

嗜水气单胞菌欧洲鳗皮肤溃疡分离株的耐药性

郑国兴 周 凯

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘 要 1996年6~8月自福建省霞浦县某养鳗场患狂游症的欧洲鳗(*Anguilla anguilla* L.)下颚溃疡处分离到15株细菌,经鉴定为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。用药敏纸片法对其进行常用抗菌药物敏感试验,结果表明耐药菌株率分别为:痢特灵,73.3%;复方新诺明(SMZ+TMP),73.3%;四环素,86.7%;土霉素,53.3%;红霉素,53.3%;氯霉素,73.3%;氟哌酸(诺氟沙星),60.0%;环丙沙星,60.0%。测定其最小抑菌浓度(MIC)平均值分别为:痢特灵,28.0 µg/ml;复方新诺明 1 424.0 µg/ml;四环素,112.0 µg/ml;土霉素,992.0 µg/ml;红霉素,103.5 µg/ml;氯霉素,136.3 µg/ml;氟哌酸,98.0 µg/ml和环丙沙星,45.0 µg/ml,均远远高于药物使用浓度。被测菌株一般对4种以上抗菌药物耐药,个别菌株对全部测试药物耐药。说明在养殖过程中频繁使用抗菌素,已产生了广泛的耐药菌株。

关键词 欧洲鳗,狂游病,嗜水气单胞菌,耐药性

1996年6~8月福建省霞浦县养殖的欧洲鳗(*Anguilla anguilla* L.)发生严重的狂游症,全县20余家养鳗场大多遭到毁灭性打击。因此对狂游病鳗做了细菌学检查,血液和内脏各器官未分离到细菌,但病鳗下颚溃疡处经显微镜检查,观察到大量活动杆菌。分离培养后检出了15株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。采用纸片扩散法进行药敏试验,发现这些细菌都有很强的耐药性,一些常用药物对之无效。本文对这些分离到的细菌作进一步耐药性分析,以期筛选有效的防治药物供生产应用。

1 材料与方法

1.1 病鳗

于1996年6~8月选自福建省霞浦县某养鳗场患狂游症的欧洲鳗。其主要症状是厌食、反应迟钝、游动无力,偶尔窜至水面侧身作间隙性狂游。病鳗下颚处出现白色斑块、充血或溃疡穿孔。死后体僵直,头上扬,嘴张开。

1.2 细菌的分离与鉴定

选取典型狂游症的病鳗,清水冲洗干净后,用75%的酒精棉球将病鳗体表反复擦拭消毒,再用灭菌

剪刀取一小块下颚溃疡处皮肤在普通营养琼脂平板上涂布接种,在30℃下培养1~2 d后进行观察,选取优势单个菌落接种于斜面,经进一步分离提纯后,供鉴定用。

细菌的分类鉴定按《一般细菌常用鉴定法》进行^[1];并按《伯捷细菌鉴定手册》^[2]鉴定至种,共分离试验菌株15株。

1.3 药物敏感试验

采用纸片法对检出的15株嗜水气单胞菌作药物敏感试验。抗菌药物药敏纸片购自上海市卫生防疫站疾病控制中心。

1.4 最小抑菌浓度的测定

在上述药敏试验基础上,挑取其中8株采用两倍稀释法测定最小抑菌浓度(MIC)。培养基用0.5%蛋白胨水于30℃培养,观察3 d。

试验药物:痢特灵,上海兽药厂,粉剂;复方新诺明,上海市医药有限公司长乐药厂,片剂;四环素,上海信谊药厂,片剂;土霉素,浙江余姚制药厂,片剂;红霉素,上海旭东海普药业有限公司,片剂;氯霉素,上海信谊药厂,片剂;氟哌酸,上海衡山药业有限公司,胶囊;环丙沙星,上海第二制药厂,胶囊。

