

## *Aeromonas hydrophila* 及 *Edwardsiella tarda* 對數種抗菌劑之抗藥性研究

### Studies on the Resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* to Some Antimicrobics

劉朝鑫<sup>1</sup>·王渭賢<sup>2</sup>

Liu Chaw-King<sup>1</sup> and Wang Way-Shyang<sup>2</sup>

#### Abstract

The sensitivity test of five antimicrobics: Nalidixic acid (NA), Oxolinic acid (OA), Flumequine (Fq), Stretomycin (SM), and Chloramphenicol (CM) were detected with plate dilution method. *A. hydrophila* and *E. tarda* were more sensitive to NA, OA, and Fq than to SM and CM, and the result of sensitivity test in former group showed that OA, Fq, NA was their order. Among the 104 resistant *A. hydrophila* strains, there were only 4 strains (3.8%) possessed transferable R plasmids. There were 23 strains (19%) had transferable R plasmids among the 121 resistant *E. tarda* strains. The resistant pattern of all transferable R plasmids was only anti-CM. The resistant indexes of the continuous ten passages of *A. hydrophila* and *E. tarda* to NA, OA, and Fq had been obtained. The maximal resistant indexes to NA were 16, and 32, respectively; and the indexes of both OA and Fq were 4. The resistant index curves of these three antimicrobics were ascending with a very gentle slope. There was not a complete cross-resistance relationship among Nalidixic acid, Oxolinic acid, and Flumequine.

#### 緒 言

以抗生素及化學藥品來控制水產動物疾病之蔓延，是目前被公認為最有效、最經濟之方法。但至今尚未有專為水產動物發展之藥物，目前大多是沿用人醫及獸醫所使用之藥品來治療水產動物之疾病，雖然效果很好，但却為人類帶來抗藥菌所產生的後遺症 (Aoki & Kitao, 1981; Roberts, 1978)。

Nalidixic acid, Oxolinic acid 及 Flumequine 三種抗菌劑，屬於 Quinolone 化合物，原本使用於人類之尿道感染治療，效果相當好，但是在種種因素之影響下，並未大量使用，僅在緊急情況及其它藥物具有抗藥性時才使用 (Engle *et al.*, 1982; Espinasse *et al.*, 1983)。而今這一類抗菌劑使

1. 國立臺灣大學獸醫學研究所 (Institute of Veterinary Medicine, National Taiwan University)
2. 國立臺灣大學獸醫學研究所，現在通訊處美國緬因大學微生物學系 (Institute of Veterinary Medicine, National Taiwan University, present address: Department of Microbiology of University of Maine, Orono, Maine, U.S.A.)

用於魚類，但魚體病原菌對其感受性及抗藥性之情形，至今尚不很清楚(Engle *et al.*, 1982; Robert, 1985; Yamagishi *et al.*, 1981)，所以本實驗以養殖環境中最常見的 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 兩種病原菌，針對 Nalidixic acid、Oxolinic acid 及 Flumequine 三種抗菌劑，研究這兩菌對這些藥物之感受性情形、抗藥性之產生情形、R質體 (R plasmid) 之檢出情形，及三種藥物相互間的交叉抗藥性 (Cross resistance) 情形，並以 Streptomycin 及 Chloramphenicol 做比較。提供今後使用此類抗菌劑時之參考。

## 材料與方法

### 供試菌株

在本研究中，供轉移性 R 質體 (transferable R plasmids) 檢出實驗時所使用之受容菌 *Escherichia coli* K-12 Substrain RC 85 及 HB 101，係承蒙日本宮崎大學青木博士所提供。

### 測定菌株

依據 (皆川等，1983; McDaniell, 1979; Shatts & Rimler, 1973; Wyatt, 1979) 之分離方法，並依 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, 1984), Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Koneman *et al.*, 1983) 之細菌生化性狀做為菌株鑑定之標準。分別自吳郭魚腸內容物、吳郭魚池池水、鰻魚內臟及鰻魚池池水分離出 *A. hydrophila* 菌株共有 225 株及 201 株之 *E. tarda* 菌株。這些菌株均於 1986 年 7 月至 9 月間分離收集。

### 抗菌劑

- (1) Chloramphenicol (Sigma)
- (2) Flumequine (Lab. Piker/3M)
- (3) Nalidixic acid (Sigma)
- (4) Oxolinic acid (INOVET-Animal Health Division of Debat Lab.)
- (5) Streptomycin (Sigma)

