesine rağmen özellikle son dönemlerde metronidazol direnci ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir¹³. *T.vaginalis* enfeksiyonlarında standart metronidazol dozuna yanıt vermeyen parazitler daha uzun sürede ve daha yüksek dozlarda tedavi edilebilmekte ve bu durum direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır¹⁶. Ülkemizde metronidazol direncinin araştırıldığı az sayıda çalışma mevcut olup Özçelik ve arkadaşları¹⁹ metronidazol direnç oranını %33, Ertabaklar ve arkadaşları³⁵ ise %7.5 olarak rapor etmiştir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda ise direnç oranının %4.3 ile %66 arasında değiştiği bildirilmiştir³⁶. Japonya'da *T.vaginalis* prevalansının ilk kez araştırıldığı güncel bir çalışmada ise %4.2 oranında *T.vaginalis* saptanmış ve tüm izolatlar metronidazole duyarlı bulunmuş, ancak iki izolatın metronidazol duyarlılığında azalma olduğu bildirilmiştir³⁷. Metronidazol direncinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ancak bunun birkaç nokta mutasyonuna bağlı olabileceği varsayılmaktadır¹⁷. Anaerobik dirençte, anahtar enzim piruvat ferredoksin oksidoredüktazın (PFOR) aktivitesinin azalması veya kaybolması ile ilacın metabolizması bozulmaktadır³⁸. Aerobik dirençte ise dirençli *T.vaginalis* suşlarında ferredoksin geninin transkripsiyonu azalmaktadır³⁹. Aerobik ve anaerobik metronidazol dirençlerinin, flavin redüktaz aktivitesinde bir azalmaya da bağlı olabileceği düşünülmektedir⁴⁰. Paulish-Miller ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada¹⁷, metronidazol direncinin *ntr4* ve/veya *ntr6* gen polimorfizmi ile yakından ilişkili olabileceği ve ilgili mutasyonların varlığında nitroredüktaz gen bölgesinde stop kodonlarının oluşmasının, metronidazolün aktif forma indirgenmesine engel olup ilaca karşı direnç gelişmesini tetiklediği ileri sürülmektedir. Benzer şekilde, Özçelik ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmalarında¹⁹ metronidazol dirençli izolatlarda *ntr4* ve *ntr6* mutasyonunun varlığını göstermişlerdir. Ngobese ve arkadaşları³⁶ 2022'de, 385 klinik örneğin %12.2'sinde *T.vaginalis* pozitifliği saptamış ve pozitif örneklerin %45'inde *ntr4*, %51'inde *ntr6* ve %40'ında ise hem *ntr4* hem de *ntr6* mutasyonunun varlığını göstermişlerdir. Xie ve arkadaşları 2023 yılında yaptıkları çalışmada⁴¹, metronidazol etkisi altında *T.vaginalis*'in transkripsiyonel profilini araştırmış ve özellikle tioredoksin ve nitroredüktaz genlerinin ekspresyonunun metronidazol uyarımı sonrası 739.3 kat arttığını ve bu bölgede meydana gelen mutasyonların direnç ile ilişkili olabileceğini ifade etmiştir.

Bu çalışmada, sekiz klinik izolatın üçünün sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle metronidazole dirençli bulunması ve aynı izolatlarda *ntr6* gen polimorfizminin varlığının gösterilmesi, metronidazol direnciyle *ntr6* gen polimorfizmi arasında yakın bir ilişkinin olabileceği tezini desteklemektedir. Nitroredüktaz genlerindeki mutasyonların izlenmesine yönelik

moleküler tabanlı deneyler, metronidazol direnci açısından sürveyans çalışmaları için geçerli bir yöntem olarak kullanılabilir. Ancak söz konusu mutasyonları taşıyan izolatların direnç durumu sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle de doğrulanmalıdır. Çünkü, minimum letal konsantrasyon tespitine (MLK) yönelik kültür bazlı yöntem ile farklı direnç mekanizmaları da saptanabilmektedir. Moleküler alt yapının olmadığı laboratuvarlarda kültür yöntemiyle üretilen *T.vaginalis* izolatlarının metronidazole karşı MLK değerlerinin belirlenmesinin dirençli olguların tespitine (MLK> 50 µg/mL) ve tedavi başarısına katkı sunabileceği bildirilmiştir¹⁵.

Sonuç olarak, *T.vaginalis* tanısında mikroskopi yöntemine ek olarak kültür ve moleküler yöntemlerin de kullanılması, parazitin laboratuvar tanısının daha etkili olmasına, metronidazol direncinin hem moleküler hem de fenotipik olarak tespit edilmesine, ülkemizdeki metronidazol direnç oranlarının daha sağlıklı olarak belirlenmesine ve tedavi protokollerinin bu veriler çerçevesinde güncellenmesine katkı sağlayabilir.

