

文章编号: 1000-7423(2012)-01-0041-04

【论著】

中缅边境地区恶性疟原虫对氯喹、哌喹、咯萘啶敏感性的体外测定

张苍林^{1,2}, 周红宁², 王剑², 刘慧²

【摘要】 目的 了解中缅边境地区恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 对氯喹、哌喹和咯萘啶敏感性的变化。方法 2009 年 9~12 月在中缅边境的缅甸拉咱市采集了 51 份恶性疟血样, 采用 Rieckmann 体外微量测定法进行药物敏感性测定。结果 敏感性测定结果有效的 42 份血样中, 其恶性疟原虫对氯喹、哌喹和咯萘啶的抗性率分别为 95.2%、7.1% 和 54.8%, 半数抑制量 (ID_{50}) 分别为 320.5、128.2 和 96.0 nmol/L。在抗咯萘啶的 23 份血样中, 对氯喹和哌喹的交叉抗性率分别为 91.3% (21/23) 和 13.0% (3/23); 抗氯喹的 40 份血样中, 对哌喹和咯萘啶的交叉抗性率分别为 7.5% (3/40) 和 52.5% (21/40); 抗哌喹的 3 份血样中, 对氯喹和咯萘啶的交叉抗性率均为 100%。结论 在缅甸拉咱市调查点流行的恶性疟原虫对氯喹已普遍产生抗性, 约半数对咯萘啶具有抗性, 多数对哌喹则敏感。

【关键词】 恶性疟原虫; 敏感性; 体外微量测定; 氯喹; 哌喹; 咯萘啶

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

In Vitro Sensitivity of *Plasmodium falciparum* Isolates from China-Myanmar Border Region to Chloroquine, Piperaquine and Pyronaridine

ZHANG Cang-lin^{1,2}, ZHOU Hong-ning², WANG Jian², LIU Hui²

(1 Department of Pathogen Biology, The Second Military Medical University, Shanghai 200025, China; 2 Yunnan Provincial Institute of Parasitic Diseases, Pu'er 665000, China)

【Abstract】 **Objective** To assess the *in vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, piperaquine and pyronaridine in China-Myanmar border area. **Methods** Fifty-one blood specimens of *P. falciparum* isolates were collected from Laza City of Myanmar during September to December in 2009, and the sensitivity of the parasites to the drugs was detected by Rieckmann's *in vitro* microtest. **Results** Among the 42 blood samples with valid results of sensitivity test, the resistance rate to chloroquine, piperaquine and pyronaridine was 95.2%, 7.1%, and 54.8%, with a corresponding 50% inhibition dose (ID_{50}) of 320.5, 128.2, and 96.0 nmol/L, respectively. Pyronaridine-resistant *P. falciparum* exhibited some degree of cross-resistance to chloroquine [91.3%(21/23)] and piperaquine [13.0% (3/23)], and chloroquine-resistant *P. falciparum* showed cross-resistance to piperaquine [7.5%(3/40)] and pyronaridine [52.5%(21/40)]. High level of cross-resistance was present to chloroquine (100%) and pyronaridine (100%) in piperaquine-resistant *P. falciparum*. **Conclusion** In Laza City, *P. falciparum* shows high resistance to chloroquine, half isolates are resistant to pyronaridine, and most isolates are still sensitive to piperaquine.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; Sensitivity; *In vitro* microtest; Chloroquine; Piperaquine; Pyronaridine

Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2007CB513103)

* Corresponding author, E-mail: zhangcanglin@yipd.org

中国云南省恶性疟主要分布于中缅、中老和中越边境一带, 以及省内中部地区的 43 个县 (市)。20 世

纪 80 年代初的监测结果证实, 云南省中缅和中老边境地区流行的恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 对氯喹普遍产生高度抗性, 抗性率均在 95% 以上^[1], 省内中部亦有约 50% 地区的恶性疟原虫对该药产生了抗性^[2]。为了解云南省中缅边境流行的恶性疟原虫对氯喹、哌喹和咯萘啶敏感性的变化, 以指导该省边境

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (No. 2007CB513103)

作者单位: 1 第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200025;
2 云南省寄生虫病防治所, 普洱 665000

* 通讯作者, E-mail: zhangcanglin@yipd.org

地带合理用药, 于 2009 年在中国云南省边境的缅甸拉咱市现场采集恶性疟血样, 体外测定该地区流行的恶性疟原虫对上述药物的敏感性。

调查对象与方法

1 调查地点和调查时间

2009 年 9 月 28 日~12 月 21 日选择缅甸拉咱市为调查点, 该地与中国云南省的盈江县那邦镇仅一河之隔, 位于北纬 24° 48.405' ~ 24° 42.283', 东经 97° 32.800' ~ 97° 33.900' 之间, 平均海拔 180~280 m。

