

MORFOLÓGIA A DIAGNOSTIKA ÚSTNYCH PRVOKOV *TRICHOMONAS TENAX* A *ENTAMOEBA GINGIVALIS* ZAFARBNÝCH PODĽA GIEMSU—ROMANOVSKÉHO

VRÁBLIC J., ¹VODRÁŽKA J., ²TOMOVÁ S., ³STANÍK R., ČATÁR G.

MORPHOLOGY AND DIAGNOSTIC OF ORAL PROTOZOANS *TRICHOMONAS TENAX* AND *ENTAMOEBA GINGIVALIS* STAINED ACCORDING TO GIEMSA—ROMANOVSKY

In the microscopic diagnosis of *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* is the technically and time not demanding native preparation of a culture, in which both protozoans can be detected according to their typical motility, determining. In the permanent preparation of the culture stained according to Giemsa—Romanovsky, which has also documentary character, are all of the characteristic cell organelles stainable, enabling so their detection without their typical motility. Staining according to Giemsa—Romanovsky is technically simple and not time consuming, not very laborious, low cost and the coloration is permanent, that means optimal for the diagnostic of oral protozoans in permanent preparations. (Fig. 5, Ref. 4.)
Key words: *Trichomonas tenax*, *Entamoeba gingivalis*, oral protozoans morphology, oral protozoans diagnostic.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 567–572

Prvky *Trichomonas tenax* a *Entamoeba gingivalis* sa vyskytujú v zdravých ústach, ale predovšetkým v ústach so zápalovými a hnisavými afekciami.

Trofozoit *T. tenax* veľký 7—12x6—10 μm má v natívnom preparáte polymorfny tvar: od okrúhleho v pokoji, cez oválny, kvapkový, či hruškový, po amébovo pretiahnutý. Je viac ako o polovicu menší ako trofozoit *E. gingivalis*. Jeho veľkosť býva veľmi rôzna. Na povrchu tela má často “nalepené” zrná ryžového škrobu

V mikroskopickej diagnostike *Trichomonas tenax* a *Entamoeba gingivalis* je rozhodujúci natívny preparát kultúry, technicky a časovo nenáročný, v ktorom oba ústne prvky určíme podľa ich typickej pohyblivosti. V trvalom preparáte kultúry zafarbenom podľa Giemsa—Romanovského, ktorý má aj dokumentárny charakter, sa farbja, a teda sú zreteľné všetky charakteristické bunkové organely, čo umožňuje ich určenie aj bez typickej pohyblivosti. Farbenie podľa Giemsa—Romanovského je technicky a časovo nenáročné, málo pracné, pomerne lacné a zafarbenie preparátov je trvalé, čiže optimálne na diagnostiku ústnych prvokov v trvalých preparátoch. (Fig. 5, Ref. 4.)

Kľúčové slová: *Trichomonas tenax*, *Entamoeba gingivalis*, morfológia ústnych prvokov, diagnostika ústnych prvokov.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 11, s. 567–572

