

实验获得的双重耐药性痢疾杆菌的变异*

田国才

刘朝

(内蒙古医学院微生物学教研组, 呼和浩特)

(内蒙古医学院组织胚胎学教研组, 呼和浩特)

自从抗菌素广泛应用于痢疾治疗之后, 即有大量的耐药菌出现。细菌所获得的耐药性是它们在药物作用下所产生的新的生物学性质, 而该性质的遗传和稳定性必然是代谢过程深刻紊乱的结果。过去曾有痢疾杆菌对磺胺剂^[1]、几种抗菌素^[2]以及黄连素^[3,4]等获得耐药性的报告, 但对生物学性状全面研究者尚未多见。只有 Weinberger 等报告, 在青霉素诱导下从新分离的痢疾杆菌得到了L型^[5]。

本文旨在研究实验获得的双重(对双氢链霉素——DSM, 氯霉素——CM)耐药性痢疾杆菌的变异, 并探讨其生物学特性、变异的深刻性和稳定性。

实验和结果

使用菌种 原菌种 Sh. 208 (经鉴定为福氏痢疾杆菌 2a 型); 耐药菌种 Sh. 208 Δ ④ 为原菌种在含有 DSM 的液体培养基内传 12 代后, 又在含有 CM 的液体培养基内传 40 代的方法实验获得的^[6]。

(一) 形态与培养特性 变异菌在普通琼脂平板上 37°C 24 小时后长出半透明针尖大的微小菌落。72 小时菌落稍大, 于 100 倍显微镜下观察见到菌落中央较厚, 边缘较薄, 表面粗糙呈乳咀状, 培养 5 天后小菌落全部变厚, 表面有颗粒性结构, 并出现 1—2 个子菌落。(图 1) 在普通肉汤内生长缓慢, 37°C 48 小时呈颗粒状沉底发育。该菌的 24 小时培养物染成革兰氏阴性, 呈球形、多角形及多种杆状的多形态性。

在试验过程中发现, 将原菌株与变异株的琼脂斜面培养物保存在 4°C, 1 月后, 原株可在普通琼脂基上传代, 而变异株则否; 若将在低温下保存的变异菌移种在葡萄糖甘油琼脂上则能生长。如每隔 1 小时以无菌手术刀切下该葡萄糖甘油琼脂培养物 1 × 0.5 厘米的小块(厚 2—3 毫米)放在载物玻片上, 为了尽量避免该琼脂块移动, 用烧热的小刀将琼脂块底面烫化, 冷却后再贴在玻片上, 然后用另一载物玻片轻轻沾取小块上的培养物作压印标本, 干燥后用 Carnoy 液固定 3 分钟, 并以 N-HCl 60°C 7 分钟水解, 再用姬姆萨液染 30 分钟, 则见随着培养时间的不同而出现不同的形态: 3—4 小时出现与膨大的杆菌有联系的, 具有核质体 (Chromatin bodies) 的巨大球体。6 小时培养物出现比细菌大数倍的梭形、线形、蝌状以及空泡样的异形型 (Heteromorphism), 该异形型含有多种形态的核质体。稍迟一些时候, 出现似由巨大球体或异形型破裂的颗粒, 与多形态的细菌相联系。12 小时后视野内看不到异形型, 只有带核质体的多形态细菌存在, 此多形态细菌与 Sh. 208 Δ ④ 在普通琼脂上培养 24 小时的细菌形态相似。该葡萄糖甘油琼脂培养物并可被福氏痢疾噬菌体裂解; 生化反应亦与 Sh. 208 Δ ④ 相同, 证明非杂菌污染。按同法, 作原菌株在葡萄糖甘油琼脂上不同时间培养物的压印片, 均未见如变株所呈现的特殊形态。

(二) 生化特性 用下述生化、动力和过氧化氢酶试验(玻片法), 对比检查原菌株与变异菌株的普

* 本文蒙张宽厚教授、陆德源同志审阅, 本院摄影室崔永洪同志协助拍照, 特此一并致谢。
本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

通琼脂培养物的生化学活动性如表 1。

表 1 变株与原株生化学特性比较

项 目	葡 萄 糖	乳 糖	麦 芽 糖	甘 露 醇	蔗 糖	鼠 李 糖	蓄 微 醇	木 胶 糖	水 杨 甙	阿 胶 糖	卫 子 醇	鞣 基 质	美 红	V.P. 反 应	枸 橛 酸 盐	硫 化 氢	硝 酸 盐 还 原	尿 素	动 力	过 氧 化 氢 酶
Sh. 208	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
Sh. 208 Δ ④	+ [△]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[△] 24 小时后发酵。糖发酵试验观察 4 周。

