

Trichomonas vaginalis İzolatlarında PZR-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Yöntemi ile Genotiplerin Belirlenmesi

Determination of *Trichomonas vaginalis* Genotypes Using PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Serpil Demirağ¹, Erdoğan Malatyalı², Sema Ertuğ², Hatice Ertabaklar²

¹Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Cite this article as: Demirağ S, Malatyalı E, Ertuğ S, Ertabaklar H. Determination of *Trichomonas vaginalis* genotypes using PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Türkiye Parazit Derg 2017; 188-91.

ÖZ

Amaç: *Trichomonas vaginalis* (*T.vaginalis*) tek hücreli, anaerobik bir protozoon olup dünya genelinde virüslerden sonra en sık görülen cinsel yolla bulaşan patojen olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada, *T. vaginalis* izolatlarının aktin genini hedef alan Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) kullanılarak genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışma kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarında semptomatik olgulardan rutin uygulamalar sırasında elde edilen ve kriyoprezervasyon ile saklanan toplam 20 *T.vaginalis* izolatu değerlendirilmiştir. Sıvı azotta dondurularak muhafaza edilen izolatlar çalışma öncesinde triptikaz-maya özütü-maltoz (TYM) besiyerinde canlandırıldıktan sonra yine bu besiyerinde çoğaltılmıştır. İzolatlardan nükleik asit izolasyonu sonrası *T. vaginalis* aktin geni Nested-PZR ile çoğaltılmış ve PZR ürünleri fenol-kloroform izoamil alkol yöntemiyle saflaştırılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış ürünler HindIII, MseI ve RsaI enzimleri ile kesilmiş ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Bulgular: Enzim kesim paternleri değerlendirildiğinde *T. vaginalis* izolatlarının büyük kısmının genotip E (n=9, %45) olduğu, bunu genotip G (n=7, %35), genotip N (n=1, %5) ve genotip H'nin (n=1, %5) takip ettiği bulunmuştur. Ayrıca, iki örnekte (%10) E ve H genotiplerine birlikte rastlanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile ülkemizde *T. vaginalis* genotip dağılımıyla ilgili ilk verilere ulaşılmıştır. Ancak, benzer yöntemlerin kullanıldığı hem ulusal hem de küresel ölçekte daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Trichomonas vaginalis*, genotip, aktin, Türkiye

Geliş Tarihi: 15.08.2017

Kabul Tarihi: 04.12.2017

ABSTRACT

Objective: *Trichomonas vaginalis* is an anaerobic protozoon and the most common non-viral sexually transmitted pathogen. The present study was designed to determine the genotypes of *T. vaginalis* using polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism of actin gene.

Methods: A total of 20 isolates from symptomatic females isolated and cryopreserved at Adnan Menderes University, Research and Training Hospital Parasitology Laboratory were included. The isolates from liquid nitrogen were thawed and grown in trypticase-yeast extract-maltose medium prior to the study. Following nucleic acid extraction, the actin gene of *T. vaginalis* was amplified using nested PCR and amplicons were concentrated with phenol-chloroform-isoamyl alcohol precipitation. The final products were digested with *HindIII*, *MseI*, and *RsaI* and were visualized using agarose gel electrophoresis.

Results: Most isolates were actin genotype E (n=9, 45%). The remaining isolates were genotype G (n=7, 35%), genotype N (n=1, 5%), and genotype H (n=1, 5%); two were mixed genotypes of E and H (10%).

Conclusion: To the best of our knowledge, this study is the first to provide data on *T. vaginalis* genotypes in Turkey. However, further studies should be conducted to understand the molecular epidemiology of *T. vaginalis* at the national and global levels.

