

12211

T. C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ BİLİM DALI

TRİCHOMONAS VAGİNALİS'İN TANISINA RAPİD LATEX AGLÜTİNASYON
YÖNTEMİNİN UYGULANMASI VE BU YÖNTEMİN MİKROSKOPİ
KÜLTÜR VE BOYAMA YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI

Bilim Uzmanlığı Tezi

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Kadri ÖZCAN

Yahya EBRAHİMİ SADR

ADANA - 1991

Gerek tez konunun secimi ve yürütülmesinde gerekse eğitim sürem içerisinde yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen Parazitoloji Bilim Dalı Başkanı ve tez yürütücüm Sayın Prof.Dr. Kadri ÖZCAN'a, her zaman yakın ilgilerini gördüğüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Erol AKAN'a, Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Doç.Dr.Fatih KÖKSAL'a, Sayın Yard.Doç.Dr. Sait YİĞİT'e ve Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ile personeline, özellikle tezimin yazım ve basım işlemlerinde olağanüstü fedakarlık gösteren Anabilim Dalı sekreteri Suna GÖKMEN'e tesekkürü bir borç bilirim.

YAHYA E. SADR

İ Ç İ N D E K İ L E R

SAYFA

| | |
|-----------------|---------|
| GİRİŞ | 1 - 2 |
| GENEL BİLGİ | 3 - 34 |
| GEREÇ ve YÖNTEM | 35 - 44 |
| BULGULAR | 45 - 53 |
| TARTIŞMA | 54 - 61 |
| ÖZET | 62 - 63 |
| KAYNAKLAR | 64 - 69 |

G İ R İ Ő

Her yıl binlerce kadın vajinit yakınmalarıyla polikliniklere basvurmaktadır. Bu yakınmaların nedenlerinden önemli bir kısmını trikomoniyaz oluşturmaktadır.

Trichomonas vaginalis'in insan üro-jenital sisteminde yerleşerek parazitlenmesiyle oluşan trikomoniyaz, kadın ve erkekte idrar ve üreme yollarının bütün hastalıkları ile karışabilir. Trichomonas vaginalis'in kadında vajinaya yerleşmesinden kaynaklanan vajinit, erkekte üretrit ve prostatit oluşturabilir. Sürekli sütlü su veya sarı-yeşil renkte, sulu, müküslü ve pis kokulu akıntılarda, vajina kaşıntısında trikomoniyaz düşünülerek parazit aranmalıdır. Erkeklerde klinik tanı oldukça zordur ve üretrit yakınmaları olanların çok azında trikomoniyaz saptanabilmistir.

Trichomonas vaginalis'in klinik tanısı bugün bile tartışmalıdır. Sadece klinik tanı güvenli olmadığından, laboratuvar tanısı ile birlikte önem taşımaktadır. Trichomonas vaginalis'in epidemiyolojisi ve kemoterapötik madde uygulanmasında doğru tanı önemlidir. Bu nedenle laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler arasında en çabuk ve en güvenilir sonuç verenini saptamak gerekir.

Trikomoniyaz'ın laboratuvar tanısında direkt ve indirekt tanı yöntemleri kullanılır. Direkt tanıda; mikroskopi, kültür ve boyama yöntemleri, indirekt tanıda ise

indirekt floresans antikor tekniği (IFAT), indirekt hemaglutinasyon tekniği (IHAT), gel immunodifüzyon tekniği, kompleman birleşmesi deneyi (KBD), enzyme immünoassay (EIA) ve rapid latex aglutinasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Son zamanlarda trikomoniyaz'ın tanısında EIA ve Rapid Latex aglutinasyon yöntemleri kullanılmış ve bunların diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında çok iyi sonuçlar verdikleri görülmüştür. Özellikle Rapid Latex aglutinasyon yöntemi, trikomoniyaz'ın tanısında kullanılan en yeni yöntemlerden biridir. Latex aglutinasyon yöntemi birçok çalışmada tanı için kullanılır. Bütün latex yöntemlerinde birçok özellikler aynıdır. Bunlar aglutinasyon veya flokülasyon tipinde bir antijen-antikor reaksiyonudur.

Bu çalışmada trikomoniyaz'ın tanısında rapid latex aglutinasyon yönteminin geliştirilmesi ve mikroskopi, kültür ve boyama yöntemleriyle karşılaştırılması yapıldı. Bu amaç için toplam 566 vajinit yakınması olan ve olmayan kadından vajinal sürüntü alındı ve yukarıda sayılan dört yöntem kullanılarak bu yöntemlerin birbirlerine üstünlüğü ve bölgedeki trikomoniyaz'ın durumu gösterilmeye çalışıldı.

GENEL BİLGİLER

Ginekolojik yakınmaların en sık görüleni vajinal akıntıdır. Bu akıntıya neden olan etkenlerden biride *Trichomonas vaginalis*'tir.

Trichomonas vaginalis'i Alfred Donne insanın üreme yollarının iltihaplı materyalinden 1936 yılında izole etmiştir (16,20,53,54).

Trichomonas vaginalis'in morfolojisi ilk tarif edildiği tarihten beri zamanın teknikleriyle oldukça iyi incelenmiştir. Bugün bilinen ince yapısı D.H.Wenrich'in 1931'de başlayan yayınlarıyla ayrıca W.N.Powell'in 1936'daki katkılarıyla öğrenilmiştir (54).

Her ne kadar *T.vaginalis*'in antijenleri üzerine yapılan araştırmalar L.Riedmüller'in 1932'deki yayınına kadar giderse de, tipler arasında antijen bakımından farklar olduğu 1950'li yıllardan sonra ortaya çıkmaya başlamıştır (54).

U.Tokura 1935 yılında *T.vaginalis* injekte edilen tavşanlardan elde edilen serumda bu parazitlerin aglütine olduğunu yazmıştır. 1957'de T. Tatsuki infeksiyonlu insanlarda antikör aranması yöntemiyle tanı için değerli sonuç alınamayacağını bildirmiştir. J.K.Teras 1959'den sonraki yayınlarında şasırtıcı sonuçların alınmasında, kullanılan susların antijence ayrılıklarının rol oynadığını ve aglütinasyonun kullanılabileceğini savunmuştur (54).

Trichomonas vaginalis'in Taksonomisi:

Kamçılı protozoonları içeren Zoomastigophorea sınıfında bulunan dört takımdan biri de Trichomonadida takımındadır.

Trichomonadida takımındaki protozoonlar; biri dalgalanan zarı oluşturan ve dalgalanan ser boyunca uzanan 4-6 kamçıya, parabazal cisime sahip olup, kistleri yoktur.

Trichomonadidae ailesi, takımın tüm özelliklerini aynen taşımaktadır.

Trichomonadidae ailesinde türler insanda Ürogenital sistem ile sindirim sisteminde yaşarlar. Bu ailede tek cinse ait üç tür bulunur (15,39,53).

TRICHOMONAS : Trichomonas vaginalis
Trichomonas tenax
Trichomonas hominis.

Tablo-1. Trichomonas'ların taksonomideki yeri.

| | |
|-----------|---|
| Dal | Protozoa |
| Alt dal | Sarcomastigophora (Rhizophlagellata) |
| Üst sınıf | Mastigophora |
| Sınıf | Zoomastigophorea |
| Takım | Trichomonadida |
| Aile | Trichomonadidae |
| Cins | Trichomonas |
| Tür | Trichomonas vaginalis Trichomonas tenax Trichomonas hominis |

Trichomonas vaginalis'in Morfolojisi ve Fizyolojisi:

Trichomonas vaginalis kist oluşturmaz sadece trofozoit şekli vardır. Bu trofozoit 10-20 (8-30) µm boyunda ve 7 (5-15) µm. eninde olup, armut şeklindedir (15, 37,40,49,53).

Boyalı preparatlarda boyasız preparatlardakinden daha küçük görülür. Çekirdek ön uca yakın, büyük ve ovaldır. Çekirdek içinde kromatin ince tanelikler şeklindedir. Dalgalanan zar ve bunun kostası, vücudun 1/3 - 2/3'ü kadardır. Ön ucta bulunan blefaroplasttan çıkan dört kancı ön tarafa uzanır. Bazen üç veya beş kancı bulunabilir. Ayrıca bir diğer kancı dalgalanan zarın serbest kenarını oluşturur ve dalgalanan zarla birlikte sonlanır, serbest ucu yoktur (33,46,48).

Dalgalanan zar vücudun ön ucundan başlar, arkaya doğru vücudun ortasına kadar devam eder. Dalgalanan zarın vücuda yapışan kenarında ince bir kosta veya bazal çanak denilen oluşum vardır. Yine ön uçtan başlayan aksostil, bir sivrilik halinde arka uçtan dışarı çıkarak sonlanır. Sitosomadaki siderofil granüller kosta ve aksostil etrafında daha çoktur. Sitosom çok belirsizdir. Bazı preparatlarda çekirdeğin sırt tarafında sosis şeklinde, kalında ve kendisinden daha uzun fibrilli olan bir parabazal cisim görülebilir (33,39,53).

Trichomonas vaginalis kancılarıyla ile ileriye doğru, insanda bulunan diğer trikomonas türlerinden daha yavaş olmakla beraber, aktif hareket gösterir. Dalgalanan zarla protozoon eksenini etrafında dönme hareketini sağlar. Genel olarak büyüklükle hareket arasında ters orantı vardır. Küçükler daha hızlı, büyükler daha yavaş hareket ederler. Dıştaki zar sert olmadığından, kendi çapından daha küçük deliklerden de geçebilir. Ayrıca çeşitli yönlerde yalnız ayaklar çıkarır (15,53).

Trichomonas vaginalis, beslenmesini; vajina mukozanın glikojeninden osmozla ve daha çok da fagositozla yapar. Bakteri, lökositler, vücut hücreleri, spermeler ve partiküller besinleri fagosite ederler. Bunu vücudunun herhangi bir yerinden çıkardığı yalancı ayaklar gerçekleştirir (15,39,53).

***Trichomonas vaginalis*'in evrimi:**

Trichomonas vaginalis monoksen bir parazittir ve tek konağı insandır. Trikomonyaz, insana ancak cinsel ilişki ile doğrudan bulaşır. Tuvalet kağıtları, tuvalet eşyası, nemli çamasırlar ve banyolardan su ile dolaylı bulaşmaya az da olsa rastlanmıştır. *Trichomonas vaginalis* uzunluğuna ikiye bölünerek çoğalır (3,17,24,25,51).

***Trichomonas vaginalis*'in patojenliği:**

Trichomonas vaginalis, kadının sağlam olan vajinasında sığıntı olarak uzun süre yaşayabilir. Ortamın pH'sı mukozada glikojen birikimi, hormon dengesinin bozulması gibi etkenlere bağlı olarak vajinada oluşan değişikliklerle sığıntı olan kamçılı, patojen hale geçer (32,34,47,53,60).

Trichomonas vaginalis'in vajinaya girişinden bir kaç gün sonra kamçılılığının çoğalan kolonileri vajina epitelinde dejenerasyon ve pul şeklinde dökülmelere neden olur (15,47).

Vajinanın pH'sı değiştiğinde veya başka etkenlerle *Trichomonas vaginalis* üretraya ya da endoservikse doğru çekilip buradaki bezlere yerleşebilir. Bu latent dönemde hasta genellikle asemptomatiktir ve organizma endoservikal kanala çekildiğinden gösterilmesi zordur. Rutin olarak yapılan pelvik muayenesinde, sağlıklı vajina ve normal serviks bulguları elde edilir. Sadece servikal smirlerde organizmaya rastlanabilir. Endoservikte görülen anormal epitel lezyonlarının nedeni daha çok latent dönemdeki organizmadır ve neden olduğu lezyonlara bağlı doku

değişiklikleri hafiften ağıra doğru değişir (32,34,47).

Yeni trikomonas enfeksiyonunda vajinal akıntı bol miktarda iltihap elemanlarına sahiptir. Akıntıda çok sayıda hareketli trikomonaslar bulunur. Enfeksiyon süregelen dönemde ise akıntı tablosu oldukça değişiktir, az miktarda trikomonas'lar görülür. Bu dönemdeki enfeksiyonda vajen epitel hücrelerindeki displazik değişiklikler akıntının karakteristiğidir (47).

Trikomonas enfeksiyonunda vajen epitel hücrelerinde eozinofili en sık rastlanılan değişimlerden birisidir. Özellikle normal hallerde siyanofil boya alan intermediyer ve parabazal hücrelerde pseudo-eozinofili ortaya çıkmaktadır. Çok sık meydana gelin bir diğer morfolojik değişiklik de vajen epitel hücrelerinin çekirdeği etrafında boşluk meydana gelmesidir. Çekirdek çevresindeki boşluk daha çok yüzeysel ve ara hücrelerde saptanmaktadır (47).

Hücre çekirdekleri çoğu zaman genişlemiş olup, düzensiz kromatin partikülleri içerirler. Çekirdek kenarları kalınlaşmış olarak görülür, hiperkromazi kuraldır. Hücrenin bütünü ile büzülmesine bağlı olarak çekirdekler bükülmüş sekildedir. Nadiren çıplak çekirdekler saptanmaktadır. Endoservikal hücrelerde de sitoplazmanın vakuolizasyona uğradığı, buna karşın çekirdek değişimlerinin daha az olduğu görülmektedir (47).

Bazı araştırmacılar, trikomonas'a bağlı iltihabi hücresel değişikliklere sahip hastaların, enfeksiyonsuz kişilere oranla servikal kansere tutulma şanslarının daha yüksek olduğunu iddia etmektedirler (47). Sitoloji konusunda önde gelen pek çok araştırmacı ise bu görüşü reddetmektedir. Bununla birlikte herhangi bir servikal kanseri olan hastalarda normal kişilere göre daha yüksek bir trikomonas

insidansı olduğu da bir gerçektir. Böyle olmasının nedeni, özellikle kanserin yol açtığı doku tahribatının trikomonas'ın gelişmesine ortam hazırlamıştır. Servikal karsinomun oluşması ve gelişmesinin vajinal kanalda trikomonas varlığına ya da yokluğuna bağlı olmadığı bilinmelidir (47).

Trichomonas vaginalis'in kuluçka dönemi ortalama 6-10 gündür. Bununla beraber infeksiyon gizli bir dönemden sonra ortaya çıkabilir (53).

Trikomoniyazın vajinaya yerleştiği durumda bazen hiç belirti yoktur, bazen de vajina ve vulvada şiddetli kızartı, yanma, kaşıntı ve akıntı vardır. Akıntı bol olabilir. Bazıları köpüklü ve pis kokuludur. Vajina kızarmıştır, ağac çileği görünümündedir ve yer yer kanamalar görülür (8,10,52).

Trikomoniyazın uretra tutulmasında belirtiler normal üretritlere benzer. Erkeklerde bu yerleşme akut başlayabildiği gibi hiç bir belirti vermeyebilir. Hastalık akut, süregelen veya gizli hale geçebilir ve kendiliğinden de iyileşebilir (1,53,59).

Trichomonas vaginalis'in epidemiyolojisi

Trikomoniyaz dünyanın her yerinde yaygın bir enfeksiyondür. Enfeksiyon oranı ülkeden ülkeye, toplumdaki topluma büyük değişiklikler göstermektedir. Özellikle de kadınlarda cinsel hijyen önlemleri eksik olan toplumlarda oldukça yüksektir. Trichomonas vaginalis ile enfeksiyon olguları %10-90 arasında değişmektedir (6,40). Farklı yöntemlerin kullanılması ve bazılarınının eksik değerlendirilmeleri gibi nedenlerle, ürojenital trikomoniyazın insidansı bakımından yaygınlar arasında büyük uyumsuzluklar dikkati çekmektedir (6).

Amerika'da yılda 4-8 milyon trikomoniyaz'lı görüldüğü

(27), İngiltere'de ise kadınların yarısının gonokok ve trikomonyozlu olduğu rapor edilmiştir (6,53). Dünyada ise trikomonyozlu kadın sayısı 180 milyon olarak tahmin edilmektedir (57).

Trikomonyoz'un epidemiyolojisinde yaş çok önem taşır (14). Trikomonyoz'a 20-40 yaş arası, cinsel yönden aktif olanlarda çok sık rastlanır (15,42,53). Çok az da olsa süt bebeklerinde de görülmüştür. Çünkü yeni doğan bebek birkaç hafta boyunca annenin hormonlarının etkisi altında bulunduğundan annesi *Trichomonas vaginalis* ile enfekte ise doğrudan doğum sırasında, ya da doğumdan sonraki ilk günlerinde hijyenik koşullara dikkat etmeyen enfekte anne veya bakıcı kadın tarafından bulaştırılabilir (53).

Trichomonas vaginalis'in tanısı:

Trikomonyoz'un tanısında alınan örnek, alındığı yer ve alma yöntemi önem taşımaktadır. *Trichomonas vaginalis* kadınlarda; vajinal akıntı ve kazıntıda, idrar sedimentinde, erkeklerde; idrar sedimenti, prostat salgısı veya prostat bezlerinin masajıyla elde edilen salgıda bulunabilir (2,7,21,29).

Tanı için örnek alınması:

Kadınlarda spekulum uygulandıktan sonra açılan vajina arka forniksinden steril bir eküvyonla vajinal akıntı alınır ve alınan örnek, içinde 1-2 ml. serum fizyolojik veya GBS (Glycin buffer salin) ya da besiyeri bulunan tüpe konur. Erkeklerde ise üretra ağzından bir öze veya eküvyonla alınan madde aynı şekilde tüpe konur. İdrar santrifüjlenerek dipte kalan cöküntü incelenir. Vajinal akıntı örneklerinden sağlıklı sonuç alınabilmesi için örnek alınmasından 1-2 gün öncesinde vajinaya herhangi bir maddenin uygulanmaması ve ilaç alınmaması önerilir.

