

试用体外微量法测定海南岛恶性疟原虫 对氯喹的敏感性

任道性 刘德全 刘瑞君

(中国医学科学院寄生虫病研究所, 上海)

黄琪林 伍柱

(广东省寄生虫病防治研究所, 广州)

蔡贤铮 庞学坚

(海南行政区寄生虫病防治研究所, 海口市)

在海南岛昌江县收治恶性疟 30 例, 以测定疟原虫对氯喹的敏感性。其中经体内外同时测定的有 14 例。按体内测定标准发现 III 级抗性者 5 例; II 级抗性者 1 例; I 级抗性者 6 例; 敏感者 1 例; 另 1 例属于 I 级抗性或敏感。经同时使用两种测定板观察结果, 各剂量组对疟原虫发育的抑制率及对不同抗性病例测得的抗性曲线基本一致。

体内方法测得 III 级抗性者, 体外方法在 32 微微克分子二磷酸氯喹并尚不能完全抑制疟原虫发育成裂殖体。体内方法测得的 II 级、I 级抗性和敏感者共 9 例, 其中药量达到 16 和 32 微微克分子时完全抑制疟原虫发育成裂殖体者分别为 2 例和 5 例; 另 2 例在 32 微微克分子氯喹仍有少数疟原虫发育成裂殖体。按世界卫生组织 Kouznetsov 等 (1979) 的暂定标准, 上列病例对氯喹都有抗性, 其抗性程度超过苏丹 Sennar 株, 近似越南 FVO 株。

以上结果表明: 1) 体外微量法和体内方法同样可测出恶性疟原虫对氯喹的敏感性, 而体外法更为方便、快速和准确; 2) 海南昌江县恶性疟对氯喹的抗性相当严重, 值得重视。

自 1960 年在南美和其后在东南亚相继发现恶性疟原虫对氯喹及其它 4-氨基喹啉类产生抗性以来, 1971 年及 1974 年我国滇南地区及海南岛南部亦先后发现恶性疟原虫对氯喹有抗性。因此, 急需弄清我国南方恶性疟原虫对氯喹抗性的分布范围及程度, 为合理制订抗疟措施提供依据。

我国卫生部与世界卫生组织 1979 年 9—10 月联合举办了恶性疟原虫对药物敏感性体外微量测定技术短期训练班 (简称短训班), 其后中国医学科学院寄生虫病研究所根据短训班方法¹⁾, 利用我国材料, 自制微量测定板 (简称自制板), 经过实验室试验, 证明自制板与世界卫生组织标准板

(简称标准板) 的效果相似。并于 11 月上旬至今年 1 月上旬和广东省有关单位组成协作组, 将自制板和标准板在海南岛现场进行对比试验。同时观察了体内外两种方法测试结果的相互关系。具体方法和结果如下。

材料和方法

(一) 微量测定板

标准板系世界卫生组织提供的测定板。自制微量测定板是利用上海生产的塑料细胞毒反应

本文于 1980 年 5 月 19 日收到。

1) WHO 体外测定疟原虫对药物敏感性短训班讲义, 1979 年。

板,将不同剂量的二磷酸氯喹,按世界卫生组织标准(即 1—32 微微克分子溶于 20 微升重蒸馏水中)加入微量测定板并内,经 37℃ 24 小时干燥后,用透明胶纸密封井口,加盖装入塑料袋后密封,在无菌罩内用 20 瓦紫外灯相距 50 厘米处灭菌 1 小时,经过无菌试验及药物稳定性测验合格后,保存于室温备用。

(二) 培养基配制

用 RPMI 1640 粉 1.04 克溶于 90 毫升重蒸馏水中,加入 HEPES 粉 0.594 克,再加重蒸馏水到 96 毫升,用 0.45 微米滤膜抽滤灭菌,保存于 4℃ 冰箱备用,同时每 96 毫升培养液加入无菌 5% NaHCO₃ 4.2 毫升。

(三) 病例选择

测试对象是 14 天内未服过抗疟药物,经 Haskins 法测定尿中无氯喹,疟原虫密度在 3,000—80,000 个/立方毫米的恶性疟现症病人。如原虫密度过高,则用“O”型健康红细胞作适当稀释¹⁾。

测试时,静脉取血以 ACD (1:4) 抗凝,每 0.9 毫升培养液加入带虫血 0.12 毫升,混匀后,于测定板每井加入 50 微升,加盖后,稍加振动,使并内氯喹充分溶解。然后,将板置于有蜡烛的玻璃真空干燥器内,点燃蜡烛,将盖盖紧,待蜡烛即将熄灭时,关闭活塞,将干燥器置于 37—38℃ 恒温箱 24—48 小时,然后从测定板每个井中取血分别制成厚血膜,用吉氏染液染色后计算每 200 个白细胞时所见裂殖体数,以未加氯喹井中的裂殖体数作对照,求得各不同剂量氯喹井中裂殖体数占对照井的百分率。每个病例同时使用 WHO 标准板和自制板进行比较测定。

取血后,患者内服标准剂量的氯喹(25 毫克/公斤,基质),作对氯喹敏感性的体内测定。第一、二天各服 10 毫克/公斤,第三天 5 毫克/公斤,以厚血膜 100 个视野未发现疟原虫者为阴性。药物皆看服下肚,并于首次服药后 48 小时取尿作氯喹定性测定。凡服药后尿中氯喹阳性,血中疟原虫无性体在 7 天内消失,28 天内无复燃者作为敏感;28 天内出现复燃者为 I 级抗性;服药后 48 小时疟原虫无性体减少 75% 以上,7 天内不转阴者为 II 级抗性;服药后 48 小时疟原虫无性体减少不到 75% 或原虫数继续增加者为 III 级抗性^[1]。

结 果

一、两种微量测定板的对比结果

同一例患者同时使用标准板和自制板测定恶性疟原虫对氯喹的敏感性,完成观察者 15 例(见表 1),除 10 号和 26 号病例的最大剂量组结果稍有不同外,其余各病例测定结果基本一致。凡是标准板表现出抗性者,自制板也同样表现出抗性。而且两种板各剂量组对疟原虫的抑制率及对不同级抗性测定结果很接近,两种板测得的敏感性曲线基本一致(见图 1)。但是,两种板均见个别井中疟原虫有发育不良的现象,其中标准板有 3 例(2, 28, 33 号病例),自制板有 1 例(8 号病例)。自制板对照井疟原虫发育明显比标准板差者有 6 例,标准板比自制板对照井疟原虫发育差

表 1 体内两种方法测定疟原虫对氯喹的敏感性

病例 编号	性 别	年 龄	籍 贯	体内测定 结果 (抗性级别)	体外能发育成裂 殖体的最大药量 (微微克分子)	
					标准板	自制板
1	男	28	外地	III	32	32
9	男	35	外地	III	32	32
11	男	24	外地	III	32	*
13	女	19	外地	III	32	32
10	男	33	外地	III	16	32
7	男	20	外地	II	16	*
2	男	22	外地	I	32	32
6	男	19	本地	I	32	32
8	男	12	本地	I	16	16
26	女	12	本地	I	16	32
32	男	5	本地	I	*	8
33	女	7	本地	I	8	8
28	男	11	本地	敏感	16	16
27**	男	14	本地	RI 或敏感	16	16
15	男	64	外地	未观察	*	32

* 疟原虫未生长或生长较差。

** 该患者服 1.5 克氯喹后 5 天疟原虫转阴,但其后中断追踪观察。

1) 见前脚注 1)。

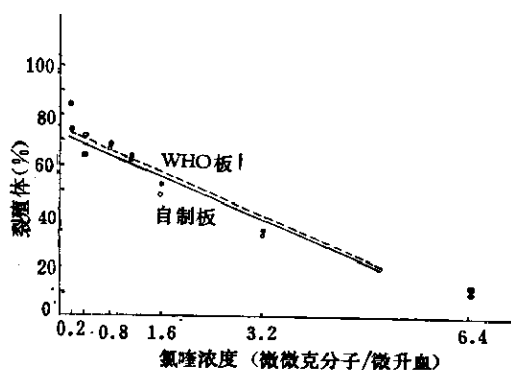


图1 两种测定板体外微量试验结果回归统计

者有7例。部分或全部井中疟原虫均不发育者,两种板各有2例(15, 32号及7, 11号病例)。

二、体内外两种方法测定恶性疟原虫对氯喹敏感性的相互关系

同时用体内外二种方法测定恶性疟原虫对氯喹的敏感性,完成观察者共14例(见表1),其中用体内方法测出III级抗性者5例,II级抗性者1例;I级抗性者6例;敏感者1例;另1例在服药后5天疟原虫无性体转阴,但未完成28天观察,属I级抗性或敏感。

二种方法测出的结果不尽一致。体内方法测得的5例III级抗性者,体外方法测得结果是低剂量对疟原虫发育无明显影响,只在较大剂量时,疟原虫发育才受影响,但32微微克分子尚不能完全抑制疟原虫发育成裂殖体。其中服药后48小时体内疟原虫无明显减少者,体外32微微克分子剂量组裂殖体数较多;服药后48小时体内疟原虫数明显减少者,体外32微微克分子剂量组裂殖体数亦少。体内方法测得II级和I级抗性者,多数病例在体外方法中表现为低剂量时疟原虫发育已受到影响,但其后表现不同。1例II级抗性者在32微微克分子剂量时疟原虫发育完全抑制。6例I级抗性者,各有2例到16和32微微

克分子时,完全抑制疟原虫发育成裂殖体,另2例32微微克分子剂量组仍有少数疟原虫发育成裂殖体。属I级抗性或敏感的1例,在32微微克分子时完全抑制疟原虫发育成裂殖体。体内方法测得的1例敏感者,在体外方法中32微微克分子才完全抑制疟原虫发育成裂殖体。

按世界卫生组织 Kouznetsov 等的暂定标准,其1.2微微克分子/微升剂量作分界点,在此剂量能完全抑制疟原虫发育到裂殖体者作为敏感,在此剂量或以上仍能发育成裂殖体者作为有抗药性。我们用二种板观察的14例中,最敏感者在16微微克分子才完全抑制疟原虫发育到裂殖体,此剂量已达3.2微微克分子/微升(见图1),可见在海南岛所测的15例全部对氯喹有抗性,其抗性程度超过苏丹 Sennar 株而与越南株 FVO 相似^[2]。

讨 论

经过现场14例恶性疟现症病例观察,凡是体内方法测得有不同程度抗性者,体外微量法也都同样能测到。表明体外微量方法和体内方法一样可测定恶性疟原虫对氯喹的敏感性,但所费时间和人力两者显著不同,尤其对I级抗性者,体内法需28天才能得出结果,而体外法只需24—48小时。可见体外微量法比体内法更方便和迅速,这对临床上需要及时治疗的病例尤其适用。

患者免疫力影响抗疟药物的治疗效果,前人报告颇多^[2],我们这次体内外同时测定所得的5例III级抗性和1例II级抗性者均属无免疫力或免疫力较差的外来人口(见表1),而6例I级抗性者,其中5例为本地人口,仅1例为外来人口。可见

1) 见前脚注1)。

体内法测得的 I—III 级抗性中, 实际上包含有个体免疫力的因素, 特别是体内法测得的 1 例敏感者 (28 号病例), 体外法却表现有明显抗性, 从而显示体外法比体内法更能准确反映当地恶性疟原虫对氯喹的敏感性。

现场试验结果表明, 自制板与标准板的测定结果相同。今后可用自制板进行调查。但是, 现用的两种测定板均有个别板或井中疟原虫发育不良的情况, 需作进一步研究改进。此外, 要把体外微量测定法应用于现场调查尚需解决如何将培养基按量分装于无菌小瓶中, 摆脱一大套无菌设备及全日供电等条件, 以便只备油电两用

恒温箱即可在农村开展调查工作。

通过本次现场工作结果表明, 当地恶性疟原虫对氯喹普遍产生了抗性, 而且抗性程度极高, 目前必须迅速加强灭蚊防蚊措施, 减少新感染, 同时要进一步利用体外微量测定法, 选用与氯喹无交叉抗性的药物, 以利防治。

参 考 文 献

- [1] WHO Technical Report Ser.: No. 529, 30—54, 1973.
- [2] Peters W.: Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria, pp. 591—593, Academic Press, London and New York, 1970.
- [3] Rieckmann KH, et al.: *Lancet*, 1: 22—23, 1978.

SENSITIVITY OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN HAINAN ISLAND TO CHLOROQUINE BY THE IN VITRO MICROTECHNIQUE

Ren Daoxing Liu Dequan Liu Ruijun

(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Shanghai)

Huang Qilin Wu Zhu

(Institute of Parasitic Diseases, Guangdong Province, Guangzhou)

Cai Xianzheng Pang Xuejian

(Institute of Parasitic Diseases, Haikou)

In order to determine the extent and degree of resistance of *P. falciparum* to chloroquine in south China by the vitro microtechnique. The test plates with available material was prepared according to the indications of the Training Course and results compared with the plates left by WHO experts. The response of the China Guangdong (FCC₂) strain of *P. falciparum* kept in continuous culture for more than 1 year, and then carried out in field trials in Hainan Is'and in cooperation with the local institutions was assessed for reliability of the home-made plates and the results of the in vitro and in vivo tests were correlated.

Subjects having asexual forms of *P. falciparum* in their blood were chosen in the study and hospitalized for 7 days. Care was taken to exclude those patients who had received 4-aminoquinolines within two weeks prior to the study.

The WHO in vivo standard (7 days) or extended (28 days) test (WHO, 1973) and the in vitro microtechnique described by Rieckmann et al (1978) were adopted.

The in vivo test of 14 cases showed that 5 had the resistance of R III level, 1 of R II level, 6 of R I level, 1 of sensitive (S) and the remaining one either sensitive or resistant at R I level. The blood samples taken from these same cases were tested by the microtechnique using 2 kinds of plates. The in vitro test indicated that 5 isolates with chloroquine-resistance of R III in vivo and 2 of R I showed schizont maturation in 32 p-mol well, 1 isolate of R II, 2 of R I, 1 of S and 1 of R I or S showed inhibition of parasite growth at 32 p-mol, and the other 2 isolates of R I showed inhibition at 16 p-mol. The plates from 2 sources showed no obvious difference in response and showed similar dose-response curves.

It appears that the *P. falciparum* of Hainan Island has a chloroquine-resistance of a degree higher than that of the Sennar strain but similar to the FVO strain.

This investigation received support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.