

بررسی مقایسه‌ای حساسیت روش‌های تشخیصی گسترش مرطوب و کشت دیاموند در شناسایی انگل تریکوموناس واژینالیس و میزان ارتباط بین آلودگی و یافته‌های بالینی

دکتر خسرو حضرتی تپه^۱، حبیب محمدزاده^۲، مهیار مستقیم^۳، جاوید فریدونی^۴، الهام مهری^۵

چکیده

پیش زمینه و هدف: تریکوموناس واژینالیس، تک یاخته یوکاریوت تازکداری است که در مجاری ادرار و سرویکس و فورنیکس خلفی واژن افراد آلوده دیده می‌شود. بیماری ناشی از آن را تریکومونیاژیس می‌نامند. متداولترین روش تشخیص انگل روش آزمایش میکروسکوپی گسترش مرطوب با حساسیتی در حدود ۶۰ درصد می‌باشد. این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای حساسیت روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی گسترش مرطوب و کشت انگل در محیط کشت دیاموند در شناسایی انگل تریکوموناس واژینالیس پرداخته است.

مواد و روش: در این مطالعه ترشحات واژن ۴۲۰ زن مراجعه کننده به مرکز بهداشت شماره ۱۵ دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دو روش آزمایش گسترش مرطوب به‌عنوان روش روتین تشخیصی و محیط کشت دیاموند به‌عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص انگل مورد بررسی قرار گرفت و نتایج هر دو آزمایش باهم مقایسه گردید. یافته‌ها: از ۴۲۰ نمونه مورد بررسی در روش گسترش مرطوب ۱۱ مورد (۲/۶٪) از نظر وجود انگل دارای آزمایش مثبت بودند در حالی که نتایج آزمایش کشت انگل آلودگی به انگل را در ۱۰ مورد (۲/۴٪) از مجموع موارد نشان داد. در این مطالعه میزان حساسیت آزمایش گسترش مرطوب و کشت در محیط کشت دیاموند به ترتیب ۹۰/۹٪ و ۱۰۰٪ به دست آمد. همچنین نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که بین میزان آلودگی و یافته‌های بالینی از نظر آماری ارتباط معنی داری وجود دارد ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری: از آنجاکه روش کشت انگل غالباً از حساسیت بالاتری نسبت به سایر روش‌های تشخیصی برخوردار است شاید بتوان علت تفاوت نتایج در دو آزمایش گسترش مرطوب و کشت را لیز شدن انگل در نتیجه نقل و انتقالات لوله‌های آزمایشی به آزمایشگاه انگل‌شناسی و یا نامساعد بودن شرایط رشد انگل در محیط کشت دانست.

کل واژگان: تریکوموناس واژینالیس، کشت دیاموند، گسترش مرطوب

مجله پزشکی ارومیه، سال پانزدهم، شماره اول، ص ۱۳-۷، بهار ۱۳۸۳

آدرس مکاتبه: ارومیه - گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دکتر خسرو حضرتی تپه

- ۱- استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
- ۲- مربی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
- ۳- مربی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
- ۴- مربی گروه زبان انگلیسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
- ۵- کارشناس آزمایشگاه مرکز بهداشت شماره ۱۵، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس یکی از تک تاخته‌های یوکاریوتیک تاژکدار بیماری زای دستگاه اذرائی تناسلی انسان می‌باشد. بیماری ناشی از آن تریکومونیاژیس نام دارد. تریکومونیاژیس دارای انتشار جهانی است و یکی از شایع‌ترین علل غیر ویروسی قابل سرایت از طریق تماس‌های جنسی^۱ است به طوری که طبق تخمین سازمان بهداشت جهانی هر ساله ۱۸۰ میلیون زن به این عفونت مبتلا می‌شوند (۱، ۲).

