

文章编号: 1674-5566(2013)02-0219-06

广东省水产动物源气单胞菌对抗菌药物的耐药分析

吴雅丽^{1,2}, 邓玉婷¹, 姜 兰¹, 谭爱萍¹, 薛慧娟^{1,2}, 王伟利¹, 罗 理¹,
赵 飞¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部渔药创制重点实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了解广东地区水产动物源气单胞菌的耐药情况, 采用 K-B 纸片法测定了 112 株 1995—2012 年来源于不同种类患病水产动物的气单胞菌对 20 种抗菌药的耐药性, 数据用 WHONET 5.6 耐药监测软件分析。结果显示, 气单胞菌对氨苄西林和头孢噻吩的耐药率分别高达 85.7% 和 79.5%, 其次对利福平、阿莫西林/克拉维酸、链霉素、萘啶酸、磺胺类、头孢西丁、四环素和磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶的耐药率分别达 57.1%、51.8%、49.1%、44.6%、31.2%、28.6%、28.6% 和 21.4%; 对氟喹诺酮类(氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星)、头孢噻肟、头孢曲松、亚胺培南、阿米卡星、呋喃妥因、氯霉素和多西环素相对敏感。比较不同来源气单胞菌的耐药情况, 结果显示爬行、两栖动物和观赏鱼来源的分离菌株对氟喹诺酮类、头孢类等药物的耐药率比养殖鱼、虾类的高; 气单胞菌对常用抗菌药呈现不同程度的耐药, 不同来源的气单胞菌的耐药率亦不尽相同。水产动物源气单胞菌存在多重耐药菌株应引起重视, 今后在气单胞菌疾病防治方面要慎重用药, 并且有必要开展水产动物源的细菌耐药性监测, 以指导水产养殖合理用药。

气单胞菌 (*Aeromonas*) 属于气单胞菌科 (*Aeromonasae*)^[1], 广泛分布在水环境中, 是常见的人畜鱼共患病原菌, 常在人体、畜禽和水产动物中检出。气单胞菌能引起人的食物中毒、腹泻、败血症等^[2-4]; 其对水产动物具有广泛的致病性, 在高温季节, 能单独或者混合感染多种水产动物, 且其危害程度高于其它细菌性疾病, 成为我国淡水水产养殖业发展的主要威胁^[5]。临水上气单胞菌急性感染表现为出血性败血症, 如中华鳖爆发性败血症; 慢性感染表现为体表溃疡或肠炎等, 如草鱼的细菌性肠炎。然而临床上的盲目、不合理用药, 使病原菌在大范围药物选择压力下, 渐渐产生了气单胞菌耐药菌株, 甚至是多

研究亮点: 目前对广东地区气单胞菌耐药性研究鲜有报导。本文对 112 株不同时期来源于广东不同种类患病水产动物的气单胞菌进行细菌药物敏感性试验, 分析探讨了广东地区气单胞菌耐药性现状, 为该地区水生细菌耐药性预警及渔用药物有效安全使用提供理论基础。

关键词: 气单胞菌; 耐药性; 水产动物源; 检测

中图分类号: S 948

文献标志码: A

重耐药菌株^[6-7], 致使抗菌药的疗效下降。这不仅导致药物对水产动物疾病的防控能力大大减弱, 同时也严重影响水产动物源性食品的质量安全^[8], 还存在将耐药性传播给人类致病菌的潜在风险。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及其来源

112 株气单胞菌为 1995 年 11 月—2012 年 2 月分离鉴定的临床致病菌, 其中 74 株鱼源分离菌(含 6 株观赏鱼源), 26 株两栖、爬行动物源分离菌以及 12 株虾源分离菌, 这些菌株分别分离于鳃、肝脏、肾脏、脾脏、肠道、病灶等部位。菌株

收稿日期: 2012-07-04 修回日期: 2012-11-22

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A0507); 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 广东省科技计划项目(2011B020307001)