Keywords: *T. vaginalis*, genotypes, actin gene, Turkey

Received: 15.08.2017

Accepted: 04.12.2017

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Erdoğan Malatyalı E.posta: erdogan.malatyalı@adu.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2017.5496

©Telif hakkı 2017 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2017 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

GİRİŞ

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) ürogenital yerleşimli, cinsel yolla bulaşan patojenik bir protozoon olup yalnızca trofozoit formu bulunmaktadır. Hareketini kamçıları ve dalgalanan zarı ile sağlayan parazit, 24-48 saatte ikiye bölünerek çoğalmaktadır. Fizyolojik veya patolojik nedenlerle vajen pH'sının bozulması, *T. vaginalis*'in yerleşmesi için uygun ortamı oluşturmaktadır. Trichomoniasis, cinsel aktif çağda görülen bir enfeksiyon olup kadın olgularda genellikle sarı/yeşil köpüklü akıntı, kasıklarda ağrı, dizürü vb. semptomlarla seyreden vajinite yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca, *T. vaginalis* kadınlarda pelvik inflamatuvar hastalığa, gebelerde düşük doğum ağırlıklı bebeklere veya erken doğumlara neden olabileceği bildirilmiştir (1). Erkeklerde de trichomoniasis, sıklıkla asemptomatik olmakla birlikte bu olgularda üretrit, prostatit ve epididimit görülebilmektedir. Bazı çalışmalarda, *T. vaginalis* enfeksiyonunun İnsan İmmün Yetmezlik Virüsünün (HIV) bulaş riskini artırdığı da rapor edilmiştir (2).

Trichomoniasisin tanısı geleneksel olarak, vajinal veya üretral sekresyonların direkt mikroskopik incelenmesinde parazitin trofozoit formunun görülmesi ile konulmaktadır. Kolay uygulanabilmesi ve maliyetinin düşük olması nedeniyle sık tercih edilen bir yöntem olmasına karşın duyarlılığının düşük olduğu bildirilmektedir. Kültür yöntemleri ise tanıda yüksek duyarlılık göstermekte olup altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, uzun inkübasyon süresi, deneyimli personel gerektirmesi, bakteri ve mantar kontaminasyonu kültür yönteminin dezavantajları olarak bildirilmektedir. Geleneksel yöntemlerin yanı sıra ticari olarak bulunabilen antijen tespiti ve moleküler tanıya dayalı yöntemler de duyarlılıklarının yüksek olması nedeniyle yaygınlaşmaktadır (3).

Trichomoniasis tedavisinde yaygın olarak 5-nitroimidazol bileşikler olan metronidazol ve tinidazol kullanılmakta olup bu ilaçlar DNA hasarına neden olarak parazitin hücre ölümünü sağlamaktadır. Metronidazol mutajenik ve karsinojenik olabileceği, plasentadan geçebilmesi nedeniyle gebelikte kullanımı sınırlı olduğu bildirilmiştir (4). Ayrıca ülkemizde ve diğer ülkelerde metronidazole dirençli *T. vaginalis* izolatlarının bulunduğu da saptanmıştır (5).

Kozmopolit bir dağılım gösteren *T. vaginalis*'in prevalansının kadınlarda %8,1 erkeklerde %1 olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca yaygınlığını etkileyen başlıca faktörlerin cinsel ilişki partner sayısı, düşük eğitim düzeyi ve yaş olduğu bildirilmiştir (1). Ülkemizde *T. vaginalis* görülme sıklığı %0,3 ile %42,8 arasında rapor edilmiş olmakla birlikte, bu çalışmalarda kullanılan yöntemler ve hedef kitleler birbirinden oldukça farklılık göstermektedir (6, 7). Aydın'daki çalışmalarda ise %4,9 ve %7,2'lik *T. vaginalis* yaygınlıkları bildirilmiştir (8).