### 方 法

#### 一、藥物感受性測定

本測定之方法係參考 (Anderson, 1961; Koneman *et al.*, 1983; 蔡, 1984) 等方法；以平板稀釋法來測定菌株對各種抗菌劑之感受性情形。

#### 二、轉移性 R 質體之檢出

對具有抗藥性之菌株篩選出來，做 R 質體之檢出，其方法係參考 Aoki (Aoki *et al.*, 1977; Aoki and Kitao, 1981) 及郭等 (郭及鍾, 1980) 之方法而實施。

#### 三、連續十代菌株對抗菌劑之抗藥性指數測定

本測定係參考 Liu (Liu, 1980; Liu, 1982) 之方法實施。

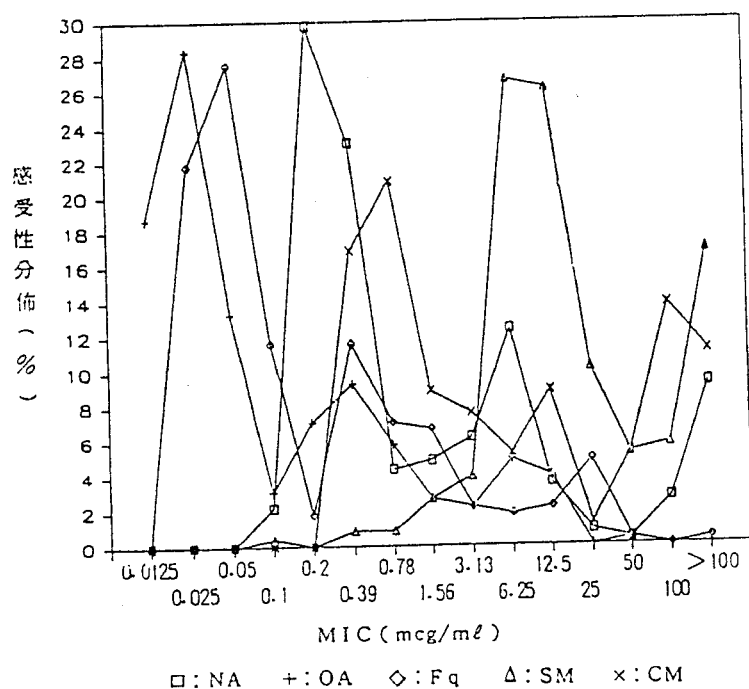
#### 四、Nalidixic acid, Oxolinic acid 及 Flumequine 間之交叉抗藥性測定

在 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 諸菌株中各選出 5 株 (其最小抑制濃度 MIC 靠近 25 mcg/ml 者)，依藥物感受性測定之方法分別對 Nalidixic acid, Oxolinic acid 及 Flumequine 做測定。反覆培養，直到該菌株產生抗藥性為止，再分別測定該菌株對其它兩種抗菌劑之最小抑制濃度值。

## 結 果

### 一、藥物感受性測定

*A. hydrophila* 對此五種抗菌劑之 MIC 值範圍，分佈相當廣（如圖一所示）。其抗藥性菌株之相對百分比分別為 NA 13% (29/225), OA 1% (2/225), Fq 6% (13/225), SM 38% (85/225), CM 31% (70/225)。



圖一 *A. hydrophila* 菌對五種抗菌劑之感受性分佈。

*E. tarda* 對此五種抗菌劑之 MIC 值範圍，分佈亦相當廣（如圖二所示）。其抗藥性菌株之相對百分比分別為 NA 23% (47/201), OA 4% (7/201), Fq 13% (27/201), SM 33% (66/201), CM 43% (86/201)。

