



بررسی آزمایشگاهی حساسیت دارویی جدایه‌های تریکوموناس واژینالیس به مترونیدازول در شهر بوشهر

مرضیه طاهرزاده (PhD)^{۱*}، رضا عباسیان (MSc)^۱، رضا طاهرخانی (PhD)^۲، مرادعلی فولادوند (PhD)^{۱**}

^۱ گروه میکروب و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
^۲ گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۴ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۳)

چکیده

زمینه: تریکومونایزس شایع‌ترین بیماری مقاربتی غیرویروسی است که توسط تک یاخته تریکوموناس واژینالیس ایجاد می‌شود. مترونیدازول (مشتق ۵- نیتروایمیدازول) داروی اصلی منتخب ضد تریکومونایی برای درمان تریکومونایزس است. از سال ۱۹۶۲ مواردی از شکست درمان با مترونیدازول گزارش شده است و به‌عنوان یک مسئله بهداشت عمومی بسیار مشکل‌ساز ظاهر شده است. این مطالعه با هدف تعیین حساسیت فعلی جدایه‌های تریکوموناس واژینالیس به مترونیدازول در شهر بوشهر انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۲۰ جدایه *T. vaginalis* جمع‌آوری شده از مراکز خدمات جامع سلامت و بیمارستان‌های شهر بوشهر انجام شد. پس از کشت انگل‌ها، تست حساسیت با استفاده از رقت‌های متوالی دو برابری مترونیدازول (۲ تا ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام شد. حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MLC) تریکوموناس‌ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۶ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. سنجش حساسیت دارویی تمامی جدایه‌ها دو بار در سه تکرار در شرایط هوازی و بی‌هوازی انجام شد.

یافته‌ها: صد درصد جدایه‌های تریکوموناس (۲۰/۲۰) به مترونیدازول حساس بودند. مقاومت به مترونیدازول به‌عنوان MIC هوازی ≤ 5 میکروگرم در میلی‌لیتر تعریف شده که در هیچکدام از ایزوله‌ها شناسایی نشد. میانگین MIC‌ها و MLC‌های هوازی و MIC‌های بی‌هوازی انگل‌ها به ترتیب ۳/۸، ۳/۲ و ۲/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: بررسی حساسیت دارویی جدایه‌های *T. vaginalis* برای اولین بار در شهرستان بوشهر انجام شد. از آنجا که ایزوله مقاوم به مترونیدازول یافت نشد، وضعیت بسیار امیدوارکننده بود. اگرچه نیاز به تحقیقات در مقیاس بزرگ‌تر در استان اجتناب‌ناپذیر است. با توجه به اینکه در اکثر مطالعات نتایج بر اساس مشاهدات آزمایشگاهی است، اخیراً مطالعه *in vivo* نیز توصیه شده است زیرا منجر به توسعه استانداردهای واقعی در مورد پاسخ بالینی و میکروبیولوژیکی به درمان مترونیدازول خواهد شد.

واژگان کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، حساسیت دارویی، شرایط آزمایشگاهی، مترونیدازول

** گروه میکروب و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

E. mail: mfooladvand39@yahoo.com

*ORCID: 0000-0002-3792-2194

**ORCID: 0000-0001-7302-6840

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس، یک تک یاخته تاژک‌دار بی‌هوازی، عامل ایجاد بیماری تریکومونیاژیس در دستگاه ادراری تناسلی انسان با شیوع قابل توجه در سراسر جهان است. تریکومونیاژیس، که به‌عنوان یک بیماری شایع مقاربتی (STD) شناخته می‌شود، اغلب با سایر بیماری‌های مقاربتی همراه است و گفته شده احتمال افزایش خطر عفونت با سایر میکروب‌ها از جمله HIV، نئوپلازی دهانه رحم و پیامدهای نامطلوب بارداری وجود دارد (۵-۱). رفتارهای بیولوژیکی متنوع، یکی از بارزترین ویژگی‌های این انگل است، به طوری که ویژگی‌های بالینی بیماری را می‌توان به‌طور متفاوتی (از شدید تا خفیف یا بدون تظاهرات بالینی) مشاهده کرد (۶).

