

# 鰻魚赤鰭病之產氣單胞菌對磺胺劑和 2,4-二氨基嘧啶類藥物的感受性試驗

林文華\*、蘇杰夫、林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

**摘要** 分離自台灣養殖鰻魚之產氣單胞菌株計 11 株，參照國際委員會臨床實驗室的標準，採用瓊脂膠平板稀釋法，進行磺胺劑和 2,4-二氨基嘧啶類藥物併用感受性試驗，結果所有測試菌株達 50% 生長抑制的最小抑制濃度如下：sulfadimethoxine 256  $\mu$  g/mL, sulfadiazine 128  $\mu$  g/mL, trimethoprim  $\leq 0.5$   $\mu$  g/mL, ormetoprim 1  $\mu$  g/mL, ormetoprim/sulfadimethoxine  $< 1/19$   $\mu$  g/mL, trimethoprim/sulfadiazine  $< 0.5/9.5$   $\mu$  g/mL。

**關鍵詞：**鰻魚、產氣單胞菌、磺胺劑、二氨基嘧啶、最小抑制濃度

## 緒 言

*Aeromonas hydrophila* 感染養殖鰻魚主要引起赤鰭病，以腹鰭、胸鰭、腹部皮膚呈現明顯潮紅為特徵而死亡，養殖業者都以能控制和治療本病以增加效益為考量。磺胺劑結合 2,4-二氨基嘧啶類藥物當作抗菌劑，除了很廣泛使用在人類，伴侶動物和家畜禽的細菌性疾病治療外[1,2,3]，也經常應用在魚類的其他細菌性疾病的治療 [9,10]。當分開單獨使用時則要考慮其抗菌活性，對於細菌合成葉酸階段的抑制作用將會受到影響 [4]，因為兩種藥物有協同作用，無論在體內或体外都會增進其抗菌的活性 [1,5,6]，對磺胺劑有抗藥性的許多傳染病皆具有治療效果，同時劑量的使用也可以明顯減少 [1]。2,4-二氨基嘧啶類藥物（2,4-diaminopyrimidine）對於細菌和原蟲的雙氫葉酸還原<sup>reductase</sup> (dihydrofolate reductase) 有顯著性的抑制效果，而引起廣泛性選擇用於當為球蟲的治療劑 [7]，但其抗菌活性則較受到限制 [8]。因此，為了使業者在臨床上對此等藥

物之併用能有正確的觀念應用於本菌引起之疾病的治療，不致於濫用而產生抗藥性細菌，增加治療控制上的困擾或造成魚體藥物殘留等公共衛生問題發生，而進行 2,4-二氨基嘧啶和磺胺劑類藥物併用對本菌的感受性試驗，以提高其治療效果。

## 材 料 與 方 法

**菌株：**本試驗之菌株係由養殖鰻魚檢體病例所分離計 11 株。其中部份菌株來自於相關縣市家畜疾病防治所自行以培養基分離所提供。

**細菌鑑定：**分離之菌株經 Tryptic soy agar (TSA, Difco) 培養發育後，釣取獨立之菌落以革蘭氏染色套組進行染色後鏡檢，以決定細菌之革蘭氏染色性狀及型態等特性，並進行觸<sup>oxidase</sup> (catalase)、氧化<sup>oxidase</sup> (oxidase) 和 O/129 忍受性試驗，再依據廠商說明書選擇適當的細菌鑑定套組 (API 套組，BioMerieux)，以常用的腸內菌和其他革蘭氏陰性桿

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

菌鑑定之 API 20E 套組，依其使用方法所附說明書實施，並以 APILAB 軟體判讀。

**藥物感受性試驗：**測定 *Aeromonas hydrophila*

對 sulfadimethoxine、sulfadiazine {Sigma} 和 trimethoprim、ormetoprim (Roche) 的最小抑制濃度 (Minimal Inhibitory concentration) 係依照 The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 之方法實施瓊脂膠平板稀釋感受性試驗 (agar-dilution susceptibility testing method) [11]。方法如下：將冷凍乾燥保存的菌株先以 TSA broth 溶解後，在 TSA 上畫菌純培養檢查，選取 4~5 個單獨菌落放入 5 mL TSA broth 內，置於 35℃ 培養直到培養基的混濁度達 0.5 McFarland standard (大概菌量為  $10^8$  CFU/mL)，以無菌生理食鹽水作 1:10 濃度稀釋，使菌量大約為  $10^7$  CFU/mL。之後，馬上取小量 (約 1~2  $\mu$ L) 放入預先準備含有各種濃度之

sulfadimethoxine、sulfadiazine 和 ormetoprim、trimethoprim 的 Mueller-Hinton agar 平板內，緩慢旋轉平板，將菌液均勻佈滿於培養基表面上，待表面乾後倒置於 35℃ 培養，經 16~20 小時後判讀。以能明顯看到抑制生長的最低濃度判為最終的最小抑制濃度。試驗同時並以標準菌株 (*E. coli* ATCC 25922 株及 *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 株) 進行品管控制。

