

Trimethoprim-sulfadiazine 合用在鰻魚赤鰓病與 愛德華氏病化學治療學之研究

劉朝鑫¹ 劉雅方²

¹ 國立臺灣大學獸醫學研究所

² 臺灣省家畜衛生試驗所

本試驗探求 trimethoprim-sulfadiazine 對於鰻魚赤鰓病病原菌 *Aeromonas hydrophila* 及愛德華氏病病原菌 *Edwardsiella tarda* 之試管內抗菌力試驗，試管內抗藥性產生試驗，實驗感染鰻魚之治療效果試驗，及其對鰻魚之急性毒性試驗。

為瞭解四種常用的二氨基嘧啶 trimethoprim, ormethoprim, diaveridine 及 pyrimethamine 對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 的抗菌作用，乃測定其對此二菌各30株的最小抑制濃度。試驗結果發現 trimethoprim 最強，ormethoprim 次之，diaveridine 及 pyrimethamine 則幾無抗菌作用。Trimethoprim 及 sulfadiazine 對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各30株之最小抑制濃測定試驗結果顯示，二藥以1:5或1:10之比例合用，對抗菌作用有相乘效果，且以1:5之比例合用，較1:10之比例合用為優。*A. hydrophila* 或 *E. tarda* 在含有 trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之培養基，連續繼代培養十代後之抗藥性指數比在單獨含有 trimethoprim 或 sulfadiazine 之培養基為小。以 *A. hydrophila* 或 *E. tarda* 肌肉注射實驗感染鰻魚後，trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之治療效果試驗顯示，對照組之累積死亡率與30及60mg/kg b.w. 之間，有顯著性差異 ($p < 0.05$)。Trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 對於鰻魚之急性毒性 LD_{50} 為 1,460mg/kg b.w.，其信賴界限在 1,676~1,273 mg/kg b.w. 之間。

前 言

台灣養殖鰻魚疾病之種類很多，為害程度不一，但其中以 *A. hydrophila* 引起的赤鰓病及 *E. tarda* 引起的愛德華氏病最為嚴重，依據林等 (1977) 之調查此二種疾病在各種鰻魚疾病在各種鰻魚疾病中的相對嚴重性為36%。可見此二種疾病對於台灣鰻魚養殖所造成的損失及所構成的威脅，非常嚴重。對於此二種疾病，台灣的養鰻業者使用抗生素治療者有33%，使用磺胺劑者29%，呋喃劑者12%，其他藥物者12% (林等，1977)。但是近十幾年來，對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 抗藥性調查結果顯示，此二種細菌對於這些常用的藥物產生相當嚴重的抗藥性 (郭等，1977；陳及郭，1978a；郭及鍾，1978；劉及蔡，1980；陳等，1984；劉及郭，1985；劉及王，1986a；劉及王，1991)，亟需探求有效而不容易產生抗藥性之藥物，作為防治之用。

Hitchings (1961) 發現 trimethoprim 與 sulfamethoxazole 合用，會增強對細菌的抗菌作用後，有各種不同的磺胺藥與 trimethoprim 之合劑，廣泛應用於醫學界及畜牧獸醫界 (Barnett and Bushby, 1970; Bushby and Hitchings, 1968; Craig and White, 1976; Ling and Ruby, 1979; Rehm and White, 1970; White and Withnell, 1973; Wormser and Keusch, 1982)。魚

病方面亦有少數試驗報告（佐古及楠田，1978；藤原等，1984；劉，1983；Bosse and Post, 1983; Liu, 1990; Macarthy et al., 1974）。本研究是從化學治療學之觀點，檢討 trimethoprim-sulfadiazine 合用對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 試管內抗菌作用，在培養基內獲得抗藥性之情形，實驗感染鰻魚之治療效果及對於鰻魚急性毒性之試驗結果。

材料與方法

試驗鰻魚

本試驗均使用日本鰻（*Anguilla japonica*）。從鹿港地區購進後，在大水槽中飼養1週，選取外觀健康鰻魚使用。使用於效果試驗者體重約100g，使用於急性毒性試驗者體重約10-20g。試驗期間均未餵飼飼料。

試驗菌株

使用於試管內抗菌力試驗之試驗菌株，是歷年來從台灣各地養鰻池罹病鰻魚或池水分離保存於國台灣大學農學院獸醫學系及同大學理學院動物學系魚病研究室之 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各30株。使用於效果試驗之攻擊菌株 *A. hydrophila* 為10A，*E. tarda* 為12E。

試管內抗菌力試驗

四種二氨基嘧啶之抗菌力試驗

測定 trimethoprim, pyrimethamine, ormethoprim 及 diaveridine 四種二氨基嘧啶對 *A. hydrophila* 及 *E. trada* 各30株之最小抑制濃度（minimal inhibitory concentration）。最小抑制濃度之測定則依照日本家畜耐性菌研究會標準法（家畜の耐性菌研究會，1976）所規定之方法實施，培養基則使用 Mueller-Hinton 培養基。

Trimethoprim 與 sulfadiazine 單獨及二者合用之抗菌力試驗測定

Trimethoprim 與 sulfadiazine 單獨及兩者以1:5及1:10合用對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各30株之最小抑制濃度。測定方法與上述1.四種二氨基嘧啶之抗菌力試驗中所說明者相同。

試管內抗藥性產生試驗

本試驗所使用之試驗菌是分別選取 *A. hydrophila* 及 *E. trada* 各2株使用。試驗方法主要是參考高橋等（1974）及高橋（1977）所描述之方法實施。

對於實驗感染鰻魚之治療效果試驗

攻擊菌株對於鰻魚LD₅₀ 稀釋倍數之測定

將 *A. hydrophila* 10A 及 *E. trada* 12E 攻擊菌株分別接種於 tryptic soy broth 中，在35°C 培養24小時測得之菌量分別為 *A. hydrophila* 約 1.8×10^9 CFU/ml，*E. tarda* 約 2.4×10^9 CFU/ml。各取0.5ml 分別接種於鰻魚背部肌肉，每菌株分別通過4尾鰻魚，重複通過數代以增強病原性。在效果試驗實施前先測定各試驗菌對於鰻魚LD₅₀ 稀釋倍數。其方法是將 *A. hydrophila*

