

江苏省1954—1956年分离出痢疾桿菌 1005株对磺胺剂、鏈霉素、氯霉素的敏感試驗*

报告二 影响敏感試驗的若干因素

金錦仁 周璠璽 邵有貴

(南京医学院微生物学教研組)

江苏省1954—1956年各地分离出痢疾桿菌1005株对磺胺剂、鏈霉素和氯霉素三种药品的敏感試驗結果分析已报告于前文。茲将有关敏感試驗影响因素的一些实验观察报告如下,以供实验室工作者的参考。

材料与方 法

菌种、药品、接种、孵育和結果判讀同于前文,不贅述。

培养基用于鏈霉素和氯霉素敏感試驗均为普通肉湯。磺胺剂敏感試驗用三种培养基:无蛋白胰肉湯^[1],酪蛋白水解物半綜合培养基^[2,3]和綜合培养基^[4], pH 均为7.4左右。其成分如下:

半綜合培养基 ^[2,3] :	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5 gm
	KH_2PO_4	0.35gm
	NaCl	5.0 gm
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 gm
	葡萄糖	2.0 gm
	酪蛋白水解物 Casein hydrolysate (Squibb)	2.0 gm
	尼可丁酸 Nicotinic acid	10 mg
	維生素乙 ₁	10 mg
	蒸餾水	1000 ml
綜合培养基:	K_2HPO_4	1.0 gm
	NaCl	2.5 gm
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05gm
	葡萄糖	2.0 gm
	天門冬酸 L-asparagic acid	1.0 gm
	谷氨酸 L-glutamic acid	1.0 gm
	尼可丁酸 Nicotinic acid	10 mg
	蒸餾水	1000 ml

敏感試驗中培养基含药量如下:磺胺噻唑为每毫升0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000r。鏈霉素和氯霉素均为每毫升0.5、1、2、3、4、6、8、12、16、20、25r。

試驗和結果观察

1. 鏈霉素的保存 鏈霉素干燥粉末非常稳定,室温保存可达数年不致影响其效价。

* 1958年1月13日收到。

溶液則不甚稳定。本实验是利用菌种干燥仪器,制备 50 毫克分装的鏈霉素干燥安瓿,保存于普通冰箱备用。本报告实验中所用的鏈霉素均为同一批制成的安瓿。干燥安瓿制成后即刻、4 个月后、10 个月及一年半后各打开一个安瓿,用 2 株痢菌滴定其效价,証明其抑菌效价没有变化。

2. 无蛋白胰肉湯(以下簡称无胰肉湯)酪蛋白水解物半綜合培养基(以下簡称半綜合培养基)和綜合培养基用于磺胺剂敏感試驗的比較 痢菌 8 株用三种培养基測定磺胺噻唑的抑菌敏度,結果見表 1,无胰肉湯測得的敏度最低,綜合培养基最高,半綜合培养基介乎其中。

表 1 三种培养基磺胺剂抑菌敏度的比較(表中数字 r/ml)

菌株号	培养基	无 胰 肉 湯	半 綜 合 培 基	綜 合 培 基	普 通 肉 湯*
475		1	0.5	0.2	>1000
478		2	1	0.2	>1000
440		5	1	0.2	>1000
441		50	20	5	>1000
442		200	50	10	>1000
443		>1000	>1000	>1000	>1000
477		>1000	>1000	>1000	>1000
480		>1000	>1000	>1000	>1000

* 普通肉湯成分之一蛋白胰为日本貨 polypeptone

痢菌 200 株(其中大約半数为敏感株,半数为抗药株)以三种培养基,三个含药浓度 1000r/ml、100r/ml、10r/ml 作磺胺敏感試驗,結果見表 2。无胰肉湯与半綜合培养基的結果基本上相近似,綜合培养基中磺胺剂抑菌作用較前二者为强。

表 2 痢菌 200 株,三种培养基作磺胺剂敏感試驗的結果比較

培养基	磺胺剂浓度			株 数
	1000r/ml	100r/ml	10r/ml	
无 胰 肉 湯	+	+	+	100
	-	+	+	0
	-	-	+	6
	-	-	-	94
半 綜 合 培 基	+	+	+	98
	-	+	+	2
	-	-	+	4
	-	-	-	96
綜 合 培 基	+	+	+	67
	-	+	+	32
	-	-	+	0
	-	-	-	101

