

在試管内誘導痢疾杆菌对合霉素的 抗药性試驗

王長安 林飛卿

(上海第一医学院微生物学教研组, 上海)

我們曾报告从病人标本中分出的腸道致病菌中, 痢疾杆菌的抗药菌株远比伤寒杆菌为多, 而各型痢疾杆菌中, 則以宋氏痢疾杆菌的抗药菌株为最多見, 而舒密次氏痢疾杆菌为最少。为了探討这两种痢疾杆菌对合霉素产生抗药規律性, 我們用递增药物浓度的方法在試管中进行誘導, 试图发现用人工法誘導抗药性和在自然条件下产生抗药性之間有无相似之处。結果发现不同种类痢疾杆菌在試管内对合霉素产生抗药性的速度与强度有一定差别, 这和在自然情况下所产生的抗药性頗相类似, 但抗药性不很稳定。在誘導过程中, 許多菌株在产生抗药性的同时, 出现了其他特性的改变, 主要表现在生长速度減慢与发酵能力減弱。虽然从文献中尚未見到来自病人标本的抗药痢疾菌株有类似的变异, 但这种可能性是值得考虑的。

一、材料与方方法

(一) 材料

1. 菌种: 均系从本市病人标本中所分得的地方菌株, 計宋氏痢疾杆菌 11 株 (编号 256、261、322、349、360、368、378、408、473、593 和 626) 和舒密次氏痢疾杆菌 11 株 (编号为 139、140、145、152、153、158、159、161、162、163 和 180), 用冰冻干燥法保存。

2. 药物: 中国科学院合成的合霉素粉末, 用生理盐水配成 1 毫克/毫升浓度, 保存在 -20°C 的冰箱內, 時間不超过 4 个月。

3. 培养基: pH7.2—7.4 的蛋白胨肉浸液。

(二) 方法

1. 細菌抗药性的測定: 試驗方法同前文^[1], 經培养后, 細菌在 4 微克/毫升药物中不生长时称为“高度敏感”; 在 4 微克/毫升中生长, 12 微克/毫升中不生长时称为“敏感”; 在 12 微克/毫升中生长时为“抗药”。

2. 細菌抗药性的誘導試驗^[2]: 在含有递增药物浓度的蛋白胨肉浸液中传代誘導, 每两次移种的間隔为 2—3 日, 直至抗药性不再上升或上升速度显著減低时为止。在誘導过程中, 选择不同菌株, 对生物学特性进行检查。同时将全部菌株培养在蛋白胨肉浸液培养基中并行传代, 作为对照。

3. 細菌抗药性的稳定性試驗^[2]: 将已产生高度抗药性的菌株在无药培养基中每隔 1—2 日传代一次, 直至大部分菌株失去抗药性为止。每 5—10 代測定細菌的抗药程度并检查其生物学特性。

二、实 驗 結 果

1. 細菌抗药性的形成及其稳定性 誘導前，舒密次氏痢疾杆菌对合霉素的敏感性为 2—4 微克/毫升(平均 2.7)，宋氏痢疾杆菌为 10—12 微克/毫升(平均 11.7)。連續通过递增藥物浓度 12 代后，11 株舒密次氏痢疾杆菌的抗药性增长情况頗为一致，达 120—140 微克/毫升(平均 125)，比誘導前高 44—52 倍(平均 46 倍)。11 株宋氏痢疾杆菌的抗药性上升情况出入頗大，誘導 12 代后，抗药性增至 120—2000 微克/毫升(平均 681)，比誘導前高 10—171 倍(平均 58.2 倍)。

在抗药性的稳定性試驗中，舒密次氏痢疾杆菌抗药性的消失較宋氏痢疾杆菌均既早且快。前者在通过无药肉湯 31 代后，除两个菌株(139 与 162 号)外，其余都变为敏感。經繼續传代后，162 号于第 39 代，139 号于第 50 代，均恢复了原来的敏感状态。宋氏痢疾杆菌在第 50 代时尚有 6 个菌株抗药，到第 55 代时仍有 3 个菌株(菌号 350, 378 与 593)抗药，抗药程度分别为 16、80 与 80 微克/毫升。

