

PIERWOTNIAKI Z RODZINY *TRICHOMONADIDAE*  
W ZAWIESINIE KRĘTKA BLADEGO PASAŻOWANEGO  
NA JĄDRACH KRÓLIKÓW

JANINA RUCZKOWSKA, ELŻBIETA PODOLSKA i ALICJA KURNATOWSKA

Ośrodek Badawczo-Diagnostyczny dla Schorzeń Wenerycznych, Wrocław  
Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Instytutu Biologiczno-Morfologicznego  
AM, Łódź

W przygotowanej do immunofluorescencji zawiesinie krętków białych, przechowywanej w temperaturze 4°C przez 35 dni, nieoczekiwanie wykryto pierwotniaki. Jednocześnie spostrzeżono, że obecność pierwotniaków powoduje prawie całkowity rozpad krętków i uniemożliwia używanie tego materiału do badań. Uznając wyjątkową rzadkość tego zjawiska, gdyż w ciągu 20 lat pracy z *Treponema pallidum* nie obserwowano kontaminacji materiału pierwotniakami, podjęto próby ich oznaczenia. Przypadkowo wyizolowany pierwotniak prawdopodobnie pochodził z narządów moczopłciowych królika, na którym pasażowano krętki blade.

**Materiał i metodyka**

Zawiesina krętka bladego (nr 629), w której wykryto pierwotniaki, była przygotowana w następujący sposób: szczepem Nicholisa zakażono dojadrowo króliki; po 10 dniach zwierzęta zabito, stosując zator powietrzny, a jądra ich po wycięciu rozdrobniono nożyczkami i wytrząsano w płynnej pożywce Nelsona-Diesendruck (N-D) [4]. Zawiesinę wirowano dwukrotnie (2000 i 15 000 obrotów na minutę, łącznie 40 min.), aby uzyskać zagęszczenie krętków do gęstości około  $10^7$  w 1 cm<sup>3</sup>; następnie część tego materiału używano do bieżących badań diagnostycznych, a resztę umieszczono w temperaturze 4°C i tu po 35 dniach zauważono szybko poruszające się pierwotniaki.

Cechy pierwotniaków określano w mikroskopie świetlnym z kondensorem z ciemnym polem widzenia (cpw) lub fazowo-kontrastowym oraz w elektronowym skaningowym (Stereoskan 600), jednocześnie podejmu-

jąc próby uzyskania hodowli pierwotniaka *in vitro* na pożywce N-D z dodatkiem i bez dodatku krętków oraz na podłożach Pawłowej, Simiča i Róiron-Ratner [3], w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C. Do 1 cm<sup>3</sup> pożywki wprowadzono 0,05 cm<sup>3</sup> zawiesiny z pierwotnikami (około 10-30 osobników w cpw, pow. 400×). W preparatach bezpośrednich z zawiesiny krętka bladego (nr 629) i z hodowli na różnych podłożach oceniano w mikroskopie świetlnym liczebność populacji pierwotniaka, mierzono wielkość komórki oraz inne cechy morfologiczne. W mikroskopie skaningowym badano pierwotniki z hodowli wspólnej z krętkiem bladym (na podłożu N-D w temperaturze 4°C) pasażowanej co miesiąc przez pół roku od wykrycia pierwotniaka.

Preparaty przygotowano w sposób opisany w pracy [2]; wybrane w preparatach miejsca fotografowano na filmie ORWO NP 20, naświetlając 20 lub 50 sek., stosując powiększenia mikroskopu 2000 i 5000×\*.

W dalszych doświadczeniach przeprowadzono próby pasażowania pierwotniaka na jądrach 3 królików zakażonych równocześnie krętkami bladymi; 1 królik kontrolny otrzymał zawiesinę *T. pallidum* bez pierwotników. Po 10 dniach doświadczenia zwierzęta zabito i z jąder ich sporządzono homogenat, którym zakażono dalsze 3 króliki.

### Wyniki badań

W preparatach bezpośrednich z zawiesiny krętka bladego (nr 629), w której wykryto pierwotniaka, spostrzegano jego obecność do około miesiąca. Stwierdzono rozpadanie się krętków oraz zmniejszanie się ruchliwości i wielkości komórek pierwotniaka w miarę upływu czasu (tabela 1).

