鱘龍魚的瓶鼻海豚鏈球菌及親水性產氣單胞菌複合感染症

張志堅[1]、黃美瑩[1]、林洋演[2]、謝弘斌[2]、黃國榮[2]、林金榮[1]
[1]水產試驗所水產養殖組、[2]新北市政府動物防疫檢疫處

前言

鱘龍魚 (鱘魚) 屬鱘科 (Acipenseridae)，體表具 5 列盾形骨板為此種魚類的重要特徵 (沈等，2004)，全世界現存計有 2 屬 24 種，多分布在北半球的淡水域。鱘魚出現在白堊紀時期，因具頑強抗逆境能力，能耐過各時期大自然變遷及氣候變化，故能生存至今且保有遠古時期的魚類特徵，有「水中活化石」之稱 (林等，2012)。鱘魚是目前最古老的脊椎動物之一，全身皆為軟骨，體表鱗片種類為硬鱗並具特徵性骨板結構。野生鱘魚發育成熟約 12 年，人工養殖者生長較快，但也需 8－10 年方可成熟。鱘魚肉質鮮美，皮膚及臟器均可加工利用，魚卵可製成魚子醬，屬高經濟價值魚種 (沈等，2004)，偏好低水溫環境，目前台灣山區有養殖業者引進飼養。台灣常見的養殖種類有西伯利亞鱘 (*Siberian sturgeon*)、閃光鱘 (*Starry sturgeon*)、史氏鱘 (*Amur sturgeon*) 及匙吻鱘 (*Mississippi paddlefish*) 等 4 種，但亦常見有雜交鱘出現，本病例之罹病鱘龍魚即是雜交品系。

鏈球菌 (*Streptococcus*) 為淡水養殖魚類常見的傳染性細菌性病原。β-溶血型鏈球菌引發的鏈球菌感染症 (Streptococcosis) 在 1958 年於日本的虹鱒被發現後 (Hoshina et al., 1958)，1966 年在黃金夏納 (golden shiner/鯉科，原產於北美東部) 也發現感染病例，接著陸續於其他淡水魚種如吳郭魚及海水魚如午仔 (striped thread fish)、海鱺 (cobia)、烏魚 (mullet) 及鯡魚 (menhaden) 等也發現感染病例。一般而言，本病經常是由一些偶發性伺機性病原菌所引發，如 *Streptococcus agalactiae* 或 *S. faecalis*，但有時也會由非溶血性 B 群菌株引發 (Baya et al., 1990)。在淡水魚感染溶血性鏈球菌的病例中分離出之菌株均是瓶鼻海豚鏈球菌 (*S. iniae*)，此點與其為淡水常在菌相關聯。鏈球菌的鹽度適應廣，故淡水魚、半淡鹹水魚及海水魚均會受鏈球菌的侵襲。一般情況下，鏈球菌感染症好發於高水溫期，水質不良為本病發生之前置因子，如老池 (水中有機質含量高)、飼養密度高 (緊迫) 及水體微生物菌叢未穩定 (水中亞硝酸及氨氮過高) 等 (劉等，2005)。鏈球菌感染常為全身性感染，病原菌隨血行途徑侵犯罹病魚全身各臟器，重度感染則以菌血症及敗血症型式出現，敗血症出現時，病程呈現甚急性感染，皮膚、鰭及臟器呈現急性出血，病原菌經血行至臟器而引發組織病理學變化，造成腦膜炎、腹膜炎及心外膜

炎，並引發血管病變，導致臟器鬱血及梗塞而造成肝、脾及腎臟的局部壞死及出血，甚急性及急性病例則僅見多發局部凝固樣壞死而缺乏炎症反應 (Roberts, 2001)。

