

# 溶組織內阿米巴與結腸內阿米巴的 培養及長期保種的簡易方法

蔡長霖 王捷 任道性

(中央衛生研究院華東分院)

## 一. 引言

自 Loesch 氏 (1873)<sup>[1]</sup>發現溶組織內阿米巴後，很多學者在人工培養基上試作培養<sup>[2]</sup>，皆未獲得結果，直至 1918 年 Culter 氏<sup>[3]</sup>始在人工培養基上培養溶組織內阿米巴獲得成功，此後遂有很多的新培養基和培養方法相繼出現，為阿米巴痢疾的臨床診斷、實驗研究及教學示範上創造了有利的條件。但以往所用的各種培養基和培養方法無論簡單或複雜，一般均須將培養基保持於 36—37°C 的溫度下，每 48 小時左右須轉種一次，方可使蟲種不致中斷。此項保種方法，不僅手續繁瑣，且所費人力很多，消耗大量的培養材料，同時因蟲種需要保持在一定溫度之下，致使標本交流大為困難，對於教學研究機構、保種工作常成爲一個相當重大的負擔。最近三年來，我們因教學工作需要，曾應用多種培養基和培養方法，作溶組織內阿米巴及結腸內阿米巴培養。在研究培養的過程中，發現應用下述二種培養基作阿米巴保種時，祇要在適當時期改變培養溫度，即可使蟲種維持生存，因此大大的節約了人力和物力，且可使標本交流非常方便，經過二年的實際應用，確實證明了這個方法的可靠性。茲將我們常用的培養基及改良的培養方法介紹如下，以供各衛生研究及醫學教學機關參考。

## 二. 培養基製作法

我們工作初期所用的培養基主要的有三種：即 Boeck 及 Drobnlav 氏雞蛋培養基 (L. E. A. 或 L. E. S.)<sup>[4]</sup>、改良 Cleveland 及 Sanders 兩氏的肝精培養基<sup>[5]</sup>及營養瓊脂血清鹽水培養基 (nutrient agar serum saline medium)<sup>[6]</sup>。這三種培

養基對培養阿米巴活動體的效果大致相等，但第一種培養基如轉種稍遲，易於變壞，而使蟲種斷絕，後二種培養基經下述方法處理後，可以延長使用日期，且可用作長期保種之用，故現就後二種培養基之製備方法介紹如下：

1. 改良 Cleveland 及 Sanders 兩氏的肝精培養基：製作方法係用 *bacto-endamoeba medium* 40.5 克 (*beef liver infusion* 28.0 克, *pepton* 0.56 克,  $\text{NaCl}$  0.28 克,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.5 克, *agar* 10.16 克) 與蒸餾水 1,000 毫升混合加熱使其充分溶解，分裝於洗淨之試管中，每管約 4—4.5 毫升，用脫脂棉花塞好，在 15 磅壓力的蒸鍋中消毒，經 20 分鐘 ( $121^\circ\text{C}$ )，取出斜放於室溫中，使凝成斜面，以緩衝液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  11.33 克,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.269 克,  $\text{NaCl}$  8 克及蒸餾水 1,000 毫升合成) 按上述同樣方法消毒冷卻後以 10 份與無菌馬血清 1 份的比例混合，配成培養基之液體部分，以後分注於上述盛培養基的試管中，以遮掩斜面的  $\frac{3}{4}$  為度，再加入消毒米粉 2—3 白金耳，然後置於  $37^\circ\text{C}$  溫箱中 24 小時，檢查消毒完善與否，如無污染細菌發現則可藏於冰箱中保存，以備隨時應用，本培養基的液體部分， $\text{pH}$  以 7.0—7.2 為最適宜。

消毒米粉製法：係將脫除蛋白及脂肪的米粉放入試管或瓶中蓋好，置於烤箱中，加熱至  $160-180^\circ\text{C}$ ，歷 1 小時，經過 24 小時後，再以同法重烤 1 次，至第 3 次為止，但加熱時應注意不要超過上述溫度，以免米粉變壞。

2. 營養瓊脂血清鹽水培養基：係用營養瓊脂 23 克 (*beef extract* 3.2 克, *pepton* 5.0 克, *agar* 15.0 克) 與蒸餾水 1,000 毫升混合加熱使其充分溶解，按上述同樣方法經蒸氣消毒，製成斜面，以後用無菌林氏溶液 ( $\text{NaCl}$  6.0 克,  $\text{KCl}$  0.1 克,  $\text{CaCl}$  0.1 克,  $\text{NaHCO}_3$  0.1 克及蒸餾水 1,000 毫升) 20 份與無菌馬血清 1 份混合的液體，加注於固體斜面上，至遮蓋固體部分  $\frac{1}{2}-\frac{3}{4}$  時為止，在  $37^\circ\text{C}$  暖箱中培養 24 小時，如無細菌污染，乃儲存於冰箱中以備應用。

