

鼠伤寒沙门氏菌对三甲氧苄二氨嘧啶耐药机制的研究

胡彦民

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

对临床分离的鼠伤寒沙门氏菌进行了三甲氧苄二氨嘧啶 (TMP) 耐药机制的研究。结果表明, 50 株鼠伤寒沙门氏菌对 TMP 的耐药率为 76%, 其中 7 株菌对 TMP 高度耐药。7 株耐药菌中有 4 株含有不同的质粒。TMP 耐药质粒可以在种内和种间转移, 而且 8% 的 SDS 可以有效地消除 R 质粒。比较不同 TMP 耐药菌和对照菌的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 活力和特性得出, 鼠伤寒沙门氏菌 TMP 耐药机制为: 无质粒菌的 TMP 耐药是由于染色体编码的 DHFR 过量产生所致, TMP 对该酶的产生起诱导作用。含质粒菌是由于 R 质粒编码产生了 Ia 型抗 TMP 的 DHFR 和 R 质粒编码产生了另一种新型的抗 TMP 的 DHFR, 后者目前尚无报道。此研究结果为临床合理用药及控制致病菌的耐药性发展和传播提供了理论依据。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌; 三甲氧苄二氨嘧啶; 耐药机制

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 是近年来世界各地沙门氏菌感染中最常见的致病菌, 约占 23—78%^[1]。该菌引起的感染常呈暴发流行, 在国内外均有增多的趋势, 对抗生素的耐药性也渐增加, 常呈多重耐药^[2,3]。国内外使用三甲氧苄二氨嘧啶 (trimethoprim TMP) 治疗由该菌引起的感染, 取得了很好的疗效。TMP 抑制叶酸代谢中二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase DHFR) 的活性, 与磺胺药合用可双重阻断细菌的叶酸代谢, 与抗生素合用可协同杀菌。

随着 TMP 的广泛使用, 其耐药菌也日渐增多。据对我国包头和上海的调查, 鼠伤寒沙门氏菌对 TMP 的耐药率各为 35—88% 和 60% 以上^[4,5]。然而, 对其耐药机制的研究国内尚无报道, 不了解国内各种致病菌 TMP 耐药的模式。国外在这方面已做了深入的研究, 普遍认为细菌对 TMP 耐药主要表现在以下几个方面: 1. 染色体编码的 DHFR 过量产生; 2. 产生了染色体编码的抗 TMP 的 DHFR; 3. 产生了由质粒或转座子决定的抗 TMP 的 DHFR^[6]。但是, 不同的临床致病菌对 TMP 的耐药机制因不同国家、地区和不同的医院而异。本文报道鼠伤寒沙门氏菌对 TMP 耐药情况以及耐药机制的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种及其来源

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 50 株系由河北医学院第二医院临床分离, 并经该院细菌室鉴定。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) A 从临床分离, 对 TMP 敏感, 对链霉素耐药。大肠杆菌 K12 J6-2 含质粒 R483, 该质粒编码 DHFR Ia 型酶。以上两株大肠杆菌由伦敦大学伦敦医学院微生物系 Mair Powll 博士提供。

(二) 培养基

1. 肉汤培养基 (NB)(%): 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, pH 7.2—7.6。营养琼脂 (NA): NB 100ml, 2% 琼脂。

2. DST 培养基为 Oxoid 公司产品。

(三) 最小抑制浓度测定

采用琼脂二倍稀释法^[7]测定 TMP、磺胺嘧啶、四环素、链霉素、氯霉素、庆大霉素对 50 株鼠伤寒沙门氏菌的最小抑制浓度 (MIC)。TMP 为 Sigma 公司产品, 其余均为市售产品。将在 NB 中 37 °C 培养 5 小时的菌液经 100 倍稀释, 用多点接种器分别定量接种于含上述抗菌药物的 DST 平板上。各种抗菌药物的浓度范围为 0.25—265 μg/ml。37 °C 培养 18 小时, 记录 MIC。

(四) 质粒 DNA 的提取

质粒 DNA 的提取过程参考文献 [8] 的碱性裂解法。

(五) 电泳

采用文献 [9] 的方法。用含 0.8% 琼脂糖的 TBE(89mmol/L, Tris HCl, 8.9mmol/L 硼酸, 2.5 mmol/L EDTA, pH8.0) 制凝胶电泳板, 在水平电泳槽中电泳, 再在溴化乙锭 (0.5 μg/ml) 中染色 40 分钟, 紫外灯下照相。

