

## 2003-2004 年台灣地區乳牛和魚類來源鏈球菌之抗菌劑感受性研究

洪紹文<sup>1</sup> 王淑玲<sup>1</sup> 涂青宇<sup>1</sup> 蔡岳智<sup>1</sup> 莊士德<sup>1</sup> 謝孟通<sup>2</sup> 何素鵬<sup>1</sup> 王渭賢<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>國立中興大學獸醫學院獸醫學系

<sup>2</sup>動植物防疫檢疫局台中分局

(收稿日期：2007.1.9，接受日期：2007.2.14)

### 摘 要

本研究目的在調查台灣地區動物（乳牛和魚類）來源鏈球菌對數種抗菌劑之感受性。2003 年至 2004 年共收集 248 株鏈球菌，利用藥物感受性試驗檢測對 azithromycin (Azi)、clarithromycin (Clar)、erythromycin (Ery)、spiramycin (Spir)、amoxicillin (Amo) 及 enrofloxacin (Enro) 是否具有抗藥性？結果顯示 248 株鏈球菌對 Spir 的抗藥性最高 (100%)，其餘藥物感受性之次依序為：Enro (98.4%)、Clar (87.5%)、Ery (54.8%)、Azi (31.9%) 及 Amo (21.8%)。研究發現鏈球菌之抗藥性類型：由哺乳類分離之鏈球菌株以 Azi-Clar-Ery-Spir<sup>r</sup> 所佔比例最高 (27.5%)，然而由水生動物分離之鏈球菌以 Spir<sup>r</sup> 所佔比例最高 (55.1%)。

**關鍵詞：**抗菌劑、感受性、鏈球菌、台灣

### 緒 言

鏈球菌 (*Streptococcus* spp.) 為革蘭氏陽性球菌，大部分鏈球菌具有莢膜的構造。其生化特性為不被膽汁溶解，不產生觸酶 (catalase) 和凝固酶 (coagulase)，無芽孢與鞭毛，因此不具運動性。鏈球菌大多存於呼吸道，而少部分存於腸道，因此常易從一般呼吸道中分離到此一細菌 (Facklam, 2002)。目前常用以分類鏈球菌方式包括有溶血型和蘭氏 (Lancefield) 血清學分類法 (Koneman *et al.*, 1997; Lancefield, 1933)：依溶血型分類可分為 4 種溶血型 (Koneman *et al.*, 1997)；而蘭氏血清學分類法可將溶血性鏈球菌區分成 A-H 和 K-U 群 (Bromage *et al.*, 1999)。鏈球菌可引起咽喉炎、猩紅熱、丹毒、腦膜炎、心內膜炎及蜂窩組織炎等疾病，根據調查，北美居民感染化膿鏈球菌的機率為每年每十萬個人中有 1.5-7.0 個病例 (Bisno *et al.*, 2003)。鏈球菌感染症之宿主除了人，還包括了其他哺乳類和水生動物 (Eldar *et al.*, 1995; Martel *et al.*, 2001; Merl *et al.*, 2003)。牛感染後會引起乳房炎 (Lancefield, 1933; Young *et al.*, 1994)；在豬會引起腦膜炎、關節炎、心內膜炎、流產、支氣管肺炎等疾病 (Kao *et al.*, 2005)；在水生動物則會引起腦膜腦炎和全眼球炎等病症 (Buxbaum *et al.*, 2004)。魚類鏈球菌致病

株於 1957 年首次被分離出 (Hoshina *et al.*, 1958)，許多研究指出，魚類鏈球菌感染症廣泛分佈於亞洲國家 (Lee *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 1985)、美國和加拿大地區 (Evans *et al.*, 2004) 及歐洲國家 (Eldar *et al.*, 1996) 等地。感染之魚種包括虹鱒、香魚、烏魚及吳郭魚等魚類 (Kitao, 1993)，由於鏈球菌感染症好發在成魚或次成魚，故往往造成養殖戶之重大經濟損失，單在 1997 年就造成了美國 15 億美金的損失 (Shoemaker *et al.*, 2000)。由此可知，鏈球菌為人畜共通疾病之病源，不僅會感染人類，也會造成動物嚴重的傷害和經濟損失，因此在公共衛生上有其重要性。

巨環類抗生素可分為兩大類，第一類為天然產物，代表藥物為 erythromycin (Ery)；第二類為半合成衍生物，包括 clarithromycin (Clar)、flurithromycin、roxithromycin 及 azithromycin (Azi) (Hansen *et al.*, 2002)，其中以 Clar 和 Azi 為最成功的第二代巨環類藥物 (Rubinstein, 2001; Sevillano *et al.*, 2006)，目前於水產養殖用藥方面較不常使用。從土壤之鏈黴菌 (*Streptomyces erythreus*) 分離出的 Ery，可當作青黴素過敏之替代藥物，除了對抗革蘭氏陽性菌有效外，也可抑制 *Mycoplasma pneumoniae*、*Campylobacter jejuni* 及 *Legionella* spp. (Zhanet *et al.*, 2001)。Ery

\*通訊作者：王渭賢 (Way-Shyan Wang)；FAX：886-4-22840894；E-mail：wswang@dragon.nchu.edu.tw

除了用於人的上呼吸道感染、皮膚鏈球菌感染症及猩紅熱等的治療外 (Zhanel *et al.*, 2001), 在獸醫領域, Ery 可用來治療豬隻呼吸道疾病 (McDonald *et al.*, 2001b) 及鳥類的葡萄球菌感染症等 (Khan *et al.*, 2002)。另外, Ery 也用在治療吳郭魚、黑鯛及黃鰭鯛等魚類之鏈球菌感染症 (Adams, 1998)。研究指出美國和加拿大地區巨環類抗生素之抗藥性比例為 25.3%-26.6% (Wierzbowski *et al.*, 2005)。綜合上述可知, 巨環類抗生素之抗藥性不僅於各國家具有其普遍性, 並且抗藥性比例於近年還有增加之趨勢 (Wallmann, 2006)。由此可知, 鏈球菌對巨環類抗生素之抗藥性已是一全球性問題, 因此, 監測藥物之抗藥性, 瞭解臨床用藥情形, 是當前刻不容緩之課題。