2 结果

收稿日期:1998-03-03

2.1 试验菌的鉴定

试验菌为革兰氏阴性短杆菌,以极生单鞭毛运动,无荚膜,不产生芽孢。根据试验菌的形态特征和各项生理生化特性(表1),对照文献[2],证实试验菌是嗜水气单胞菌。

2.2 耐药菌的出现率

15株嗜水气单胞菌对8种常用抗菌素药敏试验结果及其耐药率见表2,从中可看出耐药菌株的出现率相当高。7耐以上的共有4株,占26.7%;6耐以上8株,占53.3%;5耐以上的有11株,占73.3%;4耐以上13株,竟高达86.7%。

2.3 最小抑菌浓度的测定

8株嗜水气单胞菌对常用抗生素的最小抑菌浓度(MIC)测试结果见表3,从中可看出其最小抑菌浓度的平均值均远远高于药物的使用浓度。

3 讨论

嗜水气单胞菌是淡水养殖鱼类的主要致病菌,养鳗池中的常见菌,一般认为是条件性致病菌。当欧鳗生长环境不适宜或体表受伤或感染了其它疾病时,抗病力下降,容易引起嗜水气单胞菌的感染。通过鉴定已证实,病鳗下颌皮肤溃疡与该菌有很大的关系,至少可认为是继发性感染,它导致欧鳗狂游病的并发症,加速病鳗的死亡。

表1 分离的15株嗜水气单胞菌的生物学特性

Table 1 Characteristics of 15 strains of *Aeromonas hydrophila* isolated

特性 characteristic	阳性反应数 no. of positive	特性 characteristic	阳性反应数 no. of positive
革兰氏染色 gram stain	0	乳糖 lactose	14
直杆状 straight rods	15	麦芽糖 maltose	15
单鞭毛 1 flagellum	15	甘露醇 mannitol	15
O/F 试验 O/F Test	15/15	甘露糖 mannose	15
吲哚 indole	15	蜜二糖 melibiose	0
甲基红 methyl red	15	葡萄糖苷酶 glucosidase	7
VP	15	棉籽糖 raffinose	0
柠檬酸盐 citrate	15	鼠李糖 rhamnose	0
H ₂ S	15	水杨苷 salicin	11
尿素酶 urease	0	山梨醇 sorbitol	0
赖氨酸 lysine	15	蔗糖 sucrose	14
精氨酸 arginine	15	海藻糖 trehalose	15
鸟氨酸 ornithine	0	木糖 xylose	0
明胶酶 gelatinase	13	七叶苷 esculin	11
KCN	14	酒石酸盐 tartrate	0
丙二酸盐 malonate	0	乙酸盐 acetate	0
葡萄糖产酸 glucose, acid	15	脂酶 lipase	15
葡萄糖产气 glucose, gas	13	DNA 酶 DNA - ase	15
阿东醇 adonitol	0	硝酸盐 nitrate	15
阿拉伯 arabinose	8	氧化酶 oxidase	15
纤维二糖 cellobiose	3	ONPG	15
卫矛醇 dulcitol	0	NaCl 0%	15
赤藓糖醇 erythritol	0	NaCl 1%	15
半乳糖 galactose	15	O/129	0
甘油 glycerol	15	褐色素 brown pigment	0
肌醇 inositol	0		

表2 15株嗜水气单胞菌对常用抗生素药物的敏感试验及其耐药率

Table 2 Sensitivity test and drug resistance of 15 strains of *A. hydrophila* to the most in-use antibiotics

菌株号 strain no.	痢特灵 NF	复方新诺明 SMZ + TMP	四环素 TC	土霉素 OX	红霉素 ER	氯霉素 CP	氯哌酸 NFX	环丙沙星 CPS
OB-6	-	-	-	++	++	-	-	-
IC-7	-	-	-	+	-	-	++	++
VA16-1	+	++	-	-	+	++	-	-
A16-3	+	-	-	++	-	++	-	-
A16-4	+	-	-	++	+	-	-	-
VB16-3	-	-	-	-	-	-	-	-
VB16-4	+	+	-	++	++	-	-	-
D23-A	-	-	-	-	-	-	+	++
D23-B	-	-	-	-	-	-	++	++
D23-B2	-	-	-	-	-	-	-	-
D23-C	-	-	-	++	-	-	-	-
D23-E	-	++	++	-	++	++	++	++
D23-ET	-	-	-	-	+	-	-	-
D23-F	-	++	++	++	++	++	++	++
830-A	-	-	-	-	-	-	+	++
耐药率/% resistance rate	73.3	73.3	86.7	53.3	53.3	73.3	60.0	60.0

注: ++ 高度敏感 high sensitivity; + 中度敏感 sensitivity; - 耐药 resistance.