作者简介: 吴雅丽(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物病害。E-mail:yaliwoo2007@126.com

通信作者: 姜 兰, E-mail:jianglan2@tom.com

经牛奶冻干于-20℃保存备用。

1.2 药敏纸片和试剂

氨苄西林(AMP, 10 μg/片)、阿莫西林/克拉维酸(AMC, 30 μg/片)、头孢噻吩(KF, 30 μg/片)、头孢曲松(CRO, 30 μg/片)、头孢噻肟(CTX, 30 μg/片)、头孢西丁(FOX, 30 μg/片)、亚胺培南(IPM, 10 μg/片)、磺胺类(S3, 300 μg/片)、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶(SXT, 25 μg/片)、利福平(RD, 5 μg/片)、萘啶酸(NA, 10 μg/片)、环丙沙星(CIP, 5 μg/片)、诺氟沙星(NOR, 10 μg/片)、氧氟沙星(OFX, 5 μg/片)、呋喃妥因(F, 300 μg/片)、四环素(TET, 30 μg/片)、多西环素(DOX, 30 μg/片)、链霉素(STR, 10 μg/片)、阿米卡星(AMK, 30 μg/片)、氯霉素(CHL, 30 μg/片)等药敏纸片均为英国Oxoid产品,-20℃冷冻保存。

胰蛋白胨大豆(TSA)琼脂购自北京路桥技术有限责任公司,LB肉汤、LB琼脂、水解酪蛋白(MH)琼脂购自青岛海博生物技术有限公司。

1.3 K-B纸片法药敏实验

将试验菌株用LB肉汤复苏后接种于TSA琼脂平板,在TSA琼脂平板上挑取单个菌落接种于2 mL LB肉汤中,28℃振荡培养3~4 h,用无菌生理盐水稀释菌液,使稀释菌液达到0.5麦氏比浊管的浊度,再按1:100稀释菌液至含菌量约为 1×10^6 CFU/mL。用无菌棉拭子均匀涂抹至约4

mm厚度的MH培养基上,贴上所需药敏纸片,正置28℃培养18~20 h后观察记录,并参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)文件标准判断结果^[11~13]。

1.4 数据处理

数据用WHONET 5.6耐药监测软件分析。

2 结果

2.1 菌株的总体耐药情况

由表1和图1可见,112株气单胞菌对20种抗菌药的耐药程度表现不一,菌株对氨苄西林的耐药率最高,达85.7%;头孢噻吩次之为79.5%;其次萘啶酸、链霉素、阿莫西林/克拉维酸和利福平的耐药率在44.6%~57.1%;而对环丙沙星、诺氟沙星、阿米卡星、头孢噻肟、呋喃妥因、头孢曲松、亚胺培南呈高度敏感,其耐药率均低于10%。气单胞菌对喹诺酮类药物耐药性差异较大,对第一代喹诺酮类药物萘啶酸耐药率达44.6%,远高于第三代的环丙沙星(5.4%)、诺氟沙星(9.8%)及氧氟沙星(13.4%);头孢类药物中,第一代头孢类药物头孢噻吩的耐药率高达79.3%,而对第二、第三代的头孢类则相当敏感;对氨基糖苷类的链霉素耐药率达50%,而对阿米卡星却高度敏感;对四环素类、磺胺类药物的敏感率也较高。

表1 112株气单胞菌对20种抗菌药物的敏感性结果
Tab. 1 Susceptibility of 112 strains against 20 antimicrobial drugs

