

台灣養殖鰻之潰瘍病

劉正義 蔡信雄*

Edwardsiellosis in Pond-Cultured Eel in Taiwan

Cheng-I Liu and S. S. Tsai*

Abstract

Epidemiology, pathology, biochemical characteristics and drug sensitivity test of Edwardsiellosis were conducted in seventy-six cases of pond-cultured eels collected at Pingtung Fish Disease Diagnostic Center during July 1977-April 1979. Rapid diagnosis and control measurement were also reported in this paper.

The disease tended to prevail from January to April. Stress caused by fluctuating temperature in this period seemed to be responsible for these outbreaks.

Pathologically, the infected eels were marked with ulcerative lesions over the body. Foci of liquefactive necrosis were noticed in liver or in kidney or both.

Thirty-one strains of *Edwardsiella tarda* were selected for sensitivity test *in vitro*. The results showed each isolate was sensitive to at least one or several antibacterial drugs respectively. However, nearly all of the isolates were resistant to sulfa and/or tetracycline.

緒 言

潰瘍病 (Edwardsiellosis) 是養殖鰻重要的細菌性疾病。本省各地養鰻場皆普遍發生本病，並易造成嚴重之危害，使養殖業者蒙受重大之經濟損失。

本病過去在日本一直與赤鰓病混淆不清，以為是同一種病；直到後來經過 Hoshina⁽¹⁾、Ewing⁽²⁾、及 Wakabayashi⁽³⁾ 等證實是一種與赤鰓病之病原菌 (*Aeromonas hydrophila*) 不同，屬於腸內細菌科，並已確定其命名為 *Edwardsiella tarda* (*E. anguillimortifera*) 的病原菌所引起的疾病。由於病鰻易於體表形成潰瘍病灶，在本省郭等⁽⁴⁾ 遂以通俗名稱把由本菌感染的病鰻命名為潰瘍病。本菌除感染鰻魚外，對於其他魚類^(5,6)，爬蟲類^(5,7) 鳥類、^(5,7) 哺乳動物^(5,8)、甚至人類^(5,9,10)、亦有病原性。故對於本菌之研究深受重視。

屏東農專魚病診療服務中心自1977年7月成立以來，筆者等發現本病在屏東地區甚為猖獗。為使對本病能有更深層之認識，茲將近兩年來本中心所蒐集之病例，特別在疫學、病原分離、病原之抗藥性及病理學方面提供研討心得以供參考。

* 省立屏東農業專科學校，獸醫病理研究室

Taiwan Provincial Pingtung Institute of Agriculture, Department of Veterinary Medicine

材料與方法

1. 材料：

從1977年7月迄至1979年4月間，屏東農專魚病診療服務中心之送檢病鰻中，選就其中經病理學檢查，病原菌之分離及同定而診斷為本病之病例為材料。

2. 細菌分離及同定：

(1) 細菌分離：

將疑患本病之病鰻麻醉後，以70%酒精棉花擦拭魚體表面，以無菌操作法自肝、腎各取一小塊組織塗抹於Trypticase soy培養基 (T-S agar) 及 Rimler-Shotts 培養基 (R-S agar) 上。將可疑菌落復接種於T-S agar以純化細菌，並供生化性狀、抗藥性及血清學反應等試驗之用。

(2) 生化性狀試驗：

依 Shotts and Bullock法⁽¹⁾鑑定本病之病原菌。即將上述之可疑菌落行對 Cytochrome oxidase 之反應以確定其屬於腸內細菌科。若呈陰性反應，則再接種於 TSI, SIM 及 Lysine decarboxylase broth 上，若細菌有葡萄糖發酵、運動性、並產生 Indole 及 Lysine decarboxylase，則初步可判定為 *Edwardsiella tarda*。其餘生化性狀則按常法測定，以為分離菌之生化性狀比較。

以上各試驗及細菌分離，除 R-S agar 係在37°C下培養細菌外，其餘均在25°C下進行。

(3) 血清學試驗：

將所分離之菌株與本中心自備之 *Edwardsiella tarda* 之免疫血清 (以 AT 73 菌株之 O 抗原經多次免疫兔子使產生凝集力價達 1,600 倍之高力價凝集素) 行快速平板凝集反應，若在一分鐘內呈現明顯之凝集塊者判定為本菌。

3. 藥物敏感性試驗

以 BBL 之 Bacto-Sensitivity discs 藥片利用 Kirby-Bauer method (Surface-Swab method) 測定分離菌對於 11 種常用抗菌劑之感受性。