## 結 果

**藥物稀釋設計：**藥物感受性試驗的藥物稀釋設

計，係參照 The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 的二倍稀釋法 [11]，開始備置的濃度為 10,240  $\mu$ g/mL，然後進行傳統式的連續稀釋，如表一所示。

Table 1 Antibacterial agent dilution schedule for agar susceptibility method

step	Starting solution of antibacterial agent		No. of volume of distilled water	Intermediate concentration ( $\mu$ g/mL)	Final concentration ( $\mu$ g/mL) after 1:10 dilution in agar
	Concentration ( $\mu$ g/mL)	No. of volume			
1	10240	1	1	5120	512
2	10240	1	3	2560	256
3	10240	1	7	1280	128
4	1280	1	1	640	64
5	1280	1	3	320	32
6	1280	1	7	160	16
7	160	1	1	80	8
8	160	1	3	40	4
9	160	1	7	20	2
10	20	1	1	10	1
11	20	1	3	5	0.5
12	20	1	7	2.5	0.25
13	2.5	1	1	1.25	0.125

**藥物感受性試驗結果：**測試的 *Aeromonas*

*hydrophila* 菌株對於各種藥物的最小抑制濃度界限結果詳如表二所示。同時表中也並列對所有菌株能

達 50% 和 90% 生長抑制的最小抑制濃度。進行品質管制的二株標準菌株，其感受性都是在試驗設定濃度範圍內。

Table 2. Minimal inhibitory concentrations of 2,4-diaminopyrimidine and sulfonamide against 11 strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from the fin-rot disease eels

Antibacterial agent	Minimal inhibitory concentration ( $\mu$ g/mL)		
	Range	50%	90%
sulfadimethoxine (SDM)	128~>512	256	>512
Sulfadiazine (SDZ)	32~>512	128	>512
trimethoprim (TMP)	$\leq 0.25$ ~128	$\leq 0.5$	>128

Ormetoprim (OMP)	≤0.5~128	1	> 128
OMP/SDM	≤0.5/9.5~64/1216	< 1/19	64/1216
TMP/SDZ	≤0.25/4.75~64/1216	< 0.5/9.5	64/1216

## 討 論

抗菌的感受性試驗可以使用稀釋法或擴散法，而選擇方法則常常根據許多因素，如操作容易度、適應性和自動或半自動儀器之使用等都有關係。本試驗採用瓊脂膠平板法的連續性稀釋，為一種已經標準化而非常可靠的感受性試驗方法，可以使用於當為其它試驗系統的一種正確參考值。除此之外，同時也能夠做數個分離菌株的測定，對有污染或混雜其他微生物的檢體，利用本法比液体培養基稀釋法的測定較容易。本法主要的缺點就是浪費時間，尤其每增加一個分離菌株對抗各種不同抗菌劑的測定時，實驗室就需要負擔很重的平板製備工作 [11]。

磺胺劑結合 2,4-二氨基嘧啶類藥物，無論在實驗室試驗或者臨床上，都有協同作用增加抗菌活性的效果[1, 5, 6]，使用之濃度也比個別單獨使用明顯減少[1]。本實驗對於 *Aeromonas hydrophila* 之測試結果亦見相同效果，由此得知兩者之結合對於一般細菌性疾病之治療確有其利用價值。但是，兩者結合發生協同作用的濃度比例範圍很寬廣[1, 14]，要達到最理想的藥理學作用濃度比例，其效力會因動物種類之間的差異而不同[13, 15]，除此之外，也會因結合不同磺胺類藥物[15]，以及對不同菌株之使用而有差異[15]，故併用時須謹慎小心，避免抗藥性菌株產生。

