

3 种不同培养基体外培养阴道毛滴虫效果的比较

耿志辉¹ 韩淑梅² 刘利³ 施雨露¹ 李淑红³

【摘要】 目的 探索阴道毛滴虫体外培养的适宜条件。方法 用临床分离的阴道毛滴虫,按 $9.0 \times 10^4/\text{ml}$ 的接种量转种至 3 种不同培养基进行培养, pH 值为 5.6。结果 经 3 种培养基培养, 96 h 后阴道毛滴虫数量存在差异, 其中以半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖培养基(培养基 I)虫数较多, 肝-豚-麦芽糖培养基(培养基 II)次之, 大豆-肝-豚-麦芽糖培养基(培养基 III)较少。培养基 I 与培养基 II 及培养基 III 相比较, 滴虫存活率差异具有显著性意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 滴虫生长密度差异也具有显著性意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 生长密度高峰持续时间分别为 192 h、144 h 和 96 h, 最长存活时间分别为 288 h、216 h 和 192 h。结论 半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖培养基较适于阴道毛滴虫体外增殖。

【关键词】 阴道毛滴虫; 培养基; 体外培养

中图分类号: R382.211

文献标识码: A

Comparative Effect of Different Media in *in vitro* Cultivation of *Trichomonas vaginalis*

GENG Zhi-hui¹, HAN Shu-mei², LIU Li³, SHI Yu-lu¹, LI Shu-hong³

(1 Department of the third centre, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, the First Clinical Hospital, Norman Bethune University of

Medical Sciences, Changchun 130021; 3 Department of Pathobiology, Norman Bethune University of

Medical Sciences, Changchun 130021)

【Abstract】 Objective To investigate the optimal condition for *in vitro* cultivation of *Trichomonas vaginalis* for obtaining a better harvest of *T. vaginalis*. Methods An isolate of *T. vaginalis* from clinical specimens was cultivated in three different media with initial inoculation of $9.0 \times 10^4/\text{ml}$ under pH 5.6. Results There was distinct difference after 96h incubation in the cumulative harvest of *T. vaginalis*. The highest harvest was received in cysteine/liver/peptone/maltose medium, followed by the liver/peptone/maltose medium and soybean/liver/peptone/maltose medium. Conclusion The cysteine/liver/peptone/maltose medium may be a suitable environment for *in vitro* multiplication of *T. vaginalis*.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*, medium, *in vitro* culture

阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*) 为常见的性传播疾病病原体, 可引起阴道炎、尿道炎和前列腺炎^[1,2]。若治疗不当, 易转为慢性带虫者。近年临床症状不典型病例增多, 涂片镜检漏检率较高。为寻找一种既可提高临床患者的检出率, 又适宜教学、科研工作中长期保种需要的培养基, 本文选用了 3 种不同成分的阴道毛滴虫培养基, 在培养过程中对不同时间的存活率、生长密度作了动态观察, 报告如下。

材料与方 法

1 实验虫种

采自白求恩医科大学第一临床学院妇科门诊滴虫性阴道炎患者的虫种, 接种于大豆-蛋白胨液体培养基中, 37℃ 无菌培养, 每 3 天传代 1 次, 历时 1 个

月后进行实验。

2 培养基的种类、成分及制作

2.1 半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖培养基 (培养基 I)

含牛肝 15 g、氯化钠 0.5 g、蛋白胨 2 g、半胱氨酸盐酸盐 0.2 g、麦芽糖 1 g 及蒸馏水 100 ml。

制法: ① 将牛肝 15 g 剪成小块, 放于 100 ml 蒸馏水中, 置 4℃ 冰箱内过夜, 翌日加热煮 1 h, 过滤, 取滤液, 不足 100 ml 时用蒸馏水补足。② 每 100 ml 滤液中分别加入上述营养物质。③ 加热溶解, 调 pH 值至 5.6。④ 分装试管内, 每管 2 ml, 高压灭菌 (8 磅 20 min), 放于 4℃ 冰箱中保存备用。临用前, 每管中加入无菌灭活牛血清 20%, 青霉素 500 U/ml, 即可转种。

2.2 肝-豚-麦芽糖培养基 (培养基 II)

含牛肝 15 g、蛋白胨 1 g、麦芽糖 0.5 g 及蒸馏水 100 ml。制法: 参照 2.1。

2.3 大豆-肝-豚-麦芽糖培养基 (培养基 III)

作者单位: 1 白求恩医科大学基础医学院第三技能实验室, 长春 130021; 2 白求恩医科大学第一临床学院妇科, 长春 130021; 3 白求恩医科大学基础医学院病原生物学教研室, 长春 130021