شیوع بیماری بسیار متغیر است در آمریکا از ۲٪ در بین زنان عادی تا ۵۶٪ در مراجعان به کلینیک بیماری‌های مقاربتی، آلودگی به انگل دیده شده است (۳). وفور بیماری تا حد زیادی بستگی به جمعیت مورد بررسی، شرایط اقتصادی، بهداشتی، فرهنگی، اجتماعی دارد. شیوع بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است، حداقل ۳٪ تا حداکثر ۷۰٪ می‌باشد (۴، ۵). در ایران آمار دقیق و معتبری از میزان آلودگی به انگل وجود ندارد، گزارش‌های پراکنده‌ای که در این مورد وجود دارد عمدتاً مربوط به مراجعان به درمانگاه‌های زنان است (۶، ۷). به طوری که بر اساس آمارهای موجود میزان آلودگی در نقاط مختلف ایران نسبتاً پایین و حدود ۳/۲٪ تا ۲۶/۲٪ گزارش شده است (۸، ۹). واژنیت، اورتریت، التهاب گردن زهدان (۱۰)، دیزوری، خارش و ترشحات واژینال کف آلود، حجیم، رقیق و چرکی، بد بو و زرد رنگ تا سبز مشخصه این بیماری است. در آلودگی به این انگل شانس پارگی زود رس کیسه آمیون^۲ و زایمان پیش از موعد، تولد نوزاد با وزن کم و یا سقط جنین ناشی از عفونت افزایش می‌یابد (۱۱، ۱۲). بر اساس آمارهای موجود حدود ۱۰ تا ۵۰ درصد زنان آلوده فاقد نشانه‌های بالینی هستند (۱۳)، این وضعیت در مردان به میزان بالاتری به چشم می‌خورد.

به طور معمول مبنای تشخیص پزشکان در تعیین آلودگی بر پایه وجود علائم بالینی است. اما در زنان نمی‌توان تنها با تکیه بر

وجود نشانه‌های بالینی و مشخصات ترشحات واژن از قبیل رنگ و بو با قاطعیت به وجود آلودگی با تریکوموناس واژینالیس پی برد (۱۴). به دلیل آنکه هیچ نشانه‌ای به تنهایی یا همراه با دیگر علائم بدون انجام آزمایش‌های میکروسکوپی ملاک تشخیصی قابل اعتمادی نیست (۱۵).

مستادول‌ترین روش تشخیص آلودگی، آزمایش گسترش مرطوب^۳ با حساسیتی در حدود ۳۵ تا ۸۰ درصد می‌باشد (۱۶). حساسیت روش گسترش مرطوب به میزان بالایی به مهارت آزمایشگر و انتقال فوری نمونه به آزمایشگاه و سرعت انجام آزمایش قبل از لیز شدن و از دست رفتن تحرک انگل بستگی دارد. از دیگر روش‌های تشخیصی فلورسنت آنتی بادی غیر مستقیم^۴ و الیزا^۵ با حساسیت بین ۷۰ تا ۹۰ درصد و نیز کشت در شرایط میکروآتروفیلیک با حساسیت تخمینی ۸۵ تا ۹۵ درصد که به عنوان روش استاندارد طلایی جهت تشخیص انگل مورد توجه قرار گرفته است را می‌توان نام برد (۱۷، ۱۸). این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای حساسیت روش‌های تشخیص آزمایشگاهی گسترش مرطوب و کشت در محیط کشت دیاموند^۶ در شناسایی انگل تریکوموناس واژینالیس پرداخته است.

