

# 我国鱼类病原——嗜水气单胞的耐药性研究\*

李爱华 蔡桃珍 吴玉深 王伟俊

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉 430072)

**摘要:**采用琼脂扩散法和稀释法研究 26 株嗜水气单胞菌对 21 种抗菌药物的敏感性,分析了其耐药状况。结果表明:从不同地区分离收集到的 26 株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对青霉素类和头孢菌素类药物全部具耐药性,对万古霉素多数不敏感。21 种药物中最敏感的是氟哌酸、氯霉素、呋喃唑酮,总体耐药率分别为 7.7%、7.7% 和 11.5%。氨基糖甙类药物和四环素类药物的耐药频率介于其间。对磺胺药的耐药

---

\* 国家“九五”攻关课题资助项目(No. 96-05-03-2)

收稿日期:1998-08-09,修回日期:2000-04-14

菌比例也很高,高达73.1%的 *A. hydrophila* 对磺胺及复方磺胺具有耐药性,但耐磺胺比耐复方磺胺的现象更为普遍。对3种常用药物具有耐药性的菌株比例最高。同时对鱼类病原菌耐药性的判定标准以及两种试验方法在鱼类病原菌耐药性研究中的适用性问题进行了讨论。

关键词:嗜水气单胞菌,耐药性

中图分类号:S948 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2001)01-058-06

## INVESTIGATION ON DRUG RESISTANCE OF FISH BACTERIAL PATHOGEN-*AEROMONAS HYDROPHILA* IN CHINA

LI Ai-Hua CAI Tao-Zhen WU Yu-Shen WANG Wei-Jun

(State key laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract:** Twenty-six strains of *Aeromonas hydrophila* isolated in cultured fish and soft-shelled turtles were collected from various areas of China. Their susceptibilities to 21 antibacterial agents were studied by disc diffusion method. It was showed that all strains tested were resistant to penicillin and cephalosporins. Most of the strains were sensitive to norfloxacin, chloramphenicol and furazolidone, but up to 73.1%, 70.1% and 50.0% of strains tested showed resistance to sulfonamides, aminoglycosides and tetracyclines respectively. Meanwhile, their susceptibilities were examined by micro-dilution procedure against 8 commonly used antibacterials including ampicillin, furazolidone, tetracycline, oxytetracycline, streptomycin, chloramphenicol, sulfonamides and ciprofloxacin. Only two of 26 strains of *A. hydrophila* were sensitive to all drugs tested except ampicillin. The remaining 24 strains were resistant to various combinations of 8 drugs. Majority of the strains carried a marker of resistance to 2~3 drugs and highly sensitive to ciprofloxacin and chloramphenicol.

The results indicated that *A. hydrophila* was highly resistant to most of common antibiotics in China and more new antibacterials should be introduced into aquaculture to control ever-increasing fish diseases. The criterion for drug resistant bacteria was also discussed in this paper.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*, Drug resistance

随着水产养殖业的迅速发展,养殖环境日益恶化,鱼类病害不断发生,已成为提高养殖产量的制约因素。在我国,不仅原有的草鱼“三病”仍然发生频繁,近年来由 *A. hydrophila*、*Yersinia ruckeri*、*Vibrio fluvialis* 等引起的淡水鱼类细菌性败血症,由 *E. tarda* 引起的鳊鲂爱德华氏菌病以及特种水产养殖动物的多种细菌性疾病等更是造成巨大危害。为减少损失,养殖业者首先采用的对策就是使用抗菌药物。然而,由于对鱼病发生的病因、机理等尚认识不够,加上药物使用技术的相对滞后,又缺乏相应的政策法规,使得药物滥用情况非常严重,可以预计耐药现象会相当严重。国外资料表明,许多鱼类病原细菌产生了耐药性,而且常常是多重耐药<sup>[2]</sup>(Aoki, 1988),耐药性的扩散已成为养殖鱼类细菌性疾病控制中的严重问题。

