

TC
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
86793
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

G.vaginalis'in SEKİZ EPİDEMİYOLOJİK TİPİNİN
İMMÜNODOMİNANT YAPISAL PROTEİNLERİ VE ADHERANS
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

T 86793

Fetiye KÖSEAHMET KOLAYLI

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.04.1999

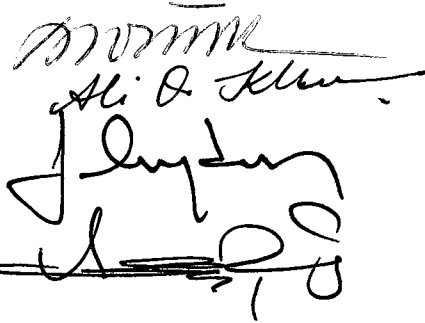
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 20.05.1999

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Ali Osman KILIÇ

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Faruk AYDIN

Enstitü Müdürü : Doç.Dr.Abdülkadir REİS



MAYIS 1999

TRABZON

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tez çalışmam süresince
Desteđini esirgemeyen ve
Beni yüreklendiren sevgili eşim
Raci'ye
ve biricik oğlum
Alperen'e



ÖNSÖZ

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimim ve tez hazırlığım süresince yardımını, bilgisini ve danışmanlığını esirgemeyen Sayın Prof.Dr.Murat ERTÜRK'e ve hocalarım Doç.Dr.Ali Osman KILIÇ, Yrd.Doç.Dr. Faruk AYDIN'a, Anabilim Dalında aynı dönem doktora ve ihtisas eğitimi gören diğer arkadaşlarım İlknur Tosun, Şengül Alpay, Neşe Kaklıkkaya, Kıvanç Çubukçu, Osman B.Özgümüş, Kurtuluş Buruk, Demet Canyılmaz ve Meral Cihanyurdu'na, doktora çalışmalarımı yürütmemde büyük sabır ve destek veren eşim Raci ve oğlum Alperen Kolaylı'ya, bu çalışmanın yürütülmesinde Dr.Faruk AYDIN'ın yürütücülüğünde 98.114.001.9 kod numaralı proje ile maddi destek sağlayan KTÜ Araştırma Fonuna, tez çalışmalarımı yürütmemde görevlendirme ve teşvikte bulunan hocam Prof.Dr.Recep BİNGÖL ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesine teşekkür ederim.

Fethiye KÖSEAHMET KOLAYLI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Gardnerella vaginalis</i> 'in Tarihçesi	3
2.2. <i>G.vaginalis</i> 'in Morfolajik, Biyokimsyal ve Üreme Özellikleri	3
2.3. <i>G. vaginalis</i> 'in İzolasyon Metodları	4
2.4. <i>G. vaginalis</i> 'in Epidemiyolojik Tipleri	5
2.5. <i>G.vaginalis</i> 'in Potagenezisinde Rol Oynayan Faktörler	5
2.6. <i>G. vaginalis</i> 'in Klinik Önemi	7
2.7. <i>G. vaginalis</i> 'in Antibiyotiklere Duyarlılığı	7
2.8. <i>G. vaginalis</i> 'in Yüzey Adhezyonu	8
2.9. Proteinlerin İmmunblotting Tekniği ile Belirlenm	8
3. MATERYAL VE METOD	10
3.1. MATERYAL	10
3.1.1. Çalışma Planı	10
3.1.2. Kullanılan Gereçler	10
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	11
3.1.4. Bakterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri	11
3.1.5. Vaginal Epitel Hücreleri Alınan Hastalar	11
3.1.6. Deney Hayvanları	12
3.1.7. Protein Lizotlarının Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar	12
3.1.8. SDS-PAGE'de Kullanılan Solüsyonlar	12
3.1.9. SDS-PAGE'de Kullanılan Jeller ve İçerikleri	13
3.1.10. Western Blotta Kullanılan Solüsyonlar	13
3.2. METOD	15
3.2.1. Biyotiplerin Üretilmesi	15
3.2.2. Total Hücre Antijenlerinin Hazırlanması	15
3.2.3. Tavşan İmmünizasyonu	15
3.2.4. <i>G. vaginalis</i> 'in Biyotiplerinin Total Hücre Protein Lizatlarının Hazırlanması	16

3.2.5.	SDS-PAGE Jel Elektroforezi	16
3.2.6.	Western Blot	17
3.2.7.	<i>G. vaginalis</i> 'in Biyotiplerinin Adezyonu	19
3.2.7.1.	Epitel Hücrelerin Hazırlanması	19
3.2.7.2.	Deneyin Yapılışı	19
4	BULGULAR	20
4.1.	<i>G. vaginalis</i> 'in Biyotiplerinin SDS-PAGE ile Belirlenen Protein Profilleri	20
4.2.	Western Blot'un Standardizasyonu	23
4.2.1.	Transferin Belirtileri	23
4.2.2.	Blocking Tampon'un Belirlenmesi	26
4.2.3.	Tavşan Poliklonal Antikor Titrasyonu	26
4.2.4.	Konjuge Anti-Tavşan Antikor Titrasyonu	26
4.3.	Biyotiplerin Homolog Sereumlarla Western Blot Reaksiyonları	29
4.4.	Biyotiplerin Homolog ve Diğer Biyotiplere Ait Poliklonal Antiserumlarla Western Blot Reaksiyonları	31
4.4.1.	Biyotip 1'in Western Blot Reaksiyonları	31
4.4.2.	Biyotip 2'in Western Blot Reaksiyonları	34
4.4.3.	Biyotip 3'in Western Blot Reaksiyonları	37
4.4.4.	Biyotip 4'in Western Blot Reaksiyonları	40
4.4.5.	Biyotip 5'in Western Blot Reaksiyonları	43
4.4.6.	Biyotip 6'in Western Blot Reaksiyonları	46
4.4.7.	Biyotip 7'in Western Blot Reaksiyonları	49
4.4.8.	Biyotip 8'in Western Blot Reaksiyonları	52
4.5.	<i>G.vaginalis</i> Biyotiplerinin Vajinal Epitel Hücrelere Adherensi	55
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	65
7.	ÖZET	66
8.	SUMMARY	67
9.	KAYNAKLAR	68
	ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

BV	: Bakteriyel Vajinozis
BT	: Biyotip
BCIP	: 5 Bromo, 4 Chloro, 3 Indolyl Phosphate
BSA	: Bovine Serum Albümin
CNA	: Colombia Nalidixic Asid
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HBT	: Human-Bilayer-Tween
KDA	: Kilodalton
MA	: Moleküler ağırlık
MWM	: Moleküler Weight Marker
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
ONPG	: Orto Nitro.Fenil Galakto Piranozid
PAGE	:Poliakrilamid Jel Elektrofözezi
PBS	: Phosphate Buffer Saline
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
TE	:Tris EDTA
TEMED	: N',N',N',N', Tetrametilendiamin
TRG	:Trabzon <i>Gardnerella vaginalis</i> suşları
TST	: Tris-Saline-Tween

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteri, maya ve *Trichomonas vaginalis* kaynaklı olmak üzere üç temel kategoriye ayrılan vajinitler içerisinde bakteri kaynaklı vajinitler tüm hastaların % 50'sini oluşturmaktadır (1). Özellikle doğurganlık yaşına ulaşan kadınlarda en sık rastlanılan Bakteriyel Vaginosis (BV) bir ürogenital sistem infeksiyonu olarak normal vajen florasındaki dominant laktobasil türlerinin yerlerini *Gardnerella vaginalis* (*G.vaginalis*), *Bacterioides sp.* *Mobilincus sp* ve *Mycoplasma hominis* gibi anaerob bakterilere bırakması şeklinde ortaya çıkmaktadır (2, 3, 4).

Gardnerella vaginalis BV'li kadınların vajinal sürüntü örneğinden en sık izole edilen mikroorganizmadır (5, 6). İlk olarak 1953 yılında Leopold tarafından servisit ve prostatit ile ilgili *Haemophilus benzeri* mikroorganizma olarak tanımlanmış, daha sonra 1955 yılında Gardner ve Dukes (8) BV'in etiyolojik ajanı olarak bu mikroorganizmayı üreterek *Haemophilus vaginalis* olarak tanımlamışlardır. 1984 yılında Piot ve arkadaşları (8) *G.vaginalis*'in çeşitli biyokimyasal özelliklerini dikkate alarak sekiz biyotipe ayırmışlar; özellikle biyotip 1, 2 ve 5'in BV'de en sık izole edilen biyotipler olduğunu bildirmişlerdir.

Postpartum endometrit, "pelvic inflammatory disease" gibi üriner sistem infeksiyonlarına sebep olabilen *G.vaginalis*'in patogenezi ve antijenik yapısı hakkında çok fazla bilgi olmamakla birlikte BV'li kadınların vajinal akıntılarında clue hücrelerin varlığı epitel hücrelere adheransını ve bunun bakterinin patogeneziindeki rolünün önemli olacağını düşündürmektedir.

Diğer taraftan, yakın zamanda Hashemi ve arkadaşları (9) tarafından *G.vaginalis*'in hücre lizatlarının monositik hücrelerde *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) Type I'in ekspresyonunu arttırdığı ve BV'li kadınlarda HIV transmisyonu oranında artmaya sebep olabileceğinin gösterilmesi *G.vaginalis*'in önemini artırmaktadır. *G.vaginalis*'in epidemiyolojik biyotipleri hakkında bir bilgi birikimi oluşmakla birlikte, bu biyotiplerin yapısal protein içerikleri; bunların antijenik özellikleri ve epitel hücrelerine adhere olmaları hususundaki bilgiler ya yok ya da oldukça sınırlıdır.

Çalışmamızda BV'li veya sağlıklı kadınlardan izole edilen *G. vaginalis*'in sekiz epidemiyolojik biyotipinin yapısal protein içeriklerinin SDS-PAGE ile protein profillerinin belirlenmesi; bu biyotiplere karşı tavşanlarda tipe özgü poliklonal serum geliştirilerek antijenik proteinlerin tanımlanması ve bunlar arasındaki antijenik farklılıklar, çapraz reaksiyonların düzeyinin belirlenmesi planlanmıştır. Ayrıca her bir biyotipin epitel hücrelerine adhere olma özellikleri incelenerek sık izole edilen biyotiplerin adherans indekslerinde fark olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Gardnerella vaginalis*'in Tarihçesi:

İlk defa Leopold tarafından 1953 yılında tanımlanmış olmakla birlikte kanlı agar dışındaki diğer besiyerlerinde ürememesi, gram negatif çubuk olması ve karakteristik akıntıya sebep olması sebebiyle 1955'de Gardner ve Dukes (7) tarafından *Haemophilus vaginalis* olarak isimlendirilmiştir. *Haemophilus* türlerinin üremesi için gerekli olan X ve V (Hemin, NAD) faktörlerine ihtiyaç göstermemesi, gram reaksiyonunda kristal viyoleyi tutma eğilimi olması, Reyn ve arkadaşlarının (10) elektron mikroskopisi çalışmaları mikroorganizmanın *Corynebacterium* genusuyla daha yakın ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Böylece Zinneman ve Turner (11) mikroorganizmayı *Corynebacterium vaginale* olarak isimlendirmişlerdir. Çeşitli biyokimyasal yöntemlerle elde edilen bilgiler, DNA-DNA hibridizasyonu ve elektron mikroskopisinden elde edilen bilgilerle yapılan iki büyük taksonomik çalışma *Haemophilus vaginalis*'in mevcut gram pozitif ve gram negatif türlere az veya hiç benzemediğini ortaya koymuştur. Greenwood ve Picket (12), Piot ve arkadaşlarının (13) önerisiyle mikroorganizmayı *G.vaginalis* olarak isimlendirmiştir.

2.2. *G.vaginalis*'in Morfolojik, Biyokimyasal ve Üreme Özellikleri:

G.vaginalis Gardnerella cinsinin tek türüdür. Mikroorganizma 0.5 mikrometre çapında, 1.5-2.5 mikrometre uzunluğunda gram negatif veya gram değişken boyanan çomakçıklardır (14,15,16). Hareketsiz, kapsülsüz ve endospor oluşturmazlar. Logaritmik olarak üreme fazında gram pozitif dir; ancak peptidoglikan tabakasının kristal viyole agregatlarını tutamayacak kadar ince olması sebebiyle yaşlı kültürlerde gram negatif boyanırlar (17,18). Löffler veya Rauk'un serumlu besiyerinde erken exponansiyel üreme fazında kısmi veya tam olarak gram pozitif olarak boyanırlar (17). Hastaların kan örneklerinin 48 saatlik kültürlerinde de dominant olarak gram pozitif boyanırlar. Oldukça nazlı ürerler. Oksidaz ve katalaz negatiftirler. Metabolizması fermentatif olan tipler

kemoorganotrofikdir. Maltoz ve nişastayı gaz yapmadan aside parçalarlar. Asetik asit en önemli fermentasyon ürünüdür. Hippüratı hidrolize ederler.

G.vaginalis bazı özellikleri bakımından difteroid bakterilere benzemektedirler. Hücrelerin açılı ve çit şeklindeki düzenlenmeleri bölünme sırasındaki ani kopmalardan dolayı ortaya çıkar. Özellikle fermete edilebilir bir madde veya sodyum fosfat varlığında kültür edilirse *G.vaginalis*'de metafosfat granülleri oluşur (7,16).

Bakterinin fizyolojik durumu morfolojisine ve boyanma reaksiyonlarına etki eder. Kanlı agardaki 24 saatlik kültürlerinde hem küçük kokobasil hem de daha uzun formlar görülür. Smith V agar medium'da yapılan vaginal agar kültürlerinde kısa çomakçıklar şeklinde görülen bakteriler gram negatif boyanmasına rağmen nişastalı besiyerinde gram değişken boyanırlar (19).

İnsan veya tavşan kanı içeren besiyerinde beta hemoliz oluşturur. Anaerobik inkübasyonda hemoliz artar. % 5 koyun kanlı Colombia agar besiyerinde koloniler % 5 soybean-casein digest agar besiyerine oranla iki kat daha büyüktür. % 2 pepton, at serumu, % 1 maltoz ve % 4 insan kanlı besiyerinde üç günlük inkübasyondan sonra 0.5 mm çapında koloni oluştururlar. PDS agarda (Protease Peptone No:3 ve dextroz) 48 saatlik koloniler 0.5-2 mm çapında düzgün kenarlı, beyazımsı kubbeli koloniler oluştururlar (20).

Optimum üreme sıcaklığı 35-37 °C'dir. Ancak 25-42 °C'de de üreyebilirler. Üreme için NAD, hemin veya koenzim benzeri maddelere ihtiyaç göstermezler. Biotin, folik asit, niasin, tiamin, riboflavin ve iki veya daha fazla pirimidine ihtiyaç gösterir (15,17,18,21).

2.3. İzolasyon Metodları:

Klinik örnklerden *G.vaginalis* izolasyonu için birçok farklı besiyeri kullanılmıştır. En başarılı üretim hem ayırıcı hem de seçici özellik taşıyan besiyerleriyle sağlanmıştır. Besiyerlerinde insan kanının bulunması birçok nonhemolitik koloniler arasında beta hemoliz oluşturan *G.vaginalis*'in ayrılmasına yardım eder (18).

Goldberg ve Washington (22) Colombia agar besiyerine 10 mikrogram/ml kolistin ve 15 mikrogram/ml nalidiksik asit ilave ederek yarı seçici besiyeri oluşturmuştur. Mickelsen ve arkadaşları (23) bu yarı seçici besiyerine % 1 oranında mısır nişastası ekleyerek nişasta hidrolizini de belirlemişlerdir. Ison ve arkadaşları (24) 4g/ml gentamisin, 30g/ml nalidiksik asit ve 2g/ml amphoteresin B içeren insan kanlı besiyerini geliştirmişlerdir.

Totten ve arkadaşları (25) HBT (Human Blood Bilayer-Tween) besiyerini geliştirmişlerdir. Besiyerinin alt tabakası % 1 proteose peptone no:3, 2g/ml amphoteresin B ve % 0.0075 Tween 80 ilaveli Colombia kolistin-nalidiksik asitden oluşmuş, üst katmanı ise

% 5 kan ilavesi ile oluşturulmuştur. HBT besiyerinde hemoliz daha belirgin ve daha yaygındır. Tween 80 hemolizi gelişimini ve üremeyi artırır.

2.4. *Gardnerella vaginalis*'in Epidemiyolojik Tipleri :

Geçen 30 yılda *G.vaginalis* ile ilgili oldukça hacimli çalışmalar yapılmasına rağmen patojenik rolü ve epidemiyolojisi hakkında hala çeşitli çelişkiler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar bu karışıklığı aydınlatmak için çeşitli serotiplendirme, biyotiplendirme gibi epidemiyolojik belirteçler geliştirmişlerdir (26).

Piot ve arkadaşları (8) *G. vaginalis*'i beta galaktozidaz, lipaz ve hippürat hidrolizine göre sekiz biyotipe ayırmışlar (Tablo1); bu biyotiplerden 1, 2 ve 5'in BV'de daha sık izole edildiğini bildirmişlerdir. Briselden (27) lipaz pozitif biyotiplerin (biyotip 1, 2, 3 ve 4) normal vajen florasına sahip kadınlara oranla BV'li kadınlardan daha sık izole edildiğini bildirmişlerdir.

Benito ve arkadaşları (28) Piot ve arkadaşlarının oluşturdukları şemaya ilave olarak karbohidrat fermentasyon testlerini (galaktoz, ksiloz ve arabinoz) ilave ederek modifiye bir şema oluşturmuşlardır.

Edmunds (29) presipitasyon sonuçlarına göre bakteriyi yedi serolojik gruba ayırmış, Ison ve arkadaşları (30) dot blot tekniğiyle 20 serotip belirlemişlerdir. Nath ve arkadaşları (31) enzimle kesilmiş DNA profillerinin tek başına biyotipleri belirlemek için yeterli olmayacağını bildirmişler; fakat bu bantların spesifik *G. vaginalis* DNA fragment problemleri ile hibridize edildiğinde tiplendirme yöntemi olarak uygun olabileceğini bildirmişlerdir.