10A及 *E. tarda* 12E攻擊菌株分別接種於tryptic soy broth中，在35°C培養24小時後，以10倍稀釋法稀釋，每一稀釋倍數接種10尾鰻魚，觀察7天每天記錄死亡情形，第7天以存活數為基礎，以Reed-Muench公式 (Jaweta et al., 1970) 求出各菌株對於鰻魚之LD₅₀ 稀釋倍數。

治療效果試驗

將鰻魚分成數組，各組每尾鰻魚在背部接種0.5ml略低於LD₅₀ 之菌量，每組各21尾鰻魚，以實驗分別感染鰻魚赤鰭病及愛德華氏病。每一細菌感染均分成：未投藥對照組，trimeoprim-sulfadiazine (1:5) 15mg/kg b.w. 組，30mg/kg b.w. 組及60mg/kg b.w. 組共四組。投藥於實驗感染病原菌後立即開始，每天以MS 222麻醉後用胃管經口灌藥一次，連續投藥3天。每天觀察鰻魚健康情形，每天記錄鰻魚之死亡數，記錄至第七天，以各組鰻魚之累積死亡率做為效果判定基礎，試驗期間水溫為25°C。

統計方法

對照組與各劑量組之間及各劑量組之間分析比較。數據以 χ^2 -test分析並以Yate's correction修正。當預期值 ≤ 5 時並以Fisher's exact test檢定。

急性毒性試驗

將trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 製成懸浮液，以MS 222麻醉後用胃管經口灌與鰻魚，各劑量使用4尾鰻魚，以求出上限（百分之百致死劑量）及下限（百分之百生存劑量）。在所獲得的上限及下限之間，依幾何級數共分成6種劑量組，每一劑量組使用10尾鰻魚，依照預備試驗之方式投藥trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 懸浮液。投藥後每天觀察鰻魚健康情形並記錄死亡情形，以第七天時各劑量組鰻魚之死亡率為基礎，用Van der Waerden公式求出LD₅₀ 及其信賴界限（高木及小澤，1960）。試驗期間水溫為25°C。

結 果

試管內抗菌力試驗

四種二氨基嘧啶之抗菌力試驗

畜牧獸醫上常用的二氨基嘧啶有四種，即trimethoprim, ormethoprim, diaveridine及pyrimethamine。為瞭解此四種化合物對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 的抗菌作用力，並選取抗菌力最強者，乃進行本試驗。四種二氨基嘧啶對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各30株之試管內抗菌力試驗結果表示於表一。從表一可知，trimethoprim對於 *A. hydrophila* 及 *E. trada* 之抗菌力量強，其最小抑制濃度分別介於0.20~1.56 μ g/ml及0.20~0.78 μ g/ml之間；ormethoprim次之，分別介於0.78~12.5 μ g/ml及1.56~12.5 μ g/ml之間；diaveridine及pyrimethamine則均等於或大於200 μ g/ml，幾乎沒有抗菌作用。因此本試驗中均選取trimethoprim與磺胺藥合用。

表一 四種二氨基嘧啶化合物對於鰻魚病原性細菌之最小抑制濃度

鰻魚病原性細菌	藥物	最小抑制濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)										
		0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	≥ 200
<i>A. hydrophila</i> n = 30	Trimethoprim	18	8	3	1	0	0	0	0	0	0	0
	Ormethoprim	0	0	2	8	10	6	4	0	0	0	0
	Diaveridin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
	Pyrimethamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>E. tarda</i> n = 30	Trimethoprim	19	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ormethoprim	0	0	0	4	8	10	8	0	0	0	0
	Diaveridin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
	Pyrimethamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30

n : 測試細菌株數

表二 Trimethoprim與sulfadiazine及二者合用對於鰻魚病原性細菌之最小抑制濃度

鰻魚病原性細菌	藥物	最小抑制濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)											
		0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	幾何平均數
<i>A. hydrophila</i> n = 30	Trimethoprim	18	8	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0.29
	Trimethoprim 1												
	+	0	0	12	8	8	2	0	0	0	0	0	1.15
	Sulfadiazine 5												
	Trimethoprim 1												
	+	0	0	0	14	9	5	2	0	0	0	0	2.78
<i>A. hydrophila</i> n = 30	Sulfadiazine 10												
	Sulfadiazine	0	0	0	0	6	6	11	1	2	2	2	12.80
	Trimethoprim	19	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27
	Trimethoprim 1												
	+	0	0	11	9	7	3	0	0	0	0	0	1.64
	Sulfadiazine 5												
<i>A. hydrophila</i> n = 30	Trimethoprim 1												
	+	0	0	0	12	8	8	2	0	0	0	0	3.12
	Sulfadiazine 10												
	Sulfadiazine	0	0	0	0	5	7	12	2	1	1	2	11.94

n : 測試細菌株數

Trimethoprim與sulfadiazine單獨及二者合用之抗菌力試驗

Trimethoprim與sulfadiazine單獨及二者以1:5及1:10之比例合用，對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各30株之最小抑制濃度表示於表二。從表二明瞭，trimethoprim對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 之抗菌力很強，其最小抑制濃度分別介於0.20~1.56 μ g/ml及0.20~0.78 μ g/ml之間，其幾何平均數分別為0.29及0.27 μ g/ml。Sulfadiazine對於此二細菌之抗菌力則很弱，其最小抑制濃度均介於3.13~200 μ g/ml之間，而其幾何平均數則分別為12.80及11.94 μ g/ml。但trimethoprim與sulfadiazine以1:5合用，則對於 *A. hydrophila* 之最小抑制濃度介於0.78~6.25 μ g/ml之間，其幾何平均數降至1.15 μ g/ml，對於 *E. tarda* 之最小抑制濃度則介於0.78~6.25 μ g/ml其幾何平均數則降至1.64 μ g/ml。Trimethoprim 與sulfadiazine以1:10合用，則對於 *A. hydrophila* 之最小抑制濃度介於1.56~12.5 μ g/ml，其幾何平均數降至0.78 μ g/ml，對 *E. tarda* 則介於1.56~12.5 μ g/ml，其幾何平均數降至3.12 μ g/ml。顯然trimethoprim與sulfadiazine之合用，對抗菌作用有相乘效果，而1:5之相乘效果較1:10為優。因此本研究爾後之試驗，trimethoprim與sulfadiazine均以1:5之比例合用。