鱼类病原菌耐药性在我国的研究还很有限、很零散。为此,我们以我国最重要的病原菌 *A. hydrophila* 为对象,对其进行系统的耐药性研究,以期对我国鱼类病原菌的耐药状况有所了解,进而指导渔药的合理使用与开发。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

实验菌株及培养基:26株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),由本实验室保存和由华中农业大学、浙江省水产研究所、中国水产科学院长江水产研究所、中国人民解放军长春兽医大学、武汉市水产科学研究所等单位惠赠。以上菌株主要来自罹病的淡水养殖鱼类及特种水产养殖动物中分离得到。

LB培养基、普通肉汤培养基或2×YT培养基,用于细菌的培养。M-H培养基用于纸片法测定细菌对抗菌药物的敏感度。

试验药物:氯霉素(Chloramphenicol, CM)、四环素(Tetracycline, TC)、链霉素(Streptomycin SM)为Serva公司产品;呋喃唑酮(Furazolidone NF)、环丙沙星(Ciprofloxacin CIP)、盐酸土霉素(Oxytetracycline OTC)、磺胺甲基异恶唑(Sulfamethoxazole SA)、利福平(Rifampicin RF)、氨苄青霉素(Ampicillin AP)为国内产品。所有药物均先配成一定浓度的母液,使用时再用无菌去离子水稀释到所需浓度,多数药物每次使用均重新配置。药敏纸片为上海市医学化验所和北京天坛药物生物技术开发部产品。

## 1.2 实验方法

纸片扩散法:参照文献[3]方法进行。同时,以标准菌株ATCC25922和ATCC25923为质控菌株。体外抑菌试验:实验采用微量二倍稀释法,在聚苯乙烯96孔板上进行,每孔容量为0.25mL。菌液浓度为1/100的McF1号管。所有药物敏感性试验均在相同的温度下进行。

# 2 结果

## 2.1 纸片扩散法测定的药敏试验结果

从表1可见,26株*A. hydrophila*对3种青霉素类和2种头孢菌素药物全部具有耐药性。其中最敏感的是氟哌酸、氯霉素、呋喃唑酮和妥布霉素,耐药率分别为7.7%、7.7%、11.5%和7.7%。在常用药物当中,氨基糖甙类药物的总体耐药水平为70.1%,其中链霉素和卡那霉素的耐药率较高,分别为61.5%和30.8%。这类药物中以妥布霉素和庆大霉素相对比较敏感。四环素类的总体耐药率为50.0%,

表1 26株*A. hydrophila*对21种药物的耐药频率(纸片扩散法)

药物	耐药菌	耐药菌
	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )	比例
<b>青霉素类</b>		100%(26/26)
Ampicillin	32	100%(26/26)
Carbenicillin	64	100%(26/26)
Penicillin G	4	100%(26/26)
<b>头孢菌素类</b>		100%(26/26)
Cefazolin	32	100%(26/26)
Cephalothin	32	100%(26/26)
<b>氨基糖甙类</b>		70.1%(19/26)
Gentamicin	8	19.2%(5/26)
Kanamycin	25	30.8%(8/26)
Neomycin	10	34.6%(9/26)
Streptomycin	15	61.5%(16/26)
Tobromycin	8	7.70%(2/26)
<b>四环素类</b>		50.0%(13/26)
Doxycycline	16	26.9%(7/26)
Oxytetracycline	1.0	50.0%(13/26)
Tetracycline	16	38.5%(10/26)
<b>磺胺类</b>		73.1%(19/26)
Sulfonamide	350	73.1%(19/26)
TMP/SMZ	160	30.8%(8/26)
<b>其它</b>		
Chloramphenicol	32	7.70%(2/26)
Erythromycin	8	50.0%(13/26)
Furazolidone	128	11.5%(3/26)
Norfloxacin	16	7.70%(2/26)
Vancomycin	32	92.3%(24/26)