Tablo1: *G.vaginalis*'in Biyotipleri

BİYOTİPLER	1	2	3	4	5	6	7	8
β -Galaktozidaz(ONPG)	+	-	-	+	-	+	-	+
Lipaz	+	+	+	+	-	-	-	-
Hippurat Hidrolizi	+	+	-	-	+	+	-	-

2.5. *G.vaginalis*'in Potagenezisinde Rol Oynayan Faktörler:

Ekzopolisakkarit Tabaka : Elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmada fibriler yapıda olduğu görülen dış tabakanın ruthenium red boyama ile polisakkarit yapıda olduğu

belirlenmiştir. Elektron-dense olan bu mikrokopsüler yapının birbirine yakın olan hücreleri arasında bağlantı kurmada görev yaptığı belirlenmiştir. Sıvı ortamlarda hücrelerin küme oluşturmasından sorumlu olacağı düşünülmektedir. *G.vaginalis*'in vaginal epitel hücrelere adhezyonunda piluslardan ziyade bu fibriler ekzopolisakkarit tabakanın rol oynadığı bildirilmiştir (18,32).

Pilus: Elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalarda *G.vaginalis*'in 3-7 nm çapında pilusları olduğu belirlenmiştir (18). Boustouller ve arkadaşları (33) BV'li kadınlardan ve nongonokoksik üretritli erkeklerden izole edilen *G.vaginalis* suşlarının laboratuvar suşlarına göre daha fazla pilus oluşturduğunu bildirmişlerdir. Scott ve arkadaşları (34) yaptıkları çalışmalarda *G.vaginalis* suşlarının epitel hücrelerine ve insan eritrositlerine yapışmada adhesin-reseptör mekanizmasını araştırarak çeşitli kimyasal ve fiziksel faktörler karşısında farklı etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Hemagglütinasyon gösteren suşların hücre kültürlerine tutunan suşlarından daha hidrofobik olduklarını; insan eritrositlerinin hemagglütinasyonunun galaktoz, laktoz, N-asetilnöraminik asit ve fosfotidilserin'le inhibe olduğunu; bunun aksine doku kültürüne tutunan suşların bu maddelerle inhibe olmadıklarını belirlemişlerdir. Sonuç olarak *G.vaginalis*'in insan eritrositlerine adheransında pilusların sorumlu olduklarını, epitel hücrelere adheranstan ise dış fibriler örtünün sorumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Sitotoksin : Rottini ve arkadaşları (35) *G.vaginalis*'in nişasta ve Tween 80 içeren ortamlarda sitotoksin oluşturduklarını bildirmişlerdir. Besiyeri içerisindeki nişasta ve Tween 80'nin etkisinin bakteriden sitolizin salınımını kolaylaştırdığı, hemolizin sentezini uyardığı veya kültür ortamına salındıktan sonra inaktivasyonunu önlediği şeklinde düşünülmektedir.

Şaflaştırılan sitotoksinin insan eritrositleri üzerine olan etkisine bakıldığında yaklaşık 1.5×10^6 U/ml'lık bir aktivite olduğu belirlenmiştir. İyon değişim kromatografisi ve western blot analizi sonucu yaklaşık 61 kDa ağırlığında olduğu belirlenen hemolitik aktiviteye sahip proteinin monoklonal antikolarla hemolitik aktivitesinin nötralize edildiği gösterilmiştir.

Farklı türlerden elde edilen eritrositler üzerine etkisine bakıldığında insan eritrositleriyle toksinin 0.75 ng'ı % 50'lik lizis oluştururken at, tavşan, koyun ve kobay eritrositlerine etkisi için toksinin dozunun 100 kez artırılması gerektiği görülmüştür. Ayrıca sitolizin'in insan nötrofilik lökositler ve vasküler endotel hücreleri üzerine de etkili olduğu belirlenmiştir.

Cauci ve arkadaşları (36) yaptıkları çalışmada *G.vaginalis* kültür süpernatantlarından kromatografik yöntemle 59 kDa ağırlığında 1.9×10^6 U/ml aktiviteye sahip sitolizin elde

etmişlerdir. Sitolizin insan eritrosotinde 2-4 mn çapında por oluşturarak etkisini gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.6. *G. vaginalis*'in Klinik Önemi :

Gardner ve Duker *G. vaginalis*'in BV'den sorumlu tek etyolojik ajan olduğunu iddia etmişler; fakat bazı araştırmacılar BV'den sorumlu olabileceğini söylerken bazıları ise ilişkili olmadığını çünkü normal vajen florasında da bulunduğunu bildirmişlerdir (37). Daha sonraki çalışmalarda anaeroplara, *G. vaginalis* ve BV arasındaki ilişkinin arttığı gösterilmiştir(38, 39, 40)

G. vaginalis'in patogenezi hakkında tam bir açıklayıcı bilgi olmamakla birlikte gebeliğin ikinci trimesterinde erken doğuma sebep olduğu bildirilmiştir (15, 41, 42, 43). Ayrıca postpartum ve postabortal ateşte kandan en sık izole edilen mikroorganizmalardan biridir. Postpartum endometritis için de önemli bir risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır (15, 44).

G. vaginalis yenidoğanlarda ölümcül veya daha hafif seyirli septisemilere, yumuşak doku infeksiyonlarına sebep olabilir. Bakteri vajinal ve karaciğer abselerinden, Bartholinit, abdominal sıvı ve orofarenkten izole edilmiştir (15). Erkeklerde genitouriner sistemden kaynaklanan bakteriyemilerden sorumlu olduğu da bildirilmiştir (45).

2.7. *G. vaginalis*'in Antibiyotiklere Duyarlılığı:

BV'nin tedavisinde bir çok araştırmacı tarafından çeşitli tedavi rejimleri uygulanmıştır (2, 46, 47). Metranidazol oldukça sık kullanılan ve tedavide yaklaşık % 90 ve daha iyi düzeyde başarı sağlayan bir ajan olarak bildirilmiştir(2, 48, 49).

Aysha ve arkadaşları (50) yaptıkları bir çalışmada 25 antimikrobiyal ajana karşı *G. vaginalis*'in duyarlılığını araştırmışlar ve bütün suşların penisilin, ampisilin, eritromisin, klindamisin, kloramfenikol ve trimetoprima duyarlı, bazı suşların tetrasiklin ve minosikline dirençli olduklarını; aztreonam, amikasin ve sulfametaksazole belirgin bir direnç görüldüğünü bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada metranidazolün subinhibitör konsantrasyonlarda bakterinin adherensini önlediği, ampisilinin ise bunu başaramadığı bildirilmiştir(51).

2.8. *G.vaginalis*'in Yüzey Adhezyonu:

Bakteriyel vajinozisin teşhisinde vajinal "clue cell" oranının belirleyici olması Gardner ve Duker'den beri adhezyonun ilgi çekmesine neden olmuştur. Clue hücreler squamöz epitel hücreleridir ve *G. vaginalis* benzeri bakterilerle kaplıdır. Çoğunlukla vaginal örneklerde bulunur, fakat kadınların idrar keselerinden aspire edilen idrarda da görülür. Hatta semende, üretral akıntılarda endoüretal sürüntü örneklerinde de görülebilirler.

Ürogenital hücrelere adezyon *G. vaginalis*'in kolonizasyonuna izin verir. Böylece bakterilerin minimal kolonizasyonu sonucu lokal antikorlar ve extrasellüler enzimlerin yaptığı hasar neticesi vaginal epitel hücreler, vaginal sıvı veya idrarla akmaya başlar. (18)

Vajinal duvarlardan kazınarak elde edilen vajinal epitel hücreleri in-vitro adhezyon deneylerinde kullanılmıştır (51, 52, 34). Vajinal epitel hücrelerin canlılığı adhezyonda oldukça önemli rol oynamaktadır. Trypan blue ile canlılığı belirlenen epitel hücrelerinde adezyonun 10 kez daha fazla olduğu bildirilmiştir (53).

Scott ve arkadaşları (38) 105 hastadan izole ettikleri *G. vaginalis* suşlarının Mc Coy hücre kültüründeki adhezyon indeksleri ile aynı hastalarda clue hücre oluşumu arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. İnsan eritrositlerine de adhere olabilen *G. vaginalis*'in hemaglutinasyon ve adherens indeksi arasında bir korelasyon belirlenememiştir.

G.vaginalis'in adhezyonu hemaglutinasyonla korelasyon göstermemesi nedeniyle adherens mekanizmasının aynı olmadığı düşünülmektedir. Scott ve arkadaşları (32) elektron mikroskopisi ile yaptıkları bir çalışmada epitel hücrelerine yapışmada fimbriadan ziyade dış fibriler örtünün öneminin daha büyük olduğunu bildirmişlerdir.

2.9. Proteinlerin İmmunblotting Tekniği ile Belirlenmesi:

Jel elektroforezi proteinlerin ayrışması ve karakterizasyonunda kullanılan önemli bir tekniktir. Agaroz jel immünokimyasal yöntemlerle kombine edilmeye uygun olmakla beraber poliakrilamid jelin kompakt yapısı ayrılmış proteinlerin immünokimyasal özelliklerinin incelenmesi için engel teşkil etmektedir. 1979 yılında Towbin SDS poliakrilamid jelde ayrılmış proteinleri elektirik akımına tabi tutarak nitroselüloz membrana aktarmış, böylece proteinlerin antikorlarla veya spesifik ligantlarla analizini mümkün kılmıştır ve bu teknik western blot olarak adlandırılmıştır.

İmmunoblot işlemi olarak da bilinen western blot birçok antijen özeliğindeki proteinlerin önemli karakteristiklerini yakalamak amacıyla kullanılabilir. Özellikle çözünmeyen, işaretlenmesi zor veya kolay bozulan dolayısıyla immünopresipitasyonla analiz

edilmeye uygun olmayan antijenlerin belirlenmesinde kullanılır; ayrıca farklı poliklonal serum antikorlarının varlığını, miktarını ve spesifikliğini belirlemede güçlü bir tekniktir.

Immunblotting tekniği i) antijen örneğinin hazırlanması; ii) protein örneğlerinin jel elektroforezi ile ayrıştırılması; iii) ayrıştırılmış olan örneğlerin membrana aktarılması; iv) membrandaki nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi; v) antikor ilave edilmesi ve vi) özgül bağlanmanın saptanması olmak üzere altı basamakta gerçekleşir (54).



3. MATERYAL METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Planı :

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Ocak 1998- Ocak 1999 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

Çalışmamızda daha önce Farabi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliğine müracet eden BV ön tanılı hastaların vajinal sürüntü örneklerinden izole edilerek identifikasyonu Piot ve arkadaşlarının (8) öngördüğü şekilde biyotiplendirilen ve Anabilim dalımızda -20°C'de saklanan sekiz farklı epidemiyolojik biyotip *G.vaginalis* suşu kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2 : *G. vaginalis*'in Sekiz Biyotipinin Suş İsimleri ve Referansları

Biyotip	Suş Adı	Referans
1	TRG 26 a	H. Çiftçi
2	TRG 99 c	H. Çiftçi
3	TRG 22 a	H. Çiftçi
4	TRG 31 c	H. Çiftçi
5	TRG 84 b	H. Çiftçi
6	TRG 184	H. Çiftçi
7	TRG 45	H. Çiftçi
8	TRG 210.	H. Çiftçi

3.1.2. Kullanılan Gereçler:

Çalışmada başlıca aşağıdaki araç ve gereçlerden faydalanıldı. Otoklav, inkübatörler, ışık mikroskobu, binoküler mikroskop, jar, mikrosantrüfuj soğutmalı santrüfuj, manyetik karıştırıcı, hassas terazi, buzdolabı, derin dondurucu (-20°C), su banyosu, vorteks,

çalkalayıcı, otomatik pipetler, güç kaynağı, elektroforez tankı, western blot aparatı(Bio-Rad), plastik küvetler, muhtelif filtreler, cam petri kutuları, lam, lamel, cam tüpler, enjektörler, bistüri.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar :

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar ve ayıraçlar çeşitli firmalardan sağlanmıştır. Bunlardan Colombia Blood agar Colombia broth (Difco), Vitamin K1, hemin, agarose , trisma base, trisma hydrochloride, sodyum dodecyl sulfate, ammonium persulfate, N,N-methylenbis acrylamide, glycine, β-mercaptoethanol, coomassie brilliant blue R-250, TEMED (N,N,N,N tetramethylene diamine), trichloro acetic acid, lysosyme, brom phenol blue, xylene cyanole EDTA, Amido black, Freund's adjuvanı, dimetil formamide, horse serum, Anti rabbit Ig, NBT, BCIP, Glisin, bovine serum albümin, sodium bicarbonate, disodium chloride, disodium hydrogen phosphate, sodium bicarbonate chloride, butanol, hydrochloride acid, glyserol, acetic acid, sodium carbonate metilen mavisi (Merck-Almanya), glucose, potasium hydroxide (Horasan Kimya-Türkiye), aseton, methanol (Carlo Erba-İtalya), acrylamide (Fisher-ABD), Whatman cellulose filtre (5m pore size), Nitrocellulose membran (Bio-Rad), PBS tablet (Difco) firmalarından temin edilmiştir.

3.1.4. Bakterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besi Yerleri:

a-Colombia Nalidiksik Agar (CNA Agar): Bileşiminde % 1 pantone, % 1 bitone, % 0.3 tryptic digest of beef heart, % 0.1 corn starch, % 0.05sodium chloride, % 1 kolistin sulfat, % 1.5 nalidixic acid, % 1.5 agar bulunan besi yeri steril edilip 50°C'ye kadar soğutulup içerisine % 0.5 hemin, % 0.1 vitamin K1 ve % 5 insan kanı ilave edilerek hazırlandı.

b-Colombia Broth: Bileşiminde % 1 pantone, % 1 bitone, % 0.3 tryptic digest of beef heart, % 0.01 L-cysteine hydrochloride, % 0.25 dextrose, % 0.5 sodiumchloride, % 0.01magnesium sulfate anhydrous, % 0.002 ferrous sulfate, % 0.06 sodium, % 0.083 aminomethane, % 0.286 aminomethane hydrochloride bulunan carbonate besiyeri steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutulup içersine % 0.2 vitamin K1, % 0.5 hemin, %5 at serumu ilave edilerek hazırlandı.

3.1.5 Vajinal Epitel Hücre Alınması :

Vajinal epitel hücreleri hamile olmayan, menstürel siklusu düzenli, 20-40 yaşları arasında sağlıklı kadınlardan alındı. Klinik muayene ile vajinal örneklerden yapılan taze preparatla enfeksiyonun olmadığı belirlendi. Epitel toplanan olgular her hangi bir ilaç kullanmayanlardan seçildi.

3.1.6. Deney Hayvanları :

Yaklaşık 2 kilogram ağırlığındaki albino tavşanlar Ankara Hıfzısihha Enstitüsü Çubuk Hayvan yetiştirme çiftliğinden temin edildi ve Anabilim dalımızda bulunan hayvan bakımına uygun laboratuvar şartlarında bakıldı.

3.1.7. Protein Lizatlarının Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar :

a. TE Tampon: 10mM Tris HCl (pH: 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0) saf suda hazırlanarak steril olarak kullanıldı.

b. STET Tampon: % 8 sükröz, % 5 Triton X-100 , 50mM EDTA , 50mM Tris HCl (pH 7.0), 10 mg/ml lizozim ilave edilerek hazırlandı.

c. PEN Tampon: 10mM Tris HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 0.1M NaCl hazırlandı.

3.1.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS PAGE) Kullanılan Solüsyonlar:

a. Acrylamide N,N methylene bis acrylamide stok solüsyonu: % 29(w/v) acrylamide ve % 1 N,N' methylene bis acrylamide karıştırılarak hazırlandı.

b. Ammonium persulfate: Bu çözelti dayanıksız olduğundan %10'luk solüsyon çalışmadan hemen önce hazırlandı.

c. Running Jel Tamponu: 1M Tris HCl (pH 8.8) hazırlandı. Ayarı yapılırken asit çözeltiyi ısıttığından içi buz dolu küvet kullanıldı. Çözelti +4°C'de saklandı.

d. Stacking jel tamponu: 1M Tris HCl (pH 6.8) hazırlandı. pH ayarı yapılırken ısıyı sabit tutmak için içi buz dolu küvet kullanıldı.

e. 10x Elektrophoresis Tampon: 30g Trisma Base, 144g Glycine 100ml % 10'luk SDS hazırlanıp 1000ml'ye tamamlandı ve pH 8.3'e ayarlandı.

f. 1x Elektrophoresis Tampon: 10x Elektrophoresis buffer'den % 90 deiyonize su ile hazırlandı.

g. 2x Solüsyonu: Distile suda % 4 SDS, % 20 glycerol, % 10 2-mercaptoethanol, 125mM Tris (pH 6.8) ve % 0.5 bromphenol ile hazırlandı.

h. Boyama Solüsyonu: 200ml Methanol ,200ml deiyonize su , 40ml asetik asit, 0.4g Coomassie Brilliant Blue R-250 ile hazırlandı.

ı. Boya Giderme Solüsyonu: 150 ml Glacial Asetik asit , 400ml Methanol, 1450ml deiyonize su ile hazırlandı.

3.1.9. SDS –PAGE'de Kullanılan Jeller ve İçerikleri:

a. % 9'luk Ayırma jeli (Runnig Jel): 15.45 ml deiyonize su, 18.75ml Tris HCl (pH 8.8), 15ml acryl: Bisryl (29:1), 0.5ml % 10'luk SDS, 0.25ml % 10'luk ammonium persulfate (APS) ve 0.050ml TEMED ile hazırlandı.

b. %5'lik Yığma jeli (Stacking gel): Yığma jeli; 9.825ml deiyonize su, 1.875ml Tris HCL (pH 6.8), 3ml acrylamide- bisacrylamide, 0.15ml %10'luk SDS, 0.075ml %10'luk APS, 0.015ml TEMED ile hazırlandı.