抗生素名称	折点/mm	耐药率/%	中敏率/%	敏感率/%
氨苄西林	14~16	85.7	0	14.3
阿莫西林/克拉维酸	14~17	51.8	29.5	18.8
头孢噻吩	15~17	79.5	0.0	20.5
头孢曲松	14~20	1.8	1.8	96.4
头孢噻肟	15~22	2.7	0	97.3
头孢西丁	15~17	28.6	10.7	60.7
亚胺培南	14~15	0.9	0.9	98.2
阿米卡星	15~16	3.6	7.1	89.3
链霉素	12~14	49.1	27.7	23.2
利福平	17~19	57.1	29.5	13.4
萘啶酸	15~19	44.6	0	55.4
环丙沙星	16~20	5.4	8.0	86.6
诺氟沙星	13~16	9.8	3.6	86.6
氧氟沙星	22~24	13.4	11.6	75.0
磺胺类	13~16	31.2	1.8	67.0
磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶	11~15	21.4	0.9	77.7
呋喃妥因	15~16	0.9	0	99.1
氯霉素	13~17	13.4	1.8	84.8
多西环素	11~13	13.4	5.4	81.2
四环素	15~18	28.6	4.5	67.0

2.2 不同来源气单胞菌的耐药情况

养殖品种不同,其用药方式如药物种类、用药周期和剂量存在差异,因此,我们根据养殖品种的种类分为4大类,即养殖鱼类、爬行两栖类、虾类以及观赏鱼类。鱼源、爬行两栖动物源及观赏鱼源气单胞菌对氨苄西林的耐药率高达89%~100%,而虾源只有30.8%。不同来源气单胞菌均对头孢噻吩呈现较强的耐药性;而对其

他抗菌药的耐药程度各有不同。虾源气单胞菌对头孢噻肟、头孢曲松、亚胺培南、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、呋喃妥因、多西环素、阿米卡星和氯霉素10种抗菌药全部敏感,养殖鱼源气单胞菌对这10种抗菌药的耐药率也小于10%;而爬行两栖动物源、观赏鱼源对这10种药的耐药率显著高于其它两种来源的菌株(表2)。

表2 不同来源气单胞菌对20种抗菌药的耐药情况

Tab. 2 Resistance rates of 20 antimicrobial drugs among strains isolated from different aquatic animals

抗生素名称	鱼源 (n=68)	爬行、两栖源 (n=26)	虾源 (n=12)	观赏鱼源 (n=6)
	耐药率/%	耐药率/%	耐药率/%	耐药率/%
氨苄西林	89.7	96.2	33.3	100.0
阿莫西林/克拉维酸	52.9	53.8	33.3	50.0
头孢噻吩	73.5	92.3	91.7	66.7
头孢曲松	0	7.7	0	0
头孢西丁	26.5	26.9	50	16.7
头孢噻肟	0	11.5	0	0
亚胺培南	0	3.8	0	0
复合磺胺	23.5	57.7	8.3	50.0
磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶	11.8	50	8.3	33.3
利福平	44.1	76.9	83.3	66.7
萘啶酸	33.8	69.2	41.7	66.7
环丙沙星	0	19.2	0	16.7
诺氟沙星	2.9	30.8	0	16.7
氧氟沙星	5.9	34.6	0	33.3
呋喃妥因	0	3.8	0	0
四环素	14.7	50	33.3	83.3
多西环素	4.4	34.6	0	50.0
链霉素	51.5	57.7	25	33.3
阿米卡星	0	11.5	0	16.7
氯霉素	7.4	34.6	0	16.7

3 讨论

气单胞菌携带类型多样的毒力因子,对包括鱼虾类、爬行类、两栖类等在内的多种冷血动物具有致病性,高温季节容易引起水生动物细菌病爆发,严重威胁我国淡水养殖业的发展。临幊上常使用抗菌药物来防治气单胞菌引起的细菌性疾病,然而盲目和滥用药物导致气单胞菌对一些常用药物已产生耐药性。近几年,广西省、江苏省等地区已率先开展了对水产动物病原菌(包括气单胞菌)的耐药性监测。广西省对2008~2009年29个县送检的438个病样、249株病原菌菌株(包括嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、恶臭假单胞菌、链球菌及类志贺邻单胞菌等)进行耐药性调

