

蝦類弧菌對 Fluoroquinolone 類藥物之感受性試驗

*王涓賢¹ 陳明輝^{1,2} 何素鵬¹ 王英旂² 劉正義¹

¹ 國立中興大學獸醫學系

² 台中市家畜疾病防治所

本試驗研究目的在於利用平板瓊脂連續稀釋法，檢測31株分離自草蝦及斑節蝦養殖池弧菌對數種 fluoroquinolone 類抗菌劑之感受性。試驗結果顯示31株蝦類 *Vibrio* spp.分離株對各種抗菌劑之感受以PD127391 (PD127) 感受性最高，PD131628 (PD131) 次之、Enrofloxacin (ENR) 再次之，Sarafloxacin (SAR)、PD124816 (PD124) 再次之，Norfloxacin (NOR) 再次之，Fleroxacin (FLE)、Difloxacin (DIF) 再次之，Oxolinic acid (OA) 再次之，Sulfadimethoxine + ormetoprim (SO) 再次之，Nalidixic acid (NA) 更次之，而以Oxytetracycline (OCT) 感受性最差。同時由實驗結果得知部分蝦類弧菌分離株對抗菌劑具有抗藥性，抗藥菌株百分比以抗OTC最高 (19.5%)；抗NA次之 (6.45%)。然而對fluoroquinolone藥物則未檢出抗藥性之菌株。

前 言

由於本省蝦類採高密度集約養殖，極易造成病害；一般以細菌性疾病居多 (廖等, 1985)，其中以弧菌感染症最為頻繁 (蔣等, 1992；鄭, 1989)，常使養殖業者遭受非常大之經濟損失。利用抗菌劑來控制細菌性疾病，被認為是最經濟、最有效之方法。現今尚未制訂水產動物用藥物使用規範，而養殖業者缺乏正確藥物使用知識，濫用抗菌劑不僅無法控制疾病，同時也造成病原菌產生抗藥性。(陳等, 1978；Aoki *et al.*, 1977)，亦為人類帶來公共衛生之後遺症 (Aoki *et al.*, 1981)。

Fluoroquinolone是一種抗菌範圍及抗菌活性極佳之新型抗菌劑，能更有效地控制各種水生動物之細菌性疾病 (王等, 1993；Bragg *et al.*, 1988；Mohny *et al.*, 1992)，且抗菌活性優於第一代quinolone類抗菌劑如Nalidixic acid、Oxolinic acid (Bowser *et al.*, 1991；Endo *et al.*, 1973；Inglis *et al.*, 1991)。Martinsen等 (1992) 指出新型Fluoroquinolone (如 Sarafloxacin 及 Enrofloxacin) 對鮭魚癩瘡病 *A. Salmonicida* 抗活菌性，優於Oxytetracycline及第一次quinolone (如Oxolinic acid及Flumequine)，且對Oxolinic acid有抗藥性之 *A. Salmonicida* 菌株能有效地抑制。

本實驗之目的，在於探討新型fluoroquinolone藥物對養殖蝦類 *Vibrio* spp.分離株之抗菌活性，並與目前普遍使用之抗菌劑作比較，以提供養殖業者日後使用此類藥物防治本病時之參考。

*：主要聯絡人

材料與方法

供試菌株之分離與鑑定

依West等(1983)之方法,自斑節蝦及草蝦養殖池進行 *Vibrio* spp.之分離,並依Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg *et al.*, 1984) 做為菌株之生化性狀特性鑑定標準。分離株及本實驗室所保存之菌株,總共有31株蝦類弧菌株,以供本實驗使用。

抗菌劑

本研究所使用之抗菌劑有十二種,可分為三大類,第一類為具氟基之quinolone抗菌劑: Norfloxacin (NOR) (Sigma Chemical Co., USA), Difloxacin (DIF)、Sarafloxacin (SAR) (Abbott Lab. USA); Fleroxacin (FLE) (Hoffmann-La Roche, Inc. USA), Enrofloxacin (ENR) (Mobay Corp, USA), PD124816 (PD124)、PD127391 (PD127)、PD131628 (PD131) (Parke-Davis, Pharmaceut. USA)。第二類為不含氟基之quinolone抗菌劑: Nalidixic acid (NA) 及 Oxolinic acid (OA) (Sigma Chemical Co., USA)。第三類為非quinoline抗菌劑 Oxytetracycline (OTC) (Sigma Chemical Co., USA), Sulfadimethoxine+ormetoprim (SO) (Hoffmann-La Roche, Inc. USA)