土霉素耐药水平最高,而强力霉素的耐药率相对较低。受试的 20 株 *A. hydrophila* 中,磺胺药耐药菌比例很高,为 73.1%,而复方磺胺的耐药菌比例相对较低。此外,50%的 *A. hydrophila* 对红霉素具耐药性。

26 株试验菌株中有 24 株至少对 1 种氨基糖甙类药物有耐药性;在 5 种氨基糖甙类药物中,5 种耐药表型同时出现的有 3 株。在 24 株耐药菌中,3~4 种耐药表型同时出现的有 15 株,占 62.0%,表现出不完全的交叉耐药性。土霉素抗性和四环素的耐药性同时出现的机率相近,而强力霉素则明显偏少。耐强力霉素的 9 株菌对土霉素和四环素均有耐药性。对复方磺胺药耐药的 9 株菌对磺胺嘧啶均有耐药性,而 11 株耐磺胺嘧啶的菌株对复方磺胺却敏感。2 株耐环丙沙星的 *A. hydrophila* 同时对土霉素也有耐药性,但其余 7 株耐土霉素的 *A. hydrophila* 对环丙沙星却敏感,这可能反应出单向的交叉耐药性,或者说使用土霉素促进了环丙沙星耐药菌株的选择。

## 2.2 微量稀释法测定的结果

鉴于纸片扩散法是医学上所建立起来的一种测定药物敏感性的方法,是否完全适合于鱼类病原菌的研究,尚无学者研究过。为此,我们在用纸片法进行药敏试验的同时,采用经典的稀释法测定了 8 种常用抗菌药物对 26 株 *A. hydrophila* 的敏感性,以比较两种的测定结果,对纸片法的适用性进行评价。

表 2 8 种抗菌药物对 26 株 *A. hydrophila* 最低抑浓度(MIC)分析( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

抗菌药物	MIC 的范围	MIC <sub>50</sub>	Mean	MIC <sub>90</sub>
Tetracycline	0.25~16.0	1.0	2.90	8.0
Furazolidone	0.4~6.4	0.8	2.02	6.4
Ciprofloxacin	0.0125~0.8	0.025	0.12	0.4
Ampicillin	25.6~>50	25.6	>46.25	>50
Oxytetracycline	0.2~25.6	3.2	6.0	12.8
Chloramphenicol	0.0625~8.0	0.25	1.03	4.0
Streptomycin	3.2~>50	12.8	>24.98	>50
sulfonamide	4.0~>25	62.5	>79.6	>250

表 3 26 株 *A. hydrophila* 对 8 种药物的耐药频率(微量稀释法)

抗菌药物	耐药菌的 MIC( $\geq\mu\text{g}/\text{mL}$ )	耐药菌的比例
Ampicillin	12.5	100%(26/26)
Chloramphenicol	1.6	19.23%(5/26)
Ciprofloxacin	0.8	7.69%(2/26)
Furazolidone	3.2	34.6%(9/26)
Oxytetracycline	4.0	34.6%(9/26)
Streptomycin	25.6	53.8%(14/26)
Sulfonamide	25	57.69%(15/26)
Tetracycline	3.2	30.7%(8/26)

从表 2 中可以看出,目前 *A. hydrophila* 对环丙沙星和氯霉素最为敏感,分别只要 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度即可抑制 50% 的菌株,抑制 90% 菌株的浓度分别为 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。四环素、土霉素、呋喃唑酮、链霉素的 MIC<sub>50</sub> 虽然不高,分别只有 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,但 MIC<sub>50</sub> 却很高,分别为 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$  以及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上。磺胺药的敏感性最低,虽然最小的 MIC 为 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,但 MIC<sub>50</sub> 高达 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,MIC<sub>90</sub> 更是在 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上。

从每种药物的 MIC 分布图(未显示)可以得出,除呋喃唑酮外,其它药物的 MIC 都有相对集中的分布。氯霉素的 MIC 集中在 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;四环素的 MIC 以 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的最多;氨苄青霉素的 MIC 绝大多数大于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;磺胺药和环丙沙星的 MIC 的分布显示出两个水平。磺胺药的 MIC 主要分布于 4~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 62.5~>250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  两个区段;而环丙沙星的 MIC 主要分布于小于