Trichomonas vaginalis'in laboratuvar tanısı:

iki şekilde olmaktadır.

- a- Direkt tanı yöntemleri,
- b- indirekt tanı yöntemleri.

A. Direkt tanı yöntemleri:

1. Direkt mikroskopik yöntem,
2. Kültür yöntemi,
3. Boyama yöntemleri olmak üzere üç şekilde incelenebilir.

I. Direkt mikroskopik yöntemi: Örnek lam üzerine alınır, bir damla serum fizyolojik veya PBS çözeltisi ile karıştırılarak homojen hale getirilir. Lamel kapatılır. Işık mikroskobu, karanlık saha veya faz kontrast mikroskopunda incelenir. Paraziti oval şekli, kamçılarının hızlı hareketi, dalgalı zarın dalgalanması ile kolayca tanınır. Örnek uzun süre bekletilmeden bakılmalıdır, aksi takdirde hareketini kaybeder. Trikomonas'ı harekete geçirmek için bir damla % 5 para-amino salisilik asit konması önerilmektedir (9,33).

Trichomoniyaz'ın tanısında en basit, en kolay, en ucuz yöntem direkt mikroskopik incelemedir. Ancak, bazı pozitif bulgular bu yöntem ile saptanamamaktadır. Yapılan incelemelere göre direkt mikroskopik yöntemde paraziti saptama oranı % 34,8-87 arasında değişmektedir (9).

II. Kültür Yöntemi: Trikomoniyaz'ın tanısında kültür yöntemi ayrı bir değer taşımaktadır. En sağlıklı sonuç direkt mikroskopi incelenmesi ve kültür yöntemleri birlikte kullanıldıkları zaman alınmaktadır. Direkt bakıda negatif olan olgularda, kültür yöntemi çoğunlukla pozitif olabilmektedir. Zaman yetersizliği nedeniyle anında incelenemeyecek olgularda kültür yöntemi tercih edilmelidir. Kadının temizlenmesi veya vajinal ilaç kullanması kültür

sonucunu fazla etkilememektedir. Kùltürler 48-96 saatte incelenir. Enfekte olduğu bilinen kadınların ancak % 8'inde kùltür sonuçlarının negatif olduğu bildirilmiştir (9,33,53).

Besiyerinde bu kamcılı parazitin üretilebilmesi için besiyerinin pH'sı 5.5-6 olmalıdır (pH 5'in altında ve 7.5'in üstünde olursa parazit ürememektedir (5). Parazitin üretilmesinde en uygun sıcaklık 37°C olup besiyerinde yoni bir kusak elde edilmesi için gereken süre de en az 6-9 saat olmaktadır (9).

Bu amaç için başlıca kullanılan besiyerleri şunlardır;

1- CPLM (Sistein-Pepton-Karaciğer-Maltoz) Besiyeri:

Bu besiyerini içeren tüpler ekim öncesi 37°C'de ısıtılır. Her bir tüpe 2 ml. steril inaktif insan veya at serumu, ayrıca 1000 ünite/ml. penisilin ve 1 mg/ml. streptomisin eklenir. Pasaj 48 saatte bir yapılır (9, 31, 33, 45).

2- Modifiye CPLM besiyeri:

Bu besiyerinin içeriği; karaciğer buyyonu, pepton ve cystein hydrochloriddir. Bunlar belirli oranlarda karıştırılıp steril edildikten sonra 1000 ünite/ml. penisilin ve 2 mg/ml. streptomisin konur.

3- Diamond TBS (Tryptose phosphate saline)-I besiyeri:

TP Broth base powder 48.8 gr.
Distile su 800 ml. karıştırılarak
Karışım 875 ml.'ye tamamlanır, pH 6'ya ayarlanır, Watman 1 filtre kağıdı ile negatif basınçta süzülür, 175 ml. halinde cam balonlara dağıtılarak steril edilir. Daha sonra 5 ml. askorbik asit ve 20 ml. inaktif at serumu konur. Tüplere 15'er ml. olacak şekilde dağıtılır ve +4°C'de saklanır (9).

4- Feinberg ve Whittington'un besiyeri:

Bu besiyeri *Trichomonas vaginalis* ve kandida infeksiyonlarının tanısında kullanılır.

Bu besiyeri de kullanılmadan önce 37°C'de ısıtılır ve pasajlar 48 saatte bir tekrarlanır (33).

5- McEntegart'ın besiyeri:

Trichomonas vaginalis ve kimi barsak protozoonlarının bakterisiz üretilmesi için uygun bir besiyeridir. Sürekli yeni pasajlarla bakterisiz protozoon ekimi elde edilir.

Bu besiyeri hazırlandıktan sonra sterillik kontrolü için 37°C'de 48 saat bekletilir (33).

6- *Trichomonas (Oxid)* besiyeri:

a) Kısmen hazır besiyeri:

Trichomonas vaginalis için Oxid (Code CY161) firmasının ürettiği toz halindeki vasattan 37.5 gr. tartılır ve 1 lt. distile suda ısıtılarak eritilir ve 120°C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Daha sonra 50°C'ye soğutulur ve 80 ml. inaktif ek serum (pH=6 olmalı) ve içine 1000 ünit/ml. penisilin ve 500 mg/ml. streptomisin eklenir.

b) Tamamiyle hazır besiyeri:

Firma tarafında *Trichomonas vaginalis* üretimi için özel olarak hazırlanmıştır (9).

Yukarıda adı geçen besiyerlerine ek olarak birçok başka besiyerleri aynı amaç için kullanılmaktadır.

III.Boyama yöntemi:Başlıca kullanılan boyama yöntemleri (8,17,33).

1- Giemsa,

- 2- May-Grünwald,
- 3- May-Grünwald-Giemsa,
- 4- Papanicolaou,
- 5- Acridine orange boyama yöntemleridir.

1- Giemsa boyama yöntemi:

Örnek lam üzerine yayılır ve havada kurutulur. Metil alkol ile 1-2 dakika tesbit edilir, Giemsa stok çözeltisinden 2 damla 1 cc. distile suya konur ve böyle elde edilmiş boya ile 30 dakika boyanır. Boyalı preparatlar immersiyon objektifinde, ışık mikroskopunda incelenir (9,33).

2- May-Grünwald Boyama yöntemi:

Yayma yapıp havada kurutulmuş olan preparat, ticari olarak hazır bulunan May-Grünwald boyası ile 3 dakika süre ile boyanır, boya dökülmeden preparata boya miktarı kadar saf su konulur. 1 dakika bekletilir, daha sonra preparat havada kurutulur ve immersiyon objektifi ile mikroskopta incelenir (9,17,33).

3- May-Grünwald-Giemsa Boyama yöntemi:

May-Grünwald ile boyanan preparat 1/1 distile su ile sulandırılmış Giemsa boyasıyla 10-15 dakika süre ile boyanarak su boyasız akıncaya kadar çeşme suyu ile yıkanır, havada kurutulduktan sonra immersiyon objektifi ile mikroskopta incelenir (9,17).

4- Papanicolaou Boyama yöntemi:

Vajinal akıntı örnekleri önceden yumurta akı-thymol karışımı sürülmüş, oda sıcaklığında kurutulmuş lemlara yayılarak 15 dakika süre ile etil-alkol karışımında tesbit edilir. Sonra % 29, % 35, % 70'lik olmak üzere alkol serilerinden geçirilir ve saf suda yıkanır. 8 dakika hemoteksilen boyasında bekletilir. Sonra boya gidinceye kadar yıkanır. % 0.9'luk HCl'ye bir kez batırılır. %

0.4'lük LiCo₃ da 7-8 dakika bekletilir, sonra tekrar % 50, % 70, % 85, % 95'lik alkol serilerinden geçirilir. D.G.6'da (Orange G 6 solution) 8 dakika tutulur ve % 95'lik alkole 4 defa batırılıp çıkarılır ve EA'da (Polychromatic solution EA) 8 dakika bırakılır. Yine hazırlanmış alkol serilerine 4'er kez olmak üzere batırılır ve 5'er dakika süre ile 2 ayrı sektele ksilolde bırakılır preparat kurutulduktan sonra kanada balsamı ile kapatılır (?).

5- Acridine Orange Boyama Yöntemi

Lamlar Amies solüsyonu (ethanol-civa klorür, susuz sodyum asetat, sucrose) içine batırılır, kurutulularak kapalı kutular içinde saklanır. Bu hazır lamlar üzerine vajinal akıntı yayılır. Havada kurutulan yaymalar en geç 24 saat içinde boyanır. Eğer daha uzun bir süre sonra boyanacaksa, lamlar Amies solüsyonu içinde saklanır. Kurutulmuş lamlar sıra ile % 80, % 70 ve % 50'lik alkol, distile su, % 1'lik asetik asit, distile su serilerinden geçirildikten sonra 3 dakika süre ile Sörensen'in fosfat tamponu (pH 6) ile sulandırılarak Acridine Orange % 1'lik stok boyası ile boyanır. 1 dakika tamponda tutularak yıkanır, 2 dakika kadar kalsiyum klorid solüsyonunda bekletilerek dekolore edilir. Preparatlar hemen incelenmeyecekse karanlıkta tamponda saklanır. Hemen bakılacak preparatlar üzerine lamel kapatılır ve floresan mikroskopunda incelenir. Bu yöntemle trikomonas'lar yuvarlak veya muz şeklinde, sarımsı-yeşil çekirdekli, epitel hücreleri ise parlak yeşile boyanmış çekirdekleri ile yeşil renkli hücreler halinde, maya, bakteri ve fagositik hücreler içindeki bakteriler parlak kırmızı görülür (9,17).

B. indirekt Tanı Yöntemleri:

Belirtisiz seyreden trikomoniyaz olgularının ortaya çıkarılmasında, süregelen olgularda ve epidemiyolojik araştırmalarda serolojik tanı yöntemlerinden de

yararlanılmaktadır. Serolojik yöntemlerden hangisinin daha kullanışlı ve özgül olduğunu ortaya koyabilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (9,53).

I. Serumda antikor arama yöntemleri.

- a) indirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT),
- b) indirekt Hemaglutinasyon Tekniği (IHAT),
- c) Jel immunodifüzyon Tekniği (GİT),
- d) Kompleman Birleşmesi Deneyi (KBD) (9).

II. Örnekte antijen arama yöntemleri:

- a- Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA)
- b- Rapid latex aglutinasyon yöntemi (RLA).

I- Serumda Antikor Arama Yöntemleri:

a) indirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT):

Deney için gerekli maddeler,

- Antijen (Özel yöntemle 2 şekilde elde edilir)
- Fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH'si 7.6 olmalıdır).

Floresans mikroskop

IFA tekniği uygulandıktan sonra Mikroskopta özellikle stoplazma sınırında olmak üzere trikomonas'ların tüm yapısının parlak floresans vermesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Soluk, belirgin olmayan floresans vermesi, zeyherle çevrili olarak görülen trikomonas'lar ise negatif olarak değerlendirilir (9,43).

b) indirekt Hemaglutinasyon Tekniği (IHAT):

Deney için gerekli maddeler,

- Saf olarak kültürden elde edilen T.vaginalis damıtık suda dondurulup çözülerek parçalandıktan sonra santrifüj edilip üstteki sıvı antijen olarak kullanılır.

- Fosfat tampon solusyonu (PBS) pH 7.2 olmalıdır.
- Taze tannik asit solusyonu,
- Modifive Alsever solusyonu,
- Koyun alyuvarları ve
- Hassaslaştırılmıs koyun alyuvarları hazırlanır.

IFA tekniği uygulandıktan sonra Alyuvarların dđme gibi toplanıp etrafının kesin olması negatif, küçük dđme, etrafı dumanlı veya granülıl olarak görđlmesi ise pozitif sonuç olarak değerlendirilir (2, 44).

c) Jel immunodifüzyon Tekniği (JIT):

Bu deney için özel tampon solusyonu hazırlanır ve pH'sı 7.4'e ayarlanır. Tampon Na_2PO_4 ve NaH_2PO_4 içerir).

100 ml. tampon içinde 1 gr. agar (Bacto) kaynar su banyosunda 30 dakika bekletilerek eritilir. Aseton-alkol karışımı ile temizlenmiş lamalar üzerine sıcak agar 3 ml. hesabıyla konur, 10-15 dakika bekletildikten sonra içinde nemli süzgeç kağıdı bulunan petri kutularına içine yerleştirilerek buzdolabında 30 dakika bekletilir. Daha sonra istenilen şekilde kuyular açılır. Kuyulara antijen ile 1/2 1/32 oranında sulandırılmış serumlar konur. Hangi sulandırımında band olmuşsa o titrede antikorun olduğu kabul edilir (9).

d) Kompleman Birleşmesi Deneyi (KBD):

Trikomoniyaz'da kullanılan diğer serolojik yöntemlerden biri de kompleman birleşmesi Deneyi (KBD) dir. Trikomoniyaz'da kullanılan bu serolojik yöntemlerden hangisinin daha kullanışlı ve özgül olabileceği konusunda tam bir görüş birliği sağlanamamıştır.

IFA yönteminin uygun bir şekilde standardize edildiğinde trikomoniyaz tanısında özellikle de epidemiyolojik

incelemelerde kullanılabileceği bildirilmektedir. İHA yöntemi-
ni trikononiyaz tanısı için başarılı bir test diye bildiren-
lerin yanı sıra tanıda, daha az başarılı sonuçlar verdiğini
belirtenler de vardır (9).

II- Örnekte Antijen Arama Yöntemleri:

a) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Bir antijen veya antikor kimyasal olarak enzime bağlanırsa enzimatik ve immünolojik bir deneyin sonunda, enzimlerin katabolik nitelikleri nedeniyle bir tek enzim molekülü birçok substrat molekülleri ile tepkimeye girdiğinden, enzim ile antijen veya antikor substratının hidrolizi sırasında immünolojik tepkimeyi artırır. Enzim-Substrat ilişkisi nedeniyle büyük bir duyarlılık sağlanmış olur. ELISA ilk kez Engvall ve Perlmann tarafından biyolojik önemi olan substratların ölçülmesinde kullanılmıştır. ELISA'nın uygulama kolaylığı enzimatik yıkılma sonucu renkli bir ürünün ortaya çıkmasıdır. "Horse radish" (Yaban turpu) peroksidaz enzimi; 5-aminosalisilik asit substratı ile kırmızıya, orthophenilene diamine (OPD) ile kahverengiye, Alkalen fosfataz enzimi ise p-nitrophenyl'li renksiz substratı fosfat sarısına dönüştürür (4,41).

ELISA'nın birkaç uygulama şekli vardır

1) Dolaylı Yöntem: Enzimle işaretlenmiş anti-antikor kullanarak antikor aramak ilkesine dayanır. Polisitren veya Polivinil bir yüze antijen kaplanır. Önce hasta serumu ile sonra enzimle işaretlenmiş anti-antikor inkübe edilir. Konjugat taşıyıcı yüzeyde antikor-antijen kompleksine bağlanır, konjugatın miktarı, hidrolize substrat miktarına eşittir. Bunun ölçülmesi serumdaki antikorun miktarını verir. Bu çok kullanışlı bir yöntemdir (41).

2) **Çift Antikor (Sandwich) Yöntemi:** Bu yöntemde taşıyıcı yüzeye özgül antikor içeren immünooglobulin bağlanır. Antijen bulunduran solüsyon duyarlaştırılmış yüzeye inkübe edilir ve yıkanarak solüsyon uzaklaştırılır. Antijen varsa antikorla birleşerek yüzeye tutunur. Özgül antikorla bağlanmış enzim ortama eklenir. Enzime uygun substratla tepkimeye sokulur. Substratın hidrolizi kadar antijen vardır (41).

3) **Enzim Bağlanmış Antijenin Rekabetiyle Antijen Aranması:** immünooglobulin içeren özgül antikor, taşıyıcı yüzeye bağlanır. Enzim bağlanmış antijen ve antijen içeren örnek, değişik oranlarda taşıyıcı yüzeye inkübe edilir. Enzimle işaretli antijen miktarı substratın hidrolizinin oranıyla ölçülür. Bilinmeyen solüsyonda antijen çok olacağından en az işaretlenmiş antijen taşıyıcı yüzeye bağlanmış olacaktır (41).

Bu yöntemlerin hepsinde enzim-substrat ilişkisi sonucu bir renk oluşur. Bu çıplak gözle veya spektrofotometrede okunur.

ELISA son zamanlarda çeşitli hastalıkların tanısında duyarlı bir test olarak kullanıldığı gibi parazitik hastalıkların örneğin; trishenelloz, sistosomiyaz, sıtma, tripanozomiyaz, toksoplazmoz ve trikomoniyaz'ın tanısında da kullanılmaktadır (41,62).

Londra'da 1987 yılında yapılan bir çalışmada vajinal sürüntüden *Trichomonas vaginalis* antijeninin belirlenmesi için ELISA yöntemi geliştirilmiştir. Çalışma, 482 cinsel ilişkiyle bulaşan hastalığı olan kadın üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada, örnekte ELISA ile antijen aranmıştır (61).

b) Latex Aglutinasyon Yöntemi:

Latex, elastik katı bir madde olup Latince "Fluid"

sıvı sözcüğünden türetilmiştir. Aslında bazen vücut sıvıları, özellikle kan serumu yerine de kullanılmaktadır. Sözcük kauçuk gibi bitki grubundaki sütlü ağaçların özsuyla anlamına kullanılmaktadır. Bu özsu havayla temas ettiğinde koagüle olur ve sıvı halden katı hale geçer. Tanımlandığından beri Polystyren de olduğu sentetik organik elastomerik polimerleri geliştirilmiştir (35).