試管內抗藥性產生試驗

A. hydrophila 及 *E. tarda* 各2株分別繼代培養十代於各含有trimethoprim, sulfadiazine及二者以1:5合用之Mueller-Hinton培養基之結果，分別表示於圖一至圖六。此結果以抗藥性指數 (resistance index) 表示，所謂抗藥性指數是繼代培養菌株與原菌株最高生長濃度 (Maximal allowance concentration, MAC) 之比 (高橋等, 1974; 高橋, 1974)。
A. hydrophila 二菌株在含有trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之培養基，其繼代培養十代後之抗藥性指數分別為8及4；在單獨含有trimethoprim之培養基則分別為32及16；在單獨含有sulfadiazine之培養基則分別為64及128。
E. tarda 二菌株在含有trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之培養基，其繼代培養十代後之抗藥性指數均為4；在單獨含有trimethoprim之培養基均為16；在單獨含有sulfadiazine之培養基則分別為32及128。無論是 *A. hydrophila* 或 *E. tarda*，在含有trimethoprim-sulfadiazine之培養基，抗藥性之產生最慢，在含有trimethoprim之培養基中次之，在含有sulfadiazine之培養基中 fastest。二種細菌各二株之抗藥性形成之模式 (pattern)，對於同一藥物有相似的趨勢。

對於實驗感染鰻魚之治療效果試驗

攻擊菌株對於鰻魚LD₅₀ 稀釋倍數之測定

A. hydrophila 10A及 *E. tarda* 12E攻擊菌株分別接種於tryptic soy broth中，在35°C培養24小時後以10倍稀釋法稀釋，各稀釋菌液分別肌肉注射鰻魚背部0.5ml，7天後之死亡情形及LD₅₀ 稀釋倍數之計算結果如下：

A. hydrophila 10A

菌液稀釋 倍數	死亡率	累積 死亡數	累積 存活數	累積 死亡率	累積 百分數
10 ⁻¹	9/10	22	1	22/23	95.65
10 ⁻²	7/10	13	4	13/17	76.47
10 ⁻³	4/10	6	10	6/16	37.50
10 ⁻⁴	2/10	2	18	2/20	10.00
10 ⁻⁵	0/10	0	28	0/28	0

將上述數據代入Reed-Muench公式 (Jawetz et al., 1970)

$$-\text{Log LD}_{50} \text{ 稀釋倍數} = 2.7$$

$$\text{LD}_{50} \text{ 稀釋倍數} = 10^{-2.7}$$

E. tarda 12E菌株

菌液稀釋 倍數	死亡率	累積 死亡數	累積 存活數	累積 死亡率	累積 百分數
10 ⁻¹	10/10	24	0	24/24	100
10 ⁻²	8/10	14	2	14/16	87.50
10 ⁻³	4/10	6	8	6/14	42.85
10 ⁻⁴	2/10	2	16	2/18	11.11
10 ⁻⁵	0/10	0	26	0/26	0

將上述數據代入Reed-Muench公式 (Jawetz et al., 1970)

$$-\text{Log LD}_{50} \text{ 稀釋倍數} = 2.8$$

$$\text{LD}_{50} \text{ 稀釋倍數} = 10^{-2.8}$$

治療效果試驗

A. hydrophila 10A及 *E. tarda* 12E對於鰻魚LD₅₀稀釋倍數分別為10⁻²⁷及10⁻²⁸，故在實驗感染時各細菌均稀釋為10⁻³，肌肉注射0.5ml。換算成菌數則 *A. hydrophila* 為約1.8×10⁶CFU/ml，*E. tarda*則為約2.4×10⁶CFU/ml，各取0.5ml肌肉注射鰻魚。實驗感染赤鰓病及受

德華氏病的治療效果，分別表示於表三及表四。 *A. hydrophila* 實驗感染鰻魚對照組之累積死亡率為42.86%， trimethoprim-sulfadiazine 15mg/kg b.w. 組為33.33%， 30mg/kg b.w.組及60mg/kg b.w. 組分別均為9.52%。投藥各組之累積死亡率比對照組各降低22.24%， 77.79%及77.79%。對照組之累積死亡率與30mg/kg b.w. 及60mg/kg b.w. 之間有顯著性差異 ($p < 0.05$)。 *E. tards* 實驗感染鰻魚對照組之累積死亡率為47.62%， 投藥15mg/kg b.w. 組為38.10%， 30mg/kg b.w. 組為14.29%， 60mg/kg b.w. 組為9.52%。投藥各組之累積死亡率比對照組各降低19.99%， 69.99%及80.00%。對照組之累積死亡率與30mg/kg b.w.及60mg/kg b.w. 之間有顯著性差異 ($p < 0.05$)。15mg/kg b.w. 之累積死亡率與60mg/kg b.w. 之間亦有顯著性差異 ($p < 0.05$)。

表三 Trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 對 *A. hydrophila*
實驗感染鰻魚治療效果試驗

組 別	劑 量 (mg/kg b. w.)	試 驗 尾 數	累 積 死 亡	累 積 死 亡 率
			尾 數	(%)
對 照	0	21	9	42.86 ^{a, b}
TMP + SD	15	21	7	33.33
TMP + SD	30	21	2	9.52 ^a
TMP + SD	60	21	2	9.52 ^b

