

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA RZĘSISTKÓW JAMY USTNEJ U PACJENTÓW Z HIV

MONIKA TURKOWICZ¹, DANUTA TOMASZEWSKA² I DANUTA CIELECKA¹

¹Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii AM, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, E-mail: mon.tu@gmx.net; ²Wojewódzki Szpital Zakaźny, ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa

ABSTRACT. Molecular diagnosis of oral cavity trichomonads in HIV patients. The occurrence of trichomonads in oral cavity of HIV patients is not well known. HIV patients often suffer from oral lesions (candidiosis, advanced caries) and it remains unclear if any oral parasites can affect that, therefore the aim of the study was verification of species that can occur in HIV patients' oral cavity. Diagnosis of oral trichomonads can be performed by conventional methods (microscopic observation of wet and stained preparations and cultivation) but these are time consuming and insufficient for proper species differentiation, therefore in order to detect and identify species of parasites precisely, molecular methods such as PCR (Polymerase Chain Reaction) and sequencing of its product, were applied. 54 HIV patients (18 females and 36 males at the age of 20-54) were examined. All of them were addicted to intravenous drugs for at least 6 years. Saliva, smears and spittle samples were collected and used for cultivation, preparations and molecular diagnosis. For PCR amplification a pair of primers (T1 and T2) specific for ITS 1 – 5.8 SrRNA – ITS 2 region was designed. The oral trichomonads were detected in saliva samples of 3 HIV patients; these were males at the age of 25, 27 and 44. The identification of species by PCR and sequencing of the PCR products showed the trichomonads belonging to *Trichomonas tenax*. Infection of HIV patients' oral cavity caused by *T. tenax* is rather related with inflammatory processes than with the immunosuppression of these patients but should be considered as a potential factor in pathogenesis of oral disorders in immunosuppressed patients.

Key words: HIV, oral cavity, *Trichomonas tenax*.

WSTĘP

Występowanie pierwotniaków w jamie ustnej u osób z immunodeficytem wywołanym wirusem HIV jest prawie nieznanne. Ponieważ w tej grupie pacjentów zmiany w jamie ustnej występują bardzo często i zaliczane są do chorób definiujących AIDS, ze względu na złożoną etiologię tych zapaleń (infekcje oportunistyczne, neoplazja), możliwość współwystępowania różnych patogenów i złożoność czynników sprzyjających chorobom jamy ustnej – podjęto badania nad kosmopolitycznymi pierwotniakami tego narządu – rzęsistkami.

Najczęściej występującym gatunkiem rzęsistków w jamie ustnej człowieka jest rzęsistek policzkowy *Trichomonas tenax* (Müller O.F., 1773) Dobell, 1939. *T. tenax*

zwykle występuje u osób z zaniedbaniami jamy ustnej, różnymi stanami zapalnymi błony śluzowej i chorobami przyzębia (Kurnatowska i Kurnatowska 1981, 1983; Feki i Molet 1990; Grzegorzczak-Jaźwińska i wsp. 1997). Opisano również przypadki inwazji tych pierwotniaków do innych narządów, takich jak: węzły chłonne, ślinianki, oskrzela, płuca, gruczoł sutkowy i wątroba (Jakobsen i wsp. 1987, Dubouché i wsp. 1995, Krvavac 1998, Stratakis i wsp. 1999, Dubouché i wsp. 2000, Lewis i wsp. 2003). Większość tych przypadków dotyczyła pacjentów w starszym wieku lub z wyniszczonym organizmem na skutek choroby nowotworowej, alkoholizmu itp.

Wykrywanie rzęsistków z jamy ustnej oparte na konwencjonalnych metodach, takich jak obserwacja mikroskopowa wymazów i barwionych preparatów czy hodowla, jest skuteczne, ale czasochłonne i mało efektywne, bowiem określenie gatunku tymi metodami wymaga dużego doświadczenia diagnostycznego i dobrej znajomości tej grupy pierwotniaków. Prawidłowa identyfikacja gatunku stała się możliwa dzięki technikom molekularnym, których przydatność polega głównie na wysokiej specyficzności, wiarygodności wyniku i dokładności identyfikacji gatunku. Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania metod molekularnych w celu wykrywania *Trichomonas tenax* pochodzą z 1997 roku (Kikuta i wsp.). Również pozostałe ważne w medycynie i weterynarii gatunki rzęsistków diagnozowane są molekularnie: *Trichomonas vaginalis* (Madico i wsp. 1998, Crucitti i wsp. 2003) i *Trichomonas foetus* (Felleisen i wsp. 1998). W latach 2000-2002 tymi metodami zidentyfikowano *T. tenax* u zwierząt domowych (psa, kota i konia), a co bardziej interesujące, wykryto u człowieka gatunek uznawany za specyficzny dla psa – *Tetratrichomonas canistomae* (Cielecka i wsp. 2000, Grytner-Zięcina i wsp. 2002).

