

# 痢疾杆菌对三甲氧苄氨磺胺的耐药变异

北京医学院微生物教研组\*

细菌性痢疾的发病率高,病原菌的耐药率亦高,因此,选择有效易得的防治药剂,是个重要问题。本文报道痢疾杆菌对三甲氧苄氨磺胺(TMP)产生耐药变异的频率及程度,并报道检查有无对TMP的耐药转移因子的结果。据此推定了TMP用于治疗细菌性痢疾的可能性。

## 材料与方 法

### 一、菌株、药物与培养基

#### (一) 菌株

供试痢疾杆菌共17株,其中9株为福氏志贺氏菌 $F_{2a}$ 型,2株 $F_{2b}$ 型,2株 $F_{1b}$ 型,1株 $F_x$ 型,1株鲍氏志贺氏菌1—5型,1株宋氏志贺氏菌,1株志贺氏志贺氏菌2型;1株大肠杆菌;1株副大肠杆菌。全部菌株均系1975年从密云县菌痢患者的粪便中分离获得。

#### (二) 药物

TMP及磺胺甲基异噁唑(SMZ)均为粉末,不含赋形剂,卡那霉素和先锋霉素为针剂。

#### (三) 培养基

菌株转移接种和测定药物最小抑菌浓度(MIC),用5%冻化人血球肉水的液体或固体培养基;测定耐药突变率,用2%葡萄糖肉水琼脂。卡那霉素或先锋霉素加入普通肉汤或肉汤琼脂中使用。

### 二、痢疾杆菌耐药突变率的测定方法

选择对TMP相当敏感的痢疾杆菌7株,经

肉汤37℃培养18小时后,稀释 $10^1$ 和 $10^3$ 倍,取此两种稀释菌液各0.1毫升分别涂布不含药物的2%葡萄糖肉水培养基平板,以及含TMP(2微克/毫升)、含TMP(2微克/毫升)和SMZ(18微克/毫升)的同种培养基平板。37℃培养48小时,统计菌落数,求出耐药突变率。将耐药突变株接种含药物的液体培养基,并转移接种数次,以便观察耐药突变株的稳定性。

### 三、痢疾杆菌在含药物培养基中的转移接种

将37℃培养18小时的菌液稀释 $10^3$ 倍,取0.1毫升稀释菌液接种在含TMP(1微克/毫升)的,含TMP(1微克/毫升)和SMZ(9微克/毫升)的,以及含卡那霉素(10微克/毫升)的液体培养基中,各1毫升。37℃培养24小时后,又取0.05毫升接种到新鲜培养基中,如此连续转接10次。每次培养液均涂布平板培养基上,长出的菌落经血清学鉴定,若有污染,应由上一次培养液中取菌液重新接种。

### 四、TMP耐药转移因子的检测

#### (一) 供体菌与受体菌的选择

由供试菌株中,用药物筛选法选出对卡那霉素(或先锋霉素)敏感、对TMP中度耐药的菌株作为供体菌;以对卡那霉素(或先锋霉素)耐药、对TMP敏感者为受体菌。

\* 由陈慰峰执笔。

## (二) 耐药因子的传递试验

将供体菌与受体菌的 37℃ 24 小时肉汤培养物以 1:9 (体积比) 相混合, 将混合液接种在肉汤培养基中, 37℃, 培养 24 小时后, 稀释  $10^3$  倍, 用灭菌棉竿蘸取菌液, 涂布于含卡那霉素(或先锋霉素)的平板培养基上, 挑出对卡那霉素(或先锋霉素)耐药的菌落(即受体菌), 用水配成浓度为  $10^9$  个/毫升的菌悬液, 涂布于含 TMP 的平板培养基上, 37℃ 培养 48 小时后, 观察菌落生长情况。如受体菌对 TMP 出现耐药性, 则可认为供体菌具有 TMP 耐药转移因子。

## 实验结果

### 一、痢疾杆菌对 TMP 及 TMP+SMZ 的耐药突变率

7 株痢疾杆菌对 TMP 及 TMP + SMZ 的耐药突变率, 视药物浓度而异。当培养基中 TMP 浓度为 2 微克/毫升时, 耐药突变率为  $7.22 \times 10^{-6}$ — $3.70 \times 10^{-10}$ ; 当培养基中含 TMP 2 微克/毫升和 SMZ 18 微克/毫升时, 耐药突变率为  $8.12 \times 10^{-6}$ — $1.26 \times 10^{-10}$ ; 当培养基中含 TMP 5 微克/毫升时, 耐药突变率为  $8.20 \times 10^{-8}$ — $9.81 \times 10^{-13}$ ; 当培养基中含 TMP 5 微克/毫升和 SMZ 45 微克/毫升时, 耐药突变率为  $5.50 \times 10^{-8}$ — $3.52 \times 10^{-13}$ 。