TMP+SD: Trimethoprim與sulfadiazine以1:5之比例合用

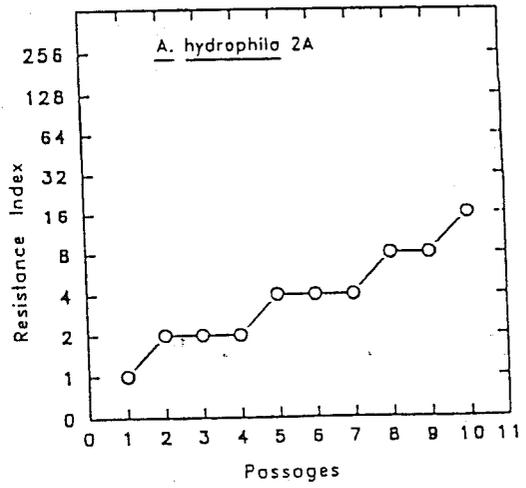
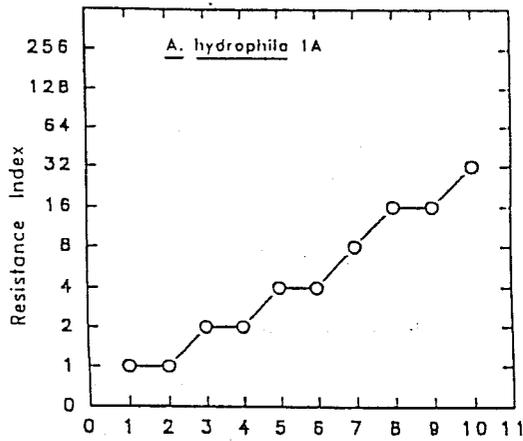
a, b: $p < 0.05$

表四 Trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 對 *E. tards*
實驗感染鰻魚治療效果試驗

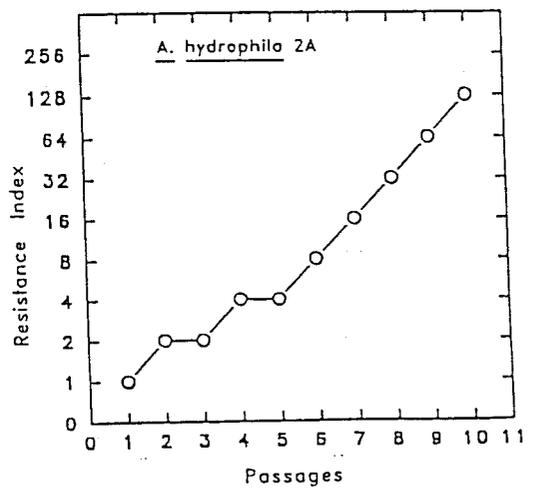
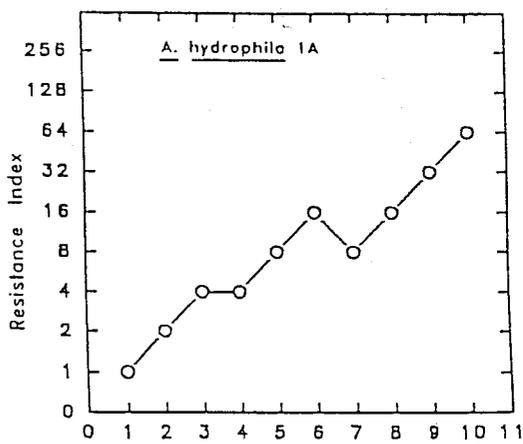
組 別	劑 量 (mg/kg b. w.)	試 驗 尾 數	累 積 死 亡	累 積 死 亡 率
			尾 數	(%)
對 照	0	21	10	47.62 ^{a, b}
TMP + SD	15	21	8	38.10 ^c
TMP + SD	30	21	3	14.29 ^a
TMP + SD	60	21	2	9.52 ^{b, c}