Próby hodowli pierwotniaka na podłożach Pawłowej, Simiča i Róiron-Ratner nie powiodły się. Natomiast na pożywce N-D z dodatkiem zawiesiny *T. pallidum* szczep utrzymywano około 6 miesięcy, w temperaturze 4°C; przeniesienie hodowli do temperatury 20°C lub 37°C powodowało natychmiast ginięcie populacji. Warto dodać, że tylko w pierwszym pasażu na podłożu N-D bez krętka pierwotniak utrzymywał się około 28 dni, następne pasáže były możliwe tylko po dodaniu świeżej zawiesiny krętka; zachowanie się populacji pierwotniaka w pierwszym pasażu ilustrują dane zestawione w tabeli 2. Największą gęstość populacji pierwotniaka w hodowli na pożywce N-D w obecności *T. pallidum* uzyskano między 6 a 12 dniem hodowli; następnie wraz z rozpadem krętków spadła

\* Dziękujemy mgr Gabrieli Hajdukiewicz z Pracowni Mikroskopii Elektronowej Ośrodka Naukowo-Badawczego AM w Łodzi za pomoc w wykonaniu preparatów i fotogramów.

TABELA 1

Zachowanie się populacji pierwotniaków wykrytych w zawieszynie *T. pallidum* nr 629

TABLE 1

The behaviour of protozoa population detected in *T. pallidum* suspension nr 629

Dzień przechowywania zawiesiny w temp. 4°C Storage day at 4°C	Liczba pierwotniaków (w 1 polu widzenia)* Number of protozoa (per 1 darkfield)
35	10-30 szybko poruszających się pierwotniaków, rozpadające się krętki 10-30 highly motile protozoa, partly disintegrated treponemes
41	5-10 mniej ruchliwych pierwotniaków, wyraźne zmniejszenie się ich wielkości, krętków brak 5-10 less motile and smaller protozoa, no treponemes
47	3-10 mało ruchliwych pierwotniaków, dalsze zmniejszanie się ich wielkości, krętków brak 3-10 poorly motile small protozoa, no treponemes
56	pojedyncze mało ruchliwe pierwotniaki, krętków brak single, poorly motile protozoa, no treponemes
80	pierwotniaków brak, krętków brak no protozoa, no treponemes

\* Obserwacje w mikroskopie świetlnym z cpm, pow. 400×  
Darkfield microscopy examination, magn. 400×

liczebność populacji pierwotniaka, zmniejszyła się ich wielkość i ruchliwość.

Mierząc wielkość komórki pierwotniaków okularom mikrometrycznym (I) 12 i (II) 24 dnia hodowli uzyskano z pomiarów 100 komórek następujące dane: (I) średnia długość  $8,60 \pm 1,02 \mu\text{m}$ , szerokość  $4,52 \pm 1,16 \mu\text{m}$  oraz odpowiednio (II)  $3,18 \pm 0,98 \mu\text{m}$  i  $2,07 \pm 0,84 \mu\text{m}$ .

W mikroskopie świetlnym z cpw i fazowo-kontrastowym spostrzegano na jednym biegunie — owalnej, okrągłej lub wrzecionowatej komórki — 2 lub 3 wici, a na biegunie przeciwnym — twór przypominający aksostyl; sposób poruszania pierwotniaka przypominał ruchy charakterystyczne dla różnych gatunków *Trichomonas*.

W cytoplazmie zaobserwowano liczne ziarnistości. Badania w mikroskopie elektronowym skaningowym — utrudnione obecnością w hodowli krętka bladego — potwierdziły w komórce pierwotniaka występowanie wici, błony falującej i aksostylu; wszystkie te cechy pozwoliły na zaliczenie go do rodziny *Trichomonadidae*, Wenyon, 1926 [1,5-7]. Próbny pasaż pierwotniaka na jądrach królika nie powiódł się. Ponadto stwier-

TABELA 2

Przeżywalność populacji pierwotniaka po pierwszym pasażu w świeżej pożywce Nelsona-Diesendruck (N-D) oraz w zawiesinie *T. pallidum* (w temp. 4°C)

TABLE 2

Survival of protozoa at 4°C after first passage in Nelson-Diesendruck medium with and without *T. pallidum*

