

体外微量法测定恶性疟原虫对抗疟药敏感性的影响因素

冯晓平 刘德全

【摘要】 目的 探讨体外微量法测定恶性疟原虫对抗疟药敏感性的影响因素。方法 采用现场测试用的培养基和抗疟药涂药板为材料,用实验室连续培养多年的恶性疟原虫 FCC-1/HN 株及恶性疟现症病人含虫血进行测定,观察其各种影响因素。结果 4℃保存,安瓿封装液体培养基和冰冻干燥培养基分别在 2 个月和 1 年内效果不变,超过上述时间,培养基支持疟原虫生长发育的能力将下降。氯喹板 2 年内、哌喹板 6 个月内效果稳定,咯萘啶板和青蒿琥酯板保存期超过 3 个月,效果将会变化。密封涂药板的胶带纸只可 1 次启封使用,否则会影响测定结果。制作涂药板的塑料应选择对疟原虫生长发育无影响的原材料。4℃保存的药液超过 2 wk 其浓度会发生变化。用于测定的疟原虫应为同步环状体阶段疟原虫,密度以 1 000~80 000 个/μl 血为宜,含虫血室温保存不超过 1 h,4℃保存不超过 48 h。操作技术需熟练,应严格按照操作规范进行,否则会影响测定结果的准确性。结论 涂药板、培养基、密封胶带纸、疟原虫及操作技术等均可影响体外微量法测定结果。为体外微量法所用材料及操作技术的标准化和规范化提供参考。

【关键词】 抗疟药;恶性疟原虫;体外微量法;敏感性;影响因素

中图分类号: R531.3

文献标识码: A

Factors Affecting the *In vitro* Microtest for Drug Sensitivity of *Plasmodium falciparum*

FENG Xiao-ping, LIU De-quan

(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Centre for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025)

【Abstract】 **Objective** To explore factors influencing the results of *in vitro* microtest for drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* (Pf). **Methods** Handy media, microplates predisposed with antimalarial drug, cultured Pf parasites (FCC-1/HN isolate) and blood samples from patients were used to evaluate the factors influencing the *in vitro* determination of drug sensitivity of Pf. **Results** Liquid medium and lyophilized medium stored at 4℃ for 2 months and 1 year respectively could keep their effect unchanged. The effect of the drug-coated plates was not changed within the following period of storage; plates coated with chloroquine and piperazine stored at 4℃ for 2 years and 6 months respectively; plates coated with pyronaridine and artesunate stored at 4℃ for 3 months. The adhesive paper of the sealed plate could be unsealed once only. The plastic plate must be harmless to the growing of parasites. The drug liquid should not be stored over 2 wk at 4℃, otherwise the drug concentration was changed. Parasites tested were at synchronous ring stage, with a density of 1 000~80 000/μl blood, stored at room temperature for 1 h, and at 4℃ for 48 h. Operation needed to follow strictly the standard technical procedure. **Conclusion** Drug plates, media, adhesive paper, parasites and operation technique can affect the result of *in vitro* microtest for drug sensitivity of *P. falciparum*. Standardized materials and operational procedure should be used to guarantee a reliable result of the test.

【Key words】 antimalarial drug, *Plasmodium falciparum*, *in vitro* microtest, sensitivity, factor

体外微量法测定疟原虫对抗疟药的敏感性,操作简便易行,48 h 内即可报告结果,患者不需住院,国内外已广泛采用。作者自 80 年代初用体外微量法研

究疟原虫对抗疟药的敏感性^[1-3],发现有诸多因素可影响测定结果,总结如下。

材料与方 法

1 培养基

冰冻干燥培养基:10.4 g RPMI1640 粉和 5.94 g HEPES 缓冲粉用双蒸水溶解至 960 ml,加入兔血清 100

作者单位:中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,卫生部寄生虫病学重点实验室,上海 200025

ml 混匀, 每 0.9 ml 分装于无菌 1 ml 安瓿制成冰冻干燥培养基, 火焰封口, 4 ℃ 保存备用。用时以 0.21% NaHCO₃ 0.9 ml 溶解^[4]。

液体培养基: 10.4 g RPMI1640 粉和 5.94 g HEPES 缓冲粉用双蒸水溶解至 960 ml, 加入兔血清 100 ml 和 5% NaHCO₃ 42 ml 混匀, 每 0.9 ml 分装于无菌 1 ml 安瓿, 火焰封口, 4 ℃ 保存备用。

2 涂药板

用上海第三塑料制品厂生产的 40 井塑料板。于 5 ℃~38 ℃ 配成不同浓度的抗疟药, 分别加入 2~9 井各 20 μl, 1 井和 10 井各加无药物溶剂 20 μl 作对照。采用冰冻干燥法或 38 ℃ 恒温干燥法使其干燥, 用胶纸密封板面, 封装于塑料袋中, 用紫外光灭菌, 4 ℃ 保存备用^[4,5]。另有 WHO 提供的涂药板作对照。