TMP+SD: Trimethoprim與sulfadiazine以1:5之比例合用

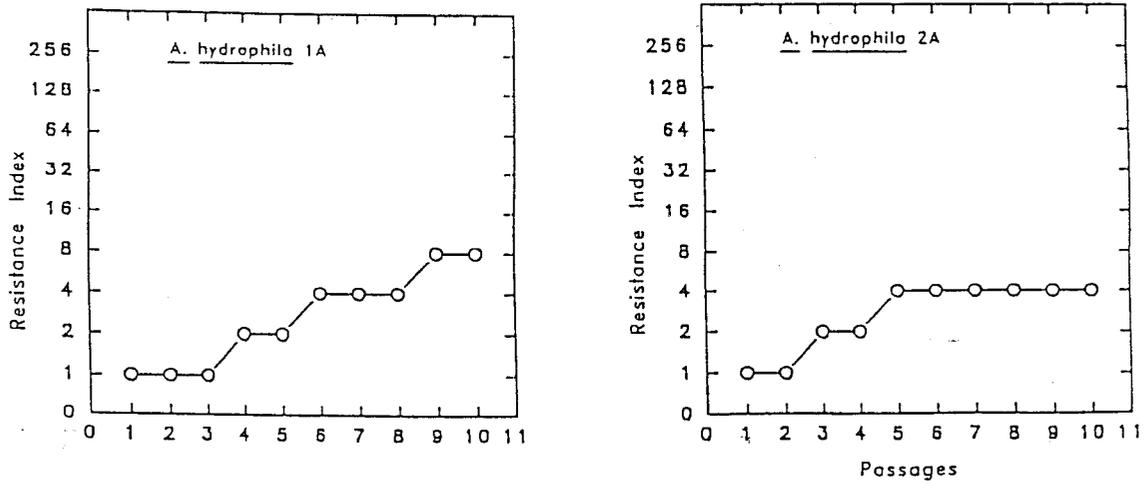
a, b, c: $p < 0.05$



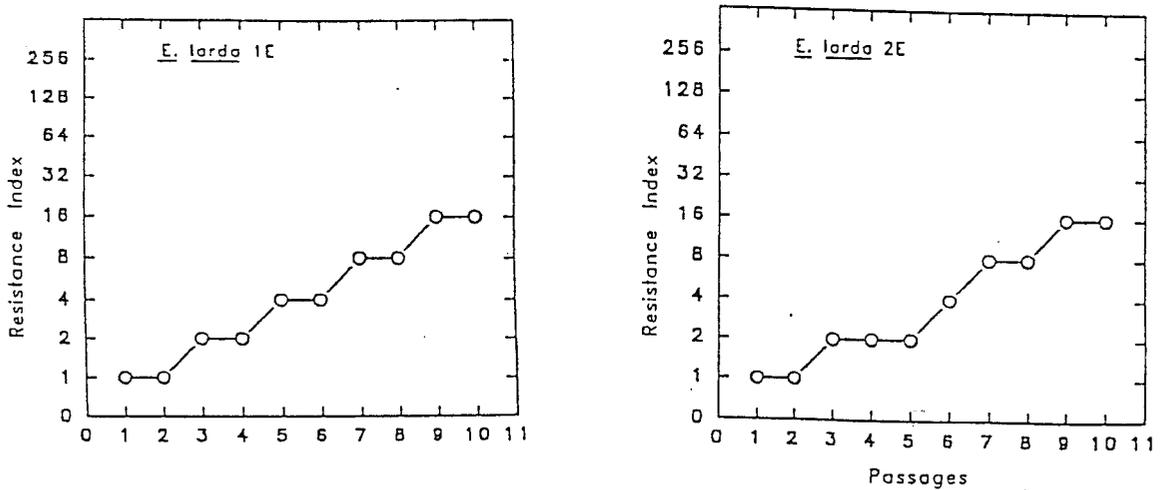
圖一 *A. hydrophila* 對 trimethoprim 之抗藥性指數



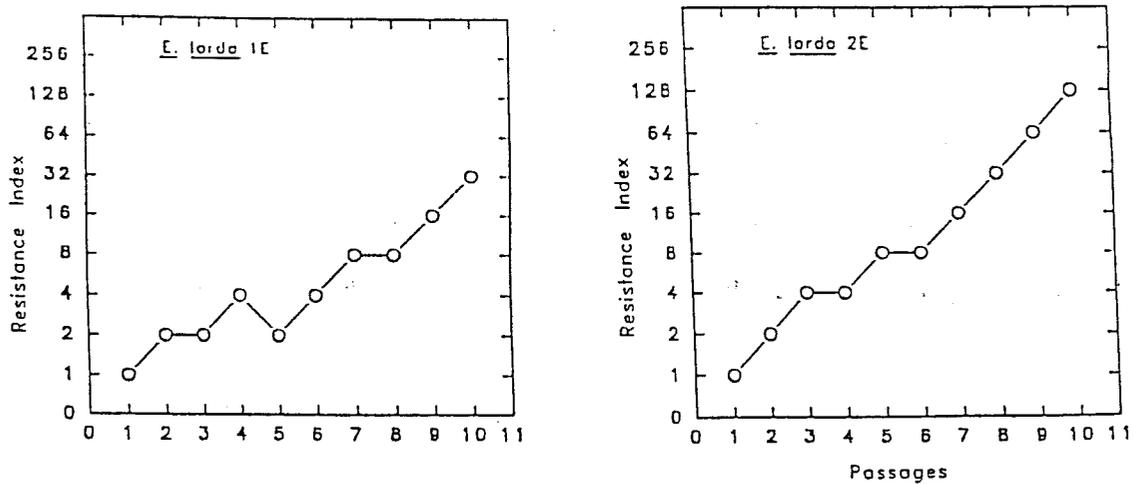
圖二 *A. hydrophila* 對 sulfadiazine 之抗藥性指數



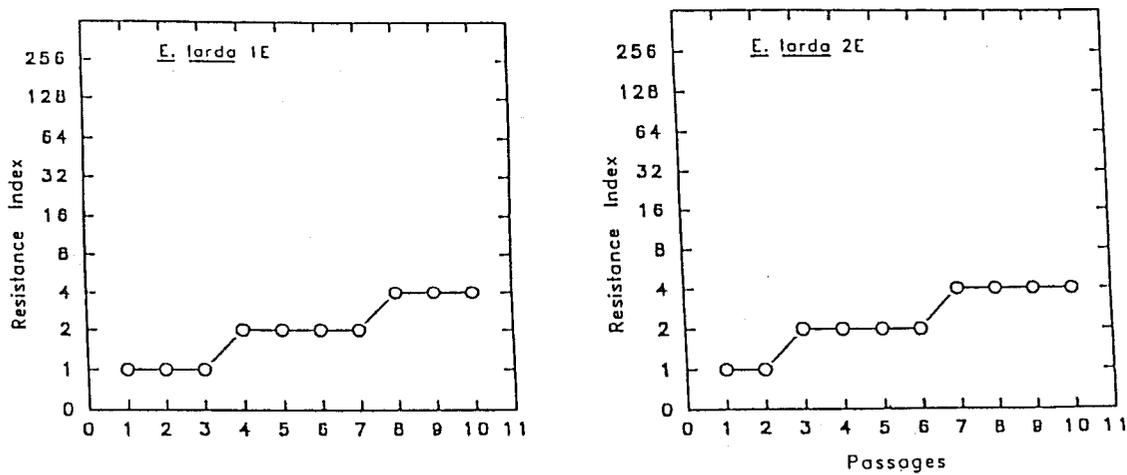
圖三 *A. hydrophila* 對 trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之抗藥性指數



圖四 *E. tarda* 對 trimethoprim 之抗藥性指數



圖五 *E. tarda* 對sulfadiazine之抗藥性指數



圖六 *E. tarda* 對trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之抗藥性指數

急性毒性試驗

從預備試驗結果明瞭 trimethoprim-sulfadiazine (1:5)，對鰻魚的上限（百分之百致死劑量）為約 2,600mg/kg b.w.，下限（百分之百生存劑量）為約 700mg/kg b.w.。因此在此劑量範圍內共分成六劑量組，其試驗結果如下：

