

魚類病原菌抗藥性之研究—I. 養鰻池 *Aeromonas hydrophila* 之抗藥性

劉朝鑫¹ 郭宗甫²

DRUG RESISTANCE OF FISH-PATHOGENIC BACTERIA I. *AEROMONAS HYDROPHILA* IN CULTURED EEL PONDS

Liu, C. K. ¹ AND T. F. Kuo²

Abstract

Drug resistance of *A. hydrophila* isolated from eel ponds and diseased eels were investigated. It was found that 79.16% of the isolates from the pond water and 98.53% from diseased eels showed resistance to one or more antimicrobics. R plasmid drug resistance were demonstrated in 37.98% of pond water isolates, 59.70% of diseased eel isolates. Resistance patterns of R plasmids from the former were often observed to SDM; CM, CTC, SDM; CTC, SDM; CM, SDM; and from the later CM, CTC, SDM; CTC, SDM; CM, SDM.

引 言

近年來抗菌劑普遍使用於養殖魚細菌性疾病之防治，減少疾病引起的損害，在增進養殖生產上有重要的貢獻。但另一方面有許多證據顯示，抗菌劑不適當的使用，是促成抗藥菌增加的重要因素（陳及郭1978；郭及鍾1980；Anderson and Lewis 1965；Anderson 1968；Aoki and Egusa 1971；Aoki et al 1972, 1974, 1977；Aoki and Kita 1981；Mitsuhashi 1979；Shotts et al 1976）。關於臺灣地區養鰻池之抗藥菌，過去雖有陳及郭（1978）與郭及鍾（1980）等之調查，但單獨對養鰻池池水或病鰻 *A. hydrophila* 做大規模之抗藥性調查，則尚無報告。抗藥菌之增加，尤其是具有R質體抗藥菌之增加，不僅在魚病防治上造成困難，在公共衛生上更是一嚴重的問題，值得吾人關切。*A. hydrophila* 不僅引起鰻魚之赤鰭病，而且會引起人體之感染（李等1983a；李等1983b），有瞭解其抗藥性情形之必要。本研究擬就臺灣地區養鰻池池水及病鰻分離所得之 *A. hydrophila* 之抗藥性及R質體之抗藥性情形提出報告。

材料及方法

一、*A. hydrophila* 之收集及鑑定

自民國72年9月至73年8月止，分別收集桃園、宜蘭、鹿港、雲林、嘉義及屏東等各地區之養鰻池池水及病鰻，帶回研究室分離 *A. hydrophila*。

A. hydrophila 之分離，是先將池水遠心分離（3,000 rpm, 15分鐘）濃縮後，倒去上層液，取

1.2. 分別為國立臺灣大學獸醫學系教授及講師。

1.2. Professor and instructor in the Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University,

下層液以白金耳塗抹培養於 Rimler-Shotts 培養基 (以下簡稱 RS 培養基) (Shotts and Rimler, 1973)。病鰻則經解剖後，從肝臟、腎臟及腸內容等，以白金耳取檢體塗抹培養於 RS 培養基。培養池水或病鰻檢體之 RS 培養基，在 35°C 之定溫箱中培養 24 小時後，選取呈黃色之菌落，經 Cytochrome Oxidase 試驗，呈陽性者確定為 *A. hydrophila*。

二、抗藥菌之選別

採用瓊脂平板稀釋法 (Anderson, 1970) 測定各抗菌劑對各分離菌之最小抑制濃度。使用抗菌劑為下列 5 種：Chloramphenicol, Chlortetracycline, Furazolidone, Kanamycin 及 Sulfadimethoxine。上述諸抗菌劑以下分別簡稱為 CM, CTC, FZD, KM, SDM, 上述諸抗菌劑均為 Sigma Chemical Company 之產品。測定最小抑制濃度時使用 Mueller-Hinton 培養基，為 Difco Laforatris 之產品。上述諸抗菌劑對各分離菌之最小抑制濃度 SDM 在 500ug/ml 以上，其餘諸抗菌劑在 25ug/ml 以上者認定為抗藥菌。

三、抗藥菌 R 質體之檢出及其抗藥性型態之決定

以轉移試驗檢出抗藥菌之 R 質體。轉移試驗及 R 質體抗藥性型態之決定，供據 Watanabe 等 (1971) 之方法進行。分離菌對上述 5 種抗菌劑之 1 種或 1 種以上具有抗藥性者作為授予菌，抗藥性之接受菌為 *Escherichia Coli* K-12 RC 85 nal^r lac⁺ 或 *E. Coli* K-12 W Str.^r lac⁻，視授予菌之抗藥性情形及對乳糖之分解情形而分別使用。上述接受菌是由日本宮崎大學農學部青木博士分讓，而在國立臺灣大學獸醫學系藥理學研究室保存者。

