

• 短篇论著 •

湖北十堰地区25例阴道毛滴虫分离株对灭滴灵敏感性分析

杨树国¹, 张光玉¹, 杨宏伟²

摘要:目的 检测十堰地区阴道毛滴虫分离株对灭滴灵的敏感性,分析本地区滴虫多分离株灭滴灵耐药性总体趋势。方法 收集阴道毛滴虫临床分离株25株,体外纯培养,设不同灭滴灵药物组,终浓度分别为50 $\mu\text{g/ml}$ 、31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、15.63 $\mu\text{g/ml}$ 、7.81 $\mu\text{g/ml}$ 、3.91 $\mu\text{g/ml}$ 、1.95 $\mu\text{g/ml}$ 、0 $\mu\text{g/ml}$,置37℃培养,分别于4、8、12、24h观察虫体生长存活情况,计算各株滴虫各时间点死亡率,对各时间点死亡率进行汇总并分析灭滴灵敏感性浓度区间分布。结果 高浓度组(50 $\mu\text{g/ml}$ 、31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、15.63 $\mu\text{g/ml}$ 、7.81 $\mu\text{g/ml}$)培养12h,滴虫死亡率均为100%,3.91 $\mu\text{g/ml}$ 浓度作用24h,滴虫死亡率为96%(24/25),1株滴虫死亡率为98.73%。结论 十堰地区阴道毛滴虫分离株对灭滴灵总体较敏感,24株体外24h有效最低杀虫浓度区间为1.95~3.91 $\mu\text{g/ml}$,1株滴虫为3.91~7.81 $\mu\text{g/ml}$ 。

关键词:阴道毛滴虫;分离株;灭滴灵;敏感性

中图分类号: R382.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)7-853-02

Sensibility of 25 *Trichomonas vaginalis* isolates from Shiyan Region to metronidazole in vitro. YANG Shu-guo¹, ZHANG Guang-yu¹, YANG Hong-wei². (Department of Parasitology, Hubei Medical University, Shiyan 442000, Hubei, P. R. China; 2. Department of Clinical Laboratory, Taihe Hospital, Affiliated to Hubei Medical University, Shiyan 442000, Hubei, P. R. China)

Abstract: Objective To observe the sensibility of 25 *Trichomonas vaginalis* isolates from Shiyan to metronidazole in vitro. Methods The 25 isolates of *Trichomonas vaginalis* were collected and cultivated four generations by cultivation in 8 tubes to logarithmic phase and the death rate was counted and the sensitivity range of *Trichomonas vaginalis* to different concentrations of metronidazole at concentrations of 50 $\mu\text{g/ml}$, 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 15.63 $\mu\text{g/ml}$, 7.81 $\mu\text{g/ml}$, 3.91 $\mu\text{g/ml}$, 1.95 $\mu\text{g/ml}$, 0 $\mu\text{g/ml}$ was observed 4, 8, 12 and 24 hours later. Results The death rate of 25 isolates was 100% 12 hours after incubation at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 15.63 $\mu\text{g/ml}$ and 7.81 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Death rate was 100% 24 hours after contact, but one isolate was 98.73% at the concentration of 3.91 $\mu\text{g/ml}$. Conclusion *Trichomonas vaginalis* isolates were sensitive to metronidazole in general. Minimum lethal concentration (MLC) of 24 isolates was 1.95~3.91 $\mu\text{g/ml}$.

Key words: *Trichomonas vaginalis* Isolates; Metronidazole; Experimentation in vitro

阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*, Tv)寄生于人体泌尿生殖道,引起的滴虫病作为性传播疾病的一种,其危害正日益受到关注,十堰地区某医院门诊妇科病人白带检查,2003年报道滴虫感染率为8.7%^[1],作为治疗滴虫病的一线药物,在长期的用药过程中,是否会引起阴道毛滴虫甲硝唑抵抗,本研究临床多分离株甲硝唑敏感性,以期了解现阶段本地区阴道毛滴虫临床分离株对甲硝唑敏感性总体情况。

1 材料与方法

1.1 材料 2009年6月~2011年6月于湖北医药学院附属太和医院妇科门诊,由检验科协助收集间收集25株阴道毛滴虫,接种肝浸汤培养基,在病原学实验室无菌培养4代,各虫株培养稳定后用于药物实验。8支培养液管,吸取100 μl 上述纯培养虫体,接种于5 ml培养液滴虫培养管,培养48~52h,滴虫生长至对数期后,调整其浓度达 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$,备用。

1.2 方法 参照前期研究使用的方法和结果^[2],设

定培养管灭滴灵终浓度分别为50 $\mu\text{g/ml}$ 、31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、15.63 $\mu\text{g/ml}$ 、7.81 $\mu\text{g/ml}$ 、3.91 $\mu\text{g/ml}$ 、1.95 $\mu\text{g/ml}$ 等7个作用浓度,以不加药物管为对照。25株滴虫药物实验参照执行,置37℃培养至4、8、12、24h并测定各时间点死亡率。于上述时间点观察各管滴虫生长情况,具体方法:吸管吹打均匀后,吸取50 μl 滴虫悬混液置于载玻片,覆盖玻片,高倍镜下随机观察3个视野,计数滴虫总数及虫体死亡数,计算各浓度下各时间点虫体死亡率。虫体死亡判断:虫体变圆,结构模糊,边缘不整,体内含有大量粗颗粒,不带折光性,失去原有透明度,鞭毛与波动膜不运动甚至缺失者判为死亡。死亡率(%)=死亡滴虫数/观察的滴虫数 $\times 100\%$ 。本实验重复3次。详细记录25株滴虫药敏数据。25株滴虫耐药实验全部完成后,分别对各时间点耐药区间及各区间滴虫数进行汇总,对24h甲硝唑最小致死量(MLC)进行测算,以了解25株滴虫敏感性整体情况。

基金项目 湖北医药学院研究生启动金项目(No.2008QDJ15)

作者单位 1.湖北医药学院寄生虫学教研室,湖北十堰442000; 2.湖北医药学院附属太和医院检验科,湖北十堰442000

作者简介 杨树国(1973~),男,硕士,讲师,主要从事寄生虫生物学研究。

2 结果

2.1 高浓度组 25 株滴虫生长情况 实验表明 50 μg/ml 浓度下 4h 各株滴虫死亡率均为 100.0% 31.25 μg/ml 浓度下 培养 4h ,21 株滴虫死亡率为 100.0% 4 株滴虫有少量滴虫存活 ,但观察滴虫活动情况 ,滴虫活动迟缓 ,鞭毛摆动无力 ,胞浆开始出现粗颗粒。至 8h ,滴虫轮廓不清 ,有胞浆外溢现象。25 μg/ml 浓度下 4h 死亡率为 100.0% 的有 17 株 ,8h 死亡率为 100% 的有 23 株 ,12h 虫体均死亡。

2.2 低浓度组 25 株滴虫各时间点死亡率区间分布

在 15.63 μg/ml 及以下 4 个灭滴灵浓度作用下 ,分别计算 4、8、12、24h 死亡率及范围分布 ,分别计数死亡率在大于和小于 75.0% 虫株数 ,结果表明 :在 15.63 μg/ml 和 7.81 μg/ml 浓度灭滴灵作用 12h ,25 株滴虫死亡率均为 100.0% ,在 3.91 μg/ml 浓度灭滴灵作用 24h ,24 株滴虫死亡率为 100.0% ,仍有 1 株虫体存活 ,死亡率为 98.73% ,见表 1。

3 讨论

随着经济的发展和人口流动性的增加 ,阴道毛滴

表 1 不同浓度灭滴灵作用下 25 株滴虫各时间点死亡率区间分布

Table 1 Distribution of death rate about 25 Trichomonas vaginalis isolates treated by different concentrations of metronidazole

药物 浓度 (μg/ml) Concen- tration	4h死亡率(%)Death rate at 4h		8h死亡率(%)Death rate at 8h		12h死亡率(%)Death rate at 12 h		24h死亡率(%)Death rate at 24h	
	≥75%区间	<75%区间虫	≥75%区间虫	<75%区间虫	≥75%区间	<75%区间虫	≥75%区间虫	<75%区间
	虫株 Isolates	株数 Isolates	株数 Isolates	株数 Isolates	虫株 Isolates	株数 Isolates	株数 Isolates	虫株 Isolates
	(≥75%)	(<75%)	(≥75%)	(<75%)	(≥75%)	(<75%)	(≥75%)	(<75%)
15.63	79.8-85.2(24)	74.6(1)	94.7-99.0(25)	0	100.0(25)	0	100.0(25)	0
7.81	0	47.2-53.4(25)	92.6-98.5(25)	0	100.0(25)	0	100.0(25)	0
3.91	0	12.5-25.5(25)	85.5-95.4(24)	68.4(1)	95.2-99.4(25)	0	98.7-100.0(25)	0
1.95	0	11.1-22.2(25)	0	39.6-47.9(25)	0	48.1-54.6(25)	80.0-84.3(25)	0
0	0	0.0(25)	0	1.7-3.8(25)	0	2.5-4.9(25)	0	5.4-7.6(25)

虫感染率呈上升趋势 ,鉴于滴虫生殖方式为无性增殖 ,各株滴虫基因组不发生重组 ,某地区分离株间对灭滴灵的敏感性的不同可因随用药、长期演化和输入性等原因而出现差异 ,作为目前治疗滴虫病一线药物 ,长期以来 ,以体外需氧条件下 48h 甲硝唑最小致死量(MLC)≥50 μg/ml 作为耐药株判断标准^[3] ,本研究 2 年间收集 25 株滴虫做体外灭滴灵敏感实验 ,结果在高浓度灭滴灵(50 μg/ml、31.25 μg/ml、25 μg/ml)作用下 ,多分离株均较敏感 ,作用 4~12h ,死亡率为 100% 的滴虫比例为 92% ~ 100% ,25 μg/ml 和 7.81 μg/ml 灭滴灵作用 12h ,死亡率均为 100%。但随着药物浓度的降低 ,在 3.91 μg/ml 浓度点 ,死亡率在 4h 和 8h 差别很大 ,但有 1 株滴虫死亡率小于 75%(68.42%) ,作用 24h ,24 株滴虫死亡率为 100% ,1 株为 98.73% ,对该株滴虫培养至 48h ,补充观察 ,高倍镜视野约有 1~2 个活动较为缓慢的虫体 ,绝大部分滴虫保持基本轮廓。而在 1.95 μg/ml 浓度下 ,24~48h 死亡率均未达到 100%。综合上述结果 ,25 株滴虫 ,24 株 24h 甲硝唑最小致死量(MLC)范围为 1.95 ~ 3.91 μg/ml ,与何玉良等报道(2 μg/ml)^[4]及汤自豪等报道(4.0 μg/ml)^[5]结果接近 ,4h 和 8h 滴虫死亡率差别较大 ,提示灭滴灵有效作用时间可能为 4~8h ,1 株(占 4%)24h MLC 范围为 3.91 ~ 7.81 μg/ml ,可判断收集到的 25 株滴虫都可视为为临床敏感株 ,但提示少量虫株出现灭滴灵敏感性的降低 ,可能与长期不规则的用药有关 ,应引起足

够重视。

参考文献

[1] Wang XY, Qiu FC, Zhou LJ, et al. Analysis and conventional test on vaginal secretion of 3347 trichomoniasis[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2004, 22(5):319. (in Chinese)
(王秀云 邱方城 周罗晶 等 . 3347 例滴虫性阴道炎患者白带常规检验分析[J] . 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 ,2004 ,22(5) :319 .)

[2] Yang SG, Wang Y, Zhang GY, et al. Study the sensibility of Trichomonas Vaginalis isolate to metronidazole in vitro[J]. Maternal and Child Health Care Of China, 2011, 26(11):1861-1862. (in Chinese)
(杨树国 王娅 张光玉 等 . 阴道毛滴虫十壅分离株对灭滴灵敏感性的实验研究[J] . 中国妇幼保健 ,2011 ,26(11) :1861-1862 .)

[3] Sarah L. Cudmore, Kiera L. Delgaty, Shannon F. Hayward-McClelland, et al. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant Trichomonas vaginalis[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 783-793.

[4] He YL, Tao XM, Guan LH, et al. In vitro effect of metronidazole ester on Trichomonas vaginalis and Entamoeba histolytica[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1995, 13(1): 32-34. (in Chinese)
(何玉良 陶贤梅 关立华 等 . 甲硝唑酯体外抗阴道毛虫和阿米巴的效果[J] . 中国寄生虫学与寄生虫病杂 ,1995 ,13(1) :32 - 34 .)

[5] Tang ZH, Zhou XO, Gao XZ, et al. The study on the effect of dihydroartemisinin, metronidazole and mixture of the two drugs on Trichomonas Vaginalis in vitro[J]. Journal of China Medical University, 2008, 37(2): 200-203. (in Chinese)
(汤自豪 周小鸥 高兴政 等 . 双氢青蒿素、甲硝唑及两药联合应用体外抗阴道毛滴虫效果的研究[J] . 中国医科大学学报 ,2008 ,37(2) :200-203 .)

收稿日期 2012-02-15 编辑 :符式刚