

Elmar RÕIGAS, Helgi SARDIS, Virve KAAL

TRICHOMONAS TENAX'I TÜVEDE PUHASTAMINE KAASNEVATEST PÄRMSEENTEST

Trichomonas tenax'i puhaskultuuride saamist peeti veel võrdlemisi hiljuti võimatuks, sest arvati, et see algloom suudab kunstlikul söötmel eksisteerida ainult koosluses teiste mikroorganismidega (de Carneri, 1958). See arvamus on küll kummutatud, kuid ülesande keerukus peegeldub juba selles meetodiski, mille abil Diamondil (1962) esmakordselt õnnestus *T. tenax*'i tüvede puhastamine kaasnevast mikrofloorast. Nimelt selgus, et ainult antibiootikumide lisamine, mis on põhiliseks teguriks inimorganismis elutsevate teiste trihhomoonaseliikide, s. o. nii *T. vaginalis*'e (Johnson jt., 1945; Тепач, 1955, jt.) kui ka *T. hominis*'e (Teras, Tompel, 1968; Томпель, Тепач, 1976) kultuuride puhastamisel, ei osutunud siin piisavaks. Et tagada *T. tenax*'i adapteerumist akseeniliseks kasvuks kunstlikul söötmel, tuli Diamondil vältimatu vaheetapina kasutada erilist menetlust — trihhomoonaste passeerimist koos trüpanosoomidega.

T. tenax'i puhaskultuuride saamist raskendavate asjaolude uurimisel on ühtlasi selgitatud (Тепач jt., 1970a), et see flagellaat on paljude antibiootikumide suhtes väga tundlik, eriti esimestes passaažides, mistõttu mikrofloorat ei ole alati võimalik kõrvaldada algloomi kahjustamata. Siiski on antibiootikumide hoolika valiku ja doseerimise ning *T. tenax*'i kultiveerimiseks sobiva söötme alusel välja töötatud meetod (Тепач jt., 1970b), mis võimaldab saada selle alglooma puhaskultuure, kasutamata seejuures vahepealseid passeerimisi trüpanosoomidega.

Tuleb aga märkida, et seni publitseeritud meetodid on rakendatavad siiski ainult neil juhtudel, kui *T. tenax*'iga kaasneb vaid bakteriaalne mikrofloora. Nende abil ei ole võimalik vabaneda pärmseentest, kuid käesolevas uurimuses tekkis just selline vajadus seoses mitmesuguste krooniliste kopsukahjustustega haigete suust, rögast ja bronhidest saadud materjalis leiduvate trihhomoonaste uurimisega. Näiteks oli üheks ülesandeks isoleeritud trihhomoonaste tüvede bioloogiliste omaduste uurimine vaatamata sellele, kas isolaadis leidis koos algloomadega ainult bakteriaalse mikrofloora liike või ka pärmseeni. Viimaseid esineski 28 juhul.

Algul püüdsime pärmseentest vabanemiseks kohandada sama põhimõtet, mida soovitas de Carneri (1956) *T. vaginalis*'e kultuuride analoogiliseks puhastamiseks, s. o. 0,1% agarit sisaldava viskoosse söötmeaga U-toru, mille trihhomoonased läbisid, pärmseened aga kui liikumatud mikroorganismid mitte. Selleks täitsime U-toru kuni selle harude poole kõrguseni viskoosse söötmeaga, mis sobis *T. tenax*'i kasvuks. Sellise söötme saime 0,1% agari lisamisega Wantlandi jt. (1963) vedelale munasöötmele. Segasjme söötmesse veel B₁₂-vitamiini kontsentratsioon 20 µg/ml, samuti hobusesecerumit 10% ning riisitärklist 1,0—1,5 mg/ml, peale selle

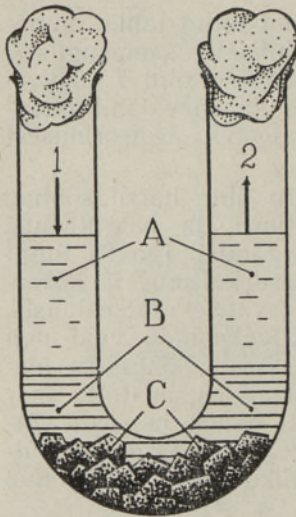
suspendeerisime sinna Hallmanni järgi (1953) valmistatud tahke munasöötme tükikesi. Olgu märgitud, et kasvuks põhiliselt samasuguses, ainult agarit mittesisaldavas kahefaasilises munasöötmes olid *T. tenax*'i tüved juba adapteerunud, sest selles oli neid koos kaasneva mikroflooraga, sealhulgas ka pärmseentega passeeritud haigetelt isoleerimisest alates.