Polimer teknolojisinin 1950'nin başından itibaren gelişmesiyle birlikte immünoolojide de önemli atılımları başlatmıştır.

immünoolojik yöntemler mikrop antijenlerinin identifikasyonu ve enfeksiyon hastalıklarının tanınmasında yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. İlk testler, özgül antikorlarla solübl antijenlerin presipitasyonu temelinde dayanmaktaydı. Daha ileri bir yöntem olan konter immünoelektroforez günümüzde de yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aslında aglütinasyon temelinde dayanan testler, şüphesizki daha kolay yapılır ve okunur. Pasif aglütinasyonda partiküller özgül antikor veya antijen ile kaplanmış veya duyarlılaştırılmıştır. Benzer antikor veya antijen varlığında bu duyarlılaştırılmış partiküllerin kümelenmeleri kolayca görülebilir. Bu tekniğin açıklandığı ilk zamanlarda karıştıran sorunlardan biri partikül olarak kullanılan eritrositlerin, kendilerinin immünoolojik olarak etkili olmalarıydı ve bu durum test sonuçlarının özgülüğünü etkiliyordu. Partiküllerin yüzey komponentleri, test örneklerindeki antikor veya diğer faktörlerle de etkileşiyordu, ek olarak partiküller tek başlarına stabil olmadıklarından sık sık taze süspansiyonların hazırlanması gerekiyordu. Serenek olarak bentonit gibi antijenik olmayan partiküller denendi. Fakat, bunun sorunları polystyren latex partiküllerinin kullanılmaya başlandığı zaman ortaya çıktı.

Latex'in kullanım alanına sokulması ile ilk güvenilir test gelişti. RF (rheumatoid factor) nin tesbit edilmesi için antikor olarak değilde latex'i duyarlaştırmak için immüoglobulin romatoid faktörün aranmasında antiijen olarak kullanıldı. Latex testi romatoid faktör ile ilgili testlerin rapor edilmesinden yaklaşık 20 yıl sonra mikrop antiijenlerinin aranmasında uygulanmaya konuldu. Geçen son 10 yılda testin kullanım alanı yaygınlaşmış ve sistem rutin klinik laboratuvar çalışmalarında bir çok hastalığın tanısında yerini almıştır (35).

Testin ilkesi, antikor ile kaplı latex partiküllerinin benzer antiijenin bulunması durumunda gözle görülebilir kümeler yapmasıdır. Ortamda antiijen yoksa veya mevcut antiijen antikora uymazsa partiküller küme yapmadan, düzgün, sit görünümünde bir süspansiyon halinde kalırlar. Aglütinasyonunun oluşması için antiijen, en azından divalar olmalı, solubl ya da partikül halinde bulunmalıdır. Solubl bakteri antiijenlerinden biri, çok tekrarlayan epitoplar içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Fakat, birçok diğer antiijenler de aynı şekilde başarı ile gösterilebilirler (11,35). Sonuçlarda farklılıklar olabilir (12,35).

Reaksiyonun özgülüğü, test örneği ile benzer antikorların karıştırılmasından sonra pozitif ve negatif kontroller yapılarak sağlanabilir.

Latex partiküllerinin süspansiyonları doğada kolloidal haldedir. immüoglobulin molekülleri ancak iyonik olmayan Van der Waals yükleriyle latex partiküllerinin yüzeyine bağlanır. Bu işlem sırasında antikorların moleküler yapısında oluşan konfügurasyon değişiklikleri, bunların immünolojik aktivitelerini önemli ölçüde etkilemez. Bu işlem ile 0.22-0.33 µm. capındaki partiküller 1300-2000 antikor

molekülünü absorbe edebilmektedirler. Moleküllerin antijen bağlayan kısımları (Fab), Stafilokok koagülünasyon testlerinde olduğu gibi partiküllerin yüzeyinde uyumlu uzaklığa sahip olmayabilirler. Fakat bu durum duyarlı latex süspansiyonlarının uygulanmasını hiç bir şekilde etkilememektedir (35).

Son zamanlarda, yüksek yoğunlukta karboksil grublarının olduğu yüzey modifikasyonlu latex süspansiyonları hazırlanmıştır. Bunlar immünglobülin moleküllerinin veya Fab fragmentlerinin kimyasal bağlanması için avantajlar sağlamaktadır.

Latex Aglütinasyon Üstünlükleri:

Latex partiküllerinin süspansiyonu pasif aglütinasyon testi için katı faz parçası olarak sunulmaktadır. Kendi yüzeylerinde immünojenik olarak tanımlanabilir antijenler yoktur. Aynı büyüklük ve aynı kalitedeki süspansiyonu ticari olarak hazır bulunmamaktadır. Bir kez duyarlı kılındktan sonra 4°C'de 1 yıl aktivitesini korur. Duyarlı hale getirilmiş latex elle ve makinayla çeşitli yöntemlerde kullanılabilir. Bu teknik basit yapıda, kolay okunan ve hatta çok tecrübeli elemana gerek göstermeyen bir yöntemdir. Pahalı aletler de gerektirmez. Antikoru kalitesine göre duyarlılığı değişir (11,12,23,35).

Solid Faz:

Latex süspansiyonları çeşitli firmalar tarafından üretilmektedir. Polystyrene partikülleri 0.1 ile 100 µm. çapında imal edilir. Bunların çok değişik uygulama alanları vardır. Aglütinasyon test sisteminde 1 µm.den büyük olanlar kullanılmaz. Bazı büyük boncuklar ELISA'da katı faz olarak kullanılmaktadır. Latex ticari olarak 36 değişik boyutta üretilmesine karşı 0.2 ile 1 µm. olanlar daha çok tercih

edilmektedir. Boncuklar çok homojen olmalıdır ve % 3'den az değişikliklere sahip olanlar uygundur ve bunlar kullanılır (35).

Polyazirenlere ek olarak polivinil, talden ve poliakrilamid, hatta naylon gibi uygun diğer çeşitli maddelerden de partiküller yapılır (11,35).

Partiküllerin yüzeyinde süspansiyonun kolloidal dayanıklılığına yardım eden sülfat grubu vardır. Son zamanlardaki modifikasyonlar partiküllerin yüzeylerini saran amin, karboksil, hidroksil veya aldehit grupları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunlar, partiküllere immünglobülinlerin veya diğer maddelerinin kovalent bağlanmasını sağlar ve bu da duyarlılaştırmayı artırır (35).

Çoğu süspansiyonlar beyaz görünümündedir. Bu süspansiyonlar, siyah bir zemin üzerinde çok iyi partiküler reaksiyonlar verirler. Fakat süspansiyonlar değişik renklerde, floresans veren veya floresans vermeyen boya ile boyanabilir. Beyaz süspansiyonlar tercih edilir (11,12,23,35).

Uygun partiküllerin seçimi:

Her hangi bir uygulama için latex partiküllerin seçiminde kesin bir kural yoktur. Bu teknolojinin gelişmesiyle ilgili pek çok kaynaklar yayınlanmıştır. Özellikle pasif duyarlılaştırmının kullanımı için Difco'nun 0.81 µm. çapında partiküler süspansiyonları tercih edilmektedir. Bacto latex 0.81, ortalama 0.81 µm. çapında olan latex partiküllerinin standardize edilmiş süspansiyonudur. Bu, romatoid artrit, kriptokokoz, tularemi, bruselloz, leptospiroz, salmonelloz, trişinoz tanısında kullanılmaktadır (13,18,35).

Son zamanlarda süspansiyonun yeni çeşitleri geliştirilmiştir. Çünkü 0.01 µm. çapındaki partiküller her test sistemine uygun olmamaktadır. Gerçekten de bazı sistemlerde çalışmayabilmektedir. En iyi süspansiyon, bir kişinin kendi sınav vanı ile elde edilmektedir. Bir kaç değişik süspansiyon denenebilir ve böylece en iyi sonuç veren seçilmiş olur. Partikül yüzeyine deşitirici gruplar eklemek suretiyle hazırlanan süspansiyonlar pasif duyarlılaştırma işleminde iyi sonuçlar vermektedir.

Ticari olarak satılan latex partiküllerinin hepsi olmasa da çoğu sıvı süspansiyonlardır. Sodyum Lauril sülfat gibi maddeleri yüzeylerinde aktif zerrecikler olarak içerirler ve bu da süspansiyonların dayanıklılığını artırır. Duyarlılaştırılmaması latexler oda sıcaklığında saklanabilir. Buzdolabında da saklanabilir. Fakat kesinlikle dondurulmamalıdır. Sayat donarsa geriye dönmeyen küçelmelere neden olur. Normalde antimikrobikler konmaz. Ancak özellikle şise sık sık açılıyorsa, koruyucu olarak % 0.1 lik sodyum asid konarak saklanmalıdır. Mikrop kontaminasyonu süspansiyonu bozabilir. Şise kullanılacağı zaman yavaşca çalkalanarak homojen hale getirilmelidir (18,35).

ANTİKOR DUYARLILAŞTIRMASI

Latex süspansiyonun duyarlılaştırma işleminde özgül antikorioların kullanımı en doğrusudur. Bu nedenle gerekli aktivitenin sağlanmasında antikorlar dikkatle seçilmelidir (35).

Arıtma işlemleri: Latex partiküllerinin duyarlılaştırması tüm serumlarla yapılır. Fakat, bu, sadece yüzey tabakasının küçük bir oranda immünolojik aktiviteye sahip olmasıyla gerçekleşir. Duyarlılaştırmada saf immünglobülinler kullanılır. Özgül

antikorların oldukça küçük bir oranını içeren poliklonal immüoglobülin fraksiyonları da kullanılır. Bu nedenle kromatografiyle saflaştırmaya uygun antikorlar seçilir. Poliklonal serum ile monoklonal, karşılaştırılmış ve sonuçta saf immüoglobülinlerin kullanımını önerilmiştir. Bu işlemlerde amonyum sülfat presipitasyonu çok kullanılır (35).

Temizleme işlemi dietilamino etil-sellüloz da kromatografi ile pH'sı 8.5 olan 0.15 M. sodyum klorid içeren 0.1 M. Tris-HCl kullanarak veya diğer uygun işlemlerle de yapılabilir.

Deneyin duyarlılaştırılmasında tüm immüoglobulin molekülleri yerine immüoglobülinin aktif parçası olan F (ab)₂ kullanılabilir.

Duyarlılaştırma işleminde antikorların hazırlanmasında kullanılan herhangi bir yöntemle latex süspansiyonunun duyarlılaştırılmasında, non veya preimmün serum örnekleri denenecek şekilde kullanılmalıdır.

Seçenek Alıcılar:

Özellikle değişik makrop antiijenleri ile reaksiyona giren immüoglobülinler dışındaki diğer maddelerdir. Lektinler böyle maddelerdendir. Bu da latex partikül süspansiyonlarının duyarlılaştırılmasında kullanılabilir. Ticari olarak bir çok saflaştırılmış lektin bulunmaktadır(35).

Duyarlılaştırma işlemleri:

Antikorla duyarlılaştırılmış latex çözeltisi yapmak için başlangıç testleri yapılmalıdır. Bu da çok küçük miktarlarla olmalıdır. Örneğin; 1 ml. antijene karşı antikorun titrasyonu yapılmalıdır. Ayrıçların değerlendirilmesinde dikkat edilecek 2 önemli özellik vardır.

1-Duyarlılık, 2- Düzgünlük.

Özgünlük de az önemli değildir, fakat, bu, antikorun seçimiyle çoğu zaman tesbit edilir. Eğer partiküller duyarlılaştırma veya testin yapılması sırasında benzer antijenlerin olmamasına karşın kendiliğinden kümeleşiyorsa onun değeri yoktur. Fakat bazı zamanlar düzgün bir çözelti elde etmek çok güçtür. Düzgün bir çözelti, süt görünümünde olup partiküller küme oluşturmazlar. Antijenin olmadığı zaman süspansiyonda gözle görülür kümelerin olması ve partiküllerin kümelenmesi otoaglutinasyon olduğunu gösterir (12, 35).

Latex'in küçük miktarlarda bir serisi, antikorun bir seri dilüsyonları kullanılarak hazırlanır ve bunlar antijenin homologluğunu ve düzgünlüğünü belirleyecek normal vücut sıvısı veya tampona karşı denenerek testin duyarlılığının ölçülmesinde kullanılır (35).

Pasif Adsorbsiyon:

Duyarlılaştırma işleminde sulandırıcı olarak normalde glycin buffer saline (GBS) kullanılır.

Pasif adsorbsiyon aşağıdaki şekilde yapılır.

1- Temiz bir cam kabin içinde eşit hacimde, uygun titrede sulandırılmış antikor ve %4'lük latex karıştırılır.

2- 37°C'de 2 saat inkübe edilir. 15 dakikada bir çalkalanır.

3-%1'lik bovine serum albumin (BSA) ve %1'lik sodyum azide içeren GBS'den 2 hacim eklenir.

Eğer karıştırma sırasında bir sorun çıkarsa işlemlerde su değişiklikleri yapılmalıdır.

1- Duyarlılaştırmadan önce latex'i deterjan veya diğer

kontaminant materyallerden uzaklaştırmak için parşümen kağıdı ile divaliz veya santrifüj yöntemiyle yıkamak gerekir. Bu iş için deiyonize su veya GBS kullanılır.

Elektrolit yoğunluğunun yüksek olması, süspansiyonun destabilize edilmesini gerektirir.

2- Farklı latex çözeltisi ve/veya farklı antikor preparatları kullanılır.

3- inkübasyon zamanı ve sıcaklığı değiştirilir.

4- Duyarlılaştırma işleminden sonra santrifüj yardımıyla latex yıkanarak, bağlanmayan antikor veya antijen uzaklaştırılır. Örneğin: BBS süspansiyonunun ilavesinden sonra BSA ile yıkanır. 37°C'de 30 dakika inkübe edilir. 18.000xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilir. BBS+BSA ile yeniden süspansiyonu yapılır. Tekrar santrifüj edilir. BBS+BSA ile çalışmada kullanılacak yoğunlukta süspansiyonu hazırlanır.

5- Fazla BSA veya deterjan (Tween 20 gibi veya Triton x-100 gibi) eklenir.

6- BSA kavnağı değiştirilir. BSA'nın değişik miktarları hazırlanır, bazıları çözeltinin sabitleşmesinde daha iyidir.

7- Latex çözeltisinin duyarlılığının stabilitesi saklandığı kabin türünden etkilenebilmektedir. Normalde temiz cam siseler kullanılır. Fakat plastik siseler de kullanılabilir. Bazı plastik maddeler proteinleri diğerlerinden daha kuvvetli adsorbe ederler. Bu nedenle siseler çok dikkatli seçilmelidir.

8- Lam aglütinasyon testlerinde kullanılan partiküllerin ortalama yoğunluğu 20.8-1.25 olmalıdır. 0 yoğunluk fabrika tarafından ayarlanmıştır. Bazı testlerde partikül yoğunluğu, duyarlılaştırma için çok önemlidir. Eğer uygunsa 650 nm. dalga boyunda optik dansite ölçümü kullanılarak verilmelidir.

9- Bazen partiküllerin immüoglobülin moleküllerinden

daha büyük affiniteye sahip olan bir madde ile kaplanması mümkündür. Saflaştırılmış antikorlar veya F (ab)₂ parçaları, polyacrylamid partiküllerine kuvvetle bağlanırlar. Önce onlar Poly-L-Lysine'le kaplanır.

10-15m bunlara karşın bağlanma sağlanmıyorsa kimyasal bağlama işlemi denenir.

Kimyasal Bağlama:

ELISA yöntemi, antijen bağlama aktivitesine etkisi olmaksızın diğer proteinlere immünglobulinlerin bağlanmasında bir seri yöntemin gelişimini sağlamıştır. Bu işlemler, immünglobulinlerin latex partiküllerine bağlanmasını esas alan en eski kimyasal işlemlerin biraraya getirilmesiyle sağlanmıştır. Birçok yöntem kullanılabilir, bunların bazıları basit, bazıları ise karmaşıktır. Kimyasal reaksiyonun olması için latex ile uygun yüzey gruplarının bulunması gerekir. Bununla beraber partiküllerin yüzey kimyasının doğrudan veya modifiye olarak son gruplara sahip olmasıyla nöleküllerin bağlanması mümkün olur. Bağlanma sırasında reaktanların stokiometrililerinin kontrol edilmesi, latex'in antikorla, antikorun latex ile latex'in diğer istenmeyen konjuat şekillerinin en aza indirgenmesi gerekir. En basit kimyasal bağlama yöntemi örnek olarak C grubu streptokok antijenleriyle reaksiyon veren Dolichos biflorus'dan elde edilen Lectin'in polystren latex ile karboksillenecek bağlanması verilebilir. immünglobulinlerin bağlanması da benzer şekilde olmaktadır (35).

1. 0.1 mg. lektin 1 ml. distile suda eritilir.
2. 100 µl. karboksilat latexten (Covasphere-Cx, Covalent technology Corp, Ann.Arbor, Mich. 0.7 µm. diameter) ilave edilir ve karıştırılır.
3. 0.1 mg. 1-etil-3 (dimetil amino-propil) karbodiimide hidroklorid (EDAC, sigma Chemical Co, st.louis)

ilave edilir ve karıştırılır.

4. Magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak gece boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.

5. 10.000 x g'de +4°C'de soğutmalı santrifüjde 10 dakika 3 kez yıkanır. Her seferinde 0.1 ml. fosfat tamponuyla süspansiyonu yapılır. 1 ml.sinde aynı tampon içinde hazırlanmış ve pH'sı 7.2 olan BSA'den 1 ml. konur.

6. +4°C'de saklanır.

TESTİN YAPILMASI:

I- Manual yöntem:

Ençok kullanılan işlem lam üzerinde aglütinasyondur. Testi yapmak için uygun bir yüzeye ihtiyac vardır. Genellikle lam, plastik veya emici olmayan kart kullanılır. Beyaz latex süspansiyonundan en iyi sonuç siyah bir zemin üzerinde alınır. Eğer temiz bir lam kullanılırsa gerçekleşen aglütinasyon ancak siyah bir zemin üzerinde görülür. Örnekler patojen ajan taşıyabilir. Bu nedenle örneğin tutulmasında ve tasarrufunda dikkatli olmak gerekir. Trikomoniyaz'ın tanısı esas alınır ise bu işlem aşağıda olduğu gibi yapılır.

a) Test yapılacak yüzeye özgül latex süspansiyonundan yanına da kontrol olarak özgül olmayan latekten bir damla konur. Süspansiyon, testin yapıldığı oda sıcaklığında olmalıdır. Uygulamadan önce yavaş yavaş sallanır. Kendiliğinden kümelenme olursa pozitif bir reaksiyondan ayırt etmek zordur. Bu süspansiyon teste kullanılmaya uygun değildir (11,12,35).

b) Latex'in herbir damlasının yanına test sıvısından bir damla konarak dağıtılır.

c) Tahta veya cam çubuk gibi uygun bir araç ile iyice yavaş yavaş karıştırılır ve yaklaşık 2-2.5 cm. çapındaki yuvarlak veya oval bir alana yayılır.

d) Kontrol olarak kullanılan trikomonas antikoru olmayan serumla kaplanmış latex'le, trikomonas antijeni karşılaştırıldığında aglütinasyon görülmemelidir. Şayet kontrolde aglütinasyon görülürse sonuç doğru kabul edilmez ve hatanın kaynağı araştırılır.

e) Reaktanları karıştırmak için el ile rotasyon hareketleri yapılarak lam yavaşça sallanır ve en çok 3 dakikada aglütinasyon gözlenir. Aglütinasyon latex partiküllerinin kümeleşmesi şeklinde görülür. Örgüt olan latex partikülleri, trikomonas antijenleri ile karşılaştığında aglütinasyon görülmalıdır (11,12). Aglütinasyonun hızı ve kuvveti mevcut antijeninin yapısına, miktarına ve kullanılan duyarlı antikor miktarına bağlıdır. Negatif bir reaksiyonda süspansiyonun görünüşü süt gibi beyazdır. Aglütinasyon normalde kolayca görülebilir. Fakat durum şüpheli ise test reaksiyonu kontrol reaksiyonu ile görünüm açısından karşılaştırılmalıdır. Görülen aglütinasyon önemlidir. Tecrübeli kişiler normalde önemli olmayan latex süspansiyonları içindeki aglütinasyonu ayarlayabilirler (35).

II- Aletle.

Bir test sisteminde meydana gelen aglütinasyon miktarını ölçmek için optik aletler kullanılabilir. Genel olarak bunlar oldukça duyarlıdırlar. Ancak özel olarak hazırlanmış latex süspansiyonlarına ihtiyaç vardır. Bunlar değişik optik hesaplama sistemleri, partikül sayma, bulanıklık, difrensial ışık yayılımı ve nefelometre ölçümlerinden oluşurlar. Bu işlemlerin temeli, süspansiyondaki partiküllerin ışın saçması ilkesine dayanır. Bu olayın karakteristik özelliği de aglütinasyon sırasında partiküllerin bir araya toplanması ve bütünleşmesidir.

Bulanıklık ölçmede, belirli bir dalga boyunda spektrometrik olarak belirlenen ışık, latex süspansiyonun içinden geçer. Bu işlemde 0.8 μ m. çapındaki partiküller

icin 360 nm. dalga boyu uygundur. Aglutinasyon arttikca absorban miktarında azalma meydana gelir.

Nefelometre 90° ye karşılık gelen ışın saçma miktarını ölçer. Partikül sayımında eşik sınırındaki aglutine olmayan partiküllerin ölçülmesi için doğru bir şekilde yayılan ışık miktarı bir pencere arasındaki dedektörle tespit edilir. Toplanmış partiküllerin belirlenmesi dedektörün algılama sınırı dışına yayılmış ışığın tespit edilmesi ve süspansiyonda kalan aglutine olmayan partiküllerin sayısının belirlenmesiyle sağlanabilir.

Difrensiyal ışık yayılım yönteminde lazer ışını üreten bir ışık kaynağı, polarize edilmiş ve benzer süspansiyondaki partiküllerin büyüklüğüne yakın dalga boyuna sahip ışık kullanılır. Bu ışık özel açılara karşılık gelen limit değerlerinde bir saçılım gösterir. Eğer yayılım gösteren ışık hareketli bir fotodiyektör kullanılmasıyla monitörize edilirse, saçılım açılarındaki değişiklik ile süspansiyondaki partiküllerin toplanma miktarları ölçülebilir.

Nefelometre, bakteri enterotoksinlerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Fekal mikrobiyolojik çalışmalarda tam bir güvenilirlik elde edilememiştir. Bu yüzden umulan duyarlılıkla hesaplama yapılması güçtür. Bu yöntemler otomatik işlemlerin gelişmesiyle gelecekte daha da önem kazanacaktır (35).

ÖRNEKLERİN UYGUN ŞEKİLDE HAZIRLANMASI:

Teorik olarak serbest hücreli veya bağımlı hücreli, canlı ya da cansız hücreli bakteri antiijenleri içeren her örnek latex lam aglutinasyon testinde kullanılabilir(13,35). Bakteri kültürlerinden, vücut sıvılarından, ya da doku örneklerine kadar olabilen örnek dizisinin büyük bir kısmının ön bir işleme tabi tutulması gerekir. Bu işlemin yapılma

amacı testteki reaksiyonlara engel olan etkenlerin uzaklaştırılmasıdır. Latex aglütinasyon testi bakteri kültürlerinin serolojik identifikasyonunda ve kültür besiyerindeki hücre dışı ürünlerin belirlenmesinde kullanılır. Organizmalar latex ile doğrudan doğruya karışabilir. Bu yüzden bu yöntem tam olarak ideal bir yöntem değildir. Çünkü farklı potansiyeldaki heterolog koloniler kontrol ayrılarıyla karışmaktadır. Önemli olan organizmaların test için su, tuzlu su veya tampon çözeltileri içinde süspansiyonlarının yapılması gerekir. Bu yöntem direkt olarak kullanılabileceği gibi sulu antiijenlerin bulunduğu örneklerin santrifüj edilerek üstteki kalan sıvılarının partiküllerden uzaklaştırılmasından sonra da yapılabilir. Bu şekilde sonucun özgüllüğü artar. Bu nedenle, sıvı kültür süpernatant sıvıları, uygun yöntem kullanılarak test edilmelidir. Bazı örneklerde test edilen antiijen, hücre süspansiyonundan açığa çıkmamaktadır. Bu durumda, örneğe antijeni açığa çıkaracak bir işlem uygulanması gerekmektedir. B-hem streptokokların gruba özgül karbonhidrat antiijenlerinin elde edilmesinde, bir enzim işlemine veya nitrik asit ekstraksiyonuna ihtiyaç vardır. *Escolii*'lerin ısıya duyarlı enterotoksinleri, içinde Polymyxin B sülfat bulunan Tris-tuz tamponu ile işleme sokulursa bu ayırma işinden iyi sonuç alınmaktadır (35).

Latex aglütinasyonu, kültürle identifikasyondan daha hızlı daha basit bir işlem olup zaman kazandırıcıdır. Bu da klinikçiler için önemlidir. Ancak test, primer kültür elde edilene kadar gerekli olabilir. Kan kültürlerinin yapılmasıyla elde edilen bulgular daha yararlıdır. Özellikle de boyanmış yayma preparasyonlarında Gr (+) koklar görülüyorsa bu daha da önem kazanır. Bu yöntem *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin erken tanısında da kullanılabilir. Kan kültürlerinde otoliz ile ölen bu

organizmaların saptanmasında da latex aglütinasyon testi önemli olabilmektedir.

Hastalardan alınan örnekler çok çeşitlidir. Bu çeşitlilik örneklerin alındığı kısım temizliğine, sterilitesine, normal olarak içirdiği mikrop florasına bağlı olarak değişiklik gösterir. Hastanenin dışında maddeleri taşıyan örneklerin uygun ön işlemlerden geçirilerek test edilmesi gerekir. Ön işlem iki nedenden gereklidir. Birincisi latex süspansiyonunun stabilitesi ile uygun bir sıvı faza ihtiyacı olması, ikincisi ise latex aglütinasyonunu (+) veya (-) olarak etkileyen, tanımlanamayan ve inaktive edilmesi gereken birçok etkenin örneklerde bolca yer almasıdır.

Doğrudan ele alınabilecek en kolay örnekler; beyin omurilik sıvısı (BOS) ve idrardır. Fakat, serum, perikard ve amniyon sıvıları gibi oldukça yüksek protein içeren örneklerin testi sorunludur. IgG-antiglobulin gibi RF'ler 0.003 M. disothreitol ile kısa bir inkübasyonla inaktif edilebilir. Ancak, 36°C'de 30 dakika inkübe edilirse deneyi engelleyen etkenler ortamdaki uzaklaştırılabilir (35).

DUYARLILIK VE ÖZGÜLLÜĞÜN GELİŞİMİ:

Latex aglütinasyon testi uygulanması sırasında partiküllerin süspansiyon halinde kalması önemli bir etkidir.

Testin duyarlılığı ve özgülüğü, duyarlılaştırmada kullanılan ilk antikorların oranına bağlıdır. Duyarlılaştırma işlemi hangi şekilde yapılsa örneklerle ve kontrollere de aynı işlem uygulanmalıdır.

Tanı amacıyla kullanılan duyarlılık, testte pozitif sonuçlar veren hastalıklı hastaların oranı olarak kabul

edilir. Özgüllük ise hastalıklı olmayan hastalarda negatif sonuçların elde edilmesidir. Her 2 grupta da en son olarak kontrollü bir klinik değerlendirmeyle kesin sonuca bağlanmalıdır. Fakat, özgüllüğün ilk yapılan testlerde değerlendirilmesi oldukça yararlı olmaktadır. Bu değerlendirme testleri, işleme sokulan antijenlerin süspansiyonlardaki reaktifliği ve etki sınırlarıyla belirlenir. Benzer antijenlerin kaplanma etki sınırı, testin değerlendirilmesini sağlar. Özellikle olave monoklonal antikolar da dahilse bu antikoların reaksiyonu ezaltıcı miktarı heteroloğ antijenlerin bu etkisiyle eşit düzeyde önemlidir.

Genel bir görüş olarak latex aglutinasyon testinin özgüllüğü, kounter immünelektroforez, enzim ya da radyoimmünoassay yöntemleri arasında orta bir yerdedir. Latex aglutinasyon bir çok durumlarda olumlu sonuçlar vermektedir. Örneğin, Londra'da yapılan bir çalışmada *Trichomonas vaginalis*'nin tanısında; rapid latex aglutinasyon testi kullanılması ve duyarlılık % 95,2, özgüllük % 99,4 olarak bulunmuştur (12). Bu test başka bir çalışmada *Candida*'nin tanısında kullanılmış, % 60 duyarlılık ve % 100 özgüllük elde edilmiştir (11,12). Biyolojik sistemlerde çok az bir yüzde ile yanlış negatif sonuçlar ve yanlış pozitif sonuçlar görülmektedir. Test sonuçları tanıda oldukça yararlı bilgiler sağlar. Bu testte taze ayraçların kullanımı önemlidir. Sonuçların değerlendirilmesinde yanlış ve anlamsız değerlerin elde edilmesi son kullanım tarihi geçmiş ayraçların kullanımıyla ilgilidir.

Semikantitatif sonuçlar, hastalıkların değerlendirilmesi açısından yararlı bilgiler sağlamaktadır. Bazı enfeksiyonların prognozunda, araştırılan antijenin düzeyi ile korelasyon göstermiştir. Bu, vücut sıvılarının distile su veya GBS

ile dilüsyonlarının yapılarak titre edilmesiyle incelenebilir.

Önemli sorun, prezon olayıdır. Antijen konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu durumda latex aglütinasyonu önlenmektedir. Böyle bir durumda örnek 10 kat sulandırılmalı ve test tekrar edilmelidir.

Latex aglütinasyonu bakteri antijenlerinin bızlı bir şekilde incelenmesini sağlamaktadır ve gelecek yıllarda daha da geliştirilerek ancak baş vurulan bir test durumuna gelecektir (11,12,35).

T e d a v i :

Agiz yoluyla metronidazole oldukça başarılıdır. Fakat, otojen olduğundan gebelerde kullanılmaz. Bu ilacın 250 mg. lık tabletleri günde 3 kez olmak üzere kullanılarak 7-10 günde tedavi başarıyla sonuçlanmaktadır (28,30,34,38,51,52,53).

metronidazole'ün yan etkileri dikkate alınarak clindazole ve pimorazole'ün 0.5 gramlık tabletlerinden 4 tanesi yemekten sonra bir kez verilerek kullanılır.

Ornidazole'ün (Bitere!) 0.5 g.lık tabletleri sabah ve akşam yemekten sonra ikiser tane alınır. 3-5 günlük tedavi yeterli olmaktadır (26,32,53).

Tritomoniyaz'ın tedavisinde eşlerden yalnız birinin tedavisi yetersizdir. Her ikisi de birlikte tedavi edilmelidir (15,53).

K o r u n m a :

Cinsel ilişkiyle bulaşan hastalıklarda uygulanan korunma önlemleri, belirtisiz infeksiyonlu erkeklerin tedavisi ve kişisel temizliğe dikkat etmek başlıca korunma yollarını oluşturmaktadır (7,15,53).

GEREC ve YONTEM

Calısmada kullanılan örnekler, Mayıs 1990 - Ocak 1991 tarihleri arasında 7 aylık bir süre içerisinde, 294'ü C.Ü.Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğinden, 247'si Adana Doğumevi Kadın Hastalıkları polikliniklerinden, vajinal akıntı ve kasıntı yakınmaları olanlardan, 25'i Adana Doğumevi Aile Planlaması polikliniğine spiral baktırmaya gelen ve benzer yakınmaları olmayanlardan (kontrol grubu) olmak üzere toplam 566 kadından vajinal sürüntü olarak alındı.

Örneklerin toplanması: Örnekler vajinadan alınan sürüntülerdir. Bu sürüntü hastalardan iki steril eküvyon yardımıyla spekulum uygulanarak, vajinanın arka foroksinden alındı, birisi içinde 1-2 ml. steril serum fizyolojik, diğeri ise 1 ml. GBS bulunan tüplere kondu. Tüpler sallanarak eküvyondaki materyalin serum fizyolojik ve GBS'de homojen bir şekilde dağılması sağlandı. İçinde GBS bulunan tüpün çözeltisi küçük bir steril süpü aktarıldı ve rapic latex aglütinasyon yönteminde kullanıldı. Semen çalışılmayanlar condurularak saklandı.

Taşıma ve saklama amacıyla kullanılan çözeltiler:

1- Serum fizyolojinin hazırlanması

NaCl 8.5 gr.

Distile su 1000 ml. eritilir.

pH'si 7.4-7.6'ya ayarlandı. Otoklavda 15 dakika

121°C'de steril edildi. 2 ml.lik olmak üzere steril eküvyonlu tüplere kondu.

2- Glycine buffer saline (GBS) in hazırlanması:

Glycine 7.3 gr.
Sodyum klorid 10 gr.

900 ml. distile suya karıştırıldı ve 1.0 N sodyum hidroksit yardımıyla pH'si 8.2'ye ayarlandı. 15 dakika 121°C de steril edildi.

3-11'lik BSA ve 3-11'lik sodyum azide içeren GBS nin hazırlanması

% 30'lik BSA 3.3 ml.
Sodyum azide 1 gr.
Hacmi GBS ile 100 ml.'ye tamamlandı.

Giemsa boyasının hazırlanması:

Stok Giemsa boyasından her ml başına 2 damla olmak üzere kondu ve yayma preparatlarının boyanmasında kullanıldı.

Çalışmada kullanılan tüpler ve diğer cam malzemeler asitten geçirilerek kullanıldı.

Cam eşyaların temizlenmesi için asit:

Çeşme suyu 500 cc.
Potasyum dikromat 100 cc.
H₂SO₄..... 500 cc. olarak hazırlandı.

Bir balon içerisine su ile potasyum dikromat karıştırıldı ve alan su altında sülfirik asit (H₂SO₄) yavaş yavaş eklendi. Böyle hazırlanan asitte çalışmada kullanılan cam malzemeler bir gece bekletildi. Sonra bol çeşme suyu ve deterjanla yıkandı ve en sonunda distile sudan geçirildi.

izolasyon amacıyla kullanılan besiyerleri:

1- Tamamıyla hazır besiyeri,

2- Kısmen hazır besiyeri.

