

专论与综述

水产病原菌抗菌药物敏感试验标准化探讨*

徐力文 冯娟** 刘广锋

(中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

摘要: 病原菌药物敏感试验是临床微生物学研究的重要手段, 相比人类和兽医临床, 国内外水产养殖中细菌性病原的药敏试验还未有公认的标准化参考方法。概括近几年国外对水产病原菌药敏试验标准化方法建立的研究进展, 探讨了试验中关键因子的影响, 指出我国水产药敏试验中存在的不足及对未来发展提出展望。

关键词: 水产病原菌, 药敏试验, 标准化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0134-06

**The Discussion on Standardization of Antimicrobial Susceptibility
Testing of Aquatic Pathogens ***

XU Li-Wen FENG Juan** LIU Guang-Feng

(South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300)

Abstract: Antimicrobial susceptibility testing (AST) is an important means to clinical microbiology. At present, there are no standard AST methods for aquatic pathogens comparing with human and veterinary pathogens. We reviewed the recent research progress on establishing these methods and discussed the key factors in AST of aquatic pathogens. Furthermore the defect of AST of aquatic pathogens in China was profiled and prospect for further research was put forward.

Key words: Aquatic pathogens, Antimicrobial susceptibility testing, Standardization

细菌性病害每年对水产养殖都造成重大损失, 对病原菌的分离、鉴定和药物敏感试验已成为水产微生物学研究的重要常规工作, 其中药敏试验可为科学地选择临床治疗药物提供参考, 防止药物的滥用和误用, 监控病原菌的耐药性变迁, 同时还可用于评价水产养殖上新药的抗菌谱和抗菌活性等药效学特征。但相比人类和畜禽临床上药敏试验标准化方法, 如美国国家临床实验室标准化委员会 (NCCLS)、欧洲抗菌药物敏感试验委员会 (EUCAST-ESCMID) 等颁布的一系列标准^[1-3], 对水产病原菌药敏试验认同的标准方法仍在积极探讨中^[4,5], 水产动物病原菌生理生态的多样性致使制订其标准方法更为复杂, 尽管试验的基本操作程序与人类和畜禽的相同, 但对培养基、培育温度和时间、质控菌株及质控限、敏感限 (Breakpoints) 的设立等关键因子上仍有较大商榷, 致使目前该类试验的许多参数仍借鉴于人类临床, 其局限性显而易见。

* 广东省科技攻关项目 (No. 2003B21502)

中国水产科学院青年基金资助 (No. 2003-青-8)

** 通讯作者 Tel: 020-84195177, E-mail: juanf@21cn.com

收稿日期: 2004-08-30, 修回日期: 2004-11-01

1 水产病原菌药敏试验标准化方法研究概况

由于缺乏水产病原菌药敏试验标准方法所导致的研究和学术交流的不便已引起国际上相关机构的高度关注。欧盟资助下 (FAIR CT 97-3760) 成立的水产工作组 1998 年 11 月起草了一份鱼类病原菌药敏试验标准参考方法^[5], 该方法主要参照 NCCLS M31-T (1997) 标准, 但仍留有许多有待解决的问题, 如未规定质控菌株的质控限及敏感限等关键因子, 仅对试验的操作方法作了规范。同年 NCCLS 在其兽医抗菌药物敏感试验委员会下成立水产工作组 (VAST-AWG), 在 Alderman 等人^[5]的工作基础上于 2003 年颁布一份关于水产第一类型病原菌纸片琼脂扩散法敏感试验标准方法报告 (M42-R)^[4], 对质控菌株 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC 33658) 和 *Escherichia coli* (ATCC 25922) 的质控限作了规范, 但也未涉及到病原菌对不同药物的敏感限, 对最小抑菌浓度 (MIC) 测定的标准方法 NCCLS 还在制订之中。日本动物抗菌药物协会 (JSAA) MIC 测定方法标准化委员会 2003 年依国际兽疫局 (OIE) 2000 年关于动物病原菌耐药性和检测指导方案^[6], 及 NCCLS 动物病原菌药敏试验标准 (M31-A2 2002)^[1], 对 1997 年版的 MIC 测定标准做了修订, 其中包括了部分鱼类病原菌^[7]。