Celem pracy była identyfikacja gatunkowa rzęsistków jamy ustnej pacjentów zakażonych HIV. Ze względu na przydatność stosowania technik molekularnych do oznaczania gatunków i szczepów, posłużono się tu nimi w celu weryfikacji gatunków rzęsistków mogących występować w jamie ustnej pacjentów w stanie immunosupresji.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 54 pacjentów z HIV: 18 kobiet i 36 mężczyzn w wieku od 20 do 54 lat, wszystkie osoby uzależnione od narkotyków dożylnych od co najmniej 6 lat. Do stadium choroby definiowanego jako AIDS zaliczono 37 osób, w tym u 29 osób liczba limfocytów CD₄ wynosiła poniżej 200 komórek/mm³. U wszystkich badanych stwierdzono bardzo zły stan higieny jamy ustnej, ubytki w uzębieniu i zaawansowaną próchnicę. W badaniu klinicznym odnotowano stany zapalne błony śluzowej jamy ustnej u wszystkich, w tym kandydozę u 37 osób. Pacjenci byli leczeni lekami: przeciwgrzybiczymi (38), przeciwbakteryjnymi (38) i przeciwretrowirusowymi (6 pacjentów).

Od pacjentów pobierane były: ślina wypłukana małą ilością PBS, wymazy z powierzchni błon śluzowych jamy ustnej i wyksztuszone plwocina. Z materiałów tych wykonano preparaty przyżyciowe i barwione barwnikiem Giemsy oraz założono hodowle na podłożu dwufazowym Simiča, a obecność rzęsistków oceniano w badaniu mikroskopowym. Równocześnie użyto technik biologii molekularnej – Łańcuchowej Reakcji Polimerazy (PCR) i sekwencjonowania otrzymanego produktu PCR, w celu wykrycia rzęsistków i oznaczenia gatunku.

DNA izolowano standardową metodą (Sambrook i wsp. 1989) z osadu uzyskanego przez odwirowanie wyżej wymienionych próbek. Osad przemywano w PBS i odwirowywano przy 5000xg przez 10 minut. Płyn usuwano, a osad rozpuszczano w 50 µl buforu do PCR (10 x PCR buffer, Promega) i inkubowano przez 15 minut w 95°C. Cykl zamrożeń w ciekłym azocie i inkubacji w 95°C wykonano trzykrotnie, a następnie zawiesinę rozpuszczono w 100 µl sterylnej wody destylowanej i powtarzano cykl zamrożeń i inkubacji. Pobierano 1 µl lizatu do PCR. Na podstawie sekwencji dostępnych w banku genów, charakterystycznych dla różnych gatunków rzęsistków, zaprojektowano parę starterów T1 (5' – GAGAAGTCGTAACAAGG-TAACG – 3') i T2 (5' – ATGCTTCAGTTCAGCGGGTCT – 3') i amplifikowano region ITS 1 – 5,8 SrRNA – ITS 2. Skład mieszaniny reakcyjnej (50 µl): 1 µl DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (Promega), 10 pM każdego ze starterów, 1 jednostka polimerazy Taq (Promega) i sterylna woda. PCR przeprowadzono w termocyklerze PTC-200 (MJ Research). Wstępnie denaturowano przez 5 min. w 95°C, a potem przeprowadzono 5 cykli, w następujących warunkach: 95°C przez 30 s (denaturacja), 60°C przez 1 min. (przyłączanie starterów), 72°C przez 45 s (wydłużanie) i 35 cykli: 95°C przez 30 s, 60°C przez 30 s, 72°C przez 45 s. Produkty PCR analizowano w świetle UV na 2% żelu agarozowym MetaPhor (FMC BioProducts) barwionym bromkiem etyldyny. Uzyskany produkt sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (Warszawa) i porównywano w sekwencjami z banku genów.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badaniami konwencjonalnymi rzęsistki wykryto jedynie w hodowlach izolatów od 3 pacjentów (preparaty przyżyciowe i barwione były negatywne) i tylko w ślinie. Dużym utrudnieniem w obserwacjach mikroskopowych żywego materiału i barwionych rozmazów były liczne grzyby. Podobnie, w badaniach molekularnych produkt PCR uzyskano z próbek śliny od tych samych 3 pacjentów, natomiast w lizatach wymazów i plwociny nie wykazano obecności DNA rzęsistków. Takiej zgodności wyników nie uzyskali Crucitti i wsp. (2003) porównując efektywność wykrywania rzęsistka pochwowego w wymazach dwiema metodami: hodowlą i PCR przy użyciu 5 par starterów. W pracy tej autorzy wykazali o wiele wyższą

wykrywalność rzęsistków przy użyciu metody PCR (20%) niż hodowli (7%). W naszych badaniach wykrywalność obiema metodami była identyczna, co przypuszczalnie uzależnione jest od wyjściowej ilości materiału pobieranego od pacjentów, dlatego nie wykryto obecności rzęsistków w wymazach z błony śluzowej i płwociny. Jednakże mała liczba zarażonych pacjentów (3/54) nie jest miarodajna, aby szerzej rozpatrywać efektywność metod.

