View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره پنجم، شماره ۱/ ۹-۴/ بهار ۱۳۸۲

تشخیص عفونت *تریکوموناس واژینالیس* با استفاده از روش PCR

دکتر محمد ربانی*، بهنام صابری**، دکتر عباس جعفریان دهکردی*، دکتر فرحناز مردانیان***

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:53 +0430 on Monday September 4th 2017

چکیده:

عفونت تریکوموناس واژینالیس یکی از شایع ترین عوامل ایجاد کننده بیماریهای منتقل شونده غیر ویروسی جنسی است. مهم ترین روش برای تشخیص تریکوموناس واژینالیس در حال حاضر تشخیص میکروسکوپی انگل با استفاده از تست لام مرطوب می باشد که حساسیت این روش تقریبا ۶۰٪ است. مطالعه میکروسکوپی کشت های اختصاصی حاوی انگل، حساسیت را تا حدودی افزایش داده اما یکی از مشکلات استفاده از محیط های کشت، عدم امکان آنالیز سریع و دقیق آن می باشد. در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی (Polymerase Chain Reaction =PCR) بر آن شدیم تا عفونت تریکوموناس واژینالیس را در بیماران مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان شهید بهشتی اصفهان مورد بررسی قرار داده و نتایج آن را با تست های لام مرطوب و مشاهده کلینکی مقایسه کنیم. سوآپ واژینالی از ۲۴ زن مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان شهید بهشتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان گرفته شد. هر یک از نمونه های گرفته شده به دو قسمت تقسیم گردید. یک قسمت آن فوراً با تست لام مرطوب و در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت و قسمت دیگر در محلول (Phosphate Buffered Saline=PBS) به صورت سوسپانسیون تهیه شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل گردید. سوسپانسیون PBS حاصله جهت انجام واکنش PCR اختصاصی برای تریکوموناس واژینالیس مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه ۲۴ نمونه اخذ شده به دو دسته ۸ و ۱۶ تایی تقسیم شدند. دسته اول با دو تست لام مرطوب و PCR و دسته دوم با تشخیص کلینیکی (توسط پزشک متخصص زنان) و تست PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های اخذ شده در گروه اول با هر دو تست لام مرطوب و PCR مثبت تشخیص داده شدند. در گروه دوم، ۹ نمونه از ۱۶ نمونه با تست PCR مثبت تشخیص داده شدند که از میان این تعداد نمونه، ۸ عدد در طی بررسی و تشخیص کلینیکی مثبت تشخیص داده شده بودند. در مورد گروه اول حساسیت تست PCR برابر ۱۰۰٪ (۸ عدد از ۸ نمونه) و اختصاصی بودن آن نیز ۱۰۰٪ بود (۸ عدد از ۸ نمونه). در این گروه حساسیت تست لام مرطوب ۱۰۰٪ (۸ عدد از ۸ نمونه) و اختصاصی بودن آن نیز ۱۰۰٪ (۸ عدد از ۸ نمونه) بود. در مورد گروه دوم حساسیت تست PCR برابر ۱۰۰٪ (۹ عدد از ۹ نمونه) و اختصاصی بودن آن نیز ۱۰۰٪ (۹ عدد از ۹ نمونه) بود. در این گروه حساسیت تشخیص کلینیکی ۸۸/۹٪ (۸ عدد از ۹ نمونه) و اختصاصی بودن آن ۵۰٪ (۸ عدد از۱۶ نمونه) بود.

واژه های کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، واکنش زنجیره ای پلیمراز، تشخیص.

*استادیار گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی: *اصفهان، دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی و علوم دارویی – گروه فارماکولوژی – تلفن: ۷۹۲۲۶٤٦ — ۰۳۱۱ (مؤلف مسئول).*

**کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی و علوم دارویی.

***استادیار گروه زنان و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:53 +0430 on Monday September 4th 2017

مقدمه:

تریکوموناس واژینالیس در سرتاسر جهان تقریباً هر ساله ۱۸۰ میلیون عفونت جدید ایجاد می کند. این انگل یکی از شایع ترین عوامل ایجاد کننده بیماری های منتقل شونده غیر ویروسی جنسی است (۱۲،۱۵،۱۶). آلودگی با تریکوموناس واژینالیس در زنان می تواند باعث التهاب واژن، سرویکس و مجاری ادراری گردد (۱۷). تخمین زده می شود که در حدود ۱۰ تا ۵۰ درصد از عفونت های ناشی از تریکوموناس واژینالیس در زنان بدون علامت بوده (۳) و این درصد در مردان حتی می تواند بالاتر باشد. این انگل به عنوان کوفاکتوری در انتقال ویروس نقص ایمنی انسانی و سایر عفونت های منتقل شونده جنسی عمل می کند. رابطه بین تریکوموناس واژینالیس و سرطان رحم اخیراً مورد بررسی قرار گرفته است (۲۱). مهم ترین روش برای تشخیص تریکوموناس واژینالیس در حال حاضر تشخیص میکروسکوپی انگل با استفاده از تست لام مرطوب می باشد که حساسیت این روش تقریباً ۶۰ درصد است (۶). مطالعه میکروسکوپی کشت های اختصاصی حاوی انگل، حساسیت را به ۸۵ تا ۹۵ درصد رسانده است (۷،۸،۱۸). در هر صورت کیفیت این تست های تشخیصی به میزان زیادی بستگی به تخصص و تجربه فردی که با میکروسکوپ کار می کند و همچنین کیفیت نمونه دارد، بنابراین نیاز به بهبود روش های تشخیص شدیداً احساس می شود. در مورد محیط های کشت، علاوه بر محیط کشت تریکوسل برگ-کوپفر محیط های کشت دیگری نیز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته اند. حساس ترین این محیط های کشت محیط کشت تغییر یافته دیاموند است (۷،۸). به هر حال شرایط مطلوب برای کشت انگل متغیر بوده و کارآیی آن تحت تاثیر زمان های انکوباسیون مختلف قرار می گیرد. یکی از مشکلات استفاده از محیط های کشت، عدم امکان آنالیز سریع و دقیق آن می باشد (۲،۵،۱۴،۱۸).

رنگ آمیزی با آکریدین نارنجی روش رنگ آمیزی غیر اختصاصی اسید نوکلئیک است که می تواند برای تشخیص تریکوموناس واژینالیس در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد استفاده قرار گیرد (۱). در نهایت روش های مولکولی برای تشخیص این انگل مورد استفاده قرار گرفته اند که از بین آنها می توان به PCR، Fluorescent in situ hybridization و Oligonucleotide probing اشاره نمود. در این مطالعه روش تشخیص تریکوموناس واژینالیس با تکنیک PCR در نمونه های سوآپ واژینال بیماران مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان شهید بهشتی اصفهان مورد بررسی قرار گرفت که برای اولین بار در ایران انجام گرفته است.

مواد و روشها:

از ۲۴ زن مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان شهید بهشتی اصفهان که مشکوک به عفونت تریکوموناس واژینالیس بودند نمونه سوآپ واژینال گرفته شد و هر نمونه به دو قسمت تقسیم گردید. یک قسمت جهت انجام تست لام مرطوب برای تشخیص انگل تریکوموناس فوراً مورد استفاده قرار گرفت و قسمت دیگر در۱/۵ میلی لیتر بافر نگهدارنده PBS استریل (pH ۷/۲) قرار داده شد و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت انجام PCR اختصاصی برای تشخیص انگل منتقل گردید. نمونه ها تا هنگام انجام آزمایش که حداکثر یک روز به طول انجامید در یخچال نگهداری شدند. برای جدا سازی DNA، ابتدا هر نمونه دو بار با بافر PBS در دور ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه شستشو داده شد. بر روی رسوب حاصله، بافر لیز کننده حاوی گلوکز استریل (۴۰٪)، EDTA (۰/۵مولار، pH ۸)، Tris-HCl (۱ مولار، pH ۸)، NaOH (۱ مولار)، sodium dodecyl sulfate

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:53 +0430 on Monday September 4th 2017

(SDS۱۰٪)، استات پتاسیم (۵ مولار) و اسید استیک (۱۱/۵٪) اضافه شده و پس از سانتریفوژ (۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۵۰۰۰) محلول رویی به لوله جدیدی منتقل گردید. به محلول رویی ۰/٦ حجم ایزوپروپانول اضافه و پس از مخلوط شدن در دور rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله که حاوی DNA استخراج شده انگل می باشد دو بار با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو (سانتریفوژ rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) داده شد. رسوب حاصله به مدت یک شبانه روز در معرض هوا قرار گرفته و پس از خشک شدن DNA، محتویات لوله در ۳۰ میکرو لیتر Tris-EDTA (۱۰ mM Tris, 1mM EDTA pH ۷/۵،۱۰) حل شد و تا زمان انجام PCR در یخچال نگهداری گردید.