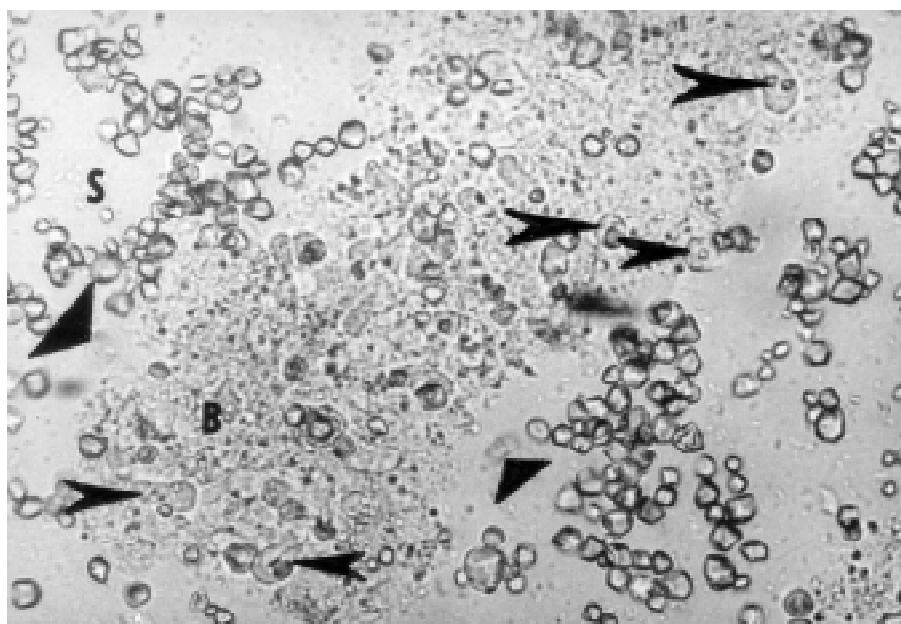
(súčasť média). Cytoplazmu má čiru, alebo málo zrnitú. Jadro väčšinou nie je zreteľné. Nápadná je časť výstužnej tyčinky — axostylu, ktorá prečnieva zadný koniec tela. Menej zreteľné sú štyri voľné bičičky a undulujúca membrána. Kmitajúce bičičky sú zreteľnejšie v momente, keď sa navzájom prekryjú. Švihanie bičičkov a undulujúcej membrány poznáme najčastejšie nepriamo, podľa lokálneho vírivého pohybu okolitých baktérií, prípadne podľa drobných škrobových zŕn. Výsledný trhavý pohyb trichomonády je rozhodujúci pre ich identifikáciu. Trichomonády je potrebné odlišiť od väčších zaoblených škrobových zŕn pasívne unášaných prúdmi média (obr. 1) (Vráblic a spol., 1991, 1992).

Trofozoit *E. gingivalis* veľký priemerne 10—25 μm má v natívnom preparáte, ak je v pokoji, okrúhly tvar. Jeho bezfarebná cytoplazma, často so zreteľným jadrom a jadierkom v zrnitej endoplazme, vysiela z povrchu do priestoru pseudopódie hyalínovej ektoplazmy vo viacerých smeroch súčasne. Pohybuje sa pomaly, plazivo, pričom mení svoj tvar — je polymorfná (obr. 2). Aj entaméba má na povrchu často “nalepené” zrná ryžového škrobu (obr. 3). *E. gingivalis* je potrebné odlišiť od prítomných leukocytov a odlúpených epitelových buniek ústnej sliznice so zreteľným jadrom (Vráblic a spol., 1991, 1992).

Ústav lekárskej biológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ¹I. stomatologická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ²Ambulancia Ústavu sociálnej starostlivosti pre telesne postihnutú mládež v Bratislave, ³Klinika otorinolaryngológie Detskej fakultnej nemocnice v Bratislave.

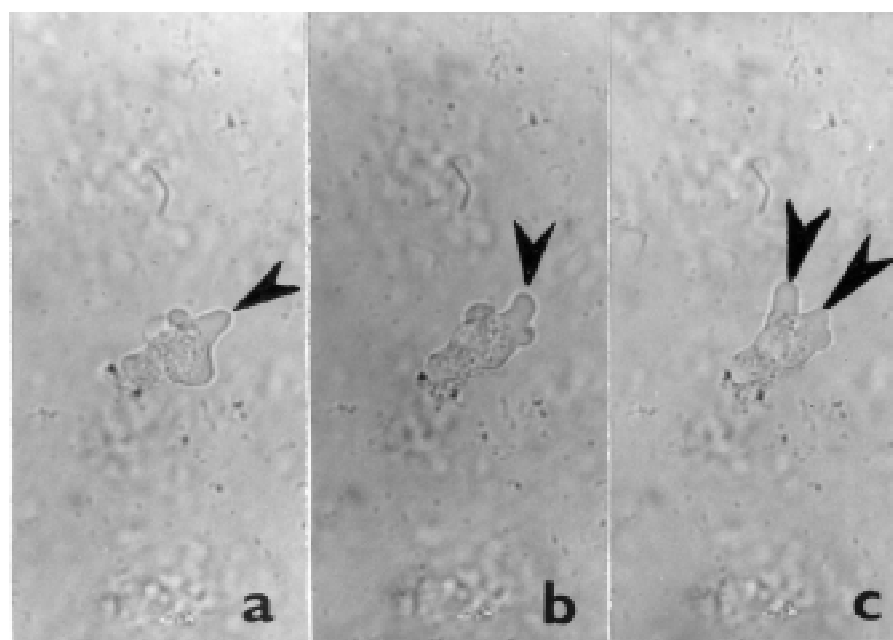
The Institute of Medical Biology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, ¹The 1st Clinic of Stomatology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, ²Ambulance of the Institute for Handicap Children, Bratislava, ³Clinic of Otorhinolaryngology, Faculty Hospital for Children, Bratislava.