### 三. 培養方法

1. 蟲種建立方法：以白金耳採取含有阿米巴活動體的黏液血便約 1 克，與上述培養基上之液體部分充份混合置於  $37^\circ\text{C}$  溫箱中進行培養，在 24—48 小時內用消毒玻璃吸管吸取培養基體之沉渣部分，在鏡下檢查有無活動體存在，一般接種後 24—48 小時即可見到活動體出現。如接種材料為帶有囊孢的糞便時，則應將糞使用清水調勻，經紗布濾過，在尖底量杯中靜置 45—60 分鐘，使沉澱下

沉至杯底，然後倒去上面液體，如此反復沉澱至上面液體澄清為止（大約 3—4 次），以後不必經過 HCl 處理，即以消毒吸管吸取沉澱，種入培養基中，置於 37°C 溫箱中進行培養。為了避免培養基本身變壞，以後每 48—72 小時，以無菌玻璃吸管吸取管底的沉渣轉種 1 次，一般至接種後 7—10 天，即可見到有活動體出現。上述建立蟲種的培養方法，和一般書中所載大致相同。在蟲種建立之後，如經常須用活動體時不必按每 48—72 小時轉種一次的方法進行繁殖，可僅將培養之液體部分倒出後，換加新的馬血清林氏液或馬血清緩衝液，如此即可減少細菌生長，而使阿米巴繁殖良好，蟲數增多，因此同一斜面即可延長使用日期 3—4 倍（圖 1）。此項倒出之液體部分，亦含有相當數量的阿米巴活動體，可

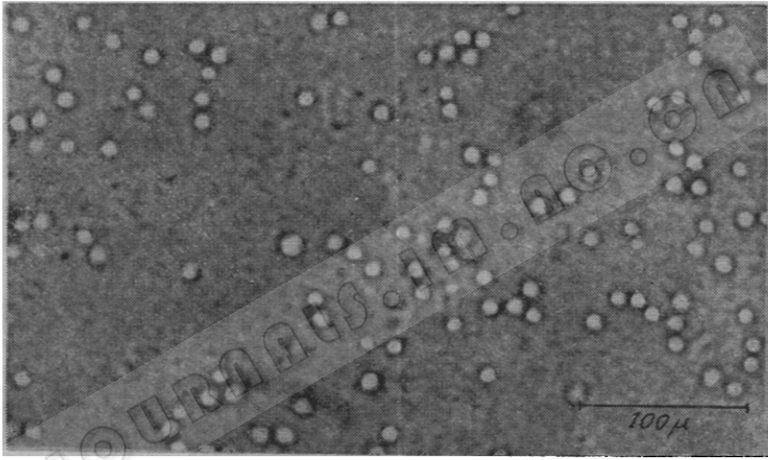


圖 1 在培養過程中，只換加液體部分，而不調換新培養基的阿米巴繁殖情形。

置於沉澱管中經每分鐘 1,500—2,000 轉的遠心沉澱 15—20 分鐘，然後傾去上面澄清液體部分，加入消毒生理鹽水，再依同樣方法進行沉澱。如此清洗 2 次，使雜菌大為減少，然後吸取管底沉渣進行培養，亦可獲得繁殖良好的效果。

