

# 体外测定抗氯喹恶性疟原虫方法的改进

寄生虫学教研室 管惟滨 黄文锦 周元昌

近年来,我国云南省及广东省海南岛均发现对氯喹有抗药性的恶性疟原虫<sup>[1,2]</sup>。为调查抗性虫株的分布及其抗性程度,并寻找新药,我们采用液氮冻存法将海南岛一恶性疟原虫虫株带回实验室复苏,参照Trager及Jensen的蜡烛缸培养法培养,用微量法以减虫率作观察指标,测定原虫对药物的敏感性。证明该株对氯喹已产生抗药性,体外培养两个月左右仍有明显抗药性,经连续转种培养3~4个月,抗性自行消失。现将结果简报如下:

## 材 料 和 方 法

一、虫株:1978年6月我们与上海生物制品研究所合作在海南岛东方县东方公社佳西大队采得一恶性疟患者的血液,用二甲亚砷作保护剂液氮冻存,带回上海,至1980年3月26日开始复苏培养(该株定名为FCC—3)。同时用由北京及上海生物制品研究所供给FCC—1虫株作对照。

二、培养及测试方法:用RPMI1640培养基及蜡烛缸法进行培养<sup>[6]</sup>。用体外微量法测试抗药性。用有盖40孔塑料微量测定板(孔径6.7mm,孔深10mm),先经紫外线照射半小时。药液用5%葡萄糖生理盐水配制,每孔注入药液量20微升。对照用等量的葡萄糖盐水不加药。磷酸氯喹由上海第十制药厂供给批号770611,按基质计量,每次实验设5~6组,每组5孔,组距按用药量对倍稀释,试验时每孔再注入含5%红细胞(原虫感染率1~2%)的培养液180 $\mu$ l。药量以加培养物后之最终浓度按每 $\mu$ g/ml计算。培养物在36~37C培养48小时,涂片吉氏

染色,计数5000红细胞内感染疟原虫数,求出5孔之平均感染率,以对照组为100求出各组的减虫率,按寇氏法算出使原虫比对照减少50%的用药量并进行比较。

## 结 果 与 讨 论

自1980年5月17日至8月25日共进行7次实验,其结果列表如下:

表 体外测定恶性疟原虫对氯喹的抗药性  
半数减虫用药量( $\mu$ g/ml)

FCC <sub>1</sub>	FCC <sub>3</sub>	
	培养56—73天	培养134—152天
0.00845	0.2078(56天)	0.0128(134天)
0.00626	0.2600(69天)	0.0128(152天)
0.0118	0.1309(73天)	
0.0091		
0.0089	0.2000	0.0128*

\* 末行数字表示均值

由上表可见FCC—3株复苏培养56~73天期间测定结果对氯喹有抗药性。其半数减虫用药量的均值为0.2 $\mu$ g/ml,较对照FCC—1株之均值0.0089 $\mu$ g/ml高22倍。继续培养至复苏后134及152天测得其半数减虫用药量的均值为0.0128 $\mu$ g/ml,与对照相近,说明其抗药性基本消失。

早在1968年Rieckmann等报告,自人工感染疟原虫的志愿者身上抽血作短期观察原虫对氯喹、奎宁、氯胍及氯酚喹等药的敏感性<sup>[3,4]</sup>;至1978年他们又用夜猴保存的各种恶性疟原虫虫株,并用微量法测定其对

氯喹的抗药性，主要指标是观察药物抑制原虫发育至裂殖体的数量多少来测定原虫的抗药性，观察原虫裂体增殖过程不到一个周期<sup>[6]</sup>。此法必需在现场进行；我国缺乏夜猴，无法仿效。故而参照 Trager等<sup>[6, 7]</sup>报道的超低温保存虫株的方法，采用液氮冻存。上述结果说明用液氮冰冻保存疟原虫可保持其原有的对氯喹有抗药性的特征，但不能持久，应在复苏培养成功后及早进行测定。我们用微量测定板经多次测试，重复性能好，用5%的红细胞，感染率是1~2%，培养两天不换液，其原虫繁殖旺盛，增殖率至少2~3倍，可用于测试原虫对药液的敏感性，其方法较 Rieckmann等所用的方法的优点是：1. 方法简便，不一定要在现场测试，也不用夜猴，培养物所含原虫也不需作同步处理；2. 效果明显，48小时采样以半数减虫用量作观察指标，可较确切地反映虫株对药物的敏感性，重复性亦好。根据初步观察药物效果与原虫密度有关，也即与培养物内含红细胞的比例有关，用5%的红细胞压积比例虽繁殖旺盛，但是否最适宜有待进一步研究。

### 小 结

1978年自海南岛分离一恶性疟原虫株，经用微量测定板测定，证明是一抗氯喹虫株，其抗性倍数在20倍以上。抗药性不能持久维持，若不用氯喹刺激连续培养3~4个月

抗药性可自行消失。通过本实验证明，用体外微量测定法，以半数减虫用量为主要指标测定药效，是一个经济、方便的方法，其结果较准确；此法并可用来作抗性测定。

(李锦明、张林春同志参加此项工作。采集标本时得到海南岛东方县医院、东方公社医院、上海生物制品研究所李德明同志的合作与帮助。

本文经龚建章教授审阅，在此一并致谢)

### 参 考 文 献

1. 昆明军区后勤部军事医学科学研究所疟疾防治组：云南省勐定恶性疟原虫对氯喹的临床敏感性观察。疟疾防治研究资料汇编，PP 133-141, 1973年12月。
2. 海南行政区卫生防疫站：海南岛抗氯喹疟疾调查报告。PP 70-74, 1978年6月。
3. Rieckmann KH, et al: Effects of chloroquine, quinine and cycloguanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of Plasmodium Falciparum in vitro. Am J Trop Med & Hyg 17 (5): 661-671, 1968.
4. Rieckmann KH: Determination of the drug sensitivity of Plasmodium Falciparum. J Am Med Ass 217 (5): 573-578, 1971.
5. Rieckmann KH, et al: Drug sensitivity of Plasmodium Falciparum An In-vitro Micro-technique. Lancet January 7: 22-23, 1978.
6. Trager W & Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673-675, 1976.
7. 李德明等：红内期诺氏疟原虫超低温保存及其体外培养试验。疟疾研究疟疾免疫专集7-9, 1979年6月。