(六) 质粒消除

参考 SDS(十二烷基磺酸钠) 质粒消除法^[10]。用 TMP 作为抗性标记。分别吸取 0.1ml 用 NB 37 °C 振荡培养 12 小时的质粒含有菌, 接种于 10ml 含 8% 和 10%SDS 的 NB 中, 37 °C 振荡培养, 间隔 24 小时取样, 经适当稀释后涂布于 DST 培养基平板上, 37 °C 培养 24 小时。用影印法将单菌落接种于含 TMP25 μg/ml 的 DST 平板上。在含药平板上没有形成菌落的菌株, 质粒已被消除。

(七) 质粒转移实验 (细菌接合实验)

将含有质粒的鼠伤寒沙门氏菌作为供体菌, 它们对 TMP 耐药, 而对链霉素敏感。作为受体菌的有 *E. coli* A 和一株临床分离的鼠伤寒沙门氏菌-3。这两株菌对链霉素耐药, 对 TMP 敏感。将供体菌和受体菌分别接种于 NB 中, 37 °C 培养 6 小时。将供体菌和受体菌等量接种于 10 ml NB 中, 37 °C 缓慢振荡 24 小时。稀释成 10^{-4} 和 10^{-5} 后, 取 0.1ml 稀释菌液涂布于含有 TMP(25 μg/ml) 和链霉素 (25 μg/ml) 的药敏培养基 (DST) 平板上和仅含有链霉素 (25 μg/ml) 的 DST 平板上, 37 °C 培养 24 小时。前者上形成的菌落为接合子 (即杂交菌株), 后者上的菌落为受体菌。计算每毫升接合子数和受体菌数。

$$\text{接合率} = \frac{\text{接合子数 (杂交菌株)}}{\text{受体菌数}} \times 100\%$$

(八) 二氢叶酸还原酶粗酶液的提取

采用了 de Groot 等人的方法^[11]。

(九) 蛋白质浓度的测定

采用考马斯兰蛋白质浓度测定法^[12]。

(十) 酶活力测定和稳定性试验

粗酶液中 DHFR 活力的测定引用 Osborn, M. J. 的紫外分光光度计法^[13], 并加以修改。酶反应体积为 1ml, 其中含 50 μ mol/L 的磷酸缓冲液, pH7.5, 10 μ mol/L 的巯基乙醇, 0.1 μ mol/L 的 NADPH, 0.1 μ mol/L 的二氢叶酸 (NADPH 和二氢叶酸均为 Sigma 公司产品)。将这些物质混合后, 于 30 $^{\circ}$ C 水浴预热 3 分钟, 加入 50 μ l 的酶液反应。利用岛津 UV-265 紫外分光光度计 340nm 处测定 OD 值, 并记录 15 分钟内随时间变化 OD 值下降的曲线。DHFR 的酶活力定为每毫克蛋白质中的酶活力单位, 用 u/mg 蛋白表示。在上述测定条件下, 每分钟引起光密度下降 0.001 为一个酶活力单位 (u)。

在研究 TMP 对 DHFR 活性的抑制作用时, 酶反应液与上述相同。只是 TMP 与磷酸缓冲液在测定前混合。将含 TMP 的磷酸缓冲液与 NADPH 和酶液混合后, 30 $^{\circ}$ C 水浴中保温 3 分钟, 再加入二氢叶酸反应。TMP 的最终浓度为 10⁻²—10⁻⁹mmol/L。把抑制 DHFR 50% 活力的 TMP mol/L 浓度称为 50% 抑制浓度, 用 TMP ID₅₀ 表示。

DHFR 热稳定性试验的酶反应液同上。将酶与磷酸缓冲液混合, 在 45 $^{\circ}$ C 水浴中预热 10 分钟, 迅速置冰浴中冷却, 加入二氢叶酸和 NADPH, 测定酶活力。热处理后, 把抑制 DHFR 50% 活力所需的时间用 45 $^{\circ}$ C ID₅₀ 表示。

结 果

(一) 最小抑制浓度的测定

从临床分离的 50 株鼠伤寒沙门氏菌 TMP 的 MIC 在 8 μ g/ml 以上的有 38 株, TMP 耐药率为 76%。其中 7 株菌 TMP 的 MIC 在 32 μ g/ml 以上。将这 7 株菌的耐药性列于表 1。