0.1μg/mL和大于0.4μg/mL两个区域,但大部分小于0.05μg/mL;土霉素的MIC集中分布于3.2μg/mL左右;链霉素的MIC多数大于50μg/mL,而呋喃唑酮的MIC分布不够集中,几乎均匀分布于0.4~6.4μg/mL之间。

表3为微量稀释法所测得的耐药菌比例。从中可以看出,所有*A. hydrophila*对氨基青霉素完全耐药;对磺胺药和链霉素的耐药率也很高,分别为57.7%、53.8%;环丙沙星、氯霉素的敏感性高,分别只有2株和5株耐药菌。呋喃唑酮、土霉素、四环素介于它们之间,耐药菌所占比例分别为34.6%、34.6%、30.8%。

表4 微量稀释法与纸片法测定的抗菌药物敏感性比较

	微量稀释法		纸片扩散法	
	耐药菌的MIC (≥μg/mL)	耐药菌的比例	耐药菌的MIC (≥μg/mL)	耐药菌的比例
AP	12.5	100%	32	100%
CM	1.6	19.23%	32	7.70%
CIP	0.8	7.69%	16	7.7%(NFX)*
NF	3.2	34.6%	128	11.5%
OTC	4.0	34.6%	1.0	50.0%
SM	25.6	53.8%	15	61.5%
SA	25	57.69%	350	73.1%
TC	3.2	30.8%	16	38.5%

\* NFX: Norfloxacin

表5 鱼类病原菌 *Aercomonas hydrophila* 的耐药谱

耐药标记数	菌株数	耐药谱
1	2	
2	3	Sm
2	2	Nf
3	5	Sa Sm
3	2	Cp Ot
4	2	Sa Ot Tc
4	2	Nf Ot Tc
4	3	Cm Sa Sm
4	1	Cm Nf Sa
4	1	Nf Sa Tc
6	2	Nf Ot Sa Sm Tc
7	1	Cm Nf Ot Sa Sm Tc

表4是两种测定方法所得结果的比较。从中可以看出两种方法所测定的结果虽具有一定的相关性,但的确存在差别。

从表5可以看出,26株*A. hydrophila*除对氨基青霉素全部耐药以外,同时对2~8种常用抗菌药物耐药的菌株比例最高,为16株占61.5%;2株耐5种药物,甚至有1株分离自甲鱼的*A. hydrophila*同时耐CM、NF、OTC、SA、CM、TC,常用药物几乎无效。26株菌中只有2株对所有常用药物敏感。

### 3 讨论

#### 3.1 耐药菌的判定标准

测定抗菌药物对病原微生物的敏感性,鱼病学研究中主要采用两种方法:

纸片扩散法和稀释法。扩散法具有快速简便的特点,国内学者应用较多,国外学者也有采用(Ansary等,1990),但完全采用医学上的相应标准。由于药物在鱼和人体内的动力学特征差别很大(Stoffregen等,1996),而判断细菌是否产生耐药性又必须考虑药物在体内的动力学特性(Tsoumas等,1989),而且水产上抗菌药物的使用剂量缺少统一标准。所以,完全套用医学上耐药菌、敏感菌的判定标准显然是不够合理。

现在多数学者采用稀释法测定抗菌药物对病原菌的MIC,但判定耐药菌所采用的标准,不同学者有所不同。有的是将所有试验菌的MICs,进行作图,然后把其中MIC明显偏高的那部分看作耐药菌(Zhao等,1992);有的是将不同年份测得的MIC值进行比较,MIC明显升高者定为耐药菌;

也有的学者综合多方面的文献资料,设置判定耐药性的MIC界限(Tsoumas等,1989)。有许多文献未给出明确的划分标准。本文所采用的判定标准(见表3)就是参考有关文献所确定的(Tsoumas等,1989)。

