

# Human Papilloma Virüs Pozitif Servikal Örneklerde *Trichomonas vaginalis* Varlığının Araştırılması<sup>§</sup>

## Investigation of *Trichomonas vaginalis* in Human Papillomavirus-Positive Cervical Specimens

Çağla Yıldız Alagöz\*, Ahmet Özbilgin\*, Sinem Akçalı\*\*, Aslı Göker\*\*\*, İbrahim Çavuş\*, Yener Özel\*\*\*\*

\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

\*\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

\*\*\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

\*\*\*\* Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

**Atf/Cite as:** Yıldız Alagöz Ç, Özbilgin A, Akçalı S, Göker A, Çavuş İ, Özel Y. Human papilloma virüs pozitif servikal örneklerde *Trichomonas vaginalis* varlığının araştırılması. Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2024;54(2):144-151.

### Öz

**Amaç:** Human papillomavirus tiplerinin dağılımı, HPV DNA pozitif hastalarda *Trichomonas vaginalis* varlığının ve HPV DNA/T. vaginalis pozitif örneklerde metronidazol direncinin moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Manisa Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran, rutin olarak HPV testi istenip Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında test sonucu pozitif 100 servikal örnek ile negatif 100 örnek olmak üzere toplam 200 hasta örneği çalışmaya alınmıştır. Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında HPV DNA analizleri yapılmış sonrasında bu örnekler Tıbbi Parazitoloji laboratuvarında T. vaginalis varlığı açısından taranmıştır ve pozitif çıkan örnekler T. vaginalis nitroreduktaz gen bölgesine özgü tasarladığımız ntr4 ve ntr6 primerleri ile metronidazol direnci açısından araştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan 100 HPV DNA pozitif örneğin 20 tanesi HPV 16, 8'i HPV 18, 64'ü HR (diğer yüksek riskli) HPV, 6'sı HPV 16/HR HPV ve 2'si HPV 18/HR HPV olarak tiplendirilmiştir. HPV DNA pozitifliği saptanan ve HR-HPV olarak tiplendirilen hastalardan birinde T. vaginalis DNA pozitifliği saptanmıştır. HPV DNA negatif hastaların hiçbirinde T. vaginalis DNA'sı saptanmamıştır. Metronidazol direnci ile ilişkili olduğu düşünülen tek nokta mutasyonlarının saptanması için yapılan PCR sonucunda T. vaginalis DNA varlığı tespit edilen 1 örnekte ntr4 mutasyonu tespit edilirken ntr6 mutasyonu tespit edilmemiştir.

**Sonuç:** HPV enfeksiyonunun önlenmesi ve T. vaginalis gibi cinsel yolla bulaşan hastalıkların birlikteliği durumu göz ardı edilmeden taranması, erken ve hızlı tedaviyle cinsel yolla bulaşan hastalık oranlarını azaltmak için önemlidir.

**Alındığı tarih / Received:**  
13.12.2023 / 13.December.2023

**Kabul tarihi / Accepted:**  
11.04.2024 / 11.April.2024

**Yayın tarihi / Publication date:**  
14.06.2024 / 14.June.2024

### ORCID Kayıtları

Ç. Yıldız Alagöz 0009-0009-5728-8301

A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

S. Akçalı 0000-0001-7090-2673

A. Göker 0000-0001-8168-2610

İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146

Y. Özel 0000-0001-6618-8251

✉ cagla\_yildiz\_61@hotmail.com

**Anahtar kelimeler:** Human Papillomavirus, *Trichomonas vaginalis*, PCR

### ABSTRACT

**Objective:** We aimed to investigate the distribution of Human papillomavirus (HPV) types, the presence of *Trichomonas vaginalis* in HPV DNA-positive patients, and metronidazole resistance in HPV DNA/T. vaginalis-positive samples using molecular methods.

**Methods:** A total of 200 patient samples, including 100 cervical samples with positive and 100 samples with negative results in the Microbiology laboratory, who applied to Manisa Celal Bayar University, Department of Gynecology and Obstetrics, were routinely asked for an HPV test, included in the study. These remaining samples were taken after the HPV DNA analysis scanned for the presence of T. vaginalis in the Parasitology laboratory, and the samples were investigated for metronidazole resistance with ntr4 and ntr6 primers that we designed specific to the T. vaginalis nitroreductase gene region.

**Results:** Of the 100 HPV DNA positive samples, 20 were typed as HPV 16, 8 as HPV 18, 64 as HR HPV, 6 as HPV 16/HR HPV and 2 as HPV 18/HR HPV. T. vaginalis DNA positivity was detected in one of the patients with HPV DNA positivity and typed as HR-HPV. T. vaginalis DNA was not detected in any of the HPV DNA negative patients. As a result of the PCR, ntr4 mutation was detected in 1 sample in which the presence of T. vaginalis DNA was detected, while ntr6 mutation was not detected.

