

無乳鏈球菌對青黴素及鏈黴素之抗藥性誘發研究

陳守仕 邱朝齊 林光榮

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

自從青黴素發現以後，許多細菌性疾病的治療已獲得解決。其後幾乎每年都有數種新的抗生素被發現，細菌性的疾病醫療也就更爲容易。但是由臨床的經驗及實驗室的研究，顯示抗生素長期廣泛使用以後，許多病原性細菌也逐漸對之產生抗藥性。細菌對一種抗生素產生抗藥性以後，往往能同時對他種抗生素亦產生抗藥性，此即所謂交叉抵抗。抗藥性之產生通常是起自於生物學之突變及自然選擇。當一種細菌的族羣處於含有抗生素的環境中，易感性之菌體由於抗生素之存在而被消滅，而獲得抵抗性之菌體則由於能耐過而繼續分裂增殖，於是在此細菌的族羣中，抵抗性之菌體愈來愈多，於是此種細菌對此抗生素之抵抗性遂越趨提高，形成抗藥性問題。

無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 爲本省乳牛乳房炎之最主要病原菌，經本所 (1971) 調查的結果佔各種病原菌總頻度之66%，尤其在較大規模的牧場，其頻度高達90%，此種病原菌，雖然對青黴素及鏈黴素一般言之皆甚敏感，但是有抵抗性之菌株亦經常可見。邱朝齊 (1971) 等²⁾，以無乳鏈球菌與金黄色葡萄狀球菌對抗生素感受性加以檢討，發現本菌對青黴素具有抗藥性菌株佔13%，而對鏈黴素則爲45%。此兩種抗生素爲乳房炎治療上最常用之抗生素，爲明瞭本菌對此二種藥劑抗藥性產生之速度，特以試管中試驗法實施抗藥性之誘導，以明瞭抗藥性產生之趨勢，以供臨床治療上之參考。

材 料 和 方 法

無乳鏈球菌係由全省各地之乳房炎乳汁分離得到者，在試驗之初爲菌株分別實施 CAMP Test 和生化學性狀鑑定，由其中選擇20株性狀穩定者供試。試驗以前各菌株以5%牛血液寒天平皿培養，選擇單一菌落繼代於 Trypticase broth，經18小時培養後供試。試驗用抗生素以 Penicillin G 和 Streptomycin 二種，試驗前以 Cylinder Test Method 在 Difco Antibiotic Assay Media No 1, 用 *Staphylococcus aureus* ATCC 6358P (USA) 之標準株，測定其確實力價，然後在試管中依照2倍幾何階實施系列稀釋，測定此兩種抗生素對供試無乳鏈球菌之最小抑制量，然後再以低於最小抑制量濃度實施累代繼代，觀察本菌之抗藥性產生情形。

試驗時上述抗生素以 Trypticase broth 稀釋到所須濃度時以 10×65mm 之小試管作成濃度系列，使每試管分別注入含抗生素 broth 2 ml 最後再加入 Trypticase broth 18 小時培養之 *Streptococcus agalactiae* 1:10 稀釋菌液 1 滴以滅菌橡皮皮栓密蓋後置 37°C 定溫箱培養24小時，判定其最小抑制濃度。試驗前各菌株先行起始 MIC 之測定，然後在低濃度下繼代，每5代實施 MIC 測定 1 次至30代止。

試 驗 結 果

起始最小抑制量之測定結果

由乳牛乳房炎乳汁分離之鏈球菌235株，依照平戶氏和 Wilson 兩氏之方法實施生化學性狀檢查，觀察其溶血性狀，肉汁及血液寒天之發育性狀，Gram 染色形態，Catalase, CAMP Test, 10°C, 45°C, 60°C/30分 6.5% NaCl, PH 9.6, 0.1% Methyleneblue, NH₄ 及馬尿酸鈉分解，10%及40%膽汁，石蕊牛乳凝固，Gelatin 液化，糖類發酵包括 Trehalose, Lactose, Sorbitol, Raffinose, Manitol 之分解等，鑑定 Streptococcus agalactiae，其中155株依生化學性狀鑑定為 Streptococcus agalactiae 佔鏈球菌病原之 66%，此等菌株再於試驗之初實施最小抑制量測定，結果，87%對 Penicillin 及 10% 對 Streptomycin 呈現高度敏感。其抵抗性菌株之百分率分別為 Penicillin 13%，Streptomycin 45% (表 1、表 2)