مقاومت دارویی و شکست درمان دو موضوع مهم در بیماری تریکومونیاژیس هستند. ترکیبات نیتروایمیدازول تنها داروهای انتخابی برای درمان عفونت هستند و توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) توصیه شده‌اند (۷). رژیم‌های دارویی خوراکی توصیه شده مترونیدازول یا تینیدازول، ۲ گرم در یک دوز واحد یا ۵۰۰ میلی‌گرم دو بار در روز به مدت ۷ روز است (CDC 2010). میزان موفقیت درمان با مترونیدازول و تینیدازول برای تریکومونیاژیس به‌ترتیب ۹۵-۹۰ درصد و ۱۰۰-۸۶ درصد است (۷).

یکی از بحث برانگیزترین مسائل در درمان تریکومونیاژیس مقاومت به مترونیدازول است و ایزوله‌های مقاوم به مترونیدازول در حال افزایش است که ممکن است با عفونت جدایه‌های انگل با TVV همراه باشد. ۲ تا ۵ درصد از تریکومونیاژیس‌ها دارای سطحی از مقاومت دارویی به مترونیدازول هستند که عامل شایع آنتی تریکومونال می‌باشند (۷). در آمریکا بروز مقاومت دارویی به ۲۲ درصد رسیده است و گزارش‌ها حاکی از گسترش

جهانی این رویداد می‌باشند (۸). از سال ۱۹۶۲ به بعد، باقی ماندن انگل پس از دو دوره متوالی تجویز مترونیدازول، به عنوان مقاومت بالینی در نظر گرفته می‌شود (۹ و ۱۰). البته این مقاومت اغلب اوقات اما نه همیشه با افزایش دوز و دوره درمان از بین می‌رود (۸). شکست درمان می‌تواند به دلیل غیرفعال شدن دارو توسط فلور باکتریایی ناحیه واژن، جذب یا تحویل ناقص دارو به محل مورد نظر، عفونت مجدد، درمان ناکافی و عدم درمان مناسب شریک جنسی باشد و در نهایت این امکان وجود دارد که عمدتاً ناشی از فعالیت خود انگل باشد (۱۰). با توجه به اهمیت موضوع بهداشت عمومی و کافی نبودن اطلاعات در این زمینه، این مطالعه با هدف بررسی حساسیت دارویی جدایه‌های بالینی *T. vaginalis* شهرستان بوشهر برای دستیابی به یک چشم‌انداز ابتدایی از سیر بروز مقاومت دارویی در سویه‌های کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با کد اخلاق ۱۵۷. ۱۳۹۹. IR.BPUMS.REC توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بوشهر مورد تأیید قرار گرفته است.

جمع‌آوری و کشت انگل

جدایه‌ها از زنان مراجعه‌کننده به مراکز خدمات جامع سلامت و بیمارستان‌های شهر بوشهر طی ۱۲ ماه از تابستان سال ۱۳۹۹ الی ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد و از نمونه‌گیری واژینال و ادرار برای تشخیص تریکومونیاژیس استفاده شد. بدین صورت که از زنان متقاضی تست پاپ اسمیر در مراکز خدمات جامع سلامت همزمان سواپ واژینال از فورنکس خلفی گرفته می‌شد و در بیمارستان‌ها نیز از زنان دارای آزمایش ادرار جمع‌آوری نمونه انجام شد. بررسی انگل‌ها با روش تهیه گسترش مرطوب سپس کشت

سنجش حساسیت دارویی

آزمایش حساسیت دارویی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش Meingassner اصلاح شده توسط CDC انجام شد (۱۲ و ۱۳). محلول قابل تزریق مترونیدازول ۰/۵ درصد (شرکت دارویی ثامن مشهد) تحت شرایط استریل با PBS (pH=۶/۵) به غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسانده شد. سپس برای اطمینان از طریق فیلتر سرنگی (اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر) مجدداً استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. رقت‌های دارویی دو برابری با استفاده از محیط کشت در محدوده‌ای از ۲ تا ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. تعداد توصیه شده انگل تریکوموناس برای سنجش حساسیت تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی به ترتیب 1×10^5 و 5×10^3 تروفوزوئیت در هر چاهک است (۱۴). انگل‌ها به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه با کف مسطح که حاوی رقت‌های متوالی مترونیدازول بودند اضافه و سپس در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط هوازی انکوبه شدند. وضعیت تروفوزوئیت‌ها در هر چاهک پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت با میکروسکوپ معکوس بررسی شد. در این مرحله، کمترین غلظت دارو در چاهک‌های میکروپلیتی که در آن انگل متحرک شناسایی نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. MLC هوازی نیز به این صورت انجام شد که پس از تعیین MIC هوازی، ۱۰۰ میکرولیتر از محتوای هر چاهک مرحله قبل به ۵ میلی‌لیتر محیط تازه بدون مترونیدازول منتقل و به صورت هوازی انکوبه شد. این کشت‌های لوله‌ای نیز پس از ۵ الی ۱۰ روز با میکروسکوپ معکوس برای مشاهده میزان انگل‌های زنده و رشد آن‌ها بررسی شدند و سپس بیشترین رقت دارویی که دارای اثر بازدارنده روی رشد انگل بود به عنوان MLC در نظر گرفته شد (۱۵). برای آزمایش‌های بی‌هوازی MIC، میکروپلیت‌ها همانند شرایط هوازی کشت شدند