Address for correspondence: J. Vráblic, MD, PhD, Ústav lekárskej biológie LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.
 Phone: +421.7.5357300



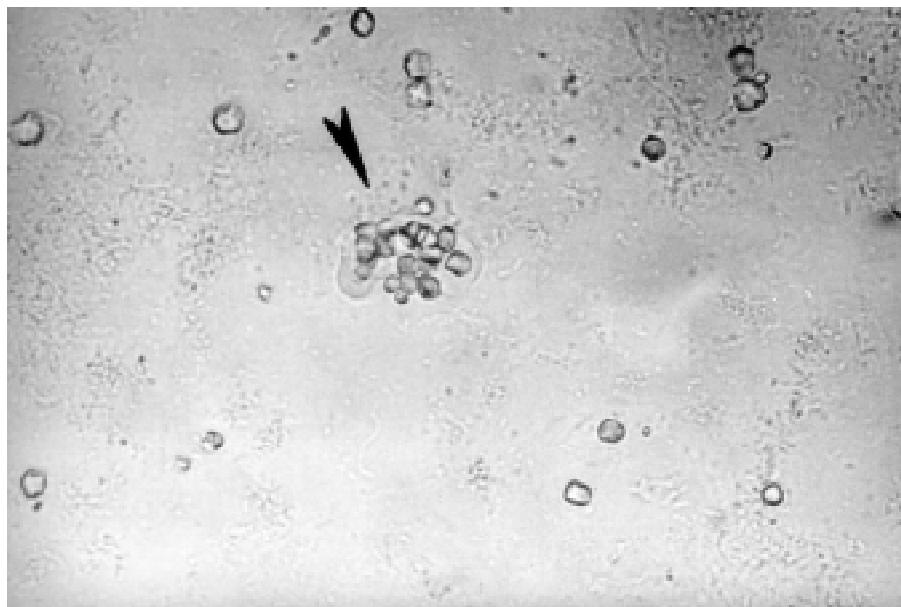
Obr. 1. *Trichomonas tenax* v natívnom mikroskopickom preparáte tekutej fázy dvojfázového kultivačného média. Trichomonády v pokoji (ostré šípky), trichomonády v pohybe — nezaostrené (tupé šípky), škrobové zrná (S), baktérie (B). Zväčš. 200-krát.

Fig. 1. *Trichomonas tenax* in the native microscopic preparation of liquid phase culture medium. Trichomonads at rest (sharp arrow), trichomonads in motion (blunt arrow), rice starch granules (S), bacteria (B). x200.



Obr. 2. *Entamoeba gingivalis* v natívnom mikroskopickom preparáte tekutej fázy dvojfázového kultivačného média v troch po sebe nasledujúcich okamihoch pohybu (a, b, c). Tvar tela zmenený v dôsledku pohybu. Ektoplazmová pseudopódia (šípka). Zväčš. 200-krát.

Fig. 2. *Entamoeba gingivalis* in the native microscopic preparation of liquid phase of two-phase culture medium at three consecutive moments of motion (a, b, c). Body shape changed by movements. Ectoplasmic pseudopodium (arrow). x200.



Obr. 3. *Entamoeba gingivalis* v natívnom mikroskopickom preparáte tekutej fázy dvojfázového kultivačného média. Zhluk škrobových zŕn “nalepených” na povrchu entaméby (šípka). Zväčš. 200-krát.
Fig. 3. *Entamoeba gingivalis* in the native microscopic preparation of liquid phase of two-phase culture medium. A cluster of rice starch granules, which are “stuck” on to the surface of the parasite (arrow). x200.