Järgides de Carneri soovitusi, külvasime U-toru ühte harru söötme ülaossa mõne tilga puhastamisele kuuluvat kultuuri ja paigutasime U-toru termostaati (37°C), vältides toru sisu loksutamist. Iga 24 tunni järel võtsime U-toru teisest harust pipetiga tilgakese kultuuri ja külvasime selle puhtasse kahefaasilisse munasöötmesse tavalises katseklaasis. Sellisel viisil õnnestus kaasnevatest pärmseentest vabastada vaid neli *T. tenax*'i tüve. Oletasime, et mitterahuldavate tulemuste põhjuseks ülejäänud 24 juhul võis olla söötme liiga vähene viskoossus, mistõttu iga-sugustele manipuleerimistele U-toruga (termostaati panek ja sealt võtmine, pipeti viimine kultuuri proovide saamiseks jne.) võis järgneda kultuuris leiduvate pärmseente mõningane passiivne liikumine ja sattumine U-toru ühest harust teise.

Ülalmärgitud arvestades suurendasime vedela munasöötme agarisisaldust algul 0,2 ja siis 0,3%-ni. Jättes muud koostisosad endisteks, saime seega tugevasti viskoossed söötmed, eriti viimasel juhul. Nii õnnestuski söötme abil, milles oli 0,2% agarit, pärmseentest vabastada kaks ja 0,3%-lise agarisisalduse puhul veel kuus *T. tenax*'i tüve. Sellest võis järeldada, et agarisisalduse määr oli tegur, mida tuli arvestada. Et saada veelgi paremaid tulemusi, lisasime vedelale munasöötmele edaspidi 0,5% agarit, mistõttu saime juba sültjat konsistentsi pooltahke söötme. Et ka sinna sisestada Hallmanni tahke munasöötme tükikesi, täitsime viimastega U-toru kõveriku ja valasime samasse eespool nimetatud koostisega kuumaga agarsöötme. Pärast selle tardumist lisasime U-toru mõlemasse harru mõne sentimeetri kõrguse kihi vedelat agarita munasöödet: ühte harru puhastatava kultuuri külvamiseks, teise — toru läbinud *T. tenax*'i isendite kogumiseks suspensioonina. Rakendades kirjeldatud meetodit neil 16 juhul, kus eelmised puhastamiskatsed tulemusi ei andnud, suutsime pärmseentest vabastada siiski veel ainult ühe *T. tenax*'i tüve. Söötme agarisisalduse edasise suurendamise ja seega konsistentsi tihedamaks muutmise abil ülejäänud 15 *T. tenax*'i tüve isoleerimine ei õnnestunud.

Ebaõnnestumiste põhjuste selgitamiseks ja uute võimaluste leidmiseks püüdsime kõigepealt kindlaks teha, millised tegurid peale söötme konsistentsi võisid mõjustada meie katsete tulemusi. Ilmnes, et söötme agarisisaldusest hoolimata läbisid U-toru nimelt need pärmseened, millel on väga pikad ja kiiresti vohavad seeneniidid. Kuigi pärmseentel liikumisorganellid puuduvad, võisid nende seeneniidid tungida algsest inokulatsioonikoldest kaugemale söötmesse, meie katsetes ka U-toru teise harru.

Nimetatud tähelepanekust lähtudes otsustasime uurida, kas trihhomoonaseid oleks võimalik seda laadi pärmseentest isoleerida mükostaatile vahendite abil, püüdes selektiivselt pärssida pärmseente paljunemist või vähemalt seeneniitide vohamist. Selleks lisasime katseklaasi kahefaasilise munasöötme vedelasse faasi levoriini kontsentratsioonides 50—1000 TÜ/ml. Tulemustest selgus, et kui levoriini kontsentratsioon oli suurem (>600 TÜ/ml), lakkas nii pärmseente kui ka *T. tenax*'i isendite paljunemine, kuid madalamate kontsentratsioonide korral säilisid mitte ainult trihhomoonased, vaid ka pärmseened elu- ja paljunemisvõimelistena. Tuleb aga märkida, et viimasel juhul oli seeneniitide vohamine tugevasti pärsitud, mistõttu need moodustusid suhteliselt hilja ja jäid ka tunduvalt lühemaks.