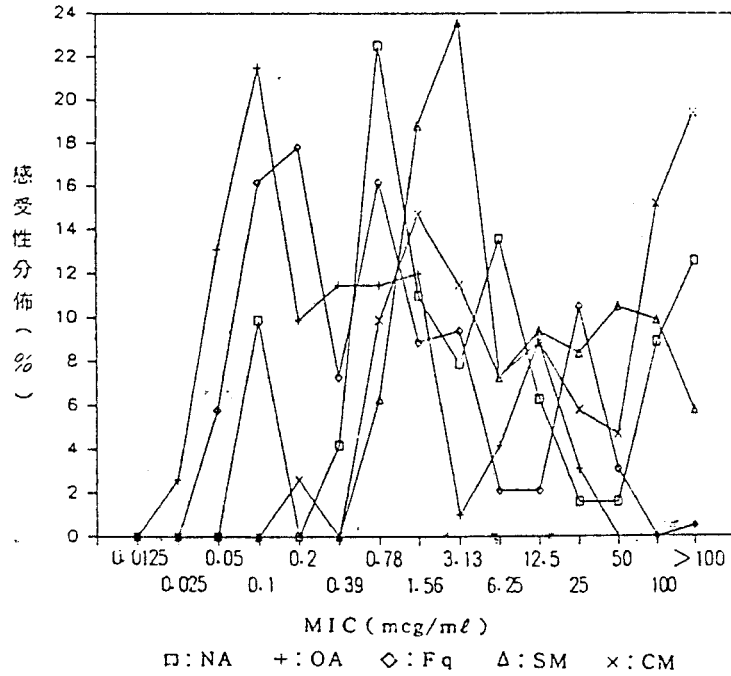
### 二、轉移性 R 質體之檢出

在 104 株具有抗藥性之 *A. hydrophila* 菌株中僅有 4 株 (3.8%) 具有 R 質體，並且 R 質體之抗藥性型態為抗 CM（如表一所示）。在 121 株具有抗藥性之 *E. tarda* 菌株中可檢出 23 株 (19%) 具有轉移性 R 質體之菌株，並且所有 R 質體之抗藥性型態亦均為抗 CM（如表二所示）。

### 三、連續十代菌株對抗菌劑之抗藥性指數測定結果

分別將 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 對 Nalidixic acid, Oxolinic acid 及 Flumequine 三種抗菌劑之抗藥性指數繪製成抗藥性指數曲線（如圖三~八所示）。

在四株 *A. hydrophila* 菌株中之最高抗藥性指數分別為：Nalidixic acid 為 16，而 Oxolinic acid 及 Flumequine 均為 4。在四株 *E. tarda* 菌株中之最高抗藥性指數除了 Nalidixic acid 為 32 外，Oxolinic acid 及 Flumequine 亦均為 4。



圖二 *E. tarda* 菌對五種抗菌劑之感受性分佈。

表一 *A. hydrophila* 之抗藥性型態及其R質體之型態

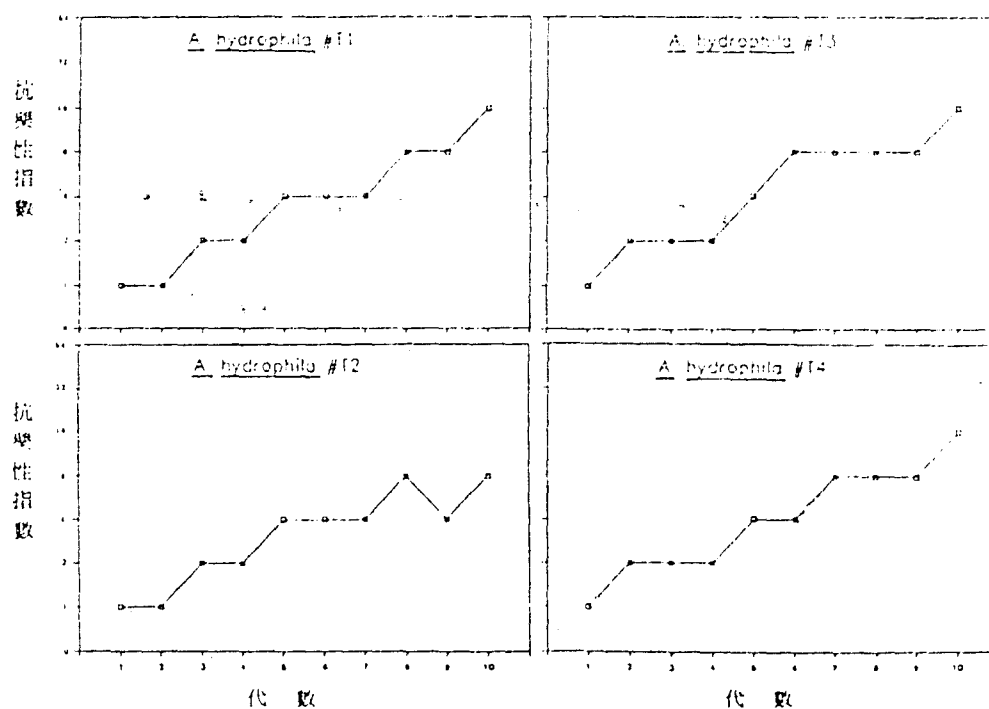
菌株抗藥性型態	抗藥性菌株		R 質 體		R 質體型態
	數	目	數	目	
NA	1		0		
OA	1		0		
SM	29		0		
CM	7		0		
NA·SM	3		0		
NA·CM	5		0		
SM·CM	38		4		CM
NA·Fq·CM	5		0		
NA·SM·CM	7		0		
NA·Fq·SM·CM	7		0		
NA·OA·Fq·SM·CM	1		0		
總 計	104		4		