Spiramycin (Spir) 為一種中廣效型抗生素, 除了對革蘭氏陽性菌 (如鏈球菌和腦膜炎雙球菌) 和一些革蘭氏陰性菌 (如百日咳桿菌和梭狀芽胞桿菌等) 有治療效果外, 對青黴素、鏈黴素、四環素及氯黴素具有抗藥性之細菌亦有治療效果 (Abou-Zeid *et al.*, 1980)。Perrin-Guyomard 等 (2005) 檢測 18 個不同來源之牛乳鏈球菌, 結果顯示對 Ery 和 Spir 之抗藥性比例各佔 86% 和 65%。Amoxicillin (Amo) 屬於乙內醯胺類抗生素, 為半合成類青黴素之胺基青黴素 (aminopenicillin)。其抗菌範圍除了對革蘭氏陽性細菌有效外, 對革蘭氏陰性菌也有抗菌作用。Amo 常被用來治療皮膚和軟組織感染、呼吸道及泌尿道感染等疾病。在獸醫亦常被應用在治療魚類鏈球菌感染症和豬隻呼吸道疾病 (Aarestrup *et al.*, 2001; Kitao, 1993)。Tsai 等 (2005) 指出, 台灣南部海水魚之分離菌對 Amo 已產生嚴重之抗藥性 (>60%)。翁 (1999) 指出, 魚隻來源之病原性鏈球菌對 Amo 的抗藥性已達 100%。Enrofloxacin (Enro) 為 quinolone 類藥物的第二衍生物, 是化學合成的抑菌劑。主要抗菌機制為抑制細菌 DNA-gyrase 或 topoisomerase IV 的作用, 導致 DNA 形成雙股螺旋與複製階段受阻。Enro 抗菌範圍相當廣泛, 對於抗革蘭氏陽性與陰性細菌有極佳的效果 (Ball, 2000), 目前已廣泛的使用於獸醫界, 如豬、牛及禽類等動物之多種細菌感染症並導致抗藥性問題發生 (Cohn *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2001c; Roesch *et al.*, 2006)。綜合上述可知, 病原菌對抗生素產生抗藥性是世界性問題, 並且細菌具有抗藥性比例有年年增加之趨勢。因此, 監測細菌對藥物抗藥性之

產生速度和瞭解目前人醫和獸醫之臨床用藥情形, 已是當前不可忽視之課題。

## 材料與方法

### 鏈球菌鑑定與保存

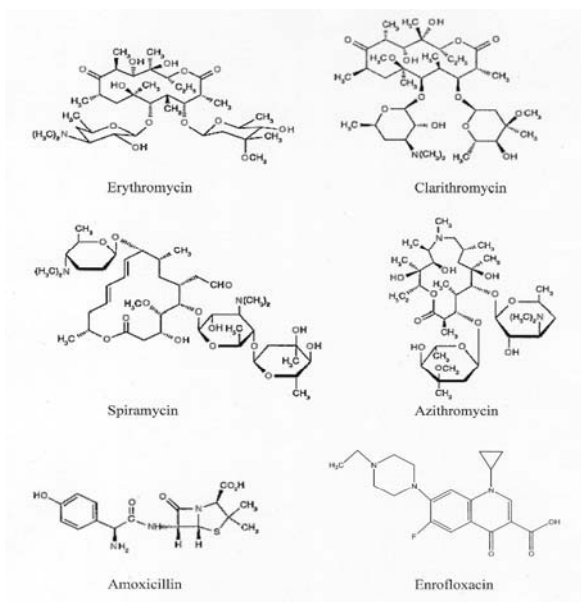
2003 年至 2004 年共收集 248 株疑似鏈球菌株, 並進行鏈球菌之生化特性鑑定。首先將菌株接種於 tryptic soy agar (TSA; Difco, Detroit, MI, USA), 於 25°C 培養 24-48 小時後進行革蘭氏染色 (Gram stain), 染色結果呈藍紫色則判定為革蘭氏陽性菌, 再將這些陽性菌進行觸酶試驗 (catalase test) 和氧化酶試驗 (oxidase test), 呈陰性反應之菌株再以鏈狀球菌共同引子 (P1: 5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA AG -3'; P2: 5'-TTT GCT CCC CAC GCT TTC GAG-3') 配合聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 進行增幅, 若能增幅出 750 bp PCR 產物之菌株, 即判定為鏈球菌 (*Streptococcus* spp.)。上述鑑定出之鏈狀球菌株以 brain heart infusion (BHI; Difco) 增菌 24-48 小時後, 以陶珠 (PROTECT, Richmond, USA) 保存於 -20°C, 供後續實驗使用。

### 抗菌劑平板製備

Azi、Clar、Ery、Spir、Amo (Sigma, Missouri, MI, USA) 及 Enro (Bayer, Wuppertal, Germany) (Fig. 1) 以溶媒進行溶解 (Table 1)。溶液經 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後, 以無菌 DW 作 2 倍連續稀釋 ( $2^7$ - $2^9$   $\mu\text{g/mL}$  等 16 種不同濃度)。取上述稀釋後之各濃度 2 mL 抗菌劑溶液分別和 18 mL Mueller Hinton Agar (MHA; Difco) 均勻混合, 製成不同濃度藥物之平盤以供後續實驗使用。另外配製菌液生長對照組和空白組平板。製備生長對照組平板含有相同比例混合溶媒與無菌 MHA, 以觀察菌株生長是否受到溶媒之影響。空白組平板則僅含無菌 MHA 平盤, 以檢測平板製作過程中是否受到污染。

### 抗生素敏感性試驗

將所保存之陶珠取出, 於 BHI 25°C 培養 24-48 小時後, 將菌液濃度調整為  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL, 而後以定量之白金接種環將菌液接種在上述含有各種不同藥劑濃度的平板和對照組平板中, 於 25°C 培養 24 小時後判定各抗生素之最小抑菌濃度 (the minimum inhibitory concentration; MIC)。



圖一、六種抗菌劑之化學結構式。

Figure 1. The chemical structures of six antimicrobial agents in the study were listed.

