

ХИМИОТЕРАПИЯ

Г. М. Пароникян

Культивирование *Trichomonas vaginalis* без бактерий

Культивирование трихомонад в смешанных культурах, в которых одни члены существуют за счет других, возможно проводить на сравнительно простых по составу питательных средах. Напротив, культивирование чистых, свободных от сопутствующих бактерий, культур трихомонад требует более сложных сред, в которых имелись бы в достаточной мере необходимые вещества не только для простого переживания, но и для длительного размножения флягеллят. Эта задача осложнялась еще и тем обстоятельством, что в достаточной мере не было известно, какие вещества необходимы для нормальной жизнедеятельности трихомонад. По этой причине попытки многих исследователей культивировать трихомонад без бактерий не приводили к желанной цели [1, 8]. Культивирование трихомонад в чистой культуре началось сравнительно недавно и было связано в основном с введением в состав питательных сред настоя печени.

Получение чистой культуры *Trichomonas vaginalis* имеет как практическое, так и теоретическое значение, так как она в значительной мере может проводить глубокое и всестороннее изучение ряда неразрешенных вопросов, относящихся к морфологии и физиологии трихомонад, патогенезу и к иммунологии трихомонадной инфекции, заниматься разработкой экспериментальной модели трихомонадной инфекции.

Наши попытки культивировать *Trichomonas vaginalis* в чистой культуре на ранее изученных нами средах, оказавшиеся пригодными для культивирования влагалищной трихомонады вместе с сопутствующей бактериальной флорой (средах Матевосяна [2], Павловой [3] и др.), оказались безуспешными. Эти обстоятельства заставили нас расширить исследования и сделать попытку изучить и модифицировать некоторые предложенные для этой цели питательные среды.

Эти среды, и в том числе известная среда С Р LM [5], из которой мы исходили в наших исследованиях, содержали вещества, состав которых нам не был известен — это либо патентованные вещества (например, триптиказа), либо вещества фабричного изготовления (например, пептон Бакто, печеночный настой Бакто и т. д.), что в значительной мере затрудняло нашу работу.

По этой причине нам пришлось не только заменять ингредиенты, входящие в состав среды, отечественными, но и модифицировать их.

В состав приготовленной нами среды № 1 входят:

- | | |
|--|-----------|
| 1. Модифицированный раствор Рингера: | |
| воды дистиллированной | 1000,0 мл |
| хлористого натрия | 6,0 г |
| хлористого кальция | 0,1 г |
| хлористого калия | 0,1 г |
| соды двууглекислой | 0,1 г |
| 2. Пептона | 32,0 г |
| 3. Агара | 1,6 г |
| 4. Цистеина (свободного) | 2,4 г |
| 5. Мальтозы | 1,6 г |
| 6. Печеночного экстракта (гепатокрина) | 24 мл |

Среда кипятится в водяной бане до растворения агара, фильтруется через ватно-марлевый фильтр и при помощи N/1 раствора едкого натра устанавливается рН —6,0. Она разливается в колбы по 150—200 мл, автоклавирется при 1 атмосфере в течение 20 минут и хранится при комнатной температуре.

Перед использованием среда разливается по 8 мл в стерильные пробирки, в каждую пробирку добавляется по 2 мл стерильной, неразбавленной сыворотки человека или барана.

Для проверки на стерильность пробирки со средой на 3 суток ставятся в термостат при 37°. Посев материала (по 0,1—0,5 мл) делается в верхний слой среды, после чего по краю пробирки добавляется по 0,1—0,2 мл (2—4 капли) 0,5% стерильного раствора метиленовой синьки. Посевы инкубируются в термостате при 37°.