Tamamıyla hazır besiyeri: Oxoid (Code R 27) firması tarafından üretilen ve Trichomonas vaginalis için özel olan besiyeridir. Bu besiyeri küçük kapaklı şişelere 4'er cc. olmak üzere dağıtılmış olarak hazırlanmıştır. Besiyeri buzdolabında saklanır. Kullanılacağı zaman 37°C'ye ısıtıldı. 1000 Ünit/ml. penisilin ve 1 mg/ml. streptomisin ilave edilerek ekim yapıldı. Bazılarına ise antibiyotik konmadı. Ancak, bu uygulamadan sonucu etkileyici bir farklılık elde edilmedi. Pasajlar 48 saatte bir vinelandı.

Kısmen Hazır Besiyeri: Bu besiyerinin bazı maddeleri Oxoid (Code R27) firmasının Trichomonas için ürettiği olduğu besiyeri içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Besiyerinin içindeki maddeler ve hazırlanışı:

Trichomonas besiyeri (Oxoid)

| | |
|--------------------------------|----------|
| Liver Digest (Oxoid L27) | 25.0 gr. |
| Dextroze | 5.0 gr. |
| NaCl | 6.5 gr. |
| Agar | 1.0 gr. |
| pH 6.4 ± 0.2 | |

Hazır toz halindeki bu besiyerinden 37.5 gr. tartılarak 1 L. distile suda ısıtılarak eritildi. Otoklavda 15 dakika 121°C'de steril edildi. Sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve içine 80 ml. inaktif at serumu (pH=6) ve 1000 ünit/ml. penisilin ve 500 mg/ml. streptomisin kondu. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 7-8 ml. steril tünlere dağıtıldı. Kontaminasyon kontrolü için 37°C'deki etuvde 24 saat bekletildi. Daha sonra kullanılmaya hazır bir şekilde buzdolabında saklandı. Ekim yapmadan önce besiyerleri 37°C'de ısıtıldı.

At serumunun elde edilmesi ve pH'sinin ayarlanması:

At serumu Adana at mezbanesinden alınan kandan elde edildi. Alınan at kanı cohtlaşmaya bırakıldı. Sonra bir baçet yardımı ile vezurdaki kan defibrine edildi ve eritrositlerin tamamıyla cökmesi için üzerine şürlük kondu. Serum iyice ayrıldıktan sonra üst kısımdan alındı ve tamamıyla eritrositten kurtarmak için 2000 devirde 10 dakika santrifü edildi. Seitz süzgeçinden süzülerek steril edildi. Steril at serumu 56°C'ye ayarlanmış bennaride 30 dakika tutularak inaktif edilip pH'sı 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH kullanılarak 6'ya ayarlandı.

Trichomonas vaginalis Antijeninin Hazırlanışı:

teinde bol miktarda T.vaginalis ücrası olan besiyerinden bir miktar steril tüpe alıldı ve üzerine steril serum fizyolojik eklenerek besiyerinin rengi aldene kadar (en az üç kez) santrifü ederek yıkandı, tuzla lamında sayıldı, her ml. de $1.8 \cdot 10^6$ T.vaginalis bulunacak şekilde süspansiyon hazırlandı (8,37). Bu süspansiyondan belirli miktarı başka bir tüpe aktarıldı ve 3 kez dondurup çözmek suretiyle T.vaginalis'in parçalanması sağlandı. Parçalanmaması için Trichomonas vaginalis süspansiyonu hazırlamak için canlı T.vaginalis bulunan süspansiyondan alındı ve üzerine $1/10$ 'luk formaldehit çözeltisi ilave edildi. Daha sonra serum fizyolojikle 3 kez yıkamak suretiyle formaldehit uzaklaştırıldı ve böylece antijen olarak kullanılacak üç poset süspansiyon elde edildi. Antijenlerde T.vaginalis sayısı sabit tutuldu.

Trichomonas vaginalis'e karşı antikorun hazırlanışı:

Elde edilen antijen artan dozlarda tavşanlara 4 gün ara ile enjekte edildi.

| | | |
|-------|--------------------------------------|----------|
| 1.doz | 1.8×10^6 T.Vaginalis/ml.den | 0.25 cc. |
| 2.doz | " " | 0.50 cc. |
| 3.doz | " " | 1.00 cc. |

| | | | |
|-------|---|---|----------|
| 4.doz | " | " | 1.50 cc. |
| 5.doz | " | " | 2.00 cc |

Antijen olarak hazırlanan süspansiyonlar ayrı ayrı tavşanlara verildiği gibi canlı T.vaginalis bulunan süspansiyon + Dondurup çözerek hazırlanan süspansiyon ve yine ölü T.vaginalis + Dondurup çözerek hazırlanmış süspansiyonların, ayrı tavşanlara enjeksiyonları yapıldı.

Üçüncü enjeksiyon yapılmadan önce tüm tavşanlardan 2'şer cc. kan alındı ve serumda antikor oluşup oluşmadığına bakıldı, hepsinde de bariz bir antikor oluşumu yoktu. Son enjeksiyon bittikten sonra yine aynı şekilde antikor oluşumu kontrol edildi. Bu kez, canlı T.vaginalis bulunan süspansiyon + Dondurup çözerek elde ettiğimiz süspansiyonun birlikte enjekte edildiği tavşanda antikor oluştuğu saptandı. Son enjeksiyondan tam 21 gün sonra tavşanların hepsinden kan alındı ve yine antikor oluşumu kontrol edildi. Canlı T.vaginalis bulunan süspansiyon + Dondurup çözerek elde edilen anti enji bir ilte enjekte edildiği tavşanda yüksek titrede antikor oluştuğu saptanırken diğerlerinde ya hiç veya çok az antikor oluştuğu görüldü. Bu yüksek antikor veren serum later aglütinasyon yönteminde kullanıldı.

Pozitif kontrol olarak kullanılan antijenin hazırlanması:

Besiyerinde üretilen *Trichococcus vaginalis* GBS ile santrifüj edilerek besiyerinin rengi tamamen gidene dek iyice yıkandı. Bu süspansiyon üç kez dondurulup çözüldü. 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek supernatant alındı. Tekrar 2300 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Supernatantın Whitaker J.R. ve Granum F.E. yöntemi ile protein miktarı saptandı (59). Bu süspansiyondaki protein miktarı GBS ile 100 µg/ml olacak şekilde sulandırıldı.

Latex aglütinasyonda kullanmak üzere antikorun latex'e bağlama işlemi:

Normalde pasif adsorpsiyon kuralları uygulandı. Fakat antikorun latex'e bağlanmadığı görüldü. Bu yüzden bağlama işleminden önce elimizdeki hazır bulunan 0.81 Bacto latex, parşümen kağıdıyla diyaliz edildi ve inkübasyon zamanı artırıldı. Bu işlemden sulandırıcı olarak GBS kullanıldı.

Bağlama işlemi:

1- Temiz bir tüpün içine eşit miktarda sulandırılmış (1/10 sulandırılmış) antikor ve 1/2 sulandırılmış latex karıştırıldı.

2- 37°C'de 3 saat inkübe edildi ve 15 dakika ara ile çalkalandı.

3- % 1'lik bovin serum albumin (BSA) ve % 1'lik sodyum azide içeren GBS'den eşit miktarda ilave edildi.

Aynı işlem kontrol olarak kullanılan bağışık olmayan normal tavşan serumu ile de yapıldı. Bu şekilde elde edilen latex çözeltileri 100 µg/ml protein bulunduran antijenle kontrol edildi ve kontrol ile pozitif olanın arasında bariz bir aglütinasyon farkı izlendi.

Yöntem:

Kastalardan elde ettiğimiz örnekler 4 değişik yöntem uygulanarak incelendi.

1. Direkt mikroskopik yöntem:

Tüpteki örneğin sterilitesini bozmadan bir pipet yardımıyla 1 damla örnek alındı ve lam üzerine kondu. Bir damla serum fizyolojik veya GBS ile karıştırıldı veya doğrudan karıştırdıktan sonra lamel kapatıldı ve mikroskopta 10'luk ve 40'luk objektifle incelendi. Pozitif olan örneklerde parazit oval şekliyle ve kancalarının hızlı

hareketiyle kolayca tanıyordu. Mikroskopik inceleme örnek alındıktan hemen sonra (ilk yarım saat) içerisinde incelendi.

2. Kültür yöntemi:

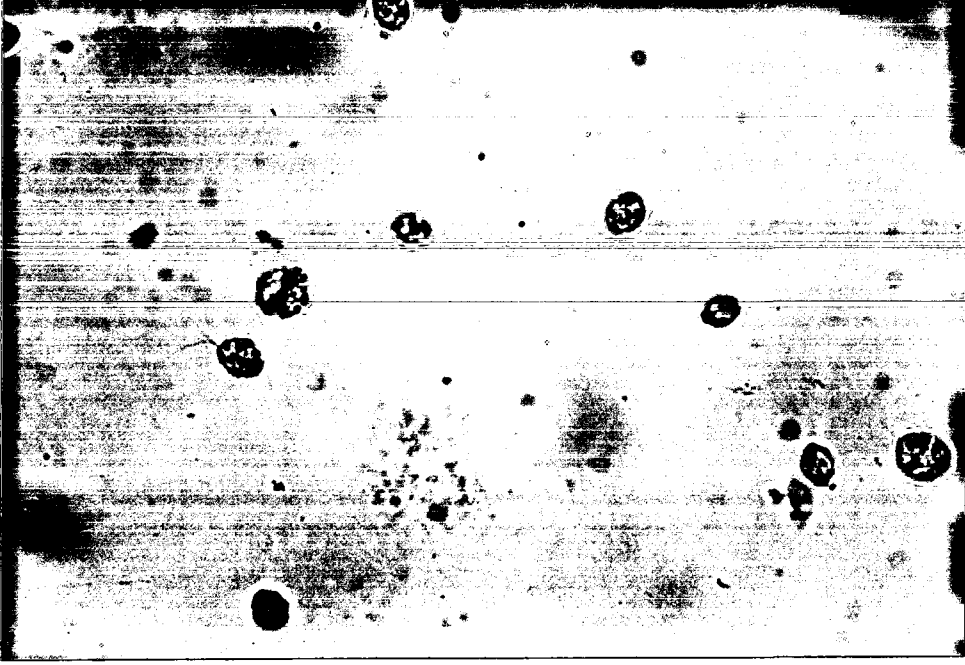
Alınan örnekler ilk yarım saat içerisinde önceden hazırlanan besiyerine ekimi yapıldı. Bu besiyerleri kullanılmadan önce 37°C'de ısıtıldı. Böyle ekimi yapılan örnekler, ilk 24, 48 saat sonra kontrol edildi ve Negatif olanlar 1 haftaya kadar inkübasyonda bekletildi. Pozitif olanları mikroskopta aynen direkt mikroskopik yöntemde olduğu gibi hızlı hareketleriyle tanıdı.

3. Boyama yöntemi:

Giemsa boyama yöntemi kullanıldı. Alınan akıntı örneği lam üzerine yayıldı. Havada kurutuldu ve lamın üzerine 3-5 ml. meril alkol dökülerek 2 dakika süre ile tesbit edildi. Tesbit edilmiş yaymalar üzerine, Giemsa boyası döklüldü ve 20-30 dakika boyandı. Pozitif olanlarda *Trichomonas vaginalis* oval şekilde, çekirdek kırmızı, sitoplazma mor veya sarımsı renkte granüllü görüldü.

Rapid Latex aglütinasyon Yöntemi:

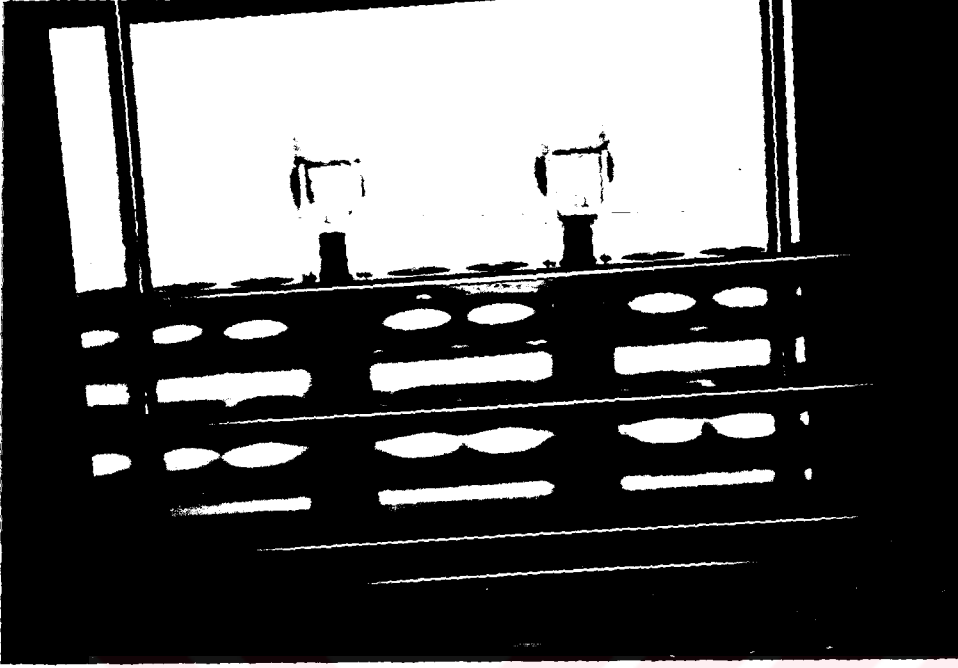
Bu yöntemde antikorla kaplı latex partikülleri kullanıldı. Temiz bir lam üzerine antikorla kaplı latex çözeltiden 1 damla, üzerine daha önce elde edilen GSS içinde bulunan hasta örneğinden bir damla konarak bir tahta çubuk yardımıyla karıştırıldı ve rotatörde 2 dakika sallanarak karışması sağlandı (bu iş elle de yapılabilir). Pozitif örneklerde kontrol ile arasında bariz bir aglütinasyon farkı görüldü. Silmazdaki pozitif antijenden de aynı şekilde bir lam hazırlandı ve deney sırasında pozitif ve negatif sonuçların değerlendirilmesinde kontrol olarak kullanıldı. Lamlar siyah bir zemin üzerinde, şüpheli olanlar mikroskopta incelenerek aglütinasyon verip vermediğine bakılarak değerlendirildi.



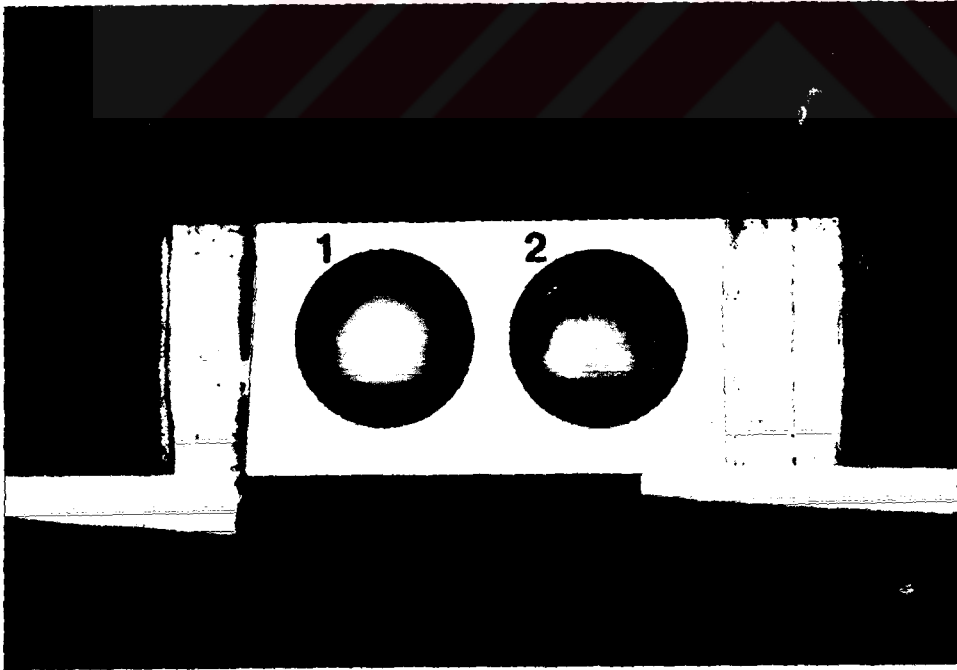
Sekil-1. Direkt mikroskopik incelemede Trichomonas vaginalisin görünümü x400



Sekil-2. Giemsa boyama yöntemiyle boyanmış Trichomonas vaginalis'in görünümü x1000



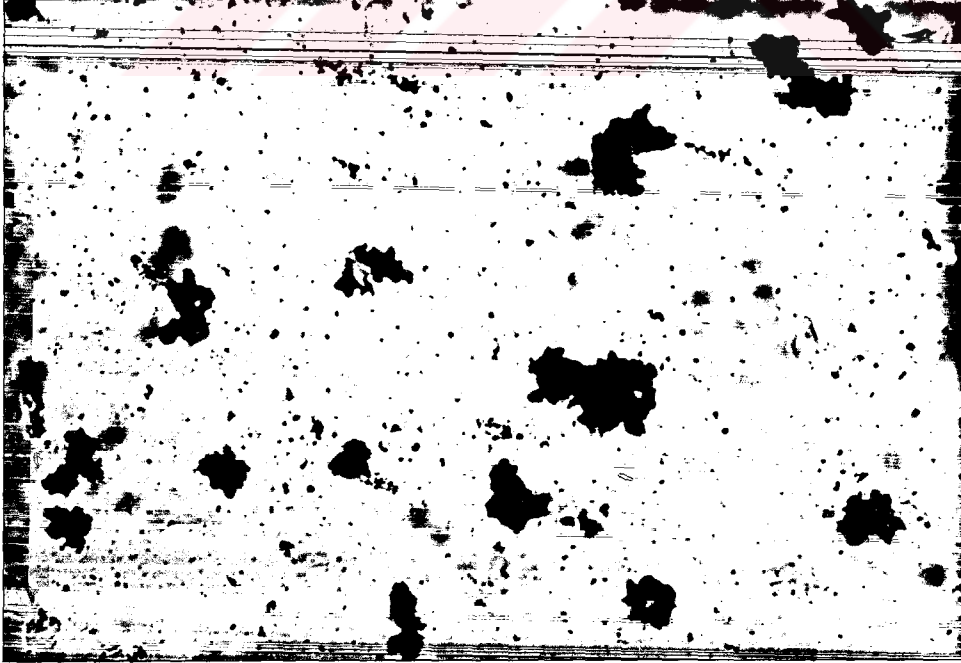
Sekil-3. Trichomonas vaginalis üredikten sonra besiyerinin renk değişiminin makroskopik olarak görünümü.
I. tüp erim yapılmadan önceki görünümü
II. tüp erim yapıldıktan sonraki görünümü



Sekil-4. Normal siyah zeminli hız kart üzerine rapid latex aglütinasyonun görünümü.
I.: Kontrol II.: Pozitif sonuç



Sekil-5. Rapid latex uygulanmadan önce duyarlılaştırılmış çözeltilinin mikroskopta görünümü. x400



Sekil-6. Rapid latex uygulandıktan sonra latex partiküllerindeki kümelenmenin görünümü x400

B U L G U L A R

Çalışmada kullanılan örneklerin 294'ü Ç.D. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğinden, 247'si Adana Doğumevi Kadın Hastalıkları polikliniklerinden, vajinal akıntı ve kasıntı yakınmaları olan, 25'i Adana Doğumevi Aile Planlanması polikliniğine spiral Iektirmaya gelen ve benzer yakınmaları olmayan (kontrol grubu) toplam 566 kadından vajinal sürüntü olarak alındı.