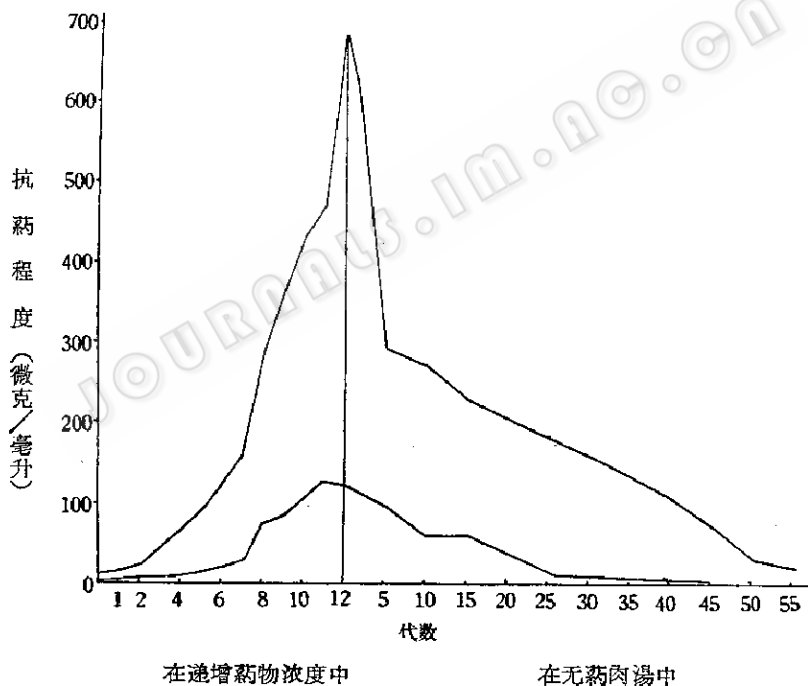


图 1 在递增合霉素浓度中，細菌抗药性的形成及其稳定性

2. 細菌生物学特性的改变 自誘導第 7 代始，检查各代菌株的形态、菌落特性、生化反应与在免疫血清中的可疑集性。結果发现当細菌的抗药性增高时，伴有生长速度減慢，細菌形态往往变小，呈多形性和生化反应減弱。

(1) 舒密次氏痢疾杆菌：11 株舒密次氏痢疾杆菌在产生抗药性后，有 8 株在平板上生长迟緩，一般經 24 小时培养后，細菌无生长或仅有細小的菌落，以后逐渐长大。例如：139 与 161 号菌株第 10 代經 1 昼夜培养后菌落細小如針头，18 日后仍很小。163 号菌株第 8 代經培养 1 日后未見細菌生长，第 2 日出現針头大小菌落，第 12 日的菌落直径为 1.5 毫米；第 159 号菌株第 8 代在前 5 日无生长，第 8 日的菌落大小为 0.8 毫米，第 10 日为 2 毫米。在許多場合下，細小与較大菌落往往同时存在。此外，同一菌株的不同代数表

現也不一致。

凡菌落很小的,涂片中的細菌形态往往也很細小,但繼續传代后,有时又变为正常。

經多次接种后,菌种往往由光滑型逐漸变为粗糙型,此时在免疫血清中的凝集度亦下降。例如我們所有菌株的原始凝集效价为 1:640—1:1280,經在葯物中多次移种后降至 1:160—1:640,但抗葯菌株的下降速度比对照略慢,特別是細小菌落,結果如表 1。

表 1 在含葯培养基中移种 8 与 11 代后,舒密次氏痢疾桿菌凝集价的改变

菌 号	第 8 代凝集价	对 照 凝 集 价	第 11 代凝集价	对 照 凝 集 价
139	320**	160	160	160
140	160—640*	160	160	160
145	160—640*	160	160	160
152	320	160	320	80
153	—	—	160	160
158	320	320	320	160
159	320	80	320	160
161	160—640*	160	320	160
162	160—640*	80	160	80
163	160—640*	320	160	160
180	160	160	160	160

* 2 細小菌落的凝集价; ** 凝集价倒数。

由上表可見,經多次移种后,当菌落开始逐步变为粗糙时,凝集价亦漸下降。但抗葯变种特別是細小的菌落的凝集价的下降比对照管为略慢,这种差异在不同代数表現略有不同。

这些新的特性不很稳定,將細菌在无葯培养基上連續通过时,抗葯性逐漸消失,其他特性亦随之恢复,但后者的复原速度要比抗葯性的消失为慢,例如,在通过无葯培养基 35 代后,此时 9/11 个菌株已恢复对葯物的敏感性,但 5/11 个菌株的生长速度仍較慢,一般培养 1 日后菌落均很細小,培养 3—4 日有些菌落变大,有些仍較小。

(2) 宋氏痢疾杆菌: 11 株宋氏痢疾杆菌通过递增量的葯物后,有 7 株在平板上生长

表 2 宋氏痢疾桿菌的抗葯性与生化反应的恢复情况

菌号	原 始 菌 株					通过葯物第 8 代菌株*					通过无葯培养基 55 代				
	葡萄糖	乳 糖	麦芽糖	甘露醇	抗 葯 性 (微克/毫升)	葡萄糖	乳 糖	麦芽糖	甘露醇	抗 葯 性 (微克/毫升)	葡萄糖	乳 糖	麦芽糖	甘露醇	抗 葯 性 (微克/毫升)
256	+	+	+	+	12	+	—	—	+	200	+	+	+	+	8
261	+	+	+	+	10	+	—	+	+	280	+	+	+	+	12
322	+	+	+	+	12	+	—	—	+	360	+	+	+	+	8
349	+	+	+	+	12	+	—	+	+	200	+	+	+	+	6
473	+	+	+	+	12	+	+	+	+	240	+	+	+	+	4
593	+	+	+	+	12	+	—	+	+	600	+	+	+	+	80
626	+	+	+	+	10	+	+	+	+	280	+	+	+	+	4