گزنیک با استفاده از محیط کشت دیاموند صورت گرفت (۱۱). سپس جدایه‌های *T. vaginalis* در محیط دیاموند همراه با ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر سرم جنین گوساله غیرفعال شده با حرارت، آنتی‌بیوتیک‌های (پنی‌سیلین / ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر، استرپتومایسین سولفات / ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، جنتامایسین ۵۰ / میکروگرم در میلی‌لیتر) و ضد قارچ (آمفوتریسین ۱/B میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت و در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (آنتی‌بیوتیک‌ها به غیر از پنی‌سیلین (sigma)، تولید شرکت‌های داروسازی ایران بودند و آمفوتریسین نیز تولید شرکت sigma بود). لوله‌های کشت انگل روزانه زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده و هر ۴۸ ساعت یک بار در محیط جدید تجدید کشت می‌شدند. کشت اگزینیک انگل‌ها پس از چندین بار تازه‌سازی کشت حاصل شد که از طریق حذف آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در محیط کشت و منفی شدن کشت باکتریایی تأیید گردید.

تعیین MIC و MLC

حداقل غلظت مهاري (MIC) به‌عنوان کمترین غلظت دارویی که انگل متحرک دیده نمی‌شود تعریف می‌گردد. بدین منظور از میکروپلیت جهت کشت انگل و بررسی حساسیت دارویی استفاده شد. تحرک جدایه‌های تریکوموناس با استفاده از بزرگ‌نمایی بالا ($\times 400$) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط هوازی و بی‌هوازی بررسی گردید. علاوه بر این، حداقل غلظت کشنده (MLC) به‌عنوان بالاترین رقت دارو که از رشد انگل در محیط تازه فاقد آنتی‌بیوتیک جلوگیری می‌کند، تعریف می‌گردد. بدین منظور انگل‌ها پس از بررسی MIC در محیط تازه فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و روزانه از نظر رشد و تکثیر توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شدند.

ولی با این تفاوت که در جار بی‌هوازی حاوی بسته Anaerocult C (Merck) انکوبه گردیدند. همه آزمایش‌های تعیین حساسیت برای هر جدایه سه بار حداقل دو بار در شرایط هوازی و بی‌هوازی در مقایسه با شاهد انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات توصیفی با استفاده از آماره‌های میانگین و انحراف معیار ($\text{mean} \pm \text{SD}$) گزارش شدند. جهت تحلیل اطلاعات، از آزمون آنالیز واریانس‌های یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه میانگین بین روش‌های مختلف سنجش حساسیت دارویی استفاده شد. سپس جهت مقایسه دو به دو روش‌ها، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ انجام شد و در تمام موارد سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۵۰ نمونه سواب واژینال و ۲۹۶ نمونه ادرار با گسترش مرطوب و سپس کشت در محیط دیاموند مورد بررسی قرار گرفتند و از این تعداد ۲۰ عدد از نمونه‌ها *T. vaginalis* مثبت بودند.

سنجش هوازی

پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، حساسیت ۱۰۰ درصد از جدایه‌ها به مترونیدازول در شرایط آزمایشگاهی حساسیت دارویی بین ۲ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر را نشان داد و میانگین MICها $\pm$ انحراف معیار $3/8 \pm 1/28$ بود. MIC هوازی مترونیدازول برابر یا بیشتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان مقاومت به مترونیدازول در نظر گرفته شده است (۱۳) که در هیچکدام از جدایه‌ها شناسایی نشد.