NF, furazolidone; SMZ + TMP, sulfamethoxazole + trimethoprim; TC, tetracycline; OX, oxytetr; ER, erythromycin; CP, chloramphenicol; NFX, nor-

floxacin; CFS, ciprofloxacin, clycline

表 3 8 株嗜水气单胞菌对常用抗生素的最小抑菌浓度

Table 3 Minimal inhibitory concentrations of 8 strains of *A. hydrophila* to the most - in - use antibiotics $\mu\text{g/ml}$

菌株号 strain no.	痢特灵 NF	复方新诺明 SMZ + TMP	四环素 TC	土霉素 OX	红霉素 ER	氯霉素 CP	氟哌酸 NFX	环丙沙星 CFS
OB - 6	32	1 024	64	256	4	64	128	16
VA16 - 1	16	64	128	2 048	32	2	128	128
VB16 - 3	32	2 048	128	1 024	128	128	128	32
VB16 - 4	16	64	128	1 024	8	128	128	64
D23 - A	32	2 048	64	256	128	128	16	8
D23 - B2	32	2 048	128	1 024	256	256	64	16
D23 - C	32	2 048	128	256	256	128	64	32
D23 - ET	32	2 048	128	2 048	16	256	128	64
平均值 mean	28.0	1 424.0	112.0	992.0	103.5	136.3	98.0	45.0

有关水产养殖中出现耐药性问题,国内外有不少报道^[3-6],但问题的严重性并没有引起广泛重视。本文对嗜水气单胞菌耐药性测定结果表明,其耐药现象已十分严重。如常用的氯霉素,其耐药菌株率为 73.3%,最小抑菌浓度高达 256 $\mu\text{g/ml}$,高于使用浓度近百倍。又例如氟哌酸(诺氟沙星),耐药菌株的出现率为 60.0%,最小抑菌浓度高达 128 $\mu\text{g/ml}$,高于使用浓度数十倍。使用广谱抗生素(如四环素、氯霉素)和近年来使用较广泛的喹诺酮类药物(如氟哌酸、环丙沙星),结合水体消毒和改善水环境治疗,嗜水气单胞菌病一般能取得满意的治疗效果。但本试验结果表明,由于在养殖过程中频繁使用抗菌素或长时间使用一种抗菌素、联用过多、配伍不当、剂量不适、选药不准等,已出现严重的耐药性问题,常用的抗生素已失去了治疗作用。据毛芝娟等报道,在饲养水中泼洒 5 $\mu\text{g/ml}$ 的土霉素、红霉素或氯霉素,并不能有效地降低细菌的生存量,当向饲养水中泼洒上述 3 种抗生素的药物浓度增加到 10 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 时,在短时间内饲养水中的活菌数量有所下降,但 24 h 后活菌数量均有较大幅度的增长^[7]。因此,向饲养水中泼洒抗菌素不应视作防治细菌疾病的好方法。它不但不能达到防病治病的目的,又极易使细菌产生耐药性。为防止养殖

过程中发生严重的“感染”,对抗药性问题必须引起足够的重视。笔者认为,全池泼洒药物以外用消毒剂较为合适,如含氯消毒剂:漂白粉、二氯异氰尿酸钠(优氯净)、三氯异氰酸钠(强氯精)以及近年来使用比较广泛的二氧化氯等,都有较好的杀菌效果。