含大豆 10 g、牛肝 10 g、蛋白胨 3.3 g、氯化钠 2.4 g、麦芽糖 3 g 及蒸馏水 600 ml。

制法：① 先将大豆用蒸馏水泡几小时，去皮后放于烧瓶内，加蒸馏水 500 ml、蛋白胨、麦芽糖及 100 ml 肝浸液。溶解后过滤于量筒中，用蒸馏水补充至 600 ml，以补充加热时失去的水量。② 调节 pH 值至 5.6，其余步骤同培养基 I。

3 虫种准备

取培养 48 h 的阴道毛滴虫培养管，用滴管从培养基近底部吸出活虫率为 99% 的滴虫悬液 1 ml，加培养液 4 ml，80 g 离心 10 min，清洗 3 次后浓集虫体，用血细胞计数器计数虫体后定量加入各试管，每管虫数约为 9.0×10^4 个/ml。

4 实验观察与结果判断

3 种培养基，每种 5 管，每管 2 ml，加入滴虫后进行培养。每隔 24 h 从试管近底部吸取 20 μ l 培养物，滴于载玻片上，加盖玻片，镜检。可见，随着时间的延长，培养基中的滴虫数量逐渐增加，死亡虫体变圆，鞭毛、波动膜停止运动，边缘模糊或破裂，虫体内颗粒堆积或者完全变性。培养过程中部分虫体破裂至一定程度时与周围物质难以辨认，为此确定鉴别虫体标准为：①

虽然虫体分解，但尚有部分外壳，肉眼可辨认出滴虫轮廓者为虫体。② 生长密度相对定量测定：“+”表示每个低倍镜视野中存活虫数为 1~20 个，“+-”为 21~50 个，“-++”为 51~100 个，“+++”为 >100 个，未发现虫体者判为“-”。为了避免漏检，对阴性培养物再作正常转种培养。在出现阴性结果后分别取阴性管近底部培养物转种至新培养基，48h 后观察并记录结果。3 次转种后仍未见虫体，方可判为“-”。

结 果

阴道毛滴虫在 3 种培养基中的繁殖情况，72 h 内滴虫的存活率及生长密度基本一致，自 96 h 起开始出现差异。从 96~288 h，培养基 I 与培养基 III 相比，滴虫的存活率有显著性差异 ($P < 0.05$)；从 120~288 h，其生长密度也有显著性差异 ($P < 0.05$)；前者的生长密度高峰持续时间为 192 h，后者为 96 h；滴虫在 2 种培养基中的最长存活时间分别为 288 h 和 192 h，培养基 I 与培养基 II 相比，其存活率和生长密度自 168 h 后也有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。在培养基 I 中，滴虫的生长密度高峰持续时间为 144 h，最长存活时间为 216 h。培养基 II 与培养基 III 相比，滴虫的存活率 96~216 h 间有显著性差异 ($P < 0.05$)，生长密度 120~216 h 间有显著性差异 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 3 种不同培养基体外培养阴道毛滴虫效果比较
Table 1 Effect of three media in *in vitro* cultivation of *Trichomonas vaginalis*

时间 Time (h)	半胱氨酸-肝-胨-麦芽糖培养基 (I) Cysteine/liver/peptone/maltose medium		肝-胨-麦芽糖培养基 (II) Liver/peptone/maltose medium		大豆-肝-胨-麦芽糖培养基 (III) Soybean/liver/peptone/maltose medium	
	存活率 (%) Survival rate	生长密度 Density of growth	存活率 (%) Survival rate	生长密度 Density of growth	存活率 (%) Survival rate	生长密度 Density of growth
24	100±0	++++	100±0	++++	100±0	++++
48	100±0	++++	100±0	++++	100±0	++++
72	100±0	++++	100±0	++++	100±0	++++
96	100±0	++++	100±0	++++	82.4±2.32	++++
120	100±0	++++	100±0	++++	78.4±1.68	++++
144	100±0	++++	100±0	++++	50.6±2.40	++
168	100±0	++++	50.1±2.64	++	30.8±1.84	+
192	78.5±1.84	++++	54.3±1.61	+	10.6±1.17	+
216	52.2±0.31	+-	10.8±1.32	+	0	-
240	45.0±1.71	+	0	-	0	-
264	50.0±3.11	-	0	-	0	-
288	61.2±2.40	+	0	-	0	-
312	0	-	0	-	0	-

注：-：阴性 Negative +：每个低倍镜视野中存活虫数为 1~20 个 Survival number in every microscope low field 1~20
 +-：每个低倍镜视野中存活虫数为 21~50 个 Survival number in every microscope low field 21~50
 -++：每个低倍镜视野中存活虫数为 51~100 个 Survival number in every microscope low field 51~100
 ++++：每个低倍镜视野中存活虫数为 >100 个 Survival number in every microscope low field >100.