* 通过葯物 8—11 代后,7 个菌株在培养 1 日后菌落很小或无生长。

“+”产酸,右上角数字代表糖发酵所需日期。

“—”培养 14 日后仍为阴性。

成細小菌落。培养 7 日或較長時間后才发育得比較正常。256 号菌株的第 8、10 与 12 代培养物移种平板后，第 1 日均无生长，培养 8—10 日后，菌落仅 0.5 毫米大。第 8 代菌的糖发酵反应在培养 2 日后才变为阳性，第 10 与 11 代經培养 6 日后仍为阴性。将抗药菌株通过无药培养基 55 代后，抗药性与生化反应都有一定程度的恢复，但抗药性的消失比生活力的复原要早些，如表 2。

三、討 論

从病人标本中分离的抗合霉素宋氏痢疾杆菌的百分率比舒密次氏痢疾杆菌高，即使同属敏感菌株，前者的敏感性一般为 10—20 微克/毫升，后者为 2—4 微克/毫升。經藥物誘導后，宋氏痢疾杆菌抗药性的上升速度与程度均較舒密次氏为显著，而且不同株宋氏痢疾杆菌抗药性的增长情况很悬殊，而不同株舒密次痢疾杆菌之間的差別則很小，以上各点与自然界中所見很相似。

所不同者即病人的抗药菌株的抗药性很稳定^[1,3]，而誘導菌株則很易消失。其原因之一是由于人工誘導法进行迅速，当細菌变为高度抗药后，未加巩固，立即将其在无药培养基中連續传代，以致新获得的特性很快失去，特别是在通过无药培养基时，往往一俟培养基稍呈混浊后立即移种。抗药菌的生长一般比較緩慢，如敏感菌与抗药菌同时存在时，这种迅速传代的结果势必使后者被其淘汰，更促成細菌抗药性的加速消失。

在藥物誘導过程中，除細菌的抗药性上升外，其他特性亦发生了变化，特别是生长速度与菌落形态，这在文献中已有报告^[4-7]。虽然各方面的意見尚未完全一致，大多数学者认为在試管中使細菌对合霉素产生抗药性时，細菌的形态有明显改变，生长迟緩，糖发酵作用慢或消失，在免疫血清中的可疑集性減弱或失去和对小白鼠的毒力減弱，我們的結果基本上与这些結果相符，仅在細菌可疑集性方面，我們发现連續移种可使菌株由 S 型变为 R 型，从而使其可疑集性普遍下降，但形成細小菌落抗药菌株的凝集度的下降較对照稍迟緩，但最后仍不免大大削弱。經繼續不断移种后，大多数菌株变得很粗糙，以致沒有再測定其可疑集性，我們未作毒力測定。可見这种 S→R 型变异是由于不断移种所引起，与抗药性的形成无关。

至于从病人标本中分离出的抗药菌株在其他特性上是否也有类似的变异？文献中的报导不多。Затуловский^[3]曾比較了 200 株从病人标本中所得的抗氯霉素痢疾杆菌和来自同組病人的 12 个敏感菌株，发现这些敏感与抗药菌株在各种特性上均无区别，但用人工誘導的 17 株抗药菌，5 株菌的可疑集性減弱，2 株完全丧失。它們对小白鼠的毒力亦有所下降，氏认为机体与試管內的环境有很大不同，因此所得抗药菌株的性质也不相符。

虽然如此，从病人分出的其他病原菌中，在产生抗药性的同时，其他特性有时也可以改变。如我們发现脑膜炎球菌的抗药菌株的生长往往需时較长。Voweke 与 Altreno^[8]在用氯霉素治疗的两側泌尿道感染的病例中，发现原来存在于尿中的綠脓杆菌变为小而干燥菌落，产生水溶性綠色色素，在液体培养基中呈薄膜样生长，經在普通肉湯多次传代后，有些菌株恢复典型的綠脓杆菌特性，有些菌株則不变。在我們实验室内曾发现 1 株抗异烟肼的結核杆菌，經 4 个月培养后才生长。鉴于近年来非典型的結核杆菌，非典型的痢疾杆菌等的发现已越来越引起人們的注意，和近 20 年来由于化学疗剂的广泛应用，这在促