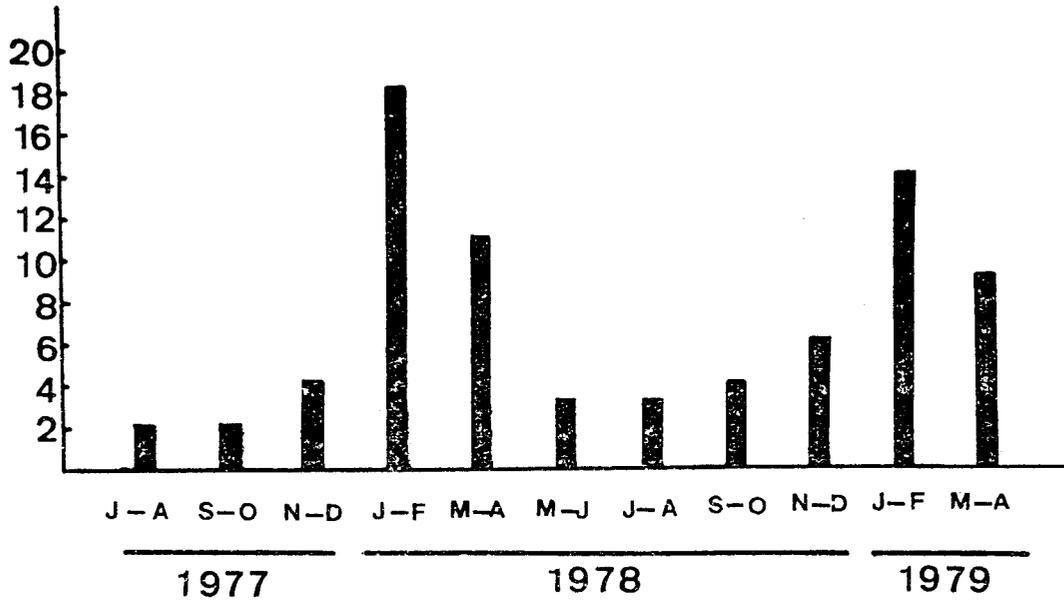
(4) 組織病理學檢查：

把病鰻之重要或有病變之臟器固定於 10% 中性福馬林液。固定標本行石臘包埋及切片。切片組織以蘇木紫—伊紅 (H & E) 染色，鏡檢。

結 果

自1977年7月迄至1979年4月間，由本中心診斷罹患潰瘍病之送檢病鰻共76例；其中有單純感染本病者，亦有與赤鰓病、凹凸病、滑動細菌性鰓病、水黴病、寄生蟲病及其他疾患併發感染者。每一病例之送檢尾數不等，少者 1~2 尾，多則達 30 幾尾。罹病鰻魚大小不等，從鰻苗至成鰻之各成長階段皆有感染本病者。發病率及死亡率隨罹病鰻魚大小及發病後場方處理方法之不同而有所差異；一般而言，以每天死亡十餘尾為常見，亦有極嚴重之死亡情況。鰻魚愈小傷亡愈重。某場飼養約 200 尾/kg 大小之幼鰻，曾經在短短不到一週內，因感染了本病死亡約達全場飼養尾數之 $\frac{1}{4}$ ，每天死亡數千尾。大多數之養鰻戶在鰻魚罹病時皆先自行投藥處理，在經過盲目地投藥而效果不彰，甚或愈形嚴重之情況下，才把病 (死) 鰻送來本中心求診。

本病之發生有明顯之季節變化 (圖一)。經統計而發現 1 至 4 月份為本病之最主要流行季節，其發生率佔 68.4% (52/76)；發生率最低為 5 至 8 月份，僅佔 10.5% (8/76) (未包括 1979 年之 5~6 月份)。



J-F: January to February; M-A: March to April
 M-J: May to June; J-A: July to August
 S-O: September to October; N-D: November to December

Fig. 1. Cases of Edwardsiellosis in pond-cultured eel diagnosed by "Fish Disease Diagnostic Center" in Taiwan (from July 1977 to April 1979)

分離 *E. tarda*，可應用 TS agar 及 R-S agar；尤其是分離菌在 R-S agar 上發育良好，於 37°C 培養 24 小時出現周圍綠色，中心黑色之特異菌落。