投藥劑量 (mg/kg b. w.)	700	910	1,183	1,538	2,000	2,600
死亡率	0/10	1/10	2/10	6/10	8/10	10/10

將上述數據代入 Van der waerden 公式

$$\log LD_{50} = 3.1644$$

$$LD_{50} = 1,460 \text{ (mg/kg b.w.)}$$

故信賴界限為 1,676~1,273mg/kg b.w. ($p=0.05$)。

從上述計算瞭解 trimethoprim-sulfadiazine (1:5)，對於鰻魚之急性毒性 LD_{50} 為 1,460mg/kg b.w.，其信賴界限在 1,676~1,273mg/kg b.w. 之間。

討 論

某些二氨基化合物與適當的磺胺藥合用，對於原蟲或細菌有增強抑制效果 (Falco et. al., 1951; Rollo, 1955; Hitchings, 1961)。為瞭解四種畜牧獸醫常用二氨基嘧啶化合物對於 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 之抗菌作用並選取最強之化合物作為與適當的磺胺藥合用，測定 trimethoprim, ormethoprim, diaveridine 及 pyrimethamine 對於此二種細菌各 30 株之最小抑制濃度，結果發現僅前二種化合物對此二種細菌有抗菌作用，且 trimethoprim 之抗菌作用較 ormethoprim 強，故本研究選取 trimethoprim 與磺胺藥合用。本試驗結果一般認為 pyrimethamine 僅對於原蟲有抑制作用而對於細菌幾乎沒有抑制作用 (Webster, 1991) 及 trimethoprim 對於細菌有極強的抑制作用 (Mandell et al., 1991) 之見解一致，即對於鰻魚病原菌 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 而言，pyrimethamine 亦幾乎沒有抗菌作用，而 trimethoprim 則具有極強的抑制作用。又從文獻中發現 sulfadiazine 在鰻魚之吸收比在其他魚類良好 (尾崎等, 1979)，故本試驗選擇 trimethoprim 與 sulfadiazine 合用。

藥物對於細菌抗菌力之大小，以最小抑制濃度表示最為適切。數種藥物對於複數細菌抗菌力之比較，有多種表示方法，例如百分之五十最小抑制濃度 (MIC_{50})，百分之九十最小抑制濃度 (MIC_{90}) 及最小抑制濃度之幾何平均數等。本試驗以最小抑制濃度之幾何平均數比較各種藥物抗菌力之大小。本試驗中 trimethoprim 對於 *A. hydrophila* 30 株最小抑制濃度之幾何平均數為 $0.29 \mu\text{g/ml}$ ，sulfadiazine 為 $12.80 \mu\text{g/ml}$ ，二藥以 1:5 之比例合用則為 $1.15 \mu\text{g/ml}$ ，換算二藥各別之濃度，trimethoprim 為 $0.19 \mu\text{g/ml}$ ，sulfadiazine 為 $0.96 \mu\text{g/ml}$ ，二藥很明顯地具有相互相乘效果；二藥以 1:10 之比例合用，則為 $2.78 \mu\text{g/ml}$ ，換算二藥各別之濃度，trimethoprim 為 $0.25 \mu\text{g/ml}$ ，sulfadiazine 為 $2.53 \mu\text{g/ml}$ ，雖然仍具有相互相乘效果，但不如 1:5 比例之合用。在測定對於 *E. tarda* 30 株之最小抑制濃度時亦有相似的趨勢，

trimethoprim單獨之最小抑制濃度幾何平均數為 $0.27 \mu\text{g/ml}$, sulfadiazine為 $11.94 \mu\text{g/ml}$, 二者以1:5之比例合用時為 $1.64 \mu\text{g/ml}$, 換算二者各別之濃度, trimethoprim為 $0.27 \mu\text{g/ml}$, sulfadiazine為 $1.37 \mu\text{g/ml}$; 二者以1:10之比例合用時為 $3.12 \mu\text{g/ml}$, 換算成二者各別之濃度, trimethoprim為 $0.28 \mu\text{g/ml}$, sulfadiazine為 $2.84 \mu\text{g/ml}$, 1:5之增強作用較1:10為強。從上述分析可瞭解, trimethoprim-sulfadiazine (1:5)之相乘效果最佳, 故以此比例進行試管內抗藥性產生試驗, 實驗感染鰻魚之效果試驗及急性毒性試驗。Trimethoprim抑制細菌細胞中的二氫葉酸還原酶, 阻斷葉酸還原成具輔酶活性的四氫葉酸, 另一方面磺胺藥抑制細菌細胞內PABA合成葉酸, 因此二藥合用, 抑制了葉酸合成及代謝過程的兩段步驟, 而被認為具有相乘效果 (Hitchings, 1961; Hitchings and Burchall, 1965)。本試驗結果證實trimethoprim與sulfadiazine合用, 對於*A. hydrophila*及*E. tarda*之抗菌作用具有相乘效果, 而以1:5比例合用之相乘效果比1:10為佳。過去有數篇關於trimethoprim與磺胺藥合用對於魚類病原菌之抗菌作用有相乘效果之報告, 但都以最小抑制濃度之分佈範圍表示 (佐古及楠田, 1978; 藤原等, 1984; 劉, 1990; Macarthy et al., 1974; Liu, 1983), 本試驗則以最小抑制濃度之幾何平均數表示相乘效果之程度, 較具體而明確。