**Conclusion:** Preventing HPV infection, screening for sexually transmitted diseases such as T. vaginalis without ignoring coexistence are important for the reduction of the rates of sexually transmitted diseases with early and rapid treatment.

**Keywords:** Human papillomavirus, *Trichomonas vaginalis*, PCR

<sup>§</sup> Bu araştırma 23.Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (30 Ekim-3 Kasım 2023, Antalya) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Dünyanın herbölgesinde sıklıkla görülen enfeksiyonlar arasında olan cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE), önemli sağlık, sosyal ve ekonomik sorunlara yol açarlar. Human immunodeficiency virüs, Herpes simpleks virüs, *Treponema pallidum*, Human papillomavirüs (HPV), *Trichomonas vaginalis* ve diğer CYBE'ler en çok cinsel aktif dönem olan 15-35 yaş grubunda saptanır, çeşitli komplikasyon ve sekellere neden olurlar<sup>(1)</sup>.

Human papillomavirüs, Papillomaviridae ailesinde bulunmaktadır. Papillomaviridae ailesinde 12 cins yer almaktadır. Bu virüsler, 50–55 nm çapında zarfsız, ikozahedral nükleokapsitli, çift sarmallı ve proteinle çevrili DNA genomu içermektedirler. HPV tipleri klinik olarak kanser açısından düşük riskli HPV (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 70, 72, 81) ve yüksek riskli HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) olarak gruplandırılmaktadırlar. Klinik tablo, virüsün tipine (HPV 16 ve HPV 18 invaziv karsinom ilişkili), lezyon bölgesine (respiratuvar papillomatozis gibi), immünite durumuna (gebeler ve immun yetmezliği olanlarda daha ağır tablo) ve epitel yapısına (serviksin transformasyon bölgesindeki metaplazik skuamöz epitel onkojenik etkiye daha yatkın) bağlıdır. İlk HPV enfeksiyonundan premalign servikal lezyon aşamaları boyunca serviks kanseri gelişimi 20-30 yıl kadar sürer. Bu durum, rahim ağzı kanserini önlemek için uygun müdahalelerin yapılması için bir fırsat olarak kullanılması gereken uzun bir zaman aralığı sağlar<sup>(2)</sup>. HPV enfeksiyonunun prevalansı dünya çapında ülkeler arasında değişmektedir; Orta Doğu ülkelerinde %6'dan, Afrika ve Okyanusya'da neredeyse %50'ye kadar değişmektedir<sup>(3-6)</sup>. Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda HPV prevalansı %2.1 ile %25.7 arasında bulunmuştur<sup>(7)</sup>.

*Trichomonas vaginalis*, kamçılı bir protozoon olup, ürogenital sistemde yerleşir ve dünya genelinde görülen önemli bir vajinit etkenidir. Parazitin kist formu yoktur; bulaş trofozoitler aracılığı ile olur. Kuluçka süresi 4-28 gün arasındadır. Kadınlarda sıklıkla klinik şikayetlere neden olmakla birlikte asemptomatik de seyrebilmektedir. Erkekler ise genellikle asemptomatik taşıyıcıdırlar. *T. vaginalis* enfeksiyonu, kadınlarda köpüklü, sarı-yeşil renkli, sulu mukuslu,

krem kıvamında ve kötü kokulu akıntı şeklinde seyreder<sup>(8,9)</sup>. Tüm dünyada bakteriyel ve viral etkenler dışında, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar arasında en sık görülendir. Trichomoniasis vakalarının sayısı yaklaşık 156 milyon olmasına rağmen, asemptomatik hasta sayısının çokluğu, birçok bölgede kullanılan ve tercih edilen tanı yöntemlerinin duyarlılığının düşük olması ve *T. vaginalis* enfeksiyonunun ihbarı zorunlu bir hastalık olmaması nedeniyle bu epidemiyolojik veriler eksik tahmin edilebilir. Tüm bunlara rağmen trichomoniasis, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından ihmal edilen paraziter enfeksiyonlar (NPI) listesine dahil edilmiştir. Trichomoniasis "rahatsız edici" bir enfeksiyon olarak görülse de, bu CYBE ile ilişkili komplikasyonlar ve riskler, bunun 2022-2030 dönemi için DSÖ CYBE Küresel Sağlık Stratejisine dahil edilmesine yol açmıştır<sup>(10-12)</sup>.

Trichomoniasis tedavisinde önerilen ve sıklıkla kullanılan ilaçlar 5-nitroimidazol bileşikleridir ve 1959'dan beri metronidazol ile tedavi edilmektedir. Daha sonra, tinidazolün kullanımı onaylandı ve yakın zamanda da Gıda ve İlaç İdaresi, Amerika Birleşik Devletleri'nde seknidazolün kullanımını onayladı. Son dönemde, daha iyi bir tam kür oranına ulaşmak için enfekte kadınların tedavisinde doza ilişkin yeni fikirler önerilmiştir<sup>(13,14)</sup>.