把從自然感染病例所分離的 31 株 *E. tarda* 進行各種生化性狀試驗均呈相同之反應（如表一所示）。分離株不產生 Cytochrome oxidase 及除可發酵利用少數醣類如 glucose, maltose 等外其餘大部分醣類均不被利用。

Table 1. Biological characteristics of the 31 strains of *Edwardsiella tarda* isolated from infected eels.

| Test | Result | Test | Result |
|----------------------|---------|------------------|--------|
| Gram stain | -* | Glucose | + |
| Cytochrome oxidase | - | Gas from glucose | + |
| TSI | R/YBG** | Arabinose | - |
| Motility | +*** | Rhamnose | - |
| Indol | + | Xylose | - |
| Lysine decarboxylase | + | Lactose | - |
| Urea | - | Sucrose | - |
| Methyl red | + | Maltose | + |
| Voges-proskauer | - | Mannitol | - |
| Nitrate reduction | + | Sorbitol | - |
| Malonate | - | Adonitol | - |
| Hugh-Leifson's agar | F**** | Inositol | - |

*: negative; **: R=Red, Y=Yellow, B=Black, G=Gas;
 : positive; *: fermentation

由本中心所研製之經 *E. tarda* 多次免疫兔子而得到之高力價凝集素兔疫血清，被應用於快速診斷分離菌是否為本菌。所有分離菌株經行快速平板凝集反應後，皆可於 1 分鐘內呈現凝集塊。

就所分離的 31 株 *E. tarda* 行抗菌劑之感受試驗，結果如表二所示。此試驗成績顯示，所供試之藥物沒有一種對所有試驗菌株完全有效，其中尤以磺胺劑之效果最差，所有試驗菌株皆對 Sulfamethorypyridazine 有抗藥性。對於 Tetracycline, Colistin, Penicillin 及 Polymycin B 等藥物，大部分菌株亦有高度之抗藥性即使感受性較高如：Chloramphenicol, Kanamycin, Nitrofurantoin, 及 Ampicillin 等藥物亦有許多菌株對其有完全的抗藥性。

Table 2. Sensitivity to antimicrobial agents of the 31 strains of *E. tarda* isolated from diseased eels

| Antmicrobial agents | Sensitive | | | Resistant |
|------------------------|-----------|----|----|-----------|
| | +++ | ++ | + | - |
| Ampicillin | 5 | 10 | 6 | 10 |
| Kanamycin | 3 | 19 | 3 | 6 |
| Nitrofurantoin | 4 | 14 | 3 | 10 |
| Neomycin | 2 | 5 | 15 | 9 |
| Streptomycin | 2 | 3 | 11 | 15 |
| Chloramphenicol | 8 | 6 | 3 | 14 |
| Tetracycline | 2 | 1 | 4 | 24 |
| Colistin | 0 | 0 | 5 | 26 |
| Polymycin B. | 0 | 1 | 11 | 19 |
| Penicillin | 1 | 2 | 5 | 23 |
| Sulfamethory-pyridazin | 0 | 0 | 0 | 31 |

罹患本病之病鰻可分為以肝臟病變為主或以腎臟病變為主的二種病型。幼鰻感染本病絕大多數皆呈現肝型病徵；中鰻或成鰻感染則兩型之出現率大致相當，但其中重篤者則可同時見肝及腎臟之病變。

肝臟受本菌侵犯而引起大小不等之多發性液化壞死灶。壞死區常伴隨明顯之出血而與周圍之正常組織界限分明。幼鰻腹壁菲薄，從外表即可見病變（圖 2）。肝臟之壞死灶常致使肝表面破潰而引起腹膜炎，患部與腹膜粘連並波及腹壁之肌肉層而使肌肉崩解，並穿孔而與外界交通（圖 3、4、5、6）。肝臟因之而裸露在外（圖 3）。病原蔓延至肌肉時，呈現明顯之炎症反應，外觀上紅斑疊疊，一旦潰瘍則在潰瘍部周圍繞以紅色圓暈狀之炎症帶（圖 3、4）瀕死期之病鰻可因敗血症而致全身性充血、出血，尤其體軀、胸鰭及腹鰭部位之發紅為顯著之外觀病徵（圖 3、4）。

腎臟型病鰻則於腎臟，特別是後腎，可見明顯之腫脹及多發性化膿灶，並常因破潰而溢出肛門口外，使肛門部呈現顯著之紅腫特徵（圖 4、7）。大多數感染腎臟型病鰻尚可見以腹鰭部為主之充血病徵（圖 3、4、7）。