四、Nalidixic acid, Oxolinic acid 及 Flumequine 間之交叉抗藥性測定結果

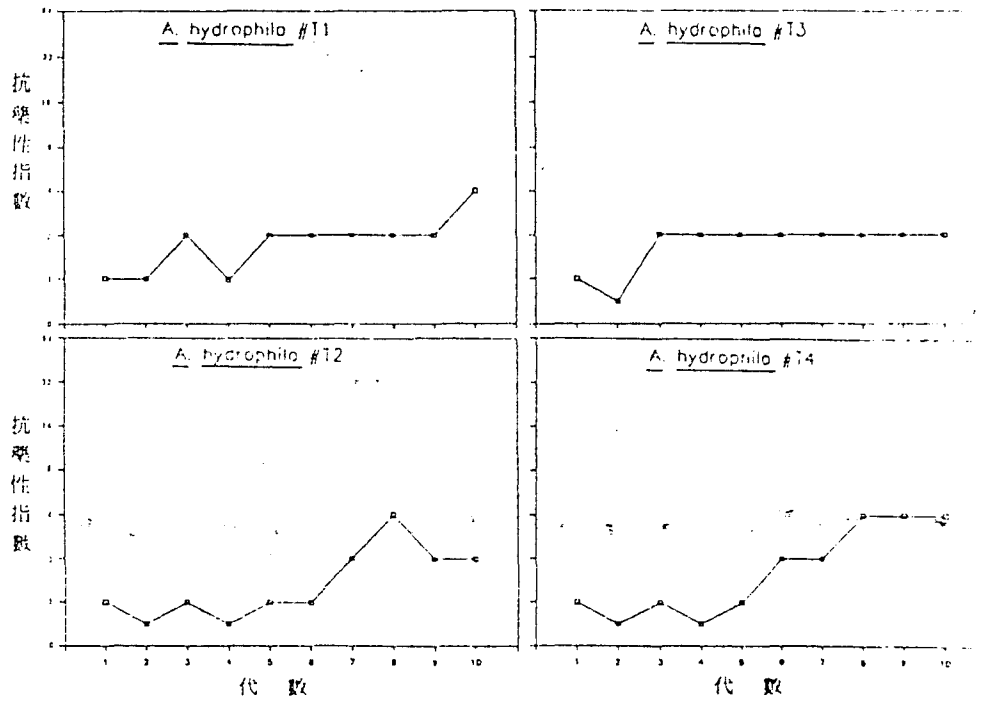
Nalidixic acid、Oxolinic acid 及 Flumequine 之間不具有完全交叉抗藥性之關係。當 *A. hydrophila* 或 *E. tarda* 菌株對 NA 有抗藥性時，對 OA 及 Fq 却尚不具有抗藥性；而當此二菌對 OA 有抗藥性時，會同時對 NA 及 Fq 均有抗藥性；而當此二菌對 Fq 有抗藥性時，會對 NA