2 试验中的关键因子研究

如人类和动物病原菌, 水产上药敏试验也主要为定性的纸片琼脂扩散法、定量的稀释法及 E 试验法, 其中稀释法包括肉汤稀释法 (常量和微量稀释法) 和琼脂稀释法, 各种方法各有千秋, 纸片扩散法应用较为广泛, 但稀释法 (特别是琼脂稀释法) 也受到越来越多的重视, 具体方法步骤可参考相关文献, 但分离于水生变温动物的病原菌与来自人类及陆基恒温动物的在生理生态特性上的差异, 致使培养基、培育时间和温度等相关试验参数有较大不同, 如表 1 和表 2。

表 1 NCCLS VAST-AWG 推荐的水产细菌纸片扩散法标准化试验条件 (2003 年)

类型	病原菌	培育温度 (℃)	培育时间 (h)	培养基
I	<i>Enterobacteriaceae</i>	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	<i>Aeromonas salmonicida</i> (非嗜冷菌株)	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	和其他适温气单胞菌			
	<i>Pseudomonas</i> sp.	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	<i>Shewanella</i> sp.	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	<i>Vibrio</i> sp. (非专性嗜盐菌株)	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
	<i>Listonella anguillarum</i>	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	MHA
II	<i>Vibrio</i> sp. (专性嗜盐菌株)	22 ± 2、28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	添加 1.5% NaCl 的 MHA
	<i>Photobacterium damsela</i> subsp.			
	<i>Piscicida</i> , <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	28 ± 2	44 ~ 48	添加 1.5% NaCl 的 MHA
III	<i>Flavobacterium columnare</i>	28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	稀释 MHA
	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	28 ± 2	24 ~ 28、44 ~ 48	稀释 MHA

续表 1

	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	15 ± 2	44 ~ 48、68 ~ 72	添加 5% 血清的 稀释 MHA
V	<i>Streptococcus iniae</i>	35	16 ~ 18	添加 5% 羊血 MHA
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	35	16 ~ 18	添加 5% 羊血 MHA
	<i>Lactococcus garvieae</i>	35	16 ~ 18	MHA
	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	35	16 ~ 18	MHA
	其他 G ⁺ 球菌	35	16 ~ 18	MHA
VI	<i>Aeromonas salmonicida</i> 嗜冷菌株	15 ± 2	44 ~ 48	MHA
	<i>Vibrio salmonicida</i>	15 ± 2	44 ~ 48	添加 1.5% NaCl 的 MHA
	<i>Streptococcus difficilis</i>	28 ± 2	44 ~ 48	添加 5% 羊血 MHA
	G ⁺ 杆菌 (<i>Renibacterium salmoninarum</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Erysipelothrix</i> <i>rhusiopathiae</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.)	未确定	未确定	未确定

表 2 水产病原细菌 MIC 琼脂稀释法标准化试验条件 (JSAA 2003) ^[7]

病原菌	培育温度 (℃)	培育时间 (h)	培养基
<i>Aeromonas hydrophila</i>	25	24	MHA
<i>Aeromonas salmonicida</i>	20	24	MHA
非典型 <i>Aeromonas salmonicida</i>	25	24	MHA
<i>Edwardsiella tarda</i>	25 ~ 30	24	MHA
<i>Flavobacterium columnare</i> (syn. <i>Chondrococcus columnaris</i>)	20 ~ 25	48	Cytophaga agar ^A
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> (syn. <i>Cytophaga psychrophila</i>)	15 ~ 20	96	Cytophaga agar 或 TYE agar ^B
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	15 ~ 20	96	Cytophaga agar
<i>Lactococcus garvieae</i>	25	24	MHA
<i>Mycobacterium</i> sp.	25	144	Middle-brook-ADH-enrichment -added Middlebrook 7H11 agar
<i>Nocardia seriolae</i>	25	96	Middle-brook-ADH-enrichment -added Middlebrook 7H11 agar
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i> (<i>Pasteurella piscicida</i>)	25 ~ 30	24 ~ 48	2% NaCl MHA
<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>p. plecoglossicida</i> , <i>P. anguilliseptica</i>)	25	24	MHA
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	18	24	KDM-2 agar ^C
<i>Streptococcus iniae</i>	25	24	MHA
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (syn. <i>Flexibacter maritimus</i>)	20 ~ 25	48	Cytophaga agar 或 TCY agar ^D
<i>Vibrio</i> spp. (<i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. damsela</i>)	25	24	2% NaCl MHA