組織病理學上，本病在實質器官之病變乃以壞死及化膿性炎為主。病原侵入肝、腎之早期以充血及實質細胞之變性，壞死為主徵（圖 8）。壞死區可見中性球浸潤（圖 9）。若細胞反應抵制細菌之增殖，則壞死灶更形擴大，實質細胞及炎症細胞遂呈溶解而液化，甚而有終成範圍較大之膿瘍灶（圖 10、11），一旦由實質表面破潰則蔓延於腹腔，再侵及軟組織，甚或腹壁肌層。在軟組織，因組織結構疏鬆且富含血管，故病變區常見出血及纖維素性炎（圖 12）。肌層內組織之溶解甚快，鏡下可見肌層呈壞疽灶，除組織壞死外尚有大量之細菌菌塊堆聚其間（圖 13）。

感染本病之鰻魚，偶而可見壞死性或纖維素性腸炎，惟顯著之腸炎病例並不多見，往往僅呈胃腸卡他兒之病徵而已。

討 論

許多魚類傳染病的發生，有明顯的季節差異⁽¹²⁾。本病在疫情上亦顯示1至4月是屏東地區最重要的流行季節在本研究室所檢驗病例68.4%的病例集中在這個季節裏。*E. tarda* 於14°C以下之水溫環境發育不良，因此，本病在有些國家被認為是一種高水溫期的魚類細菌性疾病，並以夏季為流行之頂峰^(5,6,13)。由於屏東地區地處熱帶氣候，即使冬季，平均溫度亦達18°C，所以養殖鰻仍然可以感染本病。又急劇的溫度變異造成緊迫而使魚體易於感染疾病^(12,14)。1至4月間正是屏東地區氣溫最不穩定的時候。寒流侵襲時溫度急劇下降，但隨之又迅速回升。即使平時，日夜溫差也很大，常超過10度以上。一旦水溫改變劇烈時，魚體因緊迫而影響代謝機能並降低免疫反應時，就很容易蒙受病原之侵害了。本報告統計潰瘍病之季節發生頻率與林(1977)⁽¹⁵⁾等對臺灣鰻病之統計分析成果一致。在他們的報告裏發現赤鰓病與潰瘍病以1至4月間之發生頻率最高，一年當中65%集中在這個季節裏。

76例罹患潰瘍病之送檢病鰻中，常見有併發感染現象。冬季時較常見水黴菌之併發感染，而流行期之1~4月間則以赤鰓病及滑動細菌性鰓病為主要併發感染疾病。併發感染往往使得病情複雜而難以治療。養殖戶在病急亂投藥之情況下，不僅疾病不見控制徒浪費龐大之醫藥費用外，還因為使用藥物不當引起病原菌產生抗藥性之嚴重後果。從本中心所得之*E. tarda* 分離株行藥物感受試驗之結果，顯示沒有一種抗菌劑對所有供試菌株有完全的效果；即使較具效力的藥物如氯黴素(Chloramphenicol) 新黴素(Neomycin) 及呋喃劑(Nitrofurantoin)，亦有許多菌株具抗藥性或僅具輕度之感受性而已。其中值得重視的是常用的水產藥物如磺胺劑及 Tetracycline 之效果最差，所有分離株皆對磺胺劑有抗藥性。像這樣盲目地應用抗菌劑，以期控制疾病，我們當心有一天將會找不到一種藥物能有有效的治療魚病^(4,5)。

對於快速診斷分離菌是否屬於 *E. tarda*，本中心應用快速平板凝集反應，皆能獲得滿意之快速診斷效果。分離株經生化性狀同定後證明其特異性達100%。惟免疫血清之製備是以本中心之分離菌株A T 73之O抗原多次免疫兔子後獲得的。究竟此菌株是屬那一種血清型之O抗原，因無標準菌株對照而不明。至於所製備之免疫血清若稀釋至凝集素100倍以下，是否仍然可以與所有之分離菌呈凝集反應，即分離菌是否屬於同一種或那幾種血清型，有待進一步之研究。