表二 *E. tarda* 之抗藥性型態及其R質體之型態

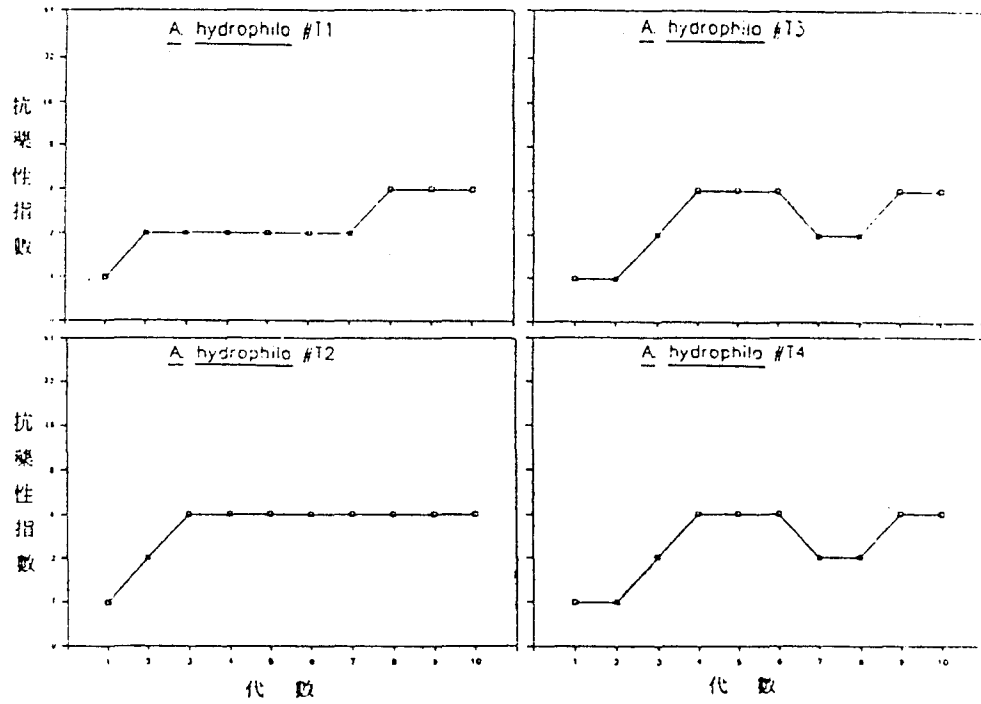
菌株抗藥性型態	抗藥性菌株		R 質 體	
	數	目	數	目
NA	15		0	
SM	16		0	
CM	32		10	CM
NA·SM	1		0	
NA·CM	4		1	CM
SM·CM	22		8	CM
NA·Fq·CM	4		2	CM
NA·SM·CM	4		0	
NA·Fq·SM	1		0	
OA·Fq·SM	1		0	
NA·Fq·SM·CM	15		1	CM
NA·OA·Fq·CM	1		0	
OA·Fq·SM·CM	3		0	
NA·OA·Fq·SM·CM	2		1	CM
總 計	121		23	



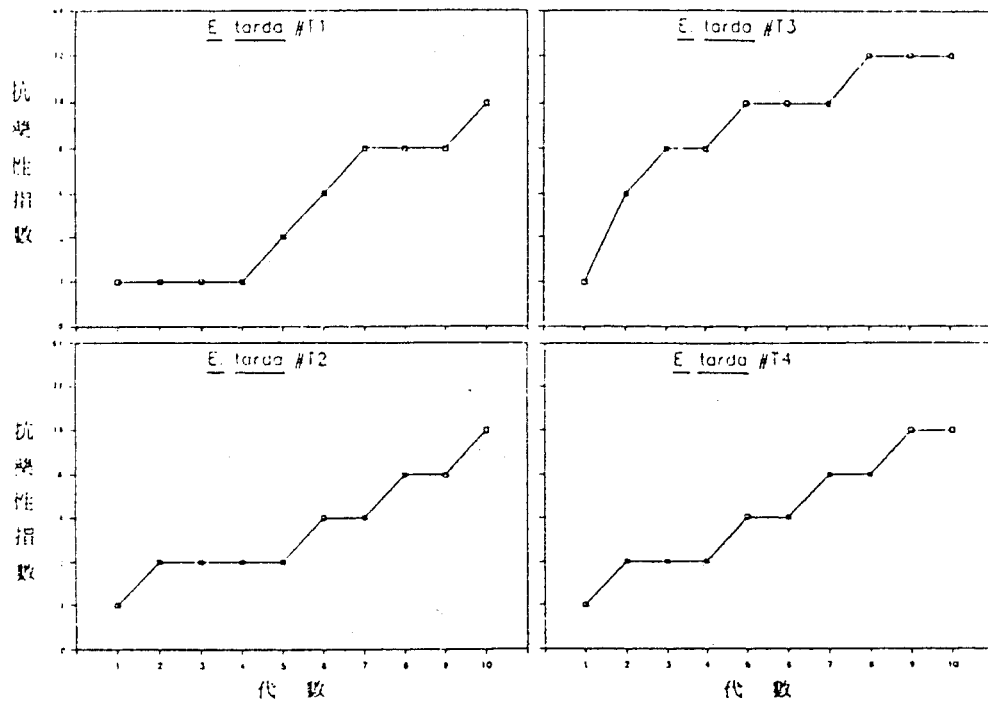
圖三 *A. hydrophila* 菌株之 Nalidixic Acid 抗藥性指數曲線。