مواد و روش

در این مطالعه ۴۲۰ زن مراجعه کننده به مرکز بهداشت شماره ۱۵ دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دو روش آزمایش گسترش مرطوب به عنوان روش روتین تشخیصی و روش کشت در محیط کشت دیاموند به عنوان روش استاندارد طلایی تشخیصی

1- STD

2- PROM

3- Wet Mount

4- IFA

5- ELISA

6- Diamond

انگل مورد بررسی قرار گرفتند ، نتایج هر دو مطالعه با استفاده از روش های آنالیز آماری مقایسه گردید. علاوه بر این ، میزان ارتباط بین آلودگی و یافته های بالینی از جمله ترشحات چرکی واژن، التهاب، سوزش و خارش و PH واژن و نیز مشخصاتی از قبیل سن بیمار، وضعیت تاهل با استفاده از آزمون های آماری مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که پس از اطمینان از نداشتن خونریزی و عدم استفاده از شیاف یا کرم واژینال و یا استفاده از مواد ضد عفونی کننده نظیر بتادین و یا پرمنگنات، مراجعه کننده توسط متخصص زنان مورد معاینه واژینال قرار می گرفت ، سپس برای وی پرسشنامه ای شامل مشخصات فردی تنظیم می گردید. بعد از قرار دادن اسپیکولوم استریل از ناحیه سرویکس و فورنیکس خلفی دوسوآپ از ترشحات تهیه می شد. سوآپ ها وارد یک لوله آزمایش حاوی یک سی سی سرم فیزیولوژی می شدند تا جهت تهیه لام مستقیم و تلقیح در محیط کشت مورد استفاده قرار گیرند سپس ، نمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و عملیات بعدی روی آنها انجام می گرفت. ابتدا با یکی از سوآپ ها یک گسترش مستقیم تهیه و از نظر وجود تریکوموناس مورد بررسی میکروسکوپی قرار می گرفت. سوآپ دوم نیز وارد لوله های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت دیاموند که از قبل تهیه شده بود می گردید. محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور 37°C نگهداری و سپس از مایع رویی محیط کشت از نظر وجود تریکوموناس واژینالیز

نتایج

از مجموع ۴۲۰ نمونه مورد بررسی ۱۱ نفر (۲/۶٪) دارای آلودگی به تریکوموناس واژینالیز بودند نتایج کشت انگل در محیط کشت دیاموند نشان داد که از مجموع موارد تعداد ۱۰ مورد (۲/۴٪) از نظر آلودگی به انگل دارای آزمایش مثبت بودند. این در حالی است که در آزمایش انجام شده به روش گسترش مرطوب تعداد ۱۱ نفر دارای جواب آزمایش مثبت بودند. به این ترتیب میزان حساسیت در روش آزمایش گسترش مرطوب ۱۰۰ درصد و روش کشت انگل در محیط کشت دیاموند ۹۰/۹ درصد به دست آمد (جدول شماره ۱).

در ضمن ارتباط بین یافته های بالینی از قبیل ترشحات واژن، سوزش، خارش و آلودگی به تریکوموناس واژینالیز در بین بیماران آلوده به انگل از نظر آماری بررسی و معنی دار گزارش گردید ($P < 0/05$). همچنین بین سواد شوهر و آلودگی همسر به تریکومونیز رابطه معنی دار آماری وجود داشت ($P < 0/05$).

جدول ۱- حساسیت و ویژگی دو روش تشخیص بکار رفته در شناسایی انگل تریکوموناس واژینالیز

روش تشخیص	تعداد نمونه	مثبت واقعی	مثبت کاذب	منفی واقعی	منفی کاذب	حساسیت	ویژگی
کشت	۴۲۰	۱۰	-	۴۱۰	۱	۹۰/۱	۱۰۰
مستقیم	۴۲۰	۱۱	-	۴۰۹	-	۱۰۰	۱۰۰

بحث

آزمایشگاهی کمک گرفته شود.

برای تشخیص انگل تریکوموناس واژینالیس روش‌های متنوعی از جمله آزمایش مستقیم نمونه تازه و یا رنگ‌آمیزی شده با کشت در محیط‌های کشت ویژه انگل، آزمایش سرولوژیکی مثل ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا و... وجود دارد. در ارتباط با حساسیت و ویژگی روش‌های مختلف آزمایشگاهی فوق در تشخیص انگل از طرف پژوهشگران مختلف، نظرات متفاوت و بعضاً ضد و نقیصی عنوان شده است. ولی بر اساس اکثر مطالعات انجام شده روش کشت راه استاندارد و انتخابی در تشخیص انگل تریکوموناس واژینالیس می‌باشد. در روش‌های آزمایش مستقیم نمونه تازه و یا رنگ‌آمیزی شده در درجات بعدی تشخیص قرار دارند (۲۳).