*Trichomonas vaginalis*'in neden olduğu inflamasyon ile servikal epitelin bozulması, HPV'nin epitelin bazal tabakasına girişini kolaylaştırır. Sonuç olarak, viral DNA'nın konakçı DNA'sına entegrasyonuna ve kanserojen mekanizmaların aktivasyonuna katkıda bulunan viral onkogenlerin aşırı ekspresyonuna yol açar<sup>(15)</sup>. Bu çalışmada amaç; HPV tiplendirilmesi, HPV pozitif hastalarda *T. vaginalis* varlığının ve HPV ve *T. vaginalis* pozitif olan hasta örneklerinde *T. vaginalis* için metronidazol direncinden sorumlu olduğu düşünülen *ntr4* ve *ntr6* tek nokta gen polimorfizminin araştırılmasıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma; Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (25.10.2021 tarih ve karar no 217) onaylanmıştır.

Human papillomavirüs pozitif hasta DNA'larının elde edilmesi: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran ve muayene sırasında Digene® HC2 DNA Collection Device (Qiagen, ABD) tüpüne alınan sürüntü örneklerinden, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında EZ1&2 Virus Mini v2.0 kiti (Qiagen, ABD) kullanılarak EZ1 Advanced (Qiagen, USA) cihazında DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri QIAscreen HPV PCR Test kiti (Qiagen, ABD) ile Rotor Gene Q (Qiagen, ABD) cihazında HPV DNA varlığı açısından taranmıştır. QIAscreen HPV PCR Test, 15 (muhtemelen) yüksek riskli HPV genotipinin HPV DNA'sının kalitatif saptanması için bir *in vitro* Real-time qPCR temelli bir testtir.

Her bir PCR döngüsü esnasında logaritmik bir şekilde artan floresan sinyal, amplifikasyon eğrisini oluşturur. Hedefin amplifikasyon eğrisi, eşığının üzerine geldiği anda örnek söz konusu hedef için pozitif kabul edilir. Multipleks format reaksiyon başına dört farklı floresan boyanın aynı anda saptanmasına izin verir; burada her bir floresan boya farklı hedefleri temsil eder. Söz konusu dört farklı hedef; (1) HPV 16; (2) HPV 18; (3) bir havuz olarak diğer 13 HR-HPV tipi ve (4) insan  $\beta$ -globin genidir. QIAscreen HPV PCR Test kiti, HPV 16'yı, HPV 18'i ve diğer 13 HR-HPV genotipinden oluşan havuzu ayrı ayrı saptar.

HPV DNA pozitif ve HPV DNA negatif 100'er örnek *T. vaginalis* DNA varlığı açısından taramak için çalışma yapılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

Human Papillomavirüs pozitif hasta DNA'larında *Trichomonas vaginalis*'in araştırılması: HPV DNA varlığı açısından taranmış 100 HPV DNA pozitif ve 100 HPV DNA negatif örnek, *T. vaginalis beta-tubulin (btub1)* gen bölgesine özgü tasarlanan primerler (Forward: CAACACAACAGCCTTCCGTG; Reverse: ACCTTCCTCGTCTTCTCGC) kullanılarak PCR ile *T. vaginalis* DNA varlığı açısından araştırılmıştır<sup>(16)</sup>.

Çalışma için hazırlanan toplam reaksiyon hacmi 25 µl; her bir primer için 1 µl, 5X PCR Dye Master Mix II 5 µl, PCR Grade Water 13 µl içermektedir. Reaksiyon karışımı üzerine 5 µl genomik DNA eklenerek PCR çalışması başlatılmıştır.

GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Perkin Elmer, ABD) cihazı kullanılmıştır. Uygulanan protokol 94°C 5 dk ön denatürasyon devamında 40 döngü (94°C 30 sn denatürasyon, 60°C 30 sn bağlanma, 72°C 45 sn uzama) ve son uzama 72°C 7 dk olacak şekilde programlanarak cihaz çalıştırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezinde 90 V 45 dk yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Human papillomavirüs pozitif ve *Trichomonas vaginalis* pozitif hasta DNA'larında metronidazol direnci ile ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerinin araştırılması: *T. vaginalis* (TV) DNA varlığı açısından taranan ve pozitif bulunan örneklerin metronidazol direnci ile ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) araştırılması için tasarlanan primerler kullanılarak tek nokta mutasyonları saptanmıştır.