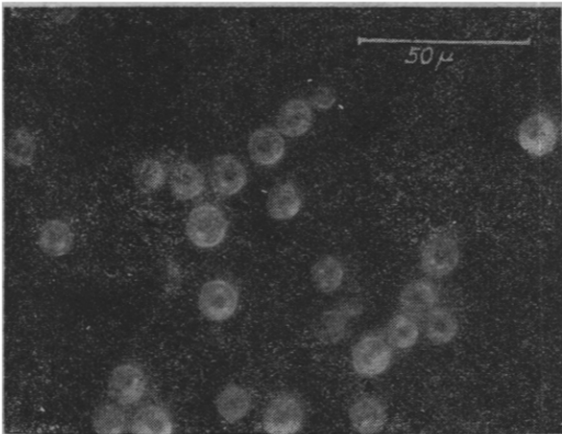


圖 2 在保種過程中，將培養基放置於溫室中，活動體縮成圓形。

面澄清液體部分，加入消毒生理鹽水，再依同樣方法進行沉澱。如此清洗 2 次，使雜菌大為減少，然後吸取管底沉渣進行培養，亦可獲得繁殖良好的效果。

2. 簡易長期保種法：如在蟲種建立之後，並不經常需用阿米巴活動體，可將已經查見含有大量活動體的培養管，由孵卵箱取出，置於室內冷暗之處，此時因溫度降低，

活動體的活動即行緩慢。一般在春秋的室溫中多數活動體變成圓形(圖 2),但尚可於少數活動體查見有短小的偽足伸出及緩慢的活動情形。冬季室溫在  $10^{\circ}\text{C}$  以下時活動全部停止,但若以碘伊紅染色仍可見到少數蟲體因受刺激伸出細小的偽足。如此保存的活動體在一個月內數目未見減少,在一個半月後則蟲數有顯著的減少。我們保存最長的時間達兩個月之久尚能見到少數蟲體,但為安全計,我們常按每一個半月轉種一次。初轉種之培養基應放在  $37^{\circ}\text{C}$  的溫箱中 48 小時,以待蟲數繁殖增多,然後再移置於室溫中,待一個半月後再行轉種,如需應用活動體,可隨時將此培養基重置於  $37^{\circ}\text{C}$  孵卵箱中,數小時後即可應用,此時一部分的活動體因溫度適合而重又恢復活動(圖 3,4),一般以放入  $37^{\circ}\text{C}$  溫箱後 15—24 小時大部分活動體的活動即能恢復,如不需用則仍可置於室溫中。南京地區冬季各月的平均室溫在  $2-5^{\circ}\text{C}$  左右,夏季各月的平均室溫在  $24-28^{\circ}\text{C}$  左右,但在天氣過冷或過熱或溫度日差較大的地區,此種保種方法是否也可適用,猶待實驗證明。我們使用此項方法將近二年的過程中,曾以結腸內阿米巴及溶組織內阿米巴各 2 例在改良 Cleveland 及 Sanders 肝精培養基及營養瓊脂血清培養基上同時作培養保種的比較觀察,結果在 45 天以內保種情況大體相似,但在 45 天以後,後者仍可查到相當數量的蟲體,而在前者則不易找到,故僅就此兩種培養基而論,後者似優於前者。我們所保存的蟲種,如有其他機關需要時,祇須把培養試管的棉花塞換裝消毒橡皮塞,以防液體部分外流,即可按一般郵寄或攜帶方法寄遞,並不需使用熱水瓶或其他保溫特殊設備。

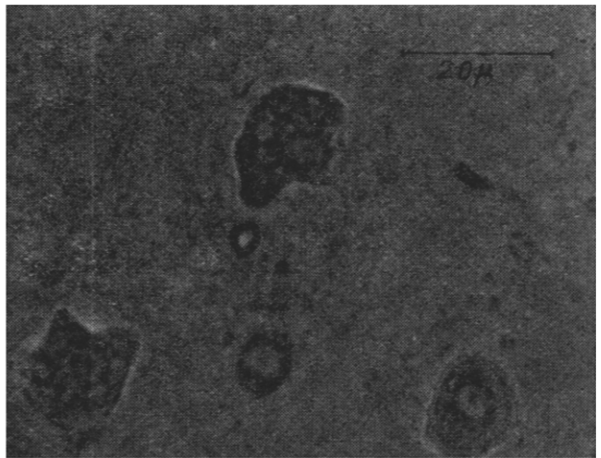
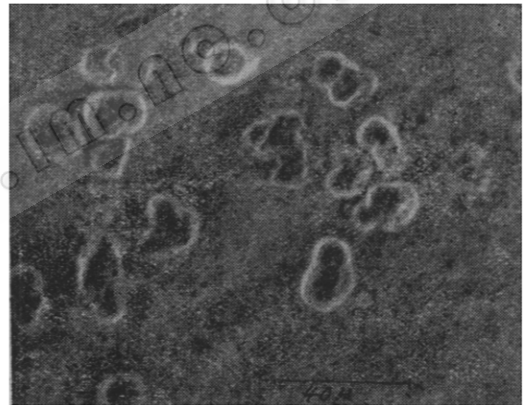


圖 3,4 將放置在室溫中的培養基,又移放至  $37^{\circ}\text{C}$  的溫箱中 24 小時後,活動體重又恢復活動。

## 四. 討 論

按過去阿米巴的培養及保種工作中，一般皆在 36—37°C 溫度條件下，每隔 48—72 小時轉種 1 次<sup>[4,5,6,7,8,9,10,11,12]</sup>，手續極為繁瑣，其後 Nelson 氏 (1947) 創用肝酒精浸出培養基，謂轉種日期可延長為 4—10 天，最長可達 17 天<sup>[13]</sup>。Craig 氏 (1948) 更介紹 Lamy 氏在培養基中加入 para amino phenyl sulphamide 抑制細菌繁殖後，可以使轉種日期延長到一個月之久<sup>[14]</sup>。我們在培養阿米巴之初，同樣地發現了培養基中如細菌過多、活動體漸行減少的現象，故研究改進培養方法時，主要的是從更換液體部分以減少細菌生長，而使活動體繁殖良好，蟲數增多來着手。嗣後又進一步探討將培養基移置於室溫中，可否使細菌繁殖受到阻礙，而阿米巴能保持其生活力，以減少過去保種上的困難，因而獲得成功。至於雞蛋培養基中 (L. E. A. 或 L. E. S.)，我們雖用同樣方法，更換液體部分效果並不良好，其中原因如何，尙待日後研究。