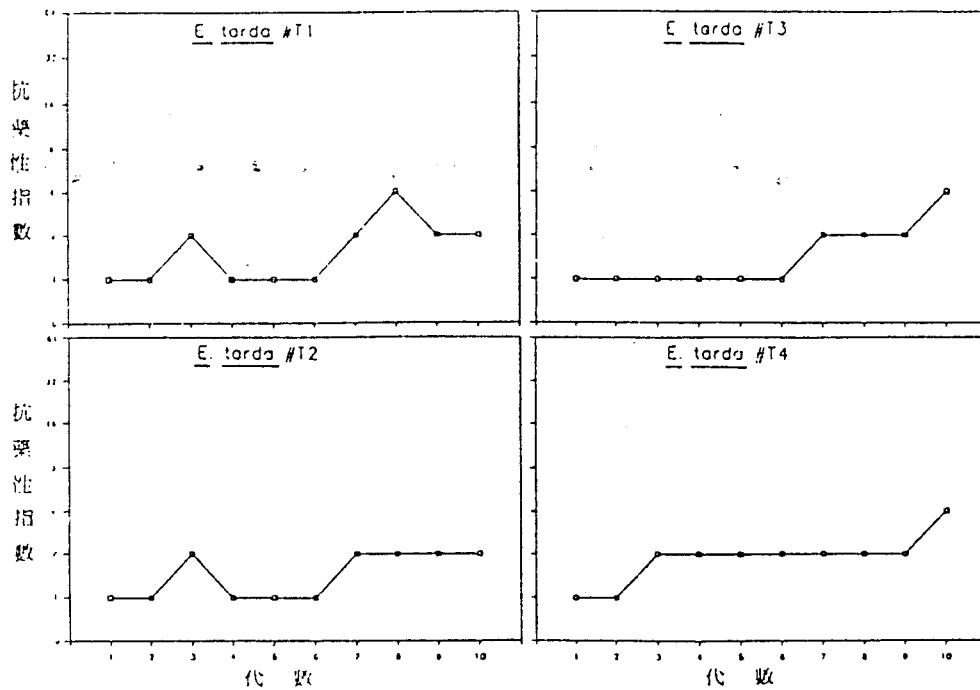
圖四 *A. hydrophila* 菌株之 Oxolinic Acid 抗藥性指數曲線。



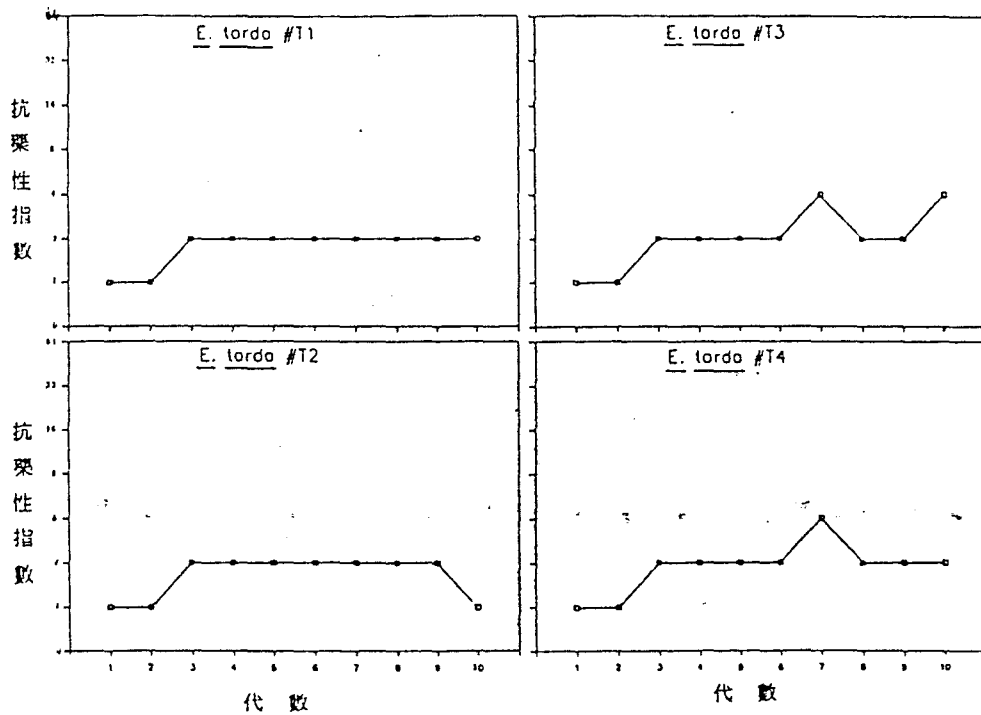
圖五 *A. hydrophila* 菌株之 Flumequine 抗藥性指數曲線。