Tab. 1. Resistance of *Sc. agalactiae* (155 strains) to Penicillin

MIC (iu/ml)	0.05	0.1	0.5	1.0	1.0
No. strains	40	55	39	—	21*
percentage	26	36	25	—	13

* Percentage of Resistance

Tab. 2. Resistance of *Sc. agalactiae* (155 strains) to Streptomycin

MIC (mcg/ml)	10	50	150
No. strains	30	55	70
percentage	20	35	45*

* Percentage of Resistance

無乳鏈球菌在低濃度抗生素環境下累代繼代結果：

I. Penicillin 由上述測定結果選敏感之無乳鏈球菌20株實施 Penicillin和 Streptomycin低濃度下累代繼代30代結果 Streptococcus agalactiae 對 Penicillin 之 MIC 變化如(圖 1)。

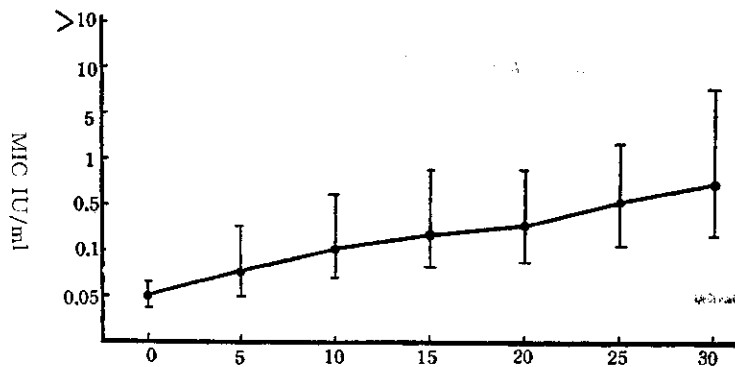


圖1. Streptococcus agalactiae 20株在含有低濃度 penicillin培地中繼代後抵抗性之變化。

由圖中顯示亦最小抑制量之變化並不顯著，在累代繼代之初 20 株之最小抑制量全為 0.05IU/ml，其後每五代繼代後即以同法測定 MIC。其平均 MIC 之變化不大，但株間變異則增加，即有部份菌株呈 MIC 增加現象，但由於其比例小故平均 MIC 之變化有限。

II. Streptomycin :

Streptococcus agalactiae 在含有 Streptomycin 之 Trypticase broth 繼代結果，平均 MIC

之變化比 Penicillin 顯著。起始最小抑制量為10mcg/ml，經累代繼代後MIC之變化如圖 2 所示，經過起初 5 代以後 MIC 均有顯著提高，至第十代 MIC 平均增高15倍，其後仍然繼續增加且變異加大。

