

101 年度魚類鏈球菌藥物感受性調查

黃子鳴*、鄭劭蕙、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 鏈球菌症為魚隻重要疾病，造成魚類死亡與經濟損失，防治魚鏈球菌症以投予抗菌劑為主，本計畫之目的為調查水產動物分離之鏈球菌對抗菌劑的感受性。收集自水生動物病例所分離的鏈球菌，以傳統生化與分子生物學方法鑑定種別，再以紙錠擴散法或最小抑菌濃度法進行藥物感受性調查。共收集並鑑定 51 株魚類分離鏈球菌，其中 36 株為 *Streptococcus agalactiae*、*S. iniae* 11 株、*S. dysgalactiae* 4 株。依地區分佈，自嘉義縣收集到 29 株鏈球菌，台南市收集 13 株，高雄市 5 株，雲林縣 4 株。藥物感受性試驗結果顯示三個種別的鏈球菌分離株對所檢測之核准水產動物用藥品感受性良好，只有 1 株自嘉義縣的赤目豆仔魚分離的 *S. agalactiae* 具有同時對 clindamycin 與 lincomycin 抗藥性。以聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）檢測 clindamycin 與 lincomycin 抗藥性有關之 *ermA*、*ermB*、*ermC*、*ermTR*、與 *mefA/E* 基因，該抗藥性 *S. agalactiae* 分離株均未發現帶有上述抗藥性基因。由本研究結果可知，由魚類分離之鏈球菌對核准的水生動物用藥品有良好之感受性。

關鍵字：魚鏈球菌、抗菌劑、感受性。

緒言

魚類鏈球菌症對養殖漁業造成重大的經濟損失。常見感染魚的鏈球菌科細菌有 *Streptococcus iniae*、*S. agalactiae*、*Lactococcus garvieae* 與 *S. dysgalactiae* 等。魚鏈球菌症容易於夏日水溫升高、水質變差時爆發。在臺灣，常見吳郭魚、金目鱸、石斑等海水或淡水養殖魚感染鏈球菌症。感染鏈球菌的魚隻會出現單側或雙側的眼球突出（exophthalmia）、角膜混濁（corneal opacity）、體色變黑（melanosis）、昏睡（lethargy）、失去方向感、泳姿怪異、厭食、消瘦、猝死等，病變可見頭顱內水腫（intracranial edema）、出血性全眼炎（hemorrhagic panophthalmitis）、腹水、腹膜炎、肛門周圍體表出血、化膿性腦膜炎等[3]。臨床上診斷除發現疑似症狀外，

可於發病魚隻臟器如肝、脾、腦等，製作組織抹片並以革蘭氏染色或劉氏染色法觀察有無排列成鏈狀之陽性球菌，確診則需自臟器組織，如腦、眼、肝、腎、脾或心臟等，以血液培養基進行細菌分離，唯魚類鏈球菌適合生長溫度與哺乳類鏈球菌不同，以商品化細菌生化性狀鑑定套組所鑑定的結果正確度不高，需要配合細菌 16s rDNA 基因定序結果才能正確鑑定種別[3]。

對魚鏈球菌症防治可由預防與控制兩方面著手，在臺灣鏈球菌症的爆發多半發生於天氣炎熱的季節，故首要之務為維持良好水質，降低環境中病原菌濃度以減少感染機會。另外可考慮以接種疫苗產生免疫方式預防，國外如美國、日本等均有研發不活化或減毒活毒之魚類鏈球菌疫苗[10, 12]，但是在台灣尚待申請與官方檢驗核准，目前並無合法魚用細菌性疫苗可

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

供使用。魚鏈球菌症之控制以投予抗菌劑為主，依據行政院農業委員會所公告「水產動物用藥品使用規範」所列之藥品用法劑量投予[1]。臨床上使用抗菌劑治療魚鏈球菌症，常見於停藥之後再復發，懷疑使用抗菌劑之後誘發抗藥性菌株產生，以致感染復發，唯因無持續性的魚類病原藥物感受性調查，並無法證實持續復發魚鏈球菌症的原因。依照國外魚鏈球菌藥物感受性的研究，發現魚分離之鏈球菌會對erythromycin、oxytetracycline或tetracycline產生抗藥性，其抗藥機制與ermB、tetM、或tetS等基因有關[2, 9]。本研究計畫由收集自發病水產動物之鏈球菌，以紙錠擴散法與最小抑菌濃度法偵測常用抗菌劑之藥物感受性，並針對有抵抗性藥物的可能抗藥機制做檢測。