### 抗藥性菌株之判定標準

依據美國臨床檢驗室標準委員會 (National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS) 準則來作為所測試菌株對不同抗生素之抗藥性。各抗菌劑之抗藥性判定標準分別為：Ery:  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  ; Spir:  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  ; Clar:  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  ; Azi:  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  ; Amo:  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  ; Enro:  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  (Marie *et al.*, 2002; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004)。

### 統計分析

本研究使用 Student's t-test 來檢定不同採樣地區或動物來源之間 MIC 值是否有顯著差異性？並以 Post Host Tests (Turkey) 進行多重性比較來檢定各抗菌劑之 MIC 值和抗藥性菌株比率是否有顯著差異？二者均以  $P < 0.05$  為具有顯著性差異。

### 結果

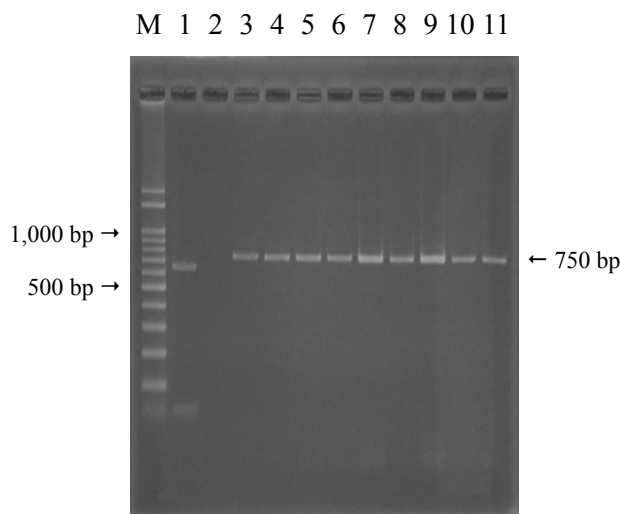
#### 採樣地區和來源動物之分佈情形

2003 年至 2004 年自台灣地區收集哺乳類、爬蟲類、兩生類及水生動物之疑似鏈球菌株共 248 株，總計哺乳類來源共計 70 株，其中以乳牛來源的 65 株佔多數；爬蟲類動物來源共計 2 株，分別來自甲魚和綠蠶龜；兩生類動物來源共計 14

株，以蛙類來源的 13 株為主；水生動物來源共計 162 株，其中以魚類來源的 157 株為多數，就魚種來分析，以吳郭魚來源的 78 株為多數。觀察季節與魚類鏈球菌株分離率之關係，研究結果發現菌株分離率之高峰期多集中於 7-9 月 (51.2%)，然而，12 月至隔年 2 月則為分離率最低之季節 (0%)。因此，鏈球菌感染症與溫度之高低有關：高溫時，則此疾病較易發生；低溫時，較不容易感染此疾病。

### 鏈球菌之鑑定

將疑似鏈球菌株經革蘭氏染色後於鏡檢下觀察菌體型態並進行觸酶和氧化酶等生化試驗，菌體呈現紫色短鏈狀排列且生化試驗呈陰性反應者，再利用鏈狀球菌之共同引子進行 PCR 增幅，結果顯示 248 株疑似鏈球菌株皆可得到 750 bp 產物 (Fig. 2)，因此確定所收集之 248 株全為鏈球菌株。



圖二、利用 PCR 偵測不同動物來源之鏈球菌。750 bps 帶可見於 2%瓊脂凝膠。2%瓊脂凝膠上於每行注入控制組 (陽性與陰性) 與不同動物 (人、豬、牛、青蛙、龜、吳郭魚及烏魚) 來源鏈球菌之 PCR 產物與標誌物 (marker)。

Figure 2. Detection of *Streptococci* isolated from different species of animals with PCR. These PCR products were showed a 750 bps band from different species of animals on 2% agarose gel. The lanes contained PCR products from the different *Streptococci* strains: 1: positive control, 2: negative control, 3: human (No. 227), 4: swine (No. 295), 5: swine (No. 305), 6: cattle (No. 322), 7: cattle (No. 323), 8: frog (No. 404), 9: turtle (No. 298), 10: tilapia (No. 277), 11: mullet (No. 430), and M: marker. The numbers in brackets indicate the strain numbers.