В дальнейшем среда № 1 нами была модифицирована: вместо печеночного экстракта-гепатокрина фабричного приготовления (выпуска Тбилисского завода органолептических препаратов, 1952 г.) применялся свежеприготовленный печеночный настой. Печеночный настой мы приготавливали следующим образом: свежая печень кролика резалась на мелкие куски, к ней добавлялась дистиллированная вода в двойном количестве и все это в течение 10 минут кипятилось в водяной бане. Остывший настой пропускаться через ватно-марлевый фильтр, после чего полученный фильтрат вносился в среду из расчета 300 мл на 1000 мл среды. В новой среде вместо 6,0 г хлористого натрия бралось 7,5 г. рН среды 6,0 устанавливалась добавлением в среду приблизительно 8 мл N/1 раствора соляной кислоты вместо раствора едкого натра. Во всем остальном эта среда соответствует первоначальной (среде № 1).

Ввиду того, что модификация среды № 1 привела к заметному изменению ряда ее свойств при культивировании трихомонад, новую среду мы обозначили № 2.

Из ингредиентов, входящих в состав этих сред — цистеин вводится с целью создания в среде анаэробных условий (цистеин, в среде окисляясь, отнимает кислород, восстанавливая другие вещества), что благоприятно влияет на рост простейших. Метиленовая синька служит индикатором. Агар увеличивает вязкость среды, мешает флягеллятам оседать на

дно пробирки, способствует цистеину поддерживать анаэробные условия и, таким образом, создает условия для роста трихомонад по всей глубине среды. Кислый рН среды (6,0) является оптимальным для роста и размножения простейших.

Испытание среды № 1 и № 2 показало, что они вполне пригодны для продолжительного выращивания чистой культуры *T. vaginalis*. Размножение в них флягеллят происходит по всей глубине среды, количество их в течение 3—5 дней достигает более 3 миллионов активных особей в 1 мл среды.

В этих средах форма тела простейших самая разнообразная, начиная от круглой и кончая веретенообразной. В первой половине процесса культивирования флягеллят в культуре преобладают веретенообразные и делящиеся формы. Величина трихомонад резко колеблется, причем чем старше простейшее, тем оно крупнее.

На названных средах (№№ 1 и 2) возможно культивировать не только чистую, безбактериальную культуру *T. vaginalis*, но и совместно с сопутствующей бактериальной флорой. Так, например, на протяжении 6—9 месяцев на первой и второй среде мы успешно культивировали 5 штаммов культуры *T. vaginalis*, вместе с чистой культурой дрожжей. При этом при штамма (25, 26, 30) выращивались совместно с одним только видом дрожжей, а два штамма (27 и 28) с двумя различными видами.

Эти данные показаны на рисунке 1.

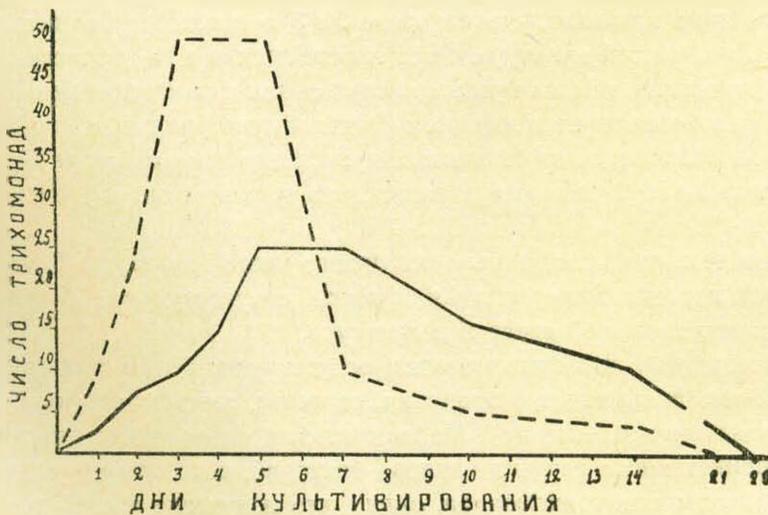


Рис. 1. Рост *Trichomonas vaginalis* на среде № 1 и 2 по дням.
(— рост на среде № 1;; рост на среде № 2).

