

Detection of drug resistance gene in trichomonas vaginalis by PCR

Talari SA^{1*}, Kazemi A², Hooshyar H¹, Kazemi F¹, Arbabi M¹, Talari MR³, Nikyar HR⁴, Sobhani A⁵, Zaree Kar B⁶, Tabibian A⁷, Alizadeh R⁴, Bandehpour M⁸

1- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Qom, I. R. Iran.

4- Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Najaf Abad Branch, Najaf Abad, I. R. Iran.

5- Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Najaf Abad Branch, Najaf Abad, I. R. Iran.

6- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I. R. Iran.

7- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Najaf Abad Branch, Najaf Abad, I. R. Iran.

8- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received May 29, 2010; Accepted January 19, 2011

Abstract:

Background: Trichomoniasis is a worldwide protozoan parasitic disease. Considering the importance of the disease in public health and the controversial ideas about the prevalence of drug resistance, this study was designed to determine the prevalence of metronidazole resistance gene in trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) with PCR-RFLP method in Tehran and in Kashan.

Materials and Methods: In this descriptive study 140 samples of *T. vaginalis* in patients with *T. vaginalis* infections were collected and assessed microscopically. Then they were isolated and examined by culturing in dorset's medium, DNA extraction and PCR amplification. The PCR products were analyzed using RFLP and suspected samples were sequenced.

Results: All but 7 samples were *T. vaginalis* positive by PCR. Sixty-two samples (44.4%) were examined by microscopic, culture and PCR techniques; 12 samples (8.5%) by microscope and PCR, 56 samples (40%) by culture and PCR and other 3 samples (2.1%) were positive only by PCR. Two samples (1.5%) were also examined for detection of mutation in 18S rRNA gene with RFLP in Tehran.

Conclusion: This study shows that *T. vaginalis* infections in the female population living in Tehran are metronidazole-resistant. Since metronidazole is considered as the drug choice for *T. vaginalis* infections, more studies are recommended for identification of the drug resistance mechanisms and prevention of the disease.

Keywords: Drug resistance, PCR, *Trichomonas vaginalis*

* Corresponding Author.

Email: talariali@yahoo.com

Tel: 0098 913 113 0371

Fax: 0098 361 555 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Spring, 2011; Vol. 15, No 1, Pages 47-52

بررسی ژن مقاومت دارویی در تریکوموناس واژینالیس به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

صفرعلی طالاری^{۱*}، بهرام کاظمی^۲، حسین هوشیار^۳، فائقه کاظمی^۴، محسن اربابی^۵، محمدرضا طالاری^۶، حمید رضا نیک یار^۷، احمد سبحانی^۸، بیتا زرعی کار^۹، اکبر طیبیان^{۱۰}، رقیه علی زاده^{۱۱}، مژگان بنده پور^{۱۱}

خلاصه:

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت تریکومونیاژیس و تناقضاتی که در مورد شیوع مقاومت دارویی آن در دسترس می‌باشد، این مطالعه به منظور تعیین میزان شیوع ژن مقاوم به داروی مترونیدازول در تریکوموناس واژینالیس به روش PCR-RFLP در شهرهای تهران و کاشان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی ۱۴۰ نمونه از ترشحات واژن جمع‌آوری شده و پس از جداسازی انگل با استفاده از محیط کشت دوسره و استخراج DNA واکنش PCR انجام گرفت. موتاسیون‌های احتمالی با تعیین تترادف و همچنین انجام RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: تعداد ۱۳۳ نفر (۹۵ درصد) از افراد مورد مطالعه با روش PCR مثبت شدند. ۶۲ نمونه (۴۴/۴ درصد) با هر سه روش لام مستقیم، کشت و PCR، ۱۲ نمونه (۸/۵ درصد) تنها به دو روش دید مستقیم و PCR، ۵۶ نمونه (۴۰ درصد) به دو روش کشت و PCR و ۳ نمونه (۲/۱ درصد) نیز تنها به روش PCR مثبت تشخیص داده شدند. در نهایت ۲ مورد (۱/۵ درصد) موتاسیون در ژن 18S rRNA از نمونه‌های تهران تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: بررسی حاضر نشان می‌دهد که تریکوموناس واژینالیس در تهران در برابر مترونیدازول مقاوم است. با توجه به اینکه مترونیدازول داروی انتخابی در درمان این بیماری می‌باشد، توصیه می‌شود مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های مقاومت دارویی و راه‌های کنترل آن صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: مقاومت دارویی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، تریکوموناس واژینالیس