Tablo-2. Balcalı hastanesi kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinden alınan örneklerde negatif ve pozitifliğin yaş gruplarına göre dağılımı.

| SONUÇ | Y A Ş G R U P L A R I | | | | | | | | TOPLAM | |
|---------|-----------------------|------|-------|------|-------|------|------|------|--------|------|
| | <-20 | | 21-30 | | 31-40 | | 41-> | | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Negatif | 24 | 92.3 | 138 | 91.4 | 76 | 88.4 | 29 | 93.6 | 267 | 90.8 |
| Pozitif | 2 | 7.7 | 13 | 8.6 | 10 | 11.6 | 3 | 6.4 | 27 | 9.2 |
| TOPLAM | 26 | 8.8 | 151 | 51.4 | 86 | 29.3 | 32 | 10.5 | 294 | 100 |

Balcalı hastanesi Kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinden toplam 294 örneğin 27(% 9.2) sinde pozitif sonuç alınmıştır. Ençok 21-30 (% 8.6) ve 31-40 (% 11.6) yaş gruplarında pozitif sonuçlar elde edildi. Bu değerlere Ki-kare ve "Fisher's exact" testi uygulandı %'deler arasında fark görümesine karşın bu fark istatiki olarak önemli

bulunmadı ($p > 0.05$) . Bu sisteme göre aradaki fark tesadüfi olarak değerlendirildi.

Tablo-3. Doğumevi kadın hastalıkları polikliniğinden alınan örneklerde negatif ve pozitifliğin yaş gruplarına göre dağılımı.

| SONUÇ | YAŞ GRUPLARI | | | | | | | | TOPLAM | |
|---------|--------------|------|-------|------|-------|------|------|------|--------|------|
| | <-20 | | 21-30 | | 31-40 | | 41-> | | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Negatif | 27 | 76.4 | 103 | 89.8 | 80 | 88.8 | 12 | 92.3 | 222 | 89.8 |
| Pozitif | 1 | 3.6 | 13 | 11.2 | 10 | 11.2 | 1 | 7.7 | 25 | 10.2 |
| TOPLAM | 28 | 11.3 | 116 | 49.9 | 90 | 36.8 | 13 | 5.3 | 247 | 100 |

Doğumevi kadın hastalıkları polikliniğinden 247 örnekten 25'inde (% 10.2) trikomoniazis saptandı ve bunların 21-30 ve 31-40 yaş grupları arasındaki kadınlarda %11.2 oranında dağılımı görüldü. Yine aynı sistemde pozitif değerlerin yaş gruplarına göre farkı istatiki olarak önemli bulunmadı ($p > 0.05$).

Doğumevindaki aile planlaması polikliniğinden alınan kontrol grubu örneklerde pozitif olguya rastlanmadı.

Tablo-4. Aile planlaması polikliniğinden alınan kontrol grubu örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı.

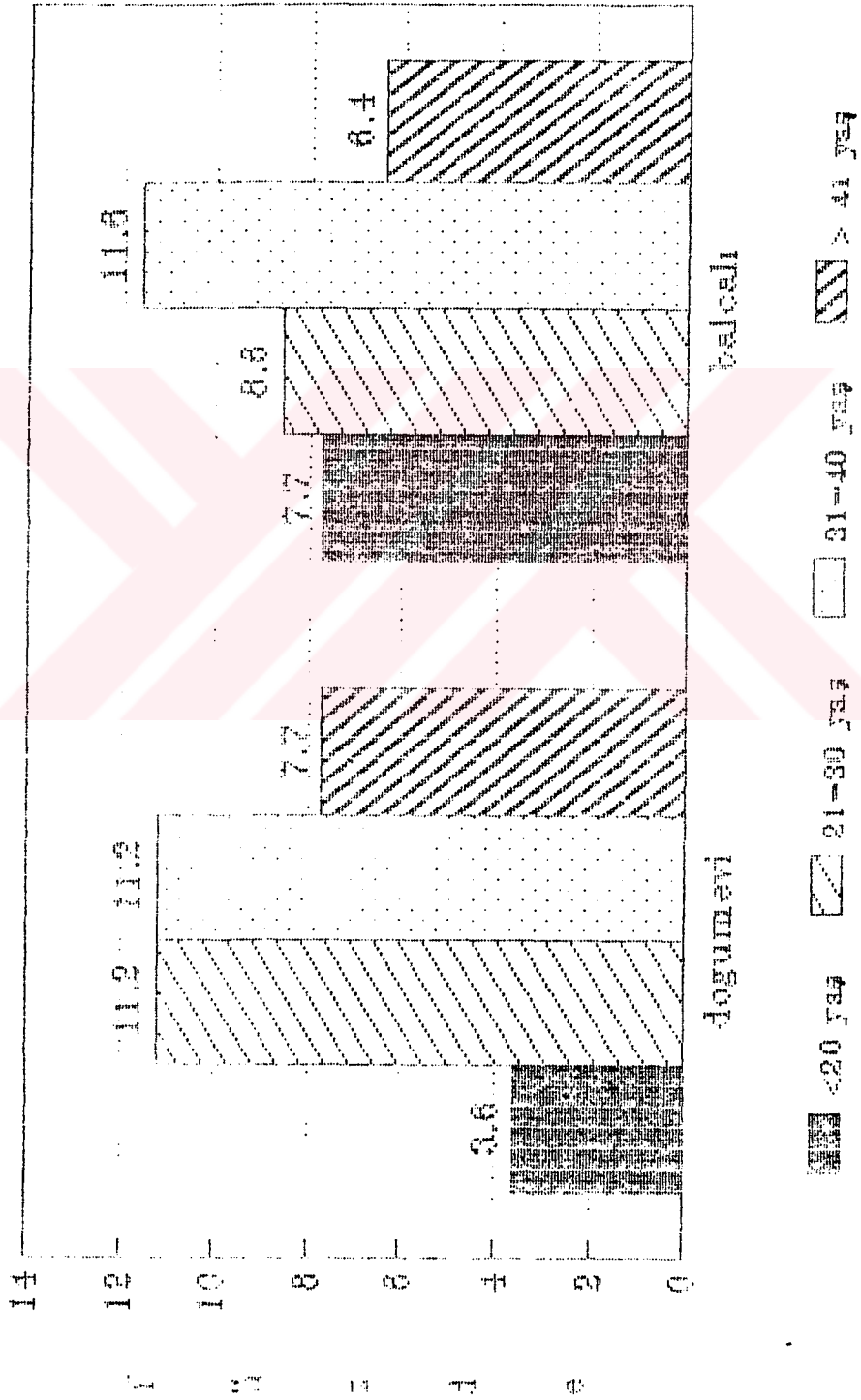
| SONUÇ | YAŞ GRUPLARI | | | | | | | | TOPLAM | |
|---------|--------------|----|-------|----|-------|----|------|---|--------|-----|
| | <-20 | | 21-30 | | 31-40 | | 41-> | | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Negatif | 6 | 24 | 9 | 36 | 8 | 32 | 2 | 8 | 25 | 100 |
| Pozitif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOPLAM | 6 | 24 | 9 | 36 | 8 | 32 | 2 | 8 | 25 | 100 |

Tablo-5. Balcalı hastanesi, Doğumevi ve Aile planlaması (A.P.) polikliniklerinden alınan örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı.

| Örneklerin alındığı yer | YAŞ GRUPLARI | | | | | | | | TOPLAM | |
|-------------------------|--------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|--------|------|
| | 1-20 | | 21-30 | | 31-40 | | 41-50 | | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Balcalı | 26 | 43.3 | 151 | 54.7 | 96 | 46.7 | 31 | 47.4 | 294 | 51.9 |
| Doğumevi | 28 | 46.7 | 116 | 42.0 | 90 | 49.0 | 13 | 28.3 | 247 | 43.7 |
| A.P.(kontrol) | 6 | 10.0 | 9 | 3.3 | 8 | 4.3 | 2 | 4.3 | 25 | 4.4 |
| TOPLAM | 60 | 10.6 | 276 | 48.7 | 184 | 32.5 | 46 | 8.2 | 566 | 100 |

Balcalı hastanesi, Doğumevi ve Aile planlaması polikliniklerinden alınan toplam 566 örnek incelendi ve 52'sinde (% 9.18) trikomoniyaz pozitif bulundu. Bunlar yaş gruplarına göre incelendiğinde akıntı, kaşıntı ve yanma yakınmalarının 276'sının (% 48.7) 21-30 ve 184'ünün (33.8) 31-40 yaş grupları arasında olduğu görülür (Tablo-5, Şekil-7).

Fozitifliğin dağılımı: Balcalı hastanesi kadın hastalıkları polikliniğinde 194'ün 25'inde, Adana Doğumevi kadın hastalıkları polikliniğinde 247'nin 25'inde ve aile planlaması polikliniğinde 25'inde sıfır olur. Toplam 566 hasta ve hasta olmayan kadınlardan alınan vajinal sürüntü örneğinin 52'sinde T.vaginalis saptandı.



Sekil-7. Doğumevi ve Balcalı hastanesi olgularında pozitif sonuçlar.

Tablo-6. Balcalı hastanesi kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinden alınan örneklere uygulanan 4 yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması

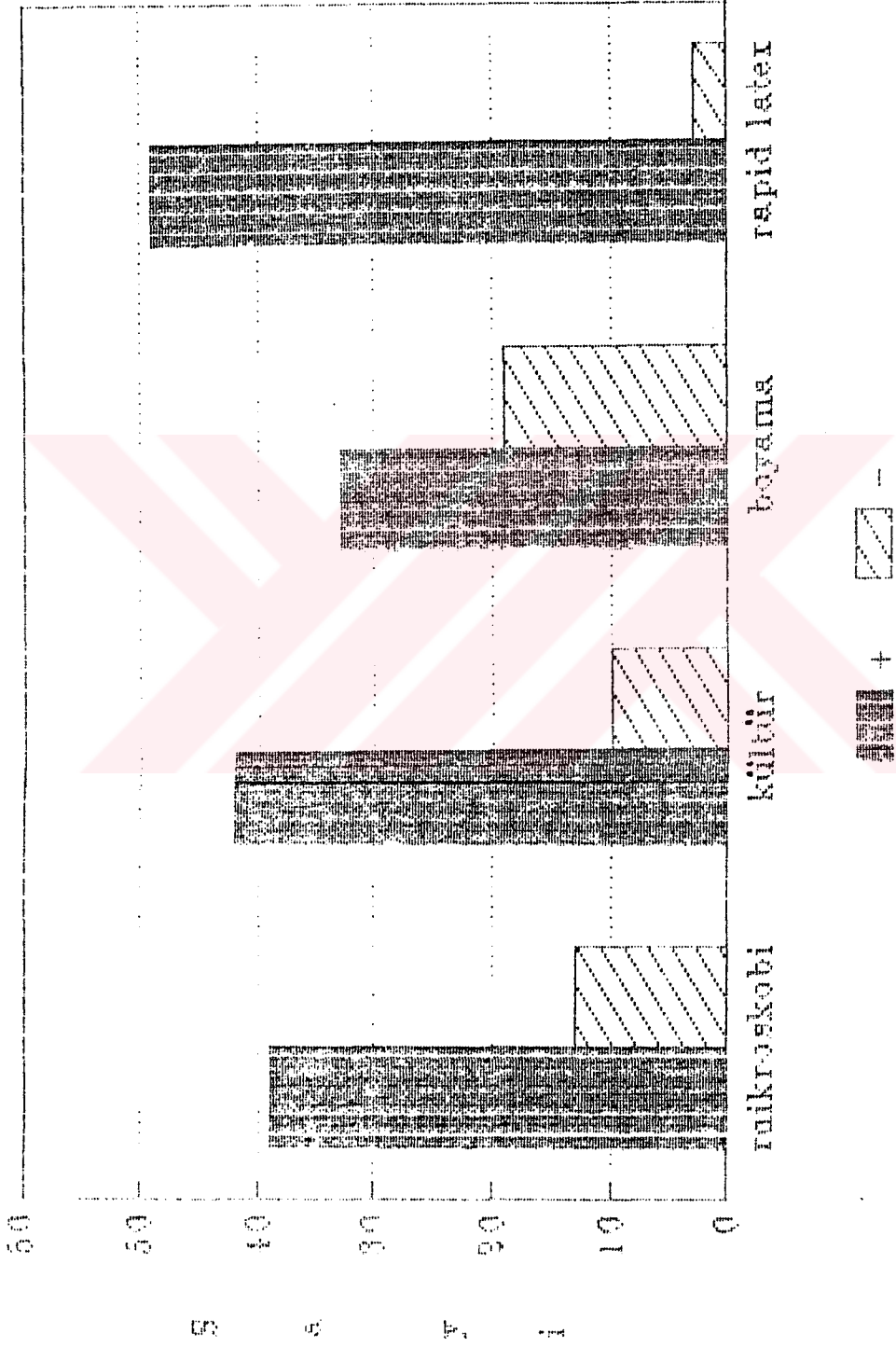
| | Mikroskopi | | Kültür | | Boyama | | Rapid latex | |
|-----------------|------------|-----|--------|-----|--------|-----|-------------|-----|
| | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Trikomoniyaz | | | | | | | | |
| Pozitif (n=27) | 20 | 7 | 22 | 5 | 17 | 10 | 26 | 1 |
| Negatif (n=267) | 0 | 267 | 0 | 267 | 0 | 267 | 0 | 267 |
| Duyarlılık | 74.07 | | 81.48 | | 62.96 | | 96.29 | |

Tablo-7. Doğum evi kadın hastalıkları polikliniğinden alınan örneklere uygulanan 4 yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması.

| | Mikroskopi | | Kültür | | Boyama | | Rapid latex | |
|-----------------|------------|-----|--------|-----|--------|-----|-------------|-----|
| | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Trikomoniyaz | | | | | | | | |
| Pozitif (n=25) | 17 | 5 | 20 | 3 | 16 | 9 | 23 | 2 |
| Negatif (n=222) | 0 | 222 | 0 | 222 | 0 | 222 | 0 | 222 |
| Duyarlılık | 76 | | 80 | | 64 | | 92 | |

Tablo-8. Balcalı hastanesi kadın hastalıkları ve doğum, Adana doğum evi kadın hastalıkları ve Aile planlaması (kontrol grubu) polikliniklerinden alınan örneklere uygulanan 4 yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması.

| | Mikroskopi | | Kültür | | Boyama | | Rapid latex | |
|-----------------|------------|-----|--------|-----|--------|-----|-------------|-----|
| | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Trikomoniyaz | | | | | | | | |
| Pozitif (n=52) | 39 | 13 | 42 | 10 | 33 | 19 | 49 | 3 |
| Negatif (n=514) | 0 | 514 | 0 | 514 | 0 | 514 | 0 | 514 |
| Duyarlılık | 75.00 | | 80.74 | | 63.46 | | 94.23 | |



Sekil-8. Yöntemlerin karşılaştırılması.

En fazla pozitif sonuc 49 hastada rapid latex aglütinasyon yöntemiyle elde edildi. Rapid latex aglütinasyon yöntemiyle pozitif sonuc vermediği halde 3 olgu kullanılan diğer yöntemlerle pozitif bulundu.