Trichomoniasis tanısında ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler yöntemlerin kullanılması *T. vaginalis* izolatları arasında genetik uzaklık, enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesinde büyük aşamalar kat edilmesini sağlamıştır (9). Bu çalışmalarda PZR-Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (PZR-SSCP), PZR-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoklu Lokus Sekans Tiplendirme (MLST), mikrosatellit analizi gibi yöntemler kullanılmıştır (10-12). Bu yöntemlerin büyük çoğunluğu ribozomal ve interjenik bölgelerdeki sekans polimorfizmlerinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır (13). Trichomoniasis patogenezi parazitin vajen mukozası ve florasıyla etkileşimine ayrıca *T. vaginalis* virüs varlığına (TVV) bağlı olarak gelişen karmaşık

bir süreç olarak ifade edilmektedir. (14). Aktin proteini hücre hareketinde kilit role sahip olup protozoonların konak dokuda hareketi, beslenme ve formlar arasında geçiş gibi önemli fonksiyonlarını etkilemektedir (15). Yüksek oranda korunmuş bir aktin proteinine sahip *T. vaginalis*'de aktin kodlayan genlerin intronlar ile kesilmediği bildirilmiştir (16). Cirucitti ve ark., *T. vaginalis* aktin genini restriksiyon enzimleriyle keserek parazitin genotiplendirilmesine olanak sağlayan bir yöntem geliştirmiştir (10).

Ulaşabildiğimiz kadarıyla Türkiye'de *T. vaginalis* genotiplerinin araştırıldığı bir çalışmanın olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada Aydın'da vajinit ön tanılı olgulardan elde edilen *T. vaginalis* izolatlarının aktin geni-RFLP paternlerine göre genotiplendirilmesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

İzolatlar ve DNA izolasyonu

Çalışma kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarında kriyoprezervasyon yapılarak saklanan 20 tane vajinit ön tanılı olguya ait *T. vaginalis* izolatu canlandırılmıştır. (Adnan Menderes Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, Protokol No: 2016/805). Tryptikaz-maya özütü maltoz (TYM) besiyerinde çoğaltılan izolatlar Fosfat Tamponlu Salin, pH:7,4 (PBS) ile yıkandıktan sonra genomik DNA izolasyonları High Pure Template Kit (Roche Life Sciences, Berlin, Almanya) ile üretici firmanın bildirdiği şekilde yapılmıştır. Tris-EDTA içerisinde çözölen DNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve saflaştırma

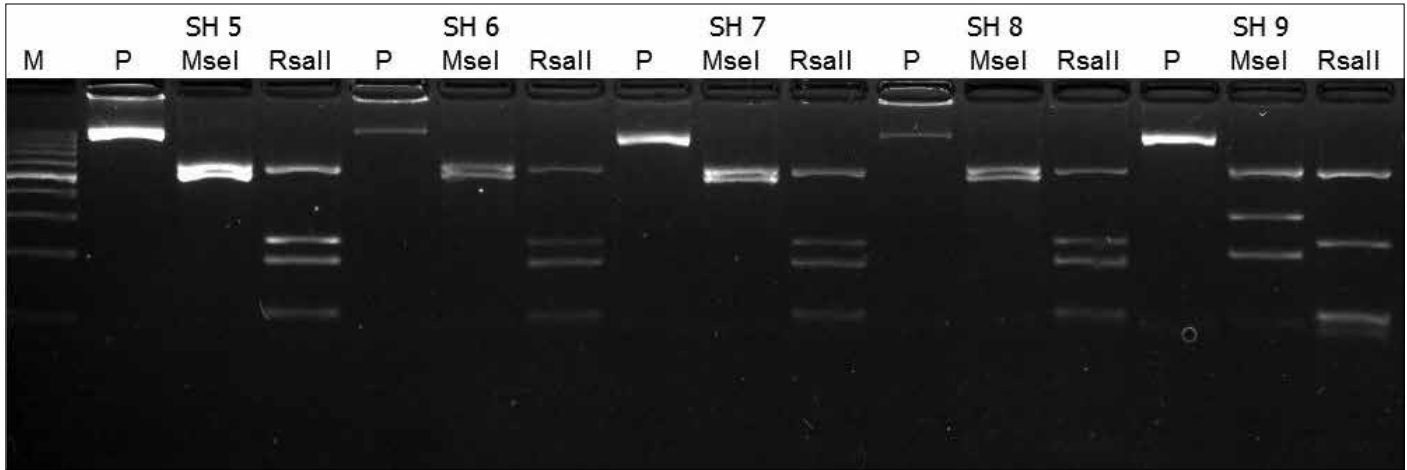
Cirucitti ve ark. bildirdiği şekilde *T. vaginalis* aktin geni nested-PZR ile çoğaltılmış ve sonrasında 100µl PZR ürünü fenol kloroform izoamil alkol DNA çöktürme yöntemi ile saflaştırılmıştır (10). İlk PZR'da, Tv8S-Tv9R primerleri kullanılmış ve reaksiyon 40 µL hacimde: 10 µL DNA, 3 mM MgCl₂, 0,3 µL primerler, 1,7U Taq Polimeraz (Thermo Fisher, Bartlesville, ABD), 0,28 mM dNTP olacak şekilde kurulmuştur. İkinci PZR Tv10S-Tv11R primerleri ile 100 µL hacimde ilk PZR'de olduğu şekilde hazırlanmış olup 1 µL ilk PZR ürünü kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Birinci RZR koşulları: ön denatürasyon 95°C'de 5 dk, 10 döngü (94°C'de 30 sn, 55°C'de 30sn ve 72°C'de 3 dk), son uzama 72°C'de 7 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. İkinci PZR koşulları ilkinde olduğu gibi ayarlanmış, ancak döngü sayısı 25 olup son uzama aşaması da 3,5 dk olarak ayarlanmıştır.