Väčšina autorov považuje *T. tenax* a *E. gingivalis* za nepatogénne komenzály. Ich výskyt dávajú do vzťahu so stavom chrupu, s hygienou a s celkovým stavom ústnej dutiny, s fajčením a podobne.

Výskyt ústnych prvokov závisí od pohlavia (muži sú viac premorení ako ženy), veku (ich výskyt stúpa s vekom), zdravotného stavu mäkkých ústnych tkanív (ich najvyšší výskyt je u pacientov s parodontózou) a prítomnosti zubov (u bezzubých detí a starcov sa nevyskytujú) (Vráblic a spol., 1986, 1992).

V našej medicíne sú ústne prvoky všeobecne na okraji pozornosti. Pretože oba prvoky sa môžu vyskytnúť nielen v ústach, ale aj v hnise z podnebných mandlí, v spúte z bronchov pľúc, v pleurovom exsudáte, v materiáli vykašľanom pri pľúcnych gangrénach, či karcinómoch, a *E. gingivalis* navyše vo vagíne a v maternici, naše poznatky a skúsenosti s diagnostikou ústnych prvokov chceme priblížiť širokej zdravotníckej verejnosti, najmä otorinolaryngológom, pneumológom, onkológom a v prípade entaméby aj gynekológom.

V súčasnosti, keď zdôrazňujeme predchádzanie ochoreniam a ich zachytávanie na úplnom začiatku, predpokladáme, že je potrebné sledovať aj možnú úlohu *T. tenax* a *E. gingivalis* v patológii človeka.

Materiál a metódy

Stery zo zubov a z parodontu sme získali ešte pred ošetrením ústnej dutiny detí, dospievajúcich i dospelých. Sliny, ktoré vyšetrený viackrát prepustil pomedzi zuby, vypustil cez lievok do skú-

mavky s dvojfázovou pôdou LES podľa Boeckea a Drbohlava a do skúmavky s dvojfázovou sérovou pôdou podľa Dobella a Laidlawa (Jírovec a spol., 1977). Do ďalších dvoch skúmaviek s rovnakými pôdami sme odobrali stery zo zubov a z parodontu. Biologický materiál v kultivačných médiách sme inkubovali v termostate pri 32 °C. Po 2—3 dňoch inkubácie sme pripravili natívne preparáty z tekutej fázy oboch médií a mikroskopicky sme odčítali výsledky kultivácií. Pozitívne boli tie médiá, v ktorých boli pohyblivé trichomonády a entaméby.