Культивирование влапалищной трихомонады на этих средах протекает различно. Эти различия касаются, главным образом, продолжительности жизни простейших, числа их и времени, необходимого для наступления максимального роста.

Из рисунка видно, что по числу выращенных трихомонад среда № 2 выгодно отличается от среды № 1. На 2-й среде максимум роста достигается через 72 часа после пересева и жизнь простейших свыше двух недель длится без пересева на новую среду. На среде № 1 рост флягеллят происходит медленнее, максимум достигается на пятый день и трихомонады при этом продолжают жить до 1 месяца. Учитывая эти данные, мы делали пересевы культуры в различные сроки; из среды № 2 через каждые 3—5 дней, а из среды № 1 через 5—7 дней.

Для того, чтобы упростить состав и способ приготовления сред №№ 1 и 2 был проведен целый ряд опытов. Путем замены, уменьшения количества или исключения тех или иных ингредиентов мы приготовили новую среду. Эта среда, обозначенная нами № 3, во многом отличается от двух первоначальных. В ее состав входят следующие вещества:

1. Раствор Локка	1000,0 мл
2. Агара	15,0 г
3. Печеночного экстракта (гепатокрина)	30,0 г
4. Пептона	22,0 г

Среда подогревается на водяной бане до растворения агара, фильтруется через ватно-марлевый фильтр, добавляется N/1 раствор едкого натра до pH—6,0. Среда разливается в пробирки по 4 мл, автоклавировается в течение 15 минут при 1,5 атмосферах, скашивается. Перед посевом культуры в каждую пробирку (в конденсационную жидкость) добавляется 0,5 мл сыворотки человека или барана. Пересевы производятся через каждые 3—5 дней и инкубируются в термостате при 37°.

Испытание показало, что на среде № 3 возможно культивирование *T. vaginalis* в чистой культуре. Рост простейших в ней происходит быстро и интенсивно, начиная уже со второго дня культивирования. Выращенные трихомонады по морфологическим и культуральным признакам заметно не отличались от флягеллят, культивируемых на среде № 1 или № 2. На среде № 3 можно культивировать трихомонады и в смешанной культуре.

Перед тем как приступить к получению чистой культуры *T. vaginalis* нами была изучена бактериальная флора, сопутствующая 15 штаммам трихомонад в нативной среде и в культуре.

Было найдено, что трихомонадам сопутствуют: белые стафилококки, стрептококки, диплококки, тетракокки, сарцины, сенные палочки и грибки (дрожжевые и плесневые). Наблюдались и спорогенные палочки.

Из приведенного перечня видов бактерий, с которыми сожительствует влагалищная трихомонада, видно, что получение чистой культуры *T. vaginalis* является довольно трудной задачей.

Попытки авторов получить безбактериальную культуру *T. vaginalis* при помощи различных химических агентов, антисептиков и лечебных средств не дали положительных результатов. Только впоследствии, когда были предложены такие мощные химиотерапевтические антибактериальные средства, как антибиотики (пенициллин, стрептомицин и др.), во-

прос выделения чистой культуры трихомонад стал более реальным делом [6, 7, 8, 9, 10].

Нам удалось получить чистую культуру *T. vaginalis* только с помощью антибиотиков. Для получения чистой культуры флягеллят мы пользовались следующей методикой: небольшое количество (1,0—1,5 мл) влапалищного выделения, содержавшего подвижные трихомонады, вносились в пробирку с 6 мл физиологического раствора или со средой Павловой [3].

Спустя час или два, но не позже чем через 4 часа после взятия материала, когда большая часть трихомонад еще была жива и бактерии не успели заметно увеличиться в числе делается посев культуры на различные среды.