3.1.10. Western Blotta Kullanılan Solüsyonlar :

a. Transfer Tampon: 3.03gr Trisma Base 14.4g Glycine, 500ml deiyonize distile suda çözüldü. Üzerine 200ml metanol ilave edilip 1000ml'ye tamamlanarak 3lt hazırlandı.

b. Blocking Tampon: 50g süt tozu, 1000ml PBS'de çözüldü 2.5ml Tween 20 ilave edilerek hazırlandı.

c. Washing Tampon: (Tris-Saline-Tween) (TST) 6.06g Trisma Base, 29.22g NaCl 800ml deiyonize suda çözölüp, HCl ile pH 9.0'a ayarlandıktan sonra 1ml Tween ilave edilip deiyonize su ile 1000ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

d. Akaline Phosphatase için Tris Tampon: 12.1 g Trisma Base , 5.84g NaCl 800ml deiyonize suda çözölüp, HCl ile pH 9.0'a ayarlandıktan sonra 2.5ml 4M MgCl₂ ilave edilip 1000ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

e. Nitro Blue Tetrazolium Stok Solüsyonu (NBT): 100mg NBT 1.33ml %70'lik dimetil formamide çözölüp +4C'de saklandı.

f. BCIP Substrate Stok Solüsyonu (50mg/ml): 100mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) 2ml dimetil formamide içinde çözölerek hazırlandı.

g. Stop Solüsyonu: 20mM Tris HCl (pH:7.5), 0.5mM EDTA

h. Amido Black Boya Solüsyonu: 2ml asetik asit, 0.1g Amido Black ve 98ml biditle su ile hazırlandı.

ı. Amido Black Boya Giderme Solüsyonu: 90ml metanol, 2ml.asetik asit, distile suyla 100ml'ye tamamlandı.

3.2. METOD

3.2.1 *G.vaginalis*'in Üretilmesi

a. CNA'da Üretme:

Daha önce Piot ve arkadaşlarının (8) önerdiği şekilde biyotiplendirilip ependorf içinde -20°C'de Anabilim Dalımızda saklanan *G.vaginalis*'in sekiz biyotipin her biri buz içerisinde yavaşça çözündürüldükten sonra iyice vortexlenip CNA besisi yerine bırakıldı. Steril öze ile besisi yeri yüzeyine seyreltme ekimi yapıldı. Ekim yapılan plaklar CO₂'li etüvde 37°C 'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Total hücre protein lizati hazırlamak için herbir biyotip için 6 petri kutusuna ekim yapıldı.

b. Sıvı Besi Yerinde Üretme:

Total hücre antijeni hazırlamak için katı besiyerinde saf olarak üretilen *G.vaginalis*'in 8 biyotipi 10ml'lik hacimdeki Colombia Broth'a bir öze dolusu ekilerek CO₂'li etüvde 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.2. Total Hücre Antijeninin Hazırlanması:

Sıvı besiyerinde üreyen *G.vaginalis*'in biyotiplerinin canlı bakteri sayısı belirlenerek 4x10⁸ CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu ependorf tüplerine alındı ve 3 kez PBS ile yıkanarak kullanılabilecek şekilde -20°C'de saklandı.

3.2.3. Tavşanların İmmünizasyonu:

Anabilim Dalımız hayvan laboratuvarında uygun şartlarda beslenen yaklaşık 2kg ağırlığındaki albino tavşanlara aşağıdaki şemada özetlendiği gibi enjeksiyon yapıldı (Tablo3)

Tablo-3: Tavşanların İmmünizasyon Şeması

Gün	Antijen
1.gün	0.5ml (4x10 ⁸ CFU/ml) bakteri süspansiyonu 1:1 Complete Freund's adjuvanı ile karıştırılarak subkutanöz verildi.
10.gün	0.5ml (4x10 ⁸ CFU/ml) bakteri süspansiyonu 1:1 Incomplete Freund's adjuvanı ile karıştırılarak intramüsküler verildi.
30.gün	0.5ml (4x10 ⁸ CFU/ml) bakteri süspansiyonu intravenöz verildi.
Booster	0.5ml (4x10 ⁸ CFU/ml) bakteri süspansiyonu intravenöz verildi.

3.2.4. *G.vaginalis* Biyotiplerinin Total Hücre Protein Lizatlarının Hazırlanması :

Clombia CNA besiyerinde üretilen *G.vaginalis* biyotipleri 7000 rpm'de 10 dakika santrüflendikten sonra süpernatant dökülüp, pellet 500 µl TE içerisinde çözülüp steril eperdorfa aktarıldı. Üç kez 500 µl TE ile yıkandıktan sonra süpernatant dökülüp içerisinde 10mg/ml lizozim bulunan STET buffer'dan 500 µl ilave edildi. İyice vortexlenip 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Viskozite gözlendikten sonra üzerine 100 µl PEN buffer koyuldu iyice vortexlenip 100 µl 2x Sample buffer ilave edilerek 3 dakika kaynatıldı ve SDS-PAGE uygulanmak üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez:

Total hücre proteinlerinin analizi için % 9'luk ayırma jeli hazırlandı ve 1.5mm spacer kullanılarak hazırlanan cam plakalar arasına dökülerek üst kısma 2-3mm kadar butanol ilave edildi. Polimerizasyon için 30 dakika oda ısısında bekletildi. Ayırma jelinin üst kısmındaki butanol dökülerek deiyonize su ile bir kaç defa yıkandı ve kurutma kağıtları ile kurulandı. Tek kuyucuğu olan tarak yerleştirildikten sonra üzerine % 5'lik yığma jeli ilave edildi. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılarak kuyucuklar elektrofrez tamponu ile yıkandı ve örnekleri yüklemek için hazır hale getirildi.

Hazırlanmış total hücre protein örnekleri -20°C'den alınarak 5 dakika kaynatıldı ve 10 000 rpm de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımdan 100 µl kuyucuğa yüklendi. Proteinler bir gece boyunca 45 V doğru akım altında elektrofrez tabi tutuldu. İşaret boyası jelin alt kısmına geldiğinde akım durdurularak jel çıkarıldı.

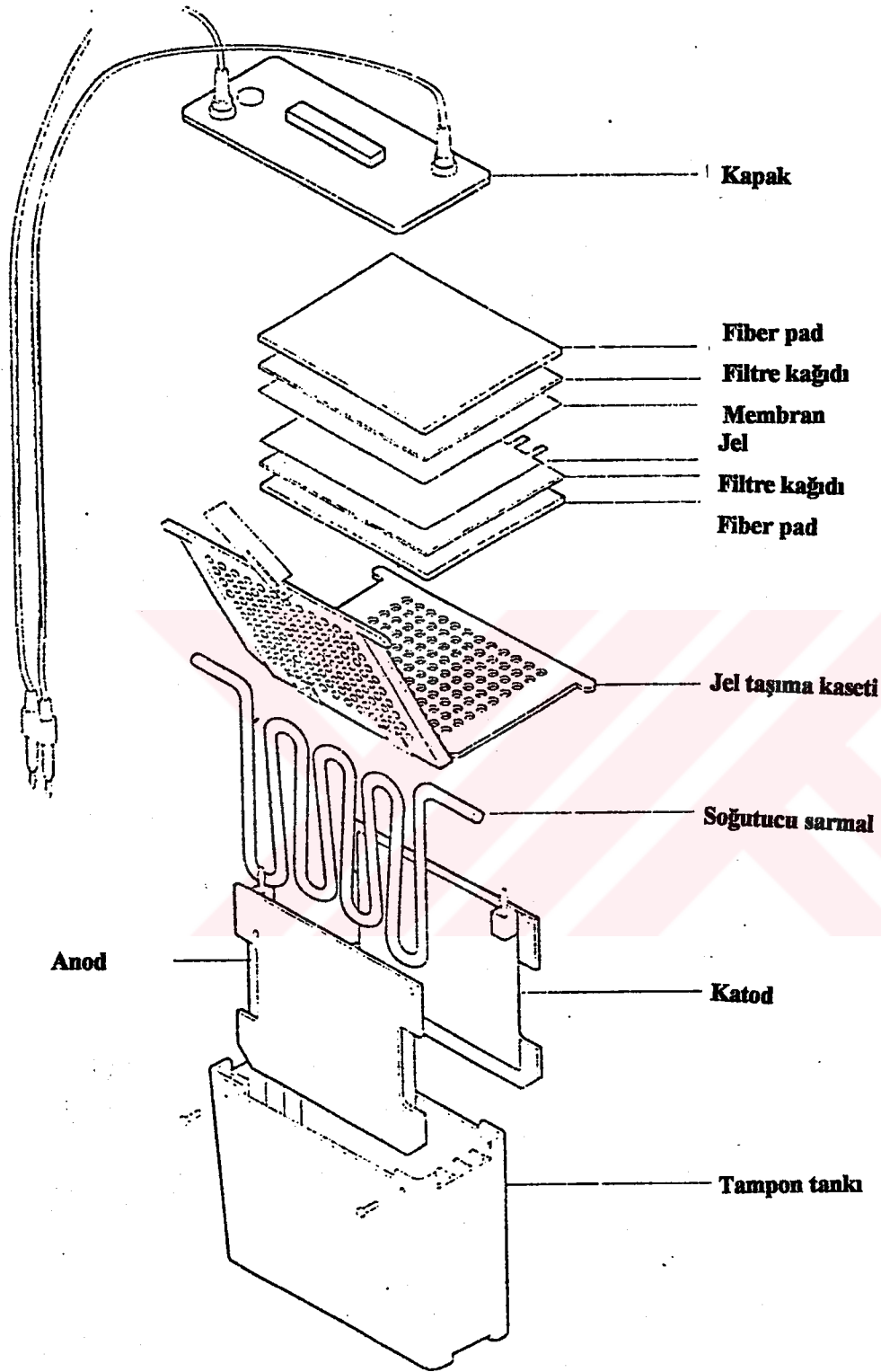
3.2.6. Western Blot :

Jel 1 saat transfer buffer içinde equilibre edildi. Kasete yerleştirilmeden 15 dakika önce pedler, Whatman filtreleri ve nitrosellüloz membran transfer buffer içersine koyularak ıslatıldı. Blot kasetinin siyah yüzeyi alta gelecek şekilde temiz bir zemine oturtuldu ve fiber ped, scoch ped, whatman filtre kağıdı (No:3) kasetin üzerine yerleştirildi. Equilibre edilen jel düzgün bir şekilde filtre kağıdı üzerine yerleştirildi. Üzerine nitrosellüloz membran koyulup hava kabarcıkları cam bir çubuk yardımıyla çıkartıldı. Üzerine whatman filtre kağıdı (No:1) yerleştirilip alt tabakadaki gibi pedler koyulup kasetin ağzı kapatıldı ve tanka yerleştirildi. Tankın içersine magnik bar koyulup transfer buffer ile dolduruldu. Bir gece boyunca magnetik karıştırıcı üzerinde 30-35V elektrik akımında blot işlemi gerçekleştirildi (Şekil 1).

Kaset açılıp pedler ve filtre kağıtları kaldırıldı. Membranın başlangıç kısmı ve transferin gerçekleştiği yüzü belirlendi. Moleküler ağırlık (MA) marker bölümü kesilip amido black boya solüsyonu içine koyuldu; diğer kısım nonspesifik bağlanmaları önlemek için blocking buffer içersine konulup 2 saat çalkalanarak inkübe edildi.

Membran temiz bir cam üzerine alınıp, stripler kesilerek 2-3 ml hacimli kuyucukları olan kanallı pleyte yerleştirildi.

1/200 dilüsyondaki tavşan serumları striplerin üzerine yerleştirildi ve 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. 5'er dakika ara ile 4 kez PBS-Tween kullanılarak yıkandı. Alkalen fosfatazla konjuge edilmiş antirabit immunglobülinin blocking tampon içersinde 1/5000'lik dilüsyonu hazırlanıp 1ml striplerin üzerine koyuldu ve 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. Her bir stripin üzerine substrat solüsyonu koyulup karanlıkta 30 dakika bekletildi, reaksiyon stop solüsyonuyla durduruldu.



Şekil 1: Western Blot Aparatı

3.2.7. *G.vaginalis* Biyotiplerinin Adhezyonu :

3.2.7.1 Epitel Hücrelerinin Hazırlanması :

Sağlıklı kadınlardan toplanan hücreler pamuklu eküvyonun vajinal mukozaya sürülmesiyle elde edildi. Eküvyon hemen PBS içine batırıldı. Hücre süspansiyonu daha sonra üç kez PBS ile 500xg de 5 dakika santrüfüjlendi ve 1 ml PBS içerisinde çözüldü bire bir oranda % 0.1 trypan blue ile boyanarak canlı hücre sayısı belirlendi ve ml de 10^5 olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

3.2.7.2 Deneyin Yapılışı :

Bakteriyel adherans çeşitli araştırmacıların bildirdiği yöntemler gerçekleştirildi (38, 51, 52). Sekiz deney tüpü içerisine 10^5 /ml olacak şekilde epitel hücreleri koyuldu. Üzerine her biyotip için 10^8 /ml bakteri koyularak 35°C ' de 100 rpm'de 1 saat inkübe edildi. 5m çapında filtreden (Whatman cellulose filtre paper) süzülerek 5 kez 10^7 'ar ml PBS'le yıkandı. Filtre alımp lam üzerine yapıştırılıp çekildi. Havada kurutuldu ve metanolle tespit edildi. Bir dakika metilen mavisi ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelendi. Her biyotip için dört veya daha fazla bakteri adhere olmuş 20 epitel hücresi sayılarak ortalamaları alındı ve aşağıdaki formüle göre % adhezyon indeksi belirlendi.

$$\% \text{ Adherens İndeksi} = \frac{\text{Total epitel hücre sayısı} \times \text{Epitel hücreye adhere olan bakteri sayısı}}{\text{Total bakteri sayısı}}$$

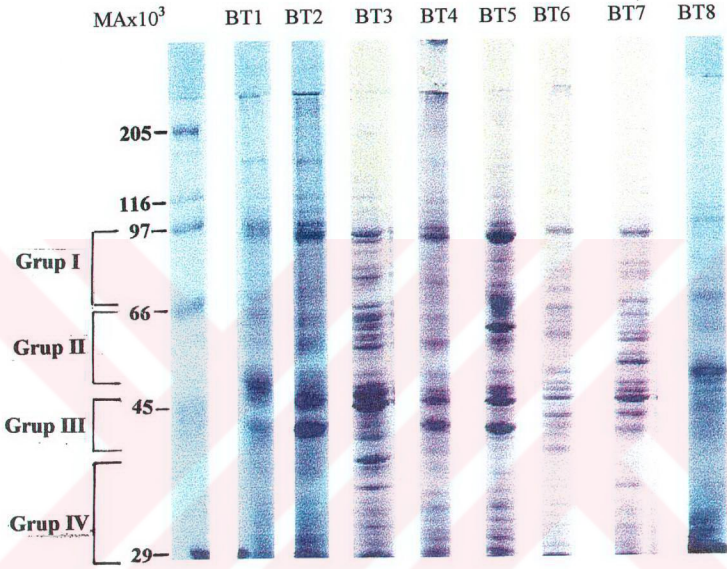
Sonuçlar χ^2 testi ile analiz edildi.

4. BULGULAR

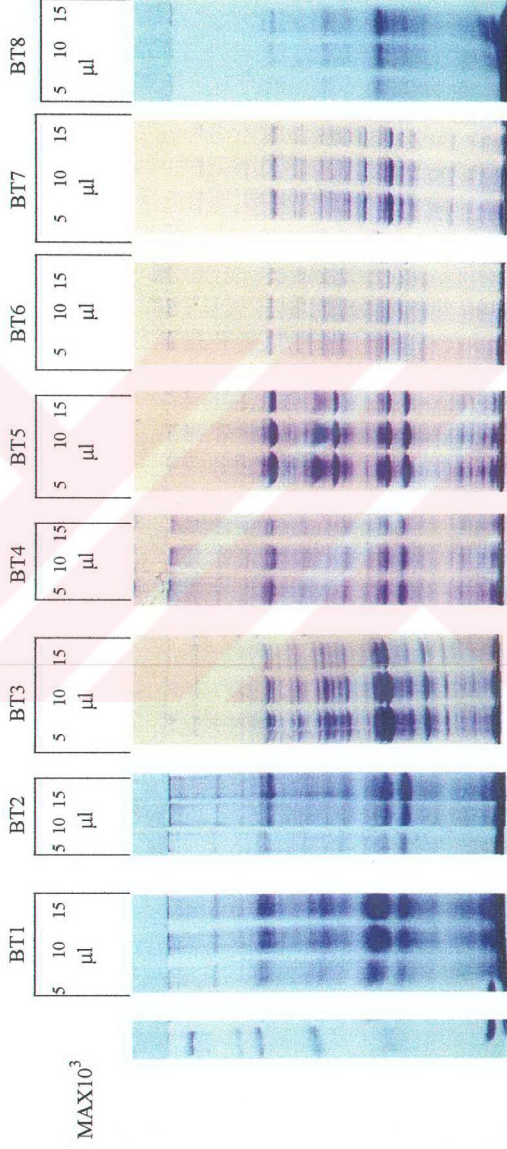
4.1. *G.vaginalis* Biyotiplerinin SDS-PAGE ile Belirlenen Protein Profilleri:

G.vaginalis'in sekiz farklı biyotipinin daha önce belirtilen yöntemle protein lizatları hazırlanarak her bir biyotipin SDS-PAGE ile protein profilleri belirlendi. Proteinlerin yoğun olarak buldukları alanlar esas alındığında (55); genel olarak mevcut protein bantların 4 ana grup içerisinde incelenebileceği görüldü. Buna göre; Grup 1'de moleküler ağırlıkları (MA) 96 kDa ile 72 kDa arasında değişen protein bantlarının bulunmakta, bunlar arasında 93 kDa protein bandı yoğunluğu farklı olmakla beraber bütün biyotiplerde görülmektedir. Grup 2, MA'ları 66 kDa ile 53 kDa değişen proteinler bulunmakta, bunlar arasında 66 kDa ağırlığındaki protein özellikle biyotip 5'de yoğun olarak, diğer biyotiplerde ise değişik yoğunluklarda görülmektedir. Grup 3 MA'ları 55 kDa ile 42 kDa arasında değişen protein bantlarını içermektedir, bunlar arasında 45.5 kDa protein bütün biyotiplerde belirgin olarak görülmektedir. Grup 4 MA'ları 40 kDa altında olan proteinleri içermekte ve hemen hemen bütün biyotiplerde benzerlik göstermektedir (Şekil 2).

