

云南省勐仑地区恶性疟原虫对 氯喹敏感性的调查

云南省“恶性疟原虫抗氯喹株地理分布调查”协作组

陈文才 车立刚 徐永言 杨恒林

七十年代以来,我省已用WHO早年推荐的临床观察法,先后调查了孟定^[1]、腊垒^[2]地区恶性疟原虫对氯喹的敏感性,证明有抗性株存在。因此有必要进一步查清省内抗氯喹恶性疟原虫株的地理分布,为制定相应的防治计划提供科学依据。

目前,恶性疟原虫对氯喹敏感性的测定方法已有很大的进展,最近WHO推荐体外微量测定法,即应用体外微量培养技术,测定恶性疟原虫对氯喹的敏感性。认为它具有用血量少、方便、快速、准确、可靠的优点。但是国内尚无现场应用的报道。为了解省内恶性疟原虫抗氯喹株的地理分布,评价体外微量测定法的现场应用价值,同时了解西双版纳州恶性疟原虫对氯喹的敏感程度,1981年5~10月,我组在西双版纳勐仑地区,采用体外微量法,调查恶性疟原虫对氯喹的敏感性,同时与体内观察法作平行对照,获得满意结果。

材料和方法

一、测定板:由中国医学科学院寄生虫病研究所提供,每板4行,每行10格,1格10格为无药对照,2~9格含氯喹量分别为1、2、4、5、7.8、16、32、64微微克分子(P-mol)。

二、培养液:取西德产RPMI 1640粉10.5克,溶于96毫升重蒸馏水,加Heps粉0.594克,加庆大霉素4000单位,磁力加热(40°C)搅拌1小时,0.3μ微孔滤膜过滤除菌,4°C贮存备用。临用时取上述1640液8.2毫升,2.93%谷氨酰胺液0.1毫升,7.5%碳酸氢钠液0.27毫升,新鲜兔血清1.5毫升,混匀制成完全新鲜

培养基。

三、方法:采用Trager-Jensen蜡烛缸法^[3]:取病人血1~2毫升,经玻璃珠摇荡去纤维后,取200微升,注入盛有新鲜完全培养基1.8毫升的小瓶内。混合制成含虫血培养基混合液,用定量移液器,按每格50微升量,将含虫血培养基混合液依次移入测定板1格10格及2~9格中。加盖,振动数秒钟,使氯喹溶解于培养基中,而后移入蜡烛缸,点燃蜡烛,待烛光将灭时,关闭活塞,移入隔水式恒温箱内,37~39°C孵育24~48小时,24小时后预收第10格,观察疟原虫发育情况,决定收获时间(至迟也在48小时收获)。收获时用毛细玻管去上清液,依次取9~1格培养物,分别制成9个厚血膜。充分干燥,吉氏常规染色。每个血膜计数200个白细胞视野内疟原虫裂殖体数,求出各药格与对照格之裂殖体百分率。分别列入表中。

四、对象:14天内未用过抗疟药物,经Wilson-Edesen浊度法测定尿中无氯喹。疟原虫密度在300~70,000/毫米³的恶性疟现症病人。

五、抗性标准:4 P-mol药格中疟原虫发育被抑制为敏感,5.7 P-mol药格疟原虫发育被抑制为效果满意,5.7 P-mol以上药格,原虫仍能发育为抗性。

临床观察

临床观察系采用WHO推荐的4周法进行。

一、经取血后,凡符合观察条件的患者,

即给予服标准剂量的氯喹，成人1.5克(基质)，3天分服，第1第2天各顿服0.6克，第3天顿服0.3克，儿童递减。由本组人员送药看服，并以尿氯喹阳性为服药佐证。投药前计数疟原虫无性体密度，投药后逐日血检一次，连续7天。每血膜镜检100个视野未查到疟原虫无性体为阴性。敏感或Ⅰ级抗性病例，于投药后第14、21、28天随访血检一次。观察期间不用其它抗疟药，确定抗性的病例改用其它抗疟药。如发现配子体，第6天加用伯喹。

二、抗性级别按WHO规定标准^[4]判定，分敏感、Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级抗性。

结 果

共收治62个病例，男31例，女31例。年龄2~50岁，14岁以下22人。当地居民58人，外来人员4人。病例来自景洪县及勐腊县的优乐山、橄榄坝、勐仑、麻木树4个公社，9个大

队，24个居民点。具有一定的代表性。

一、体外测定结果

培养测定成功39例，疟原虫在2微微克分子药格发育被抑制1例，属敏感。其余38例疟原虫在8微微克分子(P-mol)药格以上发育良好，属抗性，占97.44%(38/39)，(表1)。

表1 体外测定各药格中疟原虫生长至裂殖体的例数

	格号及氯喹剂量(P-mol)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0	1	2	4	5.7	8	16	32	64	0
初发	20	20	19	19	19	19	19	15	7	20
复发	19	19	19	19	19	19	17	11	8	19
合计	39	39	38	38	38	38	36	36	10	39