Metronidazol direnci ile ilişkili olduğu düşünülen tek nokta mutasyonlarının saptanması için;

*ntr4* TV F:ATGAGTGCCTTAAGTGCATCCAA

*ntr4*TV R:TTAGTCGGCATAAACTACCTTAGA

*ntr6* TV F:CATTGAATTTATTCGTTCAAAT

*ntr6*TV R:TTATTCATGTATGTAACCTTTCT

TVK3: ATTGTGCAACATTGGTCTTACCCTC

TVK7: TCTGTGCCGTCTTCAAGTATGC

kullanılan primer çiftleri kullanıldı<sup>(17)</sup>. *ntr4*, *ntr6* ve TVK primer çiftleri için ayrı ayrı hazırlanan toplam reaksiyon hacmi 25 µl; her bir primer için 1 µl, 5X PCR Dye Master Mix II 5 µl, PCR Grade Water 13 µl içermektedir. Reaksiyon karışımı üzerine 5 µl genomik DNA eklenerek PCR çalışması başlatılmıştır.

GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler cihazı (Perkin Elmer, USA) kullanılmıştır. Uygulanan protokol 94°C 5 dk ön denatürasyon devamında 40 döngü (94°C 30 sn denatürasyon, 60°C 30 sn bağlanma, 72°C 45 sn uzama) ve son uzama 72°C 7 dk olacak şekilde programlanarak cihaz çalıştırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezinde 90 V 30 dk yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

İstatistiksel analiz Sidak'ın çoklu eşleştirme testi (SPSS, IBM/ABD) ile yapılmıştır.

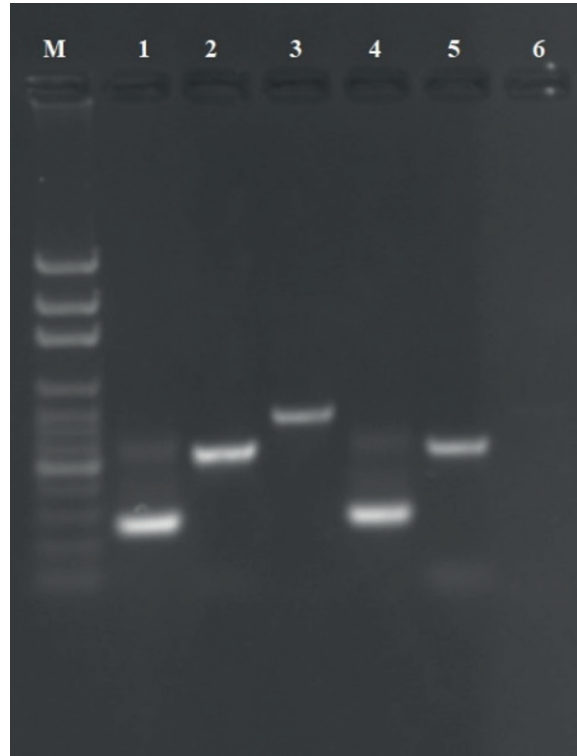
## BULGULAR

Çalışmaya alınan 100 HPV DNA pozitif örneğin 20 tanesi HPV Tip 16, 8'i HPV Tip 18, 64'ü diğer yüksek riskli HPV (HR-HPV), altısı HPV Tip 16/HR-HPV ve ikisi HPV Tip 18/HR-HPV olarak tiplendirilmiştir (Şekil 1).

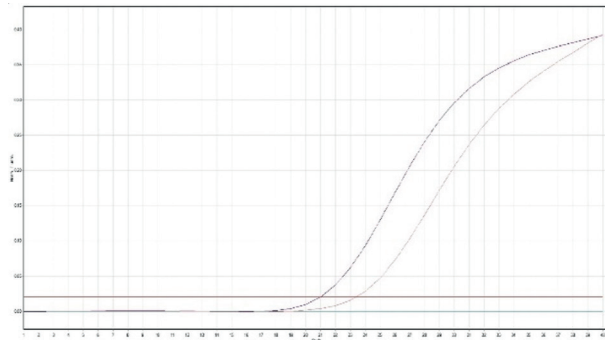
HPV DNA pozitifliği saptanan ve HR-HPV olarak tiplendirilen hastalardan birinde *T. vaginalis* DNA pozitifliği saptanmıştır. HPV DNA negatif hastaların hiçbirinde *T. vaginalis* DNA'sı saptanmamıştır.

*Trichomonas vaginalis* DNA varlığı tespit edilen örneğin metronidazol direnci ile ilişkili olduğu düşünülen tek nokta mutasyonlarının saptanması için yapılan PCR sonucunda *ntr4* mutasyonu tespit edilirken, *ntr6* mutasyonu tespit edilememiştir (Şekil 2).

