

蛋黃浸液培养基培养陰道 毛滴虫的初步探討*

毛克強

(貴陽医学院寄生虫学教研組)

前 言

陰道毛滴虫在國內外的感染是非常普遍的，在苏联整个妇科疾患中的發病率是24.1% (П. К. Пашнов)，孕妇产妇發病率为32% (В. А. Сапожкова)，幼女的發病率并不高，但分析幼女陰道炎的一般原因时，此病竟占60%以上 (Г. Р. Робачевский)^[1]。就國內情况來說，1953年北京苏联紅十字医院妇产科門診統計滴虫陰道炎的發病率是18%^[1]。同年上海第一医学院公共衛生学院、华东劳动衛生調查研究所曾調查国棉九厂妇女白帶病，陰道毛滴虫陽性率占調查人数的23.1%^[2]。1954年貴陽某工厂女工多發病調查結果，陰道毛滴虫陰道炎發病率为20.5%。由此可見陰道毛滴虫在國內也普遍地影响着妇女的健康，特別是女工的健康，也即是直接影响着祖國的建設事業。目前对于陰道毛滴虫所引起的疾病在临床治疗上虽已获得一定的成就，但是尚不能徹底战胜它。这主要是由于对陰道毛滴虫的生理生化特性以及流行病学方面研究得还不够，如能首先掌握此原虫的培养，則对于进一步研究是有很大价值的。早在1915年Lynch氏利用酸性培养湯作了短时间的培养。以后，国外学者相繼研究出各种培养基，获得了較長时间的培养，如，Trussell氏^[3]利用了1930年Cleveland和Collier二氏培养阿米巴的肝浸液琼脂斜面获得成功。根据Trussell氏所叙述，Mastsuda和Vchikoshi二氏利用了Tanabe-Chiba培养基，前者培养了124天，62代。后者培养了337代直到1940年Trussell氏才首先获得陰道毛滴虫的純培养。但采用青霉素以获得陰道毛滴虫的純培养是由Adler和Puluertaft二氏及Jahnson、Trussell和John等氏首先获得成功^[4]。以后Quisno、Foter二氏^[5]以及Ю. X. Tepaceet氏^[6]利用了青霉素和鏈霉素获得了純培养。在國內1955年叶英發表了利用胰陳肝麦糖培养基、肝浸湯和肉肝湯获得

* 1956年5月26日收到

了純培养。直到目前，对于培养陰道毛滴虫虽然已有数种較好的培养基，然而培养基較为复杂，其中某些藥物在較偏僻地方不易購到。为了寻求簡單而效果較佳的培养基以进行陰道毛滴虫的研究，我們試用了几种培养基，結果選擇了蛋黃浸液培养基。并与肝浸湯、肉肝湯培养基的效果作了比較，同时对培养条件进行了观察，利用青霉素和鏈霉素获得了純培养。此蛋黃浸液培养基系 Balumuth 和 Sandza 二氏用以培养溶組織內变形虫的^[6]，我們在它的成份和制作方法上作了适当的修改。

方 法

(一) 培养基制备方法：

1. 蛋黃浸液培养基制备方法：將煮老的鷄蛋黃 25 克置于盛有 120 毫升 0.8% 的氯化鈉溶液的燒杯內磨碎，使成悬液，煮沸 10 分鐘，靜置半小时，待蛋黃下沉后用棉花過濾，加生理鹽水恢复原体积，濾液置于高压蒸气灭菌器中經 15 磅压力半小时，靜置 2—3 小时后用濾紙濾去在灭菌时产生的沉淀，然后加入等量的 pH 6.4—6.8 磷酸鹽緩冲液。再經 15 磅压力半小时灭菌，如仍有沉淀需用濾紙過濾，直至培养基完全澄清为止，調节 pH 为 6.4—6.8，用無菌技术分裝于無菌試管中，每管量为 8 毫升，置于孵箱中經 37°C 24 小时証明無菌后待用。用时每管加入 1—2 鉤环無菌米粉，如进行純培养每管还需加入無菌人血清或牛血清 1 毫升。