Aynı şartlarda hazırlanmasına rağmen jel elektroforezi yapıldığında protein konsantrasyonlarının aynı olmadığı görüldü. Protein miktarını tayin edemediğimiz için transferde kullanacağımız miktarı belirlemek amacıyla herbir kuyucuğa 5-10-15µl protein lizatları koyularak SDS-PAGE uygulandı. Böylece bütün jel için ne kadar protein lizatı kullanacağı belirlendi. Buna göre biyotip 1, 2, 3 ve 5 için 100 µl, biyotip 4 ve 7 için 200 µl, biyotip 6 için 300 µl, biyotip 8 için 400 µl protein lizatı kullanıldı (Şekil 3).



Şekil 2 *G. vaginalis*'in sekiz biyotipinin SDS poliakril amid jel görüntüleri
BT : Biyotip



Şekil 3 *G. vaginalis*'in sekiz biyotipinin farklı konsantrasyonlardaki SDS- poliakrilamid jel görüntüleri

4.2. Western Blot'un Standardizasyonu:

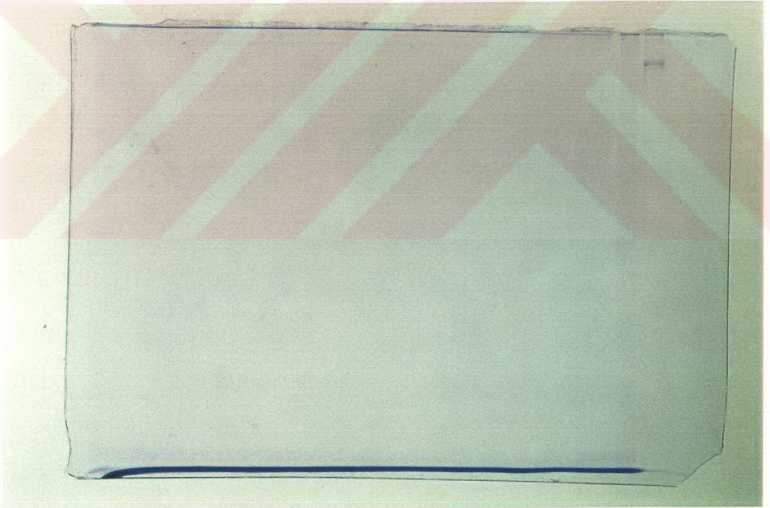
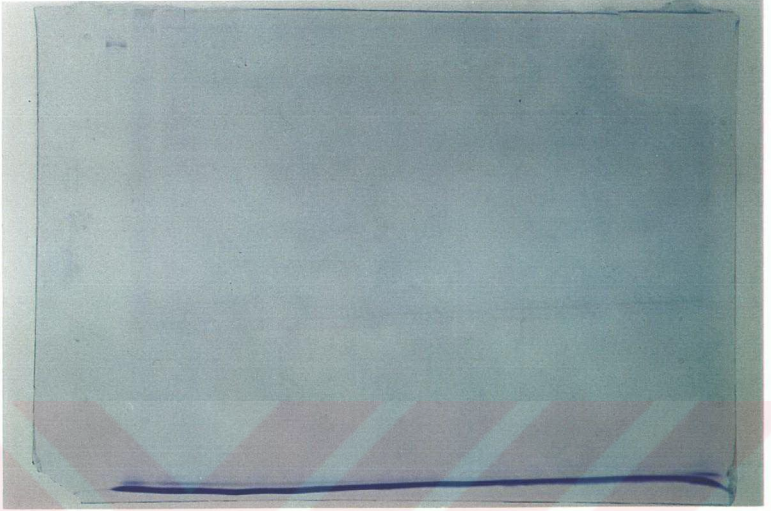
4.2.1. Transferin Belirlenmesi:

Bir gece 30V elektrik akımı verilerek proteinlerin nitroselüloz membrana transferi sağlandı. Bu işlemin başarılı olup olmadığını ve aynı zamanda Moleküler Weight Marker'ı (MWM) belirlemek amacıyla herbir biyotipe ait nitroselüloz membran amido black boyası ile boyandı. Ayrıca jelden proteinlerin ne ölçüde transfer olduğunu belirlemek amacıyla da jel comassie blue boyası ile boyandı.

Genel olarak belirtilen şartlarda gerçekleştirilen blot işlemi ile jeldeki mevcut proteinlerin nitroselüloz membrana aktarıldıkları belirlendi (Şekil 4). Örnek olarak Biyotip 1 ve 7'ye ait jelin transfer sonrası comassie blue ile boyanmış görüntüsü incelendiğinde jelde önemli miktarda proteinin kalmadığı görüldü (Şekil 5).



Şekil 4 *G. vaginalis* biyotiplerine ait proteinlerin nitrolüloz membrana transferinden sonra amido black boyası ile boyanmış görüntüleri



Şekil 5 : *Gardnerella vaginalis* Biyotip 1 ve 7'nin western blot işleminden sonra jelin comasie blue ile boyanmış görüntüsü

4.2.2. Blocking Tampon'un Belirlenmesi:

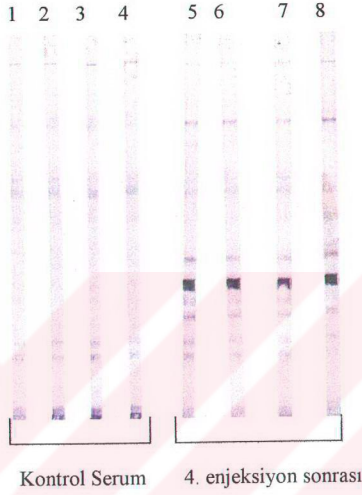
Membrana aktarılan proteinlerin poliklonal serumla reaksiyonu öncesinde gerek nitroselüloz membrandaki diğer kısımların ve gerekse proteinler üzerindeki spesifik olmayan bölgelerin spesifik olmayan bir proteinle doyurulması (bloklama); tranfer edilen proteinlerin rejenerasyonu için uygun şartları belirlemek maksadıyla için blocking tamponu için BSA ve yağsız süt tozu ile birlikte Tween 20'nin değişik konsantrasyonları denendi. Bu maksatla normal tavşan serumu ve Biyotip 1'in 4'üncü enjeksiyonu sonrasında elde edilen tavşan serumu kullanıldığında süt tozu ve BSA arasında immünglobulinlerin spesifik olmayan bağlanmasını önleme açısından önemli bir üstünlük göstermedikleri gözlemlendi (Şekil 6). Daha ucuz ve kolay temin edilebilir olması nedeniyle daha sonraki çalışmalarda % 5 yağsız süt tozu ve % 0,250 Tween 20 içeren blocking tamponu kullanıldı.

4.2.3 Tavşan Poliklonal Antikor Titrasyonu:

En uygun dilüsyonu belirlemek amacıyla tavşan serumunun 1/100, 1/200 ve 1/400'lük dilüsyonları ile western blot yapıldı ve en uygun olarak belirlenen 1/200'lük poliklonal serum dilüsyonu çalışmada kullanıldı (Şekil 7).

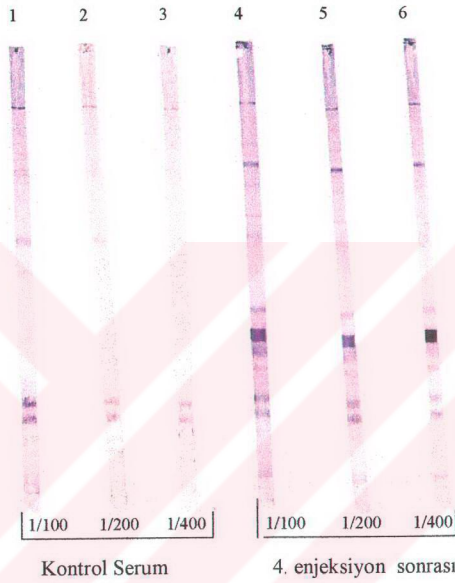
4.2.4 Konjuge Anti-Tavşan Antikor Titrasyonu:

Uygun titreyi belirlemek için 1/2500, 1/5000, 1/10 000'lik dilüsyonlar hazırlanarak western blot yapıldı. En uygun dilüsyon 1/5000 olarak belirlendi (Şekil 7).



Şekil 6 : Blocking tampon'un belirlenmesi

- 1-5 %5 süt tozu + %0.25 Tween 20
- 2-6 %2 süt tozu + %0.1 Tween 20
- 3-7 %3 BSA + %0.1 Tween 20
- 4-8 %3 BSA + %0.250 Tween 20



Şekil 7: Poliklonal serum ve conjugate dilüsyonları

1-4 Conjugate 1/2500

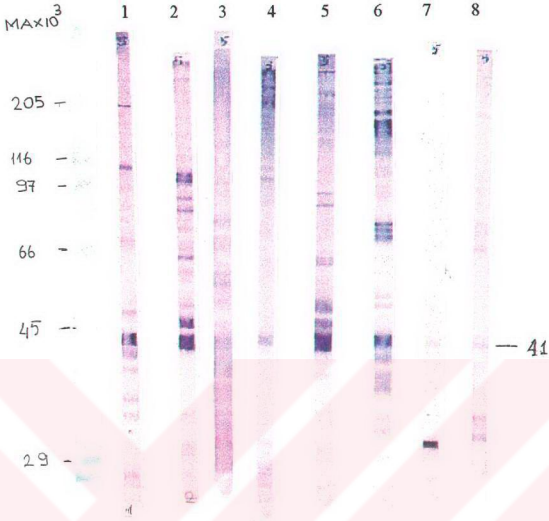
2-5 Conjugate 1/5000

3-6 Conjugate 1/10000

4.3. Biyotiplerin Homolog Serumlarla Western Blot Reaksiyonları:

Her bir biyotipin nitroselüloz membrana aktarılmış proteinleri ile tavşanda bu proteinleri içeren canlı bakteri vermek suretiyle oluşturulan hiperimmün homolog serumların reaksiyonları western blot yöntemiyle incelendi. Buna göre, genel olarak hemen hemen her biyotipde belirlenen çok sayıdaki proteinin hepsinin eşit düzeyde antijenik özellikte olmadığı; ayrıca her biyotipin göreceli olarak aynı düzeyde antijenik yapı içermediği görüldü (Şekil 8). Nitekim, biyotip 1, 2, 5 ve 6 da hiperimmün serumla reaksiyona giren (dominant) protein bantları gözlenirken biyotip 4, 7 ve 8'de saptanabilen bant sayısının çok az veya zayıf düzeyde olduğu görüldü.

Reaksiyon düzeyi biyotipler arasında göreceli olarak farklı olmasına rağmen 41 kDa ağırlığındaki bantın bütün biyotiplerde spesifik serumla reaksiyona giren tek ortak protein olduğu belirlendi. Biyotipler arasında biyotip 1, 2, 5 ve 6 ile elde edilen hiperimmün serumun 41 kDa'lık protein bandı ile güçlü bir reaksiyon verdiği, buna mukabil biyotip 4, 7 ve 8'in reaksiyonlarının zayıf olduğu görüldü (Şekil 8). Ayrıca, başta biyotip 2 ve 5 olmak üzere biyotip 1 de de ikinci derecede güçlü reaksiyon veren 45.5 kDa'lık protein bandı biyotip 3, 4, 6, 7 ve 8 de belirlenemedi (Şekil 8).



Şekil 8 : *G. vaginalis*'in sekiz biyotip homolog serumlarıyla verdiği western blot reaksiyonları. 1) Biyotip 1, 2) Biyotip 2, 3) Biyotip 3, 4) Biyotip 4, 5) Biyotip 5, 6) Biyotip 6, 7) Biyotip 7, 8) Biyotip 8,

4.4. Biotiplerin Homolog ve Diğer Biotiplere Ait Poliklonal Antiserumlarla Western Blot Reaksiyonları:

4.4.1 Biotip 1'in Western Blot Reaksiyonları

a. Homolog antiserumla verdiği reaksiyonlar: Biotip 1 antijenlerinin kontrol tavşan serumu ile reaksiyonunda MA'sı 145, 74, 32 ve 30 kDa olan dört bant görülmektedir (Şekil 9). Kontrol serumla reaksiyona giren bu proteinler homolog hiperimmün serumların hepsiyle de reaksiyon vermektedir (strip 2-5). 2. enjeksiyon sonucunda elde edilen serumla başlamak üzere Biotip 1'in yapısal proteinleri arasında 41 kDa'lık proteinin tavşanda belirgin olarak immünooglobulin oluşturduğu görülmektedir (strip 2-5). 3. ve 4. immünizasyon sonrası ise MA'sı 145, 107- 41, 37.5, 30, 32 kDa olan proteinlerin reaksiyon verdiği görülmektedir (Şekil 9, strip 3-5).

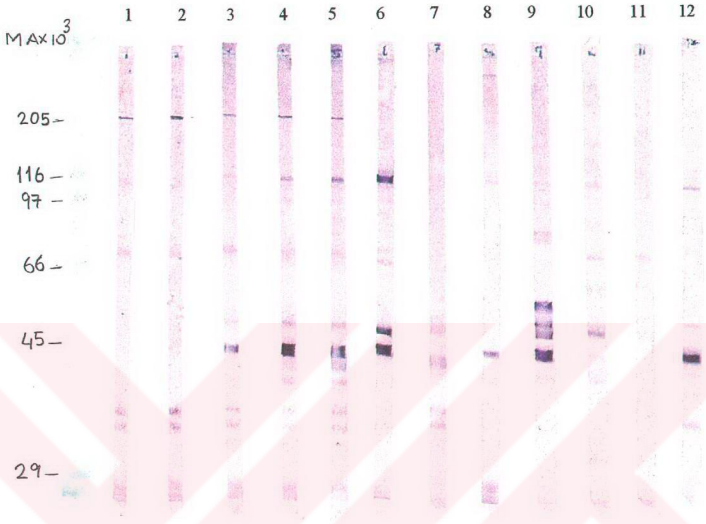
b. Diğer biotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Biotipler arasında antijenik benzer yapıların belirlenebilmesi için her bir biyotipin 4'üncü enjeksiyonu ile elde poliklonal serumlar nitrosetülöz membrana aktarılmış bir diğer biyotipin antijenleri ile karşılaştırıldı.

Bu maksatla, Biotip 1 proteinlerini içeren stripler Biotip 2'nin 4'üncü kez enjeksiyonu ile elde edilen hiperimmün serumla reaksiyona sokuldu. Biotip 2 antiserumunun Biotip 1'in 107, 66, 45.5 ve 41 kDa'lık proteinleri ile reaksiyon verdiği görüldü. Bunların dışında 145 kDa ve 74 kDa proteinlerinin de reaksiyon verdiği; ancak bunların kontrol serum ile de belirlendiği görülmektedir (Şekil 9).

Aynı şekilde; Biotip 3'ün poliklonal serumuyla olan reaksiyonda 45.5, 37.5, 32 kDa ve 30 kDa'lık bantlar görülürken, biyotip 4'ün serumuyla sadece 41 kDa'lık protein bantının reaksiyon verdiği görüldü. Biotip 5'in serumuyla 83, 54, 50, 48 ve 41 kDa'lık bantlar; Biotip 6'nın serumuyla 48 ve 74 kDa ağırlığında iki bant; Biotip 7'nin serumuyla sadece 74 kDa ağırlığındaki bant; Biotip 8'in serumuyla ise 107, 48, 41 ve 30 kDa ağırlığında bantlar görülmüştür (Tablo 4) (Şekil 9).

Tablo 4 : *G. vaginalis* Biyotip 1'in Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinleri

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 1
Biyotip 1	K: 145, 74, 32, 30 1: 145, 74, 32, 30 2: 145, 74, 41 3: 145, 107, 41, 48, 35, 37.5, 30, 32 4: 145, 107, 41, 48, 37.5, 35, 30, 32
Biyotip 2	107, 66, 45, 41
Biyotip 3	45.5, 37.5, 32, 30
Biyotip 4	41
Biyotip 5	83, 54, 50, 48, 41
Biyotip 6	48, 74
Biyotip 7	74
Biyotip 8	107, 48, 41, 30



Şekil 9 :*G. vaginalis* BT-1 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 8'e ait serumla reaksiyon

4.4.2. Biyotip 2'nin Western Blot Reaksiyonları

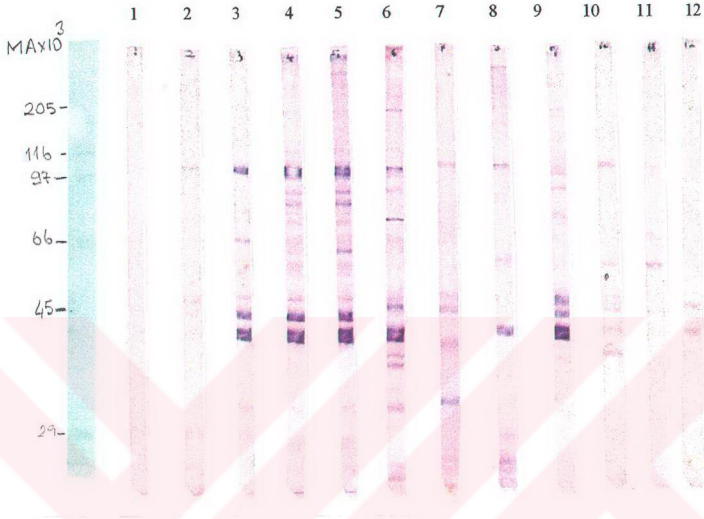
a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Biyotip 2 proteinleri ile kontrol serumun reaksiyon vermediği görüldü (Şekil 10). Biyotip 2 ile yapılan 1. immünizasyon sonrası 107 ve 50 kDa'lık, 2. immünizasyon sonrası 107, 72, 50, 45.5, 41 kDa'lık bantların reaksiyon verdiği; 3. ve 4. immünizasyon sonrası elde edilen serumların hemen hemen aynı proteinlerle (107, 93, 83, 74, 72, 66, 50, 45.5, 41 kDa) reaksiyon verdiği görüldü. 4. immünizasyondan sonra reaksiyon veren bantlar daha belirgin olup 107, 93, 83, 66, 45.5 ve 41 kDa'lık proteinler daha dominant olarak görülmektedir.

