

· 技术与方法 ·

两种不同培养基体外培养阴道毛滴虫的增殖效果比较*

张潞渝¹, 张 静^{1,2△}, 叶 彬^{1,2}, 武卫华^{1,2}

(重庆医科大学: 1. 分子与肿瘤研究中心; 2. 病原生物学教研室 400016)

摘要:目的 筛选阴道毛滴虫体外生长的适宜培养基。方法 分别配制 RPMI-1640 和半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖(肝浸汤)培养基培养基,并接种阴道毛滴虫,接种密度为 12.5×10^4 个/mL, pH 值为 5.8, 置 37 °C 恒温箱培养。血球计数板计数阴道毛滴虫增殖密度并计算增殖倍数,光镜观察虫体形态。结果 阴道毛滴虫在 pH 5.8 的环境中,在 RPMI-1640 培养基中培养 48 h,增殖倍数达高峰,为 13.6 倍;在肝浸汤培养基中培养 72 h,增殖倍数达高峰,为 26.4 倍。结论 两种培养基均适合阴道毛滴虫的生长,但肝浸汤培养基培养阴道毛滴虫更适合用来评价某种药物的杀虫效果。

关键词:毛滴虫,阴道;培养基;增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)33-3389-02

Comparision of proliferation of trichomonas vaginalis in 2 different kinds cultivation medium*

Zhang Luyu¹, Zhang Jing^{1,2△}, Ye Bin^{1,2}, Wu Weihua^{1,2}

(1. Molecular Medicine and Cancer Research Center; 2. Department of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the suitable culture medium for the growth of trichomonas vaginalis in vitro. **Methods** An isolate of trichomonas vaginalis from clinical specimens was cultivated in two medium of the rabbit liver extracts medium and RPMI-1640 medium with initial inoculation of 12.5×10^4 /mL under pH 5.8. The proliferation of trichomonas vaginalis was required by blood cell count methods. The normal structures of trichomonas vaginalis were observed by light microscopes. **Results** The organisms of trichomonas vaginalis in the liver extract culture medium multiplied by 26.4 folds at 72 hours after inoculation, in the RPMI-1640 medium by 13.6 folds at 48 hours after inoculation at 37 °C, and the optimal pH of 5.8. **Conclusion** The organisms of trichomonas vaginalis can grow well in the two medium, but the liver extract culture medium should better than RPMI-1640 medium in evaluation effect medicine on the growth of trichomonas vaginalis.

Key words: trichomonas vaginalis; culture medium; proliferation

阴道毛滴虫是寄生于人类泌尿生殖道的原虫,可引起阴道炎和尿道炎。作为一种全球性最广泛流行的非淋病性传播疾病^[1-4],近年来临床症状不典型病例增多,常见阴道分泌物涂片镜检漏检率较高,因此,培养法检测阴道毛滴虫有必要普遍地开展,影响阴道毛滴虫体外生长的因素较多,营养成分、培养基 pH 值是最为重要的因素^[5-6],为寻找一种既可提高临床患者的检出率,又适宜科研、教学工作中长期保种需要的培养基,本文选用了 RPMI-1640 培养基和半胱氨酸-肝-豚-麦芽糖(肝浸汤)培养基对阴道毛滴虫体外培养,观察阴道毛滴虫增殖情况。

1 材料与方

1.1 阴道毛滴虫虫株来源 阴道毛滴虫保存虫株由第三军医大学病原生物学教研室惠赠,接种于肝汤培养基中,37 °C 二氧化碳培养箱中培养,传种 3 代,待其稳定生长后,进行实验。

1.2 培养基种类及配制

1.2.1 RPMI-1640 细胞培养基的配制 取已消毒 RPMI-1640 培养液 100 mL,用高压灭菌的 5.6% 碳酸氢钠(NaHCO₃)、0.1mmol/L 盐酸调节溶液 pH 值为 5.8,贮于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 肝浸汤培养基 参照陈佩惠和周述龙^[7]方法配制,接种前煮沸培养基,置于 37 °C 温箱保温,然后按比例加入灭活小牛血清。

