Original Article

Identification of *Trichomonas* in the Lung Sputum of Patients with Asthma and Chronic Pulmonary Disease Admitted to Masih Daneshvari Hospital by PCR Technique

Fatemeh Fozongari[1], Abdolhossein Dalimi[2*], Mahin Pourabdollah[3], Majid Pirestani[4]

1- M.Sc., Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Pathology, Masih Daneshvari Hospital, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Ph.D., Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 22/Dec/2013, Accepted: 01/Feb/2014

Abstract

Objective: *Trichomonas* species usually reside in the mouth and occasionally in the respiratory tract. These species can be found in the lungs of humans. Although the pathogenicity of the parasite in the respiratory system has not been proven, it is more prevalent in people who lack good oral health or suffer from asthma or chronic pulmonary diseases. In the present descriptive study, we have identified *Trichomonas* by direct microscopic observation of stained smears and by PCR on the lung sputum of patients with asthma and chronic lung diseases that include lung cancer, bronchiectasis, COPD, and malignant pulmonary disease who were admitted to Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran.

Methods: For direct examination of 133 sputum samples, we stained the smears with giemsa. In addition a total of 60 samples were used for DNA extraction by an extraction kit (Cinnagen). Nested-PCR was used for amplifying the ITS1 target gene of the parasite. Finally the DNA sequence of the gene was determined.

Results: According to the results, in direct examination of the sputum smears there were only 4 positive cases identified, whereas 22 (36.66%) of the samples were identified as *Trichomonas* by nested PCR. According to gender, 33.33% of the female samples and 38.46% of the male samples were found to be positive.

Conclusion: Considering the high prevalence of this parasite in the study group, chronic pulmonary disease and asthmatic patients may be more susceptible to *Trichomonas*.

Keywords: *Trichomonas*, Asthma, Chronic pulmonary diseases

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 59-66

مقاله اصیل

شناسایی تریکوموناس در خلط بیماران ریوی مزمن و آسمی بستری شده در بیمارستان مسیح دانشوری با استفاده از روش PCR

فاطمه فزون‌گری[1]، عبدالحسین دلیمی[2*]، میهن پورعبدالله[3]، مجید پیرستانی[4]

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، بخش پاتولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۴- دکتری تخصصی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۰۱ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۱۲

چکیده

هدف: انگل تریکوموناس معمولاً در دهان و گاهی اوقات در مجاری تنفسی و حتی ریه انسان یافت می‌شود. گرچه بیماری‌زا بودن این انگل در سیستم تنفسی تا به حال به اثبات نرسیده است ولی در افرادی که توجهی به بهداشت دهان و دندان ندارند یا از بیماری‌های مزمن تنفسی رنج می‌برند حضور این انگل در مجاری تنفسی شایع‌تر است. از این رو در این مطالعه توصیفی وجود انگل تریکوموناس با استفاده از PCR لانه‌گزین در نمونه خلط بیماران ریوی مزمن شامل افراد مبتلا به سرطان ریه یا بدخیمی در ریه، بیماری مزمن انسداد ریه، برونشکتازی و آسمی بستری شده در بیمارستان مسیح دانشوری در سال ۱۳۹۱ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بدین‌منظور تعداد ۱۳۳ نمونه خلط صبحگاهی از بیماران برای انجام آزمایش مشاهده مستقیم میکروسکوپی اخذ شد. به علاوه DNA از ٦٠ نمونه با استفاده از کیت سیناژن استخراج شد. سپس از روش Nested-PCR برای تکثیر ژن ITS1 انگل استفاده شد. در نهایت توالی بازی نمونه‌های مثبت تعیین شد.

نتایج: طبق نتایج به‌دست آمده از مشاهده میکروسکوپی اسمیرهای رنگ‌آمیزی شده تنها ٤ نمونه آلودگی به تریکوموناس مثبت تشخیص داده شد. در آزمایش Nested-PCR از ٦٠ نمونه، تعداد ۲۲ نمونه(۳٦/٦٦ درصد) به انگل تریکوموناس آلوده بودند که ۳۳/۳۳ درصد از زنان و ۳۸/٤٦ درصد از مردان را شامل می‌شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به میزان آلودگی این انگل در گروه تحت مطالعه، احتمالاً ابتلا به بیماری تنفسی مزمن و آسم، زمینه را برای ابتلا بیشتر به این انگل فراهم می‌سازد.