Tablo-9. Balçalı hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğinden elde edilen pozitif sonuçların yaşlara ve yöntemlere göre dağılımı.

| S.No | Prot.No | Yaş | Mikroskopî | Kültür | Boyama | Rapid latex |
|------------------------|---------|-----|------------|---------|--------|-------------|
| 1 | 25 | 28 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 2 | 47 | 19 | (+) | (-) | (+) | (+) |
| 3 | 51 | 32 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 4 | 58 | 16 | (-) | (+) | (+) | (+) |
| 5 | 78 | 30 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 6 | 84 | 38 | (+) | (-) | (-) | (+) |
| 7 | 88 | 29 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 8 | 102 | 40 | (+) | (-) | (-) | (+) |
| 9 | 103 | 25 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 10 | 111 | 23 | (-) | (+) | (+) | (+) |
| 11 | 120 | 28 | (-) | (+) | (-) | (-) |
| 12 | 126 | 27 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 13 | 128 | 25 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 14 | 143 | 37 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 15 | 149 | 32 | (-) | (+) | (+) | (+) |
| 16 | 153 | 29 | (+) | (-) | (+) | (+) |
| 17 | 163 | 31 | (-) | (+) | (-) | (+) |
| 18 | 182 | 22 | (+) | (-) | (-) | (+) |
| 19 | 187 | 28 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 20 | 190 | 33 | (-) | (+) | (+) | (+) |
| 21 | 203 | 40 | (+) | (-) | (+) | (+) |
| 22 | 211 | 41 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 23 | 251 | 36 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 24 | 257 | 32 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 25 | 260 | 42 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 26 | 276 | 24 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 27 | 283 | 25 | (-) | (+) | (-) | (+) |
| Örnek sayısı ve sonuca | | | Sayı % | Sayı % | Sayı % | Sayı % |
| Pozitif | | | 20 74 | 22 81.5 | 17 63 | 25 96.3 |
| Negatif | | | 7 26 | 5 18.5 | 10 37 | 1 3.7 |
| Toplam | | | 27 100 | 27 100 | 27 100 | 27 100 |

Tablo-10. Adana doğumevi kadın hastalıkları polikliniğinden elde edilen pozitif sonuçların yaşlara ve yöntemlere göre dağılımı.

| S.No | Frot.No | Yaş | Mikroskopi | Kültür | Boyama | Rapid latex |
|------------------------|---------|-----|------------|--------|--------|-------------|
| 1 | 11 | 35 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 2 | 19 | 27 | (+) | (-) | (+) | (+) |
| 3 | 25 | 36 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 4 | 30 | 35 | (-) | (-) | (+) | (+) |
| 5 | 51 | 22 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 6 | 73 | 33 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 7 | 82 | 24 | (-) | (+) | (-) | (+) |
| 8 | 89 | 33 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 9 | 90 | 30 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 10 | 79 | 28 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 11 | 123 | 21 | (-) | (+) | (-) | (-) |
| 12 | 127 | 35 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 13 | 138 | 35 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 14 | 145 | 30 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 15 | 150 | 25 | (+) | (-) | (-) | (-) |
| 16 | 154 | 42 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 17 | 163 | 30 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| 18 | 165 | 35 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 19 | 173 | 29 | (-) | (+) | (-) | (+) |
| 20 | 179 | 36 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 21 | 183 | 28 | (+) | (-) | (-) | (+) |
| 22 | 188 | 32 | (-) | (+) | (-) | (+) |
| 23 | 191 | 40 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 24 | 201 | 30 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 25 | 211 | 18 | (-) | (-) | (-) | (+) |
| Örnek sayısı ve sonucu | | | Sayı % | Sayı % | Sayı % | Sayı % |
| Pozitif | | | 19 76 | 20 80 | 16 64 | 23 92 |
| Negatif | | | 6 24 | 5 20 | 9 36 | 2 8 |
| Toplam | | | 25 100 | 25 100 | 25 100 | 25 100 |

Çalışmada pozitif bulunan 52 olgunun yöntemlere göre mikroskopik yöntemle 39(% 75), kültür yöntemiyle 42(% 80.7), boyama yöntemiyle 33(% 63.4) ve rapid latex aglütinasyon yöntemiyle 49(% 94.3) olarak dağılım gösterdi.

Bunların duyarlılıkları mikroskopik yöntemiyle % 75, kültür yöntemiyle % 80.76, boyama yöntemiyle % 63.46 ve rapid latex aglütinasyon yöntemiyle %94.23 olarak belirlendi. Aile

planlamasındaki kontrol grubundaki örneklerde negatif olarak kabul ettiğimiz grupta pozitif vermedikleri için özgüllükleri %100 olarak belirlendi.

Çalışmalar 566 hasta ve hasta olmayan kadınların vajinal sürüntü örneklerinden 32(%7.18)'sinde pozitif sonuç elde edildi. Mikroskopik yöntemle 39(%6.89), kültür yöntemiyle 42(%7.42), boyama yöntemiyle 33(%5.83) ve rapid latex aglütinasyon yöntemiyle 49(%8.65) pozitiflik bulundu.

Pozitif çıkan dıguların eğitim düzeyine ve sosyo-ekonomik durumlarına göre dağılımları tablo-11, 12'de gösterilmiştir.

Tablo-11. Balcalı hastanesi Kadın hastalıkları ve doğum ile Doğum evi kadın hastalıkları polikliniklerinden elde edilen pozitif örneklerin eğitim düzeylerine göre dağılımı.

| Örneklerin alındığı yer | Okunamıs | | İlk/Orta | | Lise | | Yüke.okul | | TOPLAM | |
|-------------------------|----------|------|----------|-----|------|------|-----------|-----|--------|------|
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Balcalı | 11 | 47.8 | 14 | 56 | 2 | 56.6 | 0 | 0 | 27 | 51.9 |
| Doğum evi | 12 | 52.2 | 11 | 44 | 1 | 33.4 | 1 | 100 | 25 | 48.1 |
| TOPLAM | 23 | 100 | 25 | 100 | 3 | 100 | 1 | 100 | 52 | 100 |

Tablo-12. Balcalı hastanesi kadın hastalıkları ve doğum ile doğum evi kadın hastalıkları polikliniklerinden elde edilen pozitif örneklerin ekonomik düzeylerine göre dağılımı.

| Örneklerin alındığı yer | İyi | | Orta | | Zayıf | | TOPLAM | |
|-------------------------|------|------|------|-----|-------|------|--------|------|
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Balcalı | 7 | 67.5 | 16 | 50 | 4 | 33.4 | 27 | 51.9 |
| Doğum evi | 1 | 12.5 | 16 | 50 | 9 | 66.6 | 25 | 48.1 |
| TOPLAM | 8 | 100 | 32 | 100 | 12 | 100 | 52 | 100 |

T A R T I S M A

Trichomonas vaginalis'in olusturduğu trikomoniyaz dűnyanın her yerinde yaygın olarak bulunmaktadir. Dűnyada yaklasık olarak 180 milyon kadının trikomoniyazlı olduğu rapor edilmiştir (27). Bu hastalığın insidansı űlkeden űlkeye değismektedir. űrneđin, Amerika'da yılda 4-8 milyon trikomoniyazlı kadın, İngiltere'de ise kadınların yarısının genokok ve trikomoniyazlı olduğu rapor edilmiştir (6,32,52,53). Türkiye'de trikomoniyazın kadınlardaki prevalansı %10 civarındadır (43).

Böyle ciddi sorun yaratan hastalığın tanısı ve tedavisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Trichomonas vaginalis kadının sağlam olan vajinasında kommensal olarak uzun süre yasıyabilmektedir. Ancak, bazı etkenlerin değişmesi ile vajinada T.vaginalis patojen hale gecip parazitlenmeye başlar. Bu parazitlenme ile hastalığın özđü olan klinik tabloları ortaya çıkar. űrneđin pis kokulu akıntı, kaşıntı ve yanma gibi etkenler trikomoniyaz hastalığının klinik belirtileridir. Ancak, trikomoniyaz kadın ve erkekte idrar ve űreme yollarının bütün hastalıkları ile karışabilmektedir. Bu nedenle sadece klinik olarak tanı konması güvenli olmamaktadır. Laboratuvar tanısıyla da kanıtlanması gerekmektedir. Dođal olarak, laboratuvar tanı yöntemlerinin çok çabuk ve güvenli sonuç vereni tercih edilmektedir.

Trikomoniyaz'ın tanısında kullanılan yeni yöntemlerden

birisi de rapid latex aglütinasyon yöntemidir. Bu yöntem romatoid artrit kriptokokkoz, tularemi, bruseilloz, leptospiroz, salmonelloz, trisinoz, amöbiyaz tanısında da kullanılmaktadır (13,18,35). Bu yöntem, çeşitli aletler kullanılarak yapılabildiği gibi lam aglütinasyon işlemiyle de yapılabilir. Bu yöntem basit, kolay okunan ve çok tecrübeli elemana, pahalı aletlere gerek göstermeden kullanılan bir yöntemdir.

Çalışmada bu yöntemin geliştirilmesi ve kullanılan diğer yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Aslında trikomoniyaz'ın tanısında en basit, en kolay, en ucuz yöntem direkt mikroskopik incelemedir. Yapılan çalışmalar bazı pozitif bulguların bu yöntem ile atlanabildiğini ve direkt mikroskopik yöntemde parazitin saptanma oranının % 34.8- % 87 arasında değiştiğini göstermiştir (9).

McCann (31) trikomoniyazın tanısında mikroskopik ve kültür yöntemini karşılaştırmış mikroskopik yöntemle pozitif sonuçların çoğunun saptandığı, kültürde ise % 9'unu atlandığını belirtmiştir.

Smith (49); 247 örnekten 75(%30.3) inde trikomoniyaz saptamıştır. Ancak pozitifliğin 39(%52)'unu mikroskopik yöntem ile tanımlamıştır.

Başka bir çalışmada toplam 42 pozitif sonuçtan mikroskopik öncelemede ancak 31(%73.8)'inde pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu yöntemin duyarlılığı 73.8 ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır (12).

Çalışmamızda toplam 566 hasta ve hasta olmayan kadının 52'sinde (tablo-8) trikomoniyaz saptandı. Bu 52 pozitif

olgudan ancak 39(275)'unda mikroskopi ile *T.vaginalis* görüldü. Çalışmada bu yöntemin duyarlılığı %75 olarak belirlendi. Bu değer bazı çalışmalardan (12,49) yüksek olarak bulunmuştur. Çalışmamıza, örneklerin anında incelemesi, bazı şüpheli olgularda birkaç preparat hazırlanması ve lamın lamel kapatılan tüm sahasının taranması gibi etkenler *T.vaginalis* bulma şansımızı arttırmıştır.

Kullandığımız ikinci yöntem kültür yöntemidir. Bu amaç için Oxoid firmasının (Code CM 161) geliştirmiş olduğu *T.vaginalis*'e özgül olan besiyeri kullanıldı.

Trikomoniyaz tanısında kültür yöntemi ayrı bir değer taşımaktadır. Direkt mikroskopik incelemelerde negatif olan olgularda, kültür yöntemi çoğu zaman pozitif olabilmektedir (9). Zaman yetersizliği nedeniyle anında incelenemeyen örneğe kültür yöntemi uygulanarak daha sonra incelenebilmekte ve kadının temizlenmesi veya vaginal ilaç kullanımının sonucu fazla etkilememesi gibi üstünlükleri vardır (9).

Carney et al. (11,12) kültür yöntemi ile toplam 42 pozitif hastanın 32 sinde (% 76.19) pozitif sonuç almışlardır. Yöntemin hastalığın tanısında %76.2'lik duyarlılığa ve %100'lük özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Yule et al. (52), 482 hasta kadında kültür yöntemiyle 44 (%9.1), mikroskopik yöntem ile 32 (%6.6) ve ELISA yöntemiyle 54 (%11.2) pozitif sonuç elde etmişlerdir. Kültür yöntemi en duyarlı yöntem olmamasına rağmen yine duyarlılık bakımından yüksek değere sahiptir. Aynı çalışmada kullanılan ELISA yöntemiyle negatif çıkan bir hastanın örneği, kültür yöntemiyle 48 saat inkübasyon sonrası üreme negatifken kültür bekletildikten sonra altıncı günde pozitif sonuç vermiştir.

Çalışmamızda 52 pozitif hastanın 42(%80.76)'sinde bu yöntemle trikomoniyaz tanısı konmuş ve bu yöntemin duyarlılığı %80.76 olduğu görülmüştür (Tablo-8, Şekil-8). Diğer yöntemlerle negatif bulunan olgulardan bazısı kültür yöntemiyle pozitif sonuç vermiştir (Tablo-9 ve 10).

Trichomonas vaginalis'in laboratuvar tanısında Giemsa boyama yönteminin yanında çeşitli boyama yöntemleride yardımcı tanı yöntemi olarak kullanılmıştır (9). Giemsa yöntemi ile boyamada pozitif sonuç, papanicolaou ve kültür yönteminden daha az görülmektedir (9).

Trichomonas vaginalis'in tanısıyla ilgili bir çalışmada yardımcı tanı yöntemi olarak kullanılan boyama yöntemlerinin yanıtıcı olduğu ileri sürülmüş, fakat bu yöntemlerden acridine-orange boyama yönteminin daha az yanıtıcı olduğu belirtilmiştir (17).

Çalışmamızda Giemsa boyama yöntemiyle pozitif olgunun atlandığı görüldü. Toplam 52 pozitif hastadan ancak 33(%63.40) ünde pozitiflik elde edildi ve 19(%35.34) trikomoniyazlı olgu bu yöntemle negatif bulundu.

Trichomonas vaginalis'in tanısında, direkt tanı yöntemlerinin yanısıra bir çok indirekt tanı yöntemleri de kullanılmıştır.

Özler (43) *T.vaginalis*'in tanısında indirekt floresans antikor tekniğini kullanmıştır. Bu yöntem de trikomoniyazlı hastaların kanında çok yüksek titrasvonda olmayan antikor bulunabildiği ve bu antikorların diğer protozoon hastalıklarına göre daha ileri serum sulandırma derecelerinde pozitif sonuç verebilecek kadar özgü! olduğunu saptamıştır.

Yine aynı araştırmacı *T.vaginalis* in tanısında indirekt Hemaglutinasyon (IHA) tekniğini kullanmış ve bu yöntemle de *T.vaginalis*'e karşı kanda antikor bulunduğunu saptamıştır (44).

Diğer serolojik tanı yöntemlerinden biri de ELISA yöntemidir. ELISA son zamanlarda çeşitli hastalıkların tanısında duyarlı bir test olarak kullanıldığı gibi parazitik hastalıkların tanısında da örneğin trisitenelloz, şistosomiyaz, sıtma, tripanozomiyaz, toksoplazmoz ve trikomoniyaz'ın tanısında kullanılmaktadır (41,52,58,61).

Yule et al.(62) *T.vaginalis*'in tanısında ELISA yöntemini uygulayarak toplam 482 hastanın 54 (%11.2) ünde *T.vaginalis* saptamışlardır. Bu yöntemin diğer kültür ve direkt mikroskopik yöntemlerinden daha duyarlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar ELISA yöntemini %93.2 duyarlı ve %97.5 özgül bulmuşlardır.

Çalışmamızda kullanılan rapid latex aglütinasyon yöntemi uyguladığımız diğer yöntemler içinde çok pozitif sonuç veren tanı yöntemidir.

İncelenen toplam 566 örnekten 52 (%9.18) sinde *T.vaginalis* saptanmıştır. Bu pozitif sayıların 39(%75)'ü direkt mikroskopik yöntemle 42(%80.76) si kültür yöntemiyle, 33 ü (%63.46) boyama yöntemiyle ve en yüksek değer olan 49'u (%94.23) rapid latex aglütinasyon yöntemiyle elde edildi. Bu yöntemle %94.2'lik duyarlılık ve %100 lük özgüllük saptandı. Ancak 3(%5.76) pozitif olguda *T.vaginalis* saptanamadı.

Carney et al. (12) bu yöntemle trikomoniyaz tanısında kullanılan diğer mikroskopik, kültür ve ELISA yöntemlerini birbiriyle karşılaştırmış ve incelediği 395 örnekten

42 (%11.2) sinde T.vaginalis'i pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmada toplam 42 hastadan 31 (%73.80) inde mikroskopik yöntemle, 32'sinde(%76.19) kültür yöntemiyle, 40'ında (%95.2) ELISA ve 40'ında (%95.2) rapid latex aglütinasyon yöntemiyle pozitif sonuç elde etmişlerdir.

Araştırmacılar rapid latex aglütinasyon yöntemiyle 2 hastada yalancı pozitif sonuç bulmuşlardır. Bunların incelenmesinde hastalardan birinin vulvo-vajinit belirtileri görüldükten sonra lokal yolla 400 mg.lik Klotrimazol aldığı, ikincisinin ise mikroskopik ve kültür yöntemiyle pozitif sonuç çıkmamasına karşın vulvo-vajinit ve purulent vajinal akıntısı olduğu saptanmıştır (12).

Bu çalışmada Rapid Latex aglütinasyon yönteminin T.vaginalis'in tanısında %95.2 duyarlılık ve %99.4 özgüllük saptanmıştır (12).