در مطالعه انجام شده توسط فولادوند در سال ۷۳-۷۲ آلودگی به تریکوموناس واژینالیس به سه روش آزمایش مستقیم، کشت در محیط کشت دورسه و ایمنوفلورسانس غیر مستقیم در شهر بوشهر و بندر کنگان مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت روش مستقیم در مطالعه فولادوند نسبت به روش کشت ۸۵/۷٪ و حساسیت روش گسترش رنگ‌آمیزی شده با گیمسا نسبت به محیط کشت دورسه ۸۱ درصد به دست آمد (۲۴)، در حالی که در مطالعه حاضر حساسیت روش مستقیم ۱۰۰٪ و حساسیت روش کشت انگل در محیط کشت دیاموند ۹۰/۹ درصد بدست آمد.

در مطالعه دیگری که توسط سواهری^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد، ارزیابی سه روش تشخیصی آزمایش مستقیم نمونه تازه، رنگ‌آمیزی با آکریدین و کشت در محیط کشت دیاموند در شناسایی انگل تریکوموناس واژینالیس مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نمونه ۳۱۰ بیمار بررسی شد که از این تعداد ۴۰ نمونه (۱۲/۹٪) در آزمایش کشت و ۲۰ نمونه (۶/۵٪) در آزمایش مستقیم و ۱۹ نمونه (۶/۱٪) در آزمایش

بر اساس پژوهش‌های جدید شیوع تریکومونیاژیس در جمعیت‌های مختلف جهان بسیار متفاوت گزارش شده است به طوری که طیف آلودگی از ۱۰ درصد در جمعیت‌های نرمال تا بیش از ۷۵ درصد در جمعیت‌های در معرض خطر را شامل می‌شود (۱۹). در جوامعی که بی‌بند و باری‌های جنسی رایج است، شیوع این عفونت بالاتر بوده و طبعاً انتشار آن نیز به سهولت انجام می‌گیرد (۱۹). مطالعات انجام شده در ایران از سال ۱۳۴۴ تا سال ۱۳۶۳ نرخ آلودگی را ۲۰ تا ۴۰ درصد بیان داشته‌اند. این در حالی است که مطالعات انجام شده پس از سال ۱۳۶۶ در ایران میزان آلودگی به انگل را کمتر از ۵ درصد نشان داده است (۹، ۲۰).

در مطالعات حاضر نیز فراوانی عفونت تریکومونیاژیس ۲/۶ درصد گزارش شده است. دقت در سیر کاهش شیوع عفونت در کشورمان به وضوح نشان دهنده اهمیت فاکتورهای اخلاقی - اجتماعی و آموزشی در محدود کردن آلودگی است.

تریکومونیاژیس یک بیماری مقاربتی با طیف وسیعی از علائم بالینی است، این علائم در برخی موارد به کلی وجود ندارد و بیمار فاقد علامت است و در برخی بیماران نیز به صورت خفیف و غیراختصاصی دیده می‌شود و در تعدادی نیز علائم بالینی مشخصی وجود ندارد (۲۱). با توجه به اینکه تابلوی کلینیکی بیماران مبهم است لذا مبنای تشخیص پزشکان بر اساس علائم بالینی تقریباً ناممکن و یا غیر قابل اعتماد است (۲۲). چرا که در یک جامعه‌ای از افراد بیمار دارای علامت که به مراکز بهداشتی مراجعه می‌کنند الزاماً تمام افراد دارای علامت و نشانه‌های بیماری، آلوده به انگل تریکوموناس نیستند چونکه علائم ایجاد شده ممکن است مربوط به سایر آلودگی‌ها اعم از باکتریایی، قارچی، ویروسی باشد. بنابراین ضروری است که برای تشخیص عفونت ناشی از این تک یاخته از روش‌های