結 果

在 RS 培養基上呈黃色菌落，並經 Cytochrome Oxidase 試驗呈陽性反應確定為 *A. hydrophila* 之分離菌共有 1187 株；其中從養鰻池之水分離者 1051 株，從病鰻分離者 136 株。

在分離菌 1187 株中，對於 5 種抗菌劑中之 1 種或 1 種以上具有抗藥性者共 966 株，佔 81.38%。就分離來源而分，從養鰻池池水分離者 1051 株中，抗藥菌有 832 株，佔 79.16%；從病鰻分離者 136 株中，抗藥菌有 134 株，佔 98.53%。上述數據表示於表 1。無論從養鰻池池水或病鰻分離的 *A. hydrophila*，抗藥菌所佔的比例相當高，尤其是從病鰻分離者，136 株中僅 2 株 (1.47%) 不具抗藥性。

Table 1. Source of the resistant *A. hydrophila* isolates.

Source of the isolates	No. of the total isolates	No of the resistant isolates	Percentage (%)
Pond water	1051	832	79.16
Diseased eels	136	134	98.53
Total	1187	966	81.38

抗藥菌對於 5 種抗菌劑中各藥劑之抗藥性出現頻率，表示於圖 1。從養鰻池池水分離的抗藥菌與從病鰻分離的抗藥菌，除前者對 FZD 不具抗藥性外，對各抗菌劑抗藥性之出現頻率，有相似的傾向。即兩者對 SDM 出現抗藥性的頻率最高，分別為 89.54% 與 84.33%；其次依序為 CM，分別為 69.59% 與 72.39%；CTC，分別為 68.87% 與 71.00%；KM，分別為 16.71% 與 44.02%。從病鰻分離的抗藥菌，對 FZD 出現抗藥性的頻率為 9.70%；而從養鰻池池水分離的抗藥菌，均對 FZD 具有感受性。