参 考 文 献

- 1 中国科学院微生物研究所分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 1~194
- 2 Holt J T. et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th. Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994, 190~191, 254~255
- 3 陈会波, 等. 鳗鲡赤鳍病病原菌的分离鉴定和耐药性的研究. 水生生物学报, 1992, 16(1): 40~46
- 4 Aoki T and T Watanabe. Studies of drug - resistant bacteria isolated from ell - pond water and intestinal tracts of the eel (*Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*). Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1993, 39(2): 121~130
- 5 Son R. et al. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolated from cultured fish, *Tilapia* (*Tilapia mossambica*). Letters in Applied Microbiology, 1997, 24(6): 479~482
- 6 Zhao J. et al. Drug resistance of *Vibrio anguillarum* isolated from ayu between 1989 and 1991. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1992, 58(8): 1 523~1 527
- 7 毛芝娟, 等. 几种抗生素在饲养水中抑菌效果的初步研究. 鱼类病害研究, 1997, 19(3~5): 114~115

Drug resistance of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from skin ulcer of *Anguilla anguilla*

Zheng Guoxing Zhou Kai

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract Fifteen strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from mandibular skin ulcer of *Anguilla anguilla* L. suffer-

ing from the madly – swimming disease were obtained in an culture farm in Fujian Province from June to August, 1996. The sensitivity test of the isolates to antibiotics most in use was examined by disk diffusion method. The isolates showed resistance towards furazolidone, 73.3%; sulfamet hoxazole + trimethoprim (SMZ + TMP), 73.3%; tetracycline, 86.7%; oxytetracycline 53.3%; erythromycin, 53.3%; chloramphenicol, 73.3%; norfloxacin, 60.0% and ciprofloxacin, 60.0% respectively. Out of the 15 isolates, 8 were tested to determine the minimal inhibitory concentration (MIC). The average MICs were: furazolidone, 28.0 $\mu\text{g/ml}$; SMZ + TMP, 1 424.0 $\mu\text{g/ml}$; tetracycline, 112.0 $\mu\text{g/ml}$; oxytetracycline, 992.0 $\mu\text{g/ml}$; erythromycin, 103.5 $\mu\text{g/ml}$; chloramphenicol, 136.3 $\mu\text{g/ml}$; norfloxacin, 98.0 $\mu\text{g/ml}$ and ciprofloxacin, 45.0 $\mu\text{g/ml}$ respectively, which were several or dozens of times higher than the dosages to treat infected fishes. Most of the determined strains were resistant to more than 4 drugs. Two out of the 8 strains were resistant to all the tested drugs. It was indicated that the trouble of drug – resistance was quite serious due to incongruous and frequent use of antibiotics applied during the culture in fish farms.

Key words *Anguilla anguilla*, madly – swimming disease, *Aeromonas hydrophila*, antibiotic resistance

欢迎订阅《海洋与湖沼》

《海洋与湖沼》是由中国海洋湖沼学会主办的国家一级学术期刊, 于 1957 年创刊, 系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物。以报道基础科学、应用基础研究论文为主, 同时重视应用研究、开发研究成果的发表; 论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣、综述、学术简讯、科学家简介、书评等栏目。

据中国科学引文数据库所公布的资料, 在国内科技期刊引文频次最高的 500 名排行榜中, 本刊 1996 年列第 35 名, 1997 年列第 31 名, 均为本学科领域首位。国际上有 SCI、CA、SA、JICS、PJK 等五大检索系统引文收录本刊。1988~1996 年获省部级以上优秀科技期刊奖 8 项, 最高为国家二等奖。

本刊为双月刊, 每期 112 页, 单月出版, 国内外公开发行。每期定价 12 元, 全年 72 元(含邮费)。国内统一刊号: CN37-1149/P, 国外发行代号: BM69, 国内邮发代号: 2-421。全国各地邮局办理订阅手续, 如漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向本刊编辑部订阅, 地址: 青岛市南海路 7 号, 邮政编码: 266071; 联系电话: (0532) 2879062-2528; E-mail: bsun@ms.qdio.ac.cn