حاضر را لیز شدن انگل در نتیجه نقل و انتقالات لوله‌های آزمایش به آزمایشگاه و یا نامساعد بودن شرایط رشد انگل در محیط کشت دانست. بنابر این برای جلوگیری از مخفی ماندن آلودگی بهتر است از تلفیق دو روش آزمایش مستقیم نمونه تازه در گسترش مرطوب که روش ساده، ارزان و سریع است و روش کشت انگل برای یافتن موارد مثبت عفونت استفاده شود به کار بردن همزمان این دو روش حساسیت تشخیص را به ۹۸٪ و ویژگی آن را به ۱۰۰ درصد افزایش می‌دهد (۴). روش‌های تشخیص دیگر نظیر روش‌های سرولوژیکی به دلایل هزینه زیاد و وقت طولانی و نیاز به داشتن تجهیزات و افراد مجرب کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۶).

پیشنهاد می‌گردد که پزشکان، متخصصان زنان و زایمان و شاغلان حرفه مامایی برای تشخیص بیماری تنها به علائم و نشانه‌های بیماری اکتفا نکنند بلکه برای دستیابی به تشخیص قطعی بیماری، بیمار را به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ارجاع داده و از نتایج آزمایش‌های مستقیم و کشت ترشحات واژینال بیمار از نظر وجود آلودگی به تریکوموناس واژینالیس اطمینان حاصل نمایند.

نمونه رنگ‌آمیزی شده با اکریدین دارای جواب مثبت بودند. به این ترتیب حساسیت روش مستقیم به روش کشت ۵۰٪ و حساسیت روش نمونه رنگ‌آمیزی شده با اکریدین نسبت به کشت ۴۷/۵٪ در مطالعه سواهیر به دست آمد (۲۵).

در مطالعات آزمایشگاهی ترشحات واژینالیس آلوده به تریکوموناس واژینالیس به دو روش آزمایش مستقیم و کشت، گزارش‌های متفاوتی در مورد میزان حساسیت آزمایش مستقیم و کشت ارائه شده که ممکن است به دلایل متعددی ارتباط داشته باشد از جمله اینکه نتایج حاصل از آزمایش نمونه ترشحات بیمار به دو روش آزمایش مستقیم و کشت نمونه به میزان بالایی به مهارت آزمایشگر و نقل و انتقال فوری نمونه به آزمایشگاه و سرعت انجام آزمایش قبل از لیز شدن و از دست رفتن تحرک انگل و تازگی محیط کشت، درجه حرارت آزمایشگاه و انکوباتور بستگی دارد. لذا نتایج آزمایش متفاوتی را در مطالعات مختلف می‌توان انتظار داشت.

از آنجا که روش کشت انگل غالباً از حساسیت بالاتری نسبت به سایر روش‌های تشخیصی برخوردار است شاید بتوان علت تفاوت نتایج دو روش آزمایش مرطوب و کشت در مطالعه

References

- 1- Madico G, Quinn TC, Rompalo A: Diagnosis of Trichomonas vaginalis infection by PCR using vaginal swab samples. J clin Microbiol, 1998, 36: 3205-3210.
- 2- Petrin D, Dalgaty K, Bhatt Rond Garbe G: Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. Clin Microbiol Rev, 1998, 11:300-317.

- 3- Kent h L: Epidemiology of vaginitis. Am J Obst Gynecol, 1991, 165(4): 1168-76.
- 4- Quinn TC, Krieger JN: trichomoniasis in editor: Tropical and geographical Medicine. 5th ed philadelphia, WB Saunders Co, 1990: 358-364.
- 5- Rein MF, muller M: Trichomonas vaginalis in sexually transmitted diseases. 2 nd ed, New-York, MC Graw-Hill, 1990: 481-492.