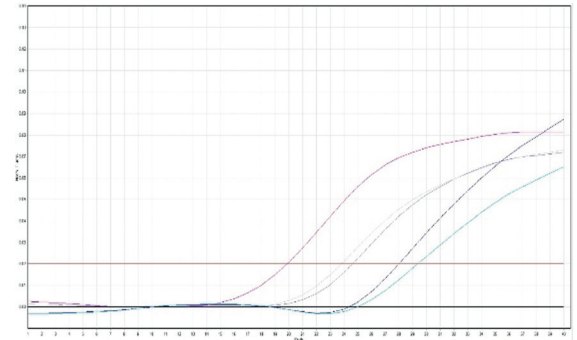
Sidak'ın çoklu eşleştirme testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda HR HPV pozitif olan bir örnekte *T. vaginalis* pozitifliği bulunduğundan dolayı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



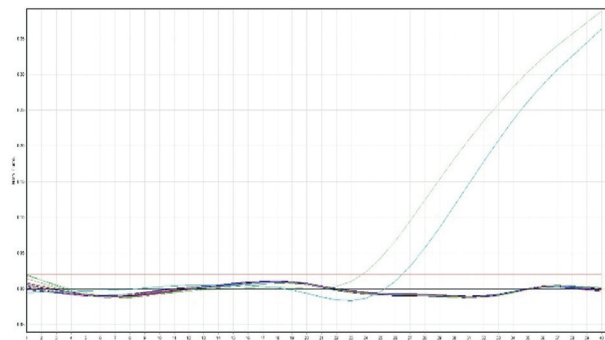
Şekil 2. *Trichomonas vaginalis* DNA elektroforez jel görüntüsü  
M: 100 bp marker 1: TV kontrol (ATCCC 50143 *T. vaginalis* dirençli izolat) 2: ntr4 (ATCCC 50143 *T. vaginalis* dirençli izolat) 3: ntr6 (ATCCC 50143 *T. vaginalis* dirençli izolat) 4: TV kontrol (Hasta örneği) 5: ntr4 (Hasta örneği) 6: ntr6 (Hasta örneği)



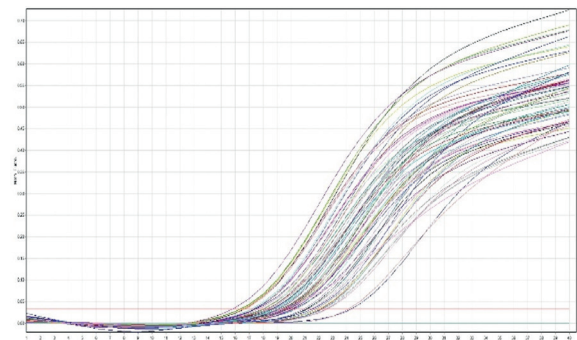
Şekil 1a. HPV tip 18 amplifikasyon eğrileri



Şekil 1b. HR-HPV amplifikasyon eğrileri



Şekil 1c. HPV tip 16 amplifikasyon eğrileri



Şekil 1d. HPV internal kontrol amplifikasyon eğrileri

Şekil 1. Çalışmada saptanan amplifikasyon eğrileri (1a: HPV tip 18; 1b: HR-HPV; 1c: HPV tip-16; 1d: HPV internal control)

## TARTIŞMA

Human papillomavirüs ve TV enfeksiyonları, dünya çapında en yaygın CYBE'ler arasındadır. Her ikisi de kadın ve erkeklerde birden fazla sağlık sorununu beraberinde getirir. TV epitelde mikro lezyonların gelişmesine yol açabilir; böylece HPV'nin virülansını arttırır ve DNA'nın konak hücreye entegrasyonuna izin verir. Çeşitli çalışmalar daha önce TV ile enfeksiyon öyküsünün, HPV enfeksiyonu riskinde artışa yol açtığını göstermiştir. Kofaktörler HPV'nin kalıcılığını kolaylaştırabilir ve aracılık ettiği servikal değişiklikleri destekleyebilir<sup>(18,19)</sup>.

Yang ve ark.'nın<sup>(20)</sup> Çin'de HPV, servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve vajinal flora ilişkisini incelemek için yaptıkları geniş popülasyonlu çalışmalarında 310.545 kadından HR-HPV genotiplemesi ve rahim ağzı kanseri taraması için vajinal sürüntüler alınmıştır. Kadınlar eğitim, medeni durum, kullandıkları doğum kontrol yöntemi, seks partneri açısından sorgulanmıştır. Pozitif trikomonas vajiniti, HR-HPV enfeksiyonu ile korele bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). TV ile koenfeksiyonun, HR-HPV ile enfekte kadınlarda CIN-1 riskini artırdığı, HPV 16 ile enfekte kadınlarda ise CIN-2 ve CIN-3 riskini artırdığı saptanmıştır. Tek cinsel partneri olan kadınlarla karşılaştırıldığında, iki veya daha fazla seks partneri olan kadınların HPV ve TV koenfeksiyonu riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca doğum kontrol yöntemi olarak rahim içi araç seçen kadınların daha yüksek enfeksiyon riski olduğu saptanmıştır.

