

若干种化学疗剂对于钩端螺旋体的 試管内抗菌作用

陈仁溥 趙家毓 許月如

(重庆医学院微生物学教研室, 重庆)

钩端螺旋体病近年来在我国各地流行相当广泛。在本病的治疗方面,目前尚存在不少问题。对于同一种药物的疗效,有不同甚至完全相反的評價,在金霉素^[1-3]、青霉素^[4-10]等药物中都有这种情况存在。为了提出我們自己的資料和看法,作为临床治疗的参考,我們进行了各种化学疗剂对钩端螺旋体的試管内抗菌作用試驗,証明了若干种药物的有效作用,并对其作用机制作了初步探討。

一、試驗方法与結果

(一) 7种药物抗菌作用的初步观察

1. 药物配制 所試药物为:青霉素、金霉素、氯霉素、鏈霉素、黃連素(小藥碱)、磺胺嘧啶、以及二氯苯砷*共7种。各药先以无菌蒸餾水适当稀释,再用不加血清之柯氏(Korthof)培养基基础液稀释至每毫升含药200微克或单位(磺胺嘧啶为2000微克/毫升),調整pH为7.2—7.4,然后再用柯氏培养基基础液进一步加以稀释,其最后浓度为200—0.4微克(或单位)/毫升(磺胺嘧啶浓度大10倍)。青霉素、鏈霉素、二氯苯砷3药系以无菌技术配制,毋需灭菌;氯霉素与磺胺嘧啶煮沸半小时灭菌,金霉素与黃連素則以玻璃过滤器过滤除菌。

2. 菌种 共用4株钩端螺旋体菌种:国际标准菌种出血性黄疸型与狗型各1株,由成都生物制品研究所供給;59-4号与59-8号各1株,均系在重庆由病人体内分离所得之强毒菌株,經鉴定属出血性黄疸型。4株菌种均在柯氏培养基中于28°—30℃培养7天,发育良好,运动活泼,无自凝現象。

3. 試驗方法 将各种稀释的药液0.1毫升置試管中,分別加入菌液0.1毫升,混合均匀,如此則药物浓度又被稀释1倍,最后浓度除磺胺嘧啶較其他药物大10倍外,均为100—0.2微克(或单位)/毫升。此外,另以菌液0.1毫升加入柯氏培养基基础液0.1毫升,

* 所用各药牌号規格如下:

1. 鉀盐青霉素 G, 上海科发药厂出品, 20万单位瓶装。
2. 鏈霉素硫酸盐, 华北制药厂出品, 1克瓶装。
3. 氯霉素, 上海通用药厂出品, 0.25克胶囊。
4. 金霉素, 重庆制药厂出品, 0.25克胶囊。
5. 重硫酸小藥碱(Berberine Bisulfate), 英国 BDH 药厂出品。
6. 磺胺嘧啶鈉盐, 牌号不明。
7. 盐酸二氯苯砷(Dichlorophenarsine Hydrochloride), 上海楊氏药厂出品, 0.068克安瓿。

本文1962年5月29日收到。

作为对照。各管置 28°—30℃ 孵育，經 24—30 小时后，由每管中取出 1 鉑环的混合液，在暗視野显微镜下检查，共检视 100 个螺旋体，记录其中不活动的螺旋体数目，以螺旋体的制动率作为判断葯物作用強弱的指标。

4. 結果 4 株钩端螺旋体对于各种葯物之敏感度差別不大。以标准菌种出血性黄疸型为代表，将其結果列如表 1。

表 1 7 种葯物对出血性黄疸型钩端螺旋体(标准菌种)的抗菌作用

葯物 \ 浓度(微克单位/毫升) \ 制动率(%)	100	50	25	12.5	6.2	3.1	1.6	0.8	0.4	0.2	对 照
二 氯 苯 砷	100*	100*	100*	100	96	98	90	87	85	30	5
黄 連 素	100*	100*	100	100	92	12	26	10	4	—	4
金 霉 素	98*	98*	62	4	2	—	—	—	—	—	4
青 霉 素	38	22	6	—	—	—	—	—	—	—	5
鏈 霉 素	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
氯 霉 素	8	10	—	—	—	—	—	—	—	—	4
磺 胺 嘧 啶 [△]	4	2	—	—	—	—	—	—	—	—	4