Посевной материал (вагинальный секрет вместе со средой) в объеме 0,5 мл вносился в среды №№ 1, 2 и Павловой. Перед посевом в одну группу пробирок, содержащих по 9,0 мл сред №№ 1 и 2, вносился свежеприготовленный раствор пенициллина по 2, 4, 6, 8, 10 тысяч единиц в 0,5 мл среды, в другую группу пробирок вносился, в тех же дозах, раствор пенициллина и стрептомицина (совместно). Контролем служила третья группа пробирок, в которых трихомонады культивировались на средах Павловой, №№ 1 и 2 без антибиотика. Подопытные и контрольные пробирки инкубировались при 37°. Спустя 72 часа после посева проверялся рост флягеллят во всех пробирках и одновременно делались высевы на питательные среды для определения роста сопутствующих микроорганизмов.

Приведенным выше методом с помощью антибиотиков нам удалось из 15 штаммов трихомонад получить чистую культуру только в 4-х случаях (штаммы №№ 21, 22, 29 и 34). Результаты опытов приведены в таблице 1.

Таблица 1

T. vaginalis	Среда	Доза антибиотика в ед./мл		Результаты воздействия антибиотиков		Длительность культивирования
		пенициллин	стрептомицин	получена чистая культура	сопутствующая бактер. флора	
Штамм 21	Павловой	600	—	да	нет	4 дня
" 22	"	600	—	да	нет	6 дней
" 23	"	1000	1000	—	2 вида	28 м-цев
" 24	"	1000	1000	—	2 вида	19 м-цев
" 31	"	1000	1000	—	3 вида	5 дней
" 25	№ 1 и № 2	600	600	—	1 вид	9 м-цев
" 26	"	400	400	—	1 вид	9 м-цев
" 27	"	1000	1000	—	2 вида	6 м-цев
" 28	"	1000	1000	—	2 вида	6 м-цев
" 29	"	1000	1000	да	нет	20 дней
" 30	"	800	800	—	1 вид	6 м-цев
" 32	"	800	800	—	2 вида	2,5 м-ца
" 33	"	1000	1000	—	3 вида	24 дня
" 34	"	1000	1000	да	нет	12 м-цев
" 35	"	1000	1000	—	2 вида	8 дней

Из таблицы видно, что для изоляции штаммов 21 и 22 от сопутствующих бактерий на среде Павловой потребовалось воздействие только

одного пенициллина в дозе 600 единиц на 1 мл среды. Штаммы же трихомонад 29 и 34 на средах №№ 1 и 2 удалось освободить от бактерий только совместным применением более высоких доз пенициллина и стрептомицина (по 1000 единиц на мл среды).

Однако чистую культуру *T. vaginalis* с помощью пенициллина и стрептомицина возможно получить только в тех случаях, когда флягеллятам сопутствуют те виды бактерий, на которые действуют указанные антибиотики. Так, из остальных 11 штаммов, подвергнутых воздействию антибиотиков, в 5 случаях (штаммы №№ 25, 26, 27, 28 и 30) получена симбиотическая культура — сожительство трихомонад с чистой культурой дрожжей. В 6 случаях (штаммы №№ 23, 24, 31, 32, 33 и 35) трихомонады сожительствовали с двумя и больше видами бактерий.

Штамм № 34 мы успешно культивировали на средах №№ 1 и 2 в течение одного года (см. рис. № 2).