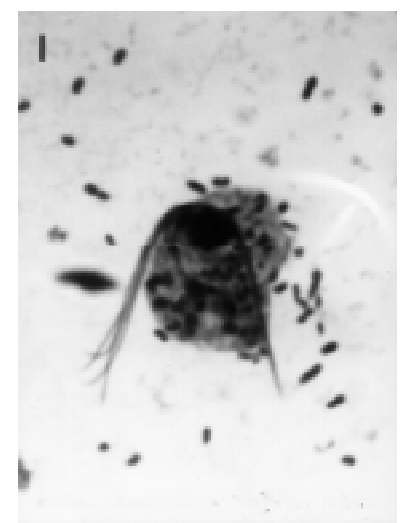
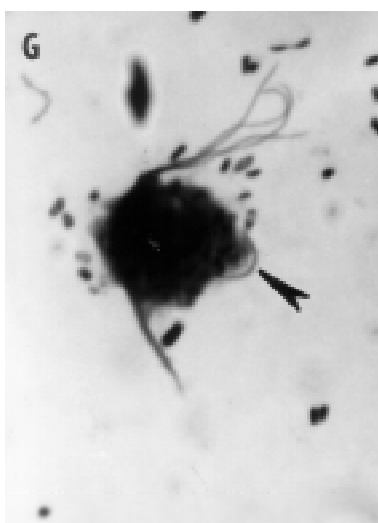
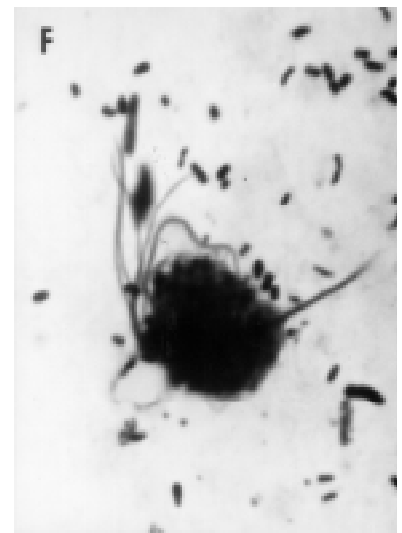
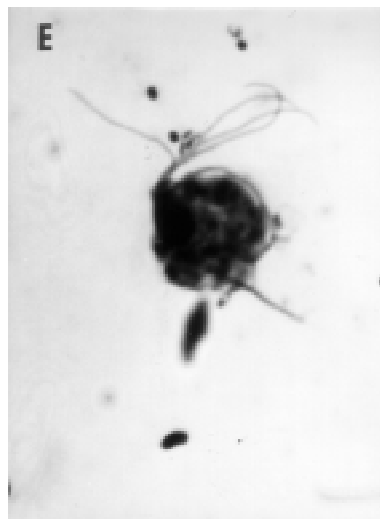
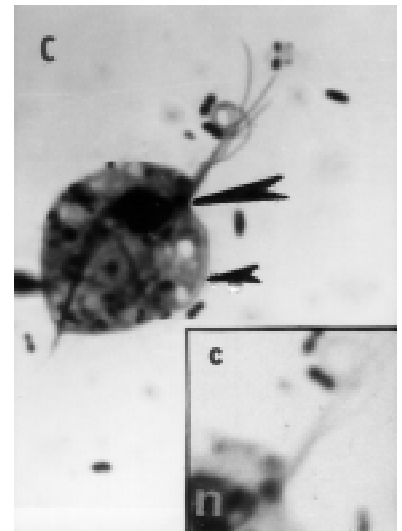
Z kultúr prvokov sme pripravili trvalé preparáty a zafarbili sme ich podľa Giemsu—Romanovského (Jírovec a spol., 1977).

Prvky sme odfotografovali pri 200-násobnom a 800-násobnom zväčšení optického mikroskopu NU-2 (Zeiss, Jena).

Výsledky a diskusia

V mikroskopickom obraze natívneho i trvalého preparátu tekutej fázy oboch dvojfázových médií sme pozorovali trofozoity ústnych prvokov. Cysty neprodukujú.

V trvalom preparáte zafarbenom podľa Giemsu—Romanovského sa zrnitá cytoplazma *T. tenax* nefarbí, alebo sa farbí na bledomodro. Jadro a menší bodkový komplex kinetozómov na prednom konci parazita sú sýtočervené. Axostyl je fialový aj v tele trichomonády. Jasnočervené sú štyri predné rovnako dlhé bičičky, ktoré vychádzajú z bodkového komplexu kinetozómov. Rovnako zafarbený je aj piaty, zadný bičik lemujúci vonkajší okraj nezafarbenej undulujúcej membrány, ktorá siaha asi do dvoch tretín dĺžky tela. Cytoplazma trichomonády je často prekrytá rôznym poč-





Obr. 4. Variabilita projekcie *Trichomonas tenax* (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) v trvalom mikroskopickom preparáte kultúry parazita zafarbenom podľa Giemsa—Romanovského.

A — trofozoit hruškového tvaru vystužený axostylom (väčšia čierna šípka), ktorý prečnieva jeho mierne zašpicatý zadný koniec. Na prednom konci má štyri voľné bičičky (menšie čierne šípky) a undulujúcu membránu, ktorá zasahuje asi do dvoch tretín dĺžky tela. Zadný bičič (biela šípka) lemuje vonkajší okraj undulujúcej membrány (zaostrené na vláknité organely);