2 调查对象

选择恶性疟原虫密度 ≥ 304 个/ μl 血, 2 周内未用过抗疟药、磺胺和四环素类药物的恶性疟现症患者。年龄 4~58 岁, 性别不限, 以拉咱市当地居民为主, 少数为拉咱市周边县/市的居民 (中国籍与缅甸籍居民比例为 1:50)。共采集 51 份恶性疟患者血样, 每份血样 5 ml。参与此次调查研究的患者均签署了知情同意书。

3 体外敏感性测定

3.1 测定板和培养基的制作

微量测定板由中国第二军医大学病原生物学教研室提供, 具体各井药物浓度见表 1。安瓿封装液体培养基的制备: 参照文献 [3-7] 的方法, 将 2 ml 安瓿洗净、高压灭菌、烘干, 每安瓿注入 1.8 ml 体外连续培养恶性疟原虫用的 RPMI 1640 完全培养基, 火焰封口, 4℃ 保存, 用于敏感性测定。

表 1 测定板中各种药物的药物浓度
Table 1 Drug concentration in plate

药物 Drug	各井浓度 Concentration/ $\text{pmol} \cdot \text{well}^{-1}$							
	A	B	C	D	E	F	G	H
氯喹 Chloroquine	0	1	2	4	8	16	32	64
哌喹 Piperaquine	0	2	4	8	16	32	64	128
咯萘啶 Pyronaridine	0	2	4	8	16	32	64	128

3.2 测定方法与结果判定

采用 WHO 推荐的 Rieckmann 体外微量法^[8]。取 0.2 ml 含虫血样, 稀释于 1.8 ml 培养基中, 在测定板各井中依次 (从低浓度井至高浓度井) 加入 50 μl 含虫血培养基混合液, 在 37℃ 恒温箱内蜡缸培养, 培养 19~37.5 h。培养时, 疟原虫密度超过 80 000 个/ μl 血时, 用健康人“O”型红细胞稀释至 20 000~50 000 个/ μl 血^[9]再按上述方法操作。计数厚血膜中 200 个无性体原虫范围内 3 个核及以上的裂殖体数^[10], 将对照井 3 个核及以上的裂殖体率 $\geq 20\%$ 判为测定成

功, 以对照井裂殖体为基数, 计算各药井裂殖体抑制率, 用 Prism 5.0 计算半数抑制量 (ID_{50}) 和 95% 可信限, 并用几何均数计算完全抑制裂殖体形成的平均浓度 (CMC)。

以恶性疟原虫能在氯喹 ≥ 8 pmol/井、哌喹 ≥ 32 pmol/井和咯萘啶 ≥ 8 pmol/井中发育至 3 个核及以上裂殖体判定为对各药产生抗性, 反之为敏感^[11], 并根据产生抗性血样数计算其抗性率, 即产生抗性的血样数/总血样数 $\times 100\%$ 。

交叉抗性率的计算公式: 抗某药恶性疟原虫对另一药的交叉抗性率 = 另一药在抗某药恶性疟原虫中出现抗性的血样数/抗某药恶性疟原虫的血样数 $\times 100\%$ 。

结 果

1 测定效率

采集的 51 份恶性疟血样中, 42 份血样 [占 82.4%, 女性血样占 19.0% (8/42)] 体外对氯喹、哌喹和咯萘啶敏感性测定结果有效。检测失败的 9 份血样中, 5 份血样 -4℃ 保存超过 24 h, 2 份血样原虫密度 < 500 个/ μl 血 (分别为 367 个/ μl 血和 304 个/ μl 血)。

2 恶性疟原虫对各药的抗性率、 ID_{50} 和平均抑制量等

测定结果显示, 各药井裂殖体平均抑制率随药物浓度的增加而升高。在测定成功的 42 份恶性疟血样中, 1 份血样在哌喹最高药物浓度 128 pmol/井中仍有裂殖体生成, 其 ID_{50} 为 2196 nmol/L, 是总平均 ID_{50} (128.2 nmol/L) 的 1.7 倍; 4 份血样在氯喹最高药物浓度 64 pmol/井中仍有裂殖体生成, 其平均 ID_{50} 为 615.8 nmol/L, 是总平均 ID_{50} (320.5 nmol/L) 的 1.9 倍; 而咯萘啶在最高药物浓度 128 pmol/井均无裂殖体生成, 仅有 1 份血样在 64 pmol/井时有裂殖体生成, ID_{50} 为 134.2 nmol/L, 是总平均 ID_{50} (96.0 nmol/L) 的 1.4 倍。