کلیدواژگان: تریکوموناس، بیماری‌های ریوی مزمن، آسم

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۵۹-۶۶

مقدمه

تاکنون سه گونه تریکوموناس (*Trichomonas*) انسانی شامل تریکوموناس تناکس (*T. tenax*)، تریکوموناس واژینالیس (*T. vaginalis*) و تریکوموناس هومینیس (*T. hominis*) در مجاری تنفسی و ریه گزارش شده‌اند [۱]. تریکوموناس تناکس تک یاخته‌ای تاژک‌دار ساکن در حفره دهان است که در افراد با بهداشت دهانی پایین و همچنین در بیماری‌های پریودنتال

پیشرفته به صورت فرصت‌طلب رشد و گسترش می‌یابد. این انگل در مبتلایان به سینوزیت، التهاب لوزه، التهاب مری وآبسه‌های فکی یافت می‌شود. در افراد با بیماری‌های ریوی مزمن مانند سرطان ریه، آبسه‌های ریوی، برونشیت (Bronchitis)، برونشکتازی (Bronchiectasis)، پنومونی (Pneumonia) و آمپیم (Empyema) انگل می‌تواند از راه حلق به ریه راه پیدا کرده و تریکومونیازیس (Trichomonasis) ریوی را ایجاد نماید [۲]. تریکومونیازیس ریوی جزء بیماری‌های غیر معمول دستگاه تنفسی است [۳] که در اکثر موارد با بیماری‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی [ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، پیوند عضو، کورتیکودرمانی (Corticotherapy)] و عوامل زمینه‌ای دیگر مانند آسم (Asthma)، سرطان، تغذیه نامناسب و اعتیاد الکلی ارتباط دارد [۲].

گرچه تا به حال گزارش‌های فراوانی از جداسازی انگل تریکوموناس از ریه یا مجاری تنفسی ارایه شده است ولی اکثر گزارش‌ها به صورت گزارش موردی و با مشاهده مستقیم انگل تریکوموناس در مایع حاصل از شستشوی ریوی یا مایع جنب یا خلط بوده و فقط تعداد کمی از لحاظ مولکولی تأیید شده است [۱، ۲، ٤-۲۲]. از جمله این مطالعات مولکولی می‌توان به بررسی‌های محمود و رحمان (Mahmoud & Rahman) در سال ۲۰۰٤ در مصر، مالات (Mallat) و همکاران در سال ۲۰۰٤ در فرانسه، بلانجر (Bellanger) و همکاران در سال ۲۰۰۸ در فرانسه و لتریر (Leterrier) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در فرانسه اشاره کرد [۲۲-۲۵]. در ایران نیز مطالعه‌ای در این زمینه توسط اطهری و همکاران (۲۰۰۷) انجام شده [۲٦] اما شیوع انگل تریکوموناس در نمونه‌های خلط بیماران مزمن ریوی تا به حال در ایران بررسی نشده است؛ بنابراین در این مطالعه سعی شد با استفاده از روش PCR آلودگی خلط بیماران ریوی مزمن و آسمی بستری شده در بیمارستان مسیح دانشوری به تریکومونیاس بررسی شود.

مواد و روش‌ها

جمعیت هدف یا جامعه آماری

جمعیت هدف در این مطالعه توصیفی شامل بیماران ریوی مزمن غیر واگیردار مانند افراد مبتلا به سرطان ریه یا بدخیمی در ریه، COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)، برونشکتازی و آسم در بیمارستان مسیح دانشوری در سال ۱۳۹۱ بود. در این مطالعه از روش نمونه‌گیری تصادفی ساده استفاده شد به این صورت که در روزهای مختلف از بیماران مورد نظر که هر کدام یک کد مخصوص برای خود داشتند نمونه خلط صبحگاهی گرفته شد.