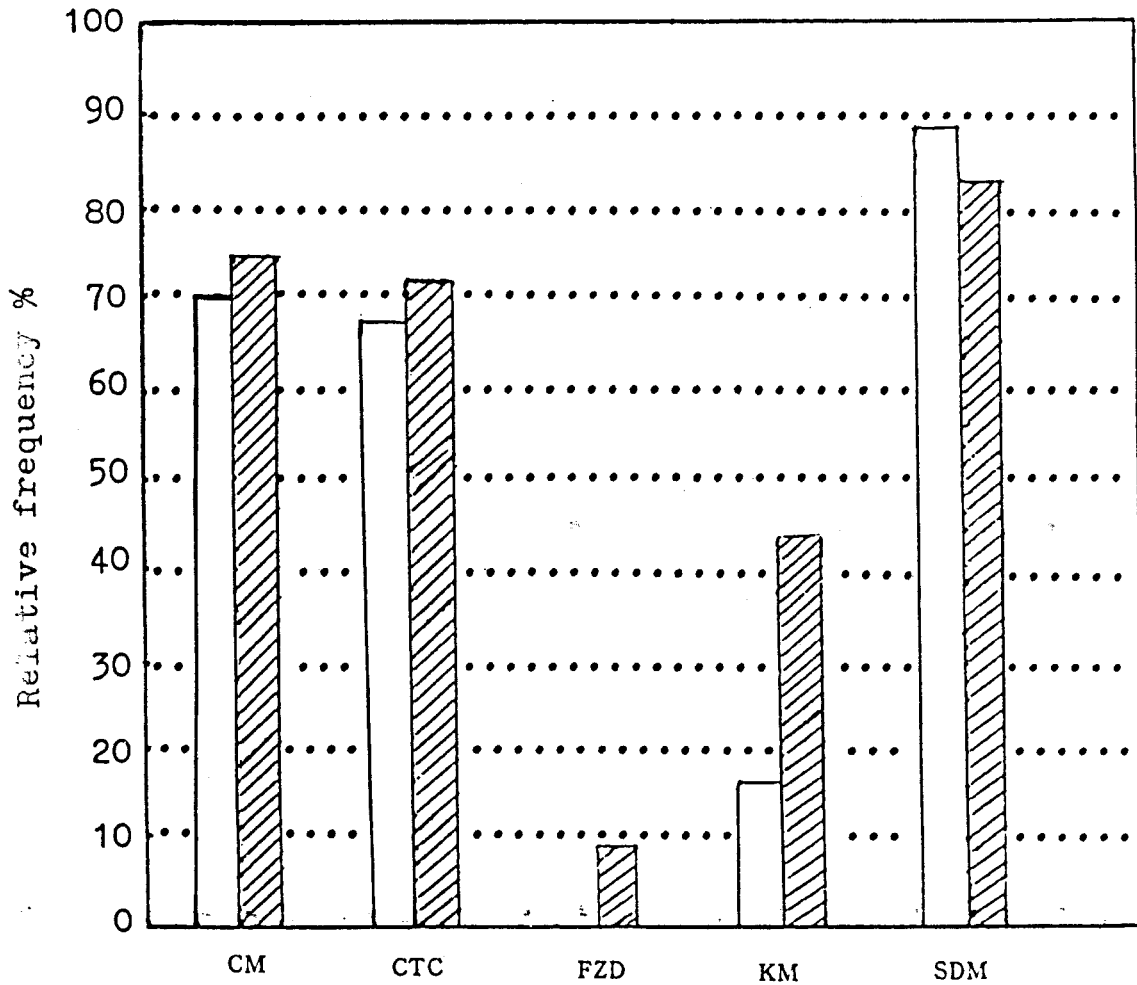


Fig. 1. Resistance frequency of the resistant *A. hydrophila* isolates to the antimicrobics.

□: isolates from Pondwater.

▨: isolates from diseased eels.

抗藥菌對於5種抗菌劑之抗藥性型態 (resistance pattern) 表示於表2。從養鰻池池水分離的抗藥菌之抗藥性型態以抗 CM, CTC, SDM 3合劑者最多。其次依序為抗 SDM; 抗CTC, SDM 2合劑; 抗 CM, KM, SDM 3合劑; 抗CM, CTC, KM, SDM 4合劑。從病鰻分離的抗藥菌之抗藥性型態則以抗 CM, CTC, SDM 3合劑最多。其次依序為抗 CM, CTC, KM, SDM 4合劑; 抗 CM, SDM 2合劑; 抗 CTC, SDM 2合劑; 抗 CM, CTC 2合劑。從病鰻分離的抗藥菌之抗藥性型態, 均為抗 2合劑或抗 2合劑以上之多劑型。

Table 2. Resistance pattern of the resistant *A. hydrophila* isolates.

Resistant pattern	No. of isolates from		Total
	Pond water	Diseased eels	
CM	16	0	16
CTC	22	0	22
FZD	0	2	2
KM	21	0	21
SDM	101	0	101
CM, CTC	7	8	15
CM, FZD	0	2	2
CM, KM	6	2	8
CM, SDM	42	12	54
CTC, FZD	0	3	3
CTC, KM	9	2	11
CTC, SDM	54	11	65
FZD, SDM	0	6	6
KM, SDM	22	5	27
CM, CTC, KM	6	2	8
CM, CTC, SDM	408	45	453
CM, KM, SDM	51	1	61
CTC, KM, SDM	24	8	32
CM, CTC, KM, SDM	43	16	59
Total	832	134	966

CM: Chloramphenicol, CTC: Chlortetracycline, FZD: Furazoldone,
 KM: Kanamycin, SDM: Sulfadimethoxine.

從表 3 R 質體轉移試驗結果，明瞭在抗藥菌 966 株中具有 R 質體者有 396 株，佔 40.99%。從養鰻池池水分離的抗藥菌 832 株中，具有 R 質體的有 316 株，佔 37.98%。從病鰻分離的抗藥菌 134 株中，具有 R 質體的有 80 株，佔 59.70%。值得注意的是具有 2 種轉移性抗藥性的抗藥菌共有 148 株，3 種轉移性抗藥性的抗藥菌共有 96 株，二者合計共 244 株，佔具有 R 質體抗藥菌的 61.62%。換言之，具有 R 質體抗藥菌的三分之一弱為多藥劑 R 質體。如果就抗藥菌的來源分析，從養鰻池池水分離的抗藥菌，具有 R 質體的共有 316 株，其中有 2 種轉移性抗藥性的有 111 株，佔 35.13%，具有 3 種轉移性抗藥性的有 72 株，佔 22.78%；二者合計共 183 株，佔 57.91%。至於從病鰻分離的抗藥菌，具有 R 質體的共有 80 株，其中具有 2 種轉移性抗藥性的有 37 株，佔 46.25%，具有 3 種轉移性抗藥性的有 24 株，佔 30%；二者合計共 61 株，佔 76.25%。換言之，具有 R 質體的抗藥菌，從養鰻池池水分離的約二分之一強為多藥劑 R 質體；從病鰻分離的約四分之三強為多藥劑 R 質體。

Table 3. R plasmid pattern of the resistant *A. hydrophila* isolates.