“+” 阳性; “-” 阴性。

试验指出该菌的生化学活动性很弱,除变为不发酵甘露醇,不形成鞣基质和过氧化氢酶阴性外,对葡萄糖发酵亦较迟缓和。

(三) 抗原性 以 Sh. 208 和 Sh. 208 Δ ④ 的 48 小时普通琼脂培养物制备加热抗原 (10 亿/毫升),分别给家兔实行足三里穴位注射。以原菌抗原注射 2 次,间隔 1 周,注射量各为 0.3 和 0.4 毫升,其免疫血清的凝集价即达 1:25,000;使用变异菌抗原,按 0.3、0.4 和 0.5 毫升的菌量注射 3 次,每周 1 回,该免疫血清与原菌株抗原只凝集 1:320。因变异菌有些粗糙,未与其相应的或原菌免疫血清作凝集反应。本文并用琼脂扩散试验比较这两抗原的关系。以 Sh. 208 的免疫血清 (1:2) 与相应抗原 (Sh. 208 的热盐水浸出物)作 Ouchterony 双向琼脂扩散试验 (试管法),放 37°C 72 小时出现 6 条沉淀带,而同一血清与变异菌抗原仅出现 2 条反应带。琼脂扩散平板法的结果为原菌抗原与相应血清出现 2 条沉淀带,而原菌免疫血清与变异菌抗原只出现 1 条沉淀带。试验指出,原株与变株尚保有共同抗原。两法以变异菌免疫血清与相应抗原或原株抗原均未出现可见的反应带,由此说明变异株的免疫原性大减。

(四) 噬菌体裂解试验 在普通琼脂平板上分别接种 Sh. 208 和 Sh. 208 Δ ④,并以福氏痢疾菌噬菌体 (效价 10^8) 滴在培养基表面上,37°C 48 小时观察结果,二者均出现裂解带。

(五) 致病性 选用健康白豚鼠 8 只,做痢疾菌性角膜结膜炎试验。其中 6 只分为两实验组 (每组 3 只),分别接种 Sh. 208、Sh. 208 Δ ④ 的 48 小时普通斜面培养物所做的浓厚盐水悬液,用带有 22 号针头的 1 毫升注射器,按 1 滴 4 亿菌量滴在每只豚鼠的单侧眼结膜囊内 1 滴,定时观察肉眼所见及组织切片的变化。另 2 只豚鼠按同法滴加生理盐水作为对照组 (按潘氏法)^[7]。实验结果如下:肉眼所见,感染原菌的 3 只豚鼠于 20—30 小时内相继发病,出现泪水盈眶、结膜发红及羞明现象;第 4 天脓性分泌物封闭眼裂,结膜严重充血,并有血管新生,角膜变混浊;第 10 天结膜炎渐消退,角膜炎增剧,上皮溃瘍糜烂,出现由角膜边缘形成的内向血管网遮盖瞳孔;第 21 天角膜变平混浊,炎症消退。感染变异菌的动物组无异常。病理切片检查,感染原菌后 4 天的角膜,各层结构轮廓基本可以辨认,但各层均呈程度不同的炎症病变。最外层的鳞状上皮细胞的正常排列秩序全部破坏,有些上皮细胞坏死。该层呈炎症细胞浸润,其中绝大多数为嗜中性多形核白血球,夹杂少数大单核细胞及淋巴细胞,且有许多浸润细胞坏死破碎。基质层中有较多新生小血管,并有上述细胞浸润 (图 2)。第 10 天的切片,看到病变比前者严重,上皮脱落,上皮与基质层无法辨认,基质层内有明显出血和细胞浸润 (图 3)。第 21 天的切片,看到炎症修复相:角膜各层结构容易辨认,留有轻度的炎症反应,但上皮尚有小的溃瘍未愈,仍可见到基质层内的血管和细胞浸润 (图 4)。感染变异菌后 4 天、10 天和 21 天的角膜切片,均未见病理改变,这表明该菌的毒力已减弱,但不能肯定是否变为无毒株,因为长期保存的某些痢疾杆菌也不能产生豚鼠的角膜结膜炎^[8]。