2. 肝浸湯与肉肝湯培养基制备方法与叶英所發表的方法同。

(二) 米粉灭菌方法：

將普通白米在乳鉢中輾成粉末，用 80 孔篩篩过，裝于試管中，置于烤箱中 160°C 2 小时灭菌即可应用。

(三) 血清灭菌方法：

將人或牛血清用蔡氏濾器過濾，經無菌試驗証明無菌后待用。

(四) 标本来源和接种方法：

标本系取自我院妇产科門診陰道毛滴虫陽性病人。取标本之方法系將扩陰器放好以后，用消毒棉拭由陰道內取出分泌物，以無菌技术置于已加入米粉的培养基中，攪拌数下，然后取出棉拭，置于 37°C 孵箱中，24 小时后轉种于新的培养基中。以后每隔一星期轉种一次，轉种量以 0.3 毫升为宜。

(五) 获得純培养的方法：

將培养 24 小时的标本轉种一次，于轉种后的第三天吸出 0.3 毫升轉种于含有青霉素 20,000 單位和鏈霉素 10,000 微克和 1 毫升血清的培养基中，以后每隔 48 小时观察

一次陰道毛滴虫生長的情形，然后轉种于含有青霉素 10,000 單位和鏈霉素 5,000 微克的培养基中，同时每次均用血琼脂平板和 0.1% 琼脂肝浸湯培养基作需气和厭气培养檢查有無細菌生長，一般需观察 48—72 小时。关于抗生素的使用，大多数情况在使用 3 次后即可获得純培养。証明为純培养后，則轉种于沒有抗生素的蛋黄浸液培养基中进行長期保种。

(六) 檢查方法：

1. 肉眼观察培养基是否混濁，有無悬浮的以米粉为核心的陰道毛滴虫群落。
2. 吸取 0.1 毫升于載玻片上，置于显微镜下观察其生長繁殖的情况。
3. 用血球計算室作陰道毛滴虫的計数，以計算每毫升的数量。

培养結果

(一) 陰道毛滴虫在蛋黄浸液培养基中生長的一般情况：

1. 有菌培养：从 1954 年 10 月到現在，我們一共培养了 24 个病人的陰道毛滴虫，培养最長的一次是 153 天共 23 代，每次均因故停止培养，而非由于培养基之不适所致。

根据多次观察，認為陰道毛滴虫在蛋黄浸液培养基中一般于第 3—4 天生長繁殖的最多(圖1)，每毫升約400余万个，以后逐漸减少，但 10 余日后，在低倍鏡下每視野仍可見到 10 余个活动的陰道毛滴虫。关于轉种的时间，最初我們是 2—3 天轉种一次，以后改为每周轉种一次，均能生長繁殖得很好，甚至有个别的培养管在两个月未进行轉种的情况下，仍可見到活动的陰道毛滴虫，而且轉种于新培养基中仍可获得增殖。如果培养基中加入 0.5 毫升無菌血清，則可于轉种的第二天开始見到試管中央悬浮着帶有小气泡的小顆粒(圖2)；如取出此小顆粒置显微镜下观察，則可見到以米粉为核心的、成堆的陰道毛滴虫，此小顆粒在培养的 5—6 天逐漸消失。