親水性產氣單胞菌感染症 (red pest/赤鰭病；魚的紅斑病) 之病原為 *Aeromonas hydrophila*，為革蘭氏陰性短桿菌，具單鞭毛且具運動性。本菌廣泛地分布於水棲環境中，早在 1891 年即被學者 Sanarelli 在許多國家的淡水養殖池罹病魚中成功的鑑定出來。本病好發於淡水魚種，但海水魚種也有偶發病例出現，高鹽度海水則無感染病例出現 (Roberts, 2001)。本病原廣泛存在養殖池水及池底污泥，感染方式為水平感染，可經由體表傷口入侵魚體 (Hazen et al., 1978；Dumontet et al., 1996)。病魚外觀主要以體表及鰭部潮紅出血為主，慢性病程可發現皮膚潰瘍的情形，腹腔壁黏膜面及肝、腎、脾臟漿膜面均可發現多發局部點狀至斑狀出血。一般在淡水養殖池及野外淡水魚發生異常嚴重魚隻死亡，則多半為本菌 (*A. hydrophila*) 的感染 (Roberts, 2001)，此與其出血性敗血症極度相關。本病的發生常與緊迫及飼養管理有關，如高密度飼養、高水溫及水溫變化大、低溶氧、水質不良伴隨寄生蟲疾病感染等前置因子 (Bullock et al., 1971)。本病可造成心肌、肝臟、生殖腺及胰臟的多發局部出血及壞死，亦可引發皮膚嚴重水腫、壞死及潰瘍 (Roberts, 2001)，致病機轉為 *A. hydrophila* 易於腸道內繁殖造成卡他性出血性腸炎，而其毒性代謝產物可經由腸道吸收入全身血液循環造成毒血症所致，組織病理學變化以毒素造成小血管病變為主，常見有胃黏膜下層微血管出血、肝索及腎小管上皮細胞變性，在血管病灶周區則出現出血、滲出物蓄積及纖維素物質沈積等組織病理學變化 (Miyazaki and Jo, 1985；Miyazaki and Kaige, 1985)。

病歷

本病例由本所水產養殖組與新北市動物防疫檢疫處共同診斷，並已在 101 年度第 1 次強化動物疾病檢診體系會議中提報。此病例為 100 年 10 月中旬，自新北市三峽某一鱘龍魚養殖場取得，屬雜交鱘，魚齡約 8 個月，該場總共飼養鱘龍魚約 2,000 尾。池魚發病後，臨床症狀為游泳無力、魚體蒼白並有零星死亡發生 (累積死亡達 17.5%)。業者將罹病魚隔離並以 BKC 及優碘消毒養殖池，同時投以 Oxolinic acid 治療，均無顯著效果，之後求助新北市動物防疫檢疫處進行處理。

一、病魚解剖

罹病鱘龍魚體色蒼白，腹部尤為明顯，顯示有貧血情形，體表部位如口腔周區、肛門、胸鰭、腹鰭可見充出血情形 (圖 1－3)，魚體表面黏液增加，腹腔內蓄積混濁暗紅色腹水，鰓絲呈現潮紅及充出血，腎臟呈現充出血及腫大，肝表面有多發局部出血點及出血斑，腸漿膜面有局部廣泛性出血斑 (圖 4)，生殖腺 (尚未完全成熟，無法分辨精巢或是卵巢)漿膜面亦有散發性分布大小不一之出血點及出血斑 (圖 5)，而在較慢性病例可見肝表處呈現粗糙並散發大小不一之小白點及小白斑 (圖 6)。綜合上述所得，此病例為急性至亞急性之出血性壞死性系統性感染，初步懷疑為細菌性敗血症或中毒所引起。

二、寄生蟲診斷

取罹病魚鰓絲進行濕壓片檢查，僅見罹鰓絲黏液增厚，並無任何外部寄生蟲感染。

三、微生物學診斷

將罹病魚心、肝、脾及腎臟進行釣菌並培養於血液培養基及 MacConkey Agar，室溫下培養 24－48 小時，觀察菌落生長並選取獨立菌落進行過氧化氫酶試驗 (Catalase test) 及氧化酶試驗 (Oxidase test)相關生化試驗。源自於脾及肝臟樣本於血液培養基生成 1.0－1.5 mm 之灰色菌落，並有 β-溶血現象，該菌落進行革蘭氏染色，鏡檢後發現其為陽性球菌， Catalase test 為陰性，另以 API20 Strep kit 進行生化鑑定，結果為 *A. hydrophilia*。慢性病例病材，將心臟疑似結節病灶製成塗抹片，烘乾後行抗酸染色鏡檢，無發現抗酸菌 (分枝桿菌及奴卡氏菌) 之菌絲出現。實驗室檢查結果，排除分枝桿菌及奴卡氏菌之感染，初步檢出細菌性病原為 *A. hydrophilia*。

四、分子生物學診斷

由新北市動物防疫檢疫處提供之 2 件細菌釣菌樣本，以血液培養基加以純化培養 3 次並進行聚合酶鏈鎖反應用以增幅 16s rRNA 基因，所得產物以 2% Agarose 膠片行膠片電泳分析後，將電泳膠片圖、引子及 PCR 產物送定序。定序結果經上網比對後，結果為：*S. iniae* 及 *A. hydrophila*。此實驗結果比之傳統微生物學鑑定多檢出另一細菌性病原 (*S. iniae*)，此亦反映出為何目前學界及獸醫防疫檢疫單位，以分子生物學進行病毒及細菌鑑定方式漸成主流的原因 (檢出率高及準確)。