查,发现耐药率在60%以上的药物有青霉素类、新生霉素、阿莫西林、头孢氨苄、复方新诺明和万古霉素6种,而高敏率在70%以上的药物有多粘菌素、舒普深、沙拉沙星、头孢曲松和左氧氟沙星5种。调查还发现不同养殖区域、不同养殖品种、不同病原菌的耐药性存在差异,可能与各区域的养殖水平、养殖模式、苗种来源和用药习惯不同有关,而且养殖越发达的区域病原菌耐药性越强^[12]。丁正峰等^[7]对2006~2009年期间收集自江苏境内的480株水产病原菌进行耐药监测,其中气单胞菌的检出率为72.8%,对喹诺酮类、氯霉素类、磺胺类、氨基糖苷类、四环素类及β-内酰胺类等常见药物均有不同程度的耐药,并且耐药率总体呈逐年上升趋势,交叉耐药及多重耐药现

象严重。本文对广东地区 112 株临床分离的水产动物源气单胞菌进行耐药分析,结果发现本地区不同来源气单胞菌的耐药谱与上述两省相似,对氟喹诺酮类、多西环素、头孢类药物、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶等也表现高度敏感,说明这几大类药物对水产养殖细菌性疾病的治疗效果仍较佳。

由于氟喹诺酮类药物抗菌谱广、抗菌活性强、与其他类抗菌药一般无交叉耐药性而被广泛应用于对气单胞菌引发的病害防治。但是,随着这类药物的反复使用、超量使用,致使这类药物的用量不断增大,治疗效果下降,临幊上已从鱼、虾、龟等多种水产动物中分离到致病性强的喹诺酮类耐药菌株,并且有些菌株还呈现交叉耐药现象^[13~16]。本实验中,气单胞菌对不同喹诺酮类药物的耐药程度不一,对第一代喹诺酮类药物萘啶酸的敏感性较低,而对第三代的环丙沙星、诺氟沙星及氧氟沙星呈高度敏感,可能与细菌对不同喹诺酮类药物产生耐药性的机制不同有关。在喹诺酮类药物选择性压力下,由于萘啶酸的作用机制简单,靶位点单一,只作用于 DNA 回旋酶的 A 亚单位(GyrA),因此细菌 DNA 靶位点自发突变频率较高($10^{-6} \sim 10^{-8}$ μg/mL),萘啶酸容易产生高水平耐药;而氟喹诺酮类药物(氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星等),在基本结构 4-诺酮环上的 C6 位引进氟原子或在其他位点引进不同基团后,与靶位点的结合能力增强,并介入了其他作用机制,因此其自发突变的频率比萘啶酸低很多($10^{-9} \sim 10^{-11}$ μg/mL),也不容易产生高水平耐药,但是由于靶位点突变发生在染色体上,喹诺酮类耐药性产生后就不可逆转。另外,喹诺酮类药物由于结构相似,也容易出现药物种内的交叉耐药^[17]。虽然气单胞菌对氟喹诺酮类药物比其他类药物敏感,但本研究与其他研究报道中都检出多株氟喹诺酮类耐药菌株,应引起水产养殖工作者的高度重视。

不同 β -内酰胺类药物的耐药率差异也较大,气单胞菌对氨苄西林和头孢噻吩的耐药率较高,可能与该菌自身产 β -内酰胺酶对部分这类药物天然耐药有关^[1];而对头孢菌素类的头孢西丁、头孢噻肟、头孢曲松以及碳青霉烯类的亚胺培南高度敏感,与多个研究报道的结果相似^[6,18]。水产养殖上较少使用头孢类抗生素和碳青霉烯类,