U-toru kasutamine *T. tenax*'i tüvede puhastamiseks kaasnevatest pärmsentest levoriini abil. A — vedel munasööde ilma levoriiniga; B — pooltahke munasööde: vedel munasööde + agar + levoriin; C — tahke munasöötme tükikesed pooltahkes munasöötmes. Nooled tähistavad materjali külvamise ja trihhomoonaste isoleerimise suunda.

Neist katsetest võis järeldada, et tavalistes katseklaasides, kus nii trihhomoonased kui ka pärmsente spoorid ja niidid on pidevalt ja võrdse aja kontaktis levoriiniga, ei ole *T. tenax*'i isoleerimine pärmsentest tõenäoline. Seetõttu võtsime taas kasutusele U-toru ja täitsime selle kõveriku pooltahke söötmega, mis oli saadud 0,5% agari lisamisega vedelale munasöötmele ja milles olid kõik juba eespool nimetatud ingrediendid (B₁₂-vitamiin, hobuseseerum, riisitärklis ja Hallmanni tahke munasöötme tükikesed), kuid peale nende ka levoriin kontsentratsioonides 50–600 TU/ml. Pärast seda valasime U-toru mõlemasse harru levoriini mittesisaldava vedela munasöötme kihi. Puhastatava materjali külvamine, kultuuride inkubeerimine ja trihhomoonaste isoleerimine toimus nii, nagu eespool kirjeldatud.

See meetod (vt. joon.) võimaldas pärmsentest vabastada 14 *T. tenax*'i tüve neist 15-st, mille puhul teised meetodid tulemusi ei andnud. Trihhomoonaste ja pärmsente levoriinitundlikkusest sõltuvalt osutusid selle toimeaine vajalikud kontsentratsioonid erinevaiks, ulatudes 100–500 TU/ml. Samuti varieerus *T. tenax*'i tüvede pärmsentest puhastamise kestus päevades, s. o. ajavahemik puhastatava kultuuri U-toru ühte harru külvamisest kuni trihhomoonaste isoleerimiseni teisest harust. Kõige varem toimus see kahe, kõige hiljem 12 päeva jooksul. Võib arvata, et ebaõnnestumine ühel juhul oli tingitud selle tüve liiga madalast levoriinitundlikkusest. Sel puhul õnnestus puhastamine, kui levoriin asendati nüstatiiiniga, kusjuures selle mükostaatikumi sobivaks kontsentratsiooniks osutus 200 TU/ml ja isoleerimise kestuseks kuus päeva.

Siinjuures ei saa jätta märkimata, et teadaolevail andmeil võivad mitmesugused toimeained, mis pärsvivad mikroorganismide kasvu, muuta ka nende bioloogilisi omadusi (Fernandes, 1965; Crippa-Franceschi jt., 1973). Järelikult peab seda silmas pidama ka levoriini abil pärmsentest puhastatud *T. tenax*'i tüvede edasise kasutamise ja bioloogiliste omaduste uurimise võimaluste vaagimisel, sest nagu selgus meie katsetest ja nähtub ka kirjanduse andmetest (Тымка, 1966), pärsvib levoriin mitte ainult pärmsente, vaid ka trihhomoonaste kasvu.

Eeltooduga seoses ei ole ülearune veel kord rõhutada, et ligikaudu pooltel juhtudel (13-l 28-st) osutus võimalikuks eesmärgile jõuda ka mükostaatikume kasutamata. Seega, kui trihhomoonaste algsete bioloogiliste omaduste muutumine ei ole edaspidiste uuringute huvides soovitatav, tuleks *T. tenax*'i vabastamiseks pärmsentest katsetada kõigepealt U-toru meetodi neid modifikatsioone, kus tuginetakse vaid söötme kõrgele viskoossusele, mis on saavutatav agari lisamisega erinevais kontsentratsioonides.