MLC‌های هوازی مترونیدازول در محدوده ۲ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر با میانگین $3/2$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و انحراف معیار $1/5$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ۹۰ درصد جدایه‌های تریکوموناس، MLC‌های هوازی مترونیدازول بین ۲ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند و تنها یک MLC در محدوده ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و جدایه مقاوم به مترونیدازول یافت نشد.

سنجش بی‌هوازی

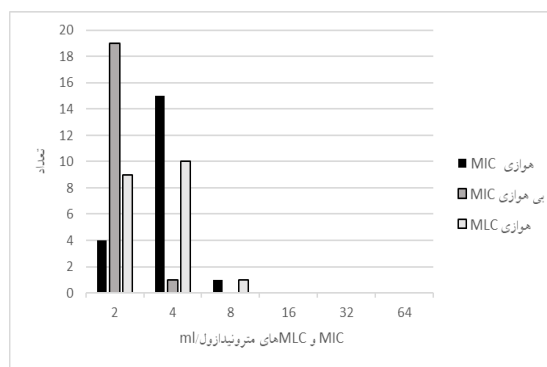
در ۴۸ ساعت انکوباسیون تحت شرایط بی‌هوازی، MIC‌های مترونیدازول از ۲ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر با میانگین $2/1$ میکروگرم در میلی‌لیتر و انحراف معیار $0/44$ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. ۹۵ درصد جدایه‌ها حساسیت به مترونیدازول کمتر یا مساوی ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند. MIC بی‌هوازی یک جدایه کمتر یا مساوی ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

نمودار ۱) نتایج حاصل از سنجش حداقل غلظت مهاري و کشندگی داروی مترونیدازول روی ایزوله‌های تریکوموناس تحت شرایط هوازی همچنین حداقل غلظت مهاري تحت شرایط بی‌هوازی را نشان می‌دهد. در ادامه نیز جدول ۱ حاوی اطلاعات جمع‌آوری شده از مقایسه میانگین MIC هوازی و بی‌هوازی و MLC هوازی مترونیدازول در شرایط آزمایشگاهی روی ایزوله‌ها می‌باشد.

طبق آزمون تعقیبی، تفاوت میانگین MIC بی‌هوازی با MIC هوازی ($p < 0/001$) و MLC هوازی ($p = 0/012$) معنادار بودند و شاهد اثربخشی بهتر داروی مترونیدازول در شرایط کشت بی‌هوازی بودیم. اما اختلاف بین MIC و MLC هوازی معنادار نبود ($p > 0/05$).

تنها یک جدایه تریکوموناس واژینالیس دارای $\text{MIC} \geq 8$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که باعث بروز یکسری علائم

در فرد هم شده بود.



نمودار (۱) مقایسه MIC و MLC های مترونیدازول در محیط هوازی و بی هوازی

جدول (۱) مقایسه میانگین MIC هوازی و بی هوازی و MLC هوازی مترونیدازول

تست	میانگین	انحراف معیار	P value
MIC هوازی	۳/۸	۱/۲۸	۰/۰۰۱
MIC بی هوازی	۲/۱	۰/۴۴	

بحث

قبل از معرفی مترونیدازول در سال ۱۹۵۹، درمان موضعی واژینال تنها راه برای درمان تریکومونیازیس بوده و عمدتاً در زنان تسکین دهنده به شمار می آمد. پس از تولید و گسترش مشتق نیتروایمیدازول (1-β-hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole) افق جدیدی برای درمان تریکومونیازیس پدیدار شد و در درمان عفونت شدید واژن بسیار مؤثر بود. خیلی زود، این داروی جدید با گزارش هایی در مورد شکست درمان در سال ۱۹۶۲ مواجه شد. به مرور مقاومت به مترونیدازول در *T. vaginalis* به دو دسته هوازی و بی هوازی تقسیم گردید. فردوکسین یک پروتئین آهن-گوگرد است که به عنوان یک حامل الکترون در واکنش های بیوشیمیایی عمل می کند و در مکانیسم مقاومت هوازی به مترونیدازول نقش دارد. به طوری که