但本实验中发现部分临床分离的致病气单胞菌对人医临床一线抗感染药物头孢曲松、头孢噻肟、亚胺培南等也产生了耐药性,可能与养殖户在治疗一些经济价值较高的动物(龟、鳖、鳄鱼、观赏鱼等)时滥用这类药物有关,也可能存在其他直接或间接途径将耐药因子传递到这些细菌中。值得注意的是,对水产养殖动物使用这类药物,不仅增加其体内致病菌的耐药性,这些耐药菌株也可能会随水产养殖污水流入江河,通过直接与人接触,或是通过间接的方式如食物、水等将其耐药基因传递到人体,导致该类药物在人医临幊上的治疗效果降低,对人类生存健康造成威胁。

比较不同来源的气单胞菌的耐药情况,发现来源于爬行两栖类和观赏鱼的气单胞菌的耐药性比养殖鱼、虾的更为严重,其结果与宋铁英等^[19]、胡大胜等^[12]报道相似。龟、鳖、观赏鱼等经济价值较高的水产动物,由于其养殖周期一般比养殖鱼虾长,养殖过程中残留药物逐渐在体内累积,导致容易产生耐药性。我国水产养殖动物品种繁多,不同种类动物的生理特性差异很大,对药物的耐受性、药物的效应以及代谢规律也存在较大差异。目前,对水产动物中各类药物的药代动力学及药效学的研究仍不完善,从而在客观上增加了养殖工作者正确选用渔药的困难。

气单胞菌是一种条件致病菌,养殖密度过大、水质恶化、管理不善、高温季节等因素容易引发气单胞菌疾病的爆发。“以防为主,防重于治”是防治水产动物病害的基本方针。近年来的研究表明,中草药对致病性气单胞菌有较强的抑菌杀菌作用^[20],并且能增强机体非特异性免疫机能和对致病菌的抵抗力^[21];中草药还具有消除大肠杆菌致病菌质粒,实现耐药性逆转的作用^[22],至于对气单胞菌是否亦具有耐药逆转作用还有待研究。此外,用疫苗来预防气单胞菌病一直是近年来的研究热点,生产有效的气单胞菌疫苗是预防和控制气单胞菌病的关键。另外,有必要在全国范围内开展对水产动物源气单胞菌等病原菌的耐药监测和耐药性动态分析,以便及时了解流行病株的分布特点及耐药发展趋势,为水产动物细菌耐药性预警及渔用药物安全使用提供指导。

参考文献:

- [1] JANDA M J, ABBOTT S L. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clinical Microbiology