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۵۲-۴۷

مقدمه

تریکومونیاژیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مقاربتی در دنیا به‌شمار می‌آید که به‌وسیله تک یاخته تریکوموناس واژینالیس ایجاد می‌شود [۲، ۱]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که وقوع آن در دنیا سالیانه ۱۷۰ میلیون مورد می‌باشد [۳].

میزان آلودگی به آن از مجموع مبتلایان به گنوره، سیفلیس و کلامیدیا بیشتر است و در انتقال ویروس ایدز نقش موثری دارد [۴]. شیوع آلودگی به این انگل در نقاط مختلف ایران متفاوت است [۶، ۵]: میزان آلودگی در تبریز ۴/۶۷ درصد، در ساری ۲۲/۵ درصد، در گرگان ۲ درصد و در تهران ۳/۶ درصد گزارش شده است [۷-۱۰]. این بیماری علاوه بر ایجاد علائم در دستگاه تناسلی زنان ممکن است موجب زایمان نارس و تولد نوزاد با وزن کم و نیز افزایش مرگ و میر در کودکان شود [۱۱]. در درمان مبتلایان به تریکوموناس واژینالیس از داروهای خانواده ۵-نیتر و ایمیدازول مثل مترونیدازول، تینیدازول و اورنیدازول استفاده می‌شود [۱۲] که مترونیدازول شایع‌ترین داروی مورد استفاده با میزان بهبودی ۹۵ درصد می‌باشد [۲]. بررسی Schmid و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در آمریکا نشان داد که مقاومت دارویی در مبتلایان به تریکوموناس واژینالیس نسبت به مترونیدازول ۵ درصد می‌باشد [۱۳]. برخی مطالعات مقاومت دارویی ای نیمری در استرالیا را بین ۵ تا ۱۰ درصد گزارش نموده‌اند [۱۴، ۱۱]. بیان شده است که ژن مربوط به مقاومت دارویی در تریکوموناس واژینالیس نسبت به مترونیدازول، ITS (Internal Transcribed Spacer) است که در rDNA قرار دارد. تعداد نوکلئوتیدهای این ژن 276bp و

- ^۱ استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
- ^۲ استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ^۳ دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
- ^۴ دانشجوی کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
- ^۵ مربی، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
- ^۶ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
- ^۷ استادیار، گروه روانشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد
- ^۸ استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد
- ^۹ مربی، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ^{۱۰} استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد
- ^{۱۱} استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲ دوتنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

پست الکترونیک: Talariali@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۸ تاریخ پذیرش نهایی: ۸۹/۱۰/۲۹

گرفت [۲۵]. آزمایش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر از ناحیه 1 IST محافظت شده ژن ریبوزومی 18S به شرح زیر استفاده گردید.

TVITS F: 5-ACACCGCCCGTCGCTCCTAAC-3'
TVITS R: 5-AATTTGCATTCAAAGATTAAC-3'

این پرایمرها تعداد ۳۱۳ نوکلئوتید از ناحیه 1 ITS ژن ریبوزومال RNA انگل را تقویت می‌کنند. واکنش PCR با شرایط زیر انجام گرفت: برای دناتوراسیون اولیه DNA هدف، مخلوط واکنش برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه قرار داده شد، سپس مراحل PCR (دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه) ۳۰ سیکل تکرار شدند و در نهایت یک سیکل به مدت ۵ دقیقه واکنش در ۷۲ درجه قرار داده شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Corber Research) انجام شد. براساس مطالعات قبلی [۱۲، ۱۱، ۳] که در این زمینه انجام شده است، موتاسیون در ناحیه 1 ITS ژن ریبوزومال RNA تریکوموناس-ناس واژینالیس با مقاومت انگل در برابر مترونیدازول همراه می‌باشد. در این تحقیق برای تشخیص موتاسیون از روش RFLP با آنزیم MspI استفاده شد [۲۵].