表 1 7 株鼠伤寒沙门氏菌的耐药性

Table 1 Drug-resistance of seven strains of *S. typhimurium*

鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	MIC (μ g/ml)					
	TMP	SM	Cm	Tc	Gm	Sm
36	128	64	256	64	<0.12	<0.25
29	64	32	128	<1	<0.12	<0.25
47	64	32	128	<1	<0.12	<0.25
8	64	32	128	<1	<0.12	<0.25
19	32	<1	<0.25	<0.25	<0.12	<0.25
44	32	<1	<0.25	<0.25	<0.12	<0.25
5	32	<1	<0.25	<0.25	<0.12	<0.25

注: Sm: 磺胺甲基嘧啶 Sulfamerazine.

Cm: 氯霉素 Chloramphenicol.

Tc: 四环素 Tetracycline.

Gm: 庆大霉素 Gentamicin.

Sm: 链霉素 Streptomycin.

表 1 结果表明, 7 株耐药菌对 TMP 均表现为高度耐药。36、29、47 和 8 菌株属于多重耐药菌。19、44、5 菌株仅对 TMP 耐药。所有 7 株菌对庆大霉素和链霉素敏感。

(二) 耐药菌质粒电泳结果

7 株 TMP 耐药菌的质粒 DNA 电泳结果说明, 从医院中分离的鼠伤寒沙门氏菌多数含有质粒。菌株 29、47 和 8 含有大小相同的质粒, 质粒的分子量比较小。菌株 36 有两条质粒带, 分子量较大。在菌株 19、44、5 中未发现质粒存在。

(三) 质粒转移试验

表 2 鼠伤寒沙门氏菌之间及与大肠杆菌接合的接合率

Table 2 Frequency of conjugation of *S. typhimurium* and that of *S. typhimurium* with the strain of *E. coli*

供体菌 Donor strain 鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	受体菌 Recipient strain 大肠杆菌 <i>E. coli</i>	接合率 Frequency of conjugation	受体菌 Recipient strain 鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	接合率 Frequency of conjugation
36	A	2.2×10^{-6}	3	5.4×10^{-4}
29	A	4.0×10^{-5}	3	4.2×10^{-4}
47	A	2.5×10^{-5}	3	3.0×10^{-4}
8	A	2.3×10^{-5}	3	1.8×10^{-4}
19	A	0	3	0
44	A	0	3	0
5	A	0	3	0

从表 2 可以看出, 菌株 19、44、5 不能将 TMP 耐药性转移到受体菌。它们中不含质粒, 与电泳结果相吻合。其他 4 株菌均可以通过接合, 传递其 TMP 耐药性。它们和大肠杆菌的接合率为 10^{-5} , 与同种菌株的接合率为 10^{-4} 。鼠伤寒沙门氏菌 TMP 耐药质粒在种内传递的机率比种间传递的高。表 3 为供体菌株、受体菌株和杂交菌株对 TMP 以及其他药物的耐药性。

表 3 鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌和杂交菌株的耐药性 (MIC $\mu\text{g/ml}$)

Table 3 Drug-resistance of *S. typhimurium*, *E. coli* and their transconjugant strains

菌种 Strains		TMP	SM	Cm	Tc	Sm
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	36	128	64	256	64	<0.25
	29	64	32	128	<1	<0.25
	47	64	32	128	<1	<0.25
	8	64	32	128	<1	<0.25
大肠杆菌 <i>E. coli</i>		<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	128
杂交菌株 The trans- conjugant strains	36-A	128	64	256	64	128
	29-A	64	<0.12	<0.12	<0.12	128
	47-A	64	<0.12	<0.12	<0.12	128
	8-A	64	<0.12	<0.12	<0.12	128
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	3	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	128
杂交菌株 The trans- conjugant strains	36-3	128	64	256	64	128
	29-3	64	<0.12	<0.12	<0.12	128
	47-3	64	<0.12	<0.12	<0.12	128
	8-3	64	<0.12	<0.12	<0.12	128

表 3 表明, 两株对 TMP 敏感的受体菌, 与菌株 36 接合后, 杂交后代不仅获得了供体菌的 TMP 耐药性, 而且还获得了对磺胺嘧啶、氯霉素、四环素的耐药性。这四种耐药基因