各药格中疟原虫发育至裂殖体的情况及裂殖体率如表2所示。查得半数有效量为2.016P-mol/微升血(相当于1040微克/升血)。95%有

表2 39例恶性疟原虫对氯喹敏感性测定结果(云南、西双版纳，1981年)

	氯 喹 剂 量 (P-mol)								
	0	1	2	4	5.7	8	16	32	64
平均裂殖体数/200WBC	427.9	362.5	344.7	315.1	270.0	237.4	158.9	76.2	1.54
裂殖体率	100	84.7	80.6	73.2	63.1	55.5	37.1	17.0	0.3

效量为8.83P-mol/微升血。

二、体内观察结果

观察记录完整的50例，有抗性48例，敏感2例。抗性率为96%(48/50)。其中Ⅲ级抗性17例，Ⅱ级抗性7例，Ⅰ级抗性24例。初发病例的抗性程度明显高于复发病例的抗性程度(表3)。

三、体内、外两种方法测定结果的相互关系

在39个经体外法测定成功的病例中，有3例因其他原因未作体内观察，有3例未完成3周追踪观察(属S-RI)。故同体内、外两种方法测定成功的完整病例为33例，其结果显示：

1. 体内观察抗性高的病例，疟原虫能在高浓度药格中发育至裂殖体。

表3 体内观察抗性结果(云南、西双版纳，1981年)

	抗 性 级 别							
	敏 感		Ⅰ 级		Ⅱ 级		Ⅲ 级	
	例数	率(%)	例数	率	例数	率	例数	率
初发	1	3.7	8	29.6	5	18.5	13	48.2
复发	1	4.3	16	69.6	2	8.7	4	17.4
合计	2	4.0	24	48.0	7	14.0	17	34.0

$P < 0.05$

2. 体内观察敏感和Ⅰ级抗性病例中，半数病例的疟原虫只能在低浓度药格(16 P-mol/格)中发育。半数病例的疟原虫可在高浓度药格(32 P-mol/格以上)中生长发育(表4)。

这后一部分病例实属抗性高的病例，只因免疫力强，体内观察时，疟原虫消失快，所以

显示的抗性程度偏低。

表 4 体外测定疟原虫发育与体内观察抗性级别的关系 (云南、西双版纳, 1981年)

体 外 法		体内抗性级别			
药量(P-mol)	例数	敏感	I	II	III
8	33	1	17	4	11
16	32	1	16	4	11
32	23	1	8	4	10
64	10	1	2	1	6

讨 论

一、我省首次用体外微量培养恶性疟原虫技术, 现场测定恶性疟原虫对氯喹的敏感性获得成功。测得西双版纳州勐仑地区的恶性疟原虫对氯喹普遍有抗性, 抗氯喹恶性疟原虫占97.44%(38/39)。抗性程度高, ED_{50} 为2.016 P-mol/微升血(相当于1040微克/升血)。远远高出WHO报道(1965)^[6]成人服氯喹650毫克基质, 对恶性疟敏感株病人的血浆有效浓度30微克/升。

二、体内观察测得96%(48/50)的病例对氯喹不敏感, I级抗性占48%, II级抗性占14%, III级抗性占34%。抗性类型与海南岛相似^[5]。抗性比省内孟定地区^[1](III级抗性2.8%)、腊垒地区^[2](III级抗性5.9%)更高。说明省内抗氯喹株恶性疟原虫的抗性水平日渐增高, 范围也可能扩大。

三、体外测定法优于体内观察法, 虽然两种方法测得抗性病例所占比率基本相似, 分别为97.44%和96%。但两种方法均成功的33例材料表明: 体内观察时抗性程度高的病例, 疟原虫在高浓度药格中发育良好。体内观察时敏感或I级抗性病例, 半数病例的疟原虫能在低浓度药格中发育, 也有半数病例的疟原虫能在高浓度药格中发育。这些病例, 显然是属于免疫力强的病人, 体内观察时疟原虫消失快, 显示抗性程度偏低。它与体内观察时复发病例抗性程度低于初发病例(因前者免疫力高于后者)的

结果相吻合。足见体内法受免疫力影响, 结果不如体外法准确可靠。

另外体内观察, 病人必须留院7天, 反复多次取血, 敏感和I级抗性病例要随访三次, 28天才能得到结果。观察烦琐, 费去病人和工作人员的许多时间。某些重病及老幼病人不宜列入观察对象。而体外法一次取少量血, 24~48小时即可得到结果, 普遍病人勿需住院治疗。较体内法方便、迅速、省时, 不受病人年龄和病情的限制, 病人也容易接受。

四、本次调查的病例, 来自西双版纳州的2个县, 4个公社, 9个大队, 24个居民点, 具有一定的代表性。它提示景洪、勐腊地区, 广泛使用氯喹防治疟疾20余年之后, 恶性疟原虫对氯喹普遍产生抗性。且抗性水平较高。应当迅速研究阻止抗氯喹株恶性疟原虫扩散的策略, 采取适当的防治措施。其中灭媒应占极重要的地位。