Wielkość wszystkich produktów PCR wynosiła 368 pz. Amplifikowanym fragmentem był region ITS 1 – 5,8 SrRNA – ITS 2, fragment występujący w wielu kopiach w komórce, powszechnie używany w pracach wielu autorów do różnicowania gatunków blisko spokrewnionych czy też szczepów (Kikuta i wsp. 1997, Felleisen i wsp. 1998). Zsekwencjonowane produkty porównano z sekwencjami dostępnymi w banku genów. Wszystkie wykazały 100% identyczność z sekwencją charakterystyczną dla *Trichomonas tenax* (GeneBank U86615).

Spośród 54 badanych obecność rzęsistków *T. tenax* wykazano u 3 chorych mężczyzn, czynnych narkomanów żyjących w złych warunkach socjalno-bytowych, okresowo bezdomnych (Tabela 1). Wszystkich zaliczono do stadium „infekcja HIV” z relatywnie dość wysoką liczbą limfocytów CD₄. Stan jamy ustnej u nich oceniono jako bardzo zły: stwierdzono niewystarczającą higienę, ubytki sięgające połowy zębów, co najmniej 75% pozostałych zębów objętych próchnicą, obecność stanu zapalnego błony śluzowej oraz grzybicy. U kobiet, chociaż ich stan zdrowotny błony śluzowej i zębów był jeszcze bardziej niezadowolający niż w grupie mężczyzn, w żadnym przypadku nie wykryto rzęsistków.

Tabela 1. Dane o trzech pacjentach HIV-pozytywnych zarażonych *Trichomonas tenax*

Nr	Płeć i wiek (lat)	Liczba CD ₄	Grzybica rozpoznana klinicznie	Ubytki w uzębieniu (w %)	Próchnica (% objętych zębów)	Warunki socjalno-bytowe
1	mężczyzna 25	558/mm ³	+	25	75	złe, mieszka w domu
2	mężczyzna 27	309/mm ³	+	50	100	złe, bezdomny
3	mężczyzna 44	595/mm ³	+	50	75	złe, bezdomny

Nie zaobserwowano zarażeń rzęsistkiem w grupie chorych w stadium AIDS z liczbą CD₄ < 200/mm³ przy podobnych zmianach w jamie ustnej. To sugeruje, że obecność *T. tenax* nie jest skorelowana z immunodeficytem albo z diagnozą HIV. Występowanie rzęsistka policzkowego u osób w badanej grupie, może mieć związek z obecnością stanu zapalnego w jamie ustnej. Podobnie, Lucht i wsp. (1998) u pacjentów z infekcją HIV, obecności innego pierwotniaka występującego w jamie ustnej – *Entamoeba gingivalis* – nie wiązali z niedoborami immunologicznymi, ale jedynie z chorobą przyzębia.

Ogólna częstość występowania *Trichomonas tenax* u pacjentów HIV/AIDS (3/54 = 5,5%) nie jest wyższa, niż u osób ogólnie zdrowych. Ale w badanej grupie

pacjentów z infekcją HIV zarażenie *T. tenax* dotyczy osób stosunkowo młodych (Tabela 1), podczas gdy u osób ogólnie zdrowych, w wieku poniżej 30 roku życia, rzęsistkowica jamy ustnej prawie nie zdarza się (Kurnatowska i Kurnatowska 1981, 1983; Grzegorzczak-Jaźwińska i wsp. 1997), a nasila się wraz z wiekiem, szczególnie po 40 roku życia (Feki i Molet 1990). Występowanie rzęsistka policzkowego u osób w młodym wieku w badanej grupie może mieć związek z szybko postępującą degradacją śluzówki i zębów na skutek wyjątkowych zaniedbań w zakresie higieny, wieloletniego nadużywania narkotyków, czy powstawania zmian polekowych u tych pacjentów.

Jest to pierwszy raport o występowaniu *Trichomonas tenax* u pacjentów HIV-pozytywnych.