罹患本病鰻魚在病變特徵上可分為肝型及腎型。引起此兩型之病原菌經生化性狀試驗皆呈完全相同之反應，然而本菌之不同血清型是否對肝或腎有特別的親和性尚屬未明。*E. tarda* 一向被認為是一種對魚類能產生腐敗作用的病原⁽⁶⁾；在鰻魚方面，肝、腎、軟組織及肌肉等組織之基本病理學反應仍然以組織壞死的中性球浸潤並迅速液化溶解為特徵。病灶區除迅速溶解外，鮮見強烈之炎症反應，當可相信本菌在鰻魚組織仍然以發揮腐敗作用為主。而這種腐敗作用可能與細菌之內毒素有關⁽⁶⁾。

E. tarda 之致病機序如何，仍未被確立⁽⁵⁾。從病鰻之病理變化當可推測可能是這樣的：即平常存在於胃腸道之細菌一旦有機會，如 Stress 緊迫消化不良而引起胃腸卡他兒或其他原發性疾患使魚體衰弱等。則迅速增殖，這時候可能引發胃腸之壞死性或纖維素性炎，繼則病原由門脈循環進入肝臟並再經體循環進入到腎臟。如果本菌果對肝或腎之組織有親和性的話，細菌遂在該組織內大量增殖並引起實質細胞之壞死，壞死區白血球浸潤並迅速液化溶解。一旦肝臟表面破潰則引起腹膜炎並波及鄰近之肌肉組織，使肌肉壞死，腐敗並造成體表潰瘍的病徵。瀕死期之病鰻又可能因大量之細菌及其毒素入侵血流而引致全身性敗血症而快速死亡。當然，本病之真正致病機制如何，實有待將來進一步的研究。

摘 要

自 1977 年 7 月至 1979 年 4 月間，由屏東農專“魚病診療服務中心”蒐集之 76 例養殖鰻潰瘍病 (Edwardsiellosis)，就其疫學、病理學、病原分離及同定等研討資料，提供為本病在診斷及防治上之參考。

本病在屏東地區全年皆可發生，而以 1~4 月間為最嚴重。溫度劇變引起緊迫 (Stress)，相信是在這個季節裏引起本病盛行之主要因素。

經同定為 *Edwardsiella tarda* 之 31 分離株經行藥物感受性試驗，顯示對所測之抗菌藥物有不同程度之感受性。幾乎所有的分離菌株對常用的水產藥物如磺胺劑及四環黴素均有抗藥性。

感染本病之病鰻常呈現特徵性的軀幹潰瘍；肝或腎特別易於見到液化壞死灶。雖然本病之致病原理尚屬未明，本報告就自然感染例所呈現之病理變化試圖解釋之。

謝 辭

本報告之所以能完成，實感謝農發會 (前農復會) 在經費及精神上支持“魚病診療服務中心”的業務。此外，並對本中心所有同仁二年來的辛勤工作表示敬意及謝意。

參 考 文 獻

1. Hoshina, T. (1962). On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 28: 162-164.
2. Ewing, W.H., A.C. Mowhorter, M.R. Escobar, And A.H. Iubini. (1965). *Edwardsiella*, A new genus of Eenterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. Int. Bull. of Bacteriol. Nomencl. Tax. 15(1): 33-38.
3. Wakabayashi, H., and S. Egusa. (1973). *Edwardsiella tarda*, associated with Pond-cultured eel disease. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 39: 611-616.
4. 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄 (1977). 養殖鰻潰瘍病病原菌 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之分離。JCRR Fisheries Series. 29; 1-6.
5. 江草周三 (1978)。魚感染症 164~172。恒星社厚生閣發行。
6. Meyer, F.P., and G.I. Bullock. (1973). *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus Ounctatus*). Appl. Microbial. 25: 155-156.
7. White, F. H. F. C Neal, C. F. Simpson, and A. F. Walsh. (1969) Isolation of *Edwardsiella tarda* from an Ostrich and Australian skink. J. Amer. Vet. med. Assoc. 155: 1057-1058.
8. Owens, D.R., S.L. Nekson, and J.B. Addison (1974): Isolation of *Edwardsiella tarda* from Swine. Appl. Microbiol. 27: 703-705.
9. Bockemuhl, J., R. Oan-Ural, and F. Burkhart (1971). *Edwardsiella tarda* associated with human disease. Path. Microbial. 37: 393-401.
10. Sonnenwirth, A.C., and B.A. Kallus. (1968). Meningitis due to *Edwardsiella tarda*. Amer. J. Clin. path. 49(1): 92-95.
11. Shotts, E.B., and G.L. Bullock. (1975). Bacterial diseases of fishes: Diagnostic procedures for gram-negative pathogens. J. Fish. Res. Board Can. 32(8): 1243-1247.