材料與方法

收集與鑑定菌株

自雲林縣、嘉義縣、台南縣、高雄市、屏東縣等地區，收集發病烏魚、吳郭魚、鱸魚等之細菌性病原。自臨床病例檢體進行細菌分離與鑑定，經革蘭氏染色觀察為陽性球菌且呈鏈狀排列型態，oxidase與catalase試驗為陰性之分離株，以商品化之API20 Strep或VITEK 2 (bioMérieux, France) 初步鑑定生化性狀為鏈球菌後，以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅16s rDNA基因序列並定序比對相似性，確認種別。

藥物感受性

以含有5%綿羊紅血球之Mueller-Hinton培養基 (Difco, USA) 上以紙錠擴散法 (disc diffusion assay) 進行，針對常用抗菌劑偵測其抑菌圈大小判定藥物感受性，所檢測藥物紙錠購自Oxoid (USA)，包含 amoxicillin/clavulanic acid (30 µg)、ampicillin (10 µg)、ceftiofur (30 µg)、cephalothin (30 µg)、chloramphenicol (30 µg)、clindamycin (2 µg)、doxycycline (30 µg)、enrofloxacin (5 µg)、erythromycin (15 µg)、florfenicol (30 µg)、lincomycin (2 µg)、nalidixic acid (30 µg)、oxacillin (1 µg)、ofloxacin (5 µg)、oxytetracycline (30 µg)、penicillin G (10 units)、spiramycin (100 µg)、

streptomycin (10 µg)、sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg)、tetracycline (30 µg) 與 vancomycin (30 µg)，共21種藥物。或以最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 法，以商品化之試劑卡 (VITEK 2 AST-GP69, bioMérieux, France)，依廠商建議步驟檢測藥物感受性，該卡包含抗菌劑 ampicillin (0.5、4、8、32 µg/mL)、chloramphenicol (2、8、16 µg/mL)、clindamycin (0.5、1、2 µg/mL)、enrofloxacin (1、2 µg/mL)、erythromycin (0.25、0.5、2 µg/mL)、gentamicin (8、16、64 µg/mL)、imipenem (2、4、8 µg/mL)、kanamycin (32、64、128 µg/mL)、oxacillin (0.5、1、2 µg/mL)、rifampicin (0.25、0.5、2 µg/mL)、tetracycline (0.5、1、2 µg/mL)、trimethoprim/sulfamethoxazole (8/152、16/304、32/608 µg/mL)、vancomycin (1、2、4、8、16 µg/mL)。紙錠擴散法與最小抑菌濃度的操作方法與感受性判定依據 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 的 M31-A3 與 M100-S21 所列標準[5, 6]，並以 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 與 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 做品管試驗，品管試驗所得之抑菌圈大小與最小抑菌濃度需符合CLSI規範。

聚合酶鏈鎖反應偵測抗藥基因

針對有erythromycin和tetracycline抗藥性，搜尋文獻找出相關抗藥基因，例如抗四環黴素類tet族群抗藥基因與抗紅黴素類erm族群抗藥基因與巨環類輸出幫浦 (macrolide efflux pump) 類mefA/E基因，其PCR條件與產物大小如表1。

結果

收集與鑑定菌株

共收集並鑑定51株自發病魚隻分離之鏈球菌，經鑑定種別，共有三種鏈球菌，其中 *Streptococcus agalactiae* 36株、*S. dysgalactiae* 4株、與 *S. iniae* 11株 (表2)。分析分離株的地區分佈，自嘉義縣收集到29株鏈球菌，台南市收集13株，高雄市5株，雲林縣4株 (表2)。以魚種分析，吳郭魚(台灣鯛)

中分離出22株的*S. agalactiae*與3株的*S. iniae*；龍膽石斑中分離出7株的*S. iniae*與2株*S. agalactiae*；銀鱸分離出4株的*S. agalactiae*與1株*S. dysgalactiae*；赤目豆仔魚中分離出3株的*S. agalactiae*；泥鰱分離出3株的*S. dysgalactiae*；條紋鱸分離出2株的*S. agalactiae*；金鱒分離出1株*S. iniae*；黑鯛、烏魚、與金目鱸個分離出1株的*S. agalactiae*（表3）。

藥物感受性

3個種別的鏈球菌分離株對所檢測之水產動物用藥品感受性良好，只有1株自嘉義縣的赤目豆仔魚分離的*S. agalactiae*具有同時對clindamycin與lincomycin抗藥性（紙錠擴散法均無抑菌圈出現，clindamycin的最小抑菌濃度為 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ）。另外，所有鏈球菌菌株對nalidixic acid與streptomycin均無抑菌圈出現，應為鏈球菌菌株先天即對該兩種抗菌劑具有抗藥性。

