

在鏈霉素、合霉素和磺胺噻唑鈉的誘導下 耐藥性伤寒杆菌和痢疾杆菌的研究

陈祖琼

(天津医学院微生物学教研组,天津)

安正明* 胡慧君 陈慶棠

(河北省医学科学院流行病学研究所,河北)

近年来由于临床上广泛使用抗菌素治疗各种传染病,耐藥菌株亦随之增多。为了进一步了解耐藥菌株形成的規律性,并企图通过藥物誘導变异,可能得到一株毒力低而免疫原性較強的減毒株,我們采用了近年来国内治疗上最常用的磺胺噻唑鈉、合霉素和鏈霉素等藥物,进行了試管内伤寒杆菌和痢疾杆菌耐藥性形成的研究,并观察了这些耐藥性細菌的生物学特性。

一、实验材料和方法

菌种:本教研组保存的伤寒杆菌和 2a 型弗氏痢疾杆菌各一株,由卫生部生物制品检定所供給。

細菌在含藥培养基内传代的方法:实验前将各菌株进行了生化反应,血清凝集試驗及对各藥物的敏感性測定。以各种細菌移种到含有递增浓度的肉湯培养基中,置 37℃ 溫箱下培养 72 小时,然后取次抑菌浓度的培养物作为次代的接种材料。每隔三天传一代,每間隔 1 代接种去氧胆酸鈉培养基,观察菌落变化。每間隔 10 代进行生化反应和血清学鉴定,并用腹腔途径注射。体重 12—14 克的小白鼠,每种浓度接种小白鼠 5 只,观察 1 周,按 Reed 和 Muench 氏^[1]法計算其半致死量。

二、实验結果

(一) 伤寒杆菌和痢疾杆菌对各种藥物产生耐藥性的情况

将伤寒杆菌和痢疾杆菌在含鏈霉素,合霉素和磺胺噻唑鈉等肉湯培养基中,連續传代。其耐藥性的增长情况见图 1。

由图 1 可以看出,在我們的試驗中,伤寒杆菌和痢疾杆菌对磺胺噻唑鈉最不容易形成耐藥性,伤寒菌在含磺胺培养基中传到 120 代时,其耐藥性仅为原始菌株的 2 倍。相反,两种細菌对合霉素和鏈霉素都能形成耐藥性,且对鏈霉素更容易形成耐藥性。伤寒菌在含合霉素的培养基中传到 120 代时,其耐藥性达到 800—1,200 微克/毫升,也就是比原始菌株增长 128—192 倍。同样痢疾菌株到 120 代达到 200 微克/毫升,比原始菌株增长 125 倍。在鏈霉素誘導試驗中,先是采用双氢鏈霉素,发现耐藥性增高很快,至 23 代已达到 150,000 微克/毫升的浓度,比原始伤寒杆菌和痢疾杆菌各增高約 1,500 倍和 19,000 倍。以后由于某些原因,暂时不能繼續研究,故将变异株置半固体培养基中保存。当保存二个月后,其耐藥性分別由 12,800 微克/毫升和 12,500 微克/毫升降到 3,200 微克/毫升和 50 微克/毫升。