同时转移, 位于一个多重耐药质粒上。菌株 29、47 和 8 与受体菌接合, 杂交菌株仅获得了 TMP 的耐药性, 这些菌株的 TMP 耐药基因单独位于分子量较小的质粒上。可见分子量大的质粒与多重耐药性有着密切的关系。

(四) 质粒消除实验

经 SDS 处理后, 发现 4 株含质粒的 TMP 耐药菌中有 TMP 敏感菌株出现。而且 8% 的 SDS, 48 小时消除的效果最好, 敏感菌株出现的频率, 菌株 36 为 47%; 菌株 29、47、18 分别是 31%、35% 和 33%。后三株菌质粒消除的情况十分相似, 它们的 TMP 耐药基因可能是由同一种质粒携带的。随机选出 10 株质粒消除菌进行 TMP 的 MIC 测定, MIC 的平均值均小于 $0.125 \mu\text{g/ml}$ 。

(五) 连续培养对 TMP 耐药性的影响

将 7 株 TMP 耐药菌在 $4-64 \mu\text{g/ml}$ 的 TMP 药敏培养基中连续培养, 最后测定 TMP 的 MIC (表 4)。

表 4 TMP 培养后鼠伤寒沙门氏菌 TMP 耐药性的变化
Table 4 Changes of TMP resistance of *S. typhimurium* after incubation with TMP

菌株 Strains	TMP 培养前 TMP 的 MIC ($\mu\text{g/ml}$) MIC of TMP before incubation with TMP	TMP 培养后 TMP 的 MIC ($\mu\text{g/ml}$) MIC of TMP after incubation with TMP
36	128	128
29	64	64
47	64	64
8	64	64
19	32	128
44	32	128
5	32	128

由表 4 可知, 通过 TMP 的连续培养, 4 株含质粒菌的 TMP 耐药性未受影响, 而不含质粒的菌株 19、44、5 对 TMP 的 MIC 由 $32 \mu\text{g/ml}$ 增至 $128 \mu\text{g/ml}$ 。由此可见, TMP 对无质粒的鼠伤寒沙门氏菌的 TMP 耐药性有明显的诱导作用。

(六) 二氢叶酸还原酶活力比较

从 7 株 TMP 耐药和 5 株 TMP 敏感的鼠伤寒沙门氏菌及 *E. coli* K12 J6-2 中提取 DHFR 粗酶液, 测定其 DHFR 活力 (图 1)。5 株 TMP 敏感菌的 DHFR 活力分别为 0.6、0.59、0.62、0.61、0.6 u/mg 蛋白, 取其平均值代表染色体编码的 DHFR 活力。

图 1 表明, 7 株 TMP 耐药菌 DHFR 的活力均显著高于染色体 DHFR 的活力。可以分为三组: 菌株 19、44 和 5 的 DHFR 活力是染色体的 9.7 倍; 菌株 29、47 和 8 是 26.38 倍; 菌株 36 的 DHFR 是染色体的 41.67 倍, 具有很高的活力。与 Ia 型 DHFR 活力比较, 菌株 29、47 和 8 的酶活力很接近, 而菌株 36 的酶活力则偏高。

部分消除了质粒的菌株, 杂交菌株及经 TMP 诱导的无质粒耐药菌株的 DHFR 活力见图 1。菌株 36 (图 1 中 36a) 失去 R 质粒后, DHFR 降至 0.73u/mg 蛋白, 与染色体的 DHFR 活力相似。说明该菌的 TMP 耐药是由质粒决定的。由于菌株 3 获得了菌株 36 的 TMP 耐药质粒, 杂交菌株 36-3 的酶活力随之增加。经 TMP 诱导的菌株 19、44 和 5 的 DHFR 活力, 比不经诱导时增加了近 2 倍。

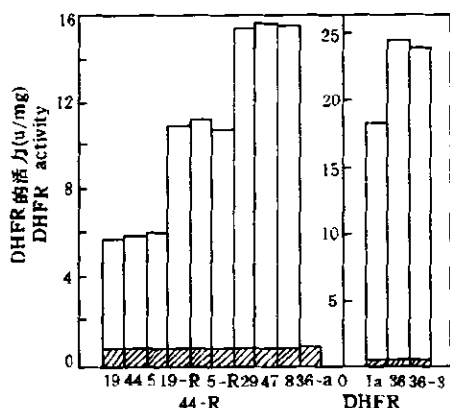


图1 二氢叶酸还原酶活性比较

19-R、44-R、5-R: TMP 培养后 DHFR 活力;
36-a: 质粒消除后的菌株 36 的 DHFR 活力;

▨ 染色体 DHFR 活力。

Fig. 1 Comparison of DHFR activities

19-R, 44-R, 5-R: DHFR activity after TMP incubation; 36-a: DHFR activity of strain No. 36 after plasmid-curing; ▨ Chromosomal DHFR activity.

