

Trichomonas vaginalis Klinik İzolatlarında İn Vitro Metronidazol Direncinin Araştırılması

Investigation of In Vitro Metronidazole Resistance in the Clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis*

Hatice ERTABAKLAR¹, Senem YAMAN KARADAM², Erdoğan MALATYALI¹, Sema ERTUĞ¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

¹ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Aydın, Turkey.

² Özel Sada Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

² Sada Private Hospital, Microbiology Laboratory, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 12.05.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.09.2016

ÖZ

Trichomonas vaginalis, ürogenital yerleşimli, kamçılı, anaerobik bir protozoon olup dünya genelinde görülen önemli bir vajinit etkenidir. Metronidazol, trikomoniyaz tedavisinde en sık tercih edilen ilaç olmakla birlikte, birçok ülkede metronidazole dirençli izolatların varlığı bildirilmiş ve yeni tedavi yaklaşımlarına gereksinim olduğu vurgulanmıştır. Ülkemizde farklı etken maddelerin *T.vaginalis* canlılığına etkisinin araştırıldığı birçok çalışma olmasına karşın, metronidazol direncinin tek bir izolatta araştırıldığı sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, semptomatik trikomoniyazlı kadın hastalardan izole edilen suşlarda in vitro metronidazol direncinin araştırılması ve duyarlı izolatlarda minimum öldürücü dozun (MLD) belirlenmesidir. Çalışma kapsamında; Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına 2009-2014 yılları arasında *T.vaginalis* tanısı için gönderilen semptomatik hastaların vajinal akıntı örneklerinden, %10 fetal dana serumlu triptikaz-mayamaltos besiyerinde çoğalan izolatlar kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen toplam 40 adet *T.vaginalis* izolatu kriyoprezervasyon yapılarak saklanmış ve çalışma öncesinde canlandırılarak kullanılmıştır. *T.vaginalis* trofozoitleri farklı konsantrasyonlarda (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 µg/ml) metronidazol ile hem aerobik hem de anaerobik koşullarda inkübe edilerek canlılıkları faz-kontrast mikroskopuyla incelenmiştir. Hareket gözlenmeyen izolatlar daha sonra yeni besiyerine alınıp canlılıkları kontrol edilmiştir. Anaerobik koşullarda 15 µg/ml'nin üzeri, aerobik koşullarda ise 75 µg/ml'nin üzeri metronidazol konsantrasyonlarında 48 saatlik inkübasyon sonrası canlılık gözlenenler dirençli olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda değerlendirilen 40 *T.vaginalis* izolatından üçünün (%7.5) metronidazole dirençli olduğu belirlenmiştir. Metronidazole duyarlı izolatlar için MLD değerlerinin ortalaması aerobik ve anaerobik koşullarında sırasıyla 27.17 µg/ml ve 7.75 µg/ml olarak saptanmıştır. Çalışmamızda bulunan %7.5'lik metronidazol direncinin, diğer ülkelerde bildirilenlerin bir çoğundan daha yüksek olduğu görülmüştür.

İletişim (Correspondence): Ar. Gör. Erdoğan Malatyali, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Merkez Kampüsü, Kepez Mevkii Efeler, 09010 Aydın, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 256 218 2000/3348, **E-posta (E-mail):** erdogan.malatyalı@adu.edu.tr