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve genotiplerin belirlenmesi

Saflaştırma sonrası elde edilen 15 µL PZR ürünü HindIII, MseI ve RsaI endonükleazları (Thermo Fisher, Bartlesville, ABD) ile üretici firmanın bildirdiği sıcaklıklara göre ayrı tüplerde kesilmiştir. Kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütölmüş ve genotipler Crucitti ve ark. bildirdiği şekilde belirlenmiştir (10).

BULGULAR

Çalışmada 20 izolatın tümünde Nested-PZR ile kısmi aktin geni çoğaltılarak 1100 bp amplikonlar elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra saflaştırma işlemi ile PZR ürün yoğunluğunun artırılması enzim kesiminde ve kesim ürünlerinin görüntülenmesinde kolaylık sağlamıştır. Restriksiyon enzim ile kesim paternlerine göre toplam dört farklı *T. vaginalis* genotipi belirlenmiştir (Şekil 1). Genotip dağılımları: Genotip E (n=9, 45%), genotip G (n=7, %35),



Şekil 1. Bazı örneklerin saflaştırma ve kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jelde elektroforez görüntüsü (M: Markır, 100 bp; P: Saflaştırılmış PZR ürünü). En yaygın rastlanan iki genotip olan genotip G (İzolatlar SH 5-8) ve genotip E (İzolat SH 9)

genotip N (n=1, %5) ve H (n=1, %5) şeklinde bulunmuştur. Ayrıca, iki örnekte (%10) genotip E ve H'ye birlikte rastlanmıştır.

TARTIŞMA

Trichomoniasis etkeni olan *T. vaginalis* dünya genelinde görülen tedavi edilebilir cinsel yolla bulaşan patojenik bir protozoondur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2008 yılında küresel çapta *T. vaginalis* insidansının 276.4 milyon olduğu tahmin edilmektedir (17). Yaygın görülen bir enfeksiyon olması, AIDS, kanser, vb. ciddi sağlık sorunları ile ilişkisi *T. vaginalis*'in genetik çeşitliliğine olan ilgiyi artırmıştır. Ayrıca, günümüzde *T. vaginalis* izolatlarının genetik karakterizasyonu için altın standart olarak belirlenen bir yöntemin bulunmaması bu alanda birçok yöntemin uygulanmasının ve değerlendirilmesinin önünü açmıştır (12).