- 6- Germain M, etal: Evaluation of a screening algorithm for the Diagnosis of Genital infections with *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trach* among female sexworkers in Benin. *Sex Trans Dis*, 1997, 24(2): 109-15.
- 7- Herzberg A J, Silverman JF: Detection of *Trichomonas vaginalis* in Endocervical smears. *Diagn Cyto pathol*, 1996, 14(3): 273-6.
- ۸- آقایان زاده بیتا: بررسی میزان شیوع تریکومونیازیس در زنان مراجعه کننده به بخش سیتولوژی بیمارستان آیت‌الله کاشانی و درمانگاه شهید داوودی شهر کرمان. پایان نامه کارشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ۱۳۷۱.
- ۹- فرهنگد مهین: بررسی تریکومونیاز در زنان مراجعه کننده به بیمارستان زنان میرزا کوچک خان و بررسی مقدماتی تست ایمنوفلورسانس غیرمستقیم. پایان نامه شماره ۱۶۳۱ دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۸.
- 10- Riley D E, Robert M C, Takayama T, Krieger J N: Development of a polymerase chain reaction - based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 465-72.
- 11- Shaio M F, Lin P R: Colorimetrye one- tube nested PCR for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharge. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 132-138.
- ۱۲- سینا شاهین، اسفند بد محسن، علیاری فرشید در: بارداری و زایمان ویلیامز ۱۹۹۷. چاپ اول، تهران، اشتیاق، ۱۳۷۶، جلد سوم، ص ۳۸۲.
- 13- Burstein G R and Zenilman J M: Nongonococcal Urethritis-a new Paradigm. *Clin Infect Dis*, 1999, 28 (suppl.1): 566-573.
- 14- Sobel J D: vaginitis. *N Engl J Med*, 1996, 337: 1896-1903.
- 15- Wawer M J, Nairn M C, Wabwire M F: Self-administered vaginal swabs for population-based assessment of *Trichomonas vaginalis* prevalence. *Lancet*, 1995, 345: 131-132.
- 16- Draper D, parker R, Patterson E: Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with the in pouch TV culture system. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1016-1018.
- 17- Guillerom M, Thomas C G, Anne R: Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by RCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol*, 1998 36(11): 3205.
- 18- Heine P, MC-Gregor J A: *Trichomonas vaginalis* a reemerging pathogen. *Clin Obstet Gynecol*, 1993, 36: 137-144.
- 19- Warren KS, Mahmoud AA: *Tropical and Geographical Medicine*. 2nd ed, New Youk, Mac Graw-Hill, 1990: 362.
- ۲۰- فرید حسین و همکاران: بررسی آلودگی با تریکوموناس واژینالیس در مراجعین به درمانگاه‌های زنان دانشکده پزشکی اصفهان. مجله بهداشت ایران، ۱۳۵۷، سال هفتم، شماره ۴، ص ۱۰.
- 21- Spence M R, Hollander D H, Smith J, etal: The Clinicial and Laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Trans*

- Dis, 1980, 7: 168.
- 22- Fouts A C, Kraus S J: *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J Infect Dis*, 1980, 141: 137.
- 23- Mandell GI: *Principles and Practice of infectious diseases*. 3rd ed, New York, Mac-Graw-Hill, 1990: 2117.
- ۲۴- فولادوند مراد علی بررسی آلودگی با تریکوموناس واژینالیس به وسیله سه روش پارازیتولوژیک و ارزشیابی تست ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) در بنادر بوشهر
- وکنگان (۷۳-۱۳۷۲). طب جنوب، پاییز ۷۹، شماره اول، ص ۲۹-۲۳.
- 25- Cevahir N, Kaleli I, Kaleli B: Evaluation of direct microscopic examination, acridine orange staining and culture methods for studies of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharge specimens. *Mikrobiol Bul*, 2002, 36(3-4): 329-335.
- 26- Kollander D M: Vit B12 requirement for the growth of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol*, 1985, 71(5): 683-4.