Bu çalışma, sadece Aydın ilindeki hastalardan elde edilen izolatlarla sınırlı kalmasına karşın, ülkemizde metronidazole dirençli *T.vaginalis* izolatların varlığını göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Türkiye'nin diğer bölgelerinde gerçekleştirilecek benzer çalışmalara ihtiyaç duyulmakta olup, bu veriler genel değerlendirmelerin yapılmasına ve tedavide yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca trikomoniyazda, in vitro metronidazol direnci ve tedaviye klinik yanıtın birlikte değerlendirildiği araştırmaların da gerekli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Trichomonas vaginalis*; metronidazol; direnç; Türkiye.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis, a flagellated, urogenital anaerobic protozoon is reported as an important cause of vaginitis with a global distribution. Although metronidazole is the primary choice of drug for the treatment of trichomoniasis, the presence of resistant isolates from many different countries highlights the need of novel drugs for the treatment. Many studies from Turkey mostly dealing with the in vitro effects of compounds and natural products against *T.vaginalis* have been reported, however, only one study has been encountered searching the metronidazole resistance in a single *T.vaginalis* isolate. The aim of this study was to determine the in vitro metronidazole resistance and minimum lethal concentrations (MLCs) of the isolates from symptomatic cases. *T.vaginalis* strains isolated from vaginal discharge samples of symptomatic women that were sent to Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Research and Training Hospital Parasitology Laboratory, between 2009-2014 period, were included in the study. The strains were isolated by the inoculation of samples into trypticase-yeast-maltose medium supplemented with 10% fetal calf serum. A total of 40 *T.vaginalis* isolates stored by cryopreservation were revived before the experiments. *T.vaginalis* trophozoites were incubated with different concentrations of metronidazole (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 µg/ml) and the viability of cells were examined in both aerobic and anaerobic conditions under phase contrast microscope. Additionally, non-motile isolates were further inoculated into fresh media and viability was checked. The wells containing motile trophozoites after 48 hours of incubation with 15 µg/ml and/or higher metronidazole concentration in anaerobic condition and 75 µg/ml and/or higher metronidazole concentration in aerobic conditions were determined as resistant isolates. Of the 40 *T.vaginalis* isolates three (7.5%) were resistant to metronidazole. MLC mean values of metronidazole-sensitive isolates were 27.17 µg/ml in aerobic and 7.75 µg/ml in anaerobic conditions. The rate of metronidazole resistance detected in this study was higher than most of reports from different countries. Despite being limited to the isolates from Aydın province (located at Aegean region of Turkey), the present study has a value as it presented the existence of metronidazole-resistant isolates in Turkey for the first time. More research from other parts of Turkey is needed to better understand the metronidazole resistance at a national scale and to investigate novel strategies for the treatment. Moreover, further studies need to be carried out in order to clarify the relationship between clinical treatment response and in vitro metronidazole resistance in trichomoniasis.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; metronidazole; resistance; Turkey.

GİRİŞ

Trichomonas vaginalis'in etken olduğu trikomoniyaz, dünya genelinde sık görülen cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardan biridir. Her yıl 276.4 milyon yeni olgunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir¹. Türkiye'de son yıllarda yapılan çalışmalarda ise farklı çalışma gruplarında *T.vaginalis* görülme sıklığı %0.3 ile %9 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir^{2,3}. Trikomoniyaz, genellikle asemptomatik seyretmekle birlikte enfekte kişi-

lerde vajinit, üretrit ve servisit gelişebilmektedir. Ayrıca kadınlarda adneksler, endometriyum, skene ve bartolin bezlerini, erkeklerde epididim ve prostatı da enfekte ederek ciddi komplikasyonlara yol açabildiği ve sperm sayısını azaltabildiği bildirilmektedir⁴. Parazit, gebelerde erken doğum ve düşük doğum ağırlıklı bebek ve insan immün yetmezlik virüsünün (HIV) bulaş riskinde artış ile de ilişkilendirilmiştir⁵. Trikomoniyaz tanısında, uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle sıklıkla kullanılan yöntem direkt mikroskopik inceleme olmakla birlikte, boyama, kültür ve serolojik yöntemler ile son yıllarda giderek artan oranda moleküler yöntemler de tanı amaçlı olarak kullanılmaktadır⁶.

Trikomoniyaz tedavisinde önerilen ve sıklıkla kullanılan ilaçlar 5-nitroimidazol bileşikler olan metronidazol ve tinidazoldür. Metronidazol daha yaygın kullanılmakla birlikte, tinidazolün daha etkili olduğu ve daha iyi tolere edildiği bildirilmektedir⁷. Bu bileşiklerin nitro gruplarının redüklenmesiyle oluşan ara metabolitler ve serbest radikaller, DNA'ya bağlanarak hücre ölümüne yol açmaktadır⁸. Metronidazol plasentadan geçebildiği için özellikle ilk trimesterde kullanılmaması önerilmektedir; ayrıca in vivo çalışmalarda mutagen ve karsinojen olduğu bildirilmiştir⁹.