- A 0.05% (W/V) 胰蛋白胨, 0.05% 酵母膏, 0.05% 醋酸钠, 0.02% 牛肉膏, 1.0% 琼脂, pH 7.2~7.4,
B 0.4% 胰蛋白胨, 0.04% 酵母膏, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $CaCl_2 \cdot H_2O$, 1.0% 琼脂, pH 7.2,
C 0.05% 酵母膏, 0.1% L-半胱氨酸盐酸盐, 1.0% 胰蛋白胨, 20% 牛血清, 1.5% 琼脂, pH 7.2,
D 0.1% 胰蛋白胨, 0.1% 酪蛋白氨基酸, 0.02% 酵母膏, 3.13% NaCl, 0.07% KCl, 1.08% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.0% 琼脂, pH 7.2, 配制液中海水不少于 30%

2.1 试验培育温度 水产病原菌生长要求温度一般远低于人类和动物的 35℃~37℃, 且不同菌种间的适宜温度又差异较大, 生长温度的多样性是水产病原菌药敏试验标准方法复杂化的主要因素, 为此需设立不同培育温度下的培育时间、质控菌株及质控限等。温度涉及到细菌和药物的一系列生理生化特性从而影响药敏试验结果, 如影响细菌的生长速率; 导致细菌细胞壁结构的变化而引起对药物敏感性的改变; 影响药物与靶标的亲和力及药物灭活酶活性; 调控基因影响细菌对药物降解酶的表达等, 对药物而言影响其物理活性及穿透细胞壁或被动扩散速率等。其他因素如盐度、培养基组成、接种量、培养时间等都可能在温度的基础上对药敏结果产生影响, 这些因子特别对纸片扩散法影响更大。因此培育温度是制订标准化方法时优先考虑的参数。

2.2 试验培养基 水解酪蛋白 (Müller-Hinton, MH) 及其改良培养基 (包括添加琼脂的 MHA) 是 NCCLS、EUCAST、JSAA 等推荐使用的标准培养基, 也是最常用的药敏试验培养基, 包括水产病原菌药敏试验。Dalsgaard^[8] 对水产上曾报导使用过的培养基作了较好的综述, 可参考。对 *F. columnare* 的测试应使用稀释的 MHA, 因为标准 MH 培养基中含有一些营养及琼脂浓度可抑制 *F. columnare* 的充分生长, 在稀释的琼脂中添加 5% 的小牛血清可刺激 *F. psychrophilum* 的生长, 使该培养基更适于磺胺和甲氧嘧啶的药敏试验。当测试海洋病原菌时, 培养基中应添加适量 NaCl 以利于嗜盐菌的生长, 不推荐用人工海水或天然海水配制培养基, 常见病原弧菌的药敏试验建议参考 Ottaviani 的研究^[9]。

2.3 抗菌药物的选择 对水产病原菌的药敏试验应尽可能选用国内外普遍允许使用的水产抗菌药物 (表 3), 而不提倡国内文献所报道的使用许多人类临床用药作测试, 以免药敏结果对水产临床用药产生误导, 我国还应特别注意参考主要水产品进口国对药物残留的规定。

表 3 常用水产药敏试验抗菌药物

抗菌药物		药片标准含 量 (μg、扩散法)	母液配制 (稀释法)	稀释液
氨苄青霉素	Ampicillin	10	磷酸缓冲液 ^A	磷酸缓冲液 ^B
庆大霉素	Gentamicin	10	蒸馏水	蒸馏水
红霉素	Erythromycin	15	95% 乙醇	蒸馏水
土霉素	Oxytetracycline	30	少量 0.1 mol/L HCl 加蒸馏水	蒸馏水
氟苯尼考	Florfenicol	30	95% 乙醇	蒸馏水
噁唑酸	Oxolinic acid	2	C	蒸馏水
氟甲喹	Flumequine	30	C	蒸馏水
恩诺沙星	Enrofloxacin	5	C	蒸馏水
沙拉沙星	Sarafloxacin	5	C	蒸馏水
磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	25 ^E	D	蒸馏水
磺胺二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	25 ^F	D	蒸馏水
甲氧苄啶	Trimethoprim	—	1/10 量 0.05 mol/L HCl 加蒸馏水	温蒸馏水