WNIOSKI

Wprawdzie wykrycie rzęsistków w jamie ustnej można uzyskać metodami konwencjonalnymi, ale tylko metody molekularne, takie jak np. PCR i sekwencjonowanie otrzymanego produktu PCR, pozwalają na uzyskanie pewnego wyniku rozpoznania gatunku pasożyta, co jest ważne w przypadku gatunków morfologicznie podobnych lub identycznych. Dzięki zastosowaniu tych technik w pracy wykazano, iż pacjenci z HIV byli zainfekowani tylko jednym gatunkiem rzęsistków – *Trichomonas tenax*.

Zarażenia rzęsistkiem policzkowym powinny być brane pod uwagę jako potencjalny czynnik w patogenezie chorób jamy ustnej u osób z immunodeficytem HIV-pochodnym, zwłaszcza, że zmiany w jamie ustnej należą do wczesnych symptomów poprzedzających AIDS.

LITERATURA

- Cielecka D., Borsuk P., Grytner-Zięcina B., Turkowicz M. 2000. First detection of *Trichomonas tenax* in dog and cat by PCR-RFLP. *Acta Parasitologica* 45: 350-352.
- Crucitti T., Van Dyck E., Tehe A., Abdellati S., Vuylsteke B., Buve A., Laga M. 2003. Comparison of culture and different PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in self collected vaginal swab specimens. *Sexually Transmitted Infections* 79: 393-398.
- Duboucher C., Farto-Bensasson F., Cheron M., Peltier J.Y., Beaufils F., Perie G. 2000. Lymph node infection by *Trichomonas tenax*: report of a case with co-infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *Human Pathology* 31: 1317-1321.
- Duboucher C., Mogenet M., Perie G. 1995. Salivary trichomoniasis. A case report of infestation of a submaxillary gland by *Trichomonas tenax*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 119: 277-279.
- Feki A., Molet B. 1990. Importance des protozoaires *Trichomonas tenax* et *Entamoeba gingivalis* dans la cavité buccale humaine. *Revue d'Odonto-Stomatologie* 19: 37-45.
- Felleisen R.S., Lambelet N., Bachmann P., Nicolet J., Muller N., Gottstein B. 1998. Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 513-519.

- Grytner-Zięcina B., Jaworski J., Cielecka D., Gierczak A., Turkowicz M. 2002. Występowanie rzęsi-
stka policzkowego *Trichomonas tenax* w jamie ustnej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem
stawów. *Reumatologia* 40: 141-145.
- Grzegorzczak-Jaźwińska A., Cielecka D., Górka R., Gierczak A. 1997. Występowanie *Trichomonas*
tenax u osób z zapaleniem przyzębia. *Wiadomości Parazytologiczne* 43: 405-410.
- Jakobsen E.B., Friis-Moller A., Friis J. 1987. *Trichomonas* species in a subhepatic abscess. *European*
Journal of Clinical Microbiology 6: 296-297.
- Kikuta N., Yamamoto A., Fukura K., Goto N. 1997. Specific and sensitive detection of *Trichomonas*
tenax by the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 24: 193-197.
- Krvavac S. 1998. Trichomoniasis of the breast diseased by fibrocystic mastopathy: pathogenic rather
than saprophytic relationship (*Trichomonas* in fibrocystic mastopathy process). *Medicinski Arhiv*
52: 143-145.
- Kurnatowska A., Kurnatowska A.J. 1981. Zbieżność zarażenia *Trichomonas tenax* ze zmianami przy-
zębia i błony śluzowej jamy ustnej. *Wiadomości Parazytologiczne* 27: 289-293.
- Kurnatowska A., Kurnatowska A.J. 1983. Analiza przypadków inwazji *T. tenax* (O.F. Müller, 1773)
Dobell, 1939. *Wiadomości Parazytologiczne* 29: 155-161.
- Lewis K.L., Doherty D.E., Ribes J., Seabolt J.P., Bensadoun E.S. 2003. Empyema caused by tricho-
monas. *Chest* 123: 291-292.
- Lucht E., Evengard B., Skott J., Pehrson P., Nord C.E. 1998. *Entamoeba gingivalis* in human immu-
nodeficiency virus type 1-infected patients with periodontal disease. *Clinical Infectious Diseases*
27: 471-473.
- Madico G., Quinn T.C., Rompalo A., McKee K.T. Jr, Gaydos C.A. 1998. Diagnosis of *Trichomonas*
vaginalis infection by PCR using vaginal swab samples. *Journal of Clinical Microbiology* 36:
3205-3210.
- Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Stratakis D.F., Lang S.M., Eichenlaub S., Loscher T., Stein R., Huber R.M. 1999. Pulmonary tricho-
moniasis: diagnosis based on identification of irritation in bronchoalveolar lavage. *Pneumologie*
53: 617-619.

Zaakceptowano do druku 30 maja 2004