Metronidazole direçli olguların varlığı, birçok ülkede hem klinik hem de in vitro çalışmalarla gösterilmiştir¹⁰. Direnç mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hidrogenozom enzimlerinin regülasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, nitroredüktaz genlerinde belirlenen tek nokta mutasyonları ile direnç arasında ilişki bulunmuştur¹¹. Metronidazol direnci olan hastaların sadece %80'inde, daha uzun tedavi süresi ve daha yüksek doz ile klinik etki sağlanmış; ayrıca bu hastalarda yüksek doza bağlı yan etki ve alerjik reaksiyon gözlenme olasılığı artmıştır. Metronidazole dirençli bu izolatlar için alternatif ilaçlara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir^{12,13}. Yapılan literatür taramasında, tek bir *T.vaginalis* izolatında metronidazol direncinin araştırıldığı bir çalışma¹³ dışında, ülkemizde bu konu ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden izole edilen *T.vaginalis* suşlarında in vitro metronidazol direncinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

T.vaginalis izolatları

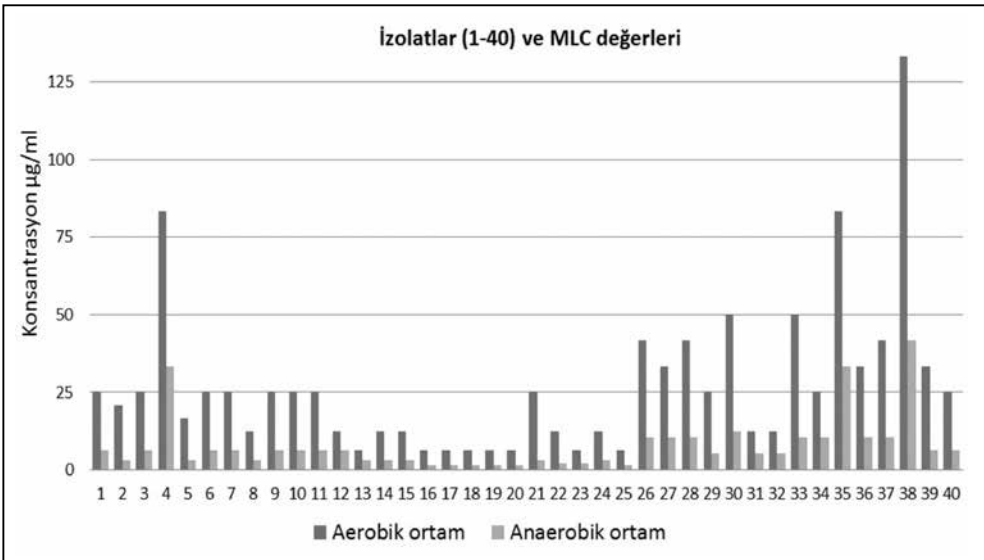
Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan (Protokol No: 2016/805) bu çalışmaya, 2009-2014 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına gönderilen, trikomoniyaz şüpheli hastalara ait vajinal akıntı örneklerinden izole edilen *T.vaginalis* suşları dahil edildi. Parazitin izolasyonu, örneklerin %10 fetal dana serumlu (FBS) triptikaz-maya-maloz (TYM) besiyerine ekilmesi ile yapıldı. Elde edilen *T.vaginalis* izolatları kriyoprezervasyon yapılarak saklandı. Kriyoprezervasyon için %6 FBS ve %10 dimetisülfoksit (DMSO) içeren TYM besiyeri kullanıldı. Kriyoprezervasyon çözeltisine alınan izolatlar +4°C'de 15 dakika ve -20°C'de 2 saat tutulduktan sonra -80°C'ye ve son olarak azot tankına konularak saklandı. Bu şekilde saklanan toplam 40 adet *T.vaginalis* izolatı çalışma yapılacağı zaman canlandırılarak kullanıldı. İn vitro ilaç denemelerinde parazit, agarsız TYM besiyerinde çoğaltıldı.