نحوه نمونه‌برداری و بررسی نمونه خلط

نمونه خلط صبحگاهی به حجم لازم متناسب با نوع خلط با فرمل- سالین مخلوط شد و از هر نمونه سه مرتبه لام تهیه شد که پس از تهیه گسترش و خشک شدن آن‌ها، در متیل الکل به مدت یک دقیقه تثبیت شد و پس از خشک شدن لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه، محلول گیمسای رقیق شده با قطره چکان روی آن‌ها ریخته شد و پس از شستشو با آب مقطر در هوای آزاد کاملاً خشک شد.

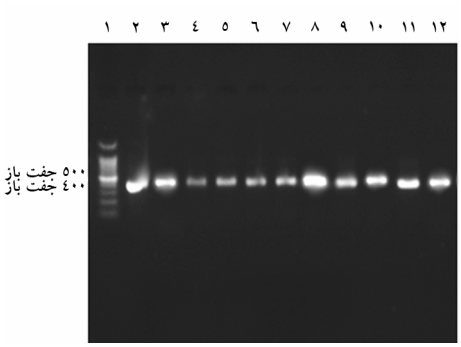
بقیه نمونه خلط برای بررسی مولکولی به حجم متناسب با محلول NTE (NaCl, Tris-HCl, EDTA) بافر مخلوط شد. حدود ۲۰۰-۳۰۰ ماکرولیتر از نمونه خلط در محلول NTE بافر (۱۰۰میلی‌مول NaCl، ۲۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH=۷/٤ و ۱ میلی‌مول EDTA) قرار داده شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت نیمه‌دستی شرکت سیناژن (ایران) با کد DN8115C که مبتنی بر روش استخراج فنل- کلروفرم است استفاده شد.

تکثیر ناحیه ITS1 با روش PCR لانه‌گزینی

به منظورشناسایی انگل تریکوموناس، ژن ITS-1 به شکل مستقیم از نمونه خلط با آغازگرهای (Primers) رفت و برگشت دور اول F1 و R1: (5`-CTT TCC CAC TCG AGA CTT TCG G-3` و 5`-TGT GCC CTT CCG TCA ATT CC-3`) و آغازگرهای رفت و برگشت دور دوم F2 و R2: (5`-AAA CGC CCG TAG TCT GAA TTG G-3` و 5`-TTC AGC CTT GCG GTC GTA G-3`) تکثیر شد. برای این کار ۱۲/۵ ماکرولیتر از مخلوط اولیه PCR (Cinagene، ایران) با غلظت نهایی 1X با ۵ ماکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده از خلط و ۱ ماکرولیتر از آغازگر رفت با غلظت نهایی ۰/٤ پیکومول و ۱ ماکرولیتر از آغازگر برگشت با غلظت نهایی ۰/٤ پیکومول و ۵/۵ ماکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر با یکدیگر مخلوط و بعد از یک تکان ملایم نمونه در دستگاه ترموسایکلر (My Cycler, Touch-Gene-Gradiant، آلمان) قرار داده شد. برای PCR دور اول، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشتگی اولیه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشتگی در ۳۵ چرخه، ٦۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای جفت شدن در ۳۵ چرخه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ساخت DNA در ۳۵ چرخه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای اطمینان از این‌که همه مولکول‌ها به طور کامل ساخته شده باشد. برای PCR ثانویه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشتگی اولیه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشتگی در ۳۵ چرخه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای جفت شدن در ۳۵ چرخه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ساخت DNA در ۳۵ چرخه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای اطمینان از این‌که همه مولکول‌ها به طور کامل ساخته شده باشد. در این کار از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. ابتدا ۰/۲۵ میلی‌گرم آگارز وزن شده و در ۲۵ سی‌سی بافر 1x TAE (Tris-Acetate-EDTA) به کمک حرارت حل شد. بعد از خنک شدن ژل، ۲ ماکرولیتر اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) به ژل اضافه شد و به آرامی داخل قالب الکتروفورز منتقل شد. برای ایجاد چاهک در ژل شانه‌ای به صورت عمودی روی قالب قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ ماکرولیتر از بافر لودینگ مخلوط و به داخل هر چاهک منتقل شد. الکتروفورز در ولتاژ ۷۰-۸۰ به مدت ٤۵-٦۰ دقیقه انجام گرفت؛ سپس در دستگاه ترانس‌لامیناتور (UVIdoc Deluxe GAS 9000، انگلیس) نتایج مشاهده شد.