تولید فردوکسین توسط تریکوموناد های مقاوم کاهش می یابد. در مقاومت بی هوازی، احتمالاً کاهش فعالیت پیرووات: فردوکسین اکسیدوردوکتاز و هیدروژناز (دو پروتئین هیدروژنوزومی) دارای نقش هستند (۵، ۶ و ۹). طبق آخرین اطلاعات ما، مطالعه حاضر برای اولین بار در سطح شهرستان بوشهر برای بررسی سنجش حساسیت به مترونیدازول در شرایط آزمایشگاهی روی جدایه های بالینی *T. vaginalis* انجام شده است. در این مطالعه، تست حساسیت دارویی به صورت هوازی و بی هوازی بر روی ۲۰ جدایه *T. vaginalis* جمع آوری شده از مراکز خدمات جامع سلامت و بیمارستان ها انجام شد. همه ایزوله ها حساس به مترونیدازول و ۹۵ درصد آن ها دارای MIC ≤ ۴ میکروگرم در میلی لیتر بودند. حساسیت بزرگ تر یا مساوی ۸ میکروگرم در میلی لیتر تنها در یک جدایه تشخیص داده شد که می تواند به عنوان یک نگرانی جهت رفتن به سمت ایجاد یک مقاومت حاشیه ای یا به عبارتی تحمل سطح پایین در نظر گرفته شود.

بر اساس یک بررسی سیستماتیک توسط مارکوس-سیلوا (Marques-Silva) مشخص شده که سطح بالای مقاومت به MTZ در شرایط آزمایشگاهی نادر و در اکثر موارد سطح پایین متوسط توصیف شده است. اگرچه مقاومت بالینی MTZ در تریکومونیازیس به طور گسترده گزارش شده ولی مطالعات کنترل شده آینده نگر کمی وجود دارد. او و همکاران به این نتیجه رسیده اند که جهت تعریف نقاط شکست برای تشخیص ایزوله های مقاوم به MTZ و برای روشن شدن ارتباط با نتیجه بالینی، نیاز به استاندارد سازی آزمون حساسیت وجود دارد و ایجاد معیارهایی برای تعریف مقاومت بالینی به داروی مترونیدازول مهم است (۱۶). نتایج مطالعه ای در سال ۲۰۲۰ روی نقش پروتئین های مؤثر در پاسخ به درمان تریکوموناس های مقاوم به مترونیدازول به این اشاره دارد

که چندین آمینوترانسفراز شرکت کننده در متابولیسم اسیدآمینه بیشتر بیان و تولید می‌شوند در حالی که پروتئین‌های درگیر در واکنش گلیکولیز و متابولیسم انرژی هیدروژنوزومی کمتر تولید خواهند شد (۱۷). در بررسی دیگری نشان داده شده که یک جهش نقطه‌ای در موقعیت نوکلئوتیدی ۶۶ منطقه ITS1 (ITS1 C66T) واقع در کنار زیرواحد ۵/۸S ژن DNA ریبوزومی ممکن است با مقاومت *T. vaginalis* به مترونیدازول مرتبط باشد (۱۸). در مطالعه‌ای که توسط متینی و همکاران انجام شد، سه جدایه تریکوموناسی که دارای MIC $\geq$ ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند از نوع جهش یافته تشخیص داده شدند (۱۹) و در سال ۲۰۱۶ از ۵۰ ایزوله جمع‌آوری شده در نواحی مرکزی و غرب ایران ۴۹ مورد حساس به مترونیدازول گزارش کرده‌اند (۲۰).

همچنین در یک بازنگری سیستماتیک و متاآنالیز منتشر شده در سال ۲۰۲۱ گفته شده به دلیل شیوع بالای ویروس تریکوموناس واژینالیس (TVV) که انگل را درگیر می‌کند، لازم است به رفتار انگل چه از نظر ایجاد علائم بالینی و چه از نظر بروز مقاومت دارویی به‌طور ویژه توجه شود. گرچه هنوز هم به دلیل زیاد بودن تعداد گزارشات، نمی‌توان گفت این ویروس در پیدایش مقاومت دارویی نقش اساسی دارد پس نیازمند بررسی‌های بیشتر است (۲۱).