نتایج

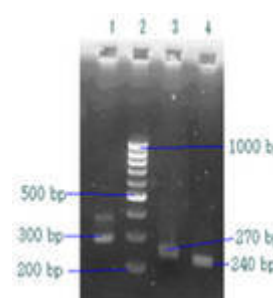
در این پژوهش از ۳۵۰۰ نفر مورد مطالعه تعداد ۱۴۰ نفر (۴ درصد) مبتلا به تریکوموناس واژینالیس بودند که ۱۱۰ نفر (۴/۴ درصد) از آنان از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان مریم تهران و ۳۰ نفر (۳ درصد) از مراجعه کنندگان به مرکز بهداشت گلابچی کاشان بودند. تقریباً ۲۹/۲ درصد افراد مبتلا در گروه ۲۰-۲۹ سال، ۴۰ درصد در گروه ۳۰-۳۹ سال، ۲۵ درصد در گروه ۴۰-۴۹ سال و ۵/۸ درصد افراد در گروه ۵۰ سال و بیشتر از آن قرار داشتند. در این مطالعه ۶۲ نمونه (۴۴/۴ درصد) با هر سه روش، ۱۲ نمونه (۸/۵ درصد) تنها به دو روش دید مستقیم و PCR، ۵۶ نمونه (۴۰ درصد) به دو روش کشت و PCR و ۳ نمونه (۲/۱ درصد) نیز تنها به روش تشخیص کلینیکی و PCR مثبت بوده و با دو روش لام مستقیم و کشت منفی تشخیص داده شدند. از ۱۴۰ نمونه لام مستقیم و کشت مثبت، تعداد ۱۳۳ نمونه (۹۵ درصد) جهت آزمایش PCR تکثیر گردیده و از این تعداد ۲ نفر (۱/۵ درصد) دارای مقاومت دارویی بودند؛ در این دو نمونه ژن نوکلئوتید C در موقعیت ۲۰۹ ناحیه 1 TSI به نوکلئوتید T تبدیل شده بود. ژن‌های مذکور در مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) به شماره Trichomonas vaginalis و Accession No. EU308571

موتاسیون آن از نوع نقطه‌ای بوده و علت مقاومت انگل کاهش فرودوکسین داخل سلولی و کاهش فعالیت آنزیم آن و در نتیجه ایجاد تغییر در شکل هیدروژنوزوم است [۱۷، ۱۵-۱۱]. مترونیدازول از طریق انتشار از غشاء دو لایه تریکوموناس وارد سیتوپلاسم آن شده، ضمن عبور از غشاء دو لایه هیدروژنوزوم به‌عنوان یک پیش دارو با آنزیم هیدروژناز برای گرفتن الکترون از فرودوکسین رقابت می‌کند. فعالیت دارو زمانی آغاز می‌شود که گروه نیترو مترونیدازول احیاء شده و تولید رادیکال آزاد کند. رادیکال آزاد شده موجب تخریب DNA و در نهایت موجب مرگ سلول می‌شود [۱۹، ۱۸، ۴]. حضور دارو در داخل هیدروژنوزوم موجب تغییر پروتئین‌های پیرووات فرودوکسین، اکسیدو رودکتاز، فرودوکسین، آنزیم مالیک و هیدروژناز می‌شود و در گونه‌های مقاوم موجب کاهش آنها می‌شود [۲۴-۲۰]. باتوجه به شیوع و عوارض مختلف ناشی از ابتلا به تریکوموناس واژینالیس و ضرورت درمان آن و نیز تناقضاتی که در میزان شیوع و مقاومت دارویی نسبت به مصرف مترونیدازول در دسترس می‌باشد، این مطالعه به‌منظور تعیین مقاومت دارویی و تشخیص ژن مربوطه با استفاده از تکنیک PCR صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی بر روی ۳۵۰۰ نفر زن در گروه‌های سنی ۲۰ تا ۵۵ سال شامل ۲۰۰۰ نفر مراجعه‌کننده به درمانگاه بیمارستان مریم تهران و ۱۵۰۰ نفر مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت گلابچی کاشان به روش سرشماری با در نظر گرفتن خصوصیات سن و مصرف دارو در طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ صورت پذیرفت. انگل‌های تریکوموناس واژینالیس از ترشحات واژن جمع‌آوری شده و با روش گسترش مرطوب، کشت و PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در محیط کشت دورسه و دیاموند در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد تکثیر شدند. انگل‌ها پس از ۱۰ روز کشت، با ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از جدا کردن و سه بار شستشو با PBS تا مراحل بعد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بر روی تمام نمونه‌ها آزمایش PCR انجام گردید. برای استخراج DNA ابتدا انگل‌ها را سه بار با روش Freze and Tawa له کرده [۲۵]، نمونه‌ها سانتریفوژ شده، رسوب حاصل از آن در بافر لیز ریخته شده و در ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتیناز K در دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس با استفاده از روش فنل کلروفرم DNA حاصل در اتانول رسوب داده شده و در بافر TE نگهداری شد. استخراج DNA مطابق روشی که قبلاً انجام شده است، صورت