3 疟原虫株及红细胞

恶性疟原虫 FCC-1/HN 株, 将其含虫血用 5% 山梨醇除去滋养体和裂殖体, 取环状体用于测定。人红细胞购自上海市中心血站经复方枸橼酸钠 (ACD) 保存的“O”型血红细胞, 4 ℃ 保存, 4 wk 内使用。弃上清, 以 2~3 倍红细胞体积的培养基洗涤 1 次, 离心弃上清, 再用培养基配制成 50% (V/V) 的细胞悬液备用。

4 恶性疟现症病人含虫血

于疟疾流行高峰季节 7~10 月赴海南省或云南省现场, 选择发热、镜检确诊为单纯恶性疟、血中无性体原虫密度为 1 000~80 000 个/μl、近 2 wk 内未用过抗疟药或有抗疟作用药物的患者为观察对象。静脉取血 0.5~1.0 ml, 肝素抗凝 (30 μg/ml 血), 4 ℃ 保存备用。

5 实验方法

每批培养基和涂药板均经过实验室 FCC-1/HN 株测定确认, 再用于测定现症病人。测定时每 0.9 ml 培养基加入含虫血 0.1 ml, 混匀, 制成培养基-含虫血悬液, 涂药板各井加入 50 μl, 轻轻摇动约 10 s, 使井中药物溶解, 盖板, 用蜡烛缸法于 37 ℃~38 ℃ 温箱培养^[6]。待大多数环状体发育为裂殖体 (其核数≤3)、裂殖体尚未破裂时终止培养, 弃上清, 每井取血制厚血膜, 吉氏液染色, 镜检, 计算每 200 个无性体疟原虫中裂殖体数。对照井形成的裂殖体率>10% 为测定成功。以完全抑制裂殖体形成的药物浓度 (以下称抑制浓度), 判断疟原虫对药物的敏感性。

结 果

1 涂药板的影响

1.1 塑料板的质量 不同来源和不同批号的塑料板, 疟原虫的生长发育有不同程度的差异。4 批不同塑料板试验结果, 各井每 200 个无性体中平均含裂殖体数, 第 1、第 3 批平均为 85 个 (34~114 个), 有 1/4 板各井间疟原虫生长发育有明显差别; 第 4 批为 0~42 个, 多数板疟原虫不能生长; 第 2 批为 124 个 (123~132 个), 每块板之间及板中各井间疟原虫生长发育无明显差别, 适于制作涂药板。

1.2 密封胶纸的质量 WHO 提供的涂药板胶纸, 37 ℃~40 ℃ 分次启封使用, 对疟原虫发育无明显影响。国产胶纸有时会导致疟原虫生长发育缓慢, 甚至停止发育, 37 ℃~40 ℃ 多次启封使用, 随时间延长逐渐影响测定结果。试验结果表明, 涂药板一次性启封使用 (胶纸全部去掉), 疟原虫生长发育良好, 试验结果重现率高; 分 2 次启封使用, 形成裂殖体数将减少 11%~20%, 试验结果重现率降低 5.7%; 分 3 次启封使用, 形成裂殖体数减少 26%~34%, 试验结果重现率降低 17.6%。

1.3 涂药板的制作 用蒸馏水或无水乙醇溶解抗疟药制作的涂药板, 对疟原虫生长发育均无影响。只溶于碱性或酸性溶剂或需用特殊溶剂溶解的抗疟药, 必须先将溶剂浓度调至适当, 不影响疟原虫生长发育, 否则抑制浓度将会降低。配制的药液应及时用于制作涂药板, 4 ℃ 保存时间不宜过长。如哌喹、青蒿琥酯药液, 4 ℃ 保存 2 wk 后浓度已发生变化, 而氯喹 4 ℃ 保存 1 年浓度仍稳定。咯萘啶及青蒿琥酯涂药板必须在低于 30 ℃ 环境中制作、用冰冻干燥法干燥, 否则可使抑制浓度偏高。

1.4 保存时间 4 ℃ 保存, 随保存时间的延长, 抑制浓度将发生变化, 使测定结果重现率下降 (表 1)。

2 培养基的影响

2.1 RPMI1640 粉与 HEPES 缓冲粉制成溶液及加入血清和 NaHCO₃ 后, 立即制作供现场使用的冰冻干燥培养基或安瓿封装的液体培养基, 形成的裂殖体率分别为 75.3% 和 77.5%; 密封 4 ℃ 保存 1 wk 后制作, 则分别为 67.1% 和 63.4%, 培养基支持疟原虫生长发育的能力约降低 10%~20%; 室温 (25 ℃~35 ℃) 保存 24 h 后制作, 分别为 61.0% 和 54.6%, 支持疟原虫生长发育的能力约降低 30%。