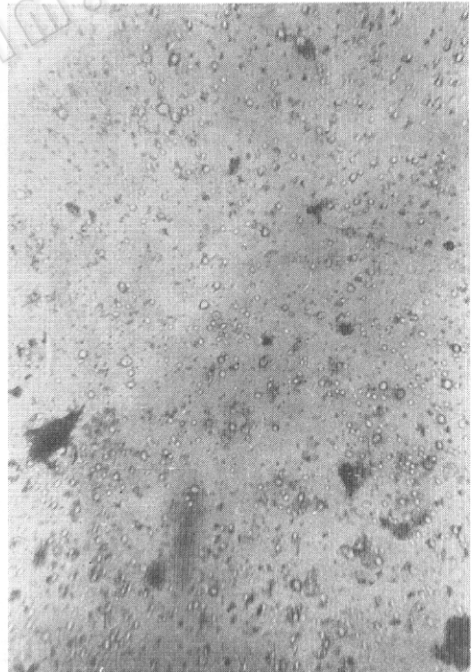


圖1 有菌培养在顯微鏡下所見之陰道毛滴虫。

2. 純培养：我們前后共用了 10 个不同病人的陰道毛滴虫进行純培养，均获得成功。

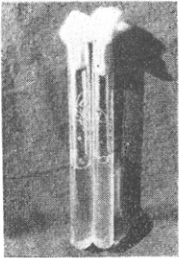


圖2 左管純培養，右管有菌培養，前者清徹，后者混濁，二者皆有懸浮之小顆粒，此系以米粉為核心的陰道毛滴蟲群落。

培養最長的時間是133天，17代，最后由于血清污染而培養終止。在培養過程中曾每隔三周用血琼脂平板和0.1%琼脂肝浸湯培養基作需氣與厭氣培養，以檢查有無細菌生長。

陰道毛滴蟲純培養生長的情況與有菌培養所不同者為前者培養液澄澈，后者培養液則混濁（圖2）。其他如生長繁殖最好的時間仍為轉種后3—4天。此時于顯微鏡下觀察亦可見到陰道毛滴蟲的群落，如有纖維于培養基中，則可見到陰道毛滴蟲附着于上（圖4）。同時于轉種后第二天也可見到以米粉為核心的陰道毛滴蟲群落（圖2）。在使用抗生素后8—9天可于顯微鏡下見到少數圓形的、身體微動的，甚至個別的體積較原來大2—3倍

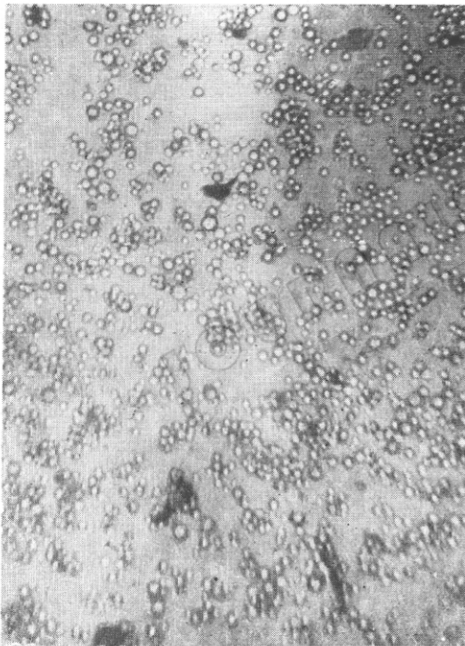


圖3 時日較久之純培養，滴蟲顯示出大小上的不同，有的形狀變圓，失去鞭毛，不活動。

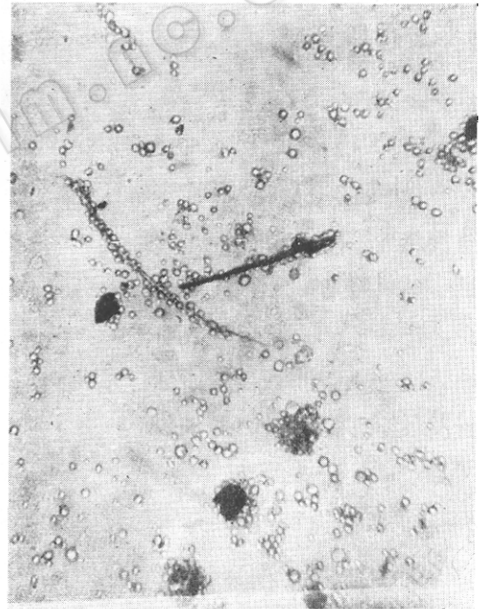


圖4 純培養中陰道毛滴蟲附着在纖維上的情形。

的陰道毛滴蟲，在更久的培養基中還可見到圓形的、身體內有空泡的，甚至有些失去鞭毛而不活動的陰道毛滴蟲（圖3）。

（二）與肝浸湯、肉肝湯培養基比較的結果：

我們前后共用了四個病人的陰道毛滴蟲分別接種在蛋黃浸液培養基、肝浸湯、肉肝

湯培养基中,在获得純培养后 72 小时測得蛋黃浸液培养基中陰道毛滴虫的数量平均为 4,567,000/毫升,肝浸湯中平均为 4,568,100/毫升,肉肝湯中平均为 4,123,600/毫升。

(三) 培养条件:

1. 血清:在我們培养的过程中,有菌培养沒有血清也可以生長繁殖。而进行純培养时,則曾因 3 次未加血清而失敗。因此純培养必須培养基中有血清才能获得成功。

2. pH 值:根据 Trussell 氏所叙述, Westphal 氏获得培养陰道毛滴虫的 pH 值是 4.0—8.8, 适宜的 pH 值是 7.0。Jirouce 和 Rodova 二氏認為适宜的 pH 为 5.5—7.0。关于純培养, Johnson 氏認為陰道毛滴虫只能在 pH 5.0—7.55 以內繁殖,最适宜的 pH 为 5.5—6.0, 叶英所用的肝浸湯、肉肝湯培养基的 pH 值分别为 5.6、5.4。而我們利用蛋黃浸液培养基进行培养的结果,証明陰道毛滴虫在 pH 5.6—7.4 均能生長,而最适宜的 pH 則为 6.4—6.8。

3. 細菌:在我們利用 pH 7.4 的蛋黃浸液培养基进行純培养时,陰道毛滴虫数量很少,但將培养管中加入从患陰道毛滴虫陰道炎病人分离出的大腸杆菌后則繁殖的很多,而对照管仍然很少。并測得加入大腸杆菌培养管在 72 小时的培养液的 pH 为 6.8, 而对照管为 7.2。以后直接用 pH 6.8 的培养基进行純培养,陰道毛滴虫也生長繁殖的很好。

4. 温度:根据培养的结果認為培养陰道毛滴虫的温度仍以 35—37°C 最适宜。关于低温对于陰道毛滴虫的影响曾有不少学者进行过研究,如 Fukushima 氏曾將陰道毛滴虫放于冰箱中, 3 天后仍能繼續培养。Mohr 氏报告他将培养管置于室温中 8 天以后再經過 24 小时冰冻, 仍能繼續培养。然而 Weiler 氏將培养物置于 18—20°C 經過 36—48 小时則不能繼續轉种下去^[10]。在我們利用蛋黃浸液培养基培养的过程中观察到陰道毛滴虫在培养管中于 23°C 室温中經 12 小时仍能保持活动能力。同时曾將分別含有大腸杆菌和白色葡萄球菌的培养管各二, 置于 14—15°C 室温中, 4 小时后仍能見到运动活潑的陰道毛滴虫, 將它們置于 5—8°C 冰箱中 11 小时后檢查, 發現陰道毛滴虫完全不活动, 但轉种于新的培养基中仍能繼續生長繁殖, 將它們再置于 -8°C 冰箱中, 3 小时后檢查發現冰冻起来了, 置于室温中解冻后檢查陰道毛滴虫均不活动, 轉种后仍能生長繁殖。但經過 12 小时冰冻后, 則未能繼續培养下去。为了确証起見, 我們曾用含有同样細菌的培养管按上法重作了 3 次, 均获得同样效果。

討 論

由以上結果可知蛋黃浸液培养基培养陰道毛滴虫是較好的培养基, 因为它的效果好, 方法簡便, 所用藥物价廉, 且易購到。同时作好的培养基于室温中 3 个月后仍可应

用。当然进一步改善此培养基还是必要的。

根据培养的条件使我们很易体会到阴道毛滴虫与它生长的环境有着密切关系,如:
(1)培养基中有無血清的关系。在有菌培养时,虽然没有血清也可以生长繁殖,而纯培养时则必须有血清才能成功,这可能是有菌培养虽然没有血清,然而细菌可以分解培养基中某些物质,或者细菌所产生的中间代谢物质供给了阴道毛滴虫的必要的营养物质或生活条件,而在纯培养时没有这种条件,故必须加入血清。(2)在利用 pH 7.4 的培养基进行纯培养时,阴道毛滴虫生长的很坏,加入了大肠杆菌后生长繁殖的很好,这可能是由于大肠杆菌分解了培养基中的碳水化合物,产生了酸,使培养基的 pH 值改变为 6.8,于是为阴道毛滴虫的生长创造了有利条件,因为以后直接用 pH 6.8 的蛋黄浸液培养基培养,也同样生长繁殖的很好,当然大肠杆菌对于阴道毛滴虫的生长可能不仅限于使培养液 pH 值的改变,其他如大肠杆菌在培养基中能够消耗一部份氧,使培养基呈比较厌氧的情况,而阴道毛滴虫是喜欢比较厌氧的环境,因此也可能为它的生长繁殖创造了条件。人的阴道总免不了有细菌寄生,即是说阴道毛滴虫的生活环境中总是有细菌寄生,不同的细菌对于阴道毛滴虫的生长应有一定的关系。因此进一步研究细菌与阴道毛滴虫的关系是有意义的。(3)从上面的事实可以看出培养基的 pH 值对阴道毛滴虫的生长繁殖有着密切的关系,在进行纯培养时 pH 7.4 的培养管中生长繁殖得很坏,而在同样条件下只是改变了培养基的 pH 值为 6.8 就生长繁殖得很好。同时经多次试验证明蛋黄浸液培养基的 pH 值为 6.4—6.8 时最适宜于阴道毛滴虫的生长繁殖,而 Johnson 认为最适宜的 pH 值为 5.5—6.0^[2],这可能由于阴道毛滴虫对于酸碱度的生理生化反应随培养基的种类而有所差异,如果是有菌培养,还与培养物中的细菌有关。