Accession No. EU308572 ثبت گردیدند. از نظر سابقه مصرف داروی مترونیدازول، در مجموع ۳۰ نفر (۲۱ درصد) از افراد از دارو استفاده کرده بودند و ۱۱۰ نفر (۷۹ درصد) باقی مانده سابقه مصرف داروی مترونیدازول را نداشتند، همچنین، دو نمونه دارای موتاسیون سابقه مصرف دارو را نداشتند. برای اطمینان از وجود موتاسیون در ژن با استفاده از روش RFLP تمام نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش محصول PCR تحت تاثیر آنزیم MSPI قرار گرفت. این آنزیم در نمونه‌های دارای موتاسیون دو جایگاه شناسایی دارد و یک قطعه 240pb روی ژل مشاهده می‌شود ولی در نمونه‌های فاقد موتاسیون، یک قطعه 270pb شناسایی و در نتیجه روی ژل مشاهده می‌شود (شکل شماره ۱)



شکل شماره ۱- الکترو فورز هضم آنزیمی محصول PCR
 تریکوموناس واژینالیس با آنزیم MSPI در ژل آگارز ۳ درصد
 ستون ۱- محصول PCR تریکوموناس واژینالیس (۳۱۳bp)
 ستون ۲- مارکر وزنی DNA (100 bp)
 ستون ۳- محصول PCR هضم شده با آنزیم MSPI، تریکوموناس واژینالیس فاقد موتاسیون (270 bp)
 ستون ۴- محصول PCR هضم شده با آنزیم MSPI، تریکوموناس واژینالیس دارای موتاسیون (240 bp). در این ژن نوکلئوتید C در موقعیت ۲۰۹ ناحیه TSI 1 به نوکلئوتید T تبدیل شده است (C209T).

بحث

در جامعه مورد مطالعه شیوع تریکومونیاژیس ۴ درصد تعیین گردید که این میزان در مراجعین به درمانگاه بیمارستان مریم تهران، ۴/۴ درصد و در افراد مراجعه کننده به مرکز بهداشت گلابچی کاشان ۳ درصد بود. از ۱۴۰ نفر مبتلا بیشترین موارد در گروه سنی ۳۹-۳۰ سال و کمترین موارد در گروه سنی بالای ۵۰ سال تشخیص داده شد. تریکومونیاژیس یکی از بیماری‌های مقاربت جنسی شایع در سراسر دنیا بوده [۲] و میزان شیوع آن در جوامع مختلف متفاوت است؛ در ایران شیوع آلودگی در گروه‌های مختلف بین ۰/۵ الی ۳۰ درصد گزارش گردیده است [۵-۷]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که میزان آلودگی در مراجعه کنندگان به مرکز بهداشتی درمانی شهر ساری، ۲۲/۵ درصد [۸].