注：* 視野中菌数显著減少，有散在的顆粒状碎片，殘存的螺旋体結構疏松。

[△] 磺胺嘧啶之浓度較表上所列者大 10 倍。

“—” 未检查。

由表 1 可以看出，鏈霉素、氯霉素、磺胺嘧啶 3 种葯物在所試驗的浓度之下对钩端螺旋体均无抗菌作用。青霉素对于 4 株钩端螺旋体在高浓度时作用十分微弱。这一試驗曾重复 3 次，并換用各种牌号的青霉素制剂，結果大致相同。

金霉素、黄连素及二氯苯砷三葯則有相当显著的抗菌作用。高浓度时螺旋体全部失去动力而呈僵直，在若干标本中并可看到菌数明显減少，視野中有散在的顆粒状物，似为螺旋体溶解以后所殘留的碎片。少数未被溶解的螺旋体結構亦十分疏松，似将断裂。葯物浓度較低时，虽无如此明显表現，但也有不同程度的影响。

(二) 三种有效葯物抗菌作用过程的連續观察

考虑到在葯物有溶菌作用的情况之下，单纯用制动率不足以完全代表葯物的抗菌作用，还必须同时将由于溶菌作用所致的菌数減少一并計算在內，故对这 3 种葯物的抗菌效力与抗菌过程，进行了复查和較詳細的連續观察。由于四株螺旋体的敏感度大致相近，故仅选用标准菌种出血性黄疸型进行試驗。

将葯物配成 200 微克/毫升，取 0.2 毫升加入菌液 0.2 毫升，28°—30℃ 孵育。經不同時間后用一直径为 4 毫米之鉑环，滿沾一环混合液，置玻片上，加盖一块 18 × 18 毫米之盖玻片，輕压之，使菌液布滿整个盖玻片下，用放大 600 倍之高倍鏡在暗視野映光下检查每个視野中的菌数，并记录其制动率与活动率，按下列公式計算該葯之杀菌率：

杀菌率 = 1 - $\frac{\text{試驗組每視野平均菌数} \times \text{活动率}\%}{\text{对照組每視野平均菌数} \times \text{活动率}\%}$

上式中分母为对照組存活菌数，分子为試驗組存活菌数，其比值代表試驗組中的存活率，而 1 減去存活率即为死亡率，亦即該葯之杀菌率。例如黄连素 10 分钟时每視野菌数为 46 个，83% 不动，17% 活动；对照組菌数为 88 个，2% 不动，98% 活动，則 10 分钟时黄

連素之杀菌率为:

$$1 - \frac{46 \times 17\%}{88 \times 98\%} = 1 - \frac{8.9}{86} = 1 - 0.103 = 89.7\%.$$

所得結果見表 2。

表 2 金霉素、黃連素及二氯苯砷对鈎端螺旋体的抗菌作用 and 作用过程

作用 時間	金 霉 素			黃 連 素			二 氯 苯 砷			对 照	
	菌数	制動率(%)	杀菌率(%)	菌数	制動率(%)	杀菌率(%)	菌数	制動率(%)	杀菌率(%)	菌数	制動率(%)
10 分	89	8	14.4	46	83	89.7	76	16	25.7	88	2
30 分	82	3	—*	35	100	100	54	33	36.7	60	5
1 小时	42	52	59.7	32	100	100	32	31	55.9	55	9
5 小时	25	88	94.5	35	100	100	20	80	92.7	60	8
9 小时	16	100	100	39	100	100	32	100	100	81	6
20 小时	12	100	100	24	100	100	18	100	100	62	15
24 小时	2	100	100	21	100	100	12	100	100	57	24

注: 菌数是定量菌液(見正文), 在 600 倍放大之高倍鏡下計数 4—6 个視野所得之每視野平均菌数。制動率是連續檢查 100 个螺旋体所見不活动螺旋体之数目。