Özcan ve Ark.(42) Adana'da 98 genel kadında Giemsa boyama yöntemiyle T.vaginalis araştırması yapmışlar ve risk grubu olarak kabul ettikleri genelev kadınlarında T.vaginalis'e rastlamamışlar. Bunun yanında 240 vajinal akıntı yakınması olan ve olmayan kadınların 4(%1.7) ünde T.vaginalis bulmuşlardır. Pozitif sonuçların yaş grubu dağılımı yapılmamış ve hepsinin de 20-40 yaşları arasında yer aldığı bildirilmiştir.

Yılmaz ve Ark. (61) Elazığ genelevindeki 34 genel kadında T.vaginalis araştırmışlar ve bunlardan 2'sinde (%5.9), pavyonlarda çalışan 26 konsomatris'in 11'inde (%42.3) T.vaginalis saptamışlardır.

Özcan ve Ark.(42) ile Yılmaz ve Ark.(61) genelevde çalışan kadınlarda bu kadar düşük pozitiflik alınmasını

kontrol öncesi çok kuvvetli antimikrobikler kullanmalarına ve özel yöntemlerle etkin bölgesel temizlik yapmalarına bağlamaktadırlar. Konsomatrislerin belirli muayene günlerinin olmaması ve gizli çalışmalarını nedeniyle genel kadınlardan daha çok pozitiflik elde edilmektedir.

Çalışma *T.vaginalis* yakınmaları olan kadınlardaki insidansın saptanması için değil, en uygun testin belirlenmesi için planlanmıştır. Ancak bulgularımızın diğer yerlerde bu konuyla ilgili çalışmalarla kıyaslanmasında onlarla uyumlu sonuç verdiği gözlemlendi (11,12,42,61). Ayrıca klasik bilgilere göre *T.vaginalis* yaygınlığında yaş grubu, sosyo-ekonomik durum ile eğitim düzeyinin etkin olduğu birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Bu amaç için hazırlanan ankette hastaların sosyo-ekonomik ve eğitim düzeyleri ile yaş grupları hakkında bilgiler toplandı. Sosyo-ekonomik durumları iyi olmayanlar ve eğitim düzeyi düşük olanlarda bu hastalığın insidansının yüksek olduğu görülmektedir (Tablo-12, 13). Pozitif bulgularımızın 21-30 ve 31-40 yaşlar (Tablo-2-3, Şekil-7) arasındaki cinsel aktiflerde *T.vaginalis*'in yüksek insidansa olması diğer araştırmacıların sonuçlarını da desteklemektedir (15,42,53,61). Yaş gruplarına göre elde edilen değerlere Ki-kare testi uygulandı %deler arasında fark görülmesine karşın bu fark istatiki olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Böyle ciddi sorun yaratan ve özellikle süregenleştğinde hastalığa tanı konularak tedavi yapılması toplumda yaygınlaşmasını önleyecektir. *T.vaginalis*'in tanısında rapid latex aglütinasyon yönteminin günümüzde en doğru ve en çabuk sonuç veren yöntemler arasında olduğu görülmektedir. Mikroskopi, kültür ve boyama yöntemleriyle rapid latex aglütinasyon yönteminin duyarlılığı kıyaslandığında, rapid latex aglütinasyon yönteminin daha

duyarlı olduğu ortaya çıkmaktadır.Özellikle bu yöntemle 3 dakika gibi kısa bir sürede sonuç alınması ve testin yapılması için gerekli olan maddelerin az kullanılması göz önünde bulundurulursa rutin laboratuvarlarda güvenle kullanılacak bir yöntemdir.



O Z E T

Çalışmada *Trichomonas vaginalis*'in oluşturduğu trikomoniyaz hastalığının tanısında kullanılan Rapid Latex aglütinasyon yönteminin geliştirilmesi ve bu yöntemin mikroskop, kültür, boyama yöntemleriyle karşılaştırması yapılmıştır. Bunun için *Trichomonas vaginalis*'e karşı tavşanlarda oluşturulan antikor, 0.81 µm. çapındaki Bacto Latex partiküllerine bağlanarak Rapid Latex aglütinasyon yönteminde kullanıldı. Kontrol amacıyla bağışık olmayan tavşan serumu aynı şekilde Bacto Latex partiküllere bağlandı.

Yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğünü ölçmek amacıyla Mayıs 1990 - Ocak 1991 tarihleri arasında 7 aylık bir süre içerisinde çalışmada kullanılan örneklerin 294'ü Ç.Ü.Tıp Fakültesi Kadın Hastalıklar ve Doğum polikliniklerinden, 247'si Adana Doğumevi Kadın Hastalıkları polikliniklerinden, vaginal akıntı ve kaşıntı yakınmaları olan, 25'i Adana Doğumevi Aile Planlaması polikliniğine spiral takılmaya gelen ve benzer yakınmaları olmayan (Kontrol grubu) toplam 566 kadından vaginal sürüntü olarak alındı. Tüm örnekler mikroskopi, kültür, boyama ve Rapid latex aglütinasyon yöntemleriyle incelendi. 52 (% 9.18) olguda *Trichomonas vaginalis* saptandı. Mikroskopik yöntemle 39(% 75)'ü, kültür yöntemiyle 42'si (% 80.7)', boyama yöntemiyle 33'ü (% 63.4) Rapid Latex aglütinasyon yöntemiyle 49'u (% 94.3) pozitif olarak saptandı. En fazla pozitif sonuç, 49 olguyla Rapid Latex aglütinasyon yöntemden elde edildi. Rapid latex aglütinasyon yöntemiyle pozitif sonuç vermediği halde 3 olgu, kullanılan diğer yöntemlerle pozitif bulundu.

Rapid latex aglütinasyon yöntemi *Trichomonas vaginalis* tanısında %94.3 duyarlılıkla, çalışılan diğer yöntemler içinde en duyarlı yöntem olarak bulundu.

Kontrol grubu olarak alınan örneklerde pozitif veya yalnızca pozitif elde edilmeyiş için yöntemlerin hepsinin *Trichomonas vaginalis* tanısında özgüllükleri % 100 olarak belirlendi.

Elde edilen pozitif olguların 21-30 ve 31-40 yaş grupları arasında, sosyo-ekonomik ve eğitim düzeyleri düşük olanlarda daha çok görüldü. Yaş gruplarına göre elde edilen değerlere ki-kare testi uygulandı %'deier arasında fark görülmesine karşın istatiki olarak önemli bulunmadı ($P>0.05$).

K A Y N A K L A R

1. Ackers J.P., Lumsden W.H.R., Catterall R.D. and Coyle. Antitrichomonal antibody in the vaginal secretions of women infected with T.vaginalis. Brit. J.Vener Dis. 51: 319, 1975
2. Anderson D.A., Introduction to microbiology. pp:352, The C.V.Mosby Company. 1973
3. Beck J.W. Davies J.E., Medical Parasitology, 3 th.Ed.pp:51-52, The C.V.Mosby Company. St.Louis. 1981.
4. Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağısıklık Bilimi.Sh:426-427, Baris Yayınları Fakülteler Kitabı, İzmir, 1987
5. Brown H.W., Neva F.A. Basic Clinical Parasitology. 5 th.Ed. pp:46-47,Appleton-Century-Crefts/Norwalk. Connecticut, 1983.
6. Budak S., Trikomoniyazın Epitemiyolojisi, Yaşarol S. Trikomoniyaz. T.Parazitol. Derneği. yayını,No:7, 19-27,1987
7. Budak S., Trikomoniyaz korunma, Yaşarol S. Trikomoniyaz. T.Parazitol. Derneği yayını No:7, 67-69, 1987
8. Budak S., Daldal,N. Trikomoniyazın immünolojisi, Yaşarol S., Trikomoniyaz. T.Parazitol. Derneği yayını. No:7, 43-46, 1987
9. Budak S. ve Daldal N. Trikomoniyazın Laboratuvar Tanısı, Yaşarol S. Trikomoniyaz. T.Parazitol Derneği yayını. No:7, 47-62, 1987
10. Bulay O., Genital Sistem Patolojisi, Özel Patoloji Ders Kitapları serisi, 2.Baskı, Ankara Ü.Tıp

Fak.yayınları, S.&I Ankara,1984

11. Carney J.A., Rapid Latex tests for the diagnosis of vaginal Candida and Trichomonas infection. *Labmedica*. 6: 31-38, 1959

12. Carney J.A., Yule A., Rajakumar R., Lacey C.J., Akers J.P., New Rapid Latex agglutination test for diagnosing Trichomonas vaginalis infection. *J.Clin.Pathol*, 54: 806-808, 1958.

13. Chessbrough M., Agglutination tests, *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries*, Vol:II, Microbiology, English Language Book Society, Tropical Health Technology/Butter Worths, pp:24, 1986.

14. Cetin E.T., infeksiyon Hastalıkları. S:235-236, 1st.Fak. Klinik Ders Kitapları, Cilt:10, Celikler Matbaacılık Koll.Sti. istanbul,1979.

15. Cetin E.T., Anç O., Töreci K., Tıbbi Parazitoloji 4. Baskı, Bayda Basım yayın dağıtım A.G. yayını, S:71-96, istanbul, 1985.

16. Daldal N., Trichomonas vaginalis'in Bakterilerle ve Mantarlarla ilişkisi. *T.Parazitol Derg.* 6:31-36, 1978

17. Daldal N., Ak N., Trichomonas vaginalis'in acridine orange ile boyanması ve diğer boyama yöntemleri ile karşılaştırması. *T.Parazitol Derg.* 6:37-43, 1987

18. Difco Manual, Sacto Latex 0,81, Dehydrated Culture media and reagents for microbiology. 10.th. Ed. Difco Laborat. Detroit Michigan. 48232 USA, 496, 1984.

19.Finegold M. and Baron E.J., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7 th. Ed. C.V.Mosby Company. ST.Louis, USA, pp:162-164, 1986

20. Fouts A.C. Kraus E.S., Trichomonas vaginalis. Reevaluation of Its Clinical Presentation and Laboratory diagnosis, *J.infect. Dis.*, 141, 2: 137-143, 1980

21. Fuerst R., Frobisher and Fuerst's Microbiology in health and Diseases, 15 th.Ed. W.B. Saunders Company/Igakushon Saunders, pp:543, 1983

22. Göksu M., Usta M., Vagina Hastalıkları, Kadın Hastalıkları, Mentek Kitabevi, S:324-328, İstanbul, 1985

23. Hopwood V, Carnev J.A., Rapid diagnosis of vaginal Candidiasis by latex particle agglutination, J.Clin. Pathol. 38:455-458, 1985

24. İnci R., Tümbay S., Uyan M., Ulusoy H., Trichomonas vaginalis ve Trikomoniyaz, Enfeksiyon Derg. 2 (1), 93-99, 1988

25. Jawetz F., Melnick J.L., Adelberg E.A., Brooks G.F., Butel J.S., Umston L.N., Medical Microbiology, 18 th.Ed. Prentice-Hall international inc. pp:317, 1989.

26. Kadayıfçı D., İbrişim D., Toksan A., Açikkal C., Trichomonas vaginalis enfeksiyonlarında Ornidazole, C.Ü.Tıp Fak. Derg. 7: 175-177, 1982.

27. Kridger J.N., Holmes K.K., Spence M.D., Bain M.F. McDermack W.M. and Tam M., Geographic variation Among isolates of Trichomonas vaginalis: Demonstration of Antigenic Heterogeneity by Using Monoclonal Antibodies and the indirect immunofluorescence Technique, J. infec. Dis, 152 (5) 979-984, 1985.

28. Kuman H.A., Trikomoniyaz sağıaltını Yeşeroğlu S. Trikomoniyaz kitabında, T.Parazitoloji Derneği Yayını No:7, 63-66, 1987

29. Lennette E.H. Spaulding E.H., Trauht J.P. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. New York, D.C. pp:590-591, 1974

30. Marshall E.K. Vogt M., John D.J. Medical Parasitology 6 th. Ed. WB. Saunders Company, West Washington square. Philadelphia PA., pp:61-63, 1986

31. McCann J.S. Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of Trichomoniasis. Brit. J. Vener. Dis., 50, 450-452, 1974

32. Merdivenci A., Klinik Parazitoloji, S:35-38, Osman Aykac Matbaası, 35-38, İstanbul, 1984.

33. Merdivenci A., Medikal Parazitoloji pratiği, S:70-80, 1st. Üniver. Cerrahpaşa Tıp Fak. yayınları, İstanbul-1981

34. Merdivenci A. Medikal parazitoloji ders kitabı, 2. Baskı, S:124-125, 1st. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. yayınları, İstanbul, 1981.

35. McIlmurray M.P. and Moody M.D., Latex agglutination Bacterial infections. Methodology, Vol:1, pp:9-26, Kohler R.B., Antigen Detection to Diagnose CRC Press, inc. Boca Raton, Florida 1986.

36. Moffet H.L., Clinical Microbiology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia Toronto, pp:226, 1975

37. Moonwiler E. Und Delerichs., Serologische Untersuchungen mit Trichomonaden. Z. Tropenmed Parasitol, 19: 315, 1968.

38. Nagarian H.H., Textbook of Medical Parasitology. PP:91-92, The Williams and Wilkins Company., 1967

39. Orhan V., Trikomonas vaginalisin morfolojisi, Fizyolojisi ve Evrimi, Trikomoniyaz kitabında T.Parazitol Derneği yayını, No:7, 1987

40. Özcan K., Parazitoloji Laboratuvar kitapçığı, S:14, Ç.Ü. Tıp Fak. Parazitoloji Bilim Dalı, 1990

41. Özcan K., Toxoplazmanın tanısında ELISA yönteminin uygulanması, S:14-21, Doçentlik tezi, Hacettepe Ü.Tıp Fak.Mikrobiyoloji A.B.D. 1982

42. Özcan K., Canbolat F., Köksal F., Yigit S., Boztuna B., Arıdoğan N., Genel Kadınlarda Trichomonas vaginalis araştırması. T.Parazitol. Derg., 12 :75-79, 1988.

43. Özler N., Trichomonas vaginalis'in indirekt floresan antikor (IFA) tekniği ile tanısı, T.Parazitol Derg. 2:65-70, 1979.

44. Özler N. Trichomonas vaginalis'in serolojik tanısında indirekt Hemaglutinasyon (IHA) Tekniğinin Değeri. T.Parazitol. Derg.:2, 59-64, 1979.

45. Özler N., Dakar N., Trichomonas vaginalis'in besiyerlerinde üretilmesi ve sürekliliği. Kükem Derg. 3:27,

46. Read C.P. Chandle A.C. introduction. Parasitology.FP:89-90, 10 th. Ed. Toppan Company, Ltd. Tokyo, Japon, 1981

47. Sermat İ., Trikomoniyaz'da Patogenez. Yaşarol S. Trikomoniyaz kitabında. T.Parazitol Derneği yayını. No:7, 29-37, 1987,

48. Skinner D.C. Basic Microbiology, FP:62, The Babbs. Merrill Company. Inc. Indianapolis New York, 1975

49. Smith R.F. incubation Time, Second Blind Passage and Cost Considerations in the isolation of trichomonas vaginalis. J.Clin.pathol. 24: 139-140. 1986

50. Sonnen Wirth A.C., Jarrett L., Gradwohl's Clinical Laboratory methods and diagnosis. 18 th.Ed. Vol:2, FP:2072-2073, The C.V.Mosby Company/ST. Louis Toronto, London, 1980.

51. Spratt M.S., Kearns A.M. Pattman R.S. Trichomonal vaginitis refractory to treatment: Case report. Genitourin Med, 64: 365-372, 1988.

52. Street P.A., Robinson D.T. Ackers J.F., Hanna N.F. Evaluation of an enzyme Linked immunosorbant assay for the detection of antibody to Trichomonas vaginalis in sera and vaginal secretion, Brit .J.Vener Dis.,58: 330-333, 1982.

53. Unat E.K. Tıp Parazitolojisi, 3.Baskı, 55571-577, Fatih Sançlık Vakfı Matbaa işletmesi, İstanbul, 1982

54. Unat E.K. Trichomonas vaginalis'in tarihçesi, S:3-10, Yaşarol S., Trikomoniyaz kitabında. T.parazitol Derneği: No:7, 1987

55. Unat E.K. Tıp Mikrobiyolojisi, Genel Mikrobiyoloji immünoloji ve enfeksiyonların Epidemiyolojisi, Cilt 1, S:137-140, 1st. Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak. yayını, İstanbul 1972

56. Öner A., Özbilgin A., Özbek Y., Üroloji Kliniğine başvuran erkek hastalarda Trichomoniasis araştırılması T. parazitoloj. Derg.,13, 65-69, 1989

57. Vural S., Çetin E.T., Klinik Teshiste Laboratuvar, Shs 234, İstanbul, 1986

58. Watt R.M., Philip A., Wos S.M. and Sam J.G., Rapid Assay for immunological Detection of Trichomonas vaginalis. J. of Clin. Microbiol.,24, 4, 551-555, 1986

59. Whitaker J.R. and Granum P.E., An Absolute Method for protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 260 nm, Anal. Biochem. 109, 156-159, 1980

60. Yaşarol S., Medikal Parazitoloji, 2.Baskı, S:83-84, Ege Üniversitesi Tıp Fak. yayını, İzmir, 1984

61. Yılmaz M., Ay S., Barlağ H., Felek S., Asçı Z. Genel Kadınlarda ve Konsomatrislerde Trichomonas vaginalis araştırması T.Parazitoloj. Derg.,13, 35-37, 1989

62. Yule A., Gezan Mca., Driel J.D., Ackers J.P., Detection of Trichomonas vaginalis antigen in women by enzyme immunoassay. J.Clin. Pathol.: 40, 566-568, 1987.