B — trofozoit vajcového tvaru zaostrený na undulujúcu membránu (šípka); C — trofozoit hruškového tvaru. Jadro v zrnitej cytoplazme má situované excentricky, bližšie k oblému prednému koncu parazita. Pred jadrom má bodkový kinetozóm (dlhšia šípka), z ktorého vybiehajú štyri voľné bičičky a piaty bičič, ktorý lemuje vonkajší okraj undulujúcej membrány situovanej na pravom okraji parazita (kratšia šípka); c — detail predného konca trofozoitu s bodkovým kinetozómom pred jadrom (n); D — trofozoit hruškového tvaru s undulujúcou membránou situovanou na ľavom okraji parazita; E — trofozoit srdcového tvaru (zaostrené na vláknité štruktúry); F — trofozoit s množstvom baktérií na povrchu. Povrchové vláknité organely sa projikujú do obrazu parazita; G — trofozoit s množstvom baktérií na povrchu. Undulujúca membrána sa len čiastočne projikuje do jeho obrazu (šípka); H — trofozoit s množstvom baktérií na povrchu. V jeho obraze chýba axostyl; I — trofozoit polygonálneho tvaru. V jeho obraze chýba undulujúca membrána; J — najmenší z trofozoitov. Všetky charakteristické organely sa projikujú do obrazu trichomonády. Zväčš. 800-krát.

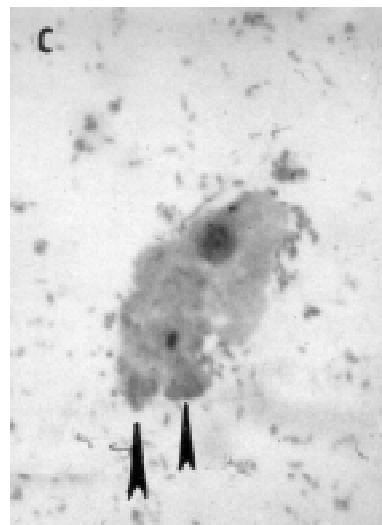
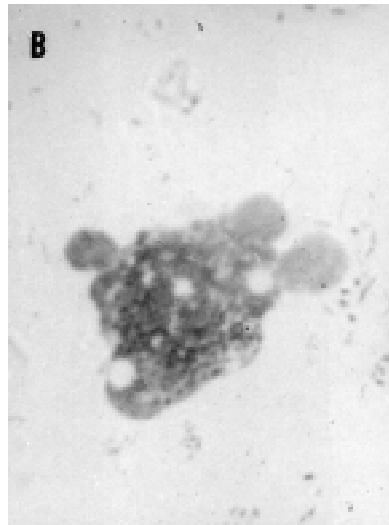
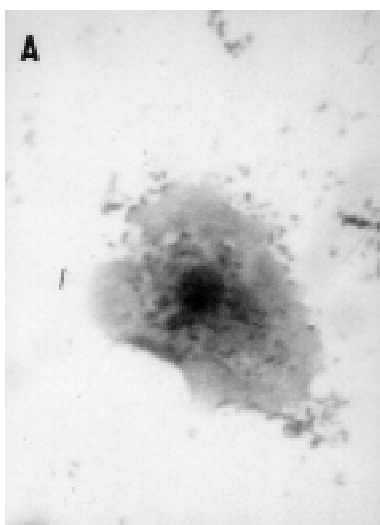
Fig. 4. Projection variability of *Trichomonas tenax* (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) in culture smears of the parasite, stained by Giemsa—Romanovsky. A — the pear-shaped trophozoite supported by an axostyle (bigger black arrow), which is protruding posteriorly. Anteriorly it has four free flagella (smaller black arrow) and an undulating membrane that is located on the right side of the parasite (shorter arrow). c — the detail of the anterior end of the parasite with the pin-shaped kinetoplast in front of the nucleus (n). D — the pear-shaped trophozoite with an undulating membrane on its left. E — the heart-shaped trophozoite (focused on the fibrous structures). F — the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface. The surface fibrillar organelles projecting into the picture of the parasite. G — the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface. The undulating membrane projects into the picture only partly (arrow). H - the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface. The axostyle is absent in its picture. I — The polygon-shaped trophozoite. The undulating membrane is absent in its picture. J — the smallest of the trophozoites. All characteristics organelles project into the picture of the trichomonad. x800.