* 菌数比对照多, 不能計算杀菌率。

(三) 三种有效藥物作用机制的初步探討

将金霉素、黃連素、二氯苯砷 3 种藥物配成 200 微克/毫升的溶液, 各取 4 毫升, 加入 59-4 株強毒鈎端螺旋体培养液 4 毫升, 藥物最后浓度为 100 微克/毫升。另以菌液 4 毫升加入柯氏培养基基础液 4 毫升作为对照, 一并置 28°—30℃ 孵育 20 小时后, 以暗視野鏡檢, 証明全部螺旋体已不动, 即移置沉淀管中, 加入无菌緩冲盐水 15 毫升, 混匀, 以 15000 轉/分离心沉淀半小时, 吸去上清液, 再以无菌緩冲盐水重复洗滌 3 次, 最后一次离心后, 在沉淀物中加入无菌緩冲盐水 2 毫升, 混匀, 即以此液 0.5 毫升接种柯氏培养基, 并在培养基中加入磺胺嘧啶 500 微克/毫升, 以防污染。

接种前菌液鏡檢, 对照菌液每个高倍鏡視野 (600 ×) 菌数約 20—30 个, 20% 左右不活动; 金霉素、黃連素及二氯苯砷 3 种藥物作用过的菌液中菌数分别为 6、10、8 个, 100% 不活动。

培养基接种后, 置 28°—30℃ 孵育, 經 3、15 天后分別鏡檢, 发现对照管在 3 天以后即发育至每个視野 30 个左右, 运动活泼, 而在 3 种藥物試驗管中未找到螺旋体, 証明在接种以前所見到的殘存的螺旋体确已死亡。

(四) 青霉素作用的进一步观察

在初步試驗中, 青霉素对鈎端螺旋体作用 24—30 小时后, 并无明显作用表现, 这一結果与其他多数作者的报告以及临床治疗的經驗均不符合。为了驗證此項結果之差异是否由于作用時間长短不同, 并观察剂量之大小对其作用有无影响, 我們又做了下述試驗:

将青霉素配成 200 单位/毫升及 2 单位/毫升两种浓度, 各取 0.5 毫升, 加入 59-4 株強毒鈎端螺旋体培养液 0.5 毫升 (青霉素最后浓度为每毫升 100 单位与 1 单位), 28°—30℃ 孵育, 每天观察 1 次, 計数在 600 倍放大的高倍鏡視野中的平均菌数及制動率, 結果如表 3。

表3 青霉素对59-4菌株的作用

作用时间 (天)	100 单位/毫升			1 单位/毫升			对 照	
	菌 数	制动率(%)	杀菌率(%)	菌 数	制动率(%)	杀菌率(%)	菌 数	制动率(%)
1	18	28	53.5	17	18	41.9	25	4
2	6	30	80.9	8	34	76.0	23	4
3	4	75	96.1	5	62	92.7	28	7
4	3	100	100	2	100	100	31	9
5	4	100	100	—	—	—	29	8

說明同表2。

二、討 論

从試驗結果看来,金霉素、黃連素、二氯苯砷3药在試管内对钩端螺旋体具有肯定的抗菌作用。鏈霉素、氯霉素、磺胺嘧啶3药在所試驗的条件之下沒有作用,而青霉素則虽有作用,但甚緩慢。

螺旋体經上金霉素、黃連素或二氯苯砷作用后,大部分已被溶解,剩留下来的菌体也发生了变化:动力消失,結構疏松,菌体僵直,但究竟是死是活,則还不能完全断言。如果仅为一时性的“假死”,当药物作用去除以后又可“复活”,則在临床治疗上也将得不到十分滿意的疗效。因之,对于这些不能活动的螺旋体的死活問題,亦即这几种药物对螺旋体的作用是杀菌还是抑菌的問題,必須加以解决。从显微镜下观察的現象初步推断起来,其作用应为溶菌和杀菌,而不仅仅是抑菌。这一点在接种培养的試驗中进一步得到了証实。Goldberg 等氏^[1]在1956年也曾做过若干种药物对钩端螺旋体作用机制的研究,但是他所采用的方法系将药物加入菌液中,作用一定時間后,未經洗滌即全部接种入培养基中,以后观察螺旋体能否生长,即判断其为杀菌或抑菌。这样做法的結果,培养基中仍然含有相当数量的药物,仍可繼續發揮其制菌作用,并不能据以推断螺旋体已經死灭。我們这次在接种以前已将菌液充分洗滌,除去剩余的藥物,当可免除此弊。