In vitro ilaç deneyleri

Metronidazol, etken madde olarak temin edildi ve son konsantrasyonlar 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 µg/ml olacak şekilde TYM besiyeri ile sulandırıldı. Çözücü olarak %100 DMSO ve deneyler için kapaklı 96 çukurlu U tabanlı steril hücre kültürü plakları kullanıldı. Plaklar bir saat 37°C'de bekletildikten sonra 10⁴/ml olacak şekilde *T.vaginalis* trofozoitleri eklendi ve 37°C'de aerobik ve anaerobik ortamda 48 saat inkübe edildi. Anaerobik ortam, gaz poşeti Anaerocult (Merck, ABD) kullanılarak anaerobik kavanoz içerisinde oluşturuldu. Plaklar, ters faz kontrast mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirme sonrası, hareketli parazit görülmeyen çukurlardan örnek alınarak taze besiyeri içeren çukurlara aktarıldı ve üreme kontrolü yapıldı. Kültür plağına aktarıldıktan 48 saat sonra hareketli parazit görülmeyen en düşük doz MLD (minimum letal doz) olarak değerlendirildi ve aynı izolatta farklı MLD saptandığında ortalaması alındı. Her test üç kez tekrarlandı. Kontrol olarak, iki adet çözücü içeren ve ilaçsız besiyeri kullanıldı. Anaerobik ortamda 48 saatte 15 µg/ml'nin üzeri ve aerobik ortamda 75 µg/ml'nin üzeri dirençli olarak kabul edildi¹⁴.

BULGULAR

Metronidazol ile yapılan etkinlik değerlendirmesinde, 40 adet *T.vaginalis* izolatından 3 (%7.5)'ünde hem aerop hem de anaerop ortamda direnç olduğu tespit edilmiştir. Diğer 37 izolatın ise değişen oranlarda metronidazole duyarlı olduğu izlenmiştir. İzolatların MLD konsantrasyonlarının aerobik ortamda 6.25-133.3 µg/ml arasında (ortalama: 27.175 µg/ml), anaerobik ortamda ise 1.56-41.6 µg/ml arasında (ortalama: 7.75 µg/ml) değiştiği saptanmıştır. Metronidazole duyarlı *T.vaginalis* izolatlarının MLD değerleri Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. *Trichomonas vaginalis* izolatlarının metronidazol MLD değerleri.

TARTIŞMA

Cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyon hastalığı olan trikomoniyaz, kozmopolit dağılım göstermektedir. Trikomoniyaz tedavisinde nitroimidazol grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmakta olup tek doz tedavi sonucu iyileşme sağlandığı (%85-95), ancak HIV birlikteliği gibi bazı durumlarda tedavi süresinin yedi güne kadar uzayabildiği bildirilmektedir¹⁰. Trikomoniyazın sistematik tedavisi için 1960 yılında piyasaya sürülen ilk nitroimidazol türevi metronidazole karşı dirençli olguların varlığı uzun yıllardır birçok ülkeden rapor edilmektedir¹⁴⁻²¹. Bu araştırmalar incelendiğinde çalışılan bölgeye ve seçilen olgulara bağlı olarak birbirinden oldukça farklı oranlarda metronidazol direncinin tespit edildiği görülmektedir. Meingassner ve arkadaşları¹⁵, 1978 yılında yaptıkları çalışmada 94 *T.vaginalis* izolatının tamamının metronidazole duyarlı olduğunu saptamışlardır. Buna karşın Perez ve arkadaşları¹⁶, İspanya'da 1995-1999 yılları arasında hayat kadınları ve jinekoloji polikliniğine başvuran hastalardan izole ettikleri 91 *T.vaginalis* suşundan ikisinin (%2.4) metronidazole dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, direnç sınırını 50 µg/ml olarak kabul etmiş ve bunu düşük olarak tanımlamışlardır¹⁶. İngiltere'de yapılan retrospektif bir çalışmada, standart metronidazol dozu ile tedavi edilemeyen trikomoniyaz olguları değerlendirilmiş; 1999'da %0.38 olan dirençli olgu oranının 2002'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstererek %3.5'e yükseldiği bildirilmiştir¹⁷. Schmid ve arkadaşları¹⁸, 82 *T.vaginalis* izolatının ikisinin (%2.4) metronidazole dirençli olduğunu ortaya koymuştur. Schwebke ve Barrientes¹⁹, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde *T.vaginalis*'in in vitro metronidazol direncini %9.6 olarak bulmuşlardır. Amerika'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada da, jinekoloji polikliniğinde pelvik muayenesi yapılan kadınlardan izole edilen *T.vaginalis* suşlarının %4.3'ünde düşük düzey (50-100 µg/ml) metronidazol direnci saptandığı bildirilmiştir²⁰. Bu çalışmada MLD'si 50 µg/mL'den büyük olan izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir²⁰.