**鏈球菌之藥物感受性測定**

70 株哺乳類動物來源之鏈球菌株，具抗藥性菌株以抗 Spir 最高 (100%)，其次依序為 Enro (98.5%) > Clar (64.2%) > Ery (62.8%) > Azi (51.4%)，最低為 Amo (20.0%)。各抗菌劑之 MIC<sub>50</sub> (2 µg/mL) < Enro 和 Spir (8 µg/mL)。水生動物來源之 162 株中，具抗藥性菌株以抗 Spir 最高 (100%)，其次依序為 Enro (98.1%)、Clar (96.2%)、Ery (51.2%)、Azi (25.3%)，最低為 Amo (24.0%)。各抗菌劑之 MIC<sub>50</sub> 由低到高依序為 Amo (0.5 µg/mL) < Azi、Clar 及 Ery (1 µg/mL) < Spir (8 µg/mL) < Enro (16 µg/mL) (Table 2)。

分析台灣地區所有乳牛和魚類來源之鏈球菌分離株，其藥物感受性試驗結果顯示 65 株乳牛來源之分離株對 6 種抗菌劑之感受性以 Amo 最高，Azi 次之，Enro 最不具感受性；各抗菌劑之 MIC<sub>50</sub> 由低到高依序為 Azi 和 Clar (1 µg/mL)、Amo 和 Ery (2 µg/mL)、Spir (8 µg/mL)、Enro (16 µg/mL)，菌株對 Spir 和 Enro 最具抗藥性 (100.0%)，其次依序為 Clar (61.5%)、Ery (60.0%)、Azi (49.2%)，最低為 Amo (20.0%) (Table 3)。157 株魚類來源之分離株，對各抗菌劑之感

受性以 Amo 最高，Azi 次之，Spir 最不具感受性；各抗菌劑之 MIC<sub>50</sub> 由低到高依序為 Amo 和 Azi (0.5 µg/mL)、Clar 和 Ery (1 µg/mL)、Spir (8 µg/mL)、Enro (16 µg/mL)，抗藥性菌株以 Spir 最高 (100.0%)，其次依序為 Enro (98.0%)、Clar (96.1%)、Ery (50.9%)、Azi (25.4%)，最低為 Amo (24.8%) (Table 3)。

**鏈球菌抗藥性類型**

將抗藥性類型分成下列各型：Azi-Clar-Ery-Spir-Amo-Enro<sup>r</sup>、Azi-Ery-Spir-Amo-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery-Spir-Enro<sup>r</sup>、Clar-Ery-Spir-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Azi-Ery-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery<sup>r</sup>、Spir-Enro<sup>r</sup>、Ery-Enro<sup>r</sup>、Ery-Spir<sup>r</sup>、Clar-Ery<sup>r</sup>、Azi-Spir<sup>r</sup>、Enro<sup>r</sup>、Spir<sup>r</sup>、Ery<sup>r</sup>、Clar<sup>r</sup> 及 Azi<sup>r</sup>。哺乳類之具抗藥性鏈球菌株的抗藥性類型為 Azi-Clar-Ery-Spir-Amo-Enro<sup>r</sup>、Azi-Ery-Spir-Amo-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery-Spir-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Azi-Ery-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery<sup>r</sup>、Spir-Enro<sup>r</sup>、Ery-Enro<sup>r</sup>、Ery-Spir<sup>r</sup>、Clar-Ery<sup>r</sup>、Azi-Spir<sup>r</sup>、Enro<sup>r</sup>、Spir<sup>r</sup>、Ery<sup>r</sup>、Clar<sup>r</sup> 及 Azi<sup>r</sup> 等 12 型，其中以 Azi-Clar-Ery-Spir<sup>r</sup> 所佔比例最高 (27.5%)，Ery-Enro<sup>r</sup>、Azi-Spir<sup>r</sup>、Spir-Enro<sup>r</sup>、

**表一、** 抗菌劑之溶媒與稀釋劑。

**Table 1.** Solvent and lacquer thinner for different antimicrobial agents.

Antimicrobial agent	Solvent	Lacquer thinner
Ery	95% Ethanol	Distilled water
Spir	Methanol	0.1 M PBS (pH 6.5)
Clar	Methanol	0.1 M PBS (pH 6.5)
Azi	95% Ethanol	Broth media
Amo	0.1 M PBS (pH 6.0)	0.1 M PBS (pH 6.0)
Enro	1/2 Distilled water + 1/2 NaOH (1 M)	Distilled water

**表二、** 台灣六種抗菌劑對哺乳類與水生動物來源鏈球菌株 (分別為 70 與 162 株) 之最小抑菌濃度。

**Table 2.** The MICs of six antimicrobial agents for *Streptococci* strains isolated from mammals (70 strains) and aquatic (162 strains) in Taiwan.

Antimicrobial agent	70 <i>Streptococci</i> strains isolated from mammals				162 <i>Streptococci</i> strains isolated from aquatic			
	MIC (µg/mL)			No. (%) of resistant isolates	MIC (µg/mL)			No. (%) of resistant isolates
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	
Azi	0.125->128 <sup>A</sup>	2	>128	36 (51.4)	0.25->128 <sup>C</sup>	1	2	41 (25.3)
Clar	0.5->128 <sup>A</sup>	1	>128	45 (64.2)	0.0625->128 <sup>C</sup>	1	2	156 (96.2)
Ery	0.25->128 <sup>A</sup>	2	>128	44 (62.8)	0.0625->128 <sup>C</sup>	1	2	83 (51.2)
Spir	1->128 <sup>A</sup>	8	>128	70 (100.0)	1->128 <sup>A</sup>	8	128	162 (100.0)
Amo	0.0625-32 <sup>B</sup>	2	32	14 (20.0)	.03125-16 <sup>C</sup>	0.5	8	39 (24.0)
Enro	2->128 <sup>A</sup>	8	>128	69 (98.5)	2->128 <sup>B</sup>	16	32	159 (98.1)

<sup>A, B, C</sup> There are significantly different at different words to compare with two test groups by Post Hoc Tests ( $P < 0.05$ ).

表三、台灣六種抗菌劑對乳牛與魚類來源鏈球菌株 (分別為 65 與 157 株) 之最小抑菌濃度。

Table 3. The MICs of six antimicrobial agents for *Streptococci* strains isolated from cattles (65 strains) and fishes (157 strains) in Taiwan.