金霉素用以治疗钩端螺旋体病,文献报告不少,但意見尚不一致。一般說来,多数作者^[1-3]都認為它的疗效是良好的,但也有些資料認為金霉素的疗效很差,甚或根本无效^[4]。我們的試驗証明,金霉素的作用是肯定的。黃連素在临床上用以治疗本病,迄今尚无所聞,根据試驗看来,頗值一試。二氯苯砷在試管中虽有強大的杀菌作用,但鉴于其毒性作用,加之本病多有肝腎損害,在实际应用时还須慎重。

至于青霉素的作用,文献报告出入很大。在临床方面,大多数人^[5-9]都認為其疗效十分显著,而 Hall^[4], Broom^[10]等氏却認為青霉素对本病沒有任何治疗作用。国内鍾惠瀾等氏^[12]对于青霉素的疗效亦未能加以肯定。在實驗室方面,也有不少人做过青霉素对钩端螺旋体的試管内敏感試驗,如 Wylie 等氏^[13]測定29株钩端螺旋体对青霉素的敏感度,均在1单位/毫升以下; Alston 等氏^[14]試驗10株钩端螺旋体,在每毫升含青霉素0.11单位的培养基中經14天仍不生长。国内王家駒等氏^[15]測定出血性黄疸型钩端螺旋体对青霉素的敏感度为0.07—0.156单位/毫升。以上这些資料都証明了钩端螺旋体对青霉素极为敏感,而我們所做的初步試驗的結果却是无效(見表1),与上述报告完全相反。这样的

矛盾可能与試驗的方法有关。前引文献中^[14-15]所报告的敏感試驗方法都是将青霉素加入培养基中,种入少量螺旋体,长期培养,观察其有无生长发育。由于青霉素在整个培养过程中始終存在,故能持續發揮其抗菌作用,使之不能生长。而我們所用的方法則是在較短時間內直接观察螺旋体动力之消失,作为作用的指标。如果葯物作用不强,不能在短期內将其杀灭,則在我們的試驗系統中无法表現出来。因此我們又做了进一步的試驗,探索青霉素作用時間的长短对其結果有无影响。

在这一部分試驗中,我們观察到青霉素在作用初期效果很不显著,1天以后菌数減少不多,大部分螺旋体仍然运动活泼。2天以后,作用逐漸發揮,其表現主要在于总菌数显著減少,而殘存螺旋体活动性尚未明显減弱。直至四天以后,始告全部杀灭。

Fulton 等氏^[16]曾將各种抗菌素分別加入鈎端螺旋体的培养物中,測定其呼吸耗氧量,从而推断其对鈎端螺旋体的抗菌作用,結果发现青霉素和鏈霉素在4小时內对鈎端螺旋体的呼吸毫无抑制作用,而金霉素和土霉素在同样条件下却能抑制螺旋体的呼吸分別达到86%和63%的程度。这一資料和我們所得的結果也是基本一致的。

在青霉素的大小剂量之間,看不出显著的差异,每毫升100单位的作用并不見得比1单位更好。在作用初期,尽管剂量很大,并不能迅速有效的杀灭螺旋体,必須等到4天以后,螺旋体方始全部死去,而到了此时,每毫升1单位的小剂量也已足够获得同样的效果了。

根据本院传染病学教研組用青霉素治疗鈎端螺旋体病的临床經驗^[17],疗效的好坏和复发率的高低与青霉素的疗程长短有显著关系,而与剂量大小无关,因此建議青霉素的剂量不必过大,但疗程不宜少于1周。我們在实验室內所得結果也完全支持这样的意見。