表中符号 + 表示生长, - 表示生长抑制

3. 八批无胰肉湯的滴定 每批无胰肉湯以磺胺剂敏感菌 2 株与抗药菌 2 株滴定,八批中六批磺胺剂抑菌价一致,两批因磺胺剂对抗物含量过多,影响药物敏感試驗結果,放弃未用。滴定結果见表 3。

表 3 八批无胰肉湯磺胺剂敏感度的比較 (表中数字 r/ml)

无胰肉湯批号 \ 菌株号 \ 敏 度	475	478	443	480	备 註
1	1	2	>1000	>1000	放棄未用
2	2	1	>1000	>1000	
3	50	50	>1000	>1000	
4	2	5	>1000	>1000	
5	2	2	>1000	>1000	
6	1	2	>1000	>1000	放棄未用
7	100	100	>1000	>1000	
8	2	2	>1000	>1000	

4. 含药培养基室温($20^{\circ}\pm 5^{\circ}C$)中放置时间与敏感度的关系 含磺胺剂的半綜合培养基管(浓度 $0.2-1000r/ml$),含鏈霉素或氯霉素的肉湯試管(浓度 $0.5-25r/ml$)新鮮配制分装之当天、第 3 天和第 6 天各用 6 株痢菌測定敏感度,結果一致說明磺胺剂、鏈霉素和氯霉素稀释于培养基中后,室温放置一周,抑菌效力相当稳定,并无損失。

5. 几种磺胺剂抑菌效价的比較 选择四种最常用的磺胺剂: sulfanilamide、sulfaguanidine、sulfadiazine 和 sulfathiazole 的粉末溶用半綜合培养基,以 8 株痢菌試驗,結果如表 4 所示 sulfanilamide 与 sulfaguanidine 近似, sulfadiazine 与 sulfathiazole 近似。前二者抑菌效力低于后二者数十倍。

表 4 四种磺胺剂抑菌效价的比較 (表中数字 r/ml)

菌株号 \ 药品 \ 抑菌价	sulfanilamide	sulfaguanidine	sulfadiazine	sulfathiazole
440	100	50	1	1
475	100	100	2	1
478	200	100	2	1
441	500	500	20	20
442	1000	500	50	50
443	>1000	>1000	>1000	>1000
477	>1000	>1000	>1000	>1000
480	>1000	>1000	>1000	>1000

6. 菌龄与敏感度的关系 痢菌 6 株的 8 小时, 12 小时, 24 小时肉湯培养物, 搖勻之, 以无菌肉湯矫正到混浊度一致, 然后稀释接种, 以半綜合培养基試驗磺胺剂的敏感度, 以肉湯試驗鏈霉素和氯霉素的敏感度, 实验結果: 接种物菌龄在 8—24 小时之間, 对药物的敏感度, 并无差別。

7. 接种量, 孵育时间与敏感度的关系 痢菌 6 株的 18 小时肉湯培养物, 以无菌盐水稀

释为 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 。稀释菌液0.1毫升接种于含药培养基2毫升中。磺胺剂敏度用半綜合培养基試驗,鏈霉素和氯霉素敏度用肉湯試驗。37℃ 孵育12小时、24小时、48小时、96小时各观察結果。藥物敏度随接种量及孵育時間而异,見表5。接种量与孵育時間对敏度讀数的影响,磺胺剂远較鏈霉素和氯霉素为显著。且磺胺剂敏感試驗中,如接种量大到 10^{-2} 、0.1毫升即不能判讀結果。