阴道毛滴虫的生长既与其生长的环境有着密切的关系,因此在进行防治它的时候,应从破坏它与外界环境的平衡着手。然而阴道毛滴虫在人体内、外到底如何与其外界环境取得统一,目前尚了解得很不够。因此今后应该利用纯培养来研究它的生理生化特性,并根据巴甫洛夫学说和米丘林学说进一步了解阴道毛滴虫在人体内、外与外界环境统一的规律。只有在掌握了这规律的基础上,破坏它与外界环境的平衡才能彻底防治它。为我国广大妇女减少疾苦,为祖国的建设事业创造有利条件。

摘 要

1. 本文对用蛋黄浸液培养基培养阴道毛滴虫作了初步介绍。
2. 对蛋黄浸液培养基的制作方法 & 培养技术均扼要叙述。
3. 从 1954 年 10 月到现在培养的结果并与肝浸液、肉肝液培养基作了比较,证明此

培养基培养阴道毛滴虫效果好。且制作方法较为简便、经济,并能保存较久的时间,同时肯定了可用此培养基获得纯培养。

4. 根据利用蛋黄浸液培养基培养阴道毛滴虫所观察到的培养条件,说明阴道毛滴虫与其生长环境有密切关系,强调应根据巴甫洛夫学说与米丘林学说了解阴道毛滴虫在人体内、外与外界环境统一的规律,从而寻求彻底防治阴道毛滴虫病的方法。

本文承金大雄教授和子本崇教授的指导与鼓励,在采取标本和技术操作方面得到本院妇产科和微生物学教研组同志们的帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 苏联红十字医院妇孺科: 大众医学, (8): 314-315, 1953.
- [2] 上海第一医学院公共卫生学院、华东劳动卫生研究所: 中华卫生杂志, (6): 478-483, 1954.
- [3] 王廷瑞: 中华妇产科杂志, (3): 233-239, 1954.
- [4] 叶英: 中华医学杂志, 41 (2): 133-136, 1955.
- [5] Терас Ю. X.: Журнал Микробиологии Эпидемиологии и Иммунологии, (8): 64-66, 1955.
- [6] Balamuth William and Josepn G. Sandza: Proc. Exp. Biol. & Med., 57: 161-163, 1944.
- [7] Johnson, G. Trussell, M. and Jahn, F.: Science, 102 (2640): 126-128, 1945.
- [8] Johnson. J. Garth: J. Parasit., 33: 189-198, 1947.
- [9] M. Magara, E. Amino and E. Yokouti: Am. Jour. Trop. Med. Hyg. 2: 267-270, 1953.
- [10] Trussell, Ray E.: Trichomonas vaginalis and Trichomoniasis. 1947, 1st edition. U.S.A. 1-75.

A PRELIMINARY STUDY ON THE CULTIVATION OF *TRICHOMONAS VAGINALIS* WITH YOLK INFUSION MEDIUM

MOU KE-CHIANG

Kueiyang Medical College

A modification of the yolk infusion medium as developed by Balamuth and Sandza for *Entamoeba*, has been tested for the cultivation of *T. vaginalis* with success. The main modifications were; a change in the pH, and the omission of the liver. The preparation of the medium and the process of cultivation are described.

With the addition of penicillin, streptomycin and serum to the medium, we succeeded in obtaining heavy growth of *T. vaginalis* free from bacteria. Comparing with the V-bouillon and Vf-bouillon media, as describe in the previous report, the yolk infusion medium is superior both in the growth of the protozoa and in the low cost and simple procedure of preparation. At the sametime, by this method of cultivation, the time required for subculture may be prolonged to a week.