三、摘 要

用試管内制动試驗的方法,观察了若干种葯物对四株鈎端螺旋体的抗菌作用,証明金霉素、黃連素、二氯苯砷3葯对鈎端螺旋体具有強大而迅速的抗菌作用,其作用系杀菌、溶菌,而非抑菌。青霉素对鈎端螺旋体亦有杀灭作用,但其作用較為緩慢,作用之強弱与剂量大小无关。鏈霉素、氯霉素、磺胺嘧啶3葯在所試驗的条件下未見明显的抗菌作用。

根据实验結果,肯定了青霉素及金霉素应用于临床治疗之依据,并建議青霉素治疗的剂量不必过大,而疗程应有相当延长。黃連素亦可作临床試用。二氯苯砷虽經証明有效,惟鉴于其毒性作用,仍以慎用为宜。

参 考 文 献

- [1] Brunner, K. T. & Meyer, K. F.: *Am. J. Vet. Research*, 11:89, 1950.
- [2] Yonder, H. W., Bergman, E. N., & Gleiser, C. A.: *J. Inf. Dis.*, 100:257, 1957.
- [3] Howarth, J. A.: *J. Am. Vet. M. A.*, 129:268, 1956.
- [4] Hall, H. E. et al.: *Ann. Int. Med.*, 35:981, 1951.
- [5] Lawson, C. W.: *Brit. Med. J.*, 2:648, 1951.
- [6] Suchett-Kaye, A. I.: *Lancet*, 1:90, 1951.
- [7] Crooks, J. & Blair, W.: *Brit. Med. J.*, 1:885, 1955.
- [8] Fairburn, A. C.: *Lancet*, 270: (6906), 13, 1956.
- [9] Mackay-Dick, J.: *Lancet*, 273: (6990), 346, 1957.

- [10] Broom, J. C.: *Brit. Med. J.*, 4733:689, 1951.
- [11] Goldberg, H. S. & Logue, J. T.: *Antibiotics and Chemotherapy*, 6:1, 19, 1956.
- [12] 鍾惠瀾等：中华内科杂志，1956年9月，712—713页。
- [13] Wylie, J. A. H. & Vincent, E.: *J. Path. & Bact.*, 59:247, 1947.
- [14] Alston, J. M. & Broom, J. C.: *Brit. Med. J.*, 2:718, 1944.
- [15] 王家駒、何世元、馬家整：微生物学报，4(1):156, 1956年。
- [16] Fulton, J. D. & Spooner, D. F.: *Exper. Parasitol.*, 5:154, 1956.
- [17] 重庆医学院传染病学教研组：青霉素治疗无黄疸型钩端螺旋体病（尚未发表）。

THE IN-VITRO ANTILEPTOSPIRAL ACTIVITIES OF CERTAIN CHEMOTHERAPEUTICS

CHEN JEN-PU, CHAO CHIA-YU AND SHU YUE-YU

(Department of Microbiology, Chungking Medical College, Chungking)

The sensitivity of 4 strains of *Leptospira* (3 of *L. icterohemorrhagiae* and 1 of *L. canicola*) to 4 antibiotics and 3 other chemotherapeutics were determined by means of the in-vitro immobilization tests. The experimental data revealed that aureomycin, berberine bisulfate, and dichlorophenarsine hydrochloride possessed strong and rapid antileptospiral effects, the action appearing to be leptospirocidal and leptospirolytic rather than leptospirostatic. Penicillin was also proved to be antileptospiral, its effect, however, was much slower and delayed as compared with those of the 3 chemotherapeutics mentioned above. The potency of effectiveness of penicillin was irrespective of the concentrations used, i.e., both high and low concentrations yielded identical results. Streptomycin, chloramphenicol and sulfadiazine exerted little or no effect on *Leptospira* under the test conditions.

The results obtained supported the further clinical use of penicillin and aureomycin, and were in accordance with the opinion that in case of penicillin the dosage could be small, while the course of treatment should be adequately prolonged. Berberine was also considered to be worthy of clinical trial. As for dichlorophenarsine, though found to be highly effective, yet on account of its toxicity, this drug should be used with great caution.