Çalışmamızda, *T.vaginalis* izolatlarının MLD konsantrasyonları, aerobik ortamda ortalama 27.175 µg/ml, anaerobik ortamda ise ortalama 7.75 µg/ml olarak saptanmıştır. Araştırmacılar tarafından, birbirinden farklı metronidazol konsantrasyonları direnç sınırı olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda ise, Meri ve arkadaşları¹⁴ tarafından bildirilen, aerobik ortam için 15 µg/ml ve anaerobik ortam için 75 µg/ml değerleri kullanılmıştır. Matini ve arkadaşları²¹, İran'da 50 *T.vaginalis* izolatından birinde in vitro metronidazol direnci saptadıklarını ve MLD ortalamasının anaerobik koşullarda 1.95 µg/ml olduğunu bildirmişlerdir²¹. Ülkemizden Gökmen ve arkadaşları¹³, tek bir klinik *T.vaginalis* izolatının metronidazol, ornidazol, pantoprazol veesomeprazole karşı in vitro duyarlılığını araştırmış; metronidazol için minimum letal konsantrasyon değerini 100 µg/ml olarak saptamış, buna göre izolatın duyarlı olduğunu bildirmişlerdir¹³. Ülkemizde *T.vaginalis*'in metronidazol direncinin araştırıldığı ilk kapsamlı çalışma olma özelliğini taşıyan bizim çalışmamızda ise, klinik *T.vaginalis* izolatlarında metronidazol direnci %7.5 (3/40) olarak saptanmıştır. Bu bulgu, ABD¹⁹ (%9.6) hariç, diğer ülkelerden^{16-18,20} bildirilen direnç oranlarından yüksektir. Ancak burada tartışılan çalışmalarda kullanılan yöntemler genelde benzer olmasına karşın, farklı olgu grupları ve farklı zamanlarda gerçekleştirildiği için

daha kapsamlı verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin İspanya'daki çalışmada¹⁶ izolatlar, 1995-1999 yılları arasında hayat kadınları ve poliklinik hastalarından elde edilirken, ABD'deki çalışmada¹⁹ 2003-2005 yılları arasında sadece polikliniğe başvuran hastalardan izole edilmiştir.

