

養殖石斑魚皮膚感染分枝桿菌病例探討

張志堅¹、林上海²、張錦宜¹

¹水產試驗所水產養殖組、²上海水產動物醫院

前言

分枝桿菌感染症 (Mycobacteriosis) 是最常在觀賞魚種被發現的慢性消耗性疾病，事實上所有的淡水及海水魚種對本病均具有感受性，特別是一些廣受歡迎的觀賞魚，如攀鱸科魚類 (Anabantidae，常見如三斑鬥魚、泰國鬥魚、麗麗魚等)、脂鯉科魚類 (Characidae，常見如紅綠燈魚、頭尾燈魚、寶蓮燈魚、玻璃燈魚等) 及鯉科魚類 (Cyprinidae，圓吻鮠、鯽魚、鯉魚等) (Nigrelli and Vogel, 1963; Smith, 1997; Zanoni et al., 2008)。報告指出，最近幾年分枝桿菌症已經在一些長期繁養殖青鱗魚及斑馬魚的實驗室內造成嚴重的污染問題 (Teska et al., 1997; Astrovsky et al., 2000)，而且早期發現分枝桿菌大多是屬於感染觀賞魚的病例，常見者僅有 *Mycobacterium marinum* 及 *M. fortuitum* 二者而已，但目前已被證實有多種觀賞魚或養殖食用魚種的新品系分枝桿菌感染病例的出現，例如 *M. montefiorensis* 感染海鰻 (Moray eel) (Levi et al., 2003)、*M. abscessus* 感染虱目魚 (Chang et al., 2006)、*M. chelonae* 感染大西洋鮭 (Brocklebank et al., 2003)，尤其特別好發於集約式養殖系統。

分枝桿菌罹病魚的皮膚潰瘍傷口或消化道上皮潰瘍傷口是本菌排毒污染水環境的主

要傳播途徑，食入病原菌 (包括食入罹患本病而死亡的魚體) 則為本病的主要感染方式 (Harriff et al., 2007)，而且某些品系的分枝桿菌會感染人類，常常引起難以癒合的局部性皮膚潰瘍 (fish tank granuloma, swimming pool granuloma)，引發這些病例的分枝桿菌因為對大多數的抗結核病藥物均具抗性，故難以治療。Glaser 等學者在 1994 年發表一件愛滋病患者因清洗家中水族缸而感染 *M. marinum* 的病例，該研究指出，寵物魚缸內可能存在著不顯性感感染分枝桿菌的罹病魚。故建議寵物魚飼主在清理水族缸時最好戴上手套以保護自己 (Glaser et al., 1994)。

本病為慢性消耗性疾病，故罹病魚多呈現消瘦、生長不良、性成熟遲緩或繁殖性能降低等臨床症狀，其他肉眼可見的病灶則包括骨骼變形 (例如罹病魚脊椎骨變形扭曲)、慢性無法癒合深淺不一的皮膚潰瘍或魚鱗糜爛。罹病死亡魚隻經解剖可見內臟表面出現大小不一、直徑 1—4 mm 的黃白色結疔，尤其常見於腫大的腎臟及脾臟；本病較急性病程的罹病魚則常見有腹部鼓脹及皮膚水腫的情形 (Astrovsky et al., 2000)。本病的組織病理學特徵為慢性炎症反應 (肉芽腫性病灶)，意即病灶中心為壞死細胞、細菌碎片所組成並包含有病原菌分枝桿菌，壞死區邊緣則由多層類上皮巨噬細胞 (epithelioid

macrophage) 所組成，並伴隨有結締組織的增生，由於一般通用的細菌染色法如革蘭氏染色，不易將分枝桿菌以分辨染色的方式辨別出來，故採用抗酸性染色法進行辨識，於風乾後之組織塗抹片及已脫蠟之組織石蠟切片後，予以背景染色後鏡檢，可在病灶區內發現有紅染的抗酸性桿菌菌體。

病史、臨床檢查及實驗室診斷

本類病例 (多場發生) 在 2013 年間於屏東縣佳冬鄉執行本所農業科技計畫時發現，養殖漁民送檢之罹病魚均為近上市體重之石斑魚 (以瑪拉巴石斑及點帶石斑為主)，漁民宣稱此批送檢之罹病石斑為收獲時不足斤重者，經篩選淘汰後再回飼於養殖池，在回飼約 1 星期至 10 天後即開始發現帶有多處爛皮膚病灶的罹病魚出現於養殖池中。將漁民送檢罹病魚施予電擊安樂死後進行臨床檢查，在魚體全身較突出部位如頭部、口部、魚鰭及尾部均發現有皮膚潰瘍灶的出現 (圖 1)，魚體頭部潰瘍出現於二眼後方部位，有二處潰瘍且該二者已融合成一個局部廣泛性深層大潰瘍灶，另發現在沿魚鰓蓋緣可見有大小不等之潰瘍灶，嚴重潰瘍灶甚至深入至骨質層而造成鰓蓋破壞，胸鰭及鰭後方區域皮膚亦可見有多發局部大小不等之潰瘍灶 (圖 2)，臀鰭及尾鰭均可見有破損及潰瘍灶出現 (圖 3)，甚至於在病魚口腔內也有多發局部潰瘍灶形成 (圖 4)。使用乾淨載玻片於皮膚病灶區取材而製成塗抹片標本，風乾後進行革蘭氏染色 (Gram's Stain Kit with Stabilized Iodine Kit, Polysciences, Inc) 及抗酸染色