شکل ۱ نتایج حاصل از الکتروفورز قطعه ژن ITS1 انگل تریکوموناس پس از تکثیر با روش Nested PCR؛ باند ۱) نشانگر ۱۰۰ جفت باز، باند ۲) نمونه کنترل مثبت، باندهای ۳ الی ۱۲) نمونه‌های مورد مطالعه

نتایج

نتایج حاصل از مشاهده مستقیم میکروسکوپی

از تعداد ۱۳۳ نمونه خلط صبحگاهی اخذ شده از لحاظ مشاهده مستقیم میکروسکوپی تنها ٤ نمونه برای تریکوموناس مثبت تشخیص داده شد.

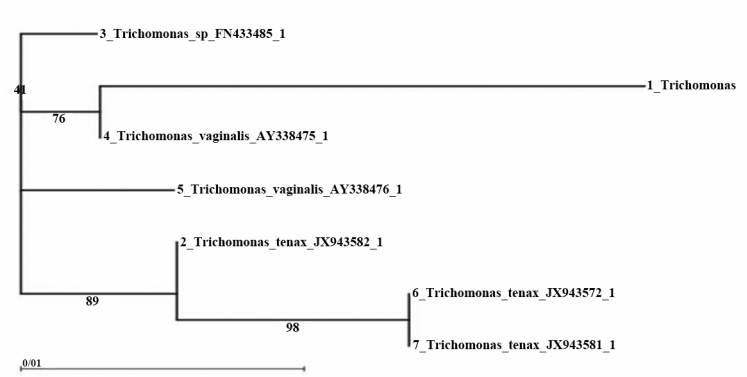
نتایج حاصل از مطالعه مولکولی

از مجموع ٦۰ نمونه مورد مطالعه، ۲۲ نمونه (۳٦/٦٦ درصد) مثبت و ۳۸ نمونه (٦۳/۳٤ درصد) منفی بود. از ۷ نمونه کنترل مثبت نیز ۷ نمونه مثبت شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR دوم و استخراج باندهای مشاهده شده توسط کیت از ژل، نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت ژن

فن‌آوران ارسال شد. پس از دریافت فایل‌های مربوط به تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Sequencher اقدام به استخراج اطلاعات به صورت فایل‌هایی با پسوند fasta نموده تا در مرحله بعد با استفاده از ابزار جستجوی هم‌ترازی پایه (BLAST) سایت NCBI اقدام به تعیین تشابه داده‌های به‌دست آمده با موارد مثبت شده در بانک ژن شود. پس از بلاست نمودن، داده‌های نتایج بدین شکل بود که نمونه مثبت با وزن مولکولی ٤٠٠ جفت باز نود و نه درصد با تریکوموناس واژینالیس و نود و هشت درصد با تریکوموناس تناکس تشابه داشته است. شکل ۲ درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن را نشان می‌دهد.

جدول ۱ نتایج حاصل از بررسی تریکومونیازیس ریوی با استفاده از روش PCR لانه‌گزین در بیمارستان مسیح دانشوری

گروه(تعداد نمونه)	زن		مرد		جمع کل (درصد)
	تعداد	نمونه مثبت (درصد)	تعداد	نمونه مثبت (درصد)	
گروه بیماران ریوی مزمن (٦٠)	٢١	٧ (٣٣/٣٣)	٣٩	١٥ (٣٨/٤٦)	٢٢ (٣٦/٦٦)



شکل ۲ درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه (1-trichomonas) با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن

بحث

بیماری تریکومونیازیس ریوی توسط سه گونه مشخص تریکوموناس انسانی شامل تریکوموناس تناکس، تریکوموناس واژینالیس و تریکوموناس هومینیس ایجاد می‌شود [۱]. آلودگی ریه و مجاری تنفسی به تریکوموناس واژینالیس در نوزادان تازه متولد شده [۲۷، ۲۸] در بالغینی که بیماری‌های نقص سیستم ایمنی دارند [۲۹، ۳۰] و در افراد با نشانگان تنفسی حاد [۳۱، ۳۲] گزارش شده است. تریکوموناس هومینیس که ساکن روده است نیز ممکن است در طول یک فیستول برونکوانترالی (Bronchoenteral Fistula) به ریه رسیده و ایجاد آمپیم یا آبسه‌های ریوی کند [۳۳]. مطالعات صورت گرفته روی تریکومونیازیس ریوی تا به حال به صورت گزارش موردی و با مشاهده مستقیم انگل تریکوموناس در مایع حاصل از شستشوی ریوی یا مایع جنب بوده که برخی از طریق مولکولی نیز تأیید شده است [۱، ۲، ٤-۲۲]. در سال ۱۹٥٦ تومکا (Tumka) در مطالعه آینده‌نگر از نمونه‌های خلط، شستشوی ریوی و بافت‌های ریه برداشت شده از طریق جراحی وجود تریکومونادها (Trichomonads) را در ۱۹ بیمار از ۱۱۲ بیمار (۱۷ درصد) با بیماری‌های ریوی مزمن شامل سرطان ریه، برونشکتازی، برونشیت مزمن، آبسه‌های ریوی، توبرکلوزیس

(Tuberculosis) و پنومونی نشان داد. تریکوموناس تنها در ۳ بیمار در گسترش مرطوب دیده شد و ۱٦ بیمار باقیمانده با کشت تریکوموناس مثبت شدند [۵].

در سال‌های اخیر از روش‌های مولکولی برای تشخیص آلودگی تریکومونادی در خلط، مایع جنب و بزاق استفاده شده است. از جمله این مطالعات می‌توان به موارد زیر اشاره کرد؛ محمود و رحمان در سال ۲۰۰٤ در مصر برای تشخیص تریکومونیازیس ریوی در نمونه خلط بیماران ریوی مزمن به ارزیابی روش PCR با استفاده از ناحیه ژنی اختصاصی تریکوموناس تناکس پرداختند [۲۳]. مالات و همکاران در سال ۲۰۰٤ در فرانسه با استفاده از روش PCR در ناحیه ژنی ITS۱ و ITS2 به شناسایی تریکوموناس تناکس در یک بیمار با بدخیمی گوارشی پرداختند [۲٤]. بلانجر و همکاران در سال ۲۰۰۸ در فرانسه روش PCR را به عنوان یک روش حساس و با ویژگی بالا در تشخیص دو مورد ابتلا به تریکوموناد عنوان کردند [۲۵]. لتریر و همکاران در سال ۲۰۱۲ در فرانسه با استفاده از روش PCR، تریکوموناس تناکس را در مایع جنب یک فرد مبتلا به ذات‌الجنب شناسایی کردند [۲۲]. اطهری و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایران نیز با استفاده روش PCR تریکوموناس تناکس را در پلاک‌های دندانی افراد تشخیص دادند [۲٦].