在試管內產生抗藥性之情形, 無論*A. hydrophila*或*E. tarda*對於sulfadiazine或trimethoprim均迅速獲得抗藥性, 但對於二藥合用時則緩慢產生。以*A. hydrophila* 2A菌株而言, 在含有trimethoprim-sulfadiazine (1:5)之培養基中繼代培養五代後, 其MAC一直保留在同一濃度而沒有上升, 但在分別有trimethoprim之培養基中則以階梯型上升, 而在含有sulfadiazine之培養基中則以直線型上升。以*E. tarda* 2E菌株亦有相似的趨勢在含有trimethoprim-sulfadiazine (1:5)之培養基中繼代培養六代後, 其MAC即停止上升。但在分別含有trimethoprim及sulfadiazine之培養基中分別呈階梯與直線型上升。何以*A. hydrophila*或*E. tarda*對trimethoprim-sulfadiazine產生抗藥性比對各別藥物緩慢? 細菌可能對其中的一種藥物獲得抗藥性, 但仍會被另一種藥物抑制之故。從本試驗結果獲知, *A. hydrophila*或*E. tarda*對trimethoprim-sulfadiazine (1:5)產生抗藥性較對各別單獨的藥物緩慢, 故不宜單獨使用, 以減緩抗藥性之產生。

藥物之治療效果試驗, 常受接種菌量之影響。接種菌量太高, 感染動物常在藥效未發生前就引起急性死亡及高死亡率; 接種菌量太低, 則治療組與對照組之死亡率很接近, 無法判定治療效果。本試驗中病原菌之接種量, 先求出對鰻魚之 LD_{50} , 然後以略低於 LD_{50} 之菌量實驗感染鰻魚, 結果對照組之死亡率*A. hydrophila*感染為42.86%, *E. tarda*感染為47.62%, 相當能夠反映現場之死亡率, 並能評估藥物治療效果。藥物對於經濟動物之治療效果, 必須評估其成本。成本之評估方法通常以治療組之死亡率比對照組降低之百分比表示。本試驗中*A. hydrophila*實驗感染鰻魚, trimethoprim-sulfadiazine 15mg/kg b.w.組之累積死亡率比對照組僅降低22.24%, 但30及60 mg/kg組則可降低達77.79%, 可見在降低死亡率方面有極明顯的效果, 而且此二組之累積死亡率與對照組之間有顯著性差異 ($p < 0.05$)。在*E. tarda*實驗感染試驗, 亦有相同的趨勢, 即15mg/kg b.w.組之累積死亡率僅比對照組降低19.99%, 但是30及60mg/kg b.w.組則可分別降低69.99%及80%, 而且此二組之累積死亡率與對照組之間有顯著性差異 ($p < 0.05$)。過去曾經報告*A. hydrophila*及*E. tarda*以 $5 \times LD_{50}$ 菌量分別感染鰻魚, 其對照組之死亡率分別為78%及82%, 以trimethoprim及sulfadiazine 1:5合劑30mg/kg b.w.經口投藥3天之死亡率分別為42%及56%, 比對照組分別降低46.15%及31.70% (Liu, 1983; 劉, 1990), 其試驗中所接種的菌量太高, 以致感染鰻魚迅速死亡且死亡率幾近百分之八十, 不能反映實際情況, 且顯示不出治療效果, 其試驗設計並不適當。

從本試驗結果明瞭, 在使用trimethoprim-sulfadiazine (1:5)治療鰻魚赤鰓病及愛德

華氏病時，以30~60mg/kg b. w. 連續經口投藥3天，即可獲得良好的效果。30mg/kg b. w. 與60mg/kg b.w. 二組在 *A. hydrophila* 或染之累積死亡率相同，在 *E. tarda* 感染則相差僅4.77%，故基於藥物投藥量以最小有效量為適當原則之考慮下，在實際應用時宜推薦30mg/kg b.w.。

急性毒性LD₅₀ 之測定方法可大別為二類，一類是劑量以等差級數增加，例如Behrens-Kaerber法；另一類是劑量以等比級數增加，例如Van der Waerden法。前者較簡便，後者較煩雜但正確度較高。本試驗中以Van der Waerden法則定trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 對於鰻魚之急性毒性LD₅₀ 為1,460mg/kg b.w.，但所謂LD₅₀值不過是平均值（中央值），僅僅是大概的安全指標，95%之信賴界限更具有重要性。本試驗中所求出之95%信賴界限為1,676~1,273mg/kg b.w.，換言之雖然平均值為1,460mg/kg b.w.，但LD₅₀在1,676mg/kg b.w. 以上或在1,273mg/kg b.w.以下的可能性仍有5%。本試驗中信賴界限上限1,676 mg/kg b.w. 與下限1,273mg/kg b.w.之差為403 mg/kg b.w.，相當於平均值1,460 mg/kg b.w.之27.60%，正確度極高，因一般認為50%以下即有相當高的正確度（白須及吐山，1982）。Liu（1983）曾經以Behrens-Kaerber法測定trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 對於鰻魚之急性毒性LD₅₀為1,287.5mg/kg b.w.，在本試驗求出之95%信賴界限範圍內，證明兩篇報告的正確性都高。本試驗結果顯示，trimethoprim-sulfadiazine (1:5) 之有效劑量30~60mg/kg b.w. 與LD₅₀ 1,460mg/kg b.w. 之間，有相當大的安全距離，安全性相當高。

參考文獻

- 林曜松、蕭世民。1997。魚池生態環境與魚病關係之研究（I）台灣鰻魚疾病之統計分析。魚病研究專集。1：57-61。
- 陳石桂、董明澄、呂車鳳、黃旭田。1984。鰻魚潰瘍病菌對各種抗菌劑之感受性試驗。魚病研究專集。6：100-106。
- 陳宏達、郭光雄。1978。水產養殖抗藥細菌之研究—1。養殖鰻抗藥菌之抗藥性。魚病研究專集。2：1-13。
- 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄。1977。養殖鰻潰瘍病病原菌 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之分離。魚病研究專集。1：1-6。
- 郭光雄、鍾虎雲。1978。養殖池之R⁺抗藥菌。魚病研究專集。3：1-8。
- 劉正義、蔡信雄。1980。台灣養殖鰻之潰瘍病。魚病研究專集。3：109-117。
- 劉朝鑫、郭宗甫。1985。魚類病原菌抗藥性之研究I。—養殖池 *Aeromonas hydrophila* 之抗藥性。魚病研究專集。7：45-51。
- 劉朝鑫、郭宗甫。1986。魚類病原抗藥性之研究II。—分佈於養殖環境中之 *Edwardsiella trada* 的抗藥性。魚病研究專集。8：56-57。
- 劉朝鑫、蔡倉吾。1988。Nalidixic acid應用於鰻魚細菌性疾病之控制。國立台灣大學農院研究報告。28(2)：1-9。
- 劉朝鑫。1990。磺胺嘧啶與三甲氧卡二氮嘧啶合用在鰻魚細菌性疾病治療效果之評估。國立台灣大學農學院研究報告。30(1)：1-5。
- 劉朝鑫、王渭賢。1991。 *Aeromonas hydrophila* 及 *Edwardsiella trada* 對數種抗菌劑之抗藥性研究。魚病研究專集。11：47-56。
- 佐古浩、楠田理一。1978。養殖アユのピリオ病に對するトリメトプリムの化學療法學的研究