A 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0), B 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0), C 加 1/2 量蒸馏水后, 滴加 1mol/L NaOH 至全部溶解, 蒸馏水定容, D 加 1/2 量蒸馏水后, 滴加 2.5mol/L NaOH 直至全部溶解, 蒸馏水定量, E 含 1.25 μ g Trimethoprim, F 含 1.25 μ g Ormetoprim

3 质控菌株及质控限研究

对水产药敏试验的室内和室间质控可参照相关标准和文献^[10,11], 不同机构推荐的质控菌株有所不同, 如 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (NCIMB1102、ATCC33658、DSM3241)、*P. damsela* subsp. *Piscicida* (NCIMB2058、ATCC51736)、*L. anguillarum* (NCIMB6、ATCC19264、CIP 63.36.T)、*Y. ruckeri* (NCIMB2194、ATCC29473、ATCC11476、CIP 82.80.T)、*F. psychrophilum* (NCIMB1947)、*A. hydrophila* (ATCC7699) 等, 只要生长条件与被测菌株相同或接近, 理论上其它菌种也可作为质控菌, 如广泛用于人类和畜禽的 *E. coli* ATCC 25922。质控菌株应有稳定的遗传和药物敏感背景, 且具代表性, 能为多数实验室所获得。建议国内水产药敏试验应使用国际通用的质控菌株。更重要的是质控株有已建立并得到公认的对不同抗菌素在不同条件下的质控限, 目前正式规范的有 NCCLS 颁布的纸片扩散法 *E. coli* ATCC 25922 和 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 在 22℃ 和 28℃ 下的质控限 (见表 4), 这些质控限还得到了较好的评价和证实^[12], 但仅为第一类型细菌 (见表 1) 所设立。对 NCCLS 尚未列出的抗菌药物, 在结果解释标准颁布之前, 建议仅测定 MIC 值。此外, Michiko 等^[13] 和 JSAA^[7] 对 *Lactococcus garvieae* 及 *P. damsela* subsp. *Piscicida* 的琼脂稀释法测定 MIC 条件下多种质控菌株对多种药物的质控限也列出了参考值, 可借鉴。

表 4 水产药敏试验纸片扩散法质控菌株与质控限 (NCCLS M42-R, 2003)^[4]

抗菌药物	纸片药物 含量 (μ g)	ATCC 25922		ATCC 33658			
		22℃		28℃		22℃	
		24~28h	44~48h	24~28h	24~28h	44~48h	24~28h
Ampicillin	10	16~23	13~22	14~23	34~42	35~44	33~41
Enrofloxacin	5				36~46	37~49	35~45
Erythromycin	15	13~21	13~20	10~15	17~28	19~31	21~29
Florfenicol	30	20~32	20~32	20~30	32~44	34~47	33~41
Gentamicin	10	24~32	23~34	22~29	23~29	22~32	24~30
Oxolinic acid	2	28~37	28~40	25~32	34~43	33~45	32~44
Oxytetracycline	30	26~35	25~35	23~29	30~39	28~38	28~34
Ormetoprim- sulfadimethoxine	1.25/23.75	14~26	13~22	17~23	24~38	21~35	21~32
Trimethoprim- sulfamethoxazole	1.25/23.75	27~40	26~36	25~32	27~40	24~39	26~36

4 敏感限 (Breakpoint) 的设立及其水产临床意义

设立科学的敏感限主要依靠微生物学数据或药代动力学和药效学数据, 后者也常结合微生物学和临床结果^[14,15], 此外, 还与细菌的耐药机制有密切关系, 如 *A. salmonicida* 对土霉素的耐药机制是具编码抗性的 R 质粒, 其药敏数据分布呈双峰模型, 相对容易设立敏感限, 但该菌对噻啶酸和氟甲喹是由于细菌外膜蛋白的改变而呈低水平多重耐药性, 对其敏感限的建立呈主观性和任意性。依据临床医学所设立的敏感限不可