کلینیک زنان گرگان، ۲ درصد، مرکز بهداشتی تبریز، ۴/۶۷ درصد [۷] و در مراجعه کنندگان به مراکز تنظیم خانواده در تهران، ۳/۶ درصد [۱۰] است. در مطالعه ما شیوع آلودگی در کاشان کمتر از تهران بود و هر دو شهر در مقایسه با دیگر شهرها شیوع کمتری داشتند که نشان دهنده وضعیت بهداشتی مناسب تر آنها می‌باشد. یکی از یافته‌های تحقیق حاضر شیوع ۱/۵ درصد مقاومت دارویی در بیماران مورد مطالعه می‌باشد. بررسی‌های انجام شده در نقاط مختلف دنیا نشان دهنده عدم پاسخ گویی مبتلایان به تریکوموناس نسبت به مترونیدازول است [۱۲]. مرکز کنترل و پیشگیری بیماری (Central for Disease Control and prevention; CDC) آمریکا در سال ۱۹۹۳ مقاومت دارویی ۵/۴ درصد نسبت به مترونیدازول را نشان داده است [۲۶]. همچنین، در مطالعه Cudmore و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در کانادا میزان مقاومت دارویی در زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان، ۵ درصد گزارش شده است [۱] که با مطالعه ما هم خوانی دارد. در بررسی مشابهی که توسط Snipes و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شده موتاسیون ژن مقاومت دارویی ۱۳ درصد گزارش گردیده است [۱۵]. Dibyarupa و همکارانش مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به تریکوموناس نسبت به مترونیدازول را بیشتر از ۷ درصد گزارش دادند [۲۷] که میزان بالاتری نسبت به مطالعه ما را نشان می‌دهد. با توجه به این که مترونیدازول یکی از شایع ترین داروهای مورد استفاده در درمان مبتلایان به تریکوموناس واژینالیس با اثر درمانی بیشتر از ۹۵ درصد می‌باشد [۲۹، ۲۸، ۲] و نتایج حاصل از مطالعات دیگران در خصوص موتاسیون ژن مقاوم به مترونیدازول گزارش گردیده است، مصرف بی رویه و غیر استاندارد آن در بیماران موجب افزایش مقاومت دارویی در جامعه می‌گردد. بنابراین جهت کاهش ایجاد مشکلات درمان و جلوگیری از انتقال انگل به شریک جنسی فرد مبتلا و همچنین تشخیص حامل بون علامت انگل و جلوگیری از انتقال ویروس‌هایی مثل HIV لازم است که یک روش دقیق مانند PCR برای شناسایی این انگل مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این پژوهش و تشخیص تریکوموناس‌های مقاوم به مترونیدازول در تعدادی از نمونه‌ها، توصیه می‌شود با توجه این که مترونیدازول داروی انتخابی در درمان این بیماری می‌باشد و بروز مقاومت دارویی در آن اهمیت ویژه‌ای دارد، تحقیقات بیشتری جهت شناسایی مقاومت دارویی در مناطق مختلف ایران انجام پذیرد.

که هزینه‌های این طرح تحقیقاتی را تامین نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

References:

- [1] Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClell SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clin Microbiol Rev** 2004; 17(4): 783-93.
- [2] Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P. 5-Nitroimidazole Drugs Effective against Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. **Antimicrob Agents Chemother** 2006; 50(1): 344-7.
- [3] Mead JR, Fernandez M, Romagnoli PA, Secor WE. Use of *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates to Evaluate Correlation of Gene Expression and Metronidazole Resistance. **J Parasitol** 2006; 92(1): 196-9.
- [4] Evangelia T P, Marianna T, Michael M, Louisa B, Vassiliki P, Aris A, Athanassios T. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection in women attending a major gynaecological hospital in Greece: a cross-sectional study. **J Clin Pathol** 2010; 63(3): 249-53.
- [5] Miller M, Liao Y, Gomez AM, Gaydos CA, Mellow D. Factors associated with the prevalence and incidence of *Trichomonas vaginalis* infection among African American women in New York City who use drugs. **J Infect Dis** 2008; 197(4): 503-9.
- [6] Rasti S. Survey of Trichomoniasis on the pregnant women in Kashan Shabih Khani Hospital. 4th **National Iranian Congress of Parasitology and Parasitic Disease**, 2001-2002, 13-16, kashan, Iran. [in Persian]
- [7] Jamali R, Zarikar B, Yosefi S, Gazanchahi A. Survey of sensitivity of wet smear and Dorset medium in comparison with Diamond medium for diagnosis of *Trichomonas Vaginalis*. **Yafteh** 2006; 3(4): 79-84. [in Persian]
- [8] Rashidi S, Ziaie H, Yaghobi T. Survey of Haelthy work of Trichomoniasis women referring to health center of Sari. 2th **Congress of Nersing Care** 2002, 50, Kermanshah, Iran. [In Persian]
- [9] Bakhshandeh Nosrat S, Ghaemi E, Behnam Poor N, Rezaeyaei M. Determining the etiological agents in vaginal infections in women referring to Dezyani Women Hospital in Gorgan. **Asrar, Journal of Sabzevar School of Medical Sciences** 2003; 10(3): 58-65. [In Persian]
- [10] Farahmand M, Rezaeian M. Study of Trichomoniasis in women referring to gynecology centers of Tehran using direct and culture methods. **Teb va Tazkie** 1995; 31: 22-7. [in Persian]
- [11] Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell Res** 2003; 13(4): 239-49.
- [12] Crucitti T, Abdellati S, Van Dyck E, Buvé A. Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism. **Clin Microbiol Infect** 2008; 14(9): 844-52.
- [13] Schimd G, Narcisi E, Mosure D, Secore WE, Higgins J, Moreno H. Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. **J Reprod Med** 2001; 46(6): 545-9.
- [14] Upcroft P, Upcroft JA. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. **Clin Microbiol Rev** 2001; 14(1): 150-64.
- [15] Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. Molecular Epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. **J Cli Microbiol** 2000; 38(8): 3004-9.
- [16] Philippe H, Germot A. Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: Long- branch attraction and models of sequence evolution. **Mol Biol Evol** 2000; 17(5): 830-4.
- [17] Wright JM, Webb RI, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft JA. Hydrogenosomes of Laboratory-Induced Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* Lines are downsized while those from clinically metronidazole-resistant isolates are not. **J Eukaryotic Microbiol** 2010; 57(2): 171-6.
- [18] Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science** 2007; 315(5809): 207-12.
- [19] Voolmann T, Borehan P. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. **Med J Aust** 1993; 159(7): 490.
- [20] Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell Res** 2003; 13(4): 239-49.
- [21] Upcroft JA, Delgadillo-Correa MG, Dunne RL, Sturm AW, Johnson PJ, Upcroft P. Genotyping *Trichomonas vaginalis*. **Int J Parasitol** 2006; 36(7): 821-8.
- [22] Malagoli M, Rossi T, Baggio A, Zandomeneghi G, Zanca A, Casolari C, et al. 'In vitro' study of chemotherapeutic activity of sulphimidazole on some sensitive and metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* strains. **Pharmacol Res** 2002; 46(5): 469-72.
- [23] Land KM, Clemens DL, Johnson PJ. Loss of Multiple Hydrogenosomal Proteins Associated with Organelle Metabolism and High-Level Drug Resistance in Trichomonads. **Exp Parasitol** 2001; 97(2): 102-10.

- [24] Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 2003; 13(4): 239-49.
- [25] Mayta H, Gilman RH, Calderon MM, Gottlieb A, Soto G, Tuero I, et al. 18s ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomona vaginalis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7): 2683-7.
- [26] Upcroft JA, Delgadillo-Correa MG, Dunne RL, Sturm AW, Johnson PJ, Upcroft P. Genotyping *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 2006; 36(7): 821-8.
- [27] Pal D, Banerjee S, Cui J, Schwartz A, Ghosh SK, Samuelson J. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* Enzymes Activate Metronidazole (Nitroreductases) and Inactivate Metronidazole (Nitroimidazole Reductases). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(2):458-64.
- [28] Upcroft JA, Upcroft P. Drug resistance in *Giardia*. *Parasitol Today* 1993; 9: 187-90.
- [29] Upcroft JA, Campbell RW, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P. Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 73-6.