- I 病原菌に對するトリメトプリムの細菌學的評價。魚病學研究。13(2) : 91-96。
- 尾崎久雄、池田彌生。1979。魚類藥理學 I. サルファ劑，東京，綠書房，pp.67。
- 家畜の耐性菌研究會。1976。家畜由來の細菌に對する藥劑の最小發育阻止濃度 (MIC) 測定法。日獸會誌。29 : 90-92。
- 高木敬次郎、小澤光。1960。藥物實驗，東京，南山堂，pp.132-133。
- 高橋勇、吉田孝治、前原東邦。1984。Mycoplasma gallisepticum に對するタイロシンとクロルテトテトラサイクリンの試験管内における併用效果，特に耐性抑制效果について。日本獸醫畜產大學紀要23 : 1-6。
- 藤原善三、加納照正、福井晴朗。1974。スルフィソゾール・トリメトプリム合劑のブリとウナギへの應用。魚病研究。19(1) : 35-44。
- Barnett, M. and S. R. M. Bushby (1970) Trimethoprim and the sulfonamides. Vet. Rec., 87 : 43-51.
- Bosse, M. P. and G. Post (1983) Tribissen and tiamulin for control of enteric red mouth disease. J. Fish Dis., 6 : 27-32.
- Bushby, S. R. M. and G. H. Hitchings (1968) Trimethoprim, a sulfonamid potentiator. Brit. J. Pharmacol., 33 : 71-76.
- Craig, G. R. and G. White (1976) Studies in dogs and cats dosed with trimethoprim and sulphadiazine. Vet. Rec., 98 : 82-86.
- Falco, E. A., L. G. Goodwin, G. H. Hitchings, I. M. Rollo, and P. B. Russel (1951) 2,4-Diaminopyrimidines a new series of antimalarials. Brit. J. Pharmacol. Chemother., 6 : 185-200.
- Hitchings, G. H. (1961) A biochemical approach to chemotherapy. Ann. N. Y. Acad. Sci., 23 : 700-708.
- Hitchings, G. H. and J. J. Burchall (1965) Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for chemotherapy. Adv. Enzymol., 27 : 417-468.
- Jawetz, E., J. Melnick and E. A. Adelbery (1970) Review of Medical Microbiology. Lange medical publications, Los Altos, California, pp.317-319.
- Ling, G. V. and A. L. Ruby (1979) Trimethoprim in combination with a sulfonamide for oral treatment of canine urinary tract infection. J. Amer. Vet. Med. Asso., 174 : 1003-1005.
- Liu, C. K. (1983) Evaluation of trimethoprim and sulfonamide in bacterial diseases of eels. In : Proceedings of ROC-Japan Cooperative Science Seminar on Fish Diseases, 1982, Taiwan, pp.88-92.
- Mandell, G. L. and M. A. Sande (1991) Antimicrobial agents. In Gilman. A. G., T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor eds. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. Singapore : Pergamon Press, pp.1047-1057.
- McCarthy. D.H., J. P. Stevenson, and A. W. Salsbury (1974) Combined in vitro activity of trimethoprim and sulfonamides on fish pathogenic bacteria. Aquacult., 3 : 87-92.
- Rehm, W. F. and G. White (1970) A field trial with trimethoprim and sulfonamides in bacterial diseases of cattle and pigs. Vet. Rec., 87 : 39-42.
- Rollo, I. M. (1955) The mode of action on sulfonamides, proguanil and pyrimethamine on *Plasmodium gallinaceum*. Brit. J. Pharmacol., 10 : 208-214.

- Webster, L. T. Jr. (1991) Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: Gilman, A. G., T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor eds. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. Singapore: Pergamon Press, pp.978-998.
- White. G. and C. G. Withnell (1973) Chemotherapeutic evaluation of trimethoprim and sulfonamides in experimental salmonellosis of sheep. Vet. Sci., 14 : 245-254.
- Wormser, G. P., G. T. Keusch and C. H. Rennie (1982) Co-trimoxazole, and updated review of its antibacterial activity and clinical efficacy. Drugs, 24: 459-918.

Chemotherapeutic Study for Infection of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* in Eels (*Anguilla japonica*) by Combination of Trimethoprim and Sulfadiazine

Chaw-King Liu¹ and Ya-Fang Liu²

¹ Institute of veterinary Science, National Taiwan University Taipei, Taiwan, R.O.C.

² Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Chemotherapeutic study of trimethoprim-sulfadiazine on *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella trada* infection in eels was investigated. In vitro antimicrobial activity and drug-resistance development studiew, it was found that trimethoprim-sulfadiazine (1:5) was highly synergistic to inhibit *A. hydrophila* and *E. trada*, and induce of drug-resistance was delayed than individual agent alone. In *in vivo* efficacy trial for eels artificially infected with *A. hydrophila* and *E. tarda*, there was significant difference ($p < 0.05$) between the cumulative mortality of the control group and trimethoprim-sulfadiazine (1:5) treated group (30 or 60mg/kg b.w.). In acute toxicity test, LD₅₀ of trimethoprim-sulfadiazine for eels was estimated to be 1,460 mg/kg b.w., this result indicated low toxicity of this combination to eels.