五、組織病理學診斷

在脾臟可見多發局部壞死灶並伴隨有不等程度之出血情形，其壞死部位涉及白髓及紅髓 (圖 7)，且缺乏組織細胞之反應，此病灶顯示有急性出血性敗血症的發生或是有急性中毒的可能；在一較不新鮮病材的脾臟，可見某些上皮細胞已逐漸自基底膜剝離 (死後變化的特徵)，但在脾小動脈血管周區 (脾圓體部位)，呈現圓圈樣圍繞血管的特化組織細胞 (以吞噬細胞為主的特化細胞) 之細胞質中出現多量細菌菌塊的蓄積，同時這些特化細胞均呈現凝固樣壞死的情形，此顯示此罹病鱘龍魚在死前時此部位特化細胞中即存在少量被吞噬的細菌，而在死後數小時內因失去組織細胞的抵抗而大量增殖，方形成此病灶 (圖 8)；肝臟實質部亦呈現多發局部性凝固樣壞死並伴隨有不等程度的出血，壞死區及壞死周區同樣也缺乏組織細胞之炎症反應，其壞死部位不特定涉及某部位而呈散發性分布，此病灶之形成大多與急性敗血症 (主要由強力細菌毒素所引發) 及急性肝臟中毒有關 (圖 9)；取自脊柱周區之肌肉組織，鏡下可見局部廣泛性岑克氏變性的情形，其肌纖維呈圓形化，同時可見其橫紋消失而呈肌質均質性的變化，此病灶與中毒、敗血症及急性局部缺氧而導致的梗塞有關 (圖 10)；腎臟之腎小管上皮細胞呈現粉紅色均質樣的變化，同時可見有核消失及核濃縮，此顯示腎小管亦遭受到傷害而發生凝固樣變性至壞死的變化，而腎間質組織有少量單核細胞及淋巴樣細胞蓄積，此可能為正常即存在細胞，不列入疾病判定。

六、最後診斷 (確診)

鱘龍魚的瓶鼻海豚鏈球菌及親水性產氣單胞菌複合感染症。

圖 1　病魚之鰭、尾部及體表多處均嚴重充出血

圖 2　病魚腹面多處嚴重充出血

圖 3　病魚頭部腹面蒼白，但口腔周區及上下方有出血情形，其他部位皮膚表面可見黏液增多

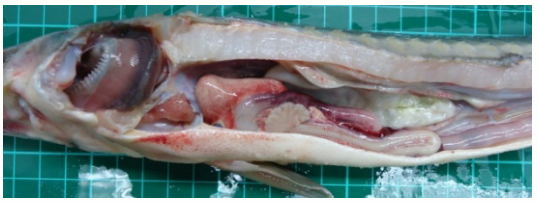

圖 4　鰓絲充出血且肝臟表面與腸漿膜面均有廣泛性充血情形

圖 5　病魚生殖腺之漿膜面，分布大小不一之出血點及出血斑之病灶

圖 6　病魚之鰓絲出血及蒼白，肝臟表面粗糙並散布小白點

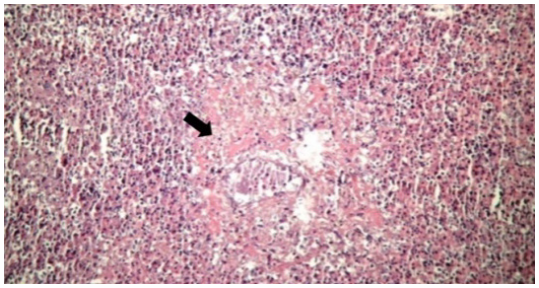

圖 7　中央血管周區粉紅色均質樣病灶區之細胞呈現典型之凝固樣壞死病變(箭頭指處)

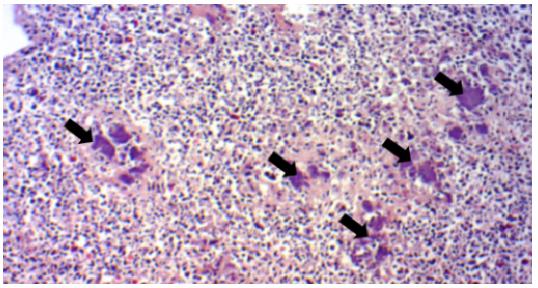

圖 8　脾臟的組織切片中發現，多發局部凝固樣壞死病灶中有細菌團塊的出現(箭頭指處)