بر اساس گزارش CDC، ۲ تا ۵ درصد از وضعیت حساسیت دارویی بیماران آلوده ممکن است با مقاومت مترونیدازول در سطح پایین همراه باشد و مقاومت در سطح بالا به ندرت یافت می‌شود (۷) و این با یافته‌های ما تقریباً مطابقت داشت. مینگاسنر (Meingassner) و همکاران، طی مطالعه‌ای، روی حساسیت دارویی ۹۴ ایزوله *T. vaginalis*، به ترتیب MIC و MLC‌های در محدوده ۰/۱ تا ۱/۶ و ۰/۴ تا ۶/۴ میکروگرم مترونیدازول در

میلی‌لیتر گزارش داده‌اند. آن‌ها MLC را بر اساس بررسی میکروسکوپی و تحرک تروفوزوئیت بررسی کرده بودند (۱۲). تحقیقی دیگر با ۹۱ جدایه تریکوموناس در اسپانیا که بر روی بیماران آلوده و سرویس دهندگان جنسی زن انجام شده بود، ۲/۲ درصد سویه‌های مقاوم به مترونیدازول با حساسیت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشخیص داده شده‌اند (۲۲). در آتلانتا، بررسی مشابهی روی نمونه‌های دختران نوجوان انجام شده و دو جدایه مقاوم به مترونیدازول در سطح متوسط (MLC $\geq$ ۵۰) میکروگرم در میلی‌لیتر) و سه سطح پایین (MLC=۵۰) میکروگرم در میلی‌لیتر) شناسایی شدند (۱۳). شوبکه (Schwebke) و همکاران، روی حساسیت دارویی ۱۷۸ جدایه تریکوموناس واژینالیس به دست آمده از زنان مراجعه کننده به کلینیک STD در بیرمنگام کار کردند و به این نتیجه رسیدند که ۹/۶ درصد ایزوله‌های مقاوم شامل ۱۱ ایزوله با مقاومت بسیار کم، سه تا با مقاومت کم، دو تا متوسط و یکی با مقاومت بالا به ترتیب با MLC‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و بیش از ۲۰۰ هستند (۱۳). ۵ مورد تریکومونیاژیس مقاوم به درمان در سال ۱۳۹۱ میان ۱۵ زن آلوده مراجعه کننده به کلینیک‌های ژنکولوژی در همدان گزارش شد (۲۳).

مقادیر آستانه مختلفی برای تشخیص مقاومت تریکوموناس‌ها به مترونیدازول توسط محققان مطرح شده است. برخی از آن‌ها MIC‌های هوازی ۲۵ و بیش از ۲۰۰ میکرومولار و MIC‌های بی‌هوازی ۳/۲ و ۲۵ میکرومولار را به ترتیب ایزوله‌های حساس و مقاوم به مترونیدازول در نظر می‌گیرند (۱۴ و ۲۳). مولر (Muller) و همکاران، آستانه MLC برای جدایه‌های مقاوم به مترونیدازول را بر اساس نتیجه درمان ۱۹۹ زن مبتلا به *T. vaginalis* نشان دادند. آن‌ها MLC‌های هوازی و بی‌هوازی را به ترتیب بیش از ۱۰۰ و ۳/۱

میکروگرم در میلی لیتر گزارش کرده اند و اذعان داشته اند که درمان موفقیت آمیز بین سویه های مقاوم و حساس همپوشانی دارد (۲۴). به گزارش مری (Meri) و همکاران، سایر غلظت های آستانه برای *تریکوموناس واژینالیس* مقاوم به درمان پس از ۲۴ ساعت تیمار هوازی و ۴۸ ساعت تیمار بی هوازی به ترتیب عبارتند از MIC های بیش از ۷۵ و ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر و برای انگل های حساس از نظر بالینی کمتر از ۱۹ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر. آن ها بین این نتایج برخلاف گزارش مولر، در زمان درمان، همپوشانی مشاهده نکردند (۱۵).

هیچ رویکرد توافقی برای عملکرد و تفسیر حساسیت دارویی *T. vaginalis* وجود ندارد. برخی از محققان از MIC و یا MLC تحت شرایط هوازی و یا بی هوازی استفاده کرده اند و مقدار MIC چهار برابر بیشتر از MLC بوده است (۱۰ و ۱۵). در مطالعه حاضر میانگین مقدار MIC ها بیشتر از MLC ها بود که این یافته با آنچه قبلاً گفته شده همخوانی دارد. می توان اینچنین توجیه کرد که انگل های در معرض مترونیدازول به طور غیرقابل برگشتی تحت تأثیر دارو در غلظت های پایین تر قرار گرفته و دیگر نمی توانند در محیط بدون دارو تحت شرایط سنجش MLC رشد کنند.