(七) 二氢叶酸还原酶的特性

1. TMP 对 DHFR 的抑制: 表 5 结果表明, 抑制菌株 7、19 和 44 的 DHFR50% 活力的 TMP 浓度与抑制染色体的 DHFR 的相同, 为 10^{-8} mol/L, 而抑制菌株 29、44 和 8 的 DHFR50% 活力的 TMP 浓度与抑制 Ia 型酶的相同, 为 10^{-4} mol/L。抑制菌株 36 DHFR50% 活力需要更高的 TMP 浓度。

2. 热稳定性: 由表 5 可见, 经 45 °C 处理后, 菌株 19、44 和 5 的 DHFR 活力抑制 50% 所需的时间与染色体 DHFR 的接近, 为 11 分钟。这些 DHFR 较耐热。菌株 29、47 和 8 的 DHFR 对热不稳定, 只需 1—1.5 分钟即抑制了一半的酶活力。菌株 36 的 DHFR 对温度更加敏感, 50% 酶活力被抑制的时间仅为 0.7 分钟。

表 5 二氢叶酸还原酶特性

Table 5 Characteristics of DHFR of *S. typhimurium* and *E. coli*

菌株 Strains	DHFR 活力 (u/mg 蛋白) DHFR activity	TMP 的 ID50(mol/L) ID50 of TMP	45 °C ID50(min)
鼠伤寒沙 门氏菌	3	0.6	13
	7	0.58	13
	19	5.79	11
<i>S. typhimurium</i>	44	5.86	11
	5	6.0	11
	29	15.78	1.0
	47	15.81	1.2
	8	15.89	1.5
	36	25	0.7
<i>E. coli</i>	K12 J6-2	18.6	1.0

讨 论

目前国内外认为, 鼠伤寒沙门氏菌对于抗菌药物的耐药性比其他沙门氏菌更强。本文报道的 50 株从临床分离的鼠伤寒沙门氏菌对 TMP 的耐药率为 76%, 而且耐药性强。

细菌耐药性最常见的是通过 R 质粒的获得或质粒的重新组合。本实验结果表明, 鼠伤寒沙门氏菌的 TMP 耐药质粒可以在种内和种间传播, 具有较广泛的寄主。TMP 耐药性并不是由同一种或同一个质粒决定的, 不同酶活性的 DHFR 的基因位于不同的 R 质粒上, 这使得 TMP 耐药基因有更多的转移机会。所以研究鼠伤寒沙门氏菌的 TMP 耐药机制在肠道菌中具有普遍意义。这种多重耐药基因和单独耐药基因自律地在细菌之间广为传播,

是引起耐药菌增多的主要原因。因此, 控制 R 质粒的转移是值得重视的问题。本实验利用 8% 的 SDS 可以消除掉部分 R 质粒, 使抗性菌恢复为敏感菌, 可以降低细菌的耐药性。正确消除质粒消除剂, 有利于杜绝 R 质粒的传播及耐药性的发展。

根据 Pentti Huovinen 的报道^[6], 到目前为止, 已经发现了 9 种由质粒编码的 DHFR, 它们在结构上不同于染色体编码的 DHFR, 主要表现在与 TMP 的结合位点发生了改变, 从而降低了与 TMP 的亲合能力而表现为 TMP 抗性。其中由转座子和质粒决定的 I 型 DHFR 和仅由质粒决定的 II 型 DHFR 是临床上主要的 TMP 抗性酶, 它们的活力高于其他型的 DHFR, 为 TMP 高度抗性。此外, 染色体编码的 DHFR 的过量生成也是 TMP 耐药的原因之一。如何区别 DHFR 是由质粒决定的还是染色体酶的过量产生, 许多研究都以 DHFR 对 TMP 的敏感程度和 DHFR 的热稳定性作为主要依据。I 型 DHFR 表现为热不稳定, 其 50% 活力被抑制的 TMP 浓度是 10^{-4} mol/L; II 型酶具有较高的热稳定性, 抑制 50% 酶活的 TMP 浓度为 10^{-2} mol/L; 染色体的 DHFR 酶活力低, 50% 抑制浓度为 10^{-8} mol/L, 对热稳定^[6]。