圖六 *E. tarda* 菌株之 Nalidixic Acid 抗藥性指數曲線。



圖七 *E. tarda* 菌株之 Oxolinic Acid 抗藥性指數曲線。



圖八 *E. tarda* 菌株之 Flumequine 抗藥性指數曲線。

有抗藥性，但對 OA 不見得一定會有抗藥性。不過，菌株對此三種抗菌劑中之任一者具有抗藥性時，菌株對其它二者之感受性均會降低。

### 討 論

本研究結果顯示 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 對 NA、OA 及 Fq 之感受性均較 SM 及 CM 之感受性為佳；並且對 NA、OA 及 Fq 之感受性次序為 OA > Fq > NA。其可能的原因在於這些抗菌劑之制菌機制之不同；NA、OA、Fq 之制菌機制在於細菌複製之前期，不活化細菌之 DNA gyrase，而 SM 及 CM 之制菌機制在於細菌複製之後期，抑制細菌之蛋白質合成。所以此可能是細菌對 NA、OA、Fq 較對 SM 及 CM 不易產生抗藥性之原因。

轉移性 R 質體僅能在對 SM 及 CM 有抗藥性之菌株中檢出，且 *E. tarda* 可檢出 R 質體之百分比比較 *A. hydrophila* 為高，此與 R 質體之檢出菌大多為腸內菌科之細菌為主之說明吻合 (Panhotral *et al.*, 1982; Rangnekar, 1982)。本研究所檢出之 R 質體的抗藥性型態僅有抗 CM 而已，並且非常有趣的是在轉移性 R 質體檢出測定，竟然對 NA、OA 及 Fq 有抗藥性之菌株中無法檢出 R 質體。此與一般 (Ravagnan, 1985) 認為此類之抗菌劑會抑制細菌間 R 因子之傳遞相吻合。因此，細菌對此類藥物產生抗藥性的機制可能由於染色體之改變 (mutation) 而引起 (Yamagishi *et al.*, 1981)。

由連續十代抗藥性指數測定結果顯示，無論是 *A. hydrophila* 或 *E. tarda* 對 NA、OA 及 Fq 之抗藥性指數曲線，上升之速度及幅度均非常小；此說明了 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 對此類藥物產生抗藥性的速度較慢。因此使用此類藥物來治療 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 感染症是非常妥當之方法。

本研究中之交叉抗藥性測定，與過去 (Greenwood, 1978) 之結果有所不同，本研究結果顯示 Nalidixic acid、Oxolinic acid 及 Flumequine 三者間雖然構造非常相似却不具有完全交叉抗藥



性之關係存在。因此，在使用此三種抗菌劑時，要考慮其使用之次序。否則，如當病原菌對 Oxolinic acid 有抗藥性時，再使用 Nalidixic acid 及 Flumequine 是沒有多大效果，只是增加治療之費用成本而已。

由本研究結果顯示 Nalidixic acid、Oxolinic acid 及 Flumequine 三者對於魚病病原菌之抗菌效果比一般的化學治療劑及傳統的抗生素好，並且三者之抗藥性菌株，均不具有轉移性 R 質體，又其抗藥性指數非常低。因此，此三種抗菌劑在防治水產動物疾病工作上似乎值得使用。不過，此類抗菌劑在魚體內之藥物動力學、副作用及殘留問題尚不很清楚，值得再進一步去研究及探討。

### 摘 要

以平板稀釋法，測定 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 菌株對 Nalidixic acid (NA)、Oxolinic acid (OA)、Flumequine (Fq)、Streptomycin (SM) 及 Chloramphenicol (CM) 等五種抗菌劑之感受性，結果發現此兩菌對 NA、OA 及 Fq 之感受性均較 SM 和 CM 之感受性為高；而對 NA、OA 及 Fq 三者之感受性，以 OA 最高，Fq 次之，而 NA 最低。在總共 104 株具有抗藥性 *A. hydrophila* 菌株中，僅有 4 株 (3.8%) 具有轉移性 R 質體；而在總共 121 株具有抗藥性 *E. tarda* 菌株中有 23 株 (19%) 具有轉移性 R 質體。非常有趣的是，所有的 R 質體抗藥性型態均為抗 CM。*A. hydrophila* 和 *E. tarda* 對 NA、OA 及 Fq 之連續十代抗藥性指數；NA 之最高值二者分別為 16 及 32，而 OA 及 Fq 之最高值兩者均為 4，並且這三種抗菌劑之抗藥性指數曲線上升之速度均非常緩慢，並且三者之間不具有完全交叉抗藥性之關係存在。