3 各药的交叉抗性

结果显示, 在抗咯萘啶的 23 份血样中, 对氯喹和哌喹产生交叉抗性的分别有 21 份和 3 份, 其交叉抗性率分别为 91.3% (21/23) 和 13.0% (3/23), 显示咯萘啶与氯喹有明显的交叉抗性; 抗氯喹的 40 份血样中, 对哌喹和咯萘啶的交叉抗性率分别为 7.5% (3/40) 和 52.5% (21/40); 抗哌喹的 3 份血样中, 对氯喹和咯萘啶的交叉抗性率均为 100%。

讨 论

本研究就中国云南省边境的缅甸拉咱市流行的恶性疟原虫对氯喹、哌喹和咯萘啶敏感性测定结果显

表 2 恶性疟原虫对氯喹、哌喹及咯萘啶敏感性体外测定结果
Table 2 *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, piperazine and pyronaridine

药物 Drug	测定血样 No. cases tested	各药并裂殖体平均抑制率/% Mean inhibition of schizonts per well/%							平均抑制浓度/nmol·L ⁻¹ CMC ^a /nmol·L ⁻¹	平均抑制量/pmol·well ⁻¹ Mean dosage/pmol·well ⁻¹	抗性率/% Resistance rate/%	ID ₅₀ (95%可信限)/nmol·L ⁻¹ ID ₅₀ (95%CL)/nmol·L ⁻¹
		B	C	D	E	F	G	H				
		氯喹 Chloroquine	42	8.5	18.1	30.8	43.3	57.9				
哌喹 Piperazine	42	10.6	23.1	71.6	95.7	99.5	99.7	99.8	440	11.1	7.1	128.2(125.1~131.4)
咯萘啶 Pyronaridine	42	12.7	40.0	82.7	94.1	98.5	100	100	410	20.3	54.8	96.0(85.4~107.9)

* 完全抑制裂殖体形成的平均浓度 Mean concentration for complete inhibition of schizont formation.

表 3 抗各药恶性疟原虫对其他抗疟药的交叉抗性
Table 3 Cross resistance of each drug-resistant *Plasmodium falciparum* to other drugs

药物 Drug	各药物原有抗性例数 No. resistance of each drug	对其他抗疟药的交叉抗性率/% Proportion of cross resistance to other anti-malarial drugs/%		
		氯喹 Chloroquine	哌喹 Piperazine	咯萘啶 Pyronaridine
氯喹 Chloroquine	40	-	7.5(3/40)	52.5(21/40)
哌喹 Piperazine	3	100.0(3/3)	-	100.0(3/3)
咯萘啶 Pyronaridine	23	91.3(21/23)	13.0(3/23)	-

示, 该地流行的恶性疟原虫对氯喹普遍产生抗性, 对咯萘啶产生一定的抗性, 而对哌喹则敏感, 且对氯喹与咯萘啶有明显的交叉抗性, 其交叉抗性率为 52.5%。该结果与杨亚明等^[12]1991-1993 年研究结果不太相符, 其原因有待进一步的研究。另外, 在本研究中发现, 恶性疟原虫密度小于 500 个/μl 血时, 抗性测定易失败, 故建议选择原虫密度大于 500 个/μl 血用于体外抗性测定。

结合杨亚明等^[12]和杨恒林等^[13-15]的研究文献数据分析, 可以看出: 自 1994 年缅甸流行的恶性疟原虫对氯喹的抗性率、ID₅₀ 和 CMC 随着时间的推移, 均由先下降后上升的趋势, 只是在 1999 年和 2003 年之间下降幅度比 1991-1993 年和 1999 年之间的稍大一些。出现该起伏的原因, 估计与 21 世纪前后恶性疟流行区逐渐停止使用氯喹^[16](但未做到完全停用), 并以复方哌喹(防疟 III 号片)为替代氯喹的主要药物, 广泛用于群众性预防服药和假定性治疗^[14], 以及 2003 年“全球基金疟疾项目”实施后, 加强了疟疾治疗的规范性, 从而增加了氯喹的使用量有关。1991-1993 年与 2003 年相比, 氯喹抗性率从 100%下降至 83.3%, ID₅₀ 和 CMC 分别下降了 52.2%(240/114.8)和 73.8%(1 220.0/320.2), 与刘德全等^[5]和杨恒林等^[15]的监测结果相似; 在此期间, 云南省减少氯喹的使用后, 虽然恶性疟原虫对氯喹抗性率变化不是很明显, 但完全抑制裂殖体形成的平均浓度却下降了 73.8%, 显然抗性程度的下降明显快于抗性率的下降。2003 年与