本報告利用瓊脂膠平板連續稀釋感受性試驗，進行 2,4-二氨基嘧啶類與磺胺藥物合併使用，對於引起養殖鰻魚赤鰭病之產氣單胞菌的 MIC 值測定，結果所得的各項數值，可供臨床獸醫師選用藥品參考。在臨床上，MIC 值必需判讀後先設定妥當，然後在一種抗菌藥物使用期間，如果血漿濃度平均值至少有 MIC 值的兩倍，應認為對微生物有感受性，如果 MIC 值比達到血漿濃度高峰還高時，則應認為微生物對此抗菌藥物有抵抗性 [12]。除此之外，藥物的使用，應該結合藥物動力學的半衰期、藥物的體內分佈和排除率，提供對於劑量計算控制所必需的訊息，以提高治療的效果。

## 參考文獻

1. Bushby SRM. Sulfonamide and trimethoprim combinations. J Am Vet Med Assoc 176: 1049-1053, 1980.
2. Rehm WF, White G. A field trial with trimethoprim and sulfadoxine in bacterial diseases of cattle and pigs. Vet Rec 87: 39-42, 1970.
3. Craig GR, White G. Studies in dogs and cats dosed with trimethoprim and sulphadiazine. Vet Rec 98: 82-86, 1976.
4. Burchall JJ. The development of the diaminopyrimidines. J Antimicrob Chemother (B) 5: 3-14, 1979.
5. Bushby SRM. Trimethoprim-sulfamethoxazole: in vitro microbiological aspects. J Infect Dis (Suppl) 128: 5442-5462, 1973.
6. White G, Pierch DWT, Gibbs HA. Use of a calf salmonellosis model to evaluate the therapeutic properties of trimethoprim and sulphadiazine and their mutual potentiation in vivo. Res Vet Sci 31: 27-31, 1981.
7. Mitrovic M, Schildknecht EG, Fusiek G. Anticoccidial activity of sulfadimethoxine potentiated mixture (Rofenaid) in turkeys. Poult Sci 50: 517-525, 1971.
8. Adamson PJW, Wilson WD, Hirsh DC. Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents. Am J Vet Res 46: 447-450, 1985.
9. Bullock GL, Stuckey HM, Collis D, Herman RL, Maestrone G. In vitro and in vivo efficacy of a potentiated sulphonamide in control of furunculosis in salmonids. Res Brd Can 31: 75-82, 1974.
10. Plumb JA, Maestrone G, Quinlan E. Use of a potentiated sulfonamide to control *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 62: 187-194, 1987.

11. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. ( NCCLS document M7-A5. )
12. Barry AL. The antimicrobial susceptibility test: Principles and practices. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 12-29, 1976.
13. Mengelers MJB, van Klinger B, van Miert ASJPAM. In vitro susceptibility of some porcine respiratory tract pathogens to aditoprim, trimethoprim, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, and combinations of these agents. Am J Vet Res 51: 1860-1864, 1990.
14. van Duijkeren E, van Klinger B, Vulto AG, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Breukink HJ, van Miert ASJPA. In vitro susceptibility of equine *Salmonella* strains to trimethoprim and sulfonamide alone or in combination. Am J Vet Res 55: 1386-1390, 1994.
15. van Duijkeren E, Vulto AG, van Miert ASJPA. Trimethoprim/sulfonamide combinations in the horse: a review. J Vet Pharmacol Ther 17: 64-73, 1994.

# Susceptibility Tests of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Eels with Fin Rot Disease to Sulfa Drugs and 2,4-diaminopyrimidine

W. H. LIN\*, J. F. SU, S. Y. LIN

National Institute for Animal Health

**SUMMARY** A total of 11 strains of *Aeromonas hydrophila* obtained from eels with fin-rot disease were tested for the susceptibility to 2,4-diaminopyrimidine and/or sulfa drugs by agar dilution method. The results showed that the 50% minimal inhibitory concentration (MIC) for the tested drugs were as followings: sulfadimethoxine 256  $\mu$  g/mL, sulfadiazine 128  $\mu$  g/mL, trimethoprim  $\leq 0.5$   $\mu$  g/mL, ormetoprim 1  $\mu$  g/mL, ormetoprim/sulfadimethoxine  $< 1/19$   $\mu$  g/mL and trimethoprim/sulfadiazine  $< 0.5/9.5$   $\mu$  g/mL.

**Keywords:** eel, *Aeromonas hydrophila*, sulfa drugs, 2,4-diaminopyrimidine, minimal inhibitory concentration

---

\*Corresponding Author  
National Institute for Animal Health