Moleküler tiplendirme çalışmaları ile belirli topluluklarda *T. vaginalis*'in genetik çeşitliliği, popülasyon yapısı ve epidemiyolojik bağlantıları hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (18, 19). Ayrıca, genetik çeşitliliğinin araştırılması parazitin patojenitesini, TVV ilişkisini, ilaç direncini ve tekrarlayan enfeksiyonların kaynağını belirlemeye büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir (10, 20, 21). Çalışmamızda, *T. vaginalis* izolatlarının genotipleri aktin geninin RFLP paternine göre belirlenmiştir. Referans olarak ele aldığımız Cirucitti ve ark. bildirdiği yöntemden farklı olarak çalışmamızda PZR ürünleri kesim öncesi saflaştırılmıştır (10). Mevcut yöntem uygulandığında agaroz jelde kesim ürünleri zayıf görülürken saflaştırma sonrası ürün yoğunluğunun artması sonucu daha parlak bantlar elde edilmiştir. Birçok çalışmada *T. vaginalis*'in oldukça polimorfik bir genomu sahip olduğu bildirmiştir. Meade ve ark., *T. vaginalis*'in Hsp70 geninin RFLP paternlerine göre yüksek seviyede polimorfizm gösterdiğini ortaya koymuştur (9). Metronidazole karşı direnç mekanizmasının bir veya birkaç mutasyon sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Snipes ve ark., 63 *T. vaginalis* izolatında ITS gen polimorfizmini araştırdıkları çalışmalarında metronidazol direncinin ve TVV varlığının bu gendeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu bildirmiştir (22). Bazı çalışmalarda da *T. vaginalis* enfeksiyonunda klinik belirtilerin ortaya çıkmasında rolü olan genetik belirteçlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Rojas ve ark., asemptomatik *T. vaginalis* enfeksiyonlarında bulunmayan sadece semptomatiklerde görülen 490 bp belirteç RAPD ile gösterilmiştir (23). Matini ve ark., *T. vaginalis* izolatları arasında aktin gen polimor-

fizmini PZR-Tek zincir Konformosyonel Polimorfizm ile araştırmış ve klinik tablo ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (11). Aktin gen polimorfizmleri *T. vaginalis* dışında *Cryptosporidium spp.*, *Toxoplasma gondii* ve *Echinococcus granulosus* genotiplendirmesinde de başarıyla kullanılmıştır (24). Ayrıca, 2016 yılındaki bir çalışmada aktin gen bölgesinin Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) yöntemi ile *T. vaginalis* tanısında kullanılabileceği bildirilmiştir (25).