مقادیر حساسیت دارویی انگل در شرایط آزمایشگاهی دقیقاً با دوز لازم برای درمان *تریکومونیاژیس* ارتباط ندارد (۲۴). ولی در عین حال برای پیش بینی و مدیریت روند درمان مفید است. اکثر اوقات مقاومت دارویی *تریکوموناس* به صورت مطلق نیست و معمولاً *تریکومونیاژیس* مقاوم به درمان با دوز بالای دارو و درمان طولانی مدت قابل درمان است. به عنوان مثال برای درمان عفونتی که با سویه های مقاوم حاشیه ای (حداقل غلظت کشنده هوازی مترونیدازول ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر

تعریف می شود) و مقاوم متوسط (MLC)، ≥ 400 میکروگرم در میلی لیتر) ایجاد شده اند، به ترتیب به یک دوز درمانی کامل ۱۰ و ۴۰ گرمی مترونیدازول به صورت خوراکی برای چند روز نیاز دارند (۱). فرض بر این است که مقاومت به مترونیدازول از نظر بالینی با پدیده مقاومت هوازی مرتبط است و می تواند در طول درمان عادی *تریکومونیاژیس* در انگل ایجاد شود. بنابراین، به نظر می رسد که آزمایش حساسیت هوازی نسبت به روش بی هوازی متمایز تر و قابل اجرا تر باشد (۵، ۶، ۹ و ۲۵).

نتیجه گیری

زمانی که *تریکومونیاژیس* مقاوم به درمان یافت می شود و به نوعی درمان به دلیل عدم تأثیرگذاری دارو با شکست مواجه شده و عفونت مجدداً برمی گردد، بررسی حساسیت دارویی *T. vaginalis* با روش های قابل اعتماد ضروری است. به دلیل حساسیت این موضوع پس از بررسی وضعیت آستانه تحمل مترونیدازول در بیست جدایه انگل *تریکوموناس* شهرستان بوشهر، مورد مقاومی شناسایی نشد. مطالعات آینده در کل استان برای ارزیابی دقیق همبستگی بین حساسیت دارویی در شرایط آزمایشگاهی و نتیجه درمان *in vivo* *تریکومونیاژیس* مورد نیاز است.

سپاس و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر (کد رهگیری پروژه: ۱۵۵۳) انجام شد. نویسندگان از سایر همکاران برای کمک در این تحقیق سپاسگزاری می کنند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

- Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 794–803. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.794-803.2004>
- Zhang ZF, Graham S, Yu SZ, et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. Ann Epidemiol 1995; 5(4): 325–32. doi: [https://doi.org/10.1016/1047-2797\(94\)00101-X](https://doi.org/10.1016/1047-2797(94)00101-X)
- Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, et al. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. Emerg Infect Dis 2001; 7(6): 927–32. doi: [10.3201/eid0706.010603](https://doi.org/10.3201/eid0706.010603)
- Soper D. Trichomoniasis: under control or undercontrolled? Am J Obstet Gynecol 2004; 190(1): 281–90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.08.023>
- Ali V, Nozaki T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. Clin Microbiol Rev 2007; 20(1): 164–87. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-06>
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2): 300–17. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.300>
- Workowski KA, Berman Stuart M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR Recomm Rep 2010; 59(RR-12): 1-110. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21160459/>
- Fouladvand MA, Khorami S, Sartavi K. Evaluation of Lethal Effect of *Pergularia Tomentosa* and *Priploca aphylla* on *Trichomonas Vaginalis* In Vitro. Iran South Med J 2017; 20(4): 370-9. (Persian) <http://eprints.bpums.ac.ir/id/eprint/6937>
- 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. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.783-793.2004>
- Narcisi EM, Secor WE. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(5): 1121–5. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.40.5.1121>
- Matini M, Rezaie S, Mohebbi M, et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Infection in Hamadan City, Western Iran. Iran J Parasitol 2012; 7(2): 67–72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469190/>
- Meingassner JG, Havelec L, Mieth H. Studies on strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. Br J Vener Dis 1978; 54(2): 72–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/sti.54.2.72>
- Schwebke JR, Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(12): 4209–10. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00814-06>
- Upcroft JA, Upcroft P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(6): 1810–4. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1810-1814.2001>
- Meri T, Jokiranta TS, 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(2): 763–7. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.2.763-767.2000>
- Marques-Silva M, Lisboa C, Gomes N, et al. *Trichomonas vaginalis* and growing concern over drug resistance: a systematic review. J Eur Acad Dermatol Venereol 2021; 35(10): 2007-21. doi: <https://doi.org/10.1111/jdv.17461>
- Lin HC, Chu LJ, Huang PJ, et al. Proteomic signatures of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* reveal novel proteins associated with drug resistance. Parasit Vectors 2020; 13(1): 1-14. doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04148-5>
- Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, et al. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. J Clin Microbiol