2009 年相比, 氯喹抗性率从 83.3%上升至 95.2%, ID₅₀ 和 CMC 分别上升了 64.2%(114.8/320.5)和 63.6%(320.2/880); 1991-1993 年与 2009 年的比较, 其平均抑制剂量下降了 28.2%(61.0/43.8), 总体 ID₅₀ (240/320.5) 的增加, 这可能与上述用药情况有关。随着当地流行的恶性疟原虫对氯喹的不断耐受, 出现平均抑制剂量下降, 而半数抑制剂量上升的现象, 确切原因尚待进一步的研究证实。

1991-1993 年与 2003 年相比, 缅甸恶性疟原虫对咯萘啶抗性率从 21.4%上升至 31.58%, ID₅₀ 和 CMC 分别上升了 55.1%(18/40.1)和 59.2%(56/137.1); 2003 年与 2009 年相比, 咯萘啶抗性率从 31.58%上升至 54.8%, ID₅₀ 和 CMC 分别上升了 58.2% (40.1/96.0) 和 66.6%(137.1/410)。平均抑制量由 1991-1993 年的 2.8 pmol/井上升至 2009 年的 20.3 pmol/井, 上升了 86.2%。显示该地区恶性疟对咯萘啶的敏感性呈逐年下降趋势, 与中缅边境南段的纵向监测结果^[1,9,17]相似, 但近几年当地未使用咯萘啶(仅重症疟患者使用), 其敏感性的下降可能与抗氯喹恶性疟原虫对该药有交叉抗性有关。

2003 年与 2009 年相比, 缅甸恶性疟原虫对哌喹抗性率从 91.76%下降至 7.1%, ID₅₀ 和 CMC 分别下降了 23.5%(167.5/128.2) 和 29.9%(628.1/440)。抗性率的急剧下降, 估计与 2003 年“全球基金疟疾项目”实施后, 加强了对疟患者的规范治疗, 哌喹仅出现在复方制剂中, 从而大幅减少了哌喹的使用

量有关;其复敏速度之快,可能与抗氯喹恶性疟原虫对哌喹交叉抗性较小有关,但有待进一步的研究验证。

总之,当地恶性疟原虫对咯萘啶的敏感性呈下降趋势;对氯喹的抗性率仍很高,但敏感性略有回升;对哌喹的抗性程度较低,与氯喹的交叉抗性又不明显,因此,当地可用哌喹替代氯喹治疗抗氯喹的恶性疟,但应加强对其敏感性的监测。

志谢 本项目所用的药板和经费由上海第二军医大学病原生物学教研室提供和资助;现场工作获得拉萨市无国界卫生组织和德宏州疾病预防控制中心杨捷女士的大力支持,在此一并感谢!