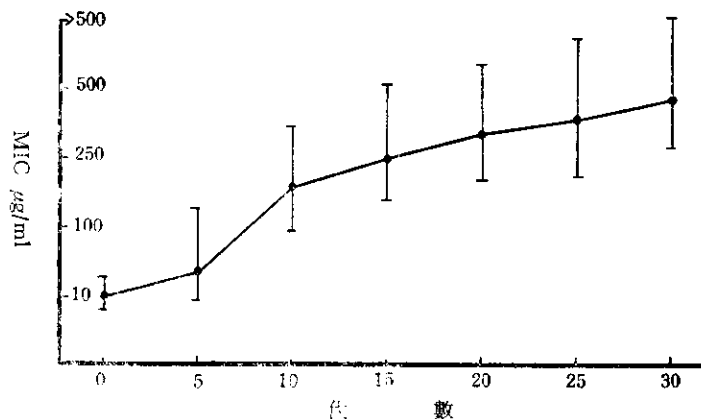


圖2. Streptococcus agalactiae 20 株在含有 Streptomycin 培地中繼代30代之抵抗力變化

生化學性狀及形態學之改變：

經含有抗生素培養基累代繼代後之 Streptococcus agalactiae 在形態上稍有變化，即菌落變小，且在 Gram Stain 之性狀上亦變為較不穩定，部份菌株之溶血性能減退或消失。

討 論

病原菌對抗生素之抵抗力已普遍受醫學界之注意，尤其在臨床治療上常面臨許多困擾。以往視抗藥性之產生為一種選擇性，因其具有抵抗某種抗生素之特性而能繼續存在，以致此類病原在其族羣中逐漸增多。但 POOLOCK(1971)⁷⁾ 研究細菌遺傳時發現抗藥性之形成，除選擇性以外，原可由類似遺傳因子之轉移 (Transfer) 而引起，即已獲得抵抗力之菌體，能將其抵抗抗生素之特性經由菌體之化學物質 (DNA) 傳遞至其他敏感菌體，使其產生相同之抵抗力。

無乳鏈球菌為本省乳牛乳房炎之最主要病原菌，其性狀及抗生素抗藥性之觀察自有其重要性。金黃色葡萄球菌具有抵抗 Penicillin 之菌株具有 Penicillinase 此種 Penicillinase 可由敏感菌株不斷與 Penicillin 接觸後而產生，早在1941及1948即分別由 ABRAHAM⁴⁾ 和 BELLAMY⁵⁾ 等在試管中加以誘導成功。其抗藥性之產生快而且強，一旦產生後即能永遠保持。鏈球菌雖然對 Penicillin 之抗藥性亦能由試驗加以誘導，一般而言 Streptococcus 之抗藥性產生速度慢，通常在10倍左右 (TOPLEY, WILSON, 1966)¹¹⁾。依 TODD et. al.¹⁰⁾ 1945 和 GEZON (1948)⁶⁾ 之觀察結果 Streptococcus 產生抗藥性後，再經不含抗生素之培地繼代後能使其抗藥性消失。其中 Group A 最易喪失其抗藥性，Group B, C，則較慢。本試驗結果 Streptococcus agalactiae 在 Penicillin 經 30 代繼代後，其平均最小抑制量亦增加大約10倍。SCHMIDT & SESLER (1943)⁸⁾ 以青黴素處理之小白鼠能使 Pneumococci 誘導抗藥性且此抗藥性能經久保持。基於本試驗及文獻之資料顯示 Streptococcus agalactiae 對 Penicillin 之抗藥性產生速度緩慢。在本省分離之無乳鏈球菌對 Penicillin 具有抗藥性者約13%，由此觀之單就 Penicillin 對 Streptococcus agalactiae 一種而言，抗藥性的問題尚未如想像般之嚴重。

Penicillin 之抗藥性與 Streptomycin 者不同，前者之產生通常緩慢且大多為暫時性，而後者則產生快且常永久保持 (TOPLEY & WILSON 1966)¹²⁾，本試驗結果 Streptococcus agalactiae 在含有 Streptomycin 之 broth 中繼代五代以及平均最小抑制量即有顯著增加，其後仍不斷提高。

在乳房炎臨床治療上 Penicillin 和 Streptomycin 爲最常用之製劑，根據此次檢查155株 *Streptococcus agalactiae* 對 Streptomycin 之敏感性試驗，發現45%之 Strain 對 Streptomycin 具有抗藥性，此種結果可能與 Streptomycin 之抗藥性誘導速度快有關，據 Schultz, et. al (1969)⁹⁾ 以 Penicillin G 對 streptococcus Group C, E, K 人實施低濃度繼代亦發現抗藥性之誘發緩慢，通常僅4~8倍左右，但在誘發後之細菌，其生化性狀亦有所改變。在血液寒天中菌落變小，且降低溶血能力，毒力及對白血球吞食抵抗等均減弱。對糖類之分解能則後有改變。此與本試驗中所做之觀察結果相近似。