从表4可以看出,两种方法测定的结果在总的趋势上虽存在相似性,但仍有一定差别。用纸片法测定的耐药菌比例对于氯霉素、呋喃酮偏低,对于四环素类、磺胺和链霉素则偏高,而对于喹诺酮类药物则相近。这些差异可能是耐药菌的判定标准不同所造成的。

### 3.2 我国鱼类病原菌耐药状况分析

我们试验的26株嗜水气单胞菌对青霉素类药物都具有耐药性。其他学者也发现*A. hydrophila*对这类药物具有耐药性(Ansary等1992),这是一种固有耐药性。因此,使用这类药物治疗*A. hydrophila*引起的疾病是无价值的。在医学上,也认为半合成青霉素对*A. hydrophila*无明显的抗菌活性。

除对氨基青霉素的耐药性外,*A. hydrophila*多数菌株同时具有3种耐药标记,其中对磺胺、链霉素、四环素类的耐药性菌株最常见,这可能与这几种药物在我国使用较多有关。

从本研究的结果看,我国鱼类病原菌的多重耐药现象比较普遍,这与Ansary等(1992)和Son等(1997)的结果有相似之处。不过,各地的细菌耐药状况相差较大,这可能与试验菌株来源、分离的年代以及各地的用药状况不同有关。有证据表明,同一地区不同年代一种细菌的耐药谱也有变化。然而,呋喃唑酮和氯霉素也是我国使用非常频繁的两种抗菌物质,但*A. hydrophila*对它们的耐药率仍比较低,分别只有11.5%和7.70%(纸片法),说明该菌对这两种药物不容易产生耐药性,因此这两种药物现在仍然可用于防治*A. hydrophila*引起的疾病。

从以上鱼类病原菌的耐药状况可以看出,目前许多常用药物已出现了大量的耐药菌,其疗效必定明显下降,因此迫切需要开发出新一代的抗菌药物,以取代这些老药。氟喹诺酮类药物可能就是一类具有良好应用前景的药物。从本次试验的结果看,*A. hydrophila*中只有7.70%的菌株对氟哌酸和环丙沙星产生了耐药性,这一结果与国外的情况接近。Enrofloxacin和沙拉沙星(Sarafloxacin)对*A. salmonicida*的MIC<sub>50</sub>分别只有0.04μg/mL和0.02μg/mL(Inglis等,1991);环丙沙星(ciprofloxacin)、诺氟沙星(norfloxacin)对*E. tarda*和*V. anguillarum*的MIC<sub>50</sub>分别为0.125μg/mL、0.1μg/mL和0.1μg/mL、0.2μg/mL(Nakano等,1989)。而我们本次试验的结果为:环丙沙星对*A. hydrophila*的MIC<sub>50</sub>为0.025μg/mL,MIC<sub>90</sub>也相近。这些结果说明了氟喹诺酮类药物在水产动物病害防治中得到如此重视的原因。

### 参 考 文 献

- [1] Ansary A, Haneef R M, Torres J L, et al. J. Fish Dis, 1992, 15: 191~196.
- [2] Aoke T. Microbiol. Sci, 1988, 5: 219~223.
- [3] Inglis V, Richards R H. J. Fish Dis, 1991, 14: 641~650.
- [4] Nakano S, Aoki T, Kitao T. J. Aquat. Anim. Health, 1989, 1: 43~50.
- [5] Son R, Rusul G, Sahilah A M, et al. Lett Appl Microbiol, 1997, 24: 479~482.
- [6] Starliper C E, Cooper R K, Shotts E B, et al. J. Aquat. Anim. Health, 1993, 5: 1~8.
- [7] Stoffregen D A, Bowser P R, Babish J G. J. Aquat. Anim. Health, 1996, 8: 181~207.
- [8] Tsoumas A, Alderman D J, Rodgers C J. J. Fish Dis, 1989, 12: 493~507.
- [9] Zhao J, Kim E H, Kobayashi T. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58: 1523~1527.