抗菌劑標準液之製備及稀釋

本試驗係參考劉等(1992)之方法,將抗菌劑以溶媒(1N NaOH)溶解後,以蒸餾水十倍稀釋製作標準抗菌液(1000 mcg/ml),然後以滅菌的蒸餾水做連續兩倍稀釋系列;以1:9比例和已滅菌含1.5% NaCl Mueller Hinton Agar (Difco) 混合凝固後,去凝結水供實驗使用。

細菌接種、培養及判定

本試驗方法係參考蔡等(1993)之平板瓊脂連續稀釋方法,來測定各抗菌劑對蝦類 *Vibrio* spp.分離株之抗菌效力,將欲檢測菌株培養於含1.5% NaCl trypticase soy broty (TS broth, Difco) 經25°C, 18小時增菌後,利用含1.5% NaCl蒸餾水調整其濃度為 10^8 cfu/ml (約為MacFarland 0.5),再以0.01mL之標準白金耳鈞 $10^5\sim 10^6$ cfu菌量,接種在含有各種不同濃度藥劑的平板瓊脂Mueller Hinton Agar培養皿(含1.5% NaCl)。在25°C中培養24小時後,判定各抗菌劑之最低抑菌濃度。

抗藥性菌株之判定標準

當菌株對抗菌劑之感受性超過在25 mcg/ml以上,則認定為該菌株對該抗菌劑有抗藥性。(陳等, 1978; 劉等, 1992; 王等, 1994)

統計分析

本試驗所使用之統計學方法,乃是使用Wilcoxon signed-rank test (Bhattacharyya *et al.*, 1977) 法來檢定兩族群是否有顯著差異性。

結 果

31株蝦類 *Vibrio* spp.分離株對各種抗菌劑之感受試驗結果(表一)顯示,利用Wilcoxon signed-rank test法分析菌株族群MIC值,細菌對抗菌劑之感受性順序為:OCT<NA<SO<OA、DIF、FLE<NOR<PD124、SAR<ENR<PD131<PD127。各抗菌劑對31株蝦類分離株以MIC₅₀值評估得知PD127 (0.025 mcg/ml); PD131 (0.1 mcg/ml); ENR (0.05 mcg/ml); PD124、SAR和NOR (0.2 mcg/ml); FLE、DIF和OA (0.05 mcg/ml); SO、NA和OTC (3.12 mcg/ml)。

同時由測定結果得知NA、OTC之MIC值分佈很廣,顯示可能抗藥性菌株已逐漸產生。各種抗菌劑具有抗藥性之菌株百分比(表一),以OTC最高(19.5%); NA次之(6.45%)。然而對具有氟基quinolone藥物具有抗藥性之菌株百分比皆為0。

表一 蝦類弧菌分離株對數種抗菌之敏感性試驗結果

抗菌劑	MIC範圍 ^A (mcg/ml)	MIC ₅₀ ^B (mcg/ml)	MIC ₉₀ ^C (mcg/ml)	抗藥菌株 (%)
OTC	0.39—>100 ⁱ	3.12	50	19.5 (6/31)
SO	0.1—50g	3.12	12.5	0 (0/31)
NA	0.78—>100g	3.12	12.5	6.45(2/31)
OA	0.05—6.25 ^h	0.2	0.78	0 (0/31)
ENR	0.0125—0.78 ^c	0.05	0.39	0 (0/31)
NOR	0.025—1.56 ^e	0.2	0.78	0 (0/31)
PD127	0.003125—0.2 ^a	0.025	0.2	0 (0/31)
PD131	0.00625—0.39 ^b	0.1	0.39	0 (0/31)
DIF	0.06—6.25 ^f	0.39	0.78	0 (0/31)
SAR	0.025—1.56 ^d	0.2	0.39	0 (0/31)
PD124	0.0125—0.78 ^d	0.2	0.78	0 (0/31)
FLE	0.05—1.56 ^f	0.39	1.56	0 (0/31)