TEŞEKKÜR

T.vaginalis standart suşlarının temin edildiği Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 06.02.2019 ve Karar No: E.6738).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. CDC. Center for Disease Control and Prevention. STI Treatment Guidelines, 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/default.htm> (Accessed date: 20.07.2023).
2. Van Gerwen OT, Opsteen SA, Graves KJ, Muzny CA. Trichomoniasis. *Infect Dis Clin North Am* 2023; 37(2): 245-65. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2023.02.001>
3. Sherrard J, Pitt R, Hobbs KR, Maynard M, Cochrane E, Wilson J, et al. British Association for Sexual Health and HIV (BASHH) United Kingdom national guideline on the management of *Trichomonas vaginalis* 2021. *Int J STD AIDS* 2022; 33(8): 740-50. <https://doi.org/10.1177/09564624221103035>
4. Hamar B, Teutsch B, Hoffmann E, Hegyi P, Váradi A, Nyirády P, et al. *Trichomonas vaginalis* infection is associated with increased risk of cervical carcinogenesis: A systematic review and meta-analysis of 470 000 patients. *Int J Gynaecol Obstet* 2023; 3. <https://doi.org/10.1002/ijgo.14763>
5. Landers DV, Wiesenfeld HC, Heine RP, Krohn MA, Hillier SL. Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190(4): 1004-8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.02.015>
6. Fouts AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: Reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 1980; 141(2): 137-43. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.2.137>
7. Anorlu RI, Fagbenro Beyioku AF, Fagorala T, Abudu OO, Galadanci HS. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in patients with vaginal discharge in Lagos, Nigeria. *Niger Postgrad Med J* 2001; 8(4): 183-6. <https://doi.org/10.4103/1117-1936.170928>

8. Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: Evaluation to execution. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011; 157(1): 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.02.024>
9. Bhesania AH, Narayankhedkar A. Trichomoniasis-a review. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2016; 5(6): 731-41. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.079>
10. Schwabke JR, Lensing SY, Sobel J. Intravaginal metronidazole/miconazole for the treatment of vaginal trichomoniasis. Sex Transm Dis 2013; 40(9): 710-4. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000431069.38601.d5>
11. Van Der Pol B. Clinical and laboratory testing for *Trichomonas vaginalis* infection. J Clin Microbiol 2016; 54(1): 7-12. <https://doi.org/10.1128/JCM.02025-15>
12. Morris SR, Bristow CC, Wierzbicki MR, Sarno M, Asbel L, French A, et al. Performance of a single-use, rapid, point-of-care PCR device for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Trichomonas vaginalis*: A cross-sectional study. Lancet Infect Dis 2021; 21(5): 668-76. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30734-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30734-9)
13. Marques-Silva M, Lisboa C, Gomes N, Rodrigues AG. *Trichomonas vaginalis* and growing concern over drug resistance: A systematic review. J Eur Acad Dermatol Venereol 2021; 35(10): 2007-21. <https://doi.org/10.1111/jdv.17461>
14. Raja IM, Basavareddy A, Mukherjee D, Meher BR. Randomized, double-blind, comparative study of oral metronidazole and tinidazole in treatment of bacterial vaginosis. Indian J Pharmacol 2016; 48: 654. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.194843>
15. Augostini P, Bradley ELP, Raphael BH, Secor WE. In vitro testing of *Trichomonas vaginalis* drug susceptibility: Evaluation of minimal lethal concentrations for metronidazole and tinidazole that correspond with treatment failure. Sex Transm Dis 2023; 50(6): 370-3. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001788>
16. Graves K, Novak J, Secor WE, Kissinger PJ, Schwabke JR, Muzny CA. A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. Parasitology 2020; 147(13): 1383-91. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001237>
17. Paulish-Miller TE, Augostini P, Schuyler JA, Smith WL, Mordechai E, Adelson ME, et al. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes *ntr4Tv* and *ntr6Tv*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(5): 2938-43. <https://doi.org/10.1128/AAC.02370-13>
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement M100-S24, Vol. 34 No. 1, 950 West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA, 2014.
19. Özcelik S, Özpınar N, Karakus S, Akyıldız F, Karakaya O. Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* determined by molecular and conventional methods. Trop Biomed 2018; 35(1): 188-94.
20. Van Gerwen OT, Muzny CA. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. F1000Res 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1666. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19972.1>
21. Östan İ, Sözen U, Limoncu ME, Kilimcioğlu AA, Özbilgin A. Manisa'da vajinal akıntılı kadınlarda *Trichomonas vaginalis* sıklığı. Turk Parazitol Derg 2005; 29(1): 7-9.
22. Tamer GS, Dündar D, Çalışkan Ş, Doğer E. *Trichomonas vaginalis* saptanmasında direkt mikroskopi ile in vitro kültürün karşılaştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg 2008; 65(2): 15-9.
23. Keleştimur N, Kaplan M. Trichomoniasis tanı yöntemlerinin karşılaştırılması. NWSA 2010; 5(1).
24. Keşli R, Pektaş B, Özdemir M, Günenç O, Coşkun E, Baykan M, ve ark. 18-45 yaş grubu kadınlarda, *Trichomonas vaginalis* ve diğer mikroorganizmaların vajinal akıntı örneklerinden mikroskopik olarak incelenmesi. Türkiye Parazitol Derg 2012; 36(3): 182-4. <https://doi.org/10.5152/tpd.2012.43>
25. Akyıldız F, Özcelik S, Özpınar N, Karakus S. Vajinit ön tanılı kadınlarda *Trichomonas vaginalis* sıklığının araştırılması ve tanısında üç farklı kültür yönteminin karşılaştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg 2018; 75(1): 43-52. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2018.90912>
26. Dogan N, Gitmez F. Investigation of *Trichomonas vaginalis* frequency by different methods in women in Eskisehir province and evaluation of its relation with various social variables. Osmangazi J Med 2019; 41(1): 46-57. <https://doi.org/10.20515/otd.425776>