将耐药突变株接种在肉汤内, 37℃ 培养 24 小时后, 稀释  $10^3$  倍测定药物对它们的 MIC, 结果见表 1。由表 1 可见, 有些耐药菌株经再次培养后又回复突变为敏感株(如菌株 2 号, 6 号和 7 号)。

痢疾杆菌的耐药突变株在含药物的培养基中长成两种类型的菌落: 一种为粗糙型, 菌落呈花边状; 另一种为光滑型, 菌落较光滑。前者菌体为长杆状, 联成长链, 转接到未加药物的平板培养基上, 生长缓慢, 48 小时后长成较光滑

的小菌落, 菌体仅少数为长杆状, 如在含 TMP (2 微克/毫升) 的液体培养基中转移接种 2—3 次, 即不再生长, 连续转接 15 次后未见再生长; 后者菌体为中型的大杆状, 在含 TMP 的培养基中可稳定地生长, 连续转接 15 次后均生长良好。

### 二、痢疾杆菌在含药物培养基中转移接种时的耐药突变率

(一) 在含 TMP 及 TMP + SMZ 的液体培养基中转移接种

供试的 17 株痢疾杆菌对 TMP 均敏感, 其中有 4 株对 SMZ 敏感, 13 株对 SMZ 有耐药性。将此 17 株菌的 37℃、18 小时培养物稀释  $10^3$  倍后, 连续在含 TMP (1 微克/毫升) 的液体培养基中培养—接种—培养, 有 2 株菌出现稳定的耐药性(如 1 号及 23 号菌株); 在含 TMP (1 微克/毫升) 和 SMZ (9 微克/毫升) 的液体培养基中连续培养—接种—培养, 有 3 株出现稳定的耐药性(1 号、23 号、35 号); 而且这些耐药菌株对 TMP 的耐药性均显著增加(表 2)。

(二) 在含卡那霉素的液体培养基中转移接种

可在含 10 微克/毫升卡那霉素的培养基中生长的 9 株菌中, 有 2 株菌经 10 次转移接种后仍保持稳定的耐药性, 且对卡那霉素的耐药程度比原始菌株增加 4—8 倍(见表 3)。

### 三、TMP 耐药转移因子的检测

采用两组供体菌和受体菌。

第一组:

供体菌: 表 2 所列 1 号菌株, 对卡那霉素敏感 ( $MIC < 10$  微克/毫升), 对 TMP 中度耐药 ( $MIC$  为 400 微克/毫升)。

受体菌: 福氏志贺氏菌  $F_{24}$  型菌株, 大肠杆菌, 副大肠杆菌。此三株菌对 TMP 敏感 ( $MIC$

表 1 TMP 对痢疾杆菌耐药突变株的 MIC

菌株号	1	2	6	7	8	23	35
MIC (微克/毫升)	12.5	0.78	0.78	0.78	25	6.25	1.5

表 2 体外诱导痢疾杆菌对 TMP 的耐药突变

菌株号	菌型	原始菌株对药物的敏感性 [MIC (微克/毫升)]		在含药物培养基中转移接种					
				可转接次数		对药物的敏感性 [MIC (微克/毫升)]			
				TMP (1 微克/ 毫升)	TMP (1 微克/ 毫升)+ SMZ (9 微克/ 毫升)	转接 1 次后		转接 10 次后	
		TMP	SMZ			TMP	TMP+SMZ	TMP	TMP+SMZ
35	志贺氏志贺氏菌 2 型	0.78	8000	7	10*	3.1	6.25	—	400
23	宋氏志贺氏菌	0.78	8000	10*	10*	12.5	12.5	50	100
1	福氏志贺氏菌 F <sub>x</sub> 型	0.20	>8000	10*	10*	200	200	400	400