表5 痢菌接种量、孵育時間和藥物敏度的关系

菌株号	接 种 量	磺 胺 噻 唑				鏈 霉 素				氯 霉 素			
		敏 度				敏 度				敏 度			
		12时	24时	48时	96时	12时	24时	48时	96时	12时	24时	48时	96时
440	10^{-2}	>1000	>1000	>1000	>1000	12	12	12	12	2	2	3	4
	10^{-4}	0.5	1	2	5	6	8	8	8	2	2	2	2
	10^{-6}	0.2	0.2	0.5	2	4	4	6	6	2	2	2	2
175	10^{-2}	>1000	>1000	>1000	>1000	16	16	16	16	6	8	10	10
	10^{-4}	0.5	1	10	20	4	8	8	8	3	4	6	8
	10^{-6}	0.2	1	5	10	4	4	4	4	3	4	6	6
478	10^{-2}	>1000	>1000	>1000	>1000	20	20	20	20	6	10	10	12
	10^{-4}	1	1	5	20	4	8	12	12	3	6	6	8
	10^{-6}	0.2	1	5	10	2	4	6	6	3	4	6	6
441	10^{-2}	>1000	>1000	>1000	>1000	16	16	16	16	6	8	10	12
	10^{-4}	5	50	50	200	4	8	12	12	3	6	8	8
	10^{-6}	5	20	50	50	2	4	4	4	3	6	6	8
442	10^{-2}	>1000	>1000	>1000	>1000	8	12	12	12	2	2	2	3
	10^{-4}	20	100	500	500	4	4	6	6	1	2	2	2
	10^{-6}	10	50	200	200	4	4	4	4	0.5	1	2	2
443	10^{-2}	>1000	>1000	>1000	>1000	12	12	12	12	3	3	3	3
	10^{-4}	>1000	>1000	>1000	>1000	4	6	6	6	1	2	2	2
	10^{-6}	>1000	>1000	>1000	>1000	4	4	6	6	1	1	2	2

8. 相同操作下敏度的差异 含磺胺噻唑5、10、15、20、30、40、50、75、100、150、200r/ml的半綜合培养基管20套,含鏈霉素或氯霉素2、3、4、6、8、12、16r/ml的肉湯管各20套均为同一批配制分装。以痢菌一株的肉湯培养物用无菌盐水稀释为 10^{-4} ,用此同一批稀释的菌液接种三种藥物敏感試驗的試管各20套,即相同条件下重复20次,孵育12、18、24、48、96小时各观察此重复20次的敏度讀数有无异同,并記錄相同讀数的次数,如表7所示,在完全相同的操作条件下,重复20次,敏度讀数在一定程度的范围内是有差异的。

痢菌1株18小时肉湯培养物 10^{-4} 和 10^{-6} 的稀释菌液5毫升接种于含磺胺噻唑鈉盐20r/ml的半綜合培养基100毫升中,同量接种于含鏈霉素10r/ml和氯霉素5r/ml的肉湯100毫升中,搖匀后分装于50个試管中,每管2毫升。孵育12、18、24、48、96、168小时观察生长的管数。

如表7所示,相同的含药培养基50管,接种同量的細菌,經孵育后,各管的生长情况

并不完全一致,在一定范围内是有参差的。这种波动(Fluctuation)似与获得性抗药性的产生有关。

表 6 痢菌一株,在相同条件下,敏感試驗重复 20 次,孵育后经过不同时间,观察敏度的差异

<div><div>藥 物</div><div>敏 度</div></div>		磺 胺 噻 唑 (r/ml)										鏈 霉 素 (r/ml)						氯 霉 素 (r/ml)					
		10	15	20	30	40	50	75	100	150	3	4	6	8	12	16	2	3	4	6	8	12	
孵育时 次 数	12 小 时		16	4								15	5					11	9				
	18 小 时		14	6								10	10					2	18				
	24 小 时			12	8							4	13	3					16	4			
	48 小 时				2	14	4						9	9	2					18	2		
	96 小 时						14	5	1				4	12	4					15	5		

表 7 完全相同条件下痢菌(株号441)接种磺胺噻唑 20r/ml、鏈霉素 10r/ml、氯霉素 5r/ml 含药培养基各 50 管,經孵育后,生长管数的推移

含药培养基	孵育时		12 时	18 时	24 时	48 时	4 天	7 天
	接种量	管 数						
磺胺噻唑 20r/ml	10 ⁻⁴ , 0.1 ml	12	29	32	50	50	50	
	10 ⁻⁶ , 0.1 ml	0	3	5	12	36	50	
链霉素 10r/ml	10 ⁻⁴ , 0.1 ml	0	14	26	36	37	38	
	10 ⁻⁶ , 0.1 ml	0	1	1	1	1	2	
氯霉素 5r/ml	10 ⁻⁴ , 0.1 ml	0	0	4	7	24	40	
	10 ⁻⁶ , 0.1 ml	0	0	0	1	4	5	

討 論

細菌的藥物敏感試驗中,好多因素影响其結果讀数,如藥物的保存,培养基的成分,接种菌量和孵育時間等。茲分別討論如下:

1. 关于藥品原液的保存 有些化学疗剂溶液状态非常稳定,如磺胺剂、氯霉素等。有些化学疗剂溶液状态較不稳定,如金霉素、青霉素、鏈霉素等。如欲长期备用,放置于低温冰箱(-20℃以下),可以保持抑菌效价不变达数月之久。本报告中試用鏈霉素干燥安瓿分装,經长期保存,效价稳定,又很經濟。笔者推测,其他抗生素原液的保存,也可用此方法。在沒有底温冰箱的实验室,干燥安瓿分装法可以解决某些不稳定抗生素原液的保存問題。

2. 磺胺剂細菌敏感試驗中药物的选择 国内最常用的磺胺剂 SA、SG、SD 及 ST 四种藥物对痢菌的抑菌效价作了比較,其結果与前人的实验观察^[5-7]相符合。可以用 S.T. 作为代表,而且其溶解度較高。

3. 磺胺剂敏感試驗与培养基成分 磺胺剂敏感試驗与培养基成分的关系极密切。一般言之,各种培养基中存在的磺胺剂对抗物质含量相差甚远。蛋白胨中均含有磺胺剂对抗物质,其中最主要者为对氨基安息香酸。各批蛋白胨成品中,磺胺剂对抗物质含量頗不一

致^[8,9]。Jewell 氏^[10]曾試用七种蛋白胨成品比較,其中五种成品磺胺剂对抗物質含量很高,另二种成品磺胺剂对抗物質含量很低,可用于磺胺剂敏感試驗。氏更发现如用該二种蛋白胨作基础培养基,再加入 0.5% 裂解的馬血球則磺胺剂对抗物質的作用完全消失。关于溶解的馬血球能抑制磺胺剂对抗物質之作用,Harper 和 Cawston 二氏^[11]曾报告过,但实际应用价值到目前为止尚无定論。MacLeod 氏^[12]用活性炭吸收过的肉湯作磺胺剂敏感試驗培养基,以减少磺胺剂对抗物質的含量。陈鴻珊氏^[11]用无朊肉湯作磺胺剂敏感試驗培养基,結果尚称滿意。Rantz 氏^[13]报告酪蛋白水解物很少含有磺胺剂对抗物質,以之配制半綜合培养基应用于磺胺剂敏感試驗十分滿意。Wolf^[14]及 Bernheimer^[15]有类似的报告。本实验的結果与前人报告相符。近年綜合培养基应用于腸道細菌日广,如 Геккер^[16]应用于痢疾和伤寒菌苗制造。桥本博^[5]和 Davis^[17]諸氏以綜合培养基用于痢菌磺胺剂敏感試驗。半綜合培养基与綜合培养基由于不含或少含磺胺剂对抗物質且各批成分一致,用于痢菌磺胺剂敏感試驗,显然优于无朊肉湯,活性炭吸收过的肉湯和裂解馬血球蛋白胨水。本实验中八批无朊肉湯,均經滴定,其中有二批因磺胺剂对抗物質含量过多,放弃未用。其原因未加分析研究。MacLeod^[18]氏报告动物組織自溶或腐敗过程中能产生大量磺胺剂对抗物質。笔者推測二批无朊肉湯磺胺剂对抗物質含量过多,可能与牛肉不新鮮腐敗有关。

4. 关于敏感試驗終点的判讀 一般均以孵育后液体培养基的清浊为終点判讀的標誌。本实验中在鏈霉素和氯霉素試驗中未遇困难,在磺胺剂敏感試驗中,如葯物浓度間隔接近,則可能遇到在清澄管与混浊管之間,連續几管有极輕微的混浊。这种情况下,判讀比較困难,笔者以一固定的比浊管(浊度大約为 0.5 亿/毫升)作为标准,浊度高于此者判讀为生长,低于此者为生长抑制。

总之,細菌对葯物的敏感試驗如象其他生物学定量試驗一样,其結果与讀数被許多因素影响着,磺胺剂敏感試驗較抗生素敏感試驗需要更加严格控制操作条件,否則,其讀数几乎没有意义。

总 結

1. 痢疾桿菌共 1005 株对磺胺剂、鏈霉素、氯霉素三种葯物敏感試驗进行之同时,将影响葯物敏度的若干因素——葯品保存,培养基种类,接种菌量和孵育時間等作了某些实验观察。