برای انجام PCR یک جفت پرایمر به نام های BTUB9 و BTUB2 مورد استفاده قرار گرفت که ترادف نوکلئوتیدی این پرایمرها به صورت زیر است:

BTUB9: 5 CAT TGA TAA CGA AGC TCT TTA CGA T 3
BTUB2: 5 GCA TGT TGT GCC GGA CAT AAC CAT 3

واکنش های PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شدند. مخلوط PCR شامل بافر PCR (10×) (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, 50 mM $MgCl_2$)، ۵ میکرولیتر از DNA نمونه، ۲ واحد از DNA Taq Polymerase، دزوکسی ریبونوکلئوتید تری فسفاتهای ۵ میکرومولار و ۲۵ پیکومول از هر پرایمر بود. هر واکنش PCR شامل ٦۰ سیکل بود که دناتوراسیون (denaturation) در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه انجام شد، آنیلینگ (annealing) در ٦۲ درجه سانتیگراد شروع و در ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه خاتمه یافت و اکستنشن (extension) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام پذیرفت. یک مرحله دناتوراسیون، پیش از سیکل اصلی در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۵ ثانیه انجام گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. الکتروفورز در بافر (50mMTris,50mMBorate,1mMEDA)(0.5×)TBE در جریان ثابت ۸۰ ولت انجام پذیرفت. ژلها در زیر نور UV بررسی شده و عکس برداری گردیدند.

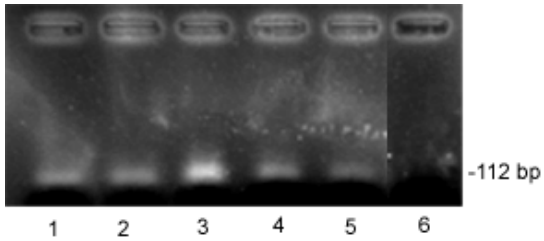
نتایج:

۲٤ نمونه سوآپ واژینال گرفته شده از بیماران به دو گروه ۸ و ۱٦ تایی تقسیم شدند. گروه اول با دو تست لام مرطوب و PCR و گروه دوم با تشخیص کلینیکی و تست PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد گروه اول تمامی ۸ نمونه مورد بررسی با تست PCR مثبت تشخیص داده شدند. همچنین تمامی آنها در تست لام مرطوب نیز مثبت تشخیص داده شدند. در گروه دوم از ۱٦ نمونه اخذ شده، ۹ نمونه در تست PCR مثبت تشخیص داده شدند که از این تعداد تنها ۸ نمونه با تشخیص کلینیکی مثبت شناخته شده بودند.

با توجه به نتایج فوق در مورد گروه اول حساسیت تست PCR برابر ۱۰۰ درصد (۸ عدد از ۸ نمونه) و اختصاصی بودن آن نیز ۱۰۰ درصد بود (۸ عدد از ۸ نمونه). در این گروه حساسیت تست لام مرطوب نیز ۱۰۰ درصد (۸عدد از ۸ نمونه) و اختصاصی بودن آن نیز ۱۰۰ درصد (۸ عدد از ۸ نمونه) بود. در مورد گروه دوم حساسیت تست PCR برابر با ۱۰۰ درصد (۹ عدد از ۹ نمونه) و اختصاصی بودن آن نیز ۱۰۰ درصد (۹ عدد از ۹ نمونه) بود. در این گروه حساسیت تشخیص کلینیکی برابر ۸۸/۹ درصد (۸ عدد از ۹ نمونه) و اختصاصی بودن آن ۵۰ درصد (۸ عدد از ۱٦ نمونه) بود.

جهت مشاهده بهترین و مشخص ترین باندها مقادیر متفاوت DNA (۲/۵، ۵، ۷/۵،۱۰ و ۱۲/۵ میکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که مقادیر ۵ و ۷/۵ میکرولیتر از DNA باندهای مناسب تری

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:53 +0430 on Monday September 4th 2017



تصویر شماره ۱: *تشخیص تریکوموناس واژینالیس با استفاده از روش PCR و پرایمرهای 2 و 9 BTUB. خطوط ۱،۲،۳ و ٤ باندهای مربوط به مقادیر ۲/۵، ۷/۵،۵ و ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده از نمونه های مختلف بیمار را نشان می دهند. خط ۵ باند مربوط به ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده از محیط کشت رانشان می دهد. کنترل منفی برای نمونه های ذکر شده در خط ٦ نشان داده شده است.*

ایجاد می کنند (تصویر شماره ۱).