Çalışmamızda en sık genotip E (%45) olmak üzere sırasıyla genotip G (%35), genotip E (%5), genotip H (%5) ve iki örnekte de genotip E ve H aktin paternine sahip *T. vaginalis* izolatına rastlanmıştır. Aktin geni RFLP paternini ilk kez araştıran Cirucitti ve ark., farklı ülkelerden seks işçileri elde ettikleri 151 izolat üzerinde çalışmış olup RFLP paternine göre sekiz farklı *T. vaginalis* aktin genotipi tanımlanmıştır. Araştırmacılar yöntemin duyarlı, tekrarlanabilir ve *T. vaginalis*'e özgü amplifikasyona olanak sağladığını bildirmiştir. Aynı çalışmada Kongo'da en sık genotip E'ye, Zambiya'da ise genotip G'ye rastladıklarını bildirmiştir (10). Momeni ve ark., İran'da 2015 yılındaki çalışmalarında hastane laboratuvarına gönderilen akıntı ve idrar örneklerini TYM besiyerine ekmiş ve toplam 45 olgudan *T. vaginalis* izole etmiştir. İzolatların %51'inin genotip G, %24,4'ünün genotip E, %13'ünün genotip H, %6'sının genotip I olduğunu ve %4'ünde iki genotipe (G ve E) birlikte rastladıklarını bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca çalıştıkları bölgede *T. vaginalis* genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu ve toplam 13 polimorfik bölge saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu değişikliklerden iki tanesi amino asit değişikliğine neden olduğunu bildirmişlerdir (26). Çalışmamızda olduğu gibi diğer ülkelerde de genotip E ve G'nin *T. vaginalis* izolatlarının büyük kısmını oluşturduğu görülmektedir. Tüm çalışmalarda kültürde çoğaltılan izolatlardan DNA izolasyonunun yapılmış olup klinik örneklerden direkt DNA izolasyonunda sonuçların nasıl olacağı konusunda elimizde veri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda semptomatik olgulardan elde edilen *T. vaginalis* izolatları değerlendirilmiş olup en yaygın bulgu vajinit olarak saptanmıştır. En sık genotip E ve G'ye rastlanması *T. vaginalis* genotipi ve klinik arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmekle birlikte asemptomatik olguların çalışmada yer almaması nedeniyle karşılaştırma yapılamamıştır. Sonraki çalışmalarda asemptomatik olgularda genotip dağılımının araştırılması aktin genotipi ve klinik arasındaki ilişkinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

SONUÇ

Türkiye’de *T. vaginalis* genotiplerinin ilk kez araştırıldığı çalışmamızda en sık genotip E’ye rastlanmıştır. Ayrıca, restriksiyon enzimleri ile kesim önce PZR ürünlerinin saflaştırılmasının RFLP yönteminin uygulanabilirliğini artırdığı gözlenmiştir. Diğer bölgelerde yapılacak benzer çalışmalar ile ülke genelinde *T. vaginalis*’in moleküler epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir. Ayrıca, sonraki çalışmalarda asemptomatik olgulardan izole edilen *T. vaginalis* izolatlarının aynı yöntemle genotiplendirmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Adnan Menderes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan alınmıştır (No: 2016/805).

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - H.E., S.D.; Tasarım - H.E., S.D.; Denetleme - H.E., S.E., S.D.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - E.M., S.D.; Analiz ve/veya Yorum - H.E., S.D.; Literatür Taraması - E.M., S.D.; Yazıyı Yazan - E.M., S.D., H.E.; Eleştirel İnceleme - S.E., H.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (TFP-12015).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received from Adnan Menderes University Clinical Research Ethics Committee (No: 2016/805).

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - H.E., S.D. Design - H.E., S.D.; Supervision - H.E., S.E., S.D.; Funding - E.M., S.D.; Materials - S.D., H.E., E. M.; Data Collection and/or Processing - H.E., S.D.; Analysis and/or Interpretation - H.E., S.D.; Literature Review - E.M., S.D.; Writing - S.D., E. M., H. E.; Critical Review - S. E., H. E.

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

Financial Disclosure: This study was supported by Adnan Menderes University Scientific Research Council (TFP-12015).