\* 这些菌株在转接 1—2 次后生长较弱,第 3 次转接后便生长旺盛。

表 3 体外诱导痢疾杆菌对卡那霉素的耐药突变

菌株号	菌型	原始菌株对卡那霉素的敏感性 [MIC (微克/毫升)]	在含卡那霉素培养基上转接培养 10 次后,对卡那霉素的敏感性 [MIC (微克/毫升)]
2	福氏志贺氏菌 F <sub>1b</sub> 型	10	40
9	福氏志贺氏菌 F <sub>1a</sub> 型	10	80

<0.7 微克/毫升),对卡那霉素耐药 (MIC > 10 微克/毫升)。

第二组:

供体菌: 经 10 次转移接种的痢疾杆菌,对 TMP 耐药 (MIC=400 微克/毫升),对先锋霉素敏感 (MIC < 5 微克/毫升)。

受体菌: 福氏志贺氏菌 F<sub>1b</sub> 型菌株,对 TMP 敏感 (MIC = 0.2 微克/毫升),对先锋霉素耐药 (MIC > 5 微克/毫升)。

将以上两组菌分别混合培养,均未证实有对 TMP 耐药转移因子存在。

讨 论

在含有浓度近于有效血浓度的 TMP 和 TMP+ SMZ 的培养基中,多数痢疾杆菌在前者中的耐药突变率较在后者中为高,7 株菌中只有 1 株情况相反。但是,值得注意的是,在这两种培养基中连续转移接种,耐药性稳定菌株的出现频率并无区别。可以认为,从长远效果看,TMP 和磺胺药物合并应用,并不足以降低使痢疾杆菌对 TMP 的耐药突变率降低。这与我们以

前的结果一致<sup>[1]</sup>。即对 TMP 高度敏感,对 SMZ 高度耐药的痢疾杆菌菌株,在联合药敏试验中,反有个别菌株出现拮抗现象。Lewis<sup>[2]</sup>, Lacey<sup>[3]</sup>等也有过类似报告。Lewis 认为,加有 TMP 的复方新诺明对尿中大肠杆菌的杀菌作用,其实是 TMP 单独的作用。

TMP 及卡那霉素对痢疾杆菌的诱导耐药突变率近似。从本文结果看,在含药物的培养基中连续转移接种,产生耐药性稳定菌株的比例,在卡那霉素中反较在 TMP 中稍高,而耐药程度则相反。在药物诱导耐药突变时,药物的浓度与突变频率有关,而与耐药程度关系不大。Bushby<sup>[4]</sup> 用含 100 微克/毫升 TMP 的培养基获得可耐受 500 微克/毫升 TMP 的菌株,我们用浓度为 1 微克/毫升的 TMP,也获得了可耐受 200 微克/毫升的菌株。所以,接近于有效血浓度的 TMP,即可促成或筛选出对 TMP 发生耐药变异的痢疾杆菌菌株。

虽然在大肠杆菌及克雷伯氏菌中已报道过对 TMP 耐药因子的传递<sup>[5,6]</sup>。在痢疾杆菌间却未检测到。其原因或许是因为它对 TMP 轻度

至中度耐药的特性,是受染色体基因控制,而不是在游离基因上<sup>[7]</sup>。

以上结果表明,在体外,单独用 TMP 对痢疾杆菌的杀菌作用,并不亚于卡那霉素;痢疾杆菌对 TMP 的耐药突变率也不高于其它细菌。对磺胺药物高度耐药的痢疾杆菌菌株,其稳定耐药变异菌株的出现频率,并不能被 TMP + SMZ 降低。但 TMP 能否单独用于治疗细菌性痢疾,尚须临床药理试验及临床实践证实。

### 参 考 文 献

- [1] 北京医学院医疗系 73—6 班工农兵学员,北京医学院微生物教研组:北京医学院学报,2:102, 1976。
- [2] Lewis, E. L. et al.: *J. Clin. Pathol.*, 27: 87, 1974.
- [3] Lacey, R. W. et al.: *Lancet*, 1: 409, 1972.
- [4] Bushby, S. R. M.: *Postgraduate Med. J.* (Suppl.), 45: 10, 1969.
- [5] Fleming, M. P. et al.: *Brit. Med. J.*, 1: 726, 1972.
- [6] Datta, N. and R. W. Neges: *J. Gen. Microbiol.*, 72: 349, 1972.
- [7] Lewis, E. L. and R. W. Lacey: *J. Clin. Pathol.*, 26: 175, 1973.