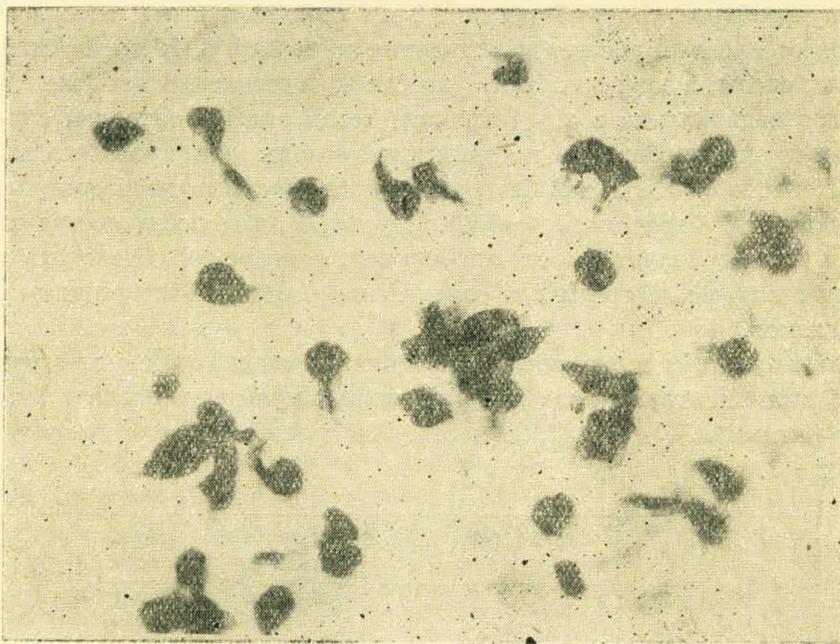


Рис. 2. Чистая культура *Trichomonas vaginalis* (штамм 34) на среде № 2. Окраска по Романовскому—Гимза. Увеличение 450 х.

Разработанная нами методика получения чистой культуры *T. vaginalis* отличается от описанных методов, во-первых, тем, что несколько пробирок со смешанной культурой трихомонад обрабатывается различными дозами антибиотика и, таким образом, подбирается его нужная концентрация. Этим исключается возможность гибели слишком чувствительной культуры трихомонад от высокой дозы антибиотика; во-вторых, имеется возможность использовать синергетическое действие пенициллина и стрептомицина.

Антибиотики — пенициллин и стрептомицин — мы с успехом применяли также и для усиления роста трихомонад на печеночных средах №№ 1 и 2, в чистой безбактериальной культуре.

В таблице 16 приведены данные по культивированию чистой культуры трихомонад на среде № 2 совместно с пенициллином и стрептомицином, а также и без этих средств.

Таблица 2

<i>T. vaginalis</i>	Доза антибиотиков (единиц/мл)	Рост трихомонад по дням*				
		2	4	7	9	14
Штамм 34 (Чистая культура)	250	++	+++	++++	++++	++
	1000	++	++++	++++	++++	++
	Контроль б/антибиот.	+	++	++	+	+

Из данных таблиц видно, что рост трихомонад в присутствии антибиотиков происходит в два и больше раз, чем в контрольной среде. При этом при применении высокой дозы пенициллина и стрептомицина (1000 ед./мл) заметный рост флягеллят наступал несколько раньше, чем при применении более низкой дозы. Выращенные в присутствии антибиотиков трихомонады отличаются от контрольных склонностью образовывать в культуре большие скопления (колонии), покрывающие почти все поле зрения микроскопа (увеличение 600х) на 4—7-й день культивирования.

Исходя из полученных данных мы находим целесообразным ввести в состав сред, пригодных для культивирования чистой культуры *T. vaginalis* по 250 ед./мл этих антибиотиков для получения обильных популяций трихомонад.

В ы в о д ы

Полученные нами экспериментальные данные дают основание сделать следующие выводы:

1. Приготовленные нами печеночные среды №№ 1, 2 и 3 оказались пригодными для продолжительного культивирования *T. vaginalis* в чистой культуре.

2. Нами получено 4 штамма чистой, безбактериальной культуры *T. vaginalis*, путем однократного действия пенициллина (штаммы №№ 21 и 22) и путем совместного действия пенициллина и стрептомицина (штаммы №№ 29 и 34) на сопутствующую бактериальную флору.

3. В течение одного года чистая культура *T. vaginalis* (штамм № 34) успешно культивировалась нами на печеночных средах №№ 1 и 2.