KIRJANDUS

- de Carneri, I. Isolation of *Trichomonas vaginalis* from fungi and bacteria. — Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1956, v. 5, N 2, p. 210—212.
- de Carneri, I. Essais de culture de *Trichomonas tenax* en l'absence de bactéries. — Compt. rend. Soc. franç. gynécol., 1958, v. 28, N 3, p. 171—172.
- Crippa-Franceschi, T., Catani Milani, P., Ferraro, S. Cortical alterations and preffission morphogenesis in *Colpoda cucullus*. Progress in Protozoology. — Abstr. IV Internat. Congr. Protozoology, Clermont-Ferrand, 2—9 Sept. 1973. Clermont, 1973, p. 98.
- Diamond, L. S. Axenic cultivation of *Trichomonas tenax*, the oral flagellate of man. I. Establishment of cultures. — J. Protozool., 1962, v. 9, N 4, p. 442—444.
- Fernandes, J. F. The effect of drugs on protein and nucleic acid metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Progress in Protozoology. — Abstr. II Internat. Conf. Protozoology, London 29. 07 — 05. 08 1965. London, 1965, p. 79—80.
- Hallmann, L. Bakteriologische Nährböden. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1953.
- Johnson, G., Trussell, M., Jahn, F. Isolation of *Trichomonas vaginalis* with penicillin. — Science, 1945, N 102, p. 126—128.
- Teras, J., Tompel, H. *Trichomonas hominis* Davaine kultiveerimine ja puhaskultuuride saamine. — EPA teaduslike tööde kogumik. Parasitoloogia-alased tööd. Tartu, 1968, lk. 48—52.
- Wantland, W. W., Wantland, E. M., Winqvist, D. L. Collection, identification and cultivation of oral protozoa. — J. Dental Res., 1963, v. 42, N 5, p. 1234—1241.
- Терас Ю. X. О выращивании *Trichomonas vaginalis* в чистых культурах — ЖМЭИ, 1955, № 8, с. 64—66.
- Терас Ю. X., Каллас Е. В., Кумм Р. А. О необходимости и возможности аксенического культивирования *Trichomonas tenax* Müller. — Сб. научн. трудов ЭСХА. Материалы по паразитологии. Тарту, 1970а, с. 89—91.
- Терас Ю., Томпель Х., Мирме Э., Каллас Э. Изыскание питательных сред для культивирования и получения аксенических культур *Trichomonas hominis* и *Trichomonas tenax*. — Проблемы паразитологии в Прибалтике. Рига, 1970b, с. 251—252.
- Томпель Х. Я., Терас Ю. X. Методика аксенического культивирования *Trichomonas hominis*. — Лабораторное дело, 1976, № 6, с. 368—370.
- Тумка А. Ф. Влияние нистатина, трихомицина и леворина на рост паразитических кишечных простейших человека в культурах. — Антибиотики, 1966, т. 11, № 11, с. 1043—1047.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaaltööstusliku Instituudi

Toimetusse saabunud
17. VIII 1978

Эльмар РЫЙГАС, Хельги САРДИС, Вирве КААЛ

ОЧИЩЕНИЕ ШТАММОВ *TRICHOMONAS TENAX* ОТ СОПУТСТВУЮЩИХ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБКОВ

Для удаления дрожжевых грибов из культур штаммов *Trichomonas tenax* использовалась U-образная трубка, нижнюю часть которой заполняли специальной средой, приготовленной из жидкой яичной среды, рекомендованной Уонтляндом (Wantland и др., 1963), с добавлением 0,5% агара. В эту среду прибавляли леворин от 50 до 600 ед./мл, лошадиную сыворотку (10%), рисовый крахмал (1,0—1,5 мг/мл) и витамин В₁₂ (20 мкг/мл). Для обеспечения оптимальных условий роста *T. tenax* в эту среду добавляли несколько кусочков твердой яичной среды, приготовленной по Галлманну (Hallmann, 1953). Затем в оба колена U-образной трубки вливали жидкую яичную среду: в одно — для инокуляции культуры вместе с сопутствующими дрожжевыми грибами, в другое — для получения суспензии проникших через полутвердую среду трихомонад. Дозы леворина, превышающие 500 ед./мл, почти одинаково убивают как дрожжевые грибки, так и трихомонады.

Elmar RŌIGAS, Helgi SARDIS, Virve KAAL

PURIFYING *TRICHOMONAS TENAX* STRAINS FROM ASSOCIATING YEASTS

For eliminating yeasts from the cultures of *Trichomonas tenax* strains we filled the curve of the U-tube with a special semisolid medium prepared from the liquid egg-medium (Wantland et al., 1963) by the use of agar (0.5%). To the medium we also added levorine from 50 to 600 units per cubic cm, horse serum (10%), rice starch (1.0—1.5 mg/cm³) and vitamine B₁₂ (20 μg/cm³). To warrant more optimal conditions for the growth of *T. tenax* we incorporated into the medium some particles of solid egg-medium prepared according to Hallmann (1953). Into both branches of the U-tube we poured pure liquid egg-medium: in one branch — for inoculating the culture, in the other — for obtaining a suspension of the trichomonads which had passed through the semisolid medium. The doses of levorine exceeding 500 units per cubic cm may kill both the yeasts and trichomonads almost equally.