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Biyotip 2'nin antijenleriyle biyotip 1'in poliklonal serumunun western blot analizi sonucu 145, 107, 93, 74, 50, 48, 41, 36, 35, 30 kDa'lık toplam 9 bant belirlendi. Bunlar arasında; özellikle 145, 74, 48, 41, 36, 35, 30 kDa'lık proteinlerin belirgin olarak reaksiyon verdiği; 107, 74, 48, 41 ve 35 kDa'lık proteinlerin biyotip 1 antijenlerinin homolog serumuyla verdiği reaksiyondaki bantlarla aynı olduğu görüldü (Tablo 5) (Şekil 10).

Aynı şekilde yapılan analizlerde, Biyotip 3'e ait serumlarla olan reaksiyonda 107, 50, 47, 37.5, 30 kDa'lık 5 bant; Biyotip 4'ün serumuyla olan reaksiyonda 107, 64, 41 kDa 'lık bantlar; Biyotip 5'in serumuyla 107, 93, 50, 47, 41 kDa ağırlığındaki protein bantların reaksiyon verdiği; bu bantların hepsinin homolog serumla olan reaksiyonlarda da belirlenebildiği görüldü. Biyotip 6' ya ait serumla reaksiyonun zayıf olduğu; sadece 107, 64, 50, 41 ve 36 kDa'lık proteinlerin reaksiyon verdiği görüldü. Aynı şekilde Biyotip 7 ve 8'in poliklonal serumlarıyla gerçekleştirilen reaksiyonlarda zayıf düzeyde sinyal elde edildiği; biyotip 7'nin serumuyla tek bant (64 kDa), biyotip 8'in serumuyla 50 ve 41 kDa'lık iki protein bantın reaksiyon verdiği belirlendi (Tablo 5) (Şekil 10).

Tablo 5 : *G. vaginalis* Biyotip 2'nin Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 2
Biyotip 1	145, 107, 93, 74, 50, 48, 41, 36, 35, 30
Biyotip 2	K: -- 1: 107, 50 2: 107, 72, 50, 45, 41 3: 107, 93, 83, 66, 50, 45, 41 4: 107, 93, 83, 74, 72, 66, 50, 41
Biyotip 3	107, 50, 47, 37.5, 30
Biyotip 4	107, 64, 41
Biyotip 5	107, 93, 50, 47, 41
Biyotip 6	107, 64, 50, 41, 36
Biyotip 7	64
Biyotip 8	50, 41



Şekil 10 :*G. vaginalis* BT-2 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 8'e ait serumla reaksiyon

4.4.3. Biotip 3'ün Western Blot Reaksiyonları

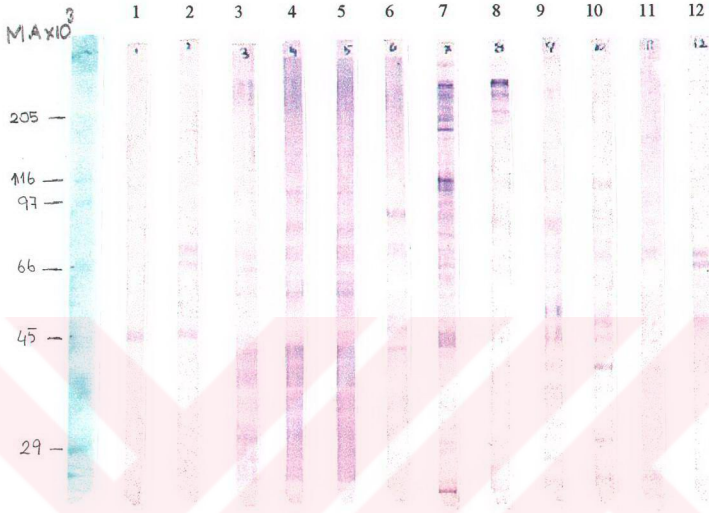
a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Kontrol serumla 45.5 kDa'da tek bir protein bandı belirlendi. 1. immünizasyon sonrası 72, 66, 45 kDa 3 protein bandı, 2. immünizasyon sonrası 45.5 kDa'luk bant çok zayıf olarak görülürken 1. immünizasyona ilave olarak zayıf reaksiyon veren 62 kDa ağırlığında bir protein bandı görüldü. 3. immünizasyon sonrası 93, 74, 66, 72, 62, 41 kDa'lık; 4. immünizasyon sonrası 93, 74, 72, 64, 62, 41 kDa'lık proteinlerin reaksiyon verdiği; 41 kDa ağırlığından daha küçük protein bantlar tek tek belirlenemedi.

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Biotip 3'ün antijenleriyle Biotip 1'in poliklonal serumu karşılaştırıldığında 83, 66, 50, 48, 45.5 kDa ağırlığında 5 proteinin reaksiyon verdiği görüldü (Tablo 6) (Şekil 11).

Biotip 2 ile elde edilen serumla 107, 93, 83, 74,66, 47 kDa'lık 6 protein bandı görülürken Biotip 4'ün serumuyla reaksiyon veren protein bandı görülmedi. Biotip 5'in serumuyla 50 ve 47 kDa'lık 2 protein bandı belirgin olarak görülürken 37.5 ve 35 kDa'lık proteinlerin zayıf düzeyde reaksiyon verdiği görüldü. Diğer taraftan, Biotip 6'nın serumuyla 47, 48 ve 37.5 kDa'lık bantlar belirgin olarak görülürken diğerlerinin (107, 66 kDa) zayıf sinyal verdiği; aynı şekilde Biotip 7'nin serumuyla 66 kDa'lık zayıf bir bant görülürken Biotip 8'in serumuyla 66, 64, 48, 42 kDa'lık proteinlerin reaksiyon verdiği belirlendi (Tablo 6) (Şekil 11).

Tablo 6 : *G. vaginalis* Biyotip 3'ün Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 3
Biyotip 1	83, 66, 50, 48, 45.5
Biyotip 2	107, 93, 83, 74, 66, 47
Biyotip 3	K: 45.5 1: 72, 66, 45.5 2: 72, 66, 62, 41 3: 93, 74, 66, 72, 62, 41 4: 93, 74, 72, 64, 62
Biyotip 4	--
Biyotip 5	50, 47, 37.5, 35
Biyotip 6	107, 66, 48, 47, 37.5, 50
Biyotip 7	66
Biyotip 8	66, 64, 48, 47



Şekil 11: *G. vaginalis* BT-3 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 8'e ait serumla reaksiyon

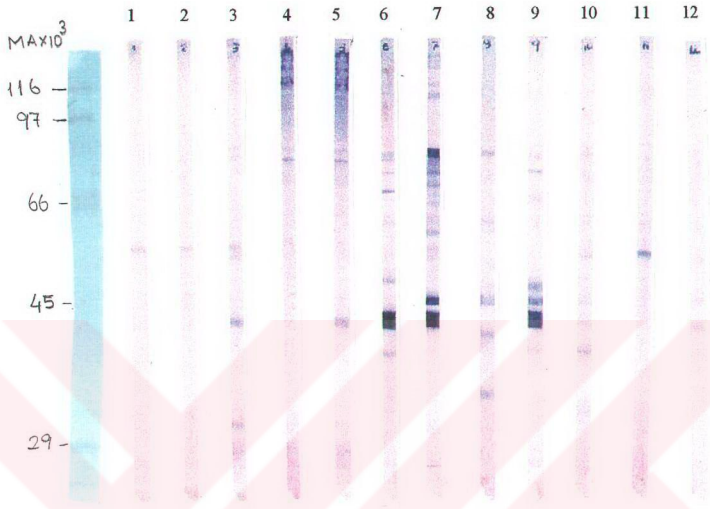
4.4.4. Biyotip 4'ün Western Blot Reaksiyonları:

a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Biyotip 4 proteinleriyle homolog serumun oldukça zayıf düzeyde reaksiyon verdiği görüldü. Kontrol serumla reaksiyonda 66 kDa'lık tek bir bant görülürken 1. immünizasyon sonrası spesifik immünglobulin gelişmediği; 2. immünizasyon sonrasında ise 64, 41 ve 29 kDa'lık proteinlere karşı antikor geliştiği görüldü (Tablo 7) (Şekil 12). Ancak, 3. enjeksiyon sonrası elde edilen serumun bu protein bantları ile reaksiyon vermediği, sadece 97 kDa'nın üstünde ağırlığa sahip bir proteinle reaksiyon verdiği; 4. immünizasyon sonrası elde edilen serumun ise bunlara ilaveten sadece 41 kDa'lık proteinle reaksiyon verdiği görüldü (Tablo 7) (Şekil 12).

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Biyotip 4'ün antijenleriyle diğer biyotiplere karşı oluşturulan antikorların reaksiyonları incelendiğinde; Biyotip 1 le elde edilen poliklonal serumun Biyotip 4 proteinleri arasında 107, 93, 83, 54, 41 ve 35 kDa'lık 6 proteinle reaksiyon verdiği, bunlar arasında 41 kDa'lık proteinin diğerlerine göre daha yoğun olarak sinyal verdiği görüldü (Tablo 7) (Şekil 12). Benzer şekilde, Biyotip 2'nin serumuyla da çok sayıda Biyotip 4 proteinlerinin (107, 93, 83, 74, 45.5, 41) 107, 45.5 ve 41 kDa) reaksiyon verdiği görüldü. Diğer taraftan Biyotip 3'e ait serumla 107, 45.5, 37.5, 30 kDa'lık, biyotip 5'in serumuyla 93, 48, 45, 41 kDa'lık protein bantları belirlenirken Biyotip 4 proteinlerinin Biyotip 6'nın serumuyla çok zayıf reaksiyon verdiği (64, 45.5, 41, 35 kDa'lık proteinler); Biyotip 7'nin serumuyla sadece 64 kDa'lık; Biyotip 8'in serumuyla da 2 proteinin (41, 45.5 kDa) çok zayıf düzeyde reaksiyon verdiği görüldü (Tablo 7) (Şekil 12).

Tablo 7 : *G. vaginalis* Biyotip 4'ün Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 4
Biyotip 1	107, 93, 83, 54, 41, 35
Biyotip 2	107, 93, 83, 74, 45.5, 41
Biyotip 3	107, 45, 37.5, 30
Biyotip 4	K: 66 1: 66 2: 66, 64, 41, 29 3: -- 4: 41
Biyotip 5	41, 45.5, 48
Biyotip 6	35, 41, 45.5, 64
Biyotip 7	64
Biyotip 8	41, 48



Şekil 12: *G. vaginalis* BT-4 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 8'e ait serumla reaksiyon

4.4.5. Biyotip 5'in Western Blot Reaksiyonları:

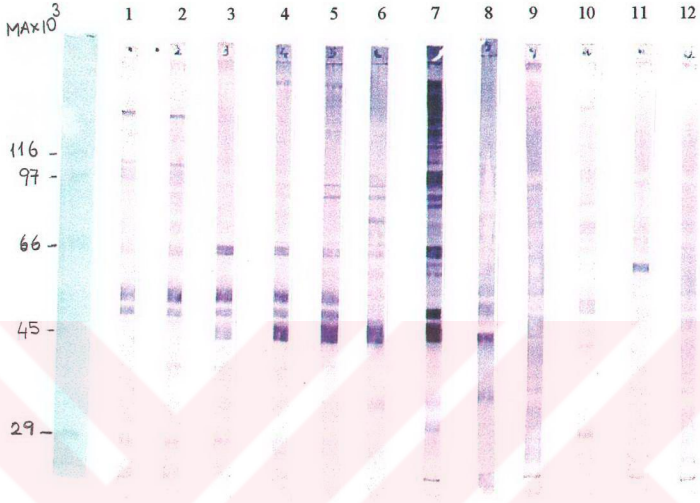
a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Biyotip 5 proteinleri ile kontrol serumun reaksiyonunda 145, 107, 66, 50, 45, 29 kDa olmak üzere 6 protein bandının belirlendiği; bunlar arasında 145, 50 ve 45.5 kDa ağırlığındaki bantların daha yoğun sinyal verdiği görüldü (Tablo 8) (Şekil 13). Biyotip 1'in ilk enjeksiyonu sonrasında elde edilen serum kullanıldığında kontrol serumun reaksiyon verdiği proteinler tekrar belirlendi; ancak 2. immünizasyondan sonra 145, 107 ve 29 kDa'lık bantların kaybolduğu, buna mukabil 66 kDa'lık bantın yoğunluğunun daha da arttığı görüldü. Ayrıca, 50 ve 45.5 kDa'luk bantların yoğunluklarının aynı düzeyde devam ettiği, yeni olarak da 41 kDa'lık protein bandının reaksiyon verdiği görüldü. 3'üncü immünizasyonda sinyal veren bant sayısı ve düzeyi değişmezken 4'üncü enjeksiyondan sonra elde edilen serumun 3'üncü immünizasyondaki bantlara ilave olarak 96 ve 89 kDa'lık proteinlerle de reaksiyon verdiği belirlendi (Tablo 8) (Şekil 13).

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Tablo 8 de özetlendiği gibi Biyotip 1'e ait poliklonal serum ile reaksiyonda Biyotip 5 proteinleri içerisinde 93, 83, 76, 66, 62, 50, 41, 42 ve 32 kDa'lık protein bantlarının belirlendiği görüldü (Şekil 13). Bunlar arasında MA'sı 41 kDa olan proteinin diğerlerinden daha yoğun sinyal verdiği görüldü.

Benzer şekilde, Biyotip 2'nin poliklonal serumuyla olan reaksiyonda da 93, 83, 80, 74, 66, 64, 62, 45.5, 41, 32, 30 kDa proteinlerinin yoğun bir sinyal verdiği belirlendi. Diğer taraftan Biyotip 3'ün serumuyla reaksiyonda 50, 45.5 ve 37.5 ve 32 kDa'luk protein bantları görülürken Biyotip 4, 6 ve 8 ile elde edilen hiperimmün serumlarla Biyotip 5 proteinlerinin zayıf bir reaksiyon verdiği, bunlar arasında sadece Biyotip 7 antiserumu ile 64 kDa'luk ağırlığında tek bir protein bandının sinyal verdiği görüldü (Tablo 8) (Şekil 13).

Tablo 8 : *G. vaginalis* Biyotip 5'in Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 5
Biyotip 1	93, 83, 76, 66, 62, 50, 41, 32
Biyotip 2	93, 83, 80, 74, 66, 64, 62, 45.5, 41, 32, 30
Biyotip 3	50, 45.5, 37.5, 32
Biyotip 4	74, 45.5, 37.5
Biyotip 5	K: 145, 107, 66, 50, 45.5, 29 1: 145, 107, 66, 50, 45.5, 29 2: 66, 50, 45.5, 41 3: 66, 50, 45, 41 4: 96, 89, 66, 50, 45.5, 41
Biyotip 6	45.5, 37.5, 74
Biyotip 7	64
Biyotip 8	45.5, 50



Şekil 13: *G. vaginalis* BT-5 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 8'e ait serumla reaksiyon

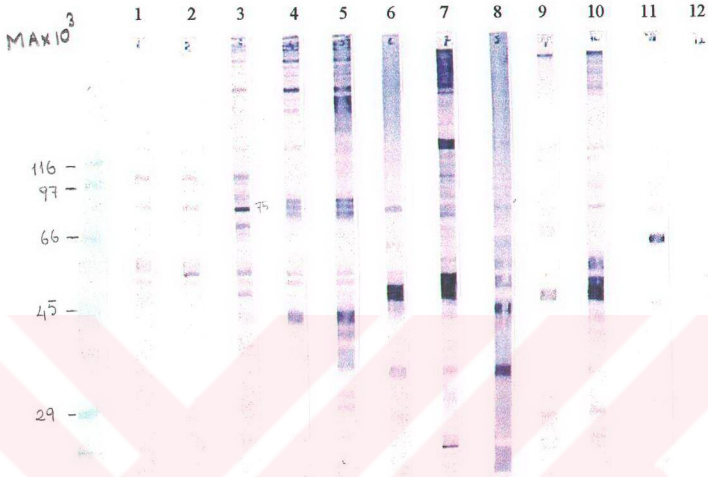
4.4.6. Biyotip 6'nın Western Blot Reaksiyonları:

a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Biyotip 6 proteinlerinin kontrol serum ile reaksiyonunda 83, 74, 52, 48 kDa ağırlığındaki 4 protein bandı belirlendi. 1'inci enjeksiyon sonrasında elde edilen serumla reaksiyonda ise 50 kDa'lık protein belirlenebilirken, kontrol serumla reaksiyon veren 48 ve 52 kDa'lık proteinlerin sinyal vermediği görüldü (Tablo 9) (Şekil 14). Ancak, 2. immünizasyon sonrası elde edilen antiserumun 83, 76, 74, 66, 50, 48 kDa'lık protein bantlarıyla reaksiyon verdiği; 3'üncü immünizasyonda 73, 74, 75 ve 41 kDa'lık 4 bantın yoğun sinyal verdiği, 4'üncü enjeksiyon sonrası elde edilen antiserumla da 3'üncü enjeksiyon antiserumla elde edilen bantlara ilave olarak 37,5, 35, 30 kDa'lık proteinlerin reaksiyon verdiği belirlendi (Tablo 9) (Şekil 14).

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Biyotip 6 proteinlerinin Biyotip 1'in 4'üncü enjeksiyonu ile elde edilen antiserumla reaksiyonunda MA'sı 74, 47, 45,5 ve 32 kDa olan protein bantları belirlendi (Tablo 9) (Şekil 14). Benzer şekilde, Biyotip 2 antiserumuyla Biyotip 6 proteinleri arasında reaksiyon veren bantların 107 ve 41 kDa; daha zayıf olarak da 83, 74, 73, 50, 41, 32, 29 kDa proteinleri olduğu görüldü. Diğer taraftan, Biyotip 3 antiserumuyla 41 ve 32 kDa'lık protein bantları yoğun olarak sinyal verirken 47 ve 50 kDa proteinlerinin de belirlenebilirken Biyotip 4 antiserumuyla sadece 47 kDa proteinin yoğun olarak belirlendiği; Biyotip 5 antiserumuyla yine 47 ve 50 kDa'lık proteinlerin reaksiyon verdiği görüldü. Biyotip 7 antiserumuyla Biyotip 6 proteinleri arasında sadece 66 kDa'nın yoğun bir sinyal verdiği bant belirlenirken Biyotip 8 antiserumuyla kayda değer reaksiyon veren protein görülmedi (Tablo 9) (Şekil 14).