参 考 文 献

- [1] Yang HL, Yang PF, Dong Y, *et al.* Longitudinal surveillance of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* after cessation of medication in south Yunnan [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1994, 12(1): 31-33. (in Chinese)
(杨恒林, 杨品芳, 董莹, 等. 云南省恶性疟原虫对氯喹抗性的纵向监测 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994, 12(1): 31-33)
- [2] Che LG, Chen WC, Yang HL, *et al.* Investigation report on geographical distribution of chloroquine resistance of falciparum malaria in Yunnan [J]. Chin J Epidemiol, 1986, 7(2): 88-91. (in Chinese)
(车立刚, 陈文才, 杨恒林, 等. 云南恶性疟抗氯喹株地理分布调查报告 [J]. 中华流行病学杂志, 1986, 7(2): 88-91.)
- [3] Liu DQ, Ren DX, Liu RJ, *et al.* Preparation of the freeze-dried medium and microplate for the assessment of sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine *in vitro* microtechnique [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1983, 1(1): 44-48. (in Chinese)
(刘德全, 任道性, 刘瑞君. 抗氯喹恶性疟原虫体外微量测定用冰冻干燥培养基的制备及涂氯喹板的改进 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1983, 1(1): 44-48.)
- [4] Yang HL, Yang PF, He H, *et al.* A field study on the microdetermination method for susceptibility of *Plasmodium falciparum* to pyronaridine and artesunate [J]. Chin J Parasit Dis Control, 1989, 2(3): 169-171. (in Chinese)
(杨恒林, 杨品芳, 何慧, 等. 恶性疟原虫对咯萘啶、青蒿琥酯敏感性的现场体外测定 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1989, 2(3): 169-171.)
- [5] Liu DQ, Ren DX, Liu RJ, *et al.* A handy medium for *in vitro* assessment of sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and mefloquine in the field [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1989, 7(2): 112-114. (in Chinese)
(刘德全, 任道性, 刘瑞君, 等. 一种便于现场测定恶性疟原虫抗药性的培养基 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1989, 7(2): 112-114.)
- [6] Wang HY, Yang HL. Present status of methods of detecting drug sensitivity in an *in vitro* assay of *Plasmodium falciparum* [J]. J Pathogen Biol, 2009, 4(7): 552-555. (in Chinese)
(王恒业, 杨恒林. 恶性疟原虫药物敏感性体外测定方法研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(7): 552-555.)
- [7] Liu DQ, Feng XP, Liu RJ, *et al.* Establishment of *in vitro* microtest for determining sensitivity of *Plasmodium falciparum* to pyronaridine [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(2): 102-105. (in Chinese)
(刘德全, 冯晓平, 刘瑞君, 等. 恶性疟原虫对咯萘啶敏感性的体外微量测试方法 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(2): 102-105.)
- [8] Rieckmann KH, Sax LJ, Campbell GH, *et al.* Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* [J]. Lancet, 1978, 311(8054): 22-23.
- [9] Yang HL, Liu DQ, Huang KG, *et al.* Longitudinal surveillance of sensitivity of *Plasmodium falciparum* to pyronaridine in south Yunnan [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1998, 16(2): 81-83. (in Chinese)
(杨恒林, 刘德全, 黄开国, 等. 云南南部恶性疟原虫对咯萘啶敏感性的纵向监测 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(2): 81-83.)
- [10] Sun YH, Zhou JL, Liu H, *et al.* *In vitro* culture of naphthoquine-resistant *Plasmodium falciparum* strains in Yunnan Province [J]. J Pathogen Biol, 2010, 5(2): 124-126. (in Chinese)
(孙院红, 周家莲, 刘慧, 等. 云南省恶性疟原虫抗萘酚喹株的体外培育 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(2): 124-126)
- [11] Lin SG, Liu DQ, Zhuo KR, *et al.* Determination of sensitivity of *Plasmodium falciparum* to antimalarials in Ledong County, Hainan Province [J]. Chin Trop Med, 2005, 5(8): 1707-1708. (in Chinese)
(林世干, 刘德全, 卓开仁, 等. 海南省乐东县恶性疟原虫对抗疟药的敏感性测定 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(8): 1707-1708.)
- [12] Yang YM, Yang HL, Dong Y, *et al.* *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to seven antimalaria drugs in China-Burma border area [J]. J Pract Parasit Dis, 1994, 2(3): 23-26. (in Chinese)
(杨亚明, 杨恒林, 董莹, 等. 中缅边境地区恶性疟原虫对 7 种抗疟药敏感性的体外测定 [J]. 实用寄生虫病杂志, 1994, 2(3): 23-26.)
- [13] Yang HL, Liu DQ, Huang KG, *et al.* *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to derivatives of artemisinin, pyronaridine and chloroquine in Yunnan [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1997, 15(5): 292-296. (in Chinese)
(杨恒林, 刘德全, 黄开国, 等. 云南省恶性疟原虫对青蒿素类药物及咯萘啶与氯喹敏感性的体外测定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(5): 292-296.)
- [14] Yang HL, Liu DQ, Huang KG, *et al.* Assay of sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, amodiaquine, piperazine, mefloquine and quinine in Yunnan Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1999, 17(1): 43-45. (in Chinese)
(杨恒林, 刘德全, 黄开国, 等. 云南省恶性疟原虫对氯喹、氨酚喹、哌喹、甲氟喹、奎宁敏感性的体外测定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(1): 43-45.)
- [15] Yang HL, Li XL, Gao BH, *et al.* Surveillance of *Plasmodium falciparum* susceptibility to seven antimalarials, including artemether, in the western part of the Sino-Myanmar border area [J]. J Pathogen Biol, 2009, 4(11): 831-843. (in Chinese)
(杨恒林, 李兴亮, 高白荷, 等. 中缅边境西段恶性疟原虫对 7 种抗疟药敏感性的监测 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(11): 831-843.)
- [16] Liu DQ, Liu RJ, Zhang CY, *et al.* Present status of the sensitivity of *Plasmodium falciparum* to antimalarials in China [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1996, 14(1): 37-40. (in Chinese)
(刘德全, 刘瑞君, 张春勇, 等. 我国恶性疟原虫对抗疟药敏感性的现状 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(1): 37-40.)
- [17] Yang HL, Liu DQ, Yang YM, *et al.* Changes in susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate *in vitro* in Yunnan Province, China [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003, 97(2): 226-228.

(收稿日期: 2011-10-09 编辑: 杨频, 张争艳)