(AFB Kinyoun Kit, Polysciences, Inc)，結果在抗酸染色塗抹片中於 1,000 倍放大倍率下檢出有紅色且呈較肥短的抗酸性桿菌，藉此我們初步懷疑本病例有分枝桿菌之感染，立即使用商品化的斜面培養基 (Lowenstein-Jensen Medium, Neogen; L-J Medium) 進行抗酸菌培養。接著將罹病魚右側臥放置後，使用骨剪於鰓蓋上方向口部方向剪開，另於鰓蓋下方以骨剪向口部方向剪開後，取下鰓蓋並曝露出魚鰓，外觀檢查及濕壓片檢查均無異常。在胸鰭正中央偏後處使用外科手術刀進行切創後，以手術剪沿肛門方向剪開約近至肛門處繞向斜上方，並沿魚鰓向頭部方向繼續將病魚胸腹腔完全剪開後進行體內臟器檢查，但各臟器均無肉眼可見病灶被發現。罹病魚病變組織採集適度大小 (不超過 1 公分厚度) 置入 10% 中性福馬林液固定至隔天後，進行組織修整 (修片) 後放入組織包埋盒，再經流水沖洗 1 小時後，移入吊籃並放入脫水機進行脫水，隔天取出後進行含蠟組織包埋、石蠟切片製作，封片後置於抽氣櫃內抽氣至隔日進行切片判讀。病理切片經使用光學顯微鏡進行讀片後發現，具有明顯組織學形態變化者均集中於皮膚，在低倍視野下可見多處皮膚正常結構消失，而被嚴重度局部廣泛性炎症區所取代，涉及區域由皮膚表層處向下深達肌肉層，炎症區內有多發局部壞死灶 (圖 5)，甚至有嚴重壞死區被數層類上皮細胞層層包被而形成肉芽腫，其外再外覆數層新生成結締組織，其中可見有中等量巨噬細胞及淋巴細胞浸潤 (圖 6)。肉芽腫病灶組織另製成切片後進行抗酸染色並以蘇木紫進行甲基藍進行背景染色，在肉芽腫病灶區內及其



圖 1 感染分枝桿菌之罹病魚全身皮膚可見有多發局部大小不等之潰瘍灶



圖 2 感染分枝桿菌之罹病魚頭部皮膚可見局部廣泛性融合性潰瘍灶



圖 3 尾部有局部廣泛性潰瘍灶出現，臀鰭亦可見局部潰瘍灶

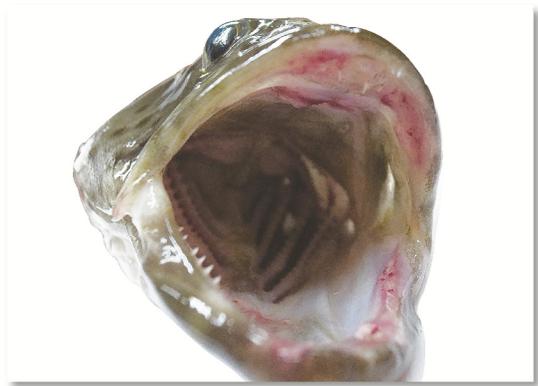


圖 4 口腔內有多發局部大小不等之潰瘍灶

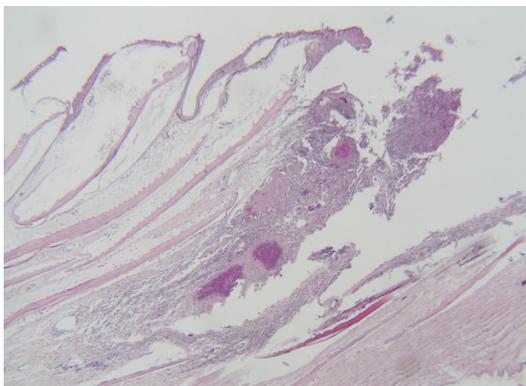


圖 5 養殖石斑魚感染分枝桿菌皮膚病灶部病理切片(H&E stain)。視野中央有局部廣泛性深層壞死病灶(潰瘍)，並伴隨大量炎症細胞浸潤；炎症區中可見 3 個中心含有呈紫紅色壞死組織的肉芽腫形成；視野左方之真皮層空隙加大，顯示有水腫