Resistance pattern of R plasmid	No. of isolates from		Total
	Pond water	Diseased eels	
CM	21	3	24
CTC	29	5	34
SDM	83	11	94
CM, CTC	28	9	37
CM, SDM	40	13	53
CTC, SDM	43	15	58
CM, CTC, SDM	72	24	96
Total	316	80	396
Percentage(%)	37.98	59.70	40.99

CM: Chloramphenicol, CTC: Chlortetracycline, SDM: Sulfadimethoxine.

至於抗藥菌之R質體型態，從養鰻池池水分離的抗藥菌以SDM最多；其次依序為CM, CTC, SDM；CTC, SDM；CM, SDM。從病鰻分離的抗藥菌則以CM, CTC, SDM最多；其次依序為CTC, SDM；CM, SDM；SDM。KM及FZD之抗藥菌則沒有R質體出現。

討 論

Shotts (1973) 等報告 *A. hydrophila* 的一種選擇培養基，主要是利用 *A. hydrophila* 分解 maltose，不形成硫化氫，不具有 Lysine decarboxylase 及 Ornigine decarboxylase 之原理，能簡易迅速與其他細菌鑑別，稱為 Rimler-Shotts 培養基，簡稱為 RS 培養基。*A. hydrophila* 在 RS 培養基上形成黃色菌落，但有少數不形成硫化氫之 *Citrofactor frenndii* 亦可在 RS 培養基上形成黃色菌落。兩者可用 Cytochrome oxidase 試驗鑑別，前者呈陽性反應，而後者則呈陰性反應。本試驗中，無論從養鰻池池水或病鰻檢體，培養在 RS 培養基上獲得的黃色菌落，均經過 Cytochrome oxidase 試驗，結果均呈陽性反應。因此在本試驗中分離到的1187株細菌，可確定為 *A. hydrophila*。本試驗由於使用 RS 培養基作為選擇培養基，節省人力及材料，得以大量分離 *A. hydrophila*。過去對各種魚類病原菌所作的抗藥性調查，尚無單獨對 *A. hydrophila* 作如此大規模的調查（陳及郭 1978；郭及鍾 1980；Anderson and Lewis 1965；Anderson 1968；Aoki and Egusa 1971；Aoki et al 1972, 1974, 1977；Aoki and Kitao 1981；Mitsunashi 1979；Shotts et al 1976）。就以臺灣有關養鰻池細菌抗藥性之調查而言，陳與郭（1978）對118株，郭與鍾（1980）對126株 *A. hydrophila* 進行研究。本試驗曾就1187株 *A. hydrophila* 進行抗藥性之調查，試驗結果當能相當地反映實際情況。

本試驗結果發現，從養鰻池池水分離的 *A. hydrophila* 對1種或1種以上抗菌劑具有抗藥性者佔79.12%，而從病鰻分離者則高達98.53%，即分離菌136株中僅2株不具有抗藥性。此結果與前人之報告比較（陳及郭1978；郭及鍾1980），我國鰻池病原菌抗藥性之增加，非常嚴重。而且對鰻魚赤鱗病之治療，已達到幾乎無藥可治的地步。

本試驗結果顯示 *A. hydrophila* 抗藥菌對各抗菌劑抗藥性的出現頻率以磺胺藥為最多，此與陳及郭（1978）之調查結果一致。可見磺胺藥之單獨使用，已無治療效益。Liu（1983）曾使用磺胺藥與Trimethoprim合劑於人工感染赤鱗病與愛德華氏病鰻魚之治療，證明比單獨使用磺胺藥有效，且其抗藥性之形成較磺胺藥單劑緩慢，可推薦給養鰻業者使用。又本試驗結果發現，*A. hydrophila*

抗藥菌之抗藥型態，以 CM, CTC, SDM 三合劑最多，而以 FZD 最少。FZD 之抗藥菌最少，價錢又便宜，在目前的確是值得推廣的抗菌劑。

陳及郭 (1978) 報告從鰻魚體內分離之 *A. hydrophila* 抗藥菌 118 株中有 40 株 (33.0%) 具有 R 質體，郭及鍾 (1980) 之調查則 72 株中有 19 株 (26.40%) 具有 R 質體，本試驗結果則 134 株中有 80 株 (59.70%) 具有 R 質體。從養鰻池池水分離者，郭及鍾 (1980) 之報告為 54 株中有 7 株 (13.00%) 具有 R 質體，而本試驗結果則在 832 株中有 316 株 (37.98%) 具有 R 質體。可見攜帶 R 質體的 *A. hydrophila* 抗藥菌之增加，非常迅速。*A. hydrophila* 在人體之感染例日漸增多 (李等 1983a; 李等 1983b)，而其攜帶 R 質體抗藥菌又迅速增加，不僅在魚病防治上造成困擾，在公共衛生上亦值得重視。