聚合酶鏈鎖反應偵測抗藥基因

因只有1株鏈球菌分離株對clindamycin與lincomycin有抗藥性，PCR檢測與clindamycin抗藥性有關之*ermA*、*ermB*、*ermC*、*ermTR*、與*mefA/E*基因。該具clindamycin與lincomycin抗藥性的*S. agalactiae*分離株未發現有上述之抗藥性基因存在。另所有分離株亦以PCR檢測與tetracycline抗藥性有關之*tetK*、*tetL*、*tetM*、*tetO*、*tetS*基因，均未發現有菌株帶有tetracycline相關抗藥基因。

討論

由本實驗結果得知，台灣魚類感染鏈球菌常見由*S. iniae*與*S. agalactiae*造成。海水養殖的魚類，如龍膽石斑，常見感染的鏈球菌為*S. iniae*；淡水養殖的魚類，如吳郭魚，常感染的鏈球菌為*S. agalactiae*；而*S. dysgalactiae*感染症則在所收集的病例中屬於少數。

由所收集的鏈球菌對核准之水產動物藥物感受性結果發現，大多數的分離株對核准藥物均有良好之感

受性，唯有1株(2%)自赤目豆仔魚分離之*S. agalactiae*對clindamycin與lincomycin同時具有抗藥性。lincomycin為核准的水產動物用藥，屬於lincosamide類抗生素，核准於治療魚鏈球菌感染症[1]，clindamycin也同屬於lincosamide類抗生素，是人類鏈球菌感染時的治療用藥，lincomycin與clindamycin的抗藥性會對部分的巨環類抗生素產生不完全交叉抗藥性[7]，但在本調查中lincomycin與clindamycin的抗藥性*S. agalactiae*分離株對紅黴素erythromycin則有感受性。選取已知的抗藥基因檢查，如*erm*（erythromycin ribosome methylase）類基因，功用為23S rRNA甲基酶，與巨環類輸出幫浦（macrolide efflux pump）類的*mefA/E*基因，發現lincomycin與clindamycin的抗藥性*S. agalactiae*菌株不帶有相關已知抗藥基因，故其抗lincosamide的機制不明，需要再進一步由其質體或其他抗藥基因或分析lincosamide的核糖體作用位置基因序列。然依據Malbruny等人（2004）的研究，由人分離對clindamycin抗藥性但對erythromycin敏感的*S. agalactiae*，檢測已知的*erm*相關基因、其他相關抗藥基因或分析lincosamide的核糖體作用位置基因序列，均未找出抗藥機制，故該種對clindamycin抗藥性但對erythromycin敏感*S. agalactiae*的抗藥機制仍未知，還需要更進一步研究[8]。

另外由本實驗結果可知目前由發病魚隻所收集的鏈球菌株對核准的水生動物用藥物有良好之感受性，所以臨床治療時可以先考慮價錢便宜與投予方便的藥物。依照行政院農業委員會公告之「水產動物用藥品使用規範」，抗菌劑的投予為連續使用3-5日，依規定不可連續使用7日以上，而临床上遇到投藥停止之後又再復發的鏈球菌病例，除了要再進行細菌分離確認藥物感受性，以免出現抗藥菌株而繼續投予無效藥物，亦需確認飼料中抗菌劑濃度，避免因為藥物濃度過低而無法有效治療，還要考慮鏈球菌感染時會有潛伏於神經組織與能在細胞內存活特性。

表 1、本試驗所用 PCR 檢測之啟動子序列與產物大小。

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)	Referance
<i>tetM</i>	Forward: GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG Reverse: CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	406	47	[11]
<i>tetO</i>	Forward: AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC Reverse: TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	515	47	[11]
<i>tetS</i>	Forward: CAT AGA CAA GCC GTT GAC C Reverse: ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG	667	47	[11]
<i>tetK</i>	Forward: TAA AGT AAT GGT ACC TGG TAA ATC AAC Reverse: GCT AGC CAC TCA TAG TTG TAA AC	860	55	[11]
<i>tetL</i>	Forward: TCG TTA GCG TGC TGT CAT TCC Reverse: CGG CTA CAT TGG TGG GAT AC	267	55	[11]
<i>ermA</i>	Forward: TCA AAA AAG CAT GTA AAA GAA Reverse: CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	650	60	[4]
<i>ermB</i>	Forward: CGA GTG AAA AAG TAC TCA ACC Reverse: GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG	616	60	[13]
<i>ermC</i>	Forward: TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA Reverse: GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT	650	60	[4]
<i>ermTR</i>	Forward: ATA GAA ATT GGG TCA GGA AAA AGG Reverse: TTG ATT TTT AGT AAA AAG	530	60	[4]
<i>mefA/E</i>	Forward: AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC Reverse: TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG	206	60	[4]