用伊红美蓝平板从原菌感染后第 2 天、4 天、10 天和 21 天的豚鼠眼分泌物中均分离出痢疾杆菌,而感染变异菌者第 2 天即分离不出该菌。

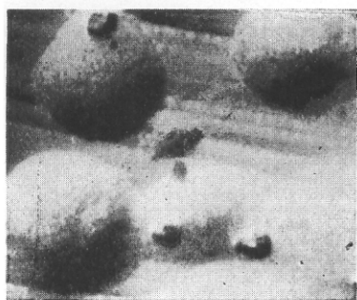


图1 Sh. 208 Δ ④ 在普通琼脂平板上培养 5 天的菌落形态

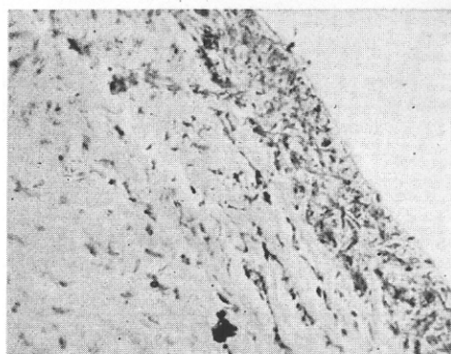


图2 原菌感染后 4 天的豚鼠角膜组织切片, H. E. 染色。×240

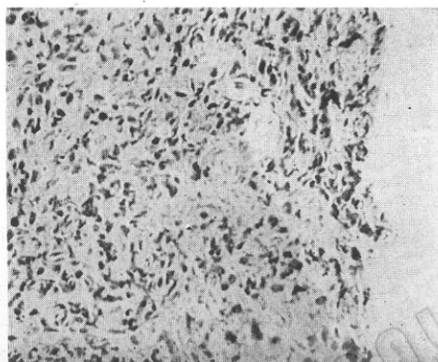


图3 原菌感染后 10 天的豚鼠角膜组织切片, H. E. 染色。× 240



图4 原菌感染后 21 天的豚鼠角膜组织切片, H. E. 染色。× 240

(六) 滤过试验 分别将普通琼脂上和移种在葡萄糖甘油琼脂上的变异菌的 48 小时肉汤培养物 10 毫升, 各加入含有 DSM (64 微克/毫升)、CM (125 微克/毫升) 的 90 毫升肉汤内, 37°C 培养 5 天, 均有细菌生长。将两者分别用蔡氏细菌滤器过滤, 然后将滤液按 1:5 分别种入 10% 血清肉汤和葡萄糖肉汤内, 37°C 40 天, 未见有细菌生长。该试验重复二次结果相同。

(七) 返祖试验 将 Sh. 208 Δ ④ 菌株的 48 小时普通琼脂培养物移种在葡萄糖甘油琼脂平板上 (2% 琼脂), 37°C 72 小时为 1 代, 如此继续传 40 代; 另将同种培养物移种在 10% 羊血清肉汤内, 37°C 1 周为 1 代, 共传 25 代, 两种传代返祖培养物除生长较好, 速度稍快外, 细菌的多形态性、微小菌落、生化反应、抗原性和致病性均未复原。对 DSM 的抵抗力却见降低, 由原来的 625 微克/毫升减至 64 微克/毫升; 但对 CM 的耐药性没有改变。

讨 论

实验指出, 当痢疾杆菌在含有抗菌素的培养基内传代而获得双重耐药性后, 不仅对该药物的抵抗力增强, 而且在一系列的生物学特性方面也发生了深刻的改变。但原株与变异株仍保有共同的抗原成分, 二者都可被福氏痢疾杆菌噬菌体裂解, 从而表明两菌株具有亲缘关系。

综观 Sh. 208 Δ ④ 菌株在形态、菌落、培养特性、生化反应、抗原性与致病性等变化, 与 Klienberger 在研究念珠状链杆菌时首先发现的 L 型^[9], 以及后来为许多学者用青霉素

诱导多种细菌所形成的特殊生长型^[5,10-13]很相似。

当 Sh. 208△[Ⓢ] 的普通斜面培养物在 4℃ 保存 1 月后, 因中断传代而失去了在普通培养基上发育的能力, 需移种在加有葡萄糖甘油的琼脂上才能生长。这说明该变异株的生活力减低, 营养要求提高了。一般 L 型需在培养基内添加一定量的人腹水或 1% 马血清才易繁殖, 但也可在含有葡萄糖、尼克酰胺的培养基上长出 L 型。在该葡萄糖甘油琼脂培养直接染色标本上所看到的, 先是巨大球体和异形型出现, 后来形成的多形性细菌似由它们破碎成颗粒型而再生的连续现象, 与细菌的 L 型形成过程大体相符。同时用 HCl-Giemsa 染色证明巨大球体和异形型内均含有多量核酸的核质体; 且在培养的对数生长初期出现, 可以认为该巨大球体与异形型的形成不是一种退化过程, 而是细菌在较长时间中断传代和移向新的培养基上发生的适应机制。