1.3 培养方法 将试管里培养的阴道毛滴虫液转移到离心管中离心,弃去上清液,用培养液重悬后,血球计数板计数。将虫体悬液混匀后用 5 mL 移液管滴加在 24 孔板上,每孔 2 mL 虫

液,接种密度为 12.5×10^4 个/mL,各组分别接种 3 孔,置 37 °C 恒温箱培养。每天吸取 3 孔虫液用血球计数板计数。

1.4 计数方法 参照参考文献[8],采用血球计数板计数法,用吸管吸取 1 滴阴道毛滴虫悬液(吸前用干净吸管吹打均匀),与 1 滴台盼蓝液(虫体活力判断标准:活虫体透亮不着色,死虫体呈蓝色且不动),混合后,滴入细胞计数板凹槽内,至盖玻片下被液体充满为止,2 min 后,在显微镜下计数四角大方格内的虫体总数,对于压线的虫体只计数在上线和左线者,对于虫体团按单个虫体计数,按公式计算虫体悬液的密度。阴道毛滴虫密度 = (4 大格虫体总数/4) × 10 000 × 稀释倍数(个/mL)

1.5 统计学处理 根据每天统计的培养孔里阴道毛滴虫数量,使用 SPSS12.0 统计软件对不同组别等因素进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阴道毛滴虫在两种培养基中增殖能力比较 阴道毛滴虫在 pH 为 5.8 的环境中,在 RPMI-1640 培养基和肝浸汤培养基中最高增殖倍数分别达 13.6 和 26.4 倍;阴道毛滴虫在 RPMI-1640 培养基中 48 h 时达增殖高峰,在肝浸汤培养基中 72 h 时达增殖高峰;对阴道毛滴虫在两种培养基下不同时间的增长倍数作方差分析,提示阴道毛滴虫在肝浸汤培养基中增殖能力比在 RPMI-1640 培养基中强($P < 0.05$),但高峰时间延后(72 h)。阴道毛滴虫在两种培养基中,接种 72 h 内的活虫比例较高,均超过 95%。

表 1 阴道毛滴虫在 pH 5.8 的两种培养基中增殖能力比较

培养时间(h)	RPMI-1640			肝浸汤		
	增殖密度($\times 10^4$ 个/mL)	活虫比例(%)	增殖倍数	增殖密度($\times 10^4$ 个/mL)	活虫比例(%)	增殖倍数
0	12.50 \pm 0.00	—	—	12.50 \pm 0.00	—	—
24	15.25 \pm 6.74	97.50 \pm 0.52	1.20	2.25 \pm 0.66	88.89 \pm 15.7	0.18
48	170.00 \pm 9.17	98.67 \pm 0.58	13.06	17.25 \pm 10.16	95.24 \pm 2.70	1.38
72	76.42 \pm 8.57	71.65 \pm 0.62	6.10	330.00 \pm 20.57	97.62 \pm 0.56	26.40
96	22.75 \pm 4.33	12.01 \pm 0.72	1.80	78.00 \pm 4.16	24.49 \pm 2.11	6.24
120	3.00 \pm 0.66	4.30 \pm 0.79	0.24	1.83 \pm 1.38	1.00 \pm 0.51	0.15
144	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

—:表示此项无数据。

2.2 形态观察 阴道毛滴虫在两种培养基中的形态观察见插图 1、2。

3 讨 论

常用于培养阴道毛滴虫的培养基配方报道颇多^[9-13],甚至有使用酪蛋白-酵母-血清培养基、琼脂糖培养基体外培养阴道毛滴虫^[14-15],RPMI 最初是由 Moore 为培养小鼠白血病细胞而设计的,开始的配方特别适合于悬浮细胞生长,主要是针对淋巴细胞,后经过改良,从 RPMI-1630、RPMI-1634,直至 RPMI-1640。RPMI-1640 组分为简单,适合多种细胞生长,如肿瘤细胞、正常细胞的原代培养、传代培养等,是现代细胞培养技术中应用较广泛的一种培养基,常用于医疗检验和药物生产中的细胞培养,也可用于培养寄生虫。本文为寻求一种效果较好,且较经济适用的培养基,对两种培养基中阴道毛滴虫的增殖状况作了动态观察。本实验发现,培养基种类影响阴道毛滴虫的增殖及活力。阴道毛滴虫在适宜 pH 为 5.6~6.0 的环境中,在两种培养基里生长都能达到对数生长,但在肝浸汤培养液里增殖更好、虫体大、分裂象多,增殖高峰在接种后 72 h 时;在 RPMI-1640 培养液里,阴道毛滴虫在接种后 48 h 达增殖高峰,虫体大小、形态接近生理盐水直接涂片。肝浸汤培养基中主要原料兔肝容易获得,且肝浸液里含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,糖可供代谢的能量。这些都给阴道毛滴虫增殖提供了有利的条件,使阴道毛滴虫密度迅速提高;但在制作培养液的过程中,肝浸汤培养液容易受消毒锅内温度影响,过高则可使培养液里的麦芽糖分解,使虫体生长不良;压力过低,可能消毒不彻底;如果用负压抽滤灭菌,则蛋白胨难以滤过,使滤过液营养不足。RPMI-1640 培养液的制作几乎由专业试剂公司制作,广泛用于细胞的培养,产品为粉末状,含量稳定,应用时只需溶解抽滤灭菌,即可用于培养,而且一次可配足实验所需的液体量,观察时视野清晰、容易计数,但是缺少丰富的矿物质,使得虫体生长不良。

使用何种培养基培养阴道毛滴虫取决于实验设计,若阴道毛滴虫用于药敏试验和教学^[12],评价某种药物的杀虫效果,应选择肝浸汤培养基,以期获得体型较大的虫体,达到易观察的目的;若仅仅是需要一定数量的虫体,如分子生物学方面的实验,RPMI-1640 培养基培养阴道毛滴虫即可满足需要、方便易行。另外,在培养的初期,刚从患者体内取来的阴道毛滴虫,最好先置于肝浸汤培养基中培养一段时间,使其在短期内迅速获得丰富的营养,杀菌纯化后再根据需要进行 RPMI-1640 培养基或肝浸汤培养基及中培养,方可达到实验设计目的。

参考文献:

[1] Saeed Khan M, Unemo M, Zaman S, et al. HIV, STI prevalence and risk behaviours among women selling sex in

Lahore, Pakistan[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11(1):119.

[2] Samra Z, Rosenberg S, Madar-Shapiro L. Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1):17-21.

[3] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2005.

[4] Cuenthner PC, Secor WE, Dezzutti CS. Trichomonas vaginalis-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1[J]. Infect Immun, 2005, 73(7):4155-4160.

[5] 易世红, 梁国光, 张永生. 影响体外培养阴道毛滴虫因素的探讨[J]. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(5):484-485.

[6] 史明珠, 许兵红, 艾予川, 等. 不同 pH 值对阴道毛滴虫体外培养的影响[J]. 河南预防医学杂志, 2002, 13(4):208-211.

[7] 陈佩惠, 周述龙. 医学寄生虫体外培养[M]. 北京:科学出版社, 1995.

[8] 鄂征. 组织细胞培养和分子细胞学计数[M]. 北京:北京出版社, 1995.

[9] 杨珺华, 姚繁荣, 答嵘, 等. 阴道毛滴虫在两种培养基中的生长与形态观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(4):209-210.

[10] 赵建玲, 高兴政. 焦性没食子酸培养阴道毛滴虫方法的建立及其应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(1):28-31.

[11] 刘晓泉, 田春林, 王卫群, 等. 阴道毛滴虫长期培养传代的实验观察[J]. 应用预防医学, 2009, 15(1):16-17.

[12] 刘芸, 吴少慧, 刘敏, 等. 阴道毛滴虫保存方法及时间的效果观察[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(1):49.

[13] 郝祥俊, 王峰, 王映星. 常规培养基培养阴道毛滴虫在实验课中的应用[J]. 承德医学院学报, 2002, 19(3):232.

[14] Mavziutov AR, Mustafina GR, Khismatullina ZR, et al. Procedure for Trichomonas vaginalis cultivation[J]. Lin Lab Diagn. 2010 Dec; (12):43-45.

[15] Stary A, Kuchinka-Koch A, Teodorowicz L. Detection of Trichomonas vaginalis on modified Columbia agar in the routine laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(9):3277-3280.