در مطالعه محمود و رحمان (۲۰۰٤) در گروه یک که شامل ۱۰۰ بیمار با یک نوع بدخیمی بودند، ۱۲ نفر، در گروه دوم که شامل ۱۰۰ بیمار ریوی مزمن بودند ۸ نفر مثبت و در گروه سوم که شامل ۵۰ نفر کنترل بود نمونه مثبت مشاهده نشد و در کل ۲۰ نفر از ۲۵۰ نفر (۸ درصد) مثبت شدند. از ۵۸ نفر مرد ۹ نفر (۱۵/۵ درصد) و از ٤۲ نفر زن ۳ نفر (۷/۱ درصد) مبتلا به بیماری‌های ریوی مزمن بودند [۲۳]. تفاوت نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات قبلی ذکر شده می‌تواند ناشی از تفاوت در نمونه‌برداری، نحوه آزمایش و شرایط بهداشت فردی بیماران باشد. با توجه به این‌که انگل فاقد مرحله کیستی است و نحوه انتقال آن مستقیم و اکثراً از طریق تبادل یا انتشار بزاق صورت می‌گیرد؛ بنابراین عدم رعایت موازین بهداشت فردی در هنگام صحبت یا بوسیدن و خوردن آب و غذای آلوده به بزاق می‌تواند در انتشار بیشتر انگل به اطرافیان مؤثر باشد. از طرفی ابتلا به بیماری تنفسی مزمن و آسم احتمالاً زمینه را برای ابتلا بیشتر فراهم می‌آورد. اگر چه نتایجی که محمود و رحمان در تحقیقات خود ارایه دادند نمی‌تواند گواه کاملی بر شیوع تریکومونیازیس ریوی در بیماران باشد زیرا احتمال آلودگی نمونه خلط با بزاق دهان که آلوده به انگل تریکوموناس است نیز وجود دارد. در مطالعه حاضر در خلط ۸۷ درصد افراد تحت مطالعه انگل تریکوموناس شناسایی شد. گرچه برای اثبات تریکومونیازیس ریوی لازم است نمونه‌های حاصل از شستشوی ریوی تغلیظ و وجود انگل تریکوموناس با مشاهده مستقیم تأیید شود و به صرف حضور انگل در خلط نمی‌توان تریکومونیازیس ریوی را اثبات نمود، ولی با توجه به محدودیت‌های نمونه‌برداری مطالعه حاضر به عنوان گام اول در اثبات حضور انگل در دهان و مجاری تنفسی بسیار حایز اهمیت است؛ به‌ویژه در گروه‌های مستعد مانند بیماران مزمن، انجام این گونه تحقیقات در روند تشخیص صحیح و درمان به موقع می‌تواند مؤثر باشد. در ادامه کار می‌توان از نمونه‌های حاصل از شستشوی ریوی یا بافت ریه برای اثبات حضور انگل در ریه استفاده کرد. با توجه به میزان آلودگی این انگل در گروه تحت مطالعه، احتمالاً ابتلا به بیماری تنفسی مزمن و آسم زمینه را برای ابتلا بیشتر به این انگل فراهم می‌سازد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده و کارکنان انگل‌شناسی دانشکده نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

[1] Hersh SM. Pulmonary trichomoniasis and *Trichomonas tenax*. J Med Microbiol 1985; 20(1): 1-10.

[2] Wang HK, Jerng JS, Su KE, Chang SC, Yang PC. *Trichomonas* empyema with respiratory failure. Am J Trop Med Hyg 2006; 75(6): 1234-6.

[3] Mantini C, Souppart L, Noël C, Duong TH, Mornet M, Carroger G, Dupont P, Masseret E, Goustille J, Capron M, Duboucher C, Dei-Cas E, Viscogliosi E. Molecular characterization of a new Tetratrichomonas species in a patient with empyema. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2336-9.

[4] Lehmann GD, Prendiville JT. Occurrence of a flagellate in the sputum of a case of bronchiectasis. Br Med J 1946; 1: 158-60.

[5] Tumka AF. Trichomonal invasion of the lungs. Klin Med (Mosk) 1956; 34(12): 35-40.

[6] Walton BC, Bacharach T. Occurrence of trichomonads in the respiratory tract. Report of three cases. J Parasitol 1963; 49: 35-8.

[7] Rebhun J. Pulmonary trichomoniasis associated with a fever of unknown origin. Calif Med 1964; 100: 443-4.

[8] Abed L, Delemotte J, Marill R, Ripert C, Tordjman G. Pleuro-pulmonary localization of *Trichomonas*. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1966; 59(6): 962-4.

[9] Memik F. Trichomonads in pleural effusion. JAMA 1968; 204(12): 1145-6.

[10] Skipina LV. On trichomonads in the lungs. Vrach Delo 1968; 4: 134-5.

[11] Fardy PW, March S. Trichomonads in resected lung tissue. Am Rev Respir Dis 1969; 100(6): 893-4.

[12] Turgel' ESh, Balode VK. Case of endobronchitis caused by *Trichomonas elongata*. Klin Med (Mosk) 1973; 51(10): 127-8.

[13] Walzer PD, Rutherford I, East R. Empyema with *Trichomonas* species. Am Rev Respir Dis 1978; 118(2): 415-8.

[14] Teras IuKh, Ryĭgas EM, Kazakova II, Ranne KhP, Trapido LE. Detection of *Trichomonas* in the bronchi, sputum and oral cavity in various lung diseases. Ter Arkh 1980; 52(3): 123-5.

[15] Ferrara A, Conca R, Grassi L Jr, de Carneri I. Possible pathogenic role of *Trichomonas tenax* in chronic periodontitis. Ann Ist Super Sanita 1986; 22(1): 253-5.