2. 鏈霉素分装于干燥安瓿备用,經 1 年半,效价一致,經濟方便。

3. 磺胺剂敏感試驗三种培养基比較,綜合培养基最敏感,半綜合培养基次之,无朊肉湯最不敏感。

4. 无朊肉湯八批中有二批因磺胺剂对抗物含量过高未能使用,其原因曾予討論。

5. 接种物菌龄(8—24 小时之間),培养基 pH(7.0—7.8 之間),含葯培养基配制后放置(室溫中一周內),以上諸因素在一定範圍內不致影响痢菌对磺胺剂、鏈霉素、氯霉素的敏度讀数。

6. 葯物敏感試驗中,接种菌量和孵育時間对敏度終点判讀影响甚大,磺胺剂最显著。

7. 在完全相同操作条件下,痢菌对磺胺剂、鏈霉素及氯霉素的敏度讀数,在一定範圍內有某些差异。

参 考 文 献

- [1] 陈鸿珊: 微生物学报, 3 (2): 151—158, 1955.
- [2] 鈴木文雄: 日本传染病学会雑誌 29 (10): 493—506, 1956.
- [3] 桥本博: 日本传染病学会雑誌 28 (9): 516—524, 1954.
- [4] 松井清治: 日本细菌学雑誌 10 (9): 761, 1955.
- [5] White, H. J.: *J. Pharmacol & Exp. Therap.* 74: 104—118, 1941.
- [6] Wyss, O.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 618, 1942.
- [7] Schweinburg, F. B.: *J. Lab. Clin Med.* 34: 1457—1461, 1949.
- [8] Cooper, M. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 50: 148, 1942.
- [9] Rantz, L. A. & Kirby, W. M. M.: *J. Immunol.* 48: 29—36, 1944.
- [10] Jewell, P.: *J. Chin. Path.* 7: 308—314, 1954.
- [11] Lawrence, J. S. & Francis, J.: *Sulfonamides and antibiotics* 2nd. Ed. 1953, Lewis, London. pp. 415—416.
- [12] MacLeod, C. M. & Mirick, G. S.: *J. Bacteriol.* 44, 3, 1942.
- [13] Rantz, L. A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 137, 1942.
- [14] Wolf, P. A.: *J. Bacteriol.* 49 (5): 463, 1945.
- [15] Bernheimer, A. W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 61: 315, 1946.
- [16] Геккер, Б. Д.: 生物制品通讯, 1 (4): 589—597, 1956.
- [17] Davis, J. R.: *Monthly Bull. Ministry of Health and Pub. Health Lab. Service* 13: 114—117, 1954.
- [18] MacLeod, C. M.: *J. Exp. Med.* 72: 217—232, 1940.

SENSITIVITY TO SULFATHIAZOL, STREPTOMYCIN AND TO CHLORAMPHENICOL OF 1005 STRAINS OF DYSENTERY BACILLI

II. FACTORS INFLUENZING THE SENSITIVITY TEST

KING KIN-ZEN, CHOW YOU-SHI AND ZAO YU-GEI

(Department of Bacteriology, Nanking Medical College)

Factors influencing the sensitivity test of dysentery bacilli to sulfathiazol, streptomycin and to chloramphenicol have been studied in experiments reported in this paper. One lot of stock solution of streptomycin was dispensed in ampoules, each containing 50 mg of the drug in 0.5 ml, dried by cryochrome process, sealed, and stored in refrigerator. It was found to remain potent during the observed period of one and a half years. It is suggested that other antibiotics used in sensitivity tests could also be kept in similar condition.

In sulfathiazol sensitivity test, results in 3 kinds of culture media, namely, broth without addition of peptone, casein hydrolysate semi-synthetic medium, and synthetic medium, were compared. It was found that the latter was the most sensitive. Besides, the content of sulfathiazol autagnostic material in 8 lots of broth without peptone was tested. In two, sufficient antagnostic material was present to render them unsuitable for sensitivity test.

Other factors studied were: range of pH (between 7.0—7.8) of the media, the storage of the media containing drugs in room temperature up to 7 days, and the age of culture inoculum (from 8—24 hours). It was found within these limits, no significant influence on sensitivity test of these three drugs were found. However, the size of inoculum of the culture and the incubation period influenced the sensitivity test to sulfathiazol to a very great extent, and to a much lesser extent to streptomycin and to chloramphenicol.

Under completely identical conditions, repetition of the sensitivity test with the same strains of dysentery bacilli revealed some variation in the end points. It was suggested that these fluctuations were related to the development of certain number of the organisms of acquired resistance to the test drugs.