Antimicrobial agent	65 <i>Streptococci</i> strains isolated from cattle				157 <i>Streptococci</i> strains isolated from fish			
	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			No. (%) of resistant isolates	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			No. (%) of resistant isolates
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	
Azi	0.125->128 <sup>A</sup>	1	>128	32 (49.2)	0.25->128 <sup>C</sup>	0.5	2	40 (25.4)
Clar	0.5->128 <sup>A</sup>	1	>128	40 (61.5)	0.0625->128 <sup>C</sup>	1	2	151 (96.1)
Ery	0.25->128 <sup>A</sup>	2	>128	39 (60.0)	0.0625->128 <sup>C</sup>	1	1	80 (50.9)
Spir	1->128 <sup>A</sup>	8	>128	65 (100.0)	1->128 <sup>A</sup>	8	128	157 (100.0)
Amo	0.0625-32 <sup>B</sup>	2	16	13 (20.0)	0.03125-16 <sup>C</sup>	0.5	8	39 (24.8)
Enro	4->128 <sup>A</sup>	16	>128	65 (100.0)	2->128 <sup>B</sup>	16	32	154 (98.0)

A, B, C There are significantly different at different words to compare with two test groups by Post Hoc Tests ( $P < 0.05$ ).

Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery<sup>r</sup>、Azi-Ery-Enro<sup>r</sup> 及 Azi-Ery-Spir-Amo-Enro<sup>r</sup> 之比例最低 (3.4%)。爬蟲類之抗藥性類型為 Clar-Spir-Ery-Enro<sup>r</sup>；兩生類之抗藥性類型為 Spir<sup>r</sup>、Enro<sup>r</sup>、Ery-Spir<sup>r</sup>、Clar-Ery<sup>r</sup> 及 Azi-Clar-Ery-Spir-Enro<sup>r</sup> 等 5 型。水生動物之抗藥性類型可分成 Azi-Clar-Ery-Spir-Enro<sup>r</sup>、Azi-Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Clar-Ery-Spir<sup>r</sup>、Spir-Enro<sup>r</sup>、Ery-Enro<sup>r</sup>、Enro<sup>r</sup>、Spir<sup>r</sup>、Ery<sup>r</sup>、Clar<sup>r</sup> 及 Azi<sup>r</sup> 等 10 型，其中以 Spir<sup>r</sup> 所佔比例最高 (55.1%)，Azi<sup>r</sup>、Clar<sup>r</sup>、Ery<sup>r</sup> 及 Azi-Spir<sup>r</sup> 之比例最低 (1.2%)。

## 討 論

Kitao (1993) 指出魚類鏈球菌感染症好發於夏季高水溫期，當水溫超過 20°C，虹鱒和吳郭魚等養殖魚類就容易感染鏈球菌，倘若養殖環境高密度飼養和氨含量過高等緊迫因子存在時，更容易引發此疾病。此外，Shoemaker 等 (2000) 指出低溶氧的循環水養殖量會增加魚隻死亡率，疾病之流行期常在 8-11 月，特別在季節交換時期發生率最高。本研究結果與上述之研究結果相似，菌株分離率之高峰期多集中於 7-9 月 (51.2%)。

抗生素除了提供人類用於治療疾病外，也提供農牧業 (食用動物與植物)、水產養殖及寵物使用等。美國、加拿大、歐盟及英國之動物用與人類用抗生素各佔總抗生素用量的 50%，但丹麥和荷蘭之動物用與人類用抗生素各佔總抗生素用量的 85%-87% 和 13%-15% (Endtz *et al.*, 1999)。由巨環類抗生素之藥物感受性試驗結果顯示，本研究所所有鏈球菌株對 Azi 與 Clar 之抗藥性比例分別為 31.9% 與 87.5%。Wu 等 (2004) 針對台灣地區臨

床分離之鏈球菌進行抗藥性調查，結果發現 Azi 之抗藥性比例為 49.0%。造成兩者抗藥性比例差異之原因，推測可能 Azi 在人醫是臨床常用藥物，而在獸醫臨床上尚未廣泛使用，但由於畜禽水產養殖業之藥物種類大量使用，未來是否因而使 Azi 的抗藥性比率增加？值得未來持續觀察和研究。Buxbaum 等 (2004) 研究顯示 Clar 抗藥性為 10.3%，其間之差異原因，可能除了動物來源差異外，不同地區之用藥習慣亦會導致檢測結果之多樣性 (Aarestrup *et al.*, 2001)。Vela 等 (2005) 將 151 株鏈球菌進行抗藥性調查，發現鏈球菌對巨環類抗生素之抗藥性竟然高達 90.7%。Siu 等 (2002) 針對台灣地區感染侵入性肺炎鏈球菌的病人進行研究，發現對紅黴素的抗藥性高達 90.6%。然而，Kao 等 (2005) 曾針對台灣地區臨床分離之鏈球菌進行藥物感受性試驗，結果發現紅黴素抗藥性比例為 42.8%-55.1%，此與本研究之結果相當相似 (54.8%)。Young 等 (1994) 指出，502 株從牛乳汁中分離出之 *Streptococcus agalactiae* 對 Ery 產生抗藥性的比例佔 0.56%，對照本實驗結果 65 株乳牛來源之鏈球菌對 Ery 產生抗藥性比例為 60%，10 年內乳牛來源之鏈球菌對 Ery 之抗藥性比例大幅增加，值得未來加以重視。Tsai 等 (2005) 指出，從正常海水魚隻所分離出之 84 株鏈球菌，對 Ery 產生抗藥性達 60% 以上，對照本實驗結果 157 株魚類來源之鏈球菌對 Ery 產生抗藥性比例為 50.9%，可見 Ery 在水產用藥上也應該加以重視。此外，不同國家間之所以有差異，推測原因除了過去巨環類抗生素允許作為動物飼料添加劑，一直使用到最近，歐盟才禁止使用於當飼料添加劑，之後才轉為疾病治