[16] Radosavljevic-Asic G, Jovanovic D, Radovanovic D, Tucakovic M. *Trichomonas* in pleural effusion. Eur Respir J 1994; 7(10): 1906-8.

[17] García ER, Carrasco I, Andrade-Alegre R, de Sandoya TB. *Trichomonas* in pleural empyema. Rev Med Panama 1997; 22(1): 16-9.

[18] Shiota T, Arizono N, Morimoto T, Shimatsu A, Nakao K. *Trichomonas tenax* empyema in an immunocompromised patient with advanced cancer. Parasite 1998; 5(4): 375-7.

[19] Porcheret H, Maisonneuve L, Estève V, Jagot JL, Le Pennec MP. Pleural trichomoniasis due to *Trichomonas tenax*. Rev Mal Respir 2002; 19(1): 97-9.

[20] Lewis KL, Doherty DE, Ribes J, Seabolt JP, Bensadoun ES. Empyema caused by *Trichomonas*. Chest 2003; 123(1): 291-2.

[21] Chiche L, Donati S, Corno G, Benoit S,

Granier I, Chouraki M, Arnal JM, Durand-Gasselin J. *Trichomonas tenax* in pulmonary and pleural diseases. Presse Med 2005; 34(19 Pt 1): 1371-2.

[22] Leterrier M, Morio F, Renard BT, Poirier AS, Miegeville M, Chambreuil G. Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. New Microbiol 2012; 35(1): 83-7.

[23] Mahmoud MS, Rahman GA. Pulmonary trichomoniasis: improved diagnosis by using polymerase chain reaction targeting *Trichomonas tenax* 18S rRNA gene in sputum specimens. J Egypt Soc Parasitol 2004; 34(1): 197-211.

[24] Mallat H, Podglajen I, Lavarde V, Mainardi JL, Frappier J, Cornet M. Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3886-7.

[25] Bellanger AP, Cabaret O, Costa JM, Foulet F, Bretagne S, Botterel F. Two unusual occurrences of trichomoniasis: rapid species identification by PCR. J Clin Microbiol 2008; 46(9): 3159-61.

[26] Athari A, Soghandi L, Haghighi A, Kazemi B. Prevalence of oral trichomoniasis in patients with periodontitis and gingivitis using PCR and direct smear. Iranian J Public Health 2007; 36(3): 33-7.

[27] McLaren LC, Davis LE, Healy GR, James CG. Isolation of *Trichomonas vaginalis* from the respiratory tract of infants with respiratory disease. Pediatrics 1983; 71(6): 888-90.

[28] Hiemstra I, Van Bel F, Berger HM. Can *Trichomonas vaginalis* cause pneumonia in newborn babies? Br Med J (Clin Res Ed) 1984; 289(6441): 355-6.

[29] Duboucher C, Gerbod D, Noël C, Durand-Joly I, Delgado-Viscogliosi P, Leclerc C, Pham S, Capron M, Dei-Cas E, Viscogliosi E. Frequency of trichomonads as coinfecting agents in Pneumocystis pneumonia. Acta Cytol 2005; 49(3): 273-7.

[30] Duboucher C, Noël C, Durand-Joly I, Gerbod D, Delgado-Viscogliosi P, Jouveshomme S, Leclerc C, Cartolano GL, Dei-Cas E, Capron M, Viscogliosi E. Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and Pneumocystis sp. as a novel manifestation of AIDS. Hum Pathol 2003; 34(5): 508-11.

[31] Duboucher C, Caby S, Pierce RJ, Capron M, Dei-Cas E, Viscogliosi E. Trichomonads as superinfecting agents in Pneumocystis pneumonia and acute respiratory distress syndrome. J Eukaryot Microbiol 2006; 53 Suppl 1: S95-7.

[32] Duboucher C, Barbier C, Beltramini A, Rona M, Ricome JL, Morel G, Capron M, Pierce RJ, Dei-Cas E, Viscogliosi E. Pulmonary superinfection by trichomonads in the course of acute respiratory distress syndrome. Lung 2007; 185(5): 295-301.

[33] Martínez-Girón R, Esteban JG, Ribas A, Doganci L. Protozoa in respiratory pathology: a review. Eur Respir J 2008; 32(5): 1354-70.