2.2 随着贮存时间的延长, 冰冻干燥培养基和安瓿封装的液体培养基的效果将逐渐降低, 形成裂殖体数量

减少, 测定成功率和测定结果重现率均降低 (表 2)。 2.3 冰冻干燥培养基溶解后或安瓿封装的液体培养

表 1 4 ℃ 保存不同时间 4 种涂药板测定结果的重现率 (%)
Table 1 Effect of storage duration under 4 ℃ of the microplates on the test results (%)

保存时间(月) Duration of storage (month)	氯喹板 Chloroquine plate	咯萘啶板 Pyronaridine plate	青蒿琥酯板 Artesunate plate	哌喹板 Piperaquine plate
≤1	100	100	100	100
3	100	100	100	100
6	100	97.8	97.4	100
9	100	90.6	76.9	98.6
12	100	51.7	23.2	57.7
24	100	—	—	16.4
36	98.8	—	—	—

表 2 4 ℃ 保存不同时间的培养基的测定结果 (%)
Table 2 Effect of storage duration of media on the test result (%)

保存时间(月) Duration of storage (month)	裂殖体率 Rate of schizonts		测定成功率 Success rate of test		测定结果重现率 Reproductivity of the rest results	
	冻干培养基 Lyophilized medium	液体培养基 Liquid medium	冻干培养基 Lyophilized medium	液体培养基 Liquid medium	冻干培养基 Lyophilized medium	液体培养基 Liquid medium
0	75.3	77.7	100	100	100	100
2	65.2	74.2	100	100	100	100
3	74.4	70.1	100	94.2	100	97.8
4	74.1	71.3	100	85.9	100	97.2
5	75.8	60.8	100	71.2	100	91.4
12	72.5	—	98.7	—	100	—
24	64.4	—	96.4	—	97.7	—
36	54.3	—	89.6	—	88.4	—

基启封后, 30 min 内使用, 疟原虫生长发育良好, 试验结果稳定。30~60 min 内使用, 疟原虫生长发育缓慢, 形成裂殖体数量减少 10%~40%, 相同时间内形成的裂殖体细胞核减少 2~3 个, 抑制浓度降低 1 个剂量。超过 1 h, 80% 疟原虫停止生长发育。

3 疟原虫的影响

3.1 被测定的疟原虫需在近 2 wk 内未受到抗疟药的作用, 否则测定结果抑制浓度将偏低。

3.2 疟原虫密度为 1 000~80 000 个/μl 血时测定结果稳定, 少于 1 000 个/μl 血时测定的抑制浓度偏低; 高于 80 000 个/μl 血则抑制浓度偏高, 或疟原虫不能发育至裂殖体, 使测定失败。

3.3 用同步环状体阶段的疟原虫测定效果较好, 以中、大环状体为主时, 培养时间仅需 20~30 h, 测定成功率高。以小环状体为主时, 则培养时间较长, 甚至超过 48 h, 有时疟原虫不能发育至裂殖体而使测定失败。被测疟原虫同步性较差, 中、大环状体低于 30% 或混有少量滋养体, 或配子体密度较高, 不仅会造成测定失败率高, 而且测定的抑制浓度会偏高。

3.4 取得患者含虫血样应立即测定, 室温下超过 1 h 可影响疟原虫生长发育; 超过 4 h, 将有 70% 以上疟原虫不能生长发育。室温越高, 影响越大。4 ℃ 保存时间越长, 测定成功率越低, 抑制浓度偏低, 导致测定结果重现率下降, 超过 72 h 血样, 不能用于测定 (表 3)。

4 操作技术的影响

4.1 涂药板每井必须准确加入测定样品 50 μl, 加样不准确, 各井间形成的裂殖体数将无规律, 测定结果不准确。

4.2 含虫血与培养基混合后, 应在 1 h 内加入涂药板各井, 进入蜡烛缸培养。超过 1 h 会影响疟原虫的生长发育, 测定结果抑制浓度会偏低。

4.3 疟原虫培养期间, 蜡烛缸必须密封, 开启次数最多不超过 3 次, 每次开启时间应尽量缩短, 否则会影响疟原虫的生长发育。

4.4 各井的含虫血分别制作血膜, 选择有代表性的视野、计数核数 ≥ 3 个的裂殖体数, 标准应统一。

表 3 不同温度下保存的恶性疟原虫对药物敏感性测定结果(%)
Table 3 Growth of *P. falciparum* under different temperatures(%)