表 2、魚鏈球菌分離株種別與地區分佈。

種別	嘉義縣	台南市	高雄市	雲林縣	總株數
<i>Streptococcus agalactiae</i>	27	4	2	3	36
<i>Streptococcus iniae</i>	1	6	3	1	11
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	3	0	0	4
總計	29	13	5	4	51

表 3、魚鏈球菌分離株的魚種分佈。

魚種	菌種			總計
	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. iniae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	
吳郭魚/台灣鯛	22	3		25
龍膽石斑	2	7		9
銀鱸	4		1	5
赤目豆仔魚	3			3
泥鰱			3	3
條紋鱸	2			2
黑鯛	1			1
烏魚	1			1
金目鱸	1			1
金鱒		1		1
總計	36	11	4	51

參考文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。水產動物用藥品使用規範(中華民國96年8月29日農防字第0961473107號)。2007。
2. Abdelsalam M, SC Chen, and T Yoshida. Phenotypic and genetic characterizations of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from fish collected in Japan and other Asian countries. FEMS Microbiol Lett 302: 32-38, 2010.
3. Agnew W, and AC Barnes. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Vet Microbiol 122: 1-15, 2007.
4. Alos, JI, B Aracil, J Oteo, C Torres, and JL Gomez-Garces. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. J Antimicrob Chemother 45: 605-609, 2000.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. M31-A3, 2008.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21, 2011.
7. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 34: 482-492, 2002.
8. Malbruny B, AM Werno, TP Anderson, DR Murdoch, and R Leclercq. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. J Antimicrob Chemother. 54: 1040-1044, 2004.
9. Park YK, SW Nho, GW Shin, SB Park, HB Jang, IS Cha, MA Ha, YR Kim, RS Dalvi, BJ Kang, and TS Jung. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vet Microbiol 136: 76-81, 2009.
10. Pridgeon, JW and PH Klesius. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Vaccine 29: 5986-5993, 2011.
11. Sapkota, AR, KK Ojo, MC Roberts, and KJ Schwab. Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Enterococcus spp. and *Streptococcus* spp. recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation. Lett Appl Microbiol 43: 534-540, 2006.
12. Takahashi, Y, K Fukuda, M Kondo, S Yasumoto, I Hirono and T Aoki. Bacterial Diseases of Marine Fish and Development of Vaccine in Japan. J Nat Fish Univ 60 : 51-56, 2011.
13. Weber P, J Filipecki, E Bingen, F Fitoussi, G Goldfarb, JP Chauvin, C Reitz, and H Portier. Genetic and phenotypic characterization of macrolide resistance in group A streptococci isolated from adults with pharyngo-tonsillitis in France. J Antimicrob Chemother 48: 291-294, 2001.

Antimicrobial Susceptibility of Fish *Streptococcus* Isolated in 2012

TM Huang*, SH Cheng, C Tu

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Streptococcosis is an important fish disease resulting in high mortality rates and economical losses. Administration of antimicrobials is widely used to control fish streptococcosis. The objective of the present study was to investigate antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* isolated from diseased fish to commonly used antimicrobial agents. *Streptococcus* isolated from diseased fish was collected and identified by traditional biochemical characterization and molecular biology methods. Antimicrobial susceptibility was analyzed by disc diffusion method (Kirby-Bauer) and minimum inhibitory concentration (MIC). In total, 51 isolates of *streptococcus* were collected. Among them, 36 isolates were *Streptococcus agalactiae*, 11 isolates were *S. iniae*, and 4 isolates were *S. dysgalactiae*. According to geographical distribution, 29 *Streptococcus* isolates were from Chiayi county, 13 isolates were from Tainan city, 5 isolates were from Kaohsiung city and 4 isolates from Yunlin county. All three species of *Streptococcus* isolates were susceptible to the commonly used antimicrobials, except one isolate of *S. agalactiae*. This isolate was from *Chelon macrolepis* in Chiayi county, and possessed resistance to clindamycin and lincomycin. Detection of resistance determinants of clindamycin and lincomycin by polymerase chain reaction showed no *ermA*, *ermB*, *ermC*, or *ermTR*, while *mefA/E* genes were found in the clindamycin and lincomycin resistant *S. agalactiae* isolates. The results of this study indicate that the fish *streptococcus* isolates are susceptible to the approved antimicrobials for aquaculture use.

Keyword: fish streptococcosis, antimicrobial agent, susceptibility.