بحث:

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تست PCR دارای حساسیت و اختصاصی بودن قابل مقایسه با تست لام مرطوب بود. اما در مقایسه با تشخیص کلینیکی، تست PCR از حساسیت و اختصاصی بودن بسیار بالاتری برخوردار بود. بنابراین تنها استناد به تشخیص کلینیکی دارای پیگیری و درمان عفونت ناشی از تریکوموناس واژینالیس به هیچ وجه کافی نبوده و در مقایسه با تشخیص کلینیکی روش PCR برای تشخیص انگل تریکوموناس بسیار حساس تر و اختصاصی تر است. در مورد یکسان بودن حساسیت و اختصاصی بودن تست لام مرطوب با تست PCR در این تحقیق می توان به این موضوع اشاره کرد که چون هدف این طرح غربالگری بیماران مبتلا به عفونت تریکوموناس واژینالیس نبوده بلکه هدف پایه گذاری یک روش حساس تر و دقیق تر از سایر روش های موجود برای تشخیص این انگل بوده است. بنابراین تعداد نمونه های انتخاب شده اختلاف مشخصی را در میزان حساسیت و اختصاصی بودن بین دو روش تست لام مرطوب و PCR نشان نمی دهد با این وجود چون اختصاصی بودن و حساسیت ۱۰۰ درصد در مورد تست PCR به دست آمده بنابراین می توان نتیجه گرفت که این روش برای تشخیص انگل تریکوموناس واژینالیس بسیار دقیق و حساس می باشد. از سوی دیگر حساسیت و اختصاصی بودن بالای به دست آمده برای تست لام مرطوب تنها در شرایطی است که کارشناس آزمایشگاه دارای تجربه و مهارت کافی در بررسی لامهای مورد آزمایش بوده و قادر به تشخیص حتی یک انگل در محیط لام نیز باشد (۱۰)، در صورتی که در بعضی از موارد چنین دقتی قابل دستیابی نبوده و خطای شخص آزمایش کننده و ابزار آزمایشگاهی باعث کاهش اعتبار تست لام مرطوب می گردند. با توجه به اینکه انجام تست لام مرطوب بر روی انگل با نظارت مستقیم مجریان طرح انجام پذیرفته و این نظارت در اکثر موارد معمول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست بنابراین حساسیت و اختصاصی بودن قابل مقایسه تست لام مرطوب با روش PCR در این تحقیق را علاوه بر مورد ذکر شده در زمینه تعداد نمونه های مورد بررسی تنها می توان به نحوه کنترل دقیق اعمال شده بر انجام این تست نسبت داد. بنابراین بر این نکته تاکید می گردد که نظارت مستمر مجریان طرح بر انجام تست لام مرطوب که توسط کارشناس آزمایشگاه انجام گردید باعث یکسان شدن نتا یج حاصل از این تست و روش PCR گردید. به طوری که در شرایط معمول خصوصاً زمانی که تعداد انگل در نمونه گرفته شده بسیار کم بود در اکثر موارد تست لام مرطوب منفی کاذب گزارش می گردید. ضمن اینکه با توجه به تعداد نمونه های کم مورد مطالعه در این تحقیق که به دلیل مشکلات موجود در اخذ نمونه های بیماران انجام پذیرفته است باید به این نکته توجه نمود که یکسان بودن نتایج تست لام مرطوب و PCR عملاً برای تعداد نمونه هایبیشتر یکسان نخواهد بود و تمامی این موارد تاییدی بر قدرت بسیار بالاتر PCR نسبت به تست لام مرطوب در تشخیص

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:53 +0430 on Monday September 4th 2017

عفونت تریکوموناس واژینالیس می باشد.

مطالعات انجام شده نشان داده است که تنها ۳۶ درصد از بیمارانی که عفونت تریکوموناس واژینالیس در آنها با روش های دقیق تر اثبات شده بود با تست لام مرطوب تشخیص داده می شوند و تنها ۵۲ درصد از این افراد با مترونیدازول مورد درمان قرارگرفتند (۱۵). بنابراین جهت کاهش ایجاد مشکلات درمان و جلوگیری از انتقال انگل به شریک جنسی فرد مبتلا و همچنین تشخیص حاملین بدون علامت انگل و جلوگیری از انتقال ویروس هایی مثل HIV نیاز است که یک روش تشخیص دقیق مانند PCR برای این انگل مورد استفاده قرار گیرد (۲۰،۱۹،۱۳،۱۰،۹،٤).