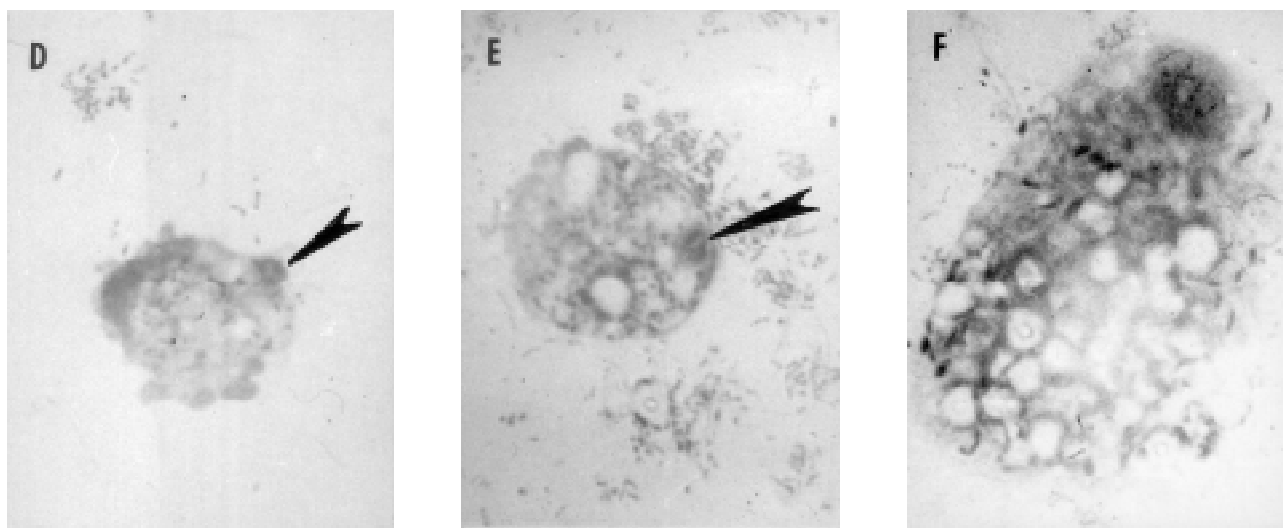
undulating membrane (focused on fibrous structures). B — the egg-shaped trophozoite. Focused on the undulating membrane (arrow). C — the pear-shaped trophozoite with the nucleus located anteriorly in the granular cytoplasm. In front of the nucleus there is a pin-shaped kinetoplast (longer arrow) with four free flagella and the posterior flagellum is lining the outer edge of the undulating membrane that is located on the right side of the parasite (shorter arrow). c — the detail of the anterior end of the parasite with the pin-shaped kinetoplast in front of the nucleus (n). D — the pear-shaped trophozoite with an undulating membrane on its left. E — the heart-shaped trophozoite (focused on the fibrous structures). F — the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface. The surface fibrillar organelles projecting into the picture of the parasite. G — the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface. The undulating membrane projects into the picture only partly (arrow). H - the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface. The axostyle is absent in its picture. I — The polygon-shaped trophozoite. The undulating membrane is absent in its picture. J — the smallest of the trophozoites. All characteristics organelles project into the picture of the trichomonad. x800.

tom tmavofialových baktérií, či nezafarbených zrn ryžového škrobu (obr. 3).

Trofozoity *T. tenax* zaokrúhlené najmä krátko pred smrťou možno omylom považovať za cysty trichomonád, alebo iných druhov prvokov.

Okrem trichomonád zdeformovaných pri príprave preparátu závisí mikroskopický obraz *T. tenax* v trvalom preparáte od uhla, ktorý zvierá pozdĺžna os prvka so zaostrenou optickou rovinou, a od priestorového rozmiestnenia jeho bičičkov, undulujúcej membrány a axostylu. Uvedené fenomény sú príčinou veľkej morfolo-