Tablo 9 : *G. vaginalis* Biyotip 6'nın Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 6
Biyotip 1	74, 50, 47, 45.5, 32
Biyotip 2	107, 83, 73, 52, 47, 41
Biyotip 3	50, 47, 41, 32
Biyotip 4	47
Biyotip 5	74, 50, 47, 41
Biyotip 6	K: 83, 74, 52, 48 1: 83, 74, 50 2: 83, 76, 74, 64 3: 41, 48, 50, 73, 74, 75 4: 75, 74, 73, 50, 48, 41, 37.5, 35, 30, 29
Biyotip 7	66
Biyotip 8	--



Şekil 14: *G. vaginalis* BT-6 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 8'e ait serumla reaksiyon

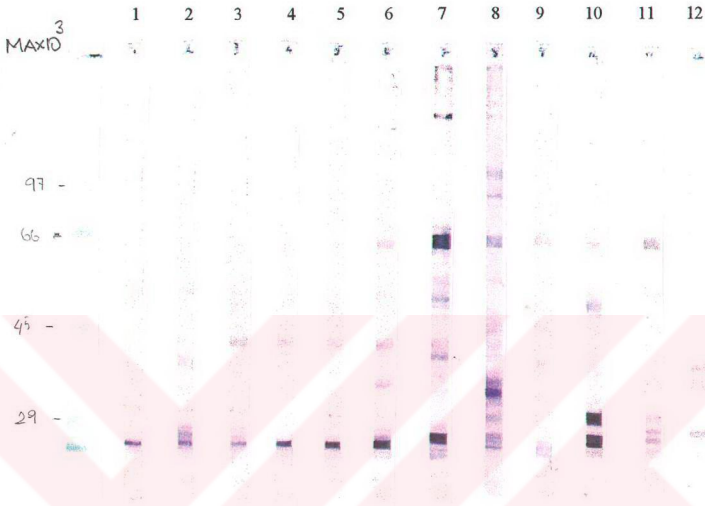
4.4.7. Biyotip 7'nin Western Blot Reaksiyonları:

a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Biyotip 7 proteinlerinin kontrol serum ile reaksiyonunda herhangi bir sinyal görülmezken 1'inci enjeksiyon sonrası elde edilen antiserumla sadece 37.5 kDa ağırlığında bir proteinin reaksiyon verdiği; 2, 3 ve 4'üncü enjeksiyonlarda elde edilen antiserumlarla reaksiyonlarda ise sadece 41 kDa ağırlığındaki proteinin belirlenebildiği görüldü (Tablo 10) (Şekil 15; strip 3-5).

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar: Biyotip 1'e ait antiserum ile Biyotip 7 antijenleri karşılaştırıldığında 66, 41, 32 kDa ağırlığında 3 bant; Biyotip 2 antiserumuyla yoğun olarak başta 145 ve 66 kDa olmak üzere 50, 41 ve 37.5 kDa'lık protein bantının sinyal verdiği görüldü. Aynı şekilde, Biyotip 3 antiserumuyla 107, 93, 66, 45.5, 41,37.5 kDa'lık protein bantları belirlenebilirken Biyotip 4 antiserumuyla 66 kDa protein bantının reaksiyonu görüldü. Benzer şekilde, Biyotip 5 antiserumuyla reaksiyonda 66, 50, 29 kDa ağırlığında 3 protein bandı belirlenirken bunlar arasında 29 kDa ağırlığındaki proteinin göreceli olarak daha yoğun sinyal veren protein olduğu görüldü. Biyotip 6 antiserumuyla reaksiyonda ise 66, 29 ve 27 kDa proteinlerinin sinyal verdiği; Biyotip 8 antiserumuyla da 37.5 ve 27 kDa proteinlerinin belirlendiği görüldü (Tablo 10) (Şekil 15).

Tablo 10 . *G. vaginalis* Biyotip 7'nin Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testlerinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 7
Biyotip 1	66, 41
Biyotip 2	145, 66, 50, 41, 67.5
Biyotip 3	107, 93, 66, 41, 45.5, 37.5
Biyotip 4	66
Biyotip 5	66, 50, 29
Biyotip 6	66, 29, 27
Biyotip 7	K: 37.5 1: 41 2: 41 3: 41 4: 41
Biyotip 8	37.5, 27



Şekil 15 :*G. vaginalis* BT-7 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1.immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4.immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon

4.4.8 Biyotip 8'in Western Blot Reaksiyonları:

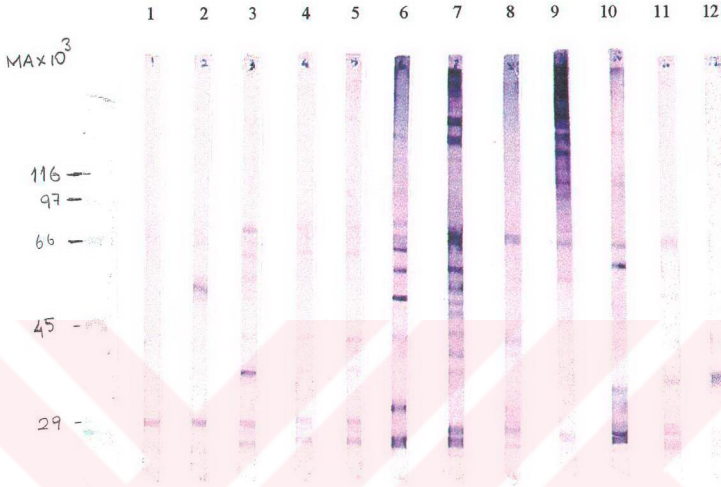
a. Homolog antiserum ile verdiği reaksiyonlar: Biyotip 8 proteinleriyle kontrol serumun reaksiyonunda 29 kDa'lık tek bir proteinin sinyal verdiği görüldü (Tablo 11) (Şekil 16; strip 1). Biyotip 8'in 1'inci enjeksiyonu sonrasında elde edilen antiserumuyla da ayrıca 50 kDa proteinin belirlendiği, ancak bunun 2'inci enjeksiyon sonrası antiserumla reaksiyon vermediği, bunun yerine 74 ve 35 kDa proteinlerinin belirlendiği görüldü (Şekil 16; strip 3). Diğer taraftan, 3 ve 4'üncü enjeksiyonlar sonrası antiserumlarla reaksiyonda Biyotip 8 proteinleri arasında zayıf olarak 64 ve 41 kDa proteinlerinin reaksiyon verdiği görüldü (Tablo 11) (Şekil 16; strip 4-5).

b. Diğer biyotiplerin antiserumlarıyla verdiği reaksiyonlar:

Biyotip 8 homolog antiserumunun nitrozelüloz membranda düşük sayı ve yoğunlukta proteinle reaksiyon vermesine rağmen Biyotip 1 heterolog antiserumuyla 74, 64, 58, 50, 48, 41, 32 kDa ağırlığındaki proteinler düzeyinde; yine Biyotip 2 antiserumuyla benzer proteinlerin sinyal verdiği, bunlar arasında da özellikle 66 kDa ağırlığındaki bantın sinyalinin yoğun olduğu görüldü (Tablo 11) (Şekil 16; strip 6-7). Buna karşın, Biyotip 8 proteinlerinin heterolog Biyotip 3 antiserumuyla reaksiyonunda 66 ve 41 kDa; Biyotip 4 antiserumuyla sadece 66 kDa; Biyotip 5 antiserumuyla ise 66, 62, 32 ve 30 kDa proteinleri sinyal verdiği belirlendi. Benzer şekilde Biyotip 6 antiserumuyla 66, 41 ve 35 kDa proteinleri reaksiyon verirken Biyotip 7' antiserumuyla belirgin olarak sadece 35 kDa'lık bir proteinin reaksiyon verdiği görüldü (Tablo 11) (Şekil 16; strip 11-12).

Tablo 11 . *G. vaginalis* Biyotip 8'in Homolog ve Heterolog Antiserum Kullanılarak Yapılan Western Blot Testlerinde Antijenik Olduğu Belirlenen Proteinler

Poliklonal Antikor	Antijen Biyotip 8
Biyotip 1	74, 66, 58, 50, 41, 30
Biyotip 2	66, 58, 54, 50, 48, 41,37.5
Biyotip 3	41, 66
Biyotip 4	66
Biyotip 5	66, 62
Biyotip 6	35, 41, 66
Biyotip 7	35, 41
Biyotip 8	K: 29 1: 50 2: 35, 74 3: 64, 41, 35 4: 64, 41, 35



Şekil 16: *G. vaginalis* BT-8 homolog ve diğer biyotiplere ait poliklonal serumlarla western blot reaksiyonları

- 1) Kontrol serum, 2) 1. immünizasyon sonrası,
- 3) 2. immünizasyon sonrası, 4) 3. immünizasyon sonrası,
- 5) 4. immünizasyon sonrası homolog poliklonal serumla reaksiyon
- 6) Biyotip 1'e ait serumla reaksiyon
- 7) Biyotip 2'ye ait serumla reaksiyon
- 8) Biyotip 3'e ait serumla reaksiyon
- 9) Biyotip 4'e ait serumla reaksiyon
- 10) Biyotip 5'e ait serumla reaksiyon
- 11) Biyotip 6'ya ait serumla reaksiyon
- 12) Biyotip 7'ye ait serumla reaksiyon

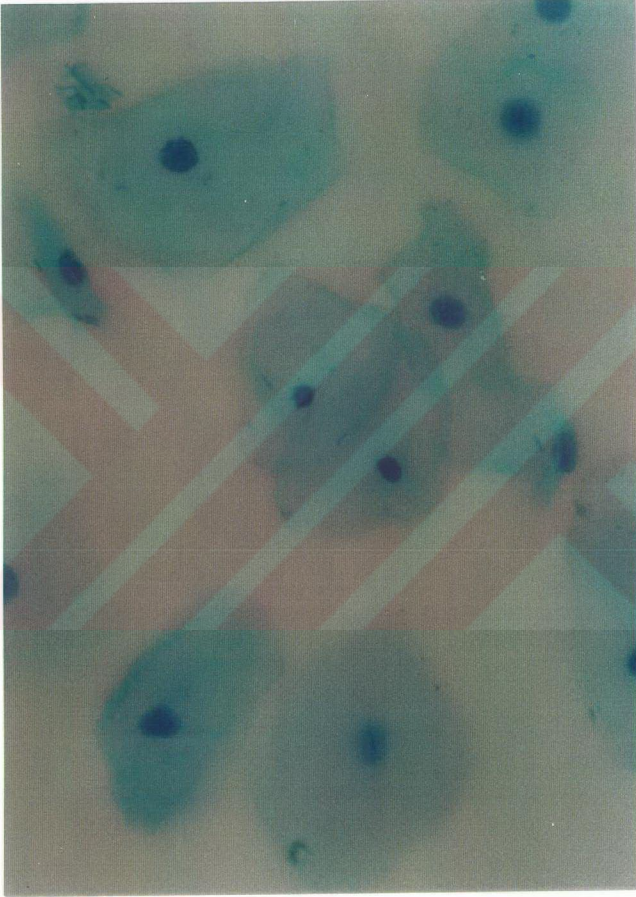
4.5. *G.vaginalis* Biyotiplerinin Vajinal Epitel Hücrelere Adherensi :

G.vaginalis biyotiplerinin adherens indekslerini belirlemek amacıyla her bir biyotip için 4 veya daha fazla bakteri yapışmış 20 epitel hücresi sayılıp ortalaması alınarak % adherens indeksi formülüne göre her bir biyotipin adherens indeksleri belirlendi. Biyotiplerin % adhezyon indekslerine bakıldığında ; biyotip 1'in 18, biyotip 2'nin 27, biyotip 3'ün 14 , biyotip 4'ün 5, biyotip 5'in 24, biyotip 6'nın 36, biyotip 7'nin 4, biyotip 8'in 8 olduğu belirlendi (Tablo 12)..

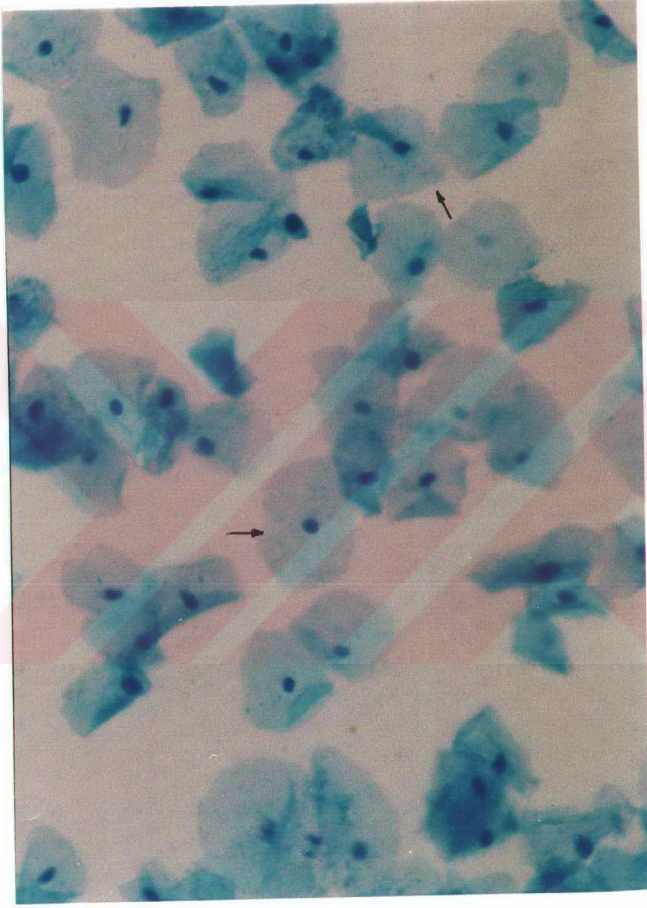
Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında biyotiplerin adherens indeksleri arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. ($\chi^2=64.78$, $p:0.00000$). Sekiz biyotip adhezyon indekslerinin yakınlıklarına göre gruplandırıldığında Biyotip 1,2,3,5 ve 6 bir grup altında toplanıp adherensleri arasında istatistiksel olarak fark görülmedi. ($\chi^2 =15.95$, $p:0.00312219$). Aynı şekilde biyotip 4,7,8 'in bir grup altında toplanıp adherensleri arasında istatistiksel farkın olmadığı belirlenmiştir. ($\chi^2=1.62$, $p:0.44457244$). Biyotipler adhezyon indexlerine göre sıralandıklarında en iyi adhezyonun biyotip 6 (%36), 2 (%27), 5 (%24) olduğu belirlendi. (Şekil 17-18-19)

Tablo 12: *G.vaginalis* Biyotiplerinin Vajinal Epitel Hücrelerine Olan Adherens İndeksleri

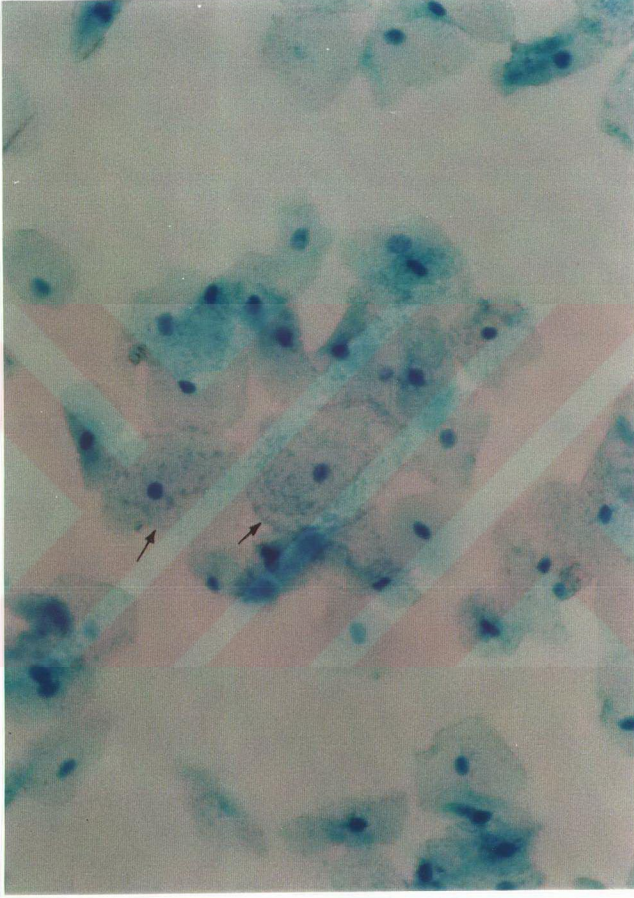
	<i>G.vaginalis</i> Biyotipleri							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Adherens indeksi (%)	18	27	14	5	24	36	4	8



Şekil :17 Sağlıklı kişilerden alınan vaginal epitel hücreleri (Metilen mavisi, x40)



Şekil :18 Vajinal epitel hücrelere *G. vaginalis*'in zayıf adherensi (Metilen mavisi, x 20)



Şekil :19 Vaginal epitel hücrelere *G. vaginalis*'in şiddetli adherensi (Metilen mavisi, x 20)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *G.vaginalis*'in sekiz epidemiyolojik biyotipinin SDS-PAGE ile protein profilleri çıkarılarak; ayrıca, immünodominant protein antijenlerin belirlenmesi maksadıyla bu proteinlerin nitroselüloz membrana aktarıldığı western blot tekniği ile, tavşanda bu biyotiplerin tekrarlanan enjeksiyonlarla elde edilen antiserumlarla reaksiyonlarından elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Ayrıca, yine *G. vaginalis*'in sekiz biyotipinin epitel hücrelerine adherans özellikleri incelenerek sık izole edilen biyotipler ve adherans indeksleri arasında bir korelasyon olup olmadığı irdelendi ve sonuçlar literatür bilgileri ışığında tartışıldı.