حساسیت روش PCR به حدی است که قادر به تکثیر حتی یک انگل تریکوموناس می باشد (۱۱). پرایمرهای BTUB9,2 برای انجام PCR به صورت کاملاً اختصاصی عمل می کنند زیرا هیچ محصول DNA دیگری با سایر پروتوزوآها یا پاتوژن های واژن با استفاده از این جفت پرایمر قابل تشخیص نیست. در ژن تریکوموناس واژینالیس چندین کپی از سه ژن کد کننده پروتئین های بتا توبولین (بتا توبولین ۱و۲و۳) وجود دارند (۱۱) که پرایمرهای BTUB9,2 یک قسمت ثابت را در هر یک از این سه ژن مورد شناسایی قرار داده و به آن متصل می شود این مسئله موجب افزایش حساسیت روش PCR با استفاده از این پرایمرها می گردد. ویژگی پرایمرها به درجه حرارت آنیلینگ بستگی دارد. با درجه حرارت های آنیلینگ بالاتر ویژگی پرایمرها بالاتر است (۱۵). با توجه به موارد ذکر شده در فوق پیشنهاد می شود روش PCR جایگزین سایر روش های تشخیص انگل تریکوموناس واژینالیس گردد و انجام این روش هم اکنون در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان امکان پذیر است.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش با حمایت حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفته است که بدینوسیله از مسئولین مربوطه تشکر و قدردانی می گردد. همچنین از سرکار خانم صدیقه صادقی که در انجام این طرح کمال مساعدت و همکاری را نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

References:

1. Bickley LS.; Krisher KK.; Punsalang AJR.; Trupei MA.; et al. Comparison of direct fluorescent antibody, acridine orange, wet mount and culture for detection of *Trichomonas vaginalis* in women attending a public sexually transmitted diseases clinic. Sex Transm Dis, 16: 127-31, 1989.

2. Borchardt KA.; Hernandez V.; Miller S.; Loaiciga K.; et al. A clinical evaluation of *trichomoniasis* in Sanjose, Costarica using the InPouch TV test. Genitourin Med, 68: 328-30, 1992.

3. Burstein GR.; Zenilman JM. Nongonococcal urethritis: a new paradigm. Clin Infect Dis, 28(Suppl 1): 66-73, 1999.

4. Cotch MF.; Pastorek JG.; Nugent RP.; Hilslier SL.; et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. Sex Transm Dis, 24: 353-60, 1997.

5. Draper D.; Parker R.; Patterson E.; Jones W.; et al. Detection of *trichomonas vaginalis* in pregnant women with the InPouch TV culture system. J Clin Microbiol, 31: 1016-18, 1993.

6. Fouts AC.; Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J Infect Dis, 141: 137-43, 1980.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:53 +0430 on Monday September 4th 2017

7. Gelbart SM.; Thomason JL.; Osypowski PJ.; James JA.; et al. Comparison of diamond's medium modified and kupferberg medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 27: 1095-6, 1989.

8. Gelbart SM.; Thomason JL.; Osypowski PJ.; Kellett AV.; et al. Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. J Clin Microbiol, 28: 962-4, 1990.

9. Hardy PH.; Hardy JB.; Nell EE.; Graham DA.; et al. Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. Lancet, 2: 333-7, 1984.

10. Heine P.; McGregor JA. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. Clin Obstet Gynecol, 36: 137-44, 1993.

11. Katiyar SK.; Edlind TD. Beta-tubulin genes of *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol, 64: 33-42, 1994.

12. Kengne P.; Veas F.; Vidal N.; Rey JL.; et al. *Trichomonas vaginalis*: repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain reaction diagnosis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 40: 819-31, 1994.

13. Laga M.; Manoka A.; Kivuvu M.; Malele B.; et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. AIDS, 7: 95-102, 1993.

14. Levi MH.; Torres J.; Pina C.; Klein RS. Comparison of the InPouch TV culture system and diamond's modified medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 35: 3308-10, 1997.

15. Madico G.; Quinn TC.; Rompalo A.; McKee KT.; et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. J Clin Microbiol, 36: 3205-10, 1998.

16. Petrin D.; Delgaty K.; Bhatt R.; Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis.* Clin Microbiol Rev, 11: 300-17, 1998.

17. Riley DE.; Roberts MC.; Takayama T.; Krieger JN. Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 30: 465-72, 1992.

18. Schmid GP.; Matheny LC.; Zaidi AA.; Kraus SJ. Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions. J Clin Microbiol, 27: 1230-3, 1989.

19. Sobel JD. Vaginitis. N Engl J Med, 337: 1896-903, 1997.

20. Soper DE.; Bump RC.; Hurt WG. Bacterial vaginosis and *trichomoniasis vaginitis* are risk factors for cuff cellulitis after abdominal hysterectomy. Am J Obstet Gynecol, 163: 1016-21, 1990.

21. Zhang ZF.; Graham S.; Yu SZ.; Marshall J.; et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer: A prospective study in China. Ann Epidemiol, 5: 325-32, 1995.