*Trichomonas vaginalis*, laktobasili önemli ölçüde azaltan ve şiddetli inflamasyona neden olan vajinal florada dengesizliğe yol açmaktadır. İnflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin sürekli aktivasyonu da servikal doku hasarına yol açabilmekte ve dolayısıyla HPV 16'nın duyarlılığını ve kanserojenik potansiyelini artırmaktadır<sup>(21,22)</sup>.

Cunha ve ark.'nın<sup>(23)</sup> çalışmasında normal serviks olan 562 kadın, serviks kanseri tarama programına alınmıştır. Vajen ve serviks örnekleri toplanıp TV ve HPV DNA varlığı açısından test edilmiştir. Kadınların %19'unda TV ve %46.8'inde HPV DNA

tespit edilmiştir. TV pozitif kadınların ise %73.8'inde HPV ile koenfeksiyon bulunmuştur ( $p=0.001$ ). TV enfeksiyonunun, servikal sitolojik anormalliklerin yanı sıra serviks HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Lazenby ve ark.'nın<sup>(21)</sup> rahim ağzı kanseri taraması amacıyla Tanzanya'daki çalışmasında ise 30-60 yaş arası 324 kadından servikal ve vajinal örneklerden sitoloji ve HR-HPV PCR testi yapılmıştır. 42 kişide HR-HPV tespit edilmiştir. Çalışmada TV ile enfekte olmuş kadınların HPV tip 16'ya sahip olma olasılığı, enfekte olmayan HPV pozitif kadınlara göre 6.5 kat daha fazla bulunmuştur. TV enfeksiyonu olan kadınlarda bulunan diğer HPV tipleri 31, 52, 56 ve 68 olarak bildirilmiştir. TV pozitif ve TV negatif kadınlarda HR-HPV tiplerine sahip kadınların oranında hiçbir fark bulunmamıştır.

Donders ve ark.'nın<sup>(24)</sup> çalışmalarında 63.251 servikal numuneden TV ve 18 ayrı HPV tipi için gerçek zamanlı PCR, sitolojik anormallikler için ise Pap smear analizi yapılmıştır. TV prevalansının çok düşük olduğu bir ortamda bile CYBE'lerin sıklıkla bir arada bulunduğu gösterilmiştir. TV, hem HPV enfeksiyonu (hem düşük hem de yüksek riskli) hem de anormal serviks sitolojisi ile korele bulunmuştur.

Taku ve ark.'nın<sup>(25)</sup> Güney Afrika'da yaptıkları çalışmada  $\geq 30$  yaşındaki kadınlardan toplam 205 servikal örnek toplanmış ve numuneler, CYBE etkenleri panel test ile incelenmiştir. Katılımcıların %52.7'sinde (108/205)  $\geq 2$  patojen ile koenfeksiyon gözlenmiştir. Analizler sonucu HSV-2 ve HIV pozitifliği, HR-HPV enfeksiyonu ile güçlü ilişkide bulunmuştur.

Kone ve ark.'nın<sup>(26)</sup> 2075 kadında HPV pozitifliğini, vajinal koenfeksiyonların prevalansını, koenfeksiyonların HPV ile ilişkisini ve bunların metaplazi veya servikal intraepitelyal lezyonlardaki rollerini araştırdığı çalışmalarında ise HPV sitolojisi pozitif olan kadınların aynı zamanda vajinal koenfeksiyonlardan birine sahip olduğu ve koenfeksiyonu olmayanlara kıyasla metaplazi geliştirme oranınının 3.8 kat daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmaların çoğunda HPV 16 dünyada ve Türkiye’de en yaygın tip olarak görülmektedir<sup>(27)</sup>. Bizim çalışmamızda 100 HPV DNA pozitif örneğin tiplendirilmesi sonucu 20 tanesi HPV tip 16, sekizi HPV tip 18, 64’ü HR-HPV, altısı HPV tip 16/HR-HPV ve ikisi HPV tip 18/HR-HPV olarak bulunmuştur. HPV DNA pozitifliği saptanan ve HR-HPV olarak tiplendirilen hastalardan bir hastada TV DNA pozitifliği saptanmış olup, HPV DNA negatif hastaların ise hiçbirinde TV DNA’sı saptanmamıştır.

CYBE etkenlerinin birlikte olması servikal epitel inflamasyonuna ve sonrasında servikal displaziye neden olmaktadır. CYBE tarafından indüklenen bu inflamatuvar süreç epitelini bozduğunda, HR-HPV bazal tabakaya nüfuz edebilmekte ve çoklu hücre aktivitesini değiştirebilmektedir.

Küresel olarak tek başına HPV pozitifliği veya herhangi bir CYBE etkeniyle koenfeksiyon farklı yaygınlık gösterse de HPV pozitifliğinde koenfeksiyon olma ihtimalini de değerlendirmek hızlı ve etkin tedavi açısından son derece önemlidir<sup>(17,18)</sup>.