12. Meyer, F.P. (1970). Seasonal Fluctuations in the incidence of disease on fish farm. *Am. Fish. Soc. Symp. Special Publication*. 5: 21-29.
13. Hoshina, T. (1962). ウチギの鰭赤病に關する研究。東京水産大學特別研究報告, 6(1) 1-104
14. Robert, R.J. (1975). The effect of temperature on diseases and their histopathologic manifestations in fish. In *Symposium on fish Pathology* (Eds. Ribelin, W. E. and Migaki, G.) Madison: University of Wisconsin press.
15. 林曜松、蕭世民 (1977). 魚池生態環境與魚病關係之研究: (1)臺灣鰻魚疾病之統計分析。 *JCRR Fisheries series* 29; 57-61.
16. 青木宙、江草周三、渡邊力 (1972). 水産養殖における薬剤耐性とR因子。 *Japan J. of Bact.* 27(6): 762-767.
17. 青木宙、渡邊力 (1973). ウナギの養殖池水および腸管より分離された蘇劑耐性菌研究。 *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39(2): 121-130.



Fig. 2. Edwardsiellosis in small eels weighed about 160 fish per Kg. The swollen and necrotic livers can be observed from outside of the body.



Fig. 4. Severe infection of eels with Edwardsiellosis. Note the necrotic lesion involving to the vent and marking hemorrhagic lesion over the body.



Fig. 6. Edwardsiellosis. A well-defined necrotic area in liver. Adhesive peritonitis is caused by direct contact with the diseased liver.

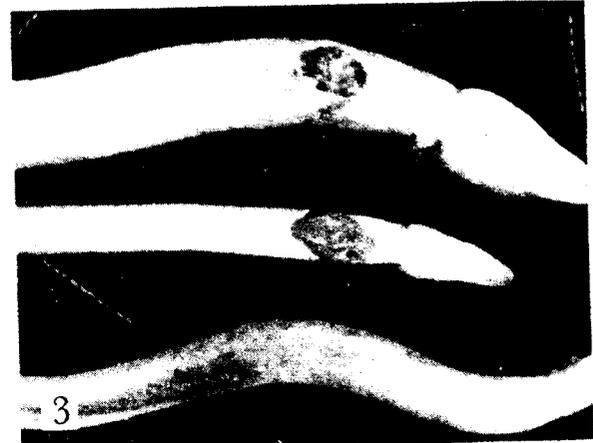


Fig. 3. Edwardsiellosis. Marked perforation of abdominal wall accompanied with prolapse of diseased liver (upper two). The third one shows swollen and inflamed vent due to kidney necrosis. Hyperemia and hemorrhage is usually seen in ventral fin as well as trunk in such case as the result of septicemic Edwardsiellosis.

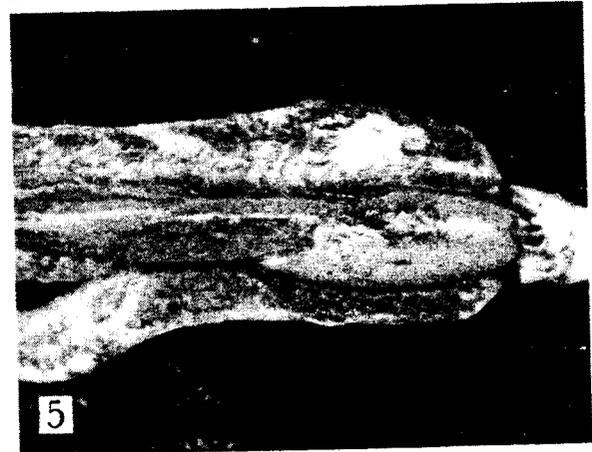


Fig. 5. Rupture of necrotic liver to cause severe peritonitis in case of Edwardsiellosis.

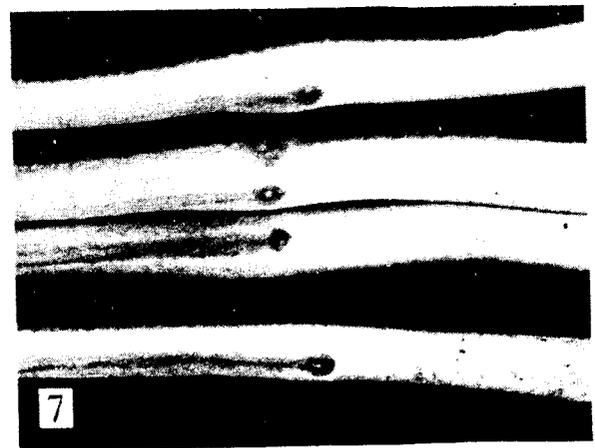


Fig. 7. Edwardsiellosis. Lesions confined to the kidney usually resulting a swollen vent as well as red-fin in appearance.