A. 不同字母表示兩族群MIC值具有顯著差異 (Wilcoxon signed-rank test), $p < 0.05$

B. MIC₅₀; 可抑制50%測試菌株之最小濃度

C. MIC₉₀; 可抑制90%測試菌株之最小濃度

討 論

本研究結果顯示蝦類 *Vibrio* spp.對所有quinolone抗菌劑感受性優於非quinolone類抗菌劑(OTC); 並且fluoroquinolone類藥物對蝦類弧菌分離株之抗菌活性較不含氟基之quinolone佳。此結果與其他學者專家做的研究結果一致(王等, 1994; Bowers *et al.*, 1990; Masecar *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1992)一致。此一現象大部分學者認為其最有可能之原因, quinolone類藥物其機制在於抑制細菌之DNA gyrase (Smith *et al.*, 1988), 然而

fluoroquinolone類藥物因在第6個碳上增加了氟基，可增強對DNA gyrase之抑制效力（Domagala, 1994），故其藥效較不含氟基之quinolone抗菌劑為佳。

各種fluoroquinolone類藥物對蝦類弧菌分離株抗菌活性比較，PD127、PD131、ENR、PD124優於DIF及SAR，DIF及SAR又優於NOR及含三個氟基之quinolone（FLE）。所以quinolone抗菌活性不受氟基多寡而影響，此一結果與Domagala等（1994）之研究結果一致，可能原因為其在結構上R1位置之替代物活性不同所致。

本研究結果顯示fluoroquinolone對蝦類弧菌分離株抗菌活性較王等（1995）fluoroquinolone對魚類弧菌分離株抗菌活性差，可能原因為最近幾年蝦類疾病引起大量死亡，養殖業者濫用藥物使得細菌對藥物感受性逐漸降低。雖然fluoroquinolone藥物抗菌活性佳，且抗藥性突變產生之機率非常低（小於 10^{-9} ）但被證實仍然具有完全交叉抗藥性（Austin *et al.*, 1981），故使用fluoroquinolone類藥物，仍須正確使用本類藥物。為了防範藥物濫用及殘留，制訂水產動物用藥品使用規範，已是刻不容緩。

誌 謝

本研究承行政院農業委員會補助之經費〔84科牧-2-21.牧-02(5)〕；宜蘭縣家畜疾病防治所協助採樣；屏東技術學院董明澄教授贈予菌株；Abbott Lab.、Hoffmann-La Roche, Inc. 及Parke-Davis, Pharmaceut.等公司贈予藥劑，特此一併致謝。

參考文獻

- 王渭賢、陳明輝、劉正義。（1995）。魚類弧菌對fluoroquinolone藥物感受性試驗。臺灣省畜牧獸醫學會會報 65(1): 27-33。
- 王渭賢、鄧晶瑩、簡茂盛、林正忠、劉正義。（1994）。愛德華氏菌對數種抗菌劑之感受性試驗。中華獸醫 20(3): 251-255。
- 王渭賢、鄧晶瑩、劉正義。（1993）。Quinolone類藥物在魚類細菌性疾病治療之應用探討。臺灣省畜牧獸醫學會會報 62: 37-46。
- 陳志遠、郭光雄。水產養殖抗藥細菌之研究-I。（1978）。養殖鰻魚抗藥菌之抗藥性。魚病研究專集(20): 1-13。
- 廖一久、郭光雄、陳秀男。（1985）。屏東地區之養殖蝦類疾病初步調查。魚病研究專集(7): 89-94。
- 蔣先沖、鐘虎雲、郭光雄、趙磐華。（1992）。弧菌對養殖蝦類致病性之研究。魚病研究專集(12): 8-19。
- 蔡文城。（1993）。實用臨床微生物診斷學。第七版。九州出版社。台北。
- 鄭文騰。1995。台灣養殖蝦類病原細菌 *Vibrio damsela* 之分離與鑑定。國立台灣大學漁業科學研究所。碩士論文。pp.46。
- 劉朝鑫、王渭賢。（1992）。 *Aeromonas hydrophila* 及 *Edwardsiella tarda* 對數種抗菌劑之抗藥性研究。魚病研究專集(11): 47-56。
- Aoki, T., T. Arai, and S. Equis. (1977). Detection of R plasmids in naturally occurring fish pathogenic bacteria: *Edwardsiella tarda*. Microbiol. Immunol. 21(2): 77-83.

- Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. Fish. Pathol. 15(3/4): 277-281.
- Austin, B., D. A. Morgan, and D. J. Alderman. (1981). comparison of antimicrobial agents for control of Vibriosis in marine fish. Aquaculture 26: 1-12.
- Barry, A. L. (1990). *In vitro* activity of quinolones and related compounds. In Siporin et al., ed. *The new generation of quinolones*. Marcel Dekker, New York, pp. 79-105.
- Bhattacharyya, G. K. and R. A. Johnson. (1977). The Wilcoxon signed-rank test, *In* G. K. Bhattacharyya et al., ed. *Statistical concepts and methods*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 519-523.
- Bowser, P. R. and J. G. Babish. (1991). Clinical Pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. Ann. Rev. Fish Dis. 1: 63-66.
- Bowser, P. R. and M. House. (1990). *In vitro* sensitivity of some fish pathogens to the quinolones nalidixic acid and oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 10248-10249.
- Bragg, R. R. and J. M. Todd. (1988). *In vitro* sensitivity to Baytril of some bacteria pathogenic to fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 8(1): 5-6.
- Domagala, J. M. (1993). Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. J. Antimicrob. Chemother 33: 685-705.
- Endo, T., K. Ogishima, S. Hayasak, and S. Ohshima. (1973). Application of oxolinic acid as a chemotherapeutic agent against infectious disease in fish. I. Antibacterial activity chemotherapeutic effects and pharmacokinetics of oxolinic acid in fishes. Bull. J. Soc. Sci. Fish 39: 165-171.
- Krieg, N. R., et al (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins company. Baltimore/London.
- Lewin, C. S. and T. S. Hastings. (1990). *In Vitro* oxolinic acid, ciprofloxacin, and norfloxacin against *Aeromonas salmonicida*, J. Fish Dis. 13: 377-384.
- Martinsen, B., H. Oppegaard, R. Wichstrom, and E. Myhr. (1992) Temperature-dependent *In vitro* antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. Antimicrob. Agents Chemother. 36(8): 1738-1743.
- Masecar, B. L., R. A. Celesk, and H. J. Robillard. (1990). Analysis of acquired ciprofloxacin resistance in clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 281-286.
- Mohney, L. L., T. S. Bell, and D. V. Lightner. (1992) Shrimp antimicrobial testing. I. *In vitro* susceptibility of thirteen gram-negative bacteria to twelve antimicrobials. J. Aquatic Anim. Health 4: 257-261.
- Palmer, P., K. Kawai, and R. Kuauda. (1992). *In vitro* activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. Gyobyo Kenkyu. 27(3): 131-142.
- Smith, J. T. and C. S. Lewin. (1988). Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In V. T. Andriole, ed. *The Quinolones*. Academic Press, New York. pp. 23-82.
- West, P. A., J. V. Lee, and T. N. Bryant. (1983). A numerical taxonomical study of

species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and bird in kent, England. J. Appl. Bacteriol. 5: 203-282.

Wolfson, J. S. and D. C. Hooper. (1985). The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action, and resistance, and spectra of activity *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 28(4): 581-586.

Sensitivities of *Vibrio* Isolates Isolated from Cultured Shrimps to Fluoroquinolones *in vitro*

*Way-Shyan Wang¹, Ming-Hui Chen^{1,2}, Shu-Pon Ho¹,
Ing-Chi Wang² and Cheng-I Liu¹

¹ Department of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University

² The Livestock Disease Control Center of Taichung City

In vitro, antibacterial activities of eight fluorquinolones including difloxacin (DIF), enrofloxacin (ENR), fleroxacin (FLE), norfloxacin (NOR), OD124816 (PD124), PD127391 (PD127), PD131628 (PD131), and sarafloxacin (SAR) were compared with nonfluoroquinolones including nalidixic acid (NA) and oxolinic acid (OA) and nonquinolones including oxyteracycline (OTC) and SO (sulfadimethoxine+ ormetoprim) by the serial plate dilution method. By Wilcoxon signed-rank test, the results revealed that the sensitive order was OTC < NA < SO < OA, DIF, and FLE < NOR < PD124 and SAR < ENR < PD131 < PD127 ($p < 0.05$). Fluoroquinolones including difloxacin, enrofloxacin, fleroxacin, norfloxacin, PD124816, Pd127391, and PD131628 had higher antibacterial activities than nonfluoroquinolones and nonquinolones. Meanwhile, those *Vibrio* isolates were more sensitive to nalidixic acid and oxolinic than to oxyteracycline.

* : Corresponce author