五、现场临床观察, 证明当地单用氯喹治疗恶性疟现症病人, 效果极差。我们对II III级抗性病例选用青蒿素针剂, 蒿甲醚针剂治疗, 效果均良好, 使用氯喹伍用防疟片2号、防疟片2号伍用喹宁, 效果均满意。治疗过程中伍用足量配子体杀灭剂, 对阻止抗氯喹株恶性疟的扩散, 是极重要的。

摘 要

为查清云南省内抗氯喹恶性疟原虫株的地理分布, 作者等于1981年5~10月, 应用WHO推荐的“体外微量测定法”在西双版纳勐仑地区, 对收治的来自景洪县和勐腊县的4个公社, 9个大队, 24个居民点的62名病例, 检测了恶性疟原虫对氯喹的敏感性, 同时与体内观察法作平行对照。结果表明景洪、勐腊地区恶性疟原虫对氯喹的抗性是普遍而严重的; 氯喹不宜作为当地治疗恶性疟患者的常规特效药; 青蒿素类或防疟片II号与其它抗疟药伍用, 治疗当地恶性疟抗氯喹株效果较满意。体外微量测定法, 调查恶性疟对氯喹的敏感性比临床观察法(体内法)更准确、迅速、方便、安全、适用。

ABSTRACT

In order to find out thoroughly the geographical distribution of the presence of resistant strains of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in Menglun Area, Yunnan Province, a microquantitative in vitro assay, recommended by WHO, was used to identify the sensitivity of this parasite to chloroquine, from 62 patients under treatment. They came from 24 residential quarters of nine production brigades of four people's communes at Jinghong and Mengla counties, Menglun area, Xishuangbana. As a control, an investigation *in vivo* was simultaneously carried out in parallel with in vitro assay. It was found that in the areas investigated, drug resistance was so strong and popular that chloroquine appeared to be unsuitable for routine therapy. Therapy with *Artemisia* extract or a combination of the antimalaria II pill and other drugs resulted in better efficacy in treating cases

with resistant strains of *P. falciparum*. The authors found that in vitro micro-assay for detecting resistant plasmodium as compared with the clinical method seemed to be equally accurate, safe, convenient and rapid to yield result & practical for use.

参 考 文 献

1. 昆明军区后勤部军事医学研究所疟疾治疗组: 中华内科杂志, (4), 1976。
2. 云南省疟疾防治研究所: 腊垒地区恶性疟原虫对氯喹的临床敏感性观察, 寄生虫病防治研究资料选编第一期, 云南血研会编, 1980。
3. Trager WQ et al: Science 193: 673, 1976。
4. 上海寄生虫病研究所编: 《实用疟疾学》204页, 人民卫生出版社出版, 1978年版。
5. 中国医学科学院寄生虫病研究所等: 试用体外微量法测定恶性疟原虫对氯喹敏感性的初步结果, 未发表资料, 1980。
6. Peters W: Chemotherapy & Drug Resistant in Malaria, p492, Academic Press, London & New York, 1970。

全国肝炎流行病学专题会议在湘潭召开

全国肝炎流行病学专题会议于4月9日至15日在湘潭市召开。参加这次会议的代表来自全国肝炎专题委员会成员、全国各省、市防疫站、研究所、高等医学院校的站长、研究员、教授、副主任医师、及主任医师共计120余人。这次会议主要是总结交流近几年肝炎在流行病学, 科研、防治经验与学术上的讨论, 以及今后对肝炎调研十项课题修改审订等工作。

为了活跃会议内容, 中华医学会湖南湘潭市分会与会务组共同研究安排了二场学术报告, 由中国医学科学院病毒研究所主任、副研究员刘崇柏, 北京第二

医学院副教授李寿复、讲师庄辉、河南省卫生防疫站病毒研究室副主任检验师李羽先后作了《国内外肝炎流行病学的新进展》、《非甲非乙型肝炎的探讨》、《甲型肝炎》、《肝炎实验诊断新技术的进展》的学术报告。同志们说: “教授作的学术报告, 理论高深创新、临床经验丰富, 丰富了我们的知识, 为我国进行肝炎科研、医疗与预防、教学提供了技术咨询与专业医学理论知识焊接, 在我们实际工作中将起着巨大信息反馈作用”。

(湖南省湘潭市卫生局 曹如斌整理)

河南省安阳地区脊髓灰质炎调查

安阳地区卫生防疫站 于 杰

1982年11月对1981年全区基层卫生网上报的脊髓灰质炎作了调查, 确诊751例, 排除332例。患者遍及全区11个县、99个公社、502个大队, 近半数县发病率高达10.56/10万以上, 发病率最高的县达40.96/10万, 最低0.37/10万, 平均发病率为10.10/10万, 流行持续时间达8个月之久。

发病年龄小, 病例集中在3岁以下儿童, 尤以1岁

组儿童发病最高, 2岁组次之, 各年龄组发病率随年龄递增而下降。男性多于女性。于夏秋季形成发病高峰。

本文分析了本次流行的特征。认为服苗率低, 人群免疫水平低, 易感儿的大量积累、传染源广泛存在、管理不严等因素是构成流行的主要原因。