成細菌变异方面,不能不是重要因素之一。因此,我們推想在病人标本中分出的抗合霉素痢疾杆菌,在生物学特性上所以无明显变化,可能是由于抗药性株的生长緩慢与生化反应不典型,因而被疏忽掉。这种可能性的是否存在值得进一步的探討。

再者,本文中曾提及,抗药性完全消失后,細菌的生活力与生化反应变异,可以繼續保持,这种情况如在自然条件下出現,会給檢驗工作带来一定的困难。

四、結 論

1. 将舒密次氏与宋氏痢疾杆菌各 11 株,在递增量合霉素浓度中通过 12 代后,前者对合霉素的抗药性平均由 2.7 微克/毫升上升至 125 微克/毫升,計 46 倍,后者由 11.7 微克/毫升上升至 681 微克/毫升,計 58.2 倍。繼而在无药培养基中連續通过,舒密次氏痢疾杆菌于第 50 代已完全失去抗药性,而宋氏痢疾杆菌在第 55 代时,11 株中仍有 4 株抗药。

2. 痢疾杆菌对合霉素产生抗药性的同时,其他特性也发生了改变,主要表現生长速度緩慢与糖发酵能力減弱,在多次通过无药培养基后,抗药性的消失比生物学特性的复原为早。

参 考 文 献

- [1] 万治华等: 上医学报, 3 (2): 143, 1960.
- [2] Петровская, В. Г.: В кн. *Изменчивость микроорганизмов*, стр. 150—163, 1956.
- [3] Затуловский, Б. Г.: *ЖМЭИ*, 7:40, 1958.
- [4] Шершевская, Р. С.: *ЖМЭИ*, 7:117, 1959.
- [5] Старкова, Т. Г. и др.: В кн. *Вопросы инфекционной патологии*, стр. 59—67, 1954.
- [6] Зыков, М. П.: В кн. *Кишечные инфекции*, стр. 123—131, 1956.
- [7] Затуловский, Б. Г.: *ЖМЭИ*, 5:98, 1957.
- [8] Voureka, A. & Atbens, M. D.: *Lancet* (Jan. 6), 27—28, 1951.

IN VITRO INDUCTION OF RESISTANCE OF DYSENTERY BACILLUS TO CHLORAMPHENICAL

C. A. WANG AND F. C. LIN

(Shanghai First Medicine College, Shanghai)

During the past few decades, owing to the wide application of chloramphenical (or chloromycetin) as chemotherapeutic agent for bacillary dysentery, the incidence of drug resistance of dysentery bacillus has been rising rapidly, especially in the case of *Sh. sonnei*, while that of *Sh. schmitz* has remained singularly low. Aiming to find some possible relationship between the development of drug resistance *in vivo* and *in vitro*, 11 strains each of *Sh. sonnei* and of *Sh. schmitz* were selected for study. These were passed successively through meat-infusion broth containing increasing concentration of chloramphenical. After 12 such passages, the drug resistance of *Sh. sonnei* rose from an initial value of 10–12 $\mu\text{g/ml}$ to 120–2,000 $\mu\text{g/ml}$ (averaging 681 $\mu\text{g/ml}$), being 10–171 times that of the parent strains. On the other hand, the resistance of *Sh. schmitz* only rose from 2–4 $\mu\text{g/ml}$ to 120–140 $\mu\text{g/ml}$ (averaging 125 $\mu\text{g/ml}$), being 44–52 times higher than before induction. Next, the bacterial strains were all passed rapidly through the drug-free bouillon medium, so as to test the stability of the resistance acquired. After 35 passages, all of *Sh. schmitz* strains had returned to the original sensitivity, whereas after 55 passages, 4 of the 11 strains of *Sh. sonnei* still retained considerable degree of resistance. The above findings seem to agree to that found in nature, that is, among the dysentery bacillus, chloramphenical resistance is met with most often among *Sh. sonnei*, and various strains of *Sh. sonnei* also differ greatly in degree of drug resistance. On the contrary, resistant *Sh. schmitz* strains are rarely encountered with. This difference is easily explained by the method of induction we employed in this study.

During the course of induction of drug resistance, many strains, both of *Sh. sonnei* and of *Sh. schmitz*, underwent variation in certain other biological characteristics, chiefly in the slowing down in the rate of growth and of diminished capacity to ferment sugars. Following repeated passages of these resistant strains through drug-free medium, the recovery of the biological characteristics was slower than the return to the original sensitivity to chloramphenical. These variation in biological characteristics has not been reported so far on resistant strains isolated in nature. In view of the fact that similar variations have been described in relation with other pathogens following chemotherapy, the possibility that such may occur in the specimens from patients should be kept in mind. Confirmation of these suggestions must await future studies.