摘 要

從民國 72 年 9 月至 73 年 8 月止，從臺灣地區各地養鰻池之池水及病鰻，分離 *A. hydrophila* 研究其抗藥性。從養鰻池池水分離者抗藥菌佔 79.16%，從病鰻分離者抗藥菌佔 98.53%。抗藥菌對於各種抗菌劑之抗藥性出現頻率以 SDM 最高，其次依序為 CM, CTC 及 KM。抗藥性之型態以 CM, CTC, SDM 三合劑最多。具有 R 質體之抗藥菌，從養鰻池池水分離者佔 37.98%，從病鰻分離者佔 59.70%。其型態前者以 SDM 單劑最多，其次依序為 CM, CTC, SDM; CTC, SDM; CM, SDM。後者以 CM, CTC, SDM 最多，其次依序為 CTC, SDM; CM, SDM。

謝 辭

本研究承國科會補助經費 (NSC 73—0409—B002—24)，謹申謝意。

參 考 文 獻

- 李寧, 吳竹簡, 蔡文城 (1983a)。親水性產氣單胞菌感染之臨床意義 (I) 急性下痢。中華民國微生物學會第 16 次學術演講, 臺北市。
- 李寧, 吳竹簡, 蔡文城。(1983b)。親水性產氣單胞菌感染之臨床意義 (II) 菌血症。中華民國微生物學會第 16 次學術演講, 臺北市。
- 陳宏遠, 郭光雄 (1978)。水產養殖抗藥細胞之研究—I、養殖鰻魚抗藥菌之抗藥性。魚病研究專集 (II) 1~13。
- 郭光雄, 鍾虎雲。(1980)。養鰻池之 R⁺ 抗藥細菌。魚病研究專集 (III) 1~8。
- Anderson, E. S. & Lewis, M. J. (1965). Drug resistance and its transfer in *Salmonella typhimurium*. *Nature*, 206, 579-583,
- Anderson, E. S. (1968). The ecology of transferable drug resistance in the *Enterobacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 22, 131-180.
- Anderson, T. G. (1970). Testing of susceptibility to antimicrobial agents and assay of antimicrobial agents in body fluids. In "Manual of Clinical Microbiology". Blair, J. E. (Editor).
- Aoki, T. and Egusa, S. (1971). Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. *Journal of General Microbiology*, 65, 343-349.
- Aoki, T., Egusa, S., Yada, C. and Watanabe, T. (1972). Studies of drug resistance and R factors in bacteria from pond-cultured Salmonids. I. Amago (*Oncorhynchus rhodurus macrostomus*) and Yamame (*Oncorhynchus macrostomus*) and Yamame (*Oncorhynchus masou ishikawae*) *Japanese Journal of Microbiology*, 16, 233-238,

- Aoki, T., Egusa, S. and Arai, T. (1974). Detection of R factor in naturally occurring *Vibrio anguillarum* strains. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*, 6, 534-538.
- Aoki, T., Egusa, S., and Arai, T. (1977). Detection of R plasmid in naturally occurring fish pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda*. *Microbiol. Immunol.*, 21, 77-83.
- Aoki, T. and Kitao, T. (1981). Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish Pathology*, 15, 277-281.
- Liu, C. K. (1983). Evaluation of Trimethoprim and sulfonamides in bacterial diseases of eels. *Proceeding of ROC-Japan Cooperative Science Seminar on Fish Diseases*, 88-92.
- Mitsubishi, S. (1979). Drug resistance plasmids. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 26, 135-181.
- Shotts, Jr., E. B. and Rimler, R. (1973). Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Applied Microbiology*, 26, 550-553.
- Shotts, E. B., Vanderwork, V. L. and Campell, L. M. (1976). Occurrence of R factors associated with *Aeromonas hydrophila* isolated from aquarium fish and waters, *J. Fish Res. Board. Can.*, 33, 736-740.
- Watanabe, T., Aoki, T., Ogata, Y. and Egusa, S. (1971). R factors related to fish culturing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 182, 383-410.