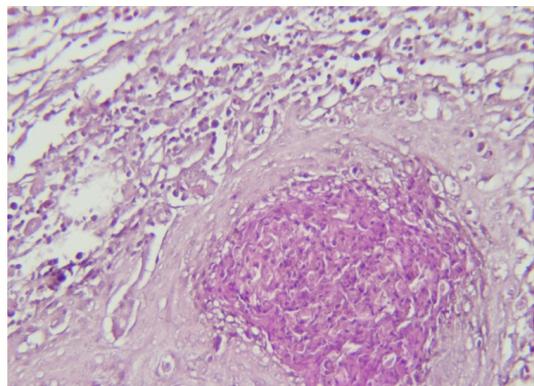


圖 6 將圖 5 所示之肉芽腫經高倍放大後，視野中央偏右下紫紅色部位為重度壞死區，周圍外覆數層類上皮細胞形成夾膜樣結構，更外層則是新生成結締組織伴隨有巨噬細胞、淋巴細胞的浸潤

周圍慢性炎症區中檢出紅染之分枝桿菌菌體 (圖 7 及 8)，此證明上述病灶由分枝桿菌所造成。前述 L-J Medium 鈎菌採樣，可

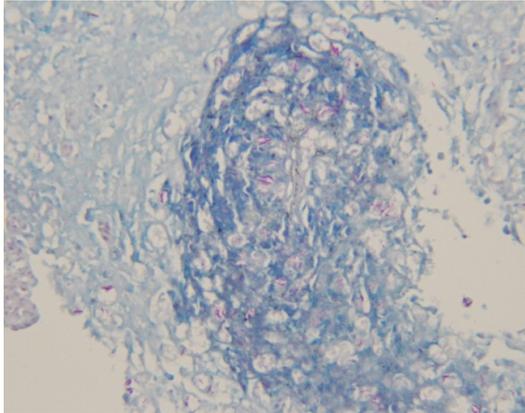


圖 7 養殖石斑魚皮膚感染分枝桿菌皮膚病灶部病理切片照片 (Acid-fast stain)。肉芽腫內部可見散在性分布呈紅染的分枝桿菌菌體，另在肉芽腫外圍慢性炎症區中亦可見少量的分枝桿菌存在

能因操作技術不當，無法成功分離病原菌而進一步進行鑑定，故本病例僅能認定是分枝桿菌感染病例。

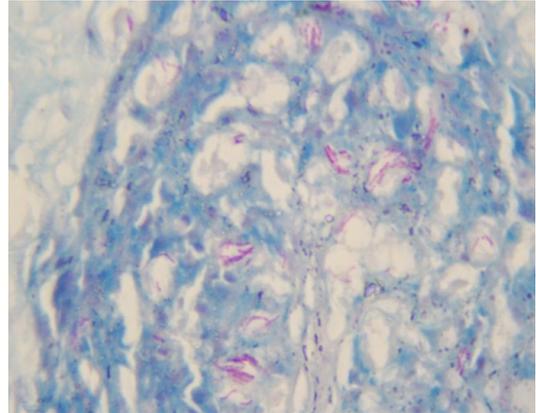


圖 8 呈紅染的分枝桿菌菌體經高倍放大後可明顯地被發現存在於腫大的細胞內部，這些細胞可能是吞噬細菌的巨噬細胞或是遭分枝桿菌寄生尚存活的細胞

結語

早期文獻報告指出，分枝桿菌可感染淡、海水魚類，但僅限於熱帶區域魚種，而溫帶水域魚種則無感染病例被發表 (Reichenbach-Klinke, 1972)，但之後陸續有新品系的分枝桿菌感染病例打破此說法，例如大西洋鮭魚 (溫帶水域魚種) 感染 *M. chelonae* 病例被發表 (Bruno et al., 1998)，即便如此，此類病例仍是好發於高水溫季節並以偏南部養殖區較多。一般而言，分枝桿菌感染方式有二，主要是經口攝食到受具感染力分枝桿菌污染的物質 (生餌、魚屍體)，或是胎生魚種直接經卵巢感染下一代 (Roberts, 2012)，而罹病魚所顯示的病灶特徵則是在體

內臟器上，尤其是肝、脾及腎臟發現粟粒狀大小的結節，組織病理切片所見則是慢性炎症反應伴隨典型肉芽腫出現，在病灶區內有大量抗酸菌的出現 (Roberts, 2012)。本文所發表之病例以皮膚病灶出現為主，受檢罹病魚體內臟器均無檢出結節樣病灶，加上此類病例病程較為急性，約發生 7-10 天即開始出現臨床徵狀並且開始有死亡魚隻出現，顯示此類為非典型分枝桿菌感染病例。本文共同作者林上海醫師亦指出此類病例在以往並未出現過，經討論判定，可能是收穫所用漁網污染分枝桿菌後 (使用後未消毒)，在篩選石斑魚過程中，污染魚網造成石斑魚皮膚傷口並直接帶入分枝桿菌，造成此類石斑魚皮膚急性感染病例的發生。