### 誌 謝

本報告之試驗經費承行政院農業委員會 (76 農建-8.1-漁-20P) 補助，謹申謝意。

### 參 考 文 獻

- 郭光雄、鍾虎雲。1980。養鰻池之 R<sup>+</sup> 抗藥細菌。魚病研究專集(三): 1-8。
- 蔡文城。1984。實用臨床微生物診斷學。第二版。九州出版社。臺北。
- 皆川武夫、中井敏博、室賀清邦。1983。養殖環境中における *Edwardsiella tarda*。魚病研究。17(4): 243-250。
- Anderson, T. G. 1961. An evaluation of antimicrobial susceptibility testing. In Antimicrobial Agents Annual. New York, Plenum press.
- Aoki, T., T. Arai and S. Egusa. 1977. Detection of R plasmids in naturally occurring fish pathogenic bacteria. *Edwardsiella tarda*. Microbil. Immunol. 21(2): 77-83.
- Aoki, T. and T. Kitao. 1981. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. Fish Pathol. 15(3/4): 277-281.
- Engle, E. C., S. H. Manes and K. Drlica. 1982. Differential effects of antibiotics inhibiting gyrase. J. Bacteriol. 149(1): 92-98.
- Espinasse, J., R. Collas, M. Viso, P. Tigeot, O. Cantegrel, G. Delvaux, P. Prtit, C. Le. Layec, A. Hervy and P. Lambert. 1983. Experimental reproduction of colibacillosis in new born calves, and its application to testing the efficacy of flumequine therapy. Recueil de Medecine Veterinaire. 159(1): 33-39.
- Greenwood, D. 1978. Activity of flumequine against *Escherichia coli*: In vitro comparison with nalidixic acid and oxolinic acid. Antimicrob. Agent. Chemother. 13(3): 379-483.

- Koneman, E. W., S. D. Allen, V. R. Dowell and H. M. Sommers. 1983. Color atlas and textbook of diagnostic Microbiology. 2nd. Ed. J. B. Lippincott company. New York.
- Krieg, N. R., *et al.* 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins company. Baltimore/London.
- Liu, C. K. 1980. A study on the application of neomycin sulfate for diseases of culture eels. Mem. Col. Agric. Nat. Taiw. Univ. 20: 35-44.
- Liu, C. K. 1982. Evaluation of trimethoprim and sulfonamide in bacterial diseases of eels. Proceedings of R. O. C.-U. S. cooperative science seminar of fish diseases. NSC Symposium Series. 3: 88-92.
- McDaniel, D. 1979. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Revised. Am. Fish. Soc.
- Panhotra, B. R., K. C. Agarwal and V. Agnihotri. 1982. Transferable-drug resistance in *Escherichia coli* isolated from food. Indian J. Med. Res. 76: 89-91.
- Rangnekar, V. M., D. D. Banker and H. I. Jhala. 1982. Drug resistance and incompatibility groups of R-plasmids in intestinal *Escherichia coli*. Indian J. Med. Res. 75: 492-500.
- Ravagnan, G., R. Piccolomini, A. M. Speciale, G. Russo and G. Remzini. 1985. In vitro synergistic activity of some chinolinic compounds combined with B-lactam antibiotics against Gram-positive and Gram-negative clinical isolates. Chemother. 31: 191-199.
- Robert, J. 1985. The quinolones. Ann. Inter. Med. 102(3): 400-401.
- Roberts, R. J. 1978. Fish pathology. Bailliere Tindall, London.
- Shotts, E. B. & R. Rimler. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. Appl. Microbiol. 26(4): 550-553.
- Wyatt, L. W., R. Nickelson II and C. Vanderzant. 1979. *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. Appl. Environ. Microbiol. 38(4): 710-714.
- Yamagishi, J. I., Y. Furutani, S. Inoue, T. Ohue, S. Nakamura and M. Shimizu. 1981. New nalidixic acid resistance mutations related to deoxyribonucleic acid gyrase activity. J. Bacteriol. 148(2): 450-456.