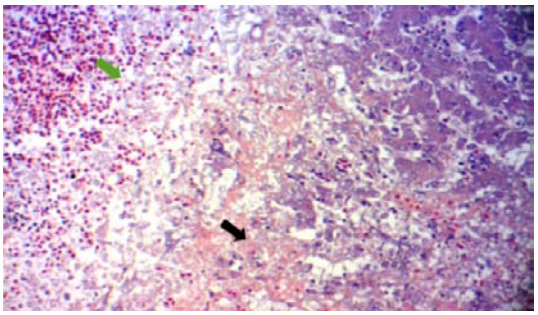

圖 9　大半肝細胞均呈現凝固樣壞死(黑色箭頭)，出血區紅血球呈核消失的現象(綠色箭頭)

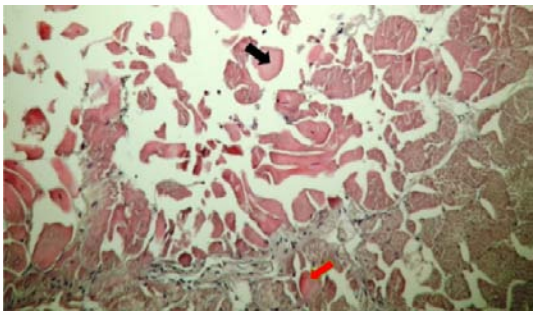

圖 10　肌纖維腫大圓形化及肌質變性(黑色箭頭)。正常組織夾有變性之肌纖維(紅色箭頭)

處理建議

依據新北市動物防疫檢疫處實驗室之抗微生物藥物敏感性試驗結果，選擇適用藥物(藥敏結果：對 *S. iniae* 具感受性藥物為 Amoxicillin、Ampicillin 及 Tetracycline；對 *A. hydrophila* 具感受性藥物為 Flumequine、Oxolinic acid 及 Tetracycline)，因需針對二種不同的病原同時治療，所以建議畜主以 Amoxicillin 及 Tetracyline 依其安全劑量、投與時間以及停藥期規定，投與罹病鱘龍魚治療。

隔離病弱魚並減少單位面積放養量 (飼養密度)、暫不餵食 (僅投藥時餵食)，降低緊迫。少量多次換水 (山泉水) 以降低水溫。定期清池及消毒養殖池。

疫情追蹤調查

2011 年 10 月 28 日及 11 月 4 日新北市動物防疫檢疫處之公職獸醫師再次拜訪該養殖場，業者表示已將發病魚隻隔離及淘汰，並加強飼養管理及減少緊迫，加上天氣轉涼，水溫逐漸降低，雖仍有零星死亡，但疫情已趨緩。

討論

台灣鱘魚養殖大多在各縣市山區引山泉水行流水式飼養，水溫大多較低 (對鱘魚而言，22℃ 算是高水溫，極易發生疾病感染/家衛所涂堅組長檢診經驗)，鱘魚發病季節主要為炎熱的夏、秋兩季，最常見的疾病為分枝桿菌或奴卡氏菌感染，但均無出現於本次病例中，其他公務獸醫單位提出鱘魚鏈球菌感染，大多為瓶鼻海豚鏈球菌，而純種鱘發生機率少，多發生於雜交鱘。親水性產氣單胞菌為伺機菌，其感染為全年性，一旦發生常為嚴重爆發，其極重要的前置因子，便是緊迫，包括密飼、水質不良、寄生蟲感染、越冬飼養管理不佳，但只要落實降低飼密，發生率便大為降低 (Roberts, 2001)。此病例解剖時發現急性至亞急性感染，急性感染為充出血病灶，見於鱘魚皮膚、口、鼻及泄殖孔周區及黏膜，體內臟器漿膜面及實質亦見出血點至出血斑；亞急性感染以壞死為主，而出血則屬陳舊病變；若就解剖觀察病變行疾病研判，僅排除部分疾病而做出初步診斷，需再由實驗室診斷證據而確診。組織病理學診斷可確定組織臟器的病理形態變化，確定本病例的感染為全身性感染，因病變涉及多種臟器且病灶形態雷同，各臟器形成之壞死灶及出血灶均為散發性，此與血行路徑極相關，此意味著造成組織器官壞死灶的原兇，可隨血液循環而至全身，並對組織臟器造成影響而產生病變；但病理學仍只是就形態學的變化為我們指出診斷方向，但無法提出確診 (除非為疾病特有病變)，此時微生物學及分子生物學的鑑定，可提供確診的證據(檢出病原 = 確診)。在細菌分離時，釣菌取樣要在病灶區邊緣，可釣出較有活力且最接近病因菌的病原菌，在第 2 次挑菌並增菌時，要小心取得優勢菌進行再次增菌，如此進行 3 次以上，較有機會取得純粹菌落，在進行 PCR 增幅標的基因並定序時，能降低判讀困擾。