療專用藥。如此，長期低劑量使用此抗生素的結果，可促使抗藥性菌株形成優勢族群。此現象也發生在丹麥、瑞典和西班牙 (Aarestruo *et al.*, 2002)。

自 20 世紀中葉發現抗生素可促進動物生長，因此抗生素廣泛添加於動物飼料中。然而，大量長期在飼料中添加抗生素常產生細菌耐藥性問題與藥物殘留問題 (翁, 1999)。抗生素添加劑的長期使用和濫用導致細菌產生耐藥性，由於細菌數量大且繁殖快，耐藥性的擴散與蔓延已非常嚴重，而且一種細菌可以產生多種耐藥性 (翁, 1999)。此外，在臨床醫療和流行病調查中發現，各種病原菌均有不同程度的抗藥性，細菌耐藥性已給人類健康帶來了巨大危害 (翁, 1999)。抗生素在禽畜水產品中殘留為大量長期使用抗生素的另一問題。抗生素可分佈全身，以肝、腎、脾等組織分佈較多，也可通過泌乳和產蛋過程而殘留在乳與蛋中 (翁, 1999)。抗生素的殘留不僅影響畜產品的品質和風味，也被認為是動物細菌耐藥性向人類傳遞的重要途徑 (翁, 1999)。此外，抗生素的大量使用對畜禽健康也構成直接威脅，並產生耐藥性、降低畜禽免疫力、破壞消化道微生物平衡及導致藥物治療效果下降，動物內源性感染與二次性細菌感染 (翁, 1999)。

由於獸醫臨床上之需用、養殖業者之濫用或違法使用抗菌劑等因素，均可造成細菌產生抗藥性 (McDonald *et al.*, 2001a)。雖然，抗菌劑的使用量和投藥時間長短也是細菌抗藥性產生的最主要因子，但是抗菌劑種類亦是細菌發展出抗藥性之最主要因素之一 (McDonald *et al.*, 2001a)。本實驗結果顯示哺乳類或水生動物來源之分離株抗 Spir 之抗藥性，竟然均高達 100%，推測其可能原因為 Spir 與最近幾年其使用率之增加有關。Martel 等 (2001) 針對鏈球菌不同血清型與 Spir 抗藥性比例之關聯性進行研究，結果顯示菌株對藥物之感受性不會因為血清型之不同而異。本研究雖未利用血清型將分離株加以分型，但由於 Spir 之抗藥性為 100%，因可推知本實驗中所有鏈球菌對 Spir 藥物之感受性不會因為血清型之不同而異，也證實巨環類抗生素抗藥性的發生頻率在所有血清型中是非常高 (Kasahara *et al.*, 2005)。本研究乳牛來源之分離株對巨環類抗生素感受性試驗結果顯示其抗藥性 49.2%-98.4%，但是分析牧場之用藥情形，結果發現乳牛之臨床鮮少使用巨環類抗生素，揣測其原因可能為細菌基

因突變或抗藥基因透過不同之途徑，於不同環境中彼此間互相發生移轉或傳遞現象。

Vela 等 (2005) 將 151 株鏈球菌並進行抗藥性調查，發現乙內醯胺類抗生素之感受性大於 96%，此與本研究結果之發現，所有鏈球菌株對 Amo 之感受性最高相似。然而，Tsai 等 (2005) 指出，從海水魚之分離革蘭氏陽性菌對 Amo 的抗藥性為 89%。Hsueh 等 (2000) 亦指出細菌對乙內醯胺類抗生素抗藥性比例在 1995-1999 年間，從 39.7% 增加為 76%。造成本研究結果與 Tsai 等 (2005) 和 Hsueh 等 (2000) 結果不同的原因，推測可能由於乙內醯胺類抗生素使用頻繁，導致抗藥性菌株之產生 (Marton, 1992; McDonald *et al.*, 2001c)；再者，乙內醯胺類抗生素雖廣泛使用於治療動物鏈球菌感染症，但由於藥物在低濃度即可達到治療效果，因此其最小抑菌濃度尚未在抗藥性標準以上；或是所採樣的時間、動物品種與樣品數不同所致。另外，本研究結果顯示所有菌株對 Enro 之抗藥性竟高達 98.4%，推測造成如此高抗藥性比例的原因可能由於 Enro 為目前是哺乳類或水生動物之最常用之臨床藥物之一，故可能在長期篩選壓力下使得細菌容易產生抗藥性。

Vela 等 (2005) 分析 151 株之鏈球菌的抗藥性類型，結果顯示 8.4% 分離株對 4 種以上藥物具有抗藥性，具有 6 種藥物以上之抗藥性類型佔 6%。本研究結果指出細菌之抗藥性類型亦呈現多樣性：89.5% (222/248) 分離株對 3 種以上的藥物具有抗藥性，其中 32.2% (80/248) 對 5 種以上之藥物有抗藥性。此顯示細菌具有高度多重抗藥性的嚴重性。抗藥性類型之多樣性可能源於巨環類抗生素間之交叉抗藥性或細菌藉由不同之機制獲得新的抗藥性基因並在不同之菌種間傳遞，進而擁有多重抗藥性 (Hsueh *et al.*, 2002)。具抗藥性之細菌可能藉帶有一個或多個抗藥性基因的 integron 存在於亦帶有抗藥性基因之 transposon 上，之後帶有數個 integron 的 transposon 再轉至抗藥性質體上，進而使抗藥性基因在不同之菌種或宿主間互相傳遞 (Zhao *et al.*, 2001)。

本研究藉由收集動物來源 (以 cattle 和 fish 為主) 之鏈球菌，檢測其對 6 種抗菌劑之感受性，其結果不僅可提供畜牧或水產養殖業者在疾病治療時選擇藥物之參考。同時亦可藉由細菌之抗藥性程度，推測目前臨床用藥之大致情形。基於國際貿易、養畜殖業永續發展及公共衛生安全等方面之考量，教導養殖戶正確的用藥觀念，以減少抗生素不必要的使用才是降低細菌產生抗

藥性治標之道。

## 誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物疾病防疫檢疫局之經費支持 (93 農科-1.8.1-檢-B1(3); 94 農科-13.2.1-檢-B1)，特為致謝! 實驗研究期間樣本之採集承蒙嘉義縣動物疾病防疫所、屏東縣動物疾病防疫所、屏東科技大學獸醫學系陳石柱教授和董明澄教授及台灣大學獸醫學系陳嫩玫教授之協助，在此一併致謝!