Dzień obserwacji Day of observation	Liczba pierwotniaków*	
	w pożywce N-D** N-D medium	w zawiesinie <i>T. pallidum</i> *** <i>T. pallidum</i> suspension
6	10-50 szybko poruszających się pierwotniaków 10-50 highly motile protozoa	10-50 szybko poruszających się pierwotniaków, bardzo liczne krętki 10-50 highly motile protozoa, numerous treponemes
12	10-50 szybko poruszających się pierwotniaków 10-50 highly motile protozoa	ponad 50 szybko poruszających się pierwotniaków, liczne krętki over 50 highly motile protozoa, numerous treponemes
24	3-6 mało ruchliwych pierwotniaków 3-6 slowly motile protozoa	10-20 szybko poruszających się pierwotniaków, pojedyncze krętki 10-20 highly motile protozoa, single, treponemes
48 60	pierwotniaków brak no protozoa	1-4 mało ruchliwych pierwotniaków, krętków brak 1-4 poorly motile protozoa, no treponemes
90	pierwotniaków brak no protozoa	pierwotniaków brak, krętków brak no protozoa, no treponemes

\* Obserwacje w mikroskopie z cpw, pow. 400×

Darkfield microscopy examination, magn. 400×

\*\* 0,05 cm<sup>3</sup> zawiesiny nr 629 (10-30 pierwotniaków w polu widzenia) dodano do 1 cm<sup>3</sup> pożywki N-D  
0.05 cm<sup>3</sup> of suspension nr 629 (contained 10-30 protozoa per darkfield) was added to 1 cm<sup>3</sup> of N-D medium

\*\*\* 0.05 cm<sup>3</sup> zawiesiny nr 629 (10-30 pierwotniaków w polu widzenia) dodano do 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny krętków nr 893, świeżo wyizolowanych (o gęstości 10<sup>7</sup> w 1 cm<sup>3</sup>) od królika

0.05 cm<sup>3</sup> of suspension nr 629 (contained 10-30 protozoa per darkfield) was added to 1 cm<sup>3</sup> of N-D medium with *T. pallidum* (10<sup>7</sup> organisms per 1 cm<sup>3</sup>) freshly isolated from rabbit

dzono, że dojadrowe podanie *T. pallidum* wraz z pierwotniakami hamowało rozwój krętka.

### Wnioski

1. Cechy morfologiczne pierwotniaka, wykrytego w zawiesinie *T. pallidum*, określone w mikroskopie świetlnym i elektronowym ska-

ningowym (wymiary komórki, obecność wici, błony falującej i aksostylu), pozwoliły na zaliczenie go do rodziny *Trichomonadidae*.

2. Obecność *T. pallidum* w pożywce N-D wpływała korzystnie na rozwój populacji pierwotniaka w temperaturze 4°C.

3. Pierwotniaki w zawieszynie *T. pallidum*, użytej do zakażania jąder królika, hamowały rozwój krętków.

*Adres autorek:*

50-368 Wrocław, Chałubińskiego 4

#### LITERATURA

1. Deflein, F., Reichenow, B.: Lehrbuch der Protozoenkunde — VEB G. Fischer, Jena 1953.
2. Hajdukiewicz, G. Karasek, M. Kurnatowska, A.: *Wiad. Parazytol.*, 22, 115, 1976.
3. Kurnatowska, A.: Wykrywanie pasożytów człowieka (Rozdz. podręcznika, red. R. Kadłubowski: *Zarys Parazytologii Lekarskiej*). — PZWL, Warszawa 1975.
4. Nelson, R. A., Diesendruck J. A.: *Immun.*, 66, 667, 1951.
5. Noble, E. R., Noble, G. A.: *Parasitology. The Biology of Animal Parasites*. — Lea & Febiger, Philadelphia 1973.
6. Raabe, Z.: *Zarys Protozoologii*. — PWN, Warszawa 1964.
7. Wenrich, D. H.: *Ebenda*, 25, 177, 1947.

#### PROTOZOA OF TRICHOMONADIDAE IN SUSPENSION OF TREPONEMA PALLIDUM PASSAGED IN RABBIT TESTS

by

J. RUCZKOWSKA, E. PODOLSKA and A. KURNATOWSKA

Numerous protozoa were unexpectedly detected in a suspension of *T. pallidum*. The latter had been isolated from the testicles of a rabbit infected with Nichols strain and kept in liquid Nelson-Diesendruck (N-D) medium at 4°C for 35 days. The protozoa accelerated the decay of *T. pallidum* in the suspension. We managed to keep the strain of the protozoa at 4°C for six months after monthly passages onto the N-D medium with *T. pallidum*. On examination of their morphological features under a phase-contrast microscope, under a light microscope with dark field of vision and under an electron scanning microscope, the protozoa have been classified among *Trichomonadidae*.