結 論

由20株無乳鏈球菌實施 Penicillin 和 Streptomycin 之抗藥性誘發試驗證明無乳鏈球菌在低濃度的 Penicillin 或 Streptomycin 之培養液中累代繼代能誘導其產生抗藥性。無乳鏈球菌對 Penicillin 抗藥性之誘發緩慢，且所誘發之抗藥性並未太高，僅得起始 MIC之10倍(變域2~50倍)。對 Streptomycin 之抗藥性則誘發快，起初五代繼代即得起始 MIC 之15倍(變域1~25倍)，此後急速增加達50倍(變域10~150倍)。經誘導產生抗藥性之菌株在生物學性狀及形態上略有變異。

誌 謝

本試驗承蒙國科會補助在此特申謝忱。

參 考 文 獻

1. 邱朝齊等(1971)：本省北部地區乳牛乳房炎調查報告
臺灣省家畜衛試研報 No. 8, P51~55
2. 邱朝齊、陳守仕等(1971)：
無乳鏈球菌與金黃色葡萄球菌對抗生素感受性之比較試驗
臺灣省家畜衛試研報 No. 8, P40~50
3. 平戶勝七：獸醫微生物學，日本養賢堂版
4. ABRAHAM E. P. et. al. 1941
Lancet. 177, 191. (in Topley's and Wilson's Principles of Bacteriology and immunology)
5. BELLAMY, W. D. and KLIMEK, J. W. 1948
J. Bact. 55, 147 (in Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunology)
6. GEZON, H. M. 1948
Proc. soc. exp. biol. N. Y. 67, 208, 212, 215
(in principles of bacteriology and immunology)
7. POOLOCK, P. R. and W. HAYES, 1971
Memorandum on some bacteriological and genitic aspects of transmissible drug resistance in Joint Committee on the use of antibiotics in animals husbandry and veterinary medicine. report, 1971. p.67-68
8. SCHMIDT, L. H. and SESLER, C. L. 1943
Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 52.353
9. SCHULTZ, R. D. et. al. 1969
Effect of sublethal concentrations of penicillin G on groups C., E, K, and L Streptococci
Amer. J. Vet. Res. 30, 1451-1459

10. TODD, E. W. 1946
Lancet, 172
11. WILSON G. S. and Mile, A. A. 1966
Principles of B acteriology and Immunity
Edward Arnold London

Studies on Induced Resistance of Streptococcus A galactiae Against Penicillin and Streptomycin

Taiwan Provincial Research Institute for animal Health

Chen Shou-She, Chiu Tsau-chi, Lin Kuan-Jung

Summary

Two hundred and thirty five strains of Streptococci which were isolated from various area of Taiwan Province. Streptococcus agalactiae was determined firstly by means of CAMP test and biological methods.

Twenty antibiotic sensitive Streptococcus agalactiae with stable character were then selected by means of antibiotic sensitivity test. The abovementioned strains were passaged in Trypticase broth in which containing either Penicillin or Streptomycin. The MIC was checked every five passages by means of Tube Dilution Method.

The results indicated that resistance to penicillin or streptomycin could be induced in the broth containing the antibiotics. Resistance was induced slowly in penicillin and the induced resistance only in about 10 fold (range 2-50) . The resistance to streptomycin was induced rapidly. In first five passages, Streptococcus agalactiae increased its resistance to streptomycin by five fold in average (range 1-25) . then up to 50 fold (range 10-150) . Changes in biological character and morphology had also been observed in induced antibiotic strains.