Obr. 5. Variabilita projekcie *Entamoeba gingivalis* (A, B, C, D, E, F) v trvalom mikroskopickom preparáte kultúry parazita zafarbenom podľa Giemsa—Romanovského. A — trofozoit s okrúhlym, centrálne situovaným jadrom v zrnitej endoplazme, obklopenej homogénnou ektoplazmou; B — trofozoit s množstvom baktérií na povrchu, ktoré prekrývajú jadro a s ektoplazmovými pseudopódiami, ktoré sa vytvárajú súčasne vo viacerých smeroch; C — trofozoit s excentrickým jadrom situovaným na póle, protíľahlom pólu s tmavšie zafarbenými dvoma pseudopódiami (šípky); D — trofozoit okrúhleho tvaru s vyčnievajúcim jadrom (šípka) a s tmavšie zafarbenými početnými ektoplazmatickými pseudopódiami, rovnako vyčnievajúcimi nad dve tretiny obvodu jeho endoplazmy; E — trofozoit okrúhleho tvaru s jadrom situovaným pod povrchom (šípka) a s bielymi zrnami ryžového škrobu a s početnými baktériami na povrchu; F — najväčší z trofozoitov pretiahnutého oválneho tvaru s jadrom na jednom póle a so súvislou vrstvou polygonálnych škrobových zŕn na protíľahlých dvoch tretinách povrchu. Zväčš. 800-krát.

Fig. 5. Projection variability of *Entamoeba gingivalis* (A, B, C, D, E, F) in the culture smear of the parasite, stained by Giemsa—Romanovsky. A — the trophozoite with the round-shaped nucleus located centrally in the granular endoplasm surrounded by the homogenous ectoplasm. B — the trophozoite with a cluster of bacteria on its surface, covering the nucleus. Ectoplasmic pseudopodia protrude simultaneously to several directions. C — the trophozoite with the excenter nucleus located on the opposite to the pole with two dark-coloured pseudopodia (arrows). D — the round shaped trophozoite with the protruding nucleus (arrow) and numerous dark-coloured ectoplasmic pseudopodia equally protruding above two thirds of the circumference of its ectoplasm. E — the round-shaped trophozoite with nucleus located beneath its surface (arrow) and with white rice starch granules and numerous bacteria on its surface. F — the biggest of the trophozoites. It is elongated, oval-shaped, with the nucleus on one pole and with coherent layer of polygon-shaped rice starch granules on the opposite two thirds of its surface.

gickej variability trichomonád v optickom mikroskope. Celkom iný je pohľad na trichomonádu, ktorej pozdĺžna os je súbežná s optickou rovinou pozorovania, ako na trichomonádu, ktorej pozdĺžna os je napr. na ňu kolmá (pozri obr. 3).

E. gingivalis v trvalom preparáte zafarbenom podľa Giemsa—Romanovského má bledomodrú drobnozrnnú cytoplazmu, často vakuolizovanú a v rôznom rozsahu prekrytú tmavofialovými ústnymi baktériami. Okrúhle jadro entaméby, v mikroskopickom obraze bez konštantnej polohy v rámci cytoplazmy, je červenofialové, bez zreteľného jadierka. Na bledomodrú cytoplazmu entaméby sa často projikujú biele zrná ryžového škrobu polygonálneho tvaru a rôznej veľkosti. V rámci cytoplazmy dobre odlišíme hrubozrnnú endoplazmu, prekrytú tmavofialovými baktériami, od povrchovej ektoplazmy vytvárajúcej pseudopódiu, ktorá je číra, homogénne na tmavomodro zafarbená a neprekrytá baktériami (obr. 4).

Literatúra

Jírovec O. a spol.: Parasitologie pro lékaře. Praha, Avicenum 1977, 798 s.

Vráblic J., Vodrážka J., Čatár G., Masárová E.: K izolácii a k výskytu ústneho bičíkovca *Trichomonas tenax*. Čs. Stomat., 86, 1986, č. 2, s. 79—87.

Vráblic J., Tomová S., Čatár G., Randová L., Šuttová S.: Morfológia a diagnostika *Entamoeba gingivalis* a *Trichomonas tenax* a ich výskyt u detí a mládeže. Bratisl. lek. Listy, 92, 1991, č. 5, s. 241—246.

Vráblic J., Čatár G., Vodrážka J., Tomová S., Staník R.: Sledovanie výskytu ústnych prvokov *Trichomonas tenax* a *Entamoeba gingivalis* v populácii. Folia Fac. med. Univ. Comenianae Bratisl., 30, 1992, 2, s. 7—41.

Do redakcie došlo 19.12.1997.