讨 论

阴道毛滴虫的培养及培养基的配方报道颇多,效果不一^[3]。本文为寻求一种效果较好,且较经济适用的培养基,对3种培养基中滴虫的繁殖状况作了动态观察。以上3种培养基中,滴虫的生长密度逐渐升高,达到高峰后又迅速下降。滴虫接种入新的培养基后,由于pH值适宜,营养丰富,故繁殖状况良好。持续一段时间后,随着虫体密度大量增加,消耗了大部分营养物质,代谢产物堆积。由于滴虫体内缺乏线粒体,只能进行无氧代谢,糖代谢产生大量的乳酸和丙酮酸,从而导致培养基中的pH值下降,抑制了滴虫的繁殖。另外,有些蛋白质的分解产物对滴虫有毒性作用,使滴虫破裂、自溶,最终全部死亡。滴虫在3种培养基中的生长情况差别较大,这可能与3种培养基中的营养成分及含量不同有关。其中半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖培养基的效果最佳。半胱氨酸为含巯基的氨基酸,既是培养基中起抗氧化作用的还原剂,又是滴虫生长所需的营养物质。在培养过程中半胱氨酸较其他物质先被氧化,同时自身被消耗掉,从而保持了培养环境

的稳定性。由于半胱氨酸属于两性氨基酸,既可与酸性物质成盐,也可与碱性物质成盐,所以在pH值发生变化的培养过程中也能发挥其应有的作用。动物肝中含有丰富的蛋白质和糖原,还含有多种维生素和矿物质。蛋白胨可提供多种氨基酸,糖可供给代谢的能量。这些都给滴虫繁殖提供了有利的条件,使滴虫生长密度迅速增高,并可存活288h。实验表明,半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖培养基成本低,效果好。半胱氨酸在食品及日化工业中用途广泛,市场上容易买到,也比较便宜,故此培养基适于普遍推广使用,是目前临床诊断和实验室保种较理想的培养基。

参 考 文 献

- [1] 赵默先. 人体寄生虫学 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 62-72.
- [2] 陈佩惠, 周述龙. 医学寄生虫体外培养 [M]. 北京: 科学出版社, 1955: 90-103.
- [3] 王健. 阴道滴虫在不同培养基中繁殖情况的动态观察 [J]. 西安医学院学报, 1981, 2(1): 103-106.

(收稿日期: 2000-02-29 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2002)-01-0044-01

【病例报告】

人体棘颚口线虫Ⅲ期幼虫感染一例

张学妹¹ 常正山² 陈韶红² 方翔³ 张永年²

中图分类号: R383.19

文献标识码: B

患者男性, 37岁, 上海金山石化公司某部销售员。左胸部皮疹伴疼痛一周, 1996年7月20日来华山医院皮肤科就诊。2d前, 左胸部数次轻度钝痛, 红色皮疹起于左侧肋缘部, 每天向上蔓延约3~4cm。主诉: 一月前曾生食鱼片。检查, 见胸部弯曲的线状红斑及色素沉着, 末端为红色丘疹。查周围血, 嗜酸性细胞占9%, 行末端皮疹切除术, 病理切片见嗜酸性细胞浸润, 未见虫体。切除后第2天, 患者发现红色线状皮疹继续延伸, 并见尖顶状突起, 挑破皮肤见一针头大小、疑似虫体的小黑点, 取出送至中国预防医学科学院寄生虫病研究所病原室鉴定。光学显微镜观察: 虫体长2.74mm, 前部头球上有4环小钩排列, 口周有一对肉质唇, 每环头钩数自前向后排列, 第1环46个小钩, 小钩基部呈椭圆形, 第2环50个小钩, 第3环52个小钩,

第4环55个小钩(第1环与第4环小钩较其他2环略小), 虫体体表有横纹及被有微棘, 单齿皮棘200列以上, 有4个肌质的管状颈囊, 各自开口于头球的气室中。近头球处宽255.8μm, 近尾部处宽263.16μm, 虫体近中部1/2处宽328.95μm, 肛门距尾端58.48μm。经虫体形态鉴定, 并与文献记载的虫体对照, 确认本病原体为棘颚口线虫Ⅲ期幼虫。

讨论

据文献报告, 某些鱼类中有棘颚口Ⅲ期幼虫寄生, 人吃了未煮熟的鱼片即有可能感染。本患者曾食过生鱼片, 一月后出现上述症状, 与棘颚口幼虫所致的症状相符。临床医生在诊断本病过程中如果对棘颚口幼虫生活史缺乏了解, 仅对症治疗, 往往不能得到满意的效果, 应该引起临床医生特别是皮肤科医生的高度关注。

作者单位: 1 上海职工医学院, 上海 200237; 2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025; 3 复旦大学医学院附属华山医院皮肤科, 上海 200040

(收稿日期: 2001-05-02 编辑: 富秀兰)