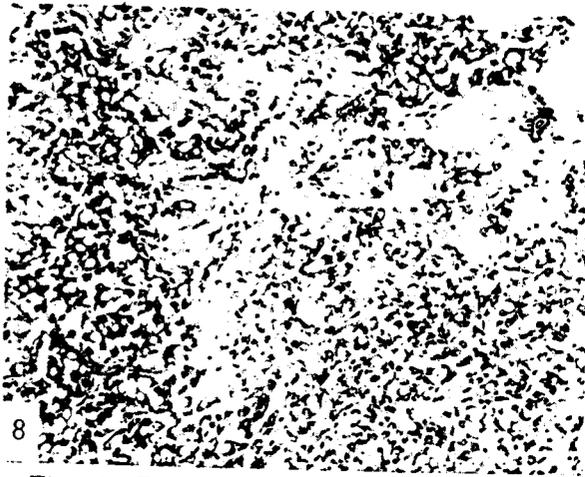


Fig. 8. Edwardsiellosis. Liver. Early stage of necrotic change found in liver without induce cellular response. The remaining cord cells show marked vacuolation and dissociation. H & E. 400X.

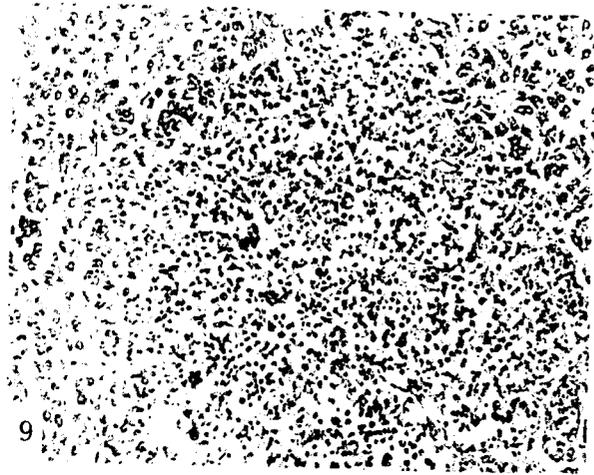


Fig. 9. Edwardsiellosis. Liver. Infiltration of neutrophils is markedly seen in the necrotic area. H & E. 200X.



Fig. 10. Edwardsiellosis. Liver. Massive area of liquefactive necrosis. The remaining prechymatous cells are intact. H & E. 100X.



Fig. 11. Edwardsiellosis. Kidney. Area of liquefactive necrosis. Subductular soft tissue shows marked hemorrhagic lesion (top end). H & E. 100X.



Fig. 12. Edwardsiellosis. Subperitoneal soft tissue. Marked peritonitis with fibrin sheets, tissue debris, extravasated erythrocytes, and purulent exudates accumulation. H & E. 200X.

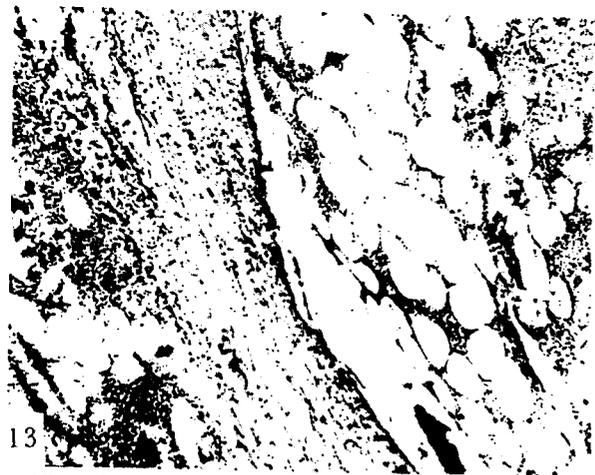


Fig. 13. Edwardsiellosis. Subcutaneous soft tissue associated with hemorrhage. Bacterial clumps are also visible in the necrotic areas. H & E. 100X.