Çalışmamızda HPV genotipleme analizi sonucunda bir HPV pozitif örnekte TV koenfeksiyonu saptandığından, HPV’nin özellikle hangi türleri ile TV arasında ilişki bulunduğu net olarak anlaşılamamıştır. Ancak HPV negatifliğinin hücresel mikro ortam değişiklikleri göz önüne alındığında, TV riskinde artış yapmadığını belirtmek mümkündür.

Günümüzde trichomoniasis tedavisinde önerilen ve sıklıkla kullanılan ilaçlar 5-nitroimidazol bileşikleridir. Protozoonların içine kolayca giren ilaç serbest radikallere dönüşerek hücre DNA’sına bağlanır ve replikasyonu durdurarak hücre ölümüne neden olur. Metronidazole dirençli olguların varlığı ile ilgili klinik ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Direnç mekanizması net olmamakla birlikte hidrogenozom enzimlerinin regülasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Nitroredüktaz genlerinde belirlenen tek nokta mutasyonları ile direnç arasında ilişki bulunmuştur<sup>(13,18,28,29)</sup>.

Bu konudaki literatür gözden geçirildiğinde moleküler yöntemler kullanılarak metronidazole dirençli TV üzerinde yeterli çalışma yapılmadığı görülmektedir. Paulish-Miller ve ark.<sup>(18)</sup> çalışmalarında, metronidazole dirençli TV’nin moleküler tanımlamasının SNP yöntemi ile yapılabileceğini göstermiştir. Çeşitli TV klinik izolatlarına SNP analizi uygulanarak nitroredüktaz geninin varlığının metronidazol direncinin bir belirteci olabileceği sonucuna varmışlardır. Ozelik ve ark.<sup>(17)</sup> çalışmasında geleneksel ve moleküler yöntemler kullanılarak yaptıkları çalışmada toplamda altı örnekten iki örneğin (%33.3) metronidazole dirençli olduğunu bulmuşlardır. Ertağlar ve ark.’nın<sup>(13)</sup> çalışmasında klinik TV izolatlarında metronidazol direnci %7.5 (3/40) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda ise metronidazol direnci ile ilişkili olduğu düşünülen tek nokta mutasyonlarının saptanması için yapılan PCR sonucunda, TV DNA varlığı tespit edilen bir örnekte *ntf4* mutasyonu tespit edilirken *ntf6* mutasyonu tespit edilmemiştir. Tek ya da çoklu etken olarak tespit edilen trichomoniasisli olgulardan izole edilen suşlarda *in vitro* ilaç etkinliğinin belirlenmesiyle olguların tedavisinde ve etkili ilacın seçiminde olanak sağlayacaktır<sup>(13)</sup>.

Bu çalışmada HPV’nin tiplendirilerek TV ile birlikteliği ve metronidazol ilaç direnci gösterilmeye çalışılmıştır. Çalışmada hasta popülasyonu ile ilgili sosyo demografik özellikler, seks partner sayısı, kondom kullanımı vs. veriler olmaması ve ayrıca klinik örneklerin rutinde laboratuvara gönderilen servikal sürüntü örneği olması, *T. vaginalis* etyolojik tanısında değerli olan vajen arka forniks örneği olmaması gibi bazı kısıtlamalar da mevcuttur. Bu sebeple daha geniş ve çok sayıda örneğin dahil edileceği ve her bir mikroorganizma için en uygun örnek yerinden alınan örneğin çalışıldığı çalışmalar, bu iki organizmanın hücresel düzeyde etkileşime girdiği mekanizmaları ve bu paylaşılan davranışsal risklerin kanser öncesi servikal lezyonların incelenmesi için nasıl etki ettiğini ortaya çıkarabilir. Ancak sonuç olarak HPV enfeksiyonunun aşılarda önlenmesi ve TV gibi cinsel yolla bulaşan hastalıkların birlikteliği durumu gözardı edilmeden taranması, erken ve hızlı tedavi açısından önemlidir.

Literatür taramasında çok sayıda hastada ya da çok sayıda etkenin ve tiplerinin bir arada tarandığı çalışmalarda TV gibi farklı birçok etkenin HPV ile birlikteliği gösterilmiştir. Bu anlamda çalışmamız bir pilot çalışma olup daha fazla örnek sayısı ile farklı enfeksiyon etkenlerinin ve tiplerinin de değerlendirildiği çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmüştür.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma; Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (25.10.2021 tarih ve karar no 217) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansman:** Bu araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2021-128 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This research was conducted with the approval of Manisa Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Clinical Research Ethics Committee (02.22.2023; 2023/02-15).

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** This study was supported by the Manisa Celal Bayar University, Scientific Research Coordination Office under the project number 2021-128.