4. Изучена сопутствующая бактериальная флора у 15 штаммов культуры *T. vaginalis*. Сопутствующие трихомонадам многочисленные микро-

* Условные обозначения: + до 10 подвижных трихомонад в поле зрения микроскопа, ++ до 25; +++ до 50; ++++ свыше 50. Увеличение 600 х.

организмы являются, главным образом, грамотрицательными бактериями и дрожжами.

5. Нами найдено, что небольшие дозы антибиотиков (пенициллина и стрептомицина), внесенные в среды №№ 1, 2 и 3 заметно усиливают рост чистой культуры *T. vaginalis*.

Лаборатория фармацевтической
химии АН АрмССР

Поступило 11 XII 1954

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Беллев Е. И. Казанский медицинский журнал, 5—6, 578—585, 1930
2. Матевосян Ш. М. Журнал микробиологии и иммунологии, 9, 2, 177—183, 1933.
3. Павлова Е. П. Мед. паразитология и паразитарные заболевания, 7, 2, 224—227 1938.
4. Davis C. u Grand C. Am. J. Obstet. Gynecol. 64, 3, 544—551, 1952.
5. Johnson G. u Trussell M. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 54, 2, 245—249 1943.
6. Johnson G., Trussell M. u John F. Science, 102, 2640, 126—128, 1945.
7. Mcentegart M. J. Clin. Pethol. 5, 275, 1952.
8. Pray E. J. Parasitol. 38, 5, 398—408, 1952.
9. Quisno R. u Foter M. J. Bacteriol. 51, 3, 404, 1946.
10. Trussell R. J. Iowa State Med. Soc. 30, 2, 66—70, 1940.

Գ. Մ. Պարոնիկյան

Trichomonas vaginalis-ի ԲԱԶՄԱՑՈՒՄԸ ԱՌԱՆՑ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Մեր պատրաստած №№ 1 և 2 միջավայրերի հիմքում վերցված է եղել CPLM միջավայրը: Այդ միջավայրի բաղկացուցիչ մասերը փոխարինվել են հայրենական նույնանման նյութերով, իսկ որոշ զեպերում կատարվել են նրանց քանակական կամ որակական ձեփոխումներ: № 3 միջավայրն ավելի պարզ է և շատ բաներով տարբերվում է ստացված երկու միջավայրերից:

Մշակված է նաև *T. vaginalis*-ի մաքուր կուլտուրայի ստացման մեթոդը՝ անտիբիոտիկների կիրառման միջոցով:

Ստացված փորձնական տվյալները հիմք են տալիս մեզ անելու հետևյալ եզրակացությունները.

1. Մեր պատրաստած №№ 1, 2 և 3 միջավայրերը պիտանի են *T. vaginalis*-ի մաքուր, անբակտերիալ կուլտուրայի երկարատև բազմացման համար:

2. Ուղեկցող բակտերիալ ֆլորայի վրա, պենիցիլինի, պենիցիլինի ու ստրեպտոմիցինի համատեղ, միանգամյա ազդեցության միջոցով ստացված են *T. vaginalis*-ի մաքուր, անբակտերիալ կուլտուրայի 4 շտամներ:

3. *T. vaginalis*-ի մաքուր կուլտուրան (շտամ № 34) մի տարվա ընթացքում հաջող կերպով բազմացվել է №№ 1 և 2 միջավայրերում:

4. Աւսումնասիրված է *T. vaginalis* 15 շտամներին ուղեկցող բակ-

տերիալ ֆլորան, որը բաղկացած է առավելագույնս գրամ-բացասական բակտերիաներից և մակարդային սնկիկներից:

5. Մենք պարզել ենք, որ անտիրիոտիկները (պենիցիլին, ստրեպտոմիցին) ոչ մեծ դոզաներով №№ 1, 2 և 3 միջավայրերում նկատելիորեն ուժեղացնում են *T. vaginalis*-ի աճը: