

强力霉素对钩端螺旋体病的预防效果研究

梅家模 李志宏 章承锋 徐建民 胡强

【摘要】 目的 探讨强力霉素对钩端螺旋体(钩体)病的预防效果。**方法** 分别在 28℃ 和 37℃ 培养进行抑杀效果观察。将钩体接种的金黄地鼠分为直接感染组、感染前给药组、感染后给药组及空白对照组,分别观察各组实验动物的临床表现、体温变化、心脏血和尿培养结果及肝、肾组织病理学改变;选定钩体病流行区,采用双盲法,将人群分为服用强力霉素组和安慰剂组,分别观察两组的发病情况和服用强力霉素后的副反应情况。**结果** 在 28℃ 条件下强力霉素对钩体具有较强的抑杀效果,对 15 群 15 型钩体最小抑杀菌浓度分别为 2 μg/ml 和 4 μg/ml;模拟人体体温(37℃ 培养)条件下强力霉素含量为 0.25 μg/ml 时,对钩体仍有较好的杀灭效果,含量 0.125 μg/ml 时,仍有抑制作用;动物实验观察到直接感染组和感染前给药组部分金黄地鼠出现血尿、尿色金黄等钩体病临床表现;肝、肾组织病理学改变,其病变程度以直接感染组最为明显,感染前给药组次之,感染后给药组最轻;现场人群服用强力霉素组无病例发生,服用安慰剂组出现 5 例患者,两组间差异有统计学意义,服用强力霉素组仅 1 例出现轻微胃肠道刺激症状。**结论** 通过抑杀试验、动物实验和现场人群投服实验等系列研究,均证实了强力霉素对钩体病有较好的预防效果,可以作为钩体病流行和暴发的应急预防措施。

【关键词】 钩端螺旋体病;强力霉素;预防药

Serial studies on doxycycline prophylaxis against leptospirosis MEI Jia-mo, LI Zhi-hong, ZHANG Cheng-feng, XU Jian-min, HU Qiang. Jiangxi Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanchang 330029, China

【Abstract】 Objective To study the efficacy of doxycycline prophylaxis against leptospirosis, a serial of studies including laboratory, animal and field trials were conducted. **Methods** An effectiveness trial of doxycycline in inhibiting *Leptospira* was conducted in the laboratory with temperature set at 28℃ and 37℃ respectively, simulating the temperatures on leptospira-friendly and human body. Golden hamsters infected by *Leptospira* were divided into the groups as directly-affected, dosed-before-affected, dosed-after-affected and placebo, to observe the symptoms, temperatures, culture results of heart blood and urine as well as pathological changes of liver and kidney. In the endemic areas, a double-blinded, placebo-controlled field trial was set up to assess the attack rate and the side-effects after administered doxycycline. **Results** A significant inhibitive effect of doxycycline on group 15 type 15 was found in the leptospira-friendly group, with concentration at 2 μg/ml and 4 μg/ml, while in 37℃ at 0.25 μg/ml and 0.125 μg/ml. In the animal trial, blood or golden-colored urine occurred in both directly-affected group and the dosed-before-affected group. The order of pathological changes appeared as: the group directly affected > the group dosed before affected > the group dosed after affected. In the field trial, no case occurred in the doxycycline group while 5 cases were identified in the placebo group. There was a significant difference between these two groups with only one case in the doxycycline group having alimentary irritation. **Conclusion** The results of the serial studies from laboratory, animal and field showed preferable outcomes of doxycycline prophylaxis against leptospirosis, suggesting its role in emergent prophylaxis during the epidemics and outbreaks.

【Key words】 Leptospirosis; Doxycycline; Prophylactic

钩端螺旋体病(钩体病)是由致病性钩端螺旋体(钩体)引起的一种急性传染病,人接触疫水后感染。江西省是钩体病流行较为严重的省份之一。由于钩体分布范围广,流行菌型复杂,影响流行因素众

多^[1],加之疫区人群接种钩体疫苗较少,故我们对疫区人群试用口服强力霉素的措施取得了较好的防治效果。为进一步探讨强力霉素对钩体病预防效果,我们进行了系列实验研究,结果报告如下。

材料与方法

1. 实验材料:强力霉素(0.1 g/片,10 万单位)常

基金项目:卫生部科学研究基金资助项目(WKJ-1999-01-01)

作者单位:330029 南昌,江西省疾病预防控制中心

州制药厂生产(批号 0006001);钩体菌株是中国药品生物制品检定所提供的 15 群 15 型标准菌株;培养基采用柯索夫培养基、磷酸盐缓冲液;实验动物是武汉生物制品研究所提供的金黄地鼠;现场人群投服的安慰剂是维生素 B₂ (5 mg/片),由浙江昂利制药厂生产(批号 020330)。

2. 实验方法:

(1)钩体培养最适温度(28℃)下的抑杀试验:将强力霉素研磨成粉状,溶于培养基中,初浓度为 8 μg/ml,倍比稀释至 0.125 μg/ml,分装试管备用;计数达(1~5)×10⁷ 条/ml的标准菌株分别接种 0.3 ml 于不同强力霉素浓度的试管中,并置空白对照管;接种好菌株试管置 28℃ 培养 7 天后观察结果,暗视野显微镜下观察钩体处于僵硬、变形状态且未见活动者记为抑制状态;将处于抑制状态的 0.5 ml 培养物再转接种于不含强力霉素的培养基中 28℃ 培养 7 天后,观察钩体形态及生长并计数情况^[2]。

(2)模拟人体体温条件(体外实验)下的抑杀试验:选用标准菌株中的黄疸出血群赖型为实验菌株,接种于磷酸缓冲液中,培养温度由 28℃ 变为 37℃,接种量分别为 0.1、0.2 和 0.3 ml 等 3 个不同接种量,其他试验方法与钩体最适条件下抑杀试验相同,观察在模拟人体体温条件下强力霉素对钩体的抑杀效果。

(3)动物实验:动物实验共进行两次,第一次实验动物为成年金黄地鼠(体重 80~100 g/只),每组 20 只,接种钩体菌剂量为 0.5 ml/100 g;第二次实验动物为未成年鼠(体重为 50~70 g/只),每组 10 只,

接种钩体菌剂量为 1.0 ml/100 g。采用随机分组方法将实验动物分成感染前给药组(给服强力霉素间隔 1 天后给药)、感染后给药组(感染钩体间隔 3 天后给药)、直接感染组和空白对照组。实验周期为 21 天,定期观察所有实验动物临床表现、体温变化、心脏血和尿液培养等结果;对处死的实验动物取其血采用显微镜凝集试验(MTA)检测其是否产生抗体,并全部进行病理检查,观察其病理变化。

(4)现场人群投服实验:在流行季节选择钩体病流行区抽取 10~60 岁的常住人口,采用双盲法,将人员按 3:1 分为服用强力霉素组和服用安慰剂组。两组人员每周服药 1 次(由专业人员直视服药),共服 2 次,间隔 1 周,统计分析两组的发病情况,同时观察服用强力霉素后的毒副作用。病例诊断采用《钩端螺旋体病诊断标准(GB 15995-1995)》,临床诊断病例采集血液进行钩体培养和双份抗体检测。

结 果

1. 强力霉素对钩体抑杀效果:

(1)钩体最适条件下抑杀试验:结果显示,在钩体最适生长条件下(28℃ 培养),强力霉素对钩体有较强的抑杀作用,其最小抑菌浓度与最小杀菌浓度基本一致,强力霉素对 15 群 15 型钩体菌的最小杀菌浓度分别为 2 μg/ml 和 4 μg/ml(表 1)。

(2)模拟人体体温条件(体外实验):当培养基中强力霉素含量为 0.25 μg/ml 时,对钩体仍有较好的杀灭效果,含量为 0.125 μg/ml 时,仍有抑制作用(表 2)。

表1 强力霉素对钩体在最适生长条件下抑杀试验结果

血清型	强力霉素(μg/ml)培养基培养 7 d								强力霉素(μg/ml)培养基再培养 7 d							
	8	4	2	1	0.5	0.25	0	8	4	2	1	0.5	0.25	0		
黄疸出血群赖型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
爪哇群爪哇型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
犬群犬型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
拜伦群拜伦型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
致热群致热型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
秋季群秋季型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
澳洲群澳洲型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
波摩那群波摩那型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
流感伤寒群临海型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
七日热群七日热型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
赛罗群乌尔夫型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
明尼群明尼型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
巴达维亚群巴叶赞型	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+					
塔拉索夫群塔拉索夫型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					
曼耗群清水型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+					

表2 强力霉素对钩体体外作用结果

强力霉素含量 ($\mu\text{g/ml}$)	接种菌量(ml)		
	0.1	0.2	0.3
8	-	-	-
4	-	-	-
2	-	-	-
1	-	-	-
0.5	-	-	-
0.25	-	-	-
0.125	±	±	±
0(对照组)	+	+	+

2. 动物实验:

(1)血清抗体比较:检测结果显示,三个实验组的金黄地鼠均有抗体产生,最低为1:400,最高为1:3200,空白对照组无抗体产生。其中第一次实验,直接感染组 MAT 试验的 G 为928.10;感染前服药组为1007.94,感染后服药组为1131.37;第二次实验依次为428.22、400.00、400.00,证明动物感染是成功的。

(2)临床表现:实验过程中,每天至少观察 2 次,将有钩体病临床表现血尿、尿色黄的鼠记为阳性。结果显示,直接感染组与感染前给药组一些金黄地鼠临床表现为阳性(表 3),且直接感染组与感染后给药组间差异有统计学意义($P < 0.022$),而感染前给药组与直接感染组间差异无统计学意义($P = 0.5238$);接种钩体后的第 7、10 天感染前给药组出现体温升高现象,且差异有统计学意义($F = 4.581, P = 0.0134; F = 3.704, P = 0.0472$);直接感染组于接种钩体菌后第 7 天出现体温升高,且差异有统计学意义($F = 8.638, P = 0.003$),其他时间体温变化差异无统计学意义,感染后给药组和对照组在整个实验期间体温无显著性变化。

(3)心脏血培养观察:第一次实验于接种钩体菌后的第 3、7、14 天,第二次实验于接种后的第 3、5、7 天各采一次心脏血进行分离培养,结果均表明各組间差异无统计学意义(表 4)。

表3 钩体感染实验动物金黄地鼠临床表现

组别	阴性只数	阳性只数	合计
直接感染组	2	3	5
感染前给药组	3	1	4
感染后给药组	10	0	10

表4 金黄地鼠感染钩体后心脏血培养结果

组别	第一次实验						第二次实验					
	3 d		7 d		14 d		3 d		5 d		7 d	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
直接感染组	3	16	16	0	17	0	9	1	4	1	4	1
感染前给药组	1	18	20	0	18	0	8	2	4	0	4	0
感染后给药组	-	-	19	0	18	0	-	-	10	0	10	0

(4)鼠尿培养:第二次实验于接种钩体菌后的第 5、7、9、11 天各采 1 次膀胱尿进行分离培养,结果亦均为阴性。

(5)病理学变化比较:两次实验采用腹腔注射接种钩体菌液浓度均为 $6.25 \times 10^8 \text{ ml}$,实验结束后处死所有动物,取所有处死动物的肝、肾标本作病理学检查。第一次实验接种剂量为 0.5 ml/鼠,所有实验动物肝、肾组织主要表现为退行性病变,三组实验动物之间肝组织检查差异均无统计学意义,但肾组织直接感染组略高于其他两组,且受损程度稍重;第二次实验,接种剂量加大至 1 ml/100 g 体重,因第 3 天采心脏血麻醉剂量过大致直接感染组和感染前给药组部分实验动物死亡,感染后给药组因当天给服强力霉素未采心血而无动物死亡。病理学检查显示:直接感染组 5 只鼠中肝、肾未受侵害 1 只,其余 4 只均出现肝细胞坏死、出血和肾小球、肾小管出血等严重病变;感染前给药组 5 只鼠中肝、肾未受侵害 1 只,肝组织可见轻度变性 2 只,肾髓质轻度出血 2 只;感染后给药组 10 只鼠中肝、肾未受侵害 3 只,1 只可见肝细胞坏死、肾小球出血,其余为肝细胞肿胀、肾小管管型等轻度损害。各組间肝、肾组织病理学发生变化的数量差异无统计学意义,但病变程度以直接感染组最为明显,感染前给药组次之,感染后给药组最轻。

3. 现场人群投服实验:2002 年 7 月 1-20 日江西省共报告钩体病患者 15 例,其中峡江县 10 例,而实验现场巴丘乡就发生 6 例。故选定该乡为实验现场,采用双盲法将实验人群分为服用强力霉素组和服用安慰剂(维生素 B₂)组,全程服用强力霉素共 2424 人,服用安慰剂 794 人。两组人员服药均为每周 1 次,成人 2 片/次,18 岁以下人群 1 片/次,均由专业人员确认已服药。至 8 月 31 日当地钩体病流行高峰结束,服用强力霉素组无人发病,服用安慰剂组发病 5 例,两组间差异有统计学意义($P = 0.0009$)。药物均于餐后服用,仅有 1 例 12 岁学生服用强力霉素后出现轻微胃肠道刺激症状,其余人员均未出现不良反应。

讨 论

钩体疫苗接种对预防钩体病能够起到一定的作用,但存在一些不足。首先,疫苗免疫力作用不持久,一般接种疫苗至产生保护性抗体需一定时间,因此需要每年在流行季节到来前 2 个月左右接种,且保护期仅有 1 年时间;其次,对钩体病的群型保护面不广,目前我国仅有 6 个血清型的钩体疫苗,接种需针对当地流行菌型定购疫苗^[3],而江西省已查明的流行菌型多达 13 型 24 群^[4],且有可能出现区域性菌型变化,流行的优势菌型在流行高峰前表现不明显^[5],因此针对性定购疫苗有一定的困难;第三,疫苗接种后机体出现不良反应,影响群众生产劳作,群众不易接受;加之钩体病常年发病率较低,偶发性强,流行季节爆发性流行的突发性较大,大面积接种钩体疫苗在成本效益比上有一定盲目性,故需要找到一种应急预防的药物和方法。

强力霉素是四环素类广谱抗生素,主要用于治疗革兰阳性菌等的感染^[6]。本实验结果表明:强力霉素对 15 群 15 型钩体菌的最小杀菌浓度分别为 2 $\mu\text{g/ml}$ 和 4 $\mu\text{g/ml}$ 。另外,体外实验结果表明:当培养基中强力霉素含量为 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 时,对钩体仍有较好的杀灭效果,当含量为 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 时,仍有抑制作用。根据强力霉素在人体内的药效作用,按照常规服药方式,强力霉素在人体内血液高峰浓度可达 4 $\mu\text{g/ml}$,生物半衰期为 10-22 小时^[7],因此,按照常规服药方法,至少在 4 个生物半衰期内(即 40-88 小时)人体血液的药物浓度对钩体均有杀灭作用。

动物实验结果表明:金黄地鼠接种钩端螺旋体后均产生抗体,说明动物感染模式是成功的。实验期间观察到直接感染组和感染前给药组部分金黄地鼠出现血尿、尿色金黄等钩体病临床表现,且直接感染组与感染后给药组及对照组间差异有统计学意

义,说明服用强力霉素有减轻或防止临床症状出现的作用。两次实验观察各组间病理学改变的差异虽无统计学意义,但从病变程度分析均以直接感染组最为明显,感染前给药组次之,感染后给药组最轻,表明服用强力霉素对钩体有一定的预防和治疗效果。

为了进一步证实强力霉素的预防效果,在动物实验的基础上,我们进行了现场人群服药实验。结果表明:服用强力霉素组人群无病例发生,而服用安慰剂组发生了 5 例病例,且服用强力霉素后仅 1 例出现轻微的胃肠道刺激症状。本次现场人群服药实验表明:强力霉素对钩体病有较好的预防作用,且服用后不良反应轻微。

综上所述,本次实验无论是从实验室、动物实验还是现场人群服药均证实了强力霉素对钩体病有较好的预防效果,可以较好的弥补目前接种钩体疫苗预防钩体病存在的诸多不足,是一种方便、快捷、安全、有效的预防措施之一,可作为钩体病流行和暴发的应急预防措施。

参 考 文 献

- 1 时曼华,于恩庶.中国钩端螺旋体病地理流行病学研究.香港:亚洲医学出版社,2000.10-13.
- 2 Fahey S. 钩端螺旋体病防治指南.魏曦,于恩庶,王枢群,等译.北京:人民卫生出版社,1985.209-210.
- 3 钟惠澜.热带医学.第 1 版.北京:人民卫生出版社,1986.591.
- 4 罗衡生,徐慧栋,胡建国,等.江西省钩端螺旋体病地理流行病学研究.中华流行病学杂志,1995,16 特刊 4 号:99.
- 5 时曼华,于恩庶,梁中兴,等.中国钩端螺旋体病地理流行病学研究.中华流行病学杂志,1995,16 特刊 4 号:22.
- 6 中山医学院.药理学.北京:人民卫生出版社,1981.357-358.
- 7 国家药典委员会.临床用药须知.第 3 版.北京:化学工业出版社,2001.667.

(收稿日期:2006-02-17)

(本文编辑:张林东)