## KAYNAKLAR

- Serter D. Türkiye'de ve dünyada cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve HIV/AIDS. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci. 2006;2(11):1-5.
- Avcı GA, Bozdayı G. Human Papillomavirus. Kafkas Tıp Bilim Derg. 2013;3(3):136-44. <https://doi.org/10.5505/kjms.2013.52724>
- World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 97. France: WHO; 2012.
- Siegler E, Reichman Y, Kugelman N, et al. Low-risk human papillomavirus types in cervical intraepithelial neoplasia 2-3 and in invasive cervical cancer patients. J Low Genit Tract Dis. 2019;23(4):248-52. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000486>
- Babi A, Issa T, Gusmanov A, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection and genotype distribution among Kazakhstani women with abnormal cervical cytology. Ann Med. 2024;56(1):2304649. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2304649>
- Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. Lancet Glob Health. 2020;8(2):e191-203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
- Williams J, Kostiuik M, Biron VL. Molecular detection methods in HPV-related cancers. Front Oncol. 2022;27(12):864820. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.864820>
- Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi - İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. Samastı M, editör. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı; 1995:140-57.
- Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji. Ankara: Nobel Yayınları; 2002:109-14.
- Ibáñez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ. The past, present, and future in the diagnosis of a neglected sexually transmitted infection: Trichomoniasis. Pathogens. 2024;13(2):126. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020126>
- Kissinger PJ, Gaydos CA, Seña AC, et al. Diagnosis and management of *Trichomonas vaginalis*: Summary of evidence reviewed for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Infections Treatment guidelines. Clin Infect Dis. 2022;74(Suppl 2):S152-61. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac030>
- 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>
- Ertabaklar H, Yaman KS, Malatyalı 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>
- Matini M, Maghsood AH, Mohebbali M, et al. In vitro susceptibility of Iranian isolates of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. Iran J Parasitol. 2016;11(1):46-51.
- Belfort IKP, Cunha APA, Mendes FPB, et al. *Trichomonas vaginalis* as a risk factor for human papillomavirus: a study with women undergoing cervical cancer screening in a northeast region of Brazil. BMC Womens Health. 2021;21(1):174. <https://doi.org/10.1186/s12905-021-01320-6>

16. Dwivedi SP, Husain N, Singh RB, Malla N. PCR based diagnostic assay targeting the beta tubulin gene for the detection of *Trichomonas vaginalis* infection in vaginal swab samples of symptomatic and asymptomatic women in India. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2012;2(5):352-7. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60077-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60077-2)
17. Ozcelik S, Ozpinar N, Karakus S, Akyildiz F, Karakaya O. Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* determined by molecular and conventional methods. *Trop Biomed.* 2018;35(1):188-94.
18. Paulish-Miller TE, Augostini P, Schuyler JA, 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>
19. Ghosh I, Muwonge R, Mittal S, et al. Association between high risk human papillomavirus infection and co-infection with *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis* in women with cervical premalignant and malignant lesions. *J Clin Virol.* 2017;87:43-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.12.007>
20. Yang M, Li L, Jiang C, et al. Co-infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2–3 among HPV16 positive female: a large population-based study. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):642. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05349-0>
21. Lazenby GB, Taylor PT, Badman BS, et al. An association between *Trichomonas vaginalis* and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clin Ther.* 2014;36(1):38-45. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2013.11.009>
22. Doerflinger SY, Throop AL, Herbst-Kralovetz MM. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis.* 2014;209(12):1989-99. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu004>
23. Cunha APA, Belfort IKP, Mendes FPB, et al. Human papillomavirus and its association with other sexually transmitted coinfection among sexually active women from the northeast of Brazil. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2020;2020:8838317. <https://doi.org/10.1155/2020/8838317>
24. Donders GGG, Depuydt CE, Bogers JP, Vereecken AJ. Association of *Trichomonas vaginalis* and cytological abnormalities of the cervix in low risk women. *PLoS One.* 2013;8(12):e85266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086266>
25. Taku O, Brink A, Meiring TL, et al. Detection of sexually transmitted pathogens and co-infection with human papillomavirus in women residing in rural Eastern Cape, South Africa. *PeerJ.* 2021;9:e10793. <https://doi.org/10.7717/peerj.10793>
26. Kone ES, Balili AD, Papparisto PD, Ceka XR, Petrela ED. Vaginal infections of Albanian women infected with HPV and their impact in intraepithelial cervical lesions evidenced by Pap test. *J Cytol.* 2017;34(1):16-21. <https://doi.org/10.4103/0970-9371.197592>
27. Findik S, Findik S, Abuoğlu S, Cihan FG, Ilter H, Iyisoy MS. Human papillomavirus (HPV) subtypes and their relationships with cervical smear results in cervical cancer screening: a community-based study from the central Anatolia region of Turkey. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(4):1391-8.
28. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients- assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;2003(31):29-34. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003478>
29. Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, et al. A review of evidence-based care of symptomatic trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. *Clin Infect Dis.* 2015;61(Suppl 8):S837-48. <https://doi.org/10.1093/cid/civ738>