## 參考文獻

- 翁有助，1999。雲林、嘉義及台南地區水產養殖動物寄生蟲性與細菌性疾病之調查及其病原菌對數種抗菌劑之抗藥性研究。國立台灣大學碩士論文，共 99 頁。
- Aarestrup FM, Hasman H, Jensen LB, Moreno M, Herrero IA, Dominguez L, Finn M, and Franklin A. 2002. Antimicrobial resistance among *enterococci* from pigs in three European countries. *Appl. Env. Microbiol.* 68:4127-4129.
- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS and Bager F. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2054-2059.
- Abou-Zeid AZ, Khalil A el-G and Rabei M. 1980. Spiramycin, a macrolide antibiotic. *Zentralbl. Bakteriol. Naturwiss.* 135:443-453.
- Adams HR. 1998. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 7th. Yi Hsien, pp. 777.
- Ball P. 2000. The quinolones, history and overview. In: Andriole VT ed. *The Quinolones*. 3rd ed. London, UK. Academic press, pp. 2-24.
- Bisno AL, Brito MO and Collins CM. 2003. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet. Infect Dis.* 3:191-200.
- Bromage ES, Thomas A and Owens L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat Org.* 36:177-181.
- Buxbaum A, Forsthuber S, Sauermann R, Gattringer R, Graninger W and Georgopoulos A. 2004. Development of macrolide-resistance and comparative activity of telithromycin in streptococci in Austria, 1996-2002. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24:397-400.
- Cohn LA, Gary AT, Fales WH and Madsen RW. 2003. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:338-343.
- Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, Horovitz A and Bercovier H. 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.* 43:33-40.
- Eldar A, Ghittino C, Asanta L, Bozzetta E, Gorla M, Prearo M and Bercovier H. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.* 32:85-88.
- Endtz HP, van den Break N, Verbrugh HA and van Belkum A. 1999. Vancomycin Resistance: Status Quo and Quo Vadis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 18:683-690.
- Evans JJ, Klesius PH and Shoemaker CA. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22:3769-3773.
- Facklam R. 2002. What happened to the *Streptococci*: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:613-630.
- Hansen JL, Ippolito JA, Ban N, Nissen P, Moore PB and Steitz TA. 2002. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* 10:117-128.
- Hoshina T, Sano T and Morimoto Y. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Tokyo Univ. Fish* 44:57-68.
- Hsueh PR, Liu CY and Luh KT. 2002. Current status of antimicrobial resistance in Taiwan. *Emerg. Infect Dis.* 8:132-137.
- Hsueh PR, Liu YC, Shyr JM, Wu TL, Yan JJ, Wu JJ, Leu HS, Chuang YC, Lau YJ and Luh KT. 2000. Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998-1999 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1342-1345.
- Kao CH, Chen PY, Huang FL, Chen CW, Chi CS, Lin YH, Shih CY, Hu BS, Li CR, Ma JS, Lau

- YJ, Lu KC and Yu HW. 2005. Clinical and genetic analysis of invasive and non-invasive group A streptococcal infections in central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect* 38:105-111.
- Kasahara K, Maeda K, Mikasa K, Uno K, Takahashi K, Konishi M, Yoshimoto E, Murakawa K, Kita E and Kimura H. 2005. Clonal dissemination of macrolide-resistant and penicillin-susceptible serotype 3 and penicillin-resistant Taiwan 19F-14 and 23F-15 *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan: a pilot surveillance study. *J. Clin. Microbiol.* 43:1640-1645.
- Khan AA, Nawaz MS, Khan SA and Steele R. 2002. Detection and characterization of erythromycin-resistant methylase genes in Gram-positive bacteria isolated from poultry litter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:377-381.
- Kitao T. 1993. Streptococcal infections. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR. *Bacterial Disease of Fish*. Blackwell Press, Landon, pp. 196-210.
- Koneman EW, Allen SD, Janada WM, Schreckenberger PC and Winn Jr. WC. 1997. The gram-positive cocci part : *Streptococci*, *Enterococci*, and "the *Streptococcus*-like" bacteria. In: *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5<sup>th</sup> ed, Lippincott Press, NY, pp. 578-629.
- Lancefield RC. 1933. A serological differentiation of human and other groups of *Streptococci*. *J. Exp. Med.* 59:441-458.
- Lee JL, Chu SY, Yu ZS, Lee CY, Lai CC, Hung CS, Wang JH, Wu ZB, Chen SC, Chang TC and Tsai SS. 2006. Identification and survey on Gram-positive *Streptococcus*-like organisms isolated from grey mullet (*Mugil cephalus* Linnaeus). *Taiwan Vet. J.* 32:136-145.
- Marie J, Morvan H, Berthelot-Herault F, Sanders P, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV, Jouy E and Kobisch M. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:201-209.
- Martel A, Baele M, Devriese LA, Goossens H, Wisselink HJ, Decostere A and Haesebrouck F. 2001. Prevalence and mechanism of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus suis* isolates. *Vet. Microbiol.* 83:287-297.
- Marton A. 1992. Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary. *Clin. Infect Dis.* 15:106-111.
- McDonald LC, Chen FJ, Lo HJ, Yin HC, Lu PL, Huang CH, Chen P, Lauderdale TL and Ho M. 2001a. Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3084-3091.
- McDonald LC, Chen MT, Lauderdale TL and Ho M. 2001b. The use of antibiotics critical to human medicine in food-producing animals in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect* 34:97-102.
- McDonald LC, Yu HT, Yin HC, Hsiung AC and Ho M. 2001c. Use and abuse of surgical antibiotic prophylaxis in hospitals in Taiwan. *J. Formos Med. Asso.* 100:5-13.
- Merl K, Abdulmawjood A, Lammler C and Zschock M. 2003. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol. Lett* 226:87-92.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals: approved standard, second ed., NCCLS document M31-A2, Wayne, USA.
- Perrin-Guyomard A, Soumet C, Leclercq R, Doucet-Populaire F and Sanders P. 2005. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *J. Food Prot.* 68:347-352.
- Roesch M, Perreten V, Doherr MG, Schaeren W, Schallibaum M and Blum JW. 2006. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *J. Dairy Sci.* 89:989-997.
- Rubinstein E. 2001. Comparative safety of the different macrolides. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18:71-76.
- Sevillano D, Alou L, Aguilar L, Echevarria O, Gimenez MJ and Prieto J. 2006. Azithromycin iv pharmacodynamic parameters predicting *Streptococcus pneumoniae* killing in epithelial