KAYNAKLAR

1. Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. BMC Infect Dis 2015; 15: 307. [CrossRef]
2. Kissinger P, Adamski A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. Sex Transm Infect 2013; 89: 426-33 [CrossRef]
3. Garber GE. The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; 16: 35-8. [CrossRef]
4. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 783-93. [CrossRef]
5. Ertabaklar H, Karadam Yaman S, Malatyali E, Ertug S. *Trichomonas vaginalis* klinik izolatlarında in vitro metronidazol direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2016; 50: 552-8. [CrossRef]
6. Culha G, Gungoren A, Demir C, Hakverdi AU, Duran N. Detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens from women by wet mount, culture and PCR. J Clin Anal Med 2015; 6: 537-40. [CrossRef]
7. Çelik A, Atılğan R, Aygün HB, Özkan SB, Can B, Kavak SB, ve ark. Serviko-vajinal pap smear taramasında *Trichomonas vaginalis*, *Candida* ve *Gardnerella vaginalis* sıklığının yaşa göre değerlendirilmesi. Firat Tıp Derg 2013; 18: 44-7.
8. Ertabaklar H1, Caner A, Döşkaya M, Demirtaş LO, Töz SO, Ertuğ S, et al. Comparison of polymerase chain reaction with wet mount and culture methods for the diagnosis of trichomoniasis. Türkiye Parazit Derg 2011; 35: 1-5. [CrossRef]
9. Meade JC, de Mestral J, Stiles JK, Secor WE, Finley RW, Cleary JD, et al. Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by *EcoRI* restriction fragment length polymorphism of Heat-Shock Protein 70 genes. Am J Trop Med Hyg 2009; 80: 245-51.
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: 844-52. [CrossRef]
11. Matini M, Rezaie S, Mohebalı M, Maghsood AH, Rabiee S, Fallah M, et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection in Hamadan City, Western Iran. Iranian J Parasitol 2012; 7: 67-72.
12. Prokopi M, Chatzitheodorou T, Ackers JP, Clark CG. A preliminary investigation of microsatellite-based genotyping in *Trichomonas vaginalis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011; 105: 479-81. [CrossRef]
13. Simoes-Barbosa A, Lobo TT, Xavier J, Carvalho SE, Leornadecz E. *Trichomonas vaginalis*: Intrastrain polymorphisms within the ribosomal intergenic spacer do not correlate with clinical presentation. Exp Parasitol 2005; 110: 108-13. [CrossRef]
14. Hirt RP. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. Sex Transm Infect 2013; 89: 439-43. [CrossRef]
15. Kusdian G, Woehle C, Martin WF, Gould SB. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. Cell Microbiol 2013; 15: 1707-21.
16. Bricheux G, Brugerolle G. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. FEMS Microbiol Lett 1997; 153: 205-13. [CrossRef]
17. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections–2008. 2012. http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rts/stisestimates/en
18. Upcroft JA, Delgadillo-Correa MG, Dunne RL, Sturm AW, Johnson PJ, Upcroft P. Genotyping *Trichomonas vaginalis*. Int J Parasitol 2006; 36: 821-8. [CrossRef]
19. Cornelius DC, Robinson DA, Muzny CA, Mena LA, Aanensen DM, Lushbaugh WB, et al. Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates by use of multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2012; 50: 3293-300. [CrossRef]
20. Gerhold RW, Allison AB, Sellers H, Linnemann E, Chang TH, Alderete JF. Examination for double-stranded RNA viruses in *Trichomonas gallinae* and identification of a novel sequence of a *Trichomonas vaginalis* virus. Parasitol Res 2009; 105: 775-9. [CrossRef]
21. Conrad MD, Kissinger P, Schmidt N, Martin DH, Carlton JM. Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* reinfection in HIV-positive women. Sex Transm Inf 2013; 89: 473-8. [CrossRef]
22. Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. J Clin Microbiol 2000; 38: 3004-9.
23. Rojas L, Fraga J, Sariego I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. Infect Genet Evol 2004; 4: 53-8. [CrossRef]
24. Arikoglu H, Arslan A, Hepdogru MA, Turhan AB. Expression profile and polymorphisms of actin genes in protoscolecocytes of *Echinococcus granulosus* from sheep in central Turkey. Turkey Vet Parasitol 2009; 166: 80-5. [CrossRef]
25. Goo YK, Shin WS, Yang HW, Joo SY, Song SM, Ryu JS, et al. Loop-Mediated isothermal amplification targeting actin DNA of *Trichomonas vaginalis*. Korean J Parasitol 2016; 54: 329-34. [CrossRef]
26. Momeni Z, Sadraei J, Kazemi B, Dalimi A. Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-RFLP in Iran. Exp Parasitol 2015; 159: 259-63. [CrossRef]