G. vaginalis'in biyokimyasal testlerle belirlenen 8 biyotipi ayrı ayrı üretilip SDS-PAGE ile incelendiğinde görünür MA'ları 205 kDa ve 29 kDa arasında değişen sayıca yaklaşık 40 kadar yapısal protein içerdikleri görüldü. Bunlar arasında, muhtemelen dimer veya daha üst protein kuruluşlarının yer aldığı yüksek MA'lı proteinler göz önüne alınmadığında, yapısal dominant proteinlerin MWM'a göre 97 kDa ve 29 kDa arasında yoğunlaştıkları belirlendi.

Bu aralıktaki proteinler, bantların diziliş ve yoğunlaştıkları alanlar baz alınarak dört gruba ayrılarak incelendiğinde (55); birinci grupta 93 kDa ağırlığındaki protein bandının bütün biyotiplerde görülmesi bu bandın biyotipleri ayırmada kullanılamayacağını göstermektedir. Yine aynı şekilde dominant olduğu görülen 2'inci grup proteinler arasındaki 66 kDa; 3'üncü grup proteinler arasında da 45.5 kDa ağırlığındaki protein bandının yine bütün biyotiplerde bulunduğu görülmektedir. Biyotip 3, 4 ve 5' in SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve nitroselüloz membrana aktarılmış protein antijenlerinin normal tavşan serumları ile reaksiyonlarında da bu iki bantın belirlenebilmesi, bunların dışındaki diğer yapısal proteinlerle reaksiyonun görülmemesi bu proteinlerin *Haemophilus* ve *Corynebacterium* gibi *G. vaginalis*'e benzer bakterilerin de yapılarında bulunabilecek, *G. vaginalis*'e spesifik olmayan protein bantları olduğunu düşündürmektedir. Deneysel şartlarda doğrulanamamış olmakla birlikte, bu proteinlerle reaksiyonunun tavşan

serumlarında bu bakteri türlerine karşı spesifik antikorların bulunması sebebiyle olduğu ileri sürülebilir.

Genel olarak, *G. vaginalis*'in SDS-PAGE protein profillerine bakılarak biyotipler arasında proteinlerin yoğunlukları ve sayısı bakımından kısmi farklılıklar görülmektedir; fakat, bu farklılıkların *G. vaginalis* biyotipleri arasında yapısal protein içeriği açısından ayırt etmeye olanak verecek düzeyde olmadığı düşünüldü.

G. vaginalis'in yapısal proteinlerinin antijenik özelliklerini, bunlar arasında immünodominant olanların belirlenebilmesi için; her bir biyotipin ayrı ayrı tekrarlanan enjeksiyonlarla tavşanlara verilerek elde edilen antiserumlarıyla Biyotiplerin SDS-PAGE sonrası nitroselüloz membrana aktarılmış proteinlerinin western blot reaksiyonları uygulandı.

Bunun maksatla, öncelikle antiserum ve reaksiyonun varlığını ortaya koymak için kullanılan AP-konjuge anti-tavşan serumunun (konjugat) uygun dilüsyonlarını belirlemek için yapılan ön çalışmalarda, bizim şartlarımızda antiserumun 1:200, konjugat'ın 1:5000 dilüsyonlarının uygun olduğu belirlendi. Diğer taraftan, nitroselüloz mebrana aktarılan proteinlerin gerek blot şartları altında olumsuz yönde etkilenen antijenik özelliklerinin yeniden düzenlenmesi maksadıyla kullanılan non-iyonik deterjan; gerekse proteinler üzerindeki spesifik olmayan bölgelerinin bloklanması için kullanılan farklı türden protein solüsyonunun ve konsantrasyonlarının seçimi için ön çalışmalar yapıldı. Bizim deney şartlarımızda, bir non-iyonik deterjan olan Tween 20'nin % 0.250 konsantrasyonunun uygun olduğu; yağsız süt tozu ve BSA'nın değişik konsantrasyonlarıyla yapılan immünoblot işlemlerinde de süt tozu ve BSA arasında fark olmadığı belirlendi; ancak ucuz ve kolay bulunur olması nedeniyle blocking buffer süt tozu ile hazırlandı.

Western blotda; *G. vaginalis*'in immünodominant proteinlerini belirlemek için her bir biyotip antijenlerinin homolog antiserumlarıyla reaksiyonları incelendiğinde; özellikle Biyotip 2'de olmak üzere biyotip 1, 2, 3, 5 ve 6'nın yapısal proteinleri arasında birçoğunun spesifik olarak antiserumlarıyla reaksiyon verdiği görüldü. Biyotip 7 ve 8'de antiserumla reaksiyonunun nisbeten zayıf olmasına karşın, bütün biyotiplerde diğer yapısal proteinlere göre MA'sı 41 kDa olan proteinin immünodominant olduğu görülmektedir. 41 kDa ağırlığındaki immünodominant proteinin özellikle Biyotip 1, 2, 5 ve 6 da yoğun sinyal verdiği görüldü. Boustouller ve arkadaşları (52) biyotipleri belirtilmeyen, 23 *G.vaginalis* klinik izolatu ile yaptıkları bir çalışmada spesifik antiserumlarla kullanarak suşlar arasında antijenik varyasyonların olduğunu, fakat hepsinin 41 kDa'luk immünodominant bir protein antijen içerdiklerini bildirmişlerdir.

G. vaginalis yapısal proteinleri arasında, ilginç olarak, coomassi blue ile boyanmış SDS-PAGE profilinde bakterinin yapısında yoğun olarak bulunduğu görülen proteinler arasında görünür MA'sı 41 kDa olan dominant bir protein belirlenememekte; buna mukabil,

antiserumlar içerisinde 41 kDa'ya spesifik güçlü bir poliklonal immünoglobulin varlığı görülmektedir. Antijenlerin antijen işleyen hücrelere prezantasyon şekli başta olmak üzere büyüklükleri ve miktarları açısından B-lenfosit cevap oluşturma düzeyleri farklı olabilmektedir; neticede, dominant proteinlerin ilk bakışta daha antijenik olmaları beklenirken, proteinlerin güçlü B-hücre yanıtı oluşturmaları içerdikleri B-hücre epitoplarıyla oldukça alakalıdır. Bu nedenle, jel elektroforezinde belirlenemeyen, ancak bu epitoplara sahip bir proteinin B lenfositlerini güçlü bir şekilde uyabilmesi beklenebilir.

Diğer taraftan, 41 kDa'lık immünodominant proteinin biyotip spesifik antiserumlarla güçlü reaksiyon vermesi sebebiyle *G.vaginalis*'in birlikte bulunabileceği heterojen bir çevrede, örneğin vajen florası içerisinde, belirlenmesi için bir marker olarak kullanılabilir.

Biyotipler, homolog antiserumlarıyla ve diğer biyotiplere ait (heterolog) antiserumlarla western blotta incelendiğinde; bazı biyotipler arasında ortak olarak görülen (çapraz reaksiyon veren) oldukça fazla antijenik yapı görülmektedir. Biyotip 1 ile geliştirilen antiserumun Biyotip 1 proteinleriyle reaksiyonu incelendiğinde; 3 ve 4'üncü immünizasyondan sonra bantların aynı olması 3'üncü enjeksiyon sonrası mümkün olan tüm proteinlere karşı immünoglobulin geliştiği görüldü. Kontrol serum ile reaksiyonda görülen bantların 4. immünizasyonda da görülmesi bu bantların *G. vaginalis* için spesifik protein bantları olmadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan, spesifik olarak kabul edilen reaksiyonlarda 41 kDa ağırlığındaki proteinin diğerlerine göre dominant olduğu görülmektedir. Biyotip 1 antijenleri diğer biyotiplere ait antiserumlarla karşılaştırmalı olarak reaksiyona sokulduğunda; biyotip 2'nin antiserumuyla verdiği reaksiyonun homolog serumla reaksiyona oldukça benzediği, Biyotip 5'e ait antiserumla karşılaştırıldığında ise homolog serumla elde edilen bantlara ilave olarak 54, 50, 48 kDa ağırlığındaki proteinler yoğun sinyal vermektedir. Biyotipler arasında en çok Biyotip 5 antiserumunun Biyotip 1 proteinlerle çapraz reaksiyon verdiği; buna karşın, Biyotip 1 antiserumunun Biyotip 5 proteinleriyle aynı düzeyde çapraz reaksiyon vermediği belirlendi. Benzer şekilde, Biyotip 2 antiserumunun da diğer antiserumlara göre daha fazla sayıda Biyotip 1 antijenleriyle reaksiyona girdiği görülmektedir. Bu da, Biyotip 1, 2 ve 5 arasında serolojik benzerliğin olduğu düşündürülebilir. Bu serolojik benzerliğin Biyotip 2 ile gösterilememesine rağmen, nitekim, Ison ve arkadaşları (30) *G. vaginalis* suşları arasında Biyotip 1, 3 ve Biyotip 5' i aynı serotip altında toplamışlardır (serotip C).

Biyotip 2'de de 3. enjeksiyon sonrası yeterli poliklonal immünoglobulin sentezinin sağlandığı görülmektedir. Bu özelliği ile biyotip 1'e benzerlik göstermektedir. Homolog serumla ve diğer biyotiplere ait serumla 107 kDa'lık (biyotip 7 ve biyotip 8 hariç) ve 50 kDa'lık (biyotip 4 ve biyotip 7 hariç) bantların görülmesi bunların *G. vaginalis* biyotipler

arasında ortak antijenik proteinler olduğunu; Biyotip 4, 7 ve 8'de bu bantların görülmemesi bu biyotiplerin zayıf antijenik özelliğe sahip olduklarını düşündürmektedir.

Biyotip 3'ün kontrol serum ile reaksiyonunda belirlenen 45.5 kDa'lık bantın *G. vaginalis*'e spesifik olmadığını göstermektedir. Bu biyotip ile yapılan antiserum reaksiyonlarının tek tek, belirgin bir şekilde görülemediğinden spesifik reaksiyonların değerlendirilmesi yapılamadı.

Biyotip 4'ün tavşana 1'inci enjeksiyon sonrasında elde edilen antiserumla reaksiyonlarda herhangi bir sinyal görülmezken, 2'inci enjeksiyonla elde edilen antiserumun 41 kDa proteini ile belirgin bir reaksiyon verdiği görülmüştür. Tekrarlanan diğer enjeksiyonlara rağmen Biyotip 4 yapısal proteinlerinin oldukça zayıf bir antijenik yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. Nitekim, Ison ve arkadaşları (30) biyotipleri belli olmayan *G. vaginalis* suşlarıyla tavşan immünizasyonu sonrasında, bazı izolatların iyi antikör oluşturduklarını, bazılarının ise zayıf antikör cevabı oluşturduklarını bildirmişlerdir. Buna karşın, bazı Biyotip 4 proteinlerinin (daha çok 41 kDa) başta Biyotip 1, 2 ve 5 olmak üzere heterolog antiserumlarla güçlü reaksiyon verdiği görülmektedir. Bu özellikleriyle, Biyotip 1 proteinlerinin homolog ve heterolog antiserumlarla reaksiyonları örneğinde olduğu gibi, Biyotip 1, 2 ve 5'in burada da aynı serotipe ait olduklarını düşündürmektedir.

Biyotip 5 proteinleriyle kontrol serumun reaksiyonunda yoğun olarak 50 ve 45.5 kDa'lık bantların sinyal verdiğinin görülmesi, *G. vaginalis* Biyotip 5' ile ortak epitop benzerliği olan bakterilere karşı tavşanda doğal olarak gelişmiş olan immünglobulinlerle çapraz reaksiyon sebebiyle olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, Biyotip 5 proteinlerinin Biyotip 1 ve 2 antiserumlarıyla güçlü sinyal veren reaksiyonlar verdiği görülmekte, bu da yine bu biyotiplerin aynı serotipe ait *G. vaginalis* olduklarının göstermektedir.

Biyotip 6'nın homolog ve heterolog antiserumlarla reaksiyonları diğer biyotiplerden daha farklı bir profil oluşturmaktadır. Örneğin, homolog antiserumla reaksiyonlarda 73 ve 75 kDa ağırlığındaki proteinlerin diğer biyotiplerin reaksiyonlarında görülmemesine karşın biyotip 6'da dikkat çekecek düzeyde sinyal verdiği görülmektedir.. Ison ve arkadaşları (30) da serotiplendirmeye çalıştıkları *G. vaginalis* suşları içerisinde Biyotip 6 ve Biyotip 8 olduğu belirlenen suşları serotiplendirememişlerdir. Ayrıca, blot stripleri incelendiğinde 41 kDa proteinin 3 ve 4'üncü enjeksiyon sonrası antiserumlarla belirgin olarak reaksiyona girdiği, ancak bu proteinin heterolog antiserumlarla reaksiyon vermediği görülmektedir. Bu da, 41 kDa proteinin Biyotiplere özgü B-hücre epitoplara bulundurabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, Biyotip 6 proteinlerinin, biyotipler arasında sadece Biyotip 1, 2 ve 5 antiserumlarıyla güçlü reaksiyon vermesi, bu biyotiplerin aynı serotip içinde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Biyotip 4 hariç, diğer biyotiplerin aksine, Biyotip 7 ve 8' in tavşanlara tekrarlayan enjeksiyonlarının yeterli bir poliklonal immünglobulin cevap oluşturmadığı görülmektedir. Buna karşılık, zayıf düzeyde de olsa, her iki biyotipin de 41 kDa proteinine karşı, spesifik cevap oluşturdukları, bu proteinin Biyotip 1 ve 2 antiserumlarıyla da reaksiyon verdiği görülmektedir.

G. vaginalis biyotiplerinin yapısal proteinlerinin antijenik özellikleri ve tür spesifik heterolog antiserumlarla reaksiyonları genel olarak değerlendirildiğinde; farklı yoğunlukta olmakla beraber bütün biyotiplerde 41 kDa ağırlığındaki proteinin immünodominant görülmesi bu proteinin *G. vaginalis*'e spesifik immünodominant bir protein olduğuna işaret etmektedir. Boustouller ve arkadaşları (56) *Neisseriae*, *Haemophilus* ve 5 adet *G. vaginalis* suşu ile yaptıkları western blot çalışmalarında 41 kDa ağırlığındaki bandın sadece *G. vaginalis* suşlarında görüldüğünü ve bu bandın SDS-PAGE'de belirgin olarak görülmemesine rağmen western blot analizi sonucu dominant olarak antiserumlarla belirlenebildiğini bildirmişlerdir.

Çalışmanın diğer bir aşamasında, yapısal proteinler açısından belirleyici farklılıklar taşımayan ancak türe spesifik antiserumlarla reaksiyonlarda çapraz reaksiyon veren; immün cevabı uyarma kapasitesi farklı antijenik yapılar sergileyebilen *G. vaginalis* biyotiplerinin epitel hücrelerine adheransları arasında farklılığın olup olmadığı irdelenmiştir.

Genel olarak, bakterilerin adherensi mukoz membran yüzeylere kolonize olmada oldukça etkili bir faktördür. Böylece adhezyonla kommensal durum devam ettirilirken; bazı bakteriler için adezyon infeksiyöz durumun hazırlanmasında önemli rol oynar (34).

G. vaginalis'in non spesifik vajinit'de tek başına etyolojik ajan olup olmadığı hala tartışılırken, bakteriyel vajinozisli kadınların vajinal akıntılarında "clue hücrelerinin varlığı" araştırmacıları *G. vaginalis*'in adherens özelliklerinin belirlenmesi yönünde çalışmaya yöneltmiştir. İlk olarak Edmunds (29) *G. vaginalis*'in hemagglütinasyon özelliğini göstermiştir. Mardh ve Weström (52) *G. vaginalis*'in epitel hücrelere adhere olduğunu göstermiş, daha sonra birçok araştırmacı *G. vaginalis*'in adheransı ile ilgili deneyler yapmışlardır. (32,34,38,51,57,58) .

Çalışmamızda *G. vaginalis*'in biyotipleri arasında epitel hücrelere adheransı yönünden farklılığın olup olmadığını araştırdığımızda; biyotipler arasında adherans indekslerinin farklı farklı olduğu gözlemlendi. Epitel hücrelerine adhere olma kapasiteleri açısından; Biyotip 6, 2, 5, 1 ve 3' ün 8, 4 ve 7'ye göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek adherans indeksine sahip oldukları belirlendi.

Scott ve arkadaşları (38) izole ettikleri 105 *G. vaginalis* suşunu adhezyon indeksine göre gruplandırmış ve adezyon indeksi bakımından fark olmadığını bildirmişlerdir.

Biyotip 1, 2, 3, 5 ve 6'nın adherens indeksinin diğer biyotiplere oranla yüksek olması, bu biyotiplerin en sık izole edilen biyotipler içinde olması açısından dikkate değerdir. Villegas ve arkadaşları (59) yaptıkları bir çalışmada BV'li kadınların seksüel partnerlerinin semen örneklerinde % 50 oranında *G.vaginalis*'i izole etmişler ve üretral epitel hücrelere adhezyonun kadınların reinfeksiyonunun klinik olarak açıklanmasında önemli olduğu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda; biyotiplerin yapısal proteinlerinin antijenik özellikleri karşılaştırıldığında biyotip 4, 7 ve 8 proteinlerinin diğer biyotiplere göre daha zayıf antijenik oldukları belirlenmişti. Biyotip 4, 7 ve 8'in epitel hücrelerine adhere olma özelliklerinin de diğer biyotiplere göre daha düşük olması bu biyotiplerin western blot reaksiyon sonuçları ile uyum göstermektedir..



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

G. vaginalis'e ait sekiz epidemiyolojik biyotipin jel elektroforez profilleri çıkarılarak incelendi. Biyotipler arasında protein yapıları bakımından kısmi bir farklılığın olduğu; fakat bu farklılıkların biyotipler arasında ayırıcı tanıy sağlamayacağı görüldü.