至于 Sh. 208△[Ⓢ] 的变异性是否稳定, 我们作了返祖试验。证明变异株无论在不含抗菌素的葡萄糖甘油琼脂上传代 4 个月, 或在血清肉汤内近半年间的传代观察, 除见其生长较好、对 DSM 的抵抗力减弱外, 其他生物学性状均未见复原。虽本试验未如 Altenbern 那样, 从调整培养温度、接种量、血清浓度及延长培养时间等方面深入研究 L 型返祖的条件^[14], 但可初步认为该菌的变异性是相当稳定的。

摘 要

1. 本文研究了实验的双重耐药性(DSM, CM)痢疾杆菌的生物学性状, 发现该菌呈多形性, 菌落微小中间厚呈乳咀状, 陈旧培养能产生子菌落, 在液体培养基内生长慢, 呈沉淀发育; 该菌与原菌保有共同抗原成分, 但比原菌的抗原减少; 变株不引起豚鼠的角膜结膜炎, 说明其毒力已减低。综上所述, 该菌与 L 型很相似。

2. 将放在 4℃ 1 个月失去了在普通培养基上发育能力的变异菌, 移种在葡萄糖甘油琼脂上可以生长。利用其直接压片染色标本看到, 先出现带有核质体的巨大球体和异形型, 以后似乎由它们碎裂成颗粒而再生为多形态性细菌的过程, 该过程与某些细菌的 L 型形成过程大体相符。原菌株的葡萄糖甘油琼脂培养物, 未见如变株所呈现的特殊形态。该菌滤液未见有再生菌出现。

3. Sh. 208△[Ⓢ] 株发生了上述深刻的变异性, 但经血清学和噬菌体裂解试验证明, 变株与原株有亲缘关系。连续在不含抗菌素的培养基上传代 4—6 月, 除生长稍快, 对 DSM 抵抗力减低外, 未见疑似的 L 型复原为菌型, 因而变异是稳定的。

参 考 文 献

- [1] Кудлай, Д. Г.: *Изменчивость Микробов Кишечной Группы*, 52—53, Медгиз, 1954.
- [2] Нобоков, Ю. С.: *Ж.М.Э.Н.*, (1):20, 1957.
- [3] 王守良, 兰懋功: *微生物学报*, 6:215, 1958.
- [4] 孙先润: *微生物学报*, 7:241, 1959.
- [5] Weinberger, H. J., Madoff, S. and Dienes, L.: *J. Bact.*, 59:765, 1950.
- [6] 田国才: *微生物学报*, 8:336, 1962.
- [7] 潘绍武: *微生物学报*, 8:316, 1962.
- [8] 冯振南, 方纲, 谢少文: *中华医学杂志*, 44:329, 1958.
- [9] Klinberger, E.: *J. Path. Bact.*, 40:93, 1935.
- [10] Dienes, L.: *J. Bact.*, 56:445, 1948.

- [11] Dienes, L.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**:589, 1948.
[12] Dienes, L.: *J. Bact.*, **57**:529, 1949.
[13] Қараң, Г. Я., Савенкова, В. Т.: *Ж. Микробиол.*, **3**:55, 1960.
[14] Altenbern, R. A.: *J. Bact.*, **81**:586, 1961.

A STUDY ON A LABORATORY INDUCED DRUG-RESISTANT VARIANT OF *SHIGELLA*

TIEN KUO-TSAI AND LIU CHAO

(Departments of Microbiology, and Histology and Embryology, Inner Mongolia Medical College,
Huhuohaote)

A strain of *Shigella flexneri*, resistant to both dihydrostreptomycin and chloromycetin, was induced by growing in broth containing first the former for 12 generations, and then in that containing the latter for another 40 generations. The resultant variant exhibited a marked pleomorphism, grew slowly in broth without antibiotics, and showed sediment in growth. Its colonies on the agar medium were small, and later, a number of papillae appeared which eventually developing into daughter colonies. It showed reduced biochemical activities, and its pathogenicity for the guinea pigs by the kerato-conjunctivitis test became lost. However, it retained the antigenic make up as well as the phage sensitivity of the parent strain. It did not revert to the original characteristics even after passages in media without antibiotics for 4—6 months.

After storage at 4°C for a month, it was found that this variant became unable to grow on ordinary nutrient agar but was still able to grow on glucose-glycerine agar. By direct impression smear stained with HCl-Giemsa, it was found that the colonies consisted of large bodies with chromatin granules with marked pleomorphism. Such a process was considered to be similar to that of L-form formation, but no regenerative forms were found in the culture filtrate.