- 2000; 38(8): 3004–9. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3004-3009.2000>
19. Matini M, Rezaeian M, Mohebbi M, et al. Genotyping of *Trichomonas vaginalis* isolates in Iran by using single stranded conformational polymorphism-PCR technique and internal transcribed spacer regions. Trop Biomed 2012; 29(4): 605–12. https://www.msptm.org/files/605_612_Matini_M.pdf
20. 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835469/>
21. Bahadory S, Aminizadeh S, Taghipour A, et al. A systematic review and meta-analysis on the global status of *Trichomonas vaginalis* virus in *Trichomonas vaginalis*. Microb Pathog 2021; 158: 105058. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105058>
22. 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. doi: [10.1097/00007435-200102000-00010](https://doi.org/10.1097/00007435-200102000-00010).
23. Rabiee S, Bazmani A, Matini M, et al. Comparison of Resistant and Susceptible Strains of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole Using PCR Method. Iran J Parasitol 2012; 7(3): 24–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469168/>
24. Muller M, Lossick JG, Gorrell TE. In vitro susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. Sex Transm Dis 1988; 15(1): 17-24. doi: [10.1097/00007435-198801000-00004](https://doi.org/10.1097/00007435-198801000-00004).
25. Rasoloson D, Tomková E, Cammack R, et al. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. Parasitology 2001; 123(Pt 1): 45–56. doi: [10.1017/s0031182001008022](https://doi.org/10.1017/s0031182001008022)

Original Article

Drug Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole in Bushehr City (In Vitro)

M. Taherzadeh (PhD)^{1*}, R. Abbasian (MSc)¹, R. Taherkhani (PhD)²,
M. A. Fouladvand (PhD)^{1**}

¹ Department of Microbiology & Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

² Department of Virology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 25 Jun, 2022

Accepted 4 Sep, 2022)

Abstract

Background: Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted disease caused by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. Metronidazole (MTZ), a 5-nitroimidazole derivative, is the main antitrichomonal agent of choice for the treatment of trichomoniasis. Since 1962, some cases of treatment failure with metronidazole have been reported, and the increased resistance of the parasite to MTZ has emerged as a highly problematic public health issue. This study aimed to determine the current susceptibility of isolates of *T. vaginalis* to metronidazole in Bushehr city.

Materials and Methods: This study was performed on 20 *T. vaginalis* isolates collected from comprehensive health service centers and hospitals in Bushehr city. After the culture of the parasites, susceptibility testing was carried out using serial twofold dilutions of MTZ (2 to 64 µg/ml). The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MLC) of the trichomonads were determined after 24 and 48 h of incubation at 36 °C. Drug susceptibility assays of all the isolates were carried out twice in triplicate under aerobic and anaerobic conditions.

Results: One hundred percent of the *T. vaginalis* isolates (20/20) were susceptible to MTZ. Resistance to metronidazole was defined as aerobic MIC ≥50 µg/ml, which was not detected in any of the isolates. The mean aerobic MIC and MLC and the mean anaerobic MIC of the parasites were 3.8, 3.2 and 2.1 µg/ml, respectively.

Conclusion: The present study was the first to investigate drug susceptibility in *T. vaginalis* isolates in Bushehr city. Since no metronidazole-resistant isolates were found, the situation looked very promising. Nevertheless, the need for larger-scale research is inevitable in the province. Considering that most results are based on *in vitro* observations, conducting an *in vivo* study has also been recommended in recent years, as these studies could help develop real standards about clinical and microbiological responses to MTZ treatment.

Keywords: *Trichomonas Vaginalis*, Drug Susceptibility, In Vitro, Metronidazole

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Taherzadeh M, Abbasian R, Taherkhani R, Fouladvand MA. Drug Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole in Bushehr City (In Vitro). Iran South Med J 2022; 25(3): 240-249

**Address for correspondence: Department of Microbiology & Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. E. mail: mfooladvand39@yahoo.com

*ORCID: 0000-0002-3792-2194

**ORCID: 0000-0001-7302-6840

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>