以上所述兩種適合於阿米巴活動體保種應用的培養基，雖其製作方法不若雞蛋培養基簡單，但滋養瓊脂培養基為細菌學上最常用的培養基之一，製作並不太多，且市上亦有成品出售。肝精培養基比較不易購到，但亦可自行配製，並不需用特殊的化學藥品，而所費人力物力比起常用的雞蛋培養基所須頻繁的轉種手續，可節省 95% 以上，因此我們認為有介紹的價值。

## 五. 綜 結

(一) 應用滋養瓊脂培養基及肝精培養基來培養溶組織內阿米巴及結腸內阿米巴活動體，如以 72 小時之間隔更換培養基中液體部分 1 次，可使活動體蟲數增多，並可使培養基斜面的使用期限延長至 9—12 天。

(二) 在上列二種培養基中，已有大量活動體存在時，如移置於室溫中，可抑止細菌繁殖而使活動體維持生活至一個半月至二個月之久；保種工作中所費之人力物力比一般方法節省 95% 以上，同時也使標本交換上的困難獲得解決。

## 參 考 文 獻

- [ 1 ] Loesch, F. Massenhafte Entwicklung von Amöben in Dickdarm. *Arch. Path. Anat.* 1875, **65**: 196.
- [ 2 ] Walker, E. L. and Sellard, A. W. Experimental Entamoebic dysentery. *Philippine Jour. Sci.* 1913, **8**: 253.
- [ 3 ] Culter, W. C. A method for the cultivation of *E. histolytica*. *Jour. Path. and Bact.* 1913, **22**: 22.
- [ 4 ] Boeck, W. C. and Drbohlav, J. The cultivation of *E. histolytica*. *Amer. J. Hyg.* 1925, **5**: 371.
- [ 5 ] Cleveland, L. R. and Sanders E. P. Encystation, multiple fission without encystment, excystation, metacystic development and variation in a pure line and nine strains of *E. Histolytica*. *Arch. F. Prot.* 1930, **70**: 223.
- [ 6 ] Simmons, J. S. Laboratory method of the United States Army 5th edition, 1946.
- [ 7 ] Cleveland, L. R. and Collier, J. Various improvements in the cultivation of *E. histolytica*. *Amer. Jour. Hyg.* 1930, **12** (3): 606-613.
- [ 8 ] Craig, C. F. A simplified method for the cultivation of *E. histolytica*. *Amer. Jour. Trop. Med.* 1926, **6**: 333-339.
- [ 9 ] Craig, C. F. Laboratory diagnosis of protozoa diseases. 2nd edition, 1948.
- [10] Tanabe M. and Chiba, B. A new culture medium for *E. histolytica*. *Acta medicana in Keijo*, 1928.
- [11] Frye, W. W. and Melency H. E. The cultivation of *E. histolytica* in Frlmeyer Flasks. *Science*. 1935, **81**: 99.
- [12] Crain C. F. and Faust E. C. Clinical Parasitology, 5th edition, 1950.
- [13] Nelson, E. C. Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *E. histolytica*. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 1947, **27** (5): 545-542.
- [14] Lamy, 1944: (看 Craig, C. F. Laboratory diagnosis of protozoa diseases, 2nd edition. 1948. p. 94).

## SIMPLE METHOD FOR THE CULTIVATION AND PRESERVATION OF *ENDAMOEDA HISTO- LYTICA* AND *ENDAMOEBIA COLI*

TSAI, C. L., WANG, T. AND JEN, T. H.

*Central Institute of Health, Hwa-Tung Branch*

If the liquid part of the usual culture media for *Endameba* is changed once every 72 hours, trophozoites of both *Endamoeba histolytica* and *Endamoeba coli* have been found to increase in number in these cultures, and it was found to prolong the usefulness of the culture from 9 to 12 days. After heavy growth of the amoeba has been obtained, if the cultures were then kept at room temperature, it has been found that growth of bacteria was slowed down, and the life of trophozoites could then be preserved for as long as one and half to 2 months. This simple method is suggested to those who have occasions to handle routine or investigative works of this line.