27. Yazısız H, Koyuncu Özyurt Ö, Öztürk Eryiğit F, Özhak B, Öngüt G, Özekinci M ve ark. *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonu tanısında mikroskopik inceleme, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu testlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2020; 54(1): 135-43. <https://doi.org/10.5578/mb.68828>
28. Karakoç ZÇ. Vajinitlerde etiyoloji değişiyor mu? Tek merkez verilerinin paylaşımı. *Muğla Sıtkı Koçman Üniv Tıp Derg* 2021; 8(1): 18-22. <https://doi.org/10.47572/muskutd.769354>
29. Turan Faraşat V, Balcıoğlu İC, Solmaz Hasdemir P, Gümüş E. Comparison of diagnostic methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in prediagnosed vaginitis cases and its association with various pathogens. *Türkiye Parazitol Derg* 2022; 46(3): 167-71. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2022.02996>
30. Bozdemir T, Çiçek C, Gökengin D, Aydemir SŞ, Altuğlu İ, Önal U ve ark. HIV pozitif kişilerde cinsel yolla bulaşan etkenlerin sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2021; 51(2): 119-25.
31. Ayaz ÇM, Karakaplan ND, İnkaya AÇ, Çakır B, Ünal S, Zarakolu P. HIV ile yaşayan erkeklerde *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* ve *Mycoplasma genitalium* sıklığının sosyodemografik özellikler ve davranışsal risk faktörleri ile birlikte araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2023; 57(3): 378-89. <https://doi.org/10.5578/mb.20239931>
32. Muzny CA, Van Gerwen OT. Secnidazole for trichomoniasis in women and men. *Sex Med Rev* 2022; 10(2): 255-62. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2021.12.004>
33. Hernández Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: An update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(1): 397-401.
34. Weir CB, Le JK. Metronidazole. *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.*; 2022.
35. Ertabaklar H, Yaman Karadam S, Malatyali E, Ertuğ S. *Trichomonas vaginalis* klinik izolatlarında in vitro metronidazol direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(4): 552-8. <https://doi.org/10.5578/mb.30140>
36. Ngobese B, Singh R, Han KSS, Tinarwo P, Mabaso N, Abbai NS. Detection of metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* using uncultured vaginal swabs. *Parasitol Res* 2022; 121(8): 2421-32. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07548-x>
37. Saito-Nakano Y, Umeki Y, Shimokawa C, Kobayashi K, Hashimoto K, Takada T, et al. Prevalence and metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* among Japanese women in 2021. *IJID Reg* 2023; 28(7): 130-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijregi.2023.02.007>
38. Kulda J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* 1999; 29: 199-212. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6)
39. Yarlett N, Yarlett NC, Lloyd D. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 19: 111-6. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90115-5)
40. Leitsch D, Janssen BD, Kolarich D, Johnson PJ, Duchêne M. *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 2014; 91: 198-208. <https://doi.org/10.1111/mmi.12455>
41. Xie Y, Zhong P, Guan W, Zhao Y, Yang S, Shao Y, et al. Transcriptional profile of *Trichomonas vaginalis* in response to metronidazole. *BMC Genomics* 2023; 24: 318. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09339-9>