保存时间 (h) Duration of storage (h)	室温 (25℃~35℃) Room temperature(25℃~35℃)			4℃		
	裂殖体率 Rate of schizonts	测定成功率 Success rate of test	测定结果重现率 Reproductivity of the test results	裂殖体率 Rate of schizonts	测定成功率 Success rate of test	测定结果重现率 Reproductivity of the test results
0	67.6	100	100	67.6	100	100
1	64.3	100	100	—	—	—
2	34.1	87.2	92.8	—	—	—
4	28.1	20.0	—	61.8	100	100
24	—	—	—	62.4	91.9	100
48	—	—	—	60.4	86.8	96.4
72	—	—	—	22.3	10.0	—

讨 论

体外微量法操作过程中诸多因素可影响测定结果的准确性。黄家章等^[7]在体外培养条件下对红细胞浓度、起始疟原虫感染率和培养时间等因素进行了比较观察,当红细胞浓度高于 10%、起始疟原虫感染率高于 2% 时,2.5×10³ mol/L 氯喹不能杀灭全部疟原虫。认为红细胞浓度和起始疟原虫感染率分别为 2.5% 和 1% 较合适^[7]。刘德全等在现场比较观察各种影响因素^[5],结果表明,培养基、涂药板、疟原虫及操作技术等均可影响测定结果的准确性。认为体外微量法使用的培养基和涂药板均应标准化,4℃ 保存、安瓿封装的液体培养基应在 2 个月内使用,冰冻干燥培养基在 1 年内使用。用于制作涂药板的塑料板和密封胶纸,应预先测定证明对疟原虫生长发育确无影响方可选用。应严格控制涂药板的使用时间,4℃ 保存的氯喹板可用 2 年,哌喹板可用 6 个月,咯萘啶板和青蒿琥酯板应在 3 个月内使用。现场检测前先用含虫血预测确认

有效。此外,工作人员熟练掌握操作技术,被测定的恶性疟原虫以大、中环状体为主 (≥50%),蜡烛缸培养时间控制在 30 h 以内等均重要。本文观察结果,可为体外微量法的标准化提供参考。

参 考 文 献

- [1] 任道性,刘德全,刘瑞君,等. 试用体外微量法测定海南岛恶性疟原虫对氯喹的敏感性[J]. 微生物学报, 1981, 21: 510-512.
- [2] 刘德全,任道性,刘瑞君,等. 我国恶性疟原虫对氯喹敏感性的初步调查结果[J]. 中华内科杂志, 1982, 21: 643-645.
- [3] 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: 37-41.
- [4] 刘德全,任道性,刘瑞君. 抗氯喹恶性疟原虫体外微量法测定用冰冻干燥培养基的制备及涂药板的改进[J]. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1983, 1: 44-48.
- [5] 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: 112-113.
- [6] Jensen JB, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture, Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method[J]. J Parasitol, 1977, 63: 883-885.
- [7] 黄家章,王京燕,高徐生,等. 影响体外测定恶性疟原虫对氯喹敏感性的某些因素[J]. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1985, 3: 95-97.

(收稿日期: 2003-03-31 编辑: 富秀兰)

【消息】

2003 年环境与职业医学国际学术研讨会征文通知

根据去年召开的环境与职业医学中美学术研讨会参会学者的广泛要求和本刊常务编委会的同意,决定今年 11 月继续由《环境与职业医学》杂志编辑委员会主办,上海市疾病预防控制中心、上海市预防医学会、复旦大学公共卫生学院协办,在上海市召开“2003 年环境与职业医学国际学术研讨会”。会期 3 天: 11 月 19 日报到, 11 月 20~22 日为正式会期。届时将邀请多名中外专家到会作专题报告。会议主题为“环境·生态·职业与健康城市”。欢迎与会学者就“环境与职业医学”所涉及各领域专题作论文或口头交流。会上交流的论文,将由《环境与职业医学》杂志择优发表。

会议地点及议程待第 2 轮通知。不尽事宜请与《环境与职业医学》杂志编辑部联系。

联系人: 洪琪, 忻霞萍; 电话: 0086-021-56636600-137、138、140;

地址: 上海市闸北区中兴路 1105 号, 邮编: 200070

E-mail: ldyxzz@online.sh.cn 或 zazhi2@.scdc.sh.cn 传真: 0086-021-56970644 (或 62957458)

自通知日起,《环境与职业医学》杂志编辑部即接受海内外学者参会报名。大会征文截止时间: 10 月 25 日(征文著录格式参照本刊“稿约”)。非特邀代表参会费 680 元(含报名费、会务费、资料费)。参会者可获 I 类学分 5 分。论文交流者可申领论文证书。

《环境与职业医学》杂志编辑委员会 2003 年 7 月 30 日