- Reviews, 2010, 23(2) :35 - 73.
- [2] 张利焱.一起由气单胞菌引起食物中毒事件的调查分析[J].医学动物防制,2011,27(3):264.
- [3] 王闻卿,赵冰,詹铭.浦东新区腹泻样本中气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2011,21(6):1434 - 1435.
- [4] 刘庆珍.血液病患者温和气单胞菌败血症伴下肢蜂窝织炎死亡2例[J].中外医疗,2010(36):105.
- [5] 唐江芳.气单胞菌及其在水产中的危害[J].河北渔业,2007(3):5 - 6,11.
- [6] 蔡丽娟,许宝青,林启存.水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J].水产科学,2011,30(1):42 - 45.
- [7] 丁正峰,薛晖,王晓丰,等.江苏主要水产病原菌耐药谱系监测[J].江苏农业科学,2011,39(2):344 - 347.
- [8] 宋浩刚,吴亚峰,沈剑强,等.南京某集贸市场淡水鱼感染嗜水气单胞菌的鉴定及毒力因子检测[J].中国兽医学报,2011,41(2):111 - 115.
- [9] SHRYOCK T R, APLEY M, JONES R N et al. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard: M31-A2 [M]. Wayne, Pennsylvania , USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006: 55 - 59.
- [10] COCKERILL F R, WIKLER M A, ALDER J, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement: M100-S22 [M]. Wayne, Pennsylvania , USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012: 68 - 69.
- [11] JORGENSEN J H, HINDLER J A, BERNARD K, et al. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; M45A-A2 [M]. Wayne, Pennsylvania , USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: 12 - 13.
- [12] 胡大胜,黄钩,罗振海,等.广西水产养殖主要细菌病的监测与耐药性调查[J].中国科技成果,2010(13):49 - 51.
- [13] 郑国兴,周凯.嗜水气单胞菌欧洲鳗皮肤溃疡分离株的耐药性[J].中国水产科学,1999,6(3):67 - 71.
- [14] 林居纯,罗忠俊,舒刚,等.嗜水气单胞菌临床分离菌对抗菌药物的耐药性调查[J].安徽农业科学,2009,37(15):7024 - 7025.
- [15] 王美珍,陈昌福,刘振兴,等.嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性研究[J].华中农业大学学报,2011,30(1):89 - 93.
- [16] LUKKANA M, WONGTAVATCHAI J, CHUANCHUEN R. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile Tilapia (*Oreochromis nilotica*) [J]. Journal Veterinary Medical Science, 2012, 74(4):435 - 440.
- [17] FABREGA A, MADURGA S, GIRALT E et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones [J]. Microbial Biotechnology , 2009, 2(1):40 - 61.
- [18] 张育禾,徐景野.贝(甲)壳类海产品中检出致病性气单胞菌的耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2008, 18(11):2370 - 2372.
- [19] 宋铁英,陈强,郑在予,等.不同来源嗜水气单胞菌的抗菌素耐药性及耐药机制分析[J].福建农业学报,2008, 23(2):119 - 124.
- [20] 李忠琴,关瑞章,汪黎虹,等.六种中药及其复方对鳗鲡致病性气单胞菌的体外抑制作用[J].水生生物学报,2012, 36(1):85 - 92.
- [21] 盛竹梅,黄文,张英杰,等.一种复方中草药制剂对黄颡鱼非特异性免疫机能和抗病力的增强作用[J].华中农业大学学报,2012,31(2):243 - 246.
- [22] 王永芬,席磊,边传周,等.猪致病性大肠杆菌耐药质粒检测及其中药消除作用研究[J].中国预防兽医学报,2011, 33(12):932 - 935.

Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from various aquatic animals in Guangdong Province

WU Ya-li^{1,2}, DENG Yu-ting¹, JIANG Lan¹, TAN Ai-ping¹, XUE Hui-juan^{1,2}, WANG Wei-li¹, LUO Li¹, ZHAO Fei¹

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, China. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: 112 *Aeromonas* strains were isolated from various aquatic animals at different time in Guangdong province. Kirby-Bauer disc diffusion method was used to detect the resistance of 112 strains against 20 commonly used antimicrobial agents. Resistance rates were analyzed by WHONET 5.6 software. The overall resistance rates were highest for ampicillin (85.7%) and cephalothin (79.5%) followed by rifampicin (57.1%), amoxicillin/clavulanic acid (51.8%), streptomycin (49.1%), sulfonamides (31.2%), cefoxitin (28.6%), tetracycline (28.6%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (21.4%). *Aeromonas* isolates were susceptible to most of antimicrobial agents and a low incidence (<10%) of resistance to imipenem (0.9%), nitrofurantoin (0.9%), ceftriaxone (1.8%), cefotaxime (2.7%) and amikacin (3.6%) were observed. Although 46.6% of isolates displayed nalidixic acid resistance, majority of isolates were very susceptible to other kinds of fluroquinolones. Compared with the resistance rates of different antimicrobial agents from different origins of aquatic animals, fluroquinolones- and cephalosporins-resistance was more prevalent in strains from reptiles, amphibians and ornamental fishes than those from farm fishes and shrimps. Our results showed that antimicrobial-resistant *Aeromonas* were widespread in the aquaculture in Guangdong and show various resistant rates to different antimicrobial agents. There is a need to build a national surveillance system of antimicrobial resistance in aquaculture.

Key words: *Aeromonas*; antimicrobial resistance; aquatic animal; detect