Her biyotipin homolog ve heterolog antiserumlarla immunoblot reaksiyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde; biyotipler arasında farklı antijenik moleküllerin bulunduğu; ancak biyotipe spesifik reaksiyonların olmadığı belirlendi. Binaenaleyh, biyotiplerin hepsinde görünür MA'sı 41 kDa olan tek ortak bir antijenik molekül 41 belirlendi. Biyotip 4, 7 ve 8 tavşanlara tekrarlanan enjeksiyonlarla verildiğinde zayıf antijenik özellik gösterirken Biyotip 1, 2, 3, 5 ve 6 antiserumlarının immunoblottarda değişen oranlarda reaksiyon verdikleri belirlendi. Bu reaksiyonların homolog ve heterolog antiserumlarla gerçekleştirildiği şartlarda Biyotip 1, 2 ve 5'in antijenik yönden benzediği görüldü.

Adherans özelliklerine bakıldığında biyotiplerin pH:7,2 'de vajinal epitel hücrelerine adhere oldukları, adherans indexlerine göre sıralandıklarında en iyi Biyotip 6'nın daha sonra biyotip 5 ve biyotip 2'nin adhere oldukları belirlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında zayıf adhere olan biyotip 4, 7, 8'in farklı olduğu belirlendi. Bakteriyel vajinozis olgularında en sık izole edilen Biyotip 1, 2 ve 5 in epitel hücrelere adherans indekslerinin yüksek, serolojik reaksiyonlarında da benzer oldukları görüldü.

G. vaginalis'in yapısal proteinlerinin farklı antijenik özellikler taşıması; özellikle 41 kDa ağırlığındaki proteinin yapısal proteinler arasında çok az miktarda bulunmasına rağmen yüksek düzeyde antijenitesi ve serotipler arasında ortak epitoplara sahip olduğunun gösterilmiş olması, bir sonraki aşama olarak immun serumların *G.vaginalis* biyotiplerinin adherans özelliklerine olan etkilerinin incelenmesini gerekli kılmaktadır. Ayrıca, BV'den en sık izole edilen biyotiplerdeki immunodominant proteinlerin saflaştırılarak normal vajen florasına hakim olan laktobasiller ve diğer bakteriler üzerine üzerine olan etkileri araştırılması; bu proteinlerin özellikle seksle geçen hastalık etkenleri arasında virusların (HIV, genital herpes vb) biyolojik özelliklerini belirlemede ne tür etkilerinin olabileceğinin araştırılması da düşünülebilir.

7. ÖZET

Bu çalışmada *G. vaginalis*'in sekiz epidemiyolojik biyotipinin SDS-PAGE ile protein profilleri çıkarılıp, antiserumlarla yapılan immüno blotlarda yapısal proteinlerin antijenik ve immünodominant özellikleri araştırıldı. Ayrıca herbir biyotipin vajinal epitel hücrelere adher olma kapasiteleri arasında fark olup olmadığı incelendi.

Jel elektroforez profilleri değerlendirildiğinde biyotiplerin protein yoğunlukları ve sayılarında farklılıklar olduğu; ancak, bu farklılığın biyotipleri ayırt etmeye olanak sağlayacak düzeyde anlamlı olmadığı belirlendi.

Western blot çalışmalarında, jel elektroforezinde açıkça belirlenemeyen, fakat antiserumlarla güçlü reaksiyon veren, MA'sı 41kDa proteinin diğer proteinlere göre immünodominant olduğu belirlendi. Antijenik yapı bakımından Biyotipler 1, 2 ve 5'in benzer reaksiyonlar verdiği; Biyotip 4, 7 ve 8'in antijenik özelliklerinin diğer biyotiplere oranla daha az olduğu belirlendi.

Vajinal epitel hücrelerine adhezyonda biyotipler arasında istatistiksel olarak fark belirlendi. Sık izole edilen biyotiplerin adherens indekslerinin de yüksek olduğu görüldü.

8. SUMMARY

The main purpose of this study was to determine immunodominant structural proteins of *G.vaginalis* biotypes isolated from vaginal samples of women. The structural proteins of eight biotypes were first analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and subsequently blotted onto nitrocellulose membranes by electrophoresis. The antigenic proteins were then identified by reacting each of biotype proteins with homolog antiserum obtained by subsequent live bacteria injections into rabbits. In addition, the adhesion of the biotypes to the vaginal epithelial cells were studied with a view to identify whether there was any correlation between biotypes isolated more frequently from bacterial vaginosis cases and those that are more antigenic and serologically similar biotypes.

SDS-PAGE analysis identified to many strongly expressed proteins, but no major differences were found between the number and/or the density of individual structural proteins as determined by coomassie blue stained gels. On the other hand, the immunoblotting studies indicated that among all the major structural proteins of *G.vaginalis* a protein band with an apparent molecular weight of 41 kDa was the most reactive with homolog as well as heterolog antisera. Although, this immunodominant protein was not readily identified in coomassie blue stained gels, it is strongly detected by the biotype specific antiserum, and found to be cross reactive, albeit with weak reactions with some of the biotype antisera. Furthermore, the antigenic properties of the Biotypes 1, 2 and 5 were found to be strong and equally cross reactive while the biotypes 4, 7 and 8 were much less antigenic than the other biotypes.

It was also shown that there was statistically significant differences between the biotypes in terms of adherence to the vaginal epithelial cells, and that those biotypes isolated more frequently in the bacterial vaginosis cases had higher adherence indexes.

9. KAYNAKLAR

1. Van Belkum A; Koeken A; Vandamme P; Van Esbroeck M; et all. Development species specific polymerase chain reaction assay for *Gardnerella vaginalis*, Mol. Cell. Probes. Jun; 9(3):167-74; 1995.
2. Schlicht J.R: Treatment of Bacterial vaginosis. Ann. Pharmacother. 28:483-7:1994.
3. Hill, G B, The microbiology of bacterial vaginosis. Am J.Obstet Gynecol,169;450-4;1993.
4. Spiegel,C.A: Bacterial vaginosis. Clin.Microbiol. Rev.4(4):485-502 1991
5. Hillier ,SL.,Krohn,MA.,Watts,P.H., Walner Honsen,P., and Eschenbach,D.A.: Microbiologic efficacy of introvaginal clindamycin cream for the treatment of bacterial vaginosis. Obstet. Gynecol, 76: 407-413, 1990.
6. Spiegel, CA. Amsel R., Eschenbach,D., Schoenknecht, F. and Holmes K.K: Anoerobic bacterian nonspecific vaginitis. N Engl. J. Med, 303;601-607, 1980.
7. Gardner, H.L , and Dukes CH, *Hoemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as "nonspesific" vaginitis. Am. J. Obst. Gynecol. 69:962-76,1955.
8. Piot, P., Von Dyck, E., Peeters, M Hale , J., Totten P.A. and Holmes K.K, Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J.Clin. Microbiol. 15:19-24, 1994.
9. Litz, Hashemi,F.B. Ghassemi, M.,Roebuck, K.A., Spear,G.T.: Activation of human Immunodeficiency Virus Type 1 Expression by Gardnerella vaginalis. J. Infect Dis. 179(4): 924-930 1999
10. Reyn, A., Birch-Anderson, A. and Lapage, S.P.: An electron microscopic study of thin section of *Hoemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) and some possibly related species. Can. J.Microbiol 12, 1125-1136, 1966.
11. Zinnemann , K and G. C. Turner : The taxonomic position of "*Hoemophilus vaginalis*" [*Corynebacterium vaginalis*] J. Pothol. Bacterial. 85:213-219,1963.

- 12 Greenwood, J.R. and Pickett M.J.: transfer of *Hoemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Garner and Dukes) comb. nov. Int. J.Sys t. Bacteriol . 30:170-178, 1980.
- 13 Piot, P., Van Dyck; Goodfellow, M, and Falkow, S.: A. taxonomic study of *Gardnerella vaginalis*. (*Haemophilus vaginalis*) Gardner and Dukes 1955. J. Gen. Microbial.119: 373-396,1980.
- 14 Wolfong, K., Joklik, Hilda P., Willett, D., Bernord, A., Catherine M. Wilfert: Pasteurella and Miscellaneous Gram-negative Bacilli in Zinsser Microbiology, Printed, in USA (19th ed), pp:506-513, 1988.
- 15 Piot P, *Gardnerella*, *Streptobacillus*, *Spirillum*, and *Calymmatobacterium* in: Balows, A., Hausler JR. W. J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H. J.: Manual of Clinical Microbiology. ASM Washington, D.C., U.S.A., (5th ed). p 483-487, 1991 .
- 16 Greenwood J.R. and Pickett M.J : Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a New Genus Gardnerella.*G.vaginalis* (Gardner ve Dukes) Comb. Nov. Int. J.Syst. Bacterial., 30: 170-178, 1980.
- 17 Nauschuetz, W.F., Kwa, B.H., Pentella, M.A.: Sexually transmitted diceases in: Diagnostic Microbiology, Mahon, C.R., and Manusellies, G.(Ed) W.B. Saunders Company West Philadelphia, Pennsylvania, USA. (9th ed), pp: 971-981,1995.
- 18 Catlin B.W. *Gardnerella vaginalis*, Charecteristic, Clinical consideration and controversies, Clin. Microbiol. Reviews. 5: 213-237, 1992.
- 19 Smith, R.F., Comparison of two media for Isolation *Haemophilus vaginalis*. J.Clin. Microbiol. 9. 729-730,1979
- 20 Dunkelberg, W.E.: *Corynebacterium vaginale*. Sex. Transm. Dis. 4:69-75,1977
- 21 Wibur E.Dunkelberg, Romulus Skaggs and Douglas S. Kellogg. A Study and New Description of *Corynebacterium vaginale* (*Hoemophilus vaginalis*) Am. J. Clin Pathol, 53: 370-377,1970
- 22 Goldberg R.L., and Washington II J.A. Comparison of isolation of *Hoemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from peptone-starch-dextrose agar and Colombia colistin nalidixic and agar. J.Clin. Microbiol. 4: 245-47,1976.
- 23 Mickelsen, P.A., Mc Carthy, L.R., Mangum M.E. New differential medium for the isolation of *Corynebacterium vaginale*. J. Clin. Microbiol. 5: 488-489, 1977.
- 24 Ison, C.A., Dawson, S.G., Hilton, J., Csonka, G.W., and Easmon, C.S.F.: Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* infection. J. Clin. Pathol., 35:550-554, 1982.

- 25 Totten, P.A., Amsel, R., Hale, J., Piot, P., and Holmes, K.K.: Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella vaginalis*. J. Clin. Microbiol., 15:141-147, 1982.
- 26 Puiles A.G.P ; Zaragoza M.C.O; Montiel, AEI and Rosas E.R.P; Biotypes of *Gardnerella vaginalis* isolated from Urinary Tract. Rev.Lat-Amer. Microbiol. 38:75-80,1996.
- 27 Briselden, A.M; and Hillier L.S. Longitudinal study of the biotypes of *G.vaginalis*. J.Clin. Microbiol.,28:2761-2764,1990
- 28 Benito R; Vazquez, J.A; Berron S, Fenoll A, and Saez-Nieto, J.A. A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*, Med. Microbiol. 21; 157-159,1986
- 29 Edmunds, P.N. The biochemical, serological and hemagglutinating reaction of "*Haemophilus vaginalis*". J. Pathol. Bacteriol, 83: 411-422,1962.
- 30 Ison C.A., Harvey D.G., Tanna, A., Easmon CSF. Devolepment and evalution of scheme for serotyping *Gardnerella vaginalis*. Genitourin. Med. 63: 196-201,1987.
- 31 Nath, K.; Choi D.J.; Devlin,D. The characterization of *Gardnerella vaginalis* DNA using non-radioactive DNA probes R.Microbiol. 142: 573-583, 1991.
- 32 Scott, T.G., Curran, B., Smyth,C.J.: Electron Microscopy of Adhesive Interaction Between *Gardnerella vaginalis* and Vaginal epithelial Cells, Mc Coy Cells and Human Blood Cells., J.Gen. Microbiol., 135:475-480, 1989.
- 33 Boustouller,Y.L., Johnson, A.P., Taylor-Robinson,D.: Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. J. Med. Microbiol. 23(4): 327-329,1987.
- 34 Scott, T.G., Curran, B., Smyth,C.J.: Haemagglutinationand Tissue Culture Adhesion of *Gardnerella vaginalis* .J. Gen. Microbiol. 133: 1999-2005, 1997.
- 35 Rottini, G., Dobrina, A., Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante, G.A. and Patriarco, P.: Identification and partial charecterisation of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis* .Infect. Immun. 58: 3751-3758,1990.
- 36 Cauci, S., Monte, R., Ropele, M., Missero, C., Not,T., Qadrifolligo, F., Menestrina, C.: Pore- forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolysin. Mol. Microbiol. 9: 1143-1155, 1993.
- 37 Scott T.G.; Smyth C.J. and Keane C.T., in vitro adhesivemess and biotype of *Gardnerella vaginalis* strains in relation to the occurence of due cells in vaginal discharges. Genitourin Med. 63: 47-53, 1987.
- 38 Taylor E, Blackwell A.L.; Barlow D, Phillips I. *Gardnerella vaginalis* anoerobes and vaginal discharge Lancet. i: 1376-1379, 1982

- 39 Fredricsson B, Hagstrom B, Evoldson G, Nord C.E. Gardnerella associated vaginitis and anaerobic bacteria Gynecol. Obstet Invest. 17; 236-241,1984
- 40 Piot P, Van Dyck E, Goats P, Vanderhayden J.: The vaginal microbiol flora in nonspecific vaginitis. Euro. J. Clin. Microbiol. 1:301-306, 1982
- 41 Mc Donald H M. O'Loughlin, J.A. Jolley P.T, Vignesuaran R. and Mc Donald P.J.: Changes in Vaginal Flora during Pregnancy and Association with Preterm Birth. J. Inf. Dis.170:724-728,1994.
- 42 Martius, J., Krohn, M.A., Hillier, S.L., Stamm W.E., Holmes, K.K., Eschenbach, D.A.: Relationships of Vaginal Lactobacillus species, Cervical *Chlamydia trachomatis* and Bacterial Vaginosis to Preterm Birth. Obstet. Gynecol 71: 89-95, 1988.
- 43 Holst, E., Goffeng, A.R., Andersch, B., Bacterial vaginosis and vaginal Microorganisms in Idiopathic Premature Labor and Association with Pregnancy Outcome; J. Clin. Microbiol 32;176-186;1994.
- 44 Watts H.D., Krohn M.A., Hillier S.L., Eschenbach, D.A.: Bacterial Vaginosis as a Risk Factor for Post-Cesarean Endometritis, Obstet Gynecol, 75: 52, 1990.
- 45 Bastida Vilt, M.T., Lopez Onrubia, P., Rovira Lidos, J., Martinez Martinez, J.A., Exposito Aguilera, M., tur. J. Clin. Microbiol. infect. Dis. 16; 400-401, 1997
- 46 Piot, P.: Bacterial vaginosis: An Evaluation of Treatment. Scand. J. Urol. Nephrol. 86(Suppl) :229-235,1984.
- 47 Lossock, J.G. Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis. Rev.Infect.Dis. 12(Suppl) :665-681,1990
- 48 Greaves, W.I., Chungafung, J. Morris, B., Haile, A. and Town j.L., Clindamycin Versus Metronidazole in the Treatment of Bacterial Vaginosis Obstet Gynecol. 72:799-802,1988
- 49 Jones, B.M., Geary, I., Alawattegama A.b., Kinghorn, G.R. and Duerden B.I.: In-vitro and In-vivo Activity of Metranidazole against *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp. and *Mobiluncus* spp. In Bacterial vaginosis. J. Antimicrob. Chemother. 16:189-197,1989.
- 50 Kharsany A.B.M., Hoosen A.A., DenEnde J.V: Antimicrobial Susceptibilities of *Gardnerella vaginalis*. Antimicrob. Agents Chermother. 37(12):2733-2735,1993.
- 51 Peeters, M., Piot, P.: Adhesion of *Gardnerella vaginalis* to vaginal epithelial cells, Variables Affecting Adhesion and Inhibition by Metranidazole, Genitourin. Med., 61: 391-395, 1985.

- 52 Mardh, P.A. and Weström, L.: Adherence of Bacteria to vaginal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 13: 661-666,1976.
- 53 Van der Meijden , W.I., Koerten,H., vanMoirik, W.,and d Bruijn. Descriptive Light and Electron Microscopy of Normal and Clue cell Positive Discharge . *Gynecol. Obstet. Invest.*,25:47-57, 1988.
- 54 Hechemy K.E., Stewans, R.W., and Corney, J.M.: Immunoelectroblot Techniques in : Balows, A., Hausler JR. W. J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H. J.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Washington, D.C., U.S.A., (5th ed). p 97-110, 1991 .
- 55 Şen, D.: Bakteriyel vajinozis olgularından izole edilen *Gardnerella vaginalis*'in epidemiyolojisi ve SDS-PAGE analizi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü.Trabzon 1997.
- 56 Boustouller,Y. L. Jhonson, A. P., Taylor-Robinson, D.: Detection of A Species Specific Antigen of *Gardnerella vaginalis* by Western Blot Analysis. *J. Gen. Microbiol* , 132:1969-1979,1986.
- 57 Boustouller,Y. L. and Jhonson, A.P.: Resistance of *Gardnerella vaginalis* to Bacterisidal Activity of Human Serum. *Genitourin. Med.* , 62:380-383, 1986.
- 58 Ison, C.A. and Easmon C.S.F.: Studies on the Mechanism of Adhesion of *Gardnerella vaginalis* to Human Erythrocytes. *Scand. J. Urol. Nefrol.* 86: (Suppl) 191-193,1984.
- 59 Villages H., Arias, F., Flores, E., Casonova, G., Karchmer, S.: Ultrastructural Characteristics of *Gardnerella vaginalis* Infection in the Heterosexual Couple. *Arch. Androl.* 39(2): 147-153,1997.

ÖZGEÇMİŞ

Fetiye Köseahmet Kolaylı

1966 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1983 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı 1987 yılında mezun oldu. 1988 yılında KTÜ Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programına başladı. 1991 yılında Aynı enstitüde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1992 yılında yüksek lisansını tamamlayıp aynı yıl doktora programına başladı ve Mayıs 1999 yılında mezun oldu. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi olarak çalışmakta olup evli ve bir çocuk sahibidir.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**