* 現在通訊处:河北省东光县防疫站。

本文 1962 年 12 月 17 日收到。

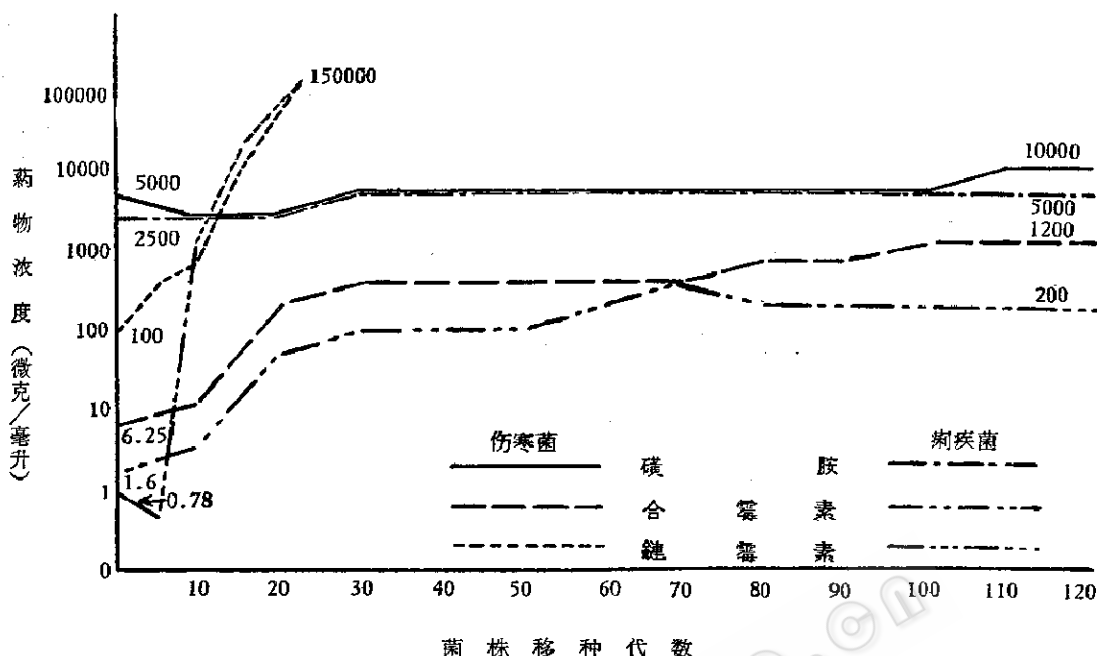


图1 在不同葯物浓度培养基中細菌耐葯性增长曲綫

以后自第 24 代起改用鏈霉素繼續誘導至 110 代,在此过程中耐葯性很稳定,一直維持在 6,400 微克/毫升的浓度。

(二) 敏感性恢复試驗

为了进一步研究传代菌株的耐葯性是否稳定,我們將“伤鏈”¹⁾株 23 代及“弗鏈”株 20 代,分別移种至不含鏈霉素的肉湯培养基中,每 24 小时移种 1 代,共移种 70 代。其敏感性恢复最快者为“弗鏈”株,至 70 代即由原来 70,000 微克/毫升降至 3.125 微克/毫升,相当于原来耐葯株 1/22,400。“伤鏈”株敏感性恢复較慢,至 70 代后,耐葯性为 1,600 微克/毫升,降为原耐葯株的 1/90。

(三) 耐葯菌株形态、菌落的变异

將各耐葯菌株接种至去氧胆酸钠琼脂平板上,經 37℃ 24 小时培养后,观察菌落及形态变化。一般說来,菌落变化不大,菌落均为圓形,边缘整齐,表面光滑湿润,灰白色。仅有的菌株菌落变小,生长极为緩慢。但形态变化較显著,有杆状、球状、絲状和鏈状等变化。

按一般鉴定腸道杆菌的方法,进行生化反应試驗。

耐葯菌株除大部分生化反应与原始菌株比較无变化或稍有不規律外,各菌株在糖发酵方面有变弱現象。如“弗鏈”株第 50 代麦芽糖发酵到 10 日始呈阳性,“弗鏈”株第 60 代对葡萄糖发酵到第 10 日始呈阳性,但繼續传代后又恢复原来性状。除“弗鏈”株外,其他耐葯性弗氏痢疾菌都失去了形成凝基質的能力。

值得提出的是,弗氏痢疾杆菌原始株对水楊素沒有发酵能力,而在含葯培养基中传代后,“弗鏈”株、“弗磺”株和“弗合”株第 60 代均分別于第 3 日和第 15 日发酵。对果糖肌醇发酵不規律,美紅試驗也不規律。奇怪的是“弗鏈”株第 50 代,对葡萄糖、甘露醇的发酵能

1) 系指伤寒杆菌在不同浓度磺胺嘧啶鈉的传代培养基的菌株,其余类推。

力突然丢失,該菌株經加入少量鏈霉素后,发酵葡萄糖的能力立即恢复,而对甘露醇的发酵能力,直到第 70 代才恢复。至于耐药性伤寒杆菌,仅“伤合”株第 20 代于第 14 日才开始对水楊素进行分解。“伤合”株第 40 代及“伤鏈”株第 50 代起,在半固体培养基上及用悬滴标本检查都无动力。

（四）耐药菌株抗原結構的变化

实验結果証明,各耐药菌株的凝集效价比原始菌株下降 2—3 管不等。值得注意的是“伤合”株及“伤鏈”株,自第 10 代起即对抗伤寒杆菌 *d* 因子血清失去凝集能力,但与多价抗伤寒杆菌血清,有較高的滴度,而为 O-凝集現象。

（五）耐药菌株对小白鼠的毒力变化

我們采用本校动物室饲养的瑞士种小白鼠,体重 12—14 克,雌雄不分,对各耐药菌株进行了半致死剂量的測定。結果見表 1。

表 1 耐药性伤寒桿菌和痢疾桿菌对小白鼠半致死剂量的測定

菌 株	半数致死量 (亿/毫升)	菌 株	半数致死量 (亿/毫升)
伤寒杆菌原始菌株	10	弗氏痢疾杆菌原始菌株	15.55
“伤 合” 株	23.8	“弗 合” 株	18.75
“伤 鏈” 株	18.75	“弗 鏈” 株	12.50
“伤 磺” 株	22	“弗 磺” 株	16.25

三、討 論

根据我們試管内累次传代的結果証明,伤寒杆菌和痢疾杆菌对磺胺噻唑鈉不容易形成耐药性,与王、张二氏^[2]的报告不同。王氏报告,“弗氏痢疾杆菌在磺胺噻唑中传代的 24 株变种,其中 19 株对磺胺的耐药性比原始菌株增长 1,000—5,000 倍或更高,其余增加 100—640 倍者”。这个分歧的原因不明,值得进一步研究。