Metronidazole dirençli olgular, daha yüksek dozlarla veya uzun sürelerle metronidazol ile tedavi edilmektedir²². Ancak bu uygulamanın, dirençli suşların seçimini ve devamlılığını artırdığı için uygun bir yaklaşım olmayacağı öngörülmektedir²³. Ayrıca, metronidazole dirençli olgularda bir diğer nitroimidazol türevi olan tinidazolün etkin olarak kullanılabilmesi de bildirilmiştir²⁴. Benzer şekilde, metronidazole dirençli iki trikomoniyaz olgusunun intravajinal paromomisin ve yüksek doz tinidazol ile tedavi edildiği rapor edilmiştir²⁵. Trikomoniyazlı olgulardan izole edilen suşlarda in vitro ilaç etkinliğinin belirlenmesi, olguların tedavisinde etkili ilacın seçimine olanak sağlayacaktır. İn vitro metronidazol direnci ile klinik yanıt arasında uyum olduğu düşünülmekle birlikte, her zaman bu paralellikten söz etmenin mümkün olmadığı da bildirilmiştir^{18,19}. Bu nedenle in vitro direnç çalışmalarında elde edilen bulgular ile tedavi yanıtının birlikte değerlendirildiği araştırmaların faydalı olacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda, diğer ülkelerden bildirilenlerle karşılaştırıldığında, direnç görülme oranının yüksek olduğu izlenmektedir. Ancak metronidazol direnci konusunda, ülkemizin diğer bölgelerindeki merkezlerde yapılacak benzer çalışmalar ile daha kapsamlı verilere gereksinim olduğu açıktır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. WHO 2012. Geneva, Switzerland. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf?ua=1
2. Keşli R, Pektaş B, Özdemir M ve ark. 18-45 yaş grubu kadınlarda, *Trichomonas vaginalis* ve diğer mikroorganizmaların vajinal akıntı örneklerinden mikroskopik olarak incelenmesi. Türkiye Parazitoloj Derg 2012; 36(3): 182-4.
3. Çelik A, Atılğan R, Aygün HB ve ark. Serviko-vajinal pap smear taramasında *Trichomonas vaginalis*, *Candida* ve *Gardnerella vaginalis* sıklığının yaşa göre değerlendirilmesi. Fırat Tıp Derg 2013; 18(1): 44-7.
4. Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. BMC Infect Dis 2015; 15: 307.
5. Kissinger P, Adamski A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. Sex Transm Infect 2013; 89(6): 426-33.
6. Ertabaklar H. *Trichomonas*'larda moleküler biyolojik yapı ve çalışmaları, s: 519-22. Özcel MA, Tanyuksel M, Eren H (ed), Moleküler Parazitoloji. 2009, Meta Basım, İzmir.
7. Workowski KA, Bolan GA; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015; 64(RR-03): 1-137.
8. Ertuğ S, Dost T. Nitroimidazol türevleri, s: 191-202. Akisu Ç, Korkmaz M (ed), Tıbbi Parazitolojide Tedavi. 2005, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir.
9. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, et al. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 783-93.
10. Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, et al. A review of evidence-based care of symptomatic trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. Clin Infect Dis 2015; 61(8): 837-48.

11. Paulish-Millera TE, Augostinib P, Schuyler JA, et al. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4Tv and ntr6Tv. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(5): 2938-43.
12. Ertabaklar H, Kivçak B, Mert T, et al. In-vitro activity of *Arbutusunedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2009; 33(4):263-5.
13. Gökmen Aksoy A, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu AA, et al. *Trichomonas vaginalis*'in metronidazol, ornidazol ve proton pompa inhibitörleri pantoprazol ve esomeprazole karşı in vitro duyarlılığı. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(1): 133-9.
14. Meri T, Sakari Jokiranta T, Suhonen L, et al. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 763-7.
15. Meingassner JG, Havelec L, Mieth H. Studies on strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. *Br J Vener Dis* 1978; 54(2): 72-6.
16. Perez S, Fernandez-Verdugo A, Perez F, et al. Prevalence of 5-nitroimidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Oviedo, Spain. *Sex Transm Dis* 2001; 28(2): 115-6.
17. Das S, Huengsborg M, Shahmanesh M. Treatment failure of vaginal trichomoniasis in clinical practice. *Int J STD AIDS* 2005; 16(4): 284-6.
18. Schmid G, Narcisi E, Mosure D, et al. Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. *J Reprod Med* 2001; 46(6): 545-9.
19. Schwebke JR, Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(12): 4209-10.
20. Kirkcaldy RD, Augustini P, Asbel LE, et al. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(6): 939-43.
21. Matini M, Maghsood AH, Mohebbi M, et al. In vitro susceptibility of Iranian isolates of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. *Iran J Parasitol* 2016; 11(1): 46-51.
22. Bosserman EA, Helms DJ, Mosure DJ, Secor WE, Workowski KA. Utility of antimicrobial susceptibility testing in *Trichomonas vaginalis*-infected women with clinical treatment failure. *Sex Transm Dis* 2011; 38(10): 983-7.
23. Secor WE. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;10(2): 107-9.
24. Sobel JD, Nyirjesy P, Brown W. Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clin Infect Dis* 2001; 33(8): 1341-6.
25. Nyirjesy P, Gilbert J, Mulcahy LJ. Resistant trichomoniasis: successful treatment with combination therapy. *Sex Transm Dis* 2011; 38(10): 962-3.