能科学的解释水产病原菌药敏试验结果, 但仅以微生物学数据的频率分布而脱离水产养殖临床背景, “敏感”或“耐药”的划分也只有微生物学上的意义。目前水产养殖动物的药代学、药理学和药效学等研究仍相对滞后, 加之水产养殖动物及栖息环境的多样性, 对水产病原菌敏感限的科学设立显得更为复杂。在缺乏药代学数据下, 应用药敏试验指导水产临床用药的作用极为有限。考虑到水产用药与人类和畜禽的显著差异性, 药敏试验的临床意义更值得思考。试验数据微生物学上的解释, 特别是 MIC 值, 对水产病原菌耐药性变迁的监控及水产药物的宏观管理可能更具意义。

5 结语

虽然每年国内都有大量水产药敏试验报道, 在没有标准的试验方法和质控菌株及对结果缺乏科学的解释标准下, 这种试验的微生物学和临床意义都值得怀疑。在国际相关机构的共同努力下, 相信不久将有一套完整科学的水产病原菌药敏试验标准方法供人们参考, 作为深受病害困扰的水产养殖和水产品出口大国, 我国应积极参入这套标准的制订中, 更何况相比欧美养殖的较单一的冷水和温水性鱼类, 我国水产养殖种类和养殖环境的多样性决定了丰富的病原多样性。

从病害的防治到抗菌药物的滥用误用而引发的水产品质量安全问题及科研学术间的交流, 国内都应重视水产药敏试验及其方法的标准化, 参照 NCCLS 相关标准在实验中严格遵循规范的操作程序。在国际公认的试验方法颁布之前, 应组织相关实验室制订临时标准, 同时加强水产抗菌药物的药代学、药理学、药效学及病原菌耐药机制等研究, 密切联系水产临床用药, 科学地阐释药敏结果并规范敏感限, 改变药敏试验这一重要研究方法在水产微生物学上的应用落后状况。条件成熟时相关部门还应组织室间质控评价活动, 加强地区间、国际间合作交流, 分析掌握水产耐药菌株的分布和流行动态变化, 确保我国水产品质量安全和水产养殖的健康发展。

参考文献

- [1] NCCLS. Approved standard. NCCLS document M31-A2, 2002.
- [2] NCCLS. Approved standard. NCCLS document M2-A8, 2003.
- [3] EUCAST. EUCAST Definitive Document E. Def 3.1., Clin. Microbi. Infect., 2000, 6: 509 ~ 515.
- [4] NCCLS. Approved report. NCCLS document M42-R, 2003.
- [5] Alderman D J, Smith P. Aquaculture, 2001, 196: 211 ~ 243.
- [6] White D G. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 2000, 20: 849 ~ 858.
- [7] Japanese Society of Antimicrobials for Animals. Proceeding of the JSAA, 2003, 25: 63 ~ 67
- [8] Dalsgaard I. Aquaculture, 2001, 196: 267 ~ 275.
- [9] Ottaviani D, Bacchiocchi I, Masini L, et al. Int J Antimicrob. Agents, 2001, 18: 135 ~ 140.
- [10] NCCLS. Approved guideline NCCLS document M23-A2, (2001), M37-A2 (2002)
- [11] King A, Brown D F J. J Antimicrob Chemother, 2001, 48 (Suppl. S1.): 71 ~ 76.
- [12] Miller R A, Walker R D, Baya A, et al. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4318 ~ 4323.
- [13] Michiko K, Akemi K, Kanako I, et al. Fish Pathology, 2004, 39: 111 ~ 114.
- [14] EUCAST. EUCAST Definitive Document E. Def 2.1., Clin Microbi Infect, 2000, 6: 570 ~ 572.
- [15] MacGowan A P, Wise R. J Antimicrob Chemother, 2001, 48 (Suppl. S1.): 17 ~ 28.