在生物学性状方面,高度耐药性的菌株,菌落往往变小,生长緩慢,形态变化較大。但是,形态上的变化,不能認為是細菌产生耐药性的特征,因为在其他不良因素或陈旧培养物中,也有形态的变化,因此有关耐药性細菌的形态变化需要繼續观察。至于生化反应方面,表现为对糖发酵能力的減弱或不規律。我們观察到“弗鏈”株第 50 代、55 代和 60 代突然失去了发酵甘露醇的能力,第 50 代同时还失去了发酵葡萄糖的能力,当时曾在糖发酵培养基中加入少許鏈霉素,重复 50 代的生化反应,結果发酵葡萄糖的能力立即恢复,而发酵甘露醇的能力,直到第 70 代才恢复。我們考虑是否由于該菌株已产生了对鏈霉素的依賴性,以致影响了酶的活力。以后即进行了一系列的依賴性实验,一直观察到“弗鏈”株第 99 代,也未見到有賴药菌株的現象。但也看到这样的現象,即“弗鏈”株在无鏈霉素的传代培养基中,可以生长很好,在无或有鏈霉素的去氧胆酸鈉琼脂平板上,培养 72 小时后,往往也看不見菌落生长。因此,我們考虑,在固体培养基上不生长或生长緩慢,是否是菌株形成耐药性后的一种表现,而与依賴性无关。此外,耐药性痢疾杆菌对半乳糖的发酵能力,也曾有丢失而又恢复現象。关于对甘露醇和半乳糖、葷糖发酵能力的变化,在我們有限的材料中,还未見到。其他对水楊素、果糖、鼠李糖、肌醇的分解和美紅試驗出現不規律

性,都值得注意。

关于耐葯菌株毒力变化的材料并不少见,但結果尚不完全相同。而我們的材料,可以看出耐葯性痢疾杆菌的毒力,几乎没有下降。而耐葯性伤寒杆菌的毒力有下降趋势。这倒是个别现象,抑或是一定规律,现在尚不能回答。

四、摘 要

1. 本文研究了伤寒杆菌和痢疾杆菌在不同浓度鏈霉素、合霉素和磺胺噻唑鈉含葯培养基中,連續传代后的变异现象。

2. 伤寒杆菌和痢疾杆菌对磺胺噻唑鈉,不容易形成耐葯性,至 120 代时,其敏感度仅为原始菌株的二倍。但对鏈霉素较对合霉素更易形成耐葯性。“伤鏈”株和“弗鏈”株至 110 代,其耐葯性分别为原始菌株的 1,000 倍和 16,000 倍。“伤合”株和“弗合”株至 120 代,分别为原始菌株的 120—190 倍和 125 倍。

3. 耐葯菌株生物学特性方面有若干变化,如菌落变小、菌落生长缓慢、生化反应减弱或不规律、凝集力下降。耐葯性痢疾杆菌毒力不变,耐葯性伤寒杆菌毒力有下降趋势。

4. 耐葯性痢疾杆菌的耐葯性最不稳定,在无葯肉湯中,传 70 代后,耐葯性降为原来的 1/22,400。耐葯性伤寒杆菌,传 70 代后,耐葯性降为原来的 1/90。

参 考 文 献

- [1] Reed, L. J. and Muench, H.: *Am. J. Hyg.*, 27: 493, 1938.
- [2] 王士燊、张寬厚: 微生物学报, 7: 236—240, 1959.

STUDY ON DRUG-INDUCED RESISTANT STRAINS OF *SAL. TYPHI* AND *SH. DYSENTERIAE*

CHEN TSU-KIUNG

(Dept. of Microbiology, Tientsin
Medical College, Tientsin)

AN CHEN-MING HU HUI-CHUN

CHEN CHING-YUNG

(Institute of Epidemiology, Hopei
Academy of Medical Sciences, Hopei)

One strain each of *Sal. typhi* and *Sh. dysenteriae* was subjected to serial passages in media containing various concentrations of streptomycin, syntomycin and sodium sulfathiazole.

It was found that, it is difficult to induce drug-resistance in our strains to sulfathiazole, as at the 120th generation, the resistance of these bacilli was increased only twice as compared with that of the original strains. However, they were much easier to be rendered streptomycin-resistant and syntomycin-resistant. In the streptomycin-containing media, the concentration of the drug to which *Sal. typhi* and *Sh. dysenteriae* could tolerate was increased to 1,024 and 16,140 times respectively at the 110th generation. Similarly, at 120th generation, they were 128—192 times and 125 times respectively more resistant to syntomycin.

There were some changes in the biological characteristics found among the drug-induced resistant strains, such as much smaller colonial form, retarded growth, weak biochemical activity, reduced agglutinability and some attenuation in virulence.

The acquired drug resistance was found to be unstable. When at the height of drug-resistance *Sal. typhi* and *Sh. dysenteriae*, were inoculated into drug-free broth for serial passages their resistance dropped by 94 and 22,400 times respectively after only seventy generations.