本研究中 7 株耐 TMP 的鼠伤寒沙门氏菌的 DHFR 的活力显著地高于敏感菌中染色体 DHFR 的。其中 3 株无质粒菌的 DHFR 50% 抑制的 TMP 浓度与染色体酶的相同, TMP 可以有效地和 DHFR 结合, 在很低浓度时对该酶则产生抑制作用, 并表现为热稳定。这三株菌在含有 TMP 的培养基中连续培养之后, TMP 的 MIC 明显增加, TMP 诱导了 DHFR 的生成。本研究结果表明, 这三株菌所表现出的 TMP 耐药是由于染色体的 DHFR 过量产生所致。另外 4 株耐药菌均含有质粒, 其 TMP 耐药性可以转移, SDS 处理消除质粒后, TMP 耐药性随之消失。它们的 DHFR 酶活性很高, 酶特点也不同于染色体的 DHFR。它们的 TMP 耐药是由 R 质粒决定的。这 4 株菌的质粒型 DHFR 属于两种不同的抗性酶, 其中 3 株菌的 DHFR 的活力和特点与 I 型 DHFR 相似, 它们属于 I 型 DHFR。菌株 36 的 DHFR 具有很高的酶活力, 需要 10^{-2} mol/L 的 TMP 才能抑制 50% 的活力, 这点类似于 II 型酶。但是该酶对温度的敏感程度又高于 I 型酶, 它是区别于 I 型酶和 II 型酶的一种新型 DHFR。本研究结果表明, 鼠伤寒沙门氏菌对 TMP 耐药的机制主要表现为: 1. 染色体编码的 DHFR 过量产生; 2. 由 R 质粒编码生成 Ia 型 DHFR; 3. 由 R 质粒编码产生了一种新型的 DHFR。

参 考 文 献

- [1] Abbott, J. D. et al.: *J. Hosp. Infect.*, **1**: 307, 1980.
- [2] 汪复等: 中华传染病杂志, (4):205, 1986。
- [3] MacDonald, K. L. et al.: *JAMA*, **258**:1496, 1987.
- [4] 安家瓊等: 中华流行病学杂志, (2):257, 1981。
- [5] 王静莉等: 中华传染病杂志, (5):2, 1987。
- [6] Huovinen, P.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**:1451-1456, 1987.
- [7] Powell, M.: *Br. Med. J.*, **295**:176-179, 1987.
- [8] T. 曼尼阿蒂斯等著 (余茂效译): 分子克隆操作指南, 第 66 页, 科学出版社, 北京, 1986 年。
- [9] 徐洵等主编: DNA 重组技术, 第 45-46 页, 科学出版社, 1990 年。
- [10] Tomoeda, M. et al.: *J. Bacteriol.*, **95**: 1078-1089, 1968.
- [11] de Groot, R. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**:477-484, 1988.
- [12] 李琳等: 植物生理学通讯, (6):51-55, 1980。
- [13] Osborn, M. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **233**: 969-974, 1958.

STUDIES ON THE MECHANISMS OF RESISTANCE TO TRIMETHOPRIM IN *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Hu Yanmin

(Biology Department, Hebei Teachers University, Shijiazhuang 050016)

The mechanisms of resistance to trimethoprim (TMP) in the clinical isolates of *Salmonella typhimurium* were studied. The experimental results indicated that the frequency of TMP resistance of 50 strains of *Salmonella typhimurium* was 76%. Seven of the resistant strains were highly resistant to TMP and four of them contained different plasmids which could transfer in the same species and between different ones, and could be eliminated with 8% of SDS. The results of comparing the activities and characteristics of dihydrofolate reductase (DHFR) in crude extracts from seven resistant strains and those from controls suggested that overproduction of the chromosomal DHFR was the resistance mechanisms in three plasmid-free strains and the levels of DHFR activity of the strains was increased during prolonged exposure to TMP in vitro. However resistance to TMP of the plasmid-containing strains resulted from production of plasmid-mediated TMP resistant type Ia DHFR and a new type DHFR which has not been reported up to now. The present work provided the theoretical basis for clinical use of TMP and attempts to suppress development and spread of drug resistance of pathogenic bacteria.

Key words *Salmonella typhimurium*; Trimethoprim; Mechanism of resistance