- lining fluid versus serum: an *in vitro* pharmacodynamic simulation. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:1128-1133.
- Shoemaker CA, Evans JJ and Klesius PH. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188: 229-235.
- Shoemaker CA and Klesius P. 1997. Streptococcal disease problems and control: a review. In: Fitzsimmons K, (Ed.), *Tilapia Aquaculture Vol. 2 Northeast Regional Agricultural Engineering Service-106, Ithaca, NY, USA*, pp. 671-680.
- Siu LK, Chu ML, Ho M, Lee YS and Wang CC. 2002. Epidemiology of invasive pneumococcal infection in Taiwan: antibiotic resistance, serogroup distribution, and ribotypes analyses. *Microb. Drug Resist.* 8:201-208.
- Tsai HL, Ma YP, Kuo HJ, Lin SH, Tu C and Chang SK. 2005. Antimicrobial susceptibility in bacterial isolated from normal seawater fish farm in Southern Taiwan. *Taiwan Vet. J.* 31:274-280.
- Tung MC, Chen SC and Tsai SS. 1985. General septicemia of streptococcal infection in cage-cultured *Tilapia mossambica*, in southern Taiwan. *Fisheries Series* 4:95-105.
- Vela AI, Moreno MA, Cebolla JA, Gonzalez S, Latre MV, Dominguez L and Fernandez-Garayzabal JF. 2005. Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Vet. Microbiol.* 105:143-147.
- Wallmann J. 2006. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int J Med Microbiol* 296:81-86.
- Wierzbowski AK, Swedlo D, Boyd D, Mulvey M, Nichol KA, Hoban DJ and Zhanel GG. 2005. Molecular epidemiology and prevalence of macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* in *Streptococcus pneumoniae* obtained in Canada from 1997 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1257-1261.
- Wu CS, Wang SM, Ko WC, Wu JJ, Yang YJ and Liu CC. 2004. Group B streptococcal infections in children in a tertiary care hospital in southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect* 37:169-175.
- Young CL, Tsung BW, Chung TC and Dong HD. 1994. Studies involving the isolated technique, antibiotic resistant patterns and epidemic distributions of bovine *Streptococcus agalactiae* from bulk tank milk at Taiwan dairy farms. *Taiwan Vet. J.* 20:362-370.
- Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS and Karlowisky JA. 2001. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs* 61:443-498.
- Zhao S, White DG, Ge B, Ayers S, Friedman S, English L, Wagner D, Gaines S and Meng J. 2001. Identification and Characterization of integron-mediated antibiotic resistance among shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Env. Microbiol.* 67:1558-1564.

## The Antimicrobial Susceptibility of *Streptococci* Obtained from Cattle and Fish in Taiwan from 2003-2004

Shao-Wen Hung<sup>1</sup>, Shu-Ling Wang<sup>1</sup>, Ching-Yu Tu<sup>1</sup>, Yueh-Chih Tsai<sup>1</sup>, Shih-Te Chuang<sup>1</sup>,  
Meng-Tong Shieh<sup>2</sup>, Shu-Peng Ho<sup>1</sup>, Way-Shyan Wang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University  
Taichung, Taiwan

<sup>2</sup>Taichung Branch Office, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine  
Taichung, Taiwan

(Received: 9 January 2007, accepted: 14 February 2007)

### ABSTRACT

The aim of this investigation was to study the antimicrobial susceptibility of 248 *Streptococci* strains obtained from cattle and fish in Taiwan from 2003-2004. The susceptibilities of 248 *Streptococci* strains were determined by the agar dilution method to 6 antimicrobial agents included azithromycin (Azi), clarithromycin (Clar), erythromycin (Ery), spiramycin (Spir), amoxicillin (Amo), and enrofloxacin (Enro) in this study. The results indicated that the highest resistant percentage of 6 antimicrobial agents was Spir (100.0%), followed by Enro (98.4%), Clar (87.5%), Ery (54.8%), Azi (31.9%), and Amo (21.8%) among 248 *Streptococci* strains. The highest percentage of resistant-antimicrobial agent patterns for *Streptococci* strains obtained from mammals and aquatic organisms were Azi-Clar-Ery-Spir<sup>r</sup> (27.5%) and Spir<sup>r</sup> (55.1%), respectively.

**Key words:** antimicrobial agent, susceptibility, *Streptococci*, Taiwan