

臺灣發生之鱧魚 *Pasteurella* 菌急性敗血症感染

An Acute Septicemic Infection of *Pasteurella* Organism in Pond-cultured Formosa Snake-head Fish (*Channa maculata* Lacepede) in Taiwan

董明澄·蔡信雄·何莉芳·黃旭田·陳石柱

Ming-Chen Tung, Shinn-Shyong Tsai, Lih-Fang Ho
Shiuh-Tyan Huang and Shih-Chu Chen,

Abstract

In March 1983, an acute bacterial septicemic infection in fresh water pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacepede) outbreak in Pingtung Hsein, Taiwan. The affected fish showed no apparent surface lesions, nevertheless, sudden listlessness and subsequent death at the bottom of the pond were the only clinical feature of the epizootic. The accumulative mortality was as high as 30% (1500/5000). The characteristic bipolarity of bacilli in blood and squash smear of spleen were recognized. Lesions of white, circumscribed areas were scattered throughout the parenchyma of spleen and kidney. Histologically, the acute focal necrosis with vary sizes of bacterial clumps were apparent. Based on the growth characters, morphological and biochemical properties of the isolated bacterium, it was classified into the genus *Pasteurella*. The isolate was sensitive to the most antimicrobial agents tested, and the epizootic was effectively controlled by the medication with chloramphenicol.

The 50% lethal dose of Formosa snake-head fish to this *Pasteurella* isolate was $10^{1.9}$ CFU/ml which indicates the bacterium is highly pathogenic to this particular fish species. The lesions similar to the natural cases was produced together with re-isolation of the inoculated bacterium from the experimentally infected fish.

緒 言

1963年 Snieszko 等⁽¹⁵⁾在美國東部 Chesapeake 灣爆發引起 White Perch (*Roccus americanus*) 大量死亡之罹病魚分離得兩端濃染之 *Pasteurella* 菌，同時亦由 Striped bass (*Roccus saxatilis*) 類死魚分離到相類似之細菌。Janssen 及 Surgalla⁽⁸⁾ 研究檢討該菌之分類學位置後，乃定名為 *Pasteurella piscicida*。日本於 1969 年夏季，發生 Yellow-tail (*Seriola quinqueradiata*) 流行疫，並於翌年蔓延全日本各該魚類養殖場，造成極為慘重之損失，罹病魚以脾、腎等內臟形成多數白色小結節病灶為特徵，在組織學上形成類上皮性肉芽腫，乃定名為細菌性類結節病 (Pseudotuberculosis)^(4,5)，分離菌經

鑑定與美國之 *Pasteurella piscicida* 相同^(9,14)。

其他魚類有：美國 Menhaden (*Brevoortia tyrannus*)，Mullet (*Mugil cephalus*)⁽¹⁰⁾ 及 Striped bass (*Morone Saxatilis*)⁽¹²⁾，英國 Rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) 及 Chub (*Coregonus zenithicus*)⁽⁶⁾，挪威 Brown trout (*Salmo trutta*) 及 Atlantic salmon (*Salmo salar*)⁽⁷⁾，日本 Ayu (*Plecoglossus altivelis*)⁽³⁾ 及 Black seabream (*Mylio macrocephalus*)⁽¹¹⁾ 等亦均有 *Pasteurella* 細菌之感染記載。

本省於 1983 年 3 月間，在屏東縣某鱧魚 (*Channus maculata*) 養殖場爆發 *Pasteurella* 菌之急性敗血感染，茲將研究試驗結果報告於下，以供對本病之防治參考。

材料及方法

1. 疫學及臨床症狀：

1983 年 3 月，在屏東縣某淡水鱧魚養殖場突發大量斃死病例，該場以海魚絞碎為生餌拌和鰻魚飼料蓄養 5,000 尾。該場不同月齡，體長約在 15~30 cm 之全部鱧魚同時罹病，病魚外觀上並無特殊異常，但驟然發生活力衰減、離羣及下沉池底而斃死。該場迄至送檢屏東農專魚病診療服務中心時共死亡 1,500 尾，累計死亡率達 30%。

2. 病理及血液檢查：

罹病魚主要剖檢之肉眼病變為脾、腎等實質器官散發限局性 0.5~1.0 mm 之白色病灶 (圖 1)，肝略腫大褪色。各重要臟器組織經中性福馬林固定，石臘包埋及切成厚度 4~5 μ 切片，以 Hematoxylin 及 Eosin 染色。血液及脾等組織塗抹片，經以劉氏染色液⁽¹⁾染色後鏡檢。

3. 細菌培養、鑑定及抗菌劑感受性試驗：

細菌之分離培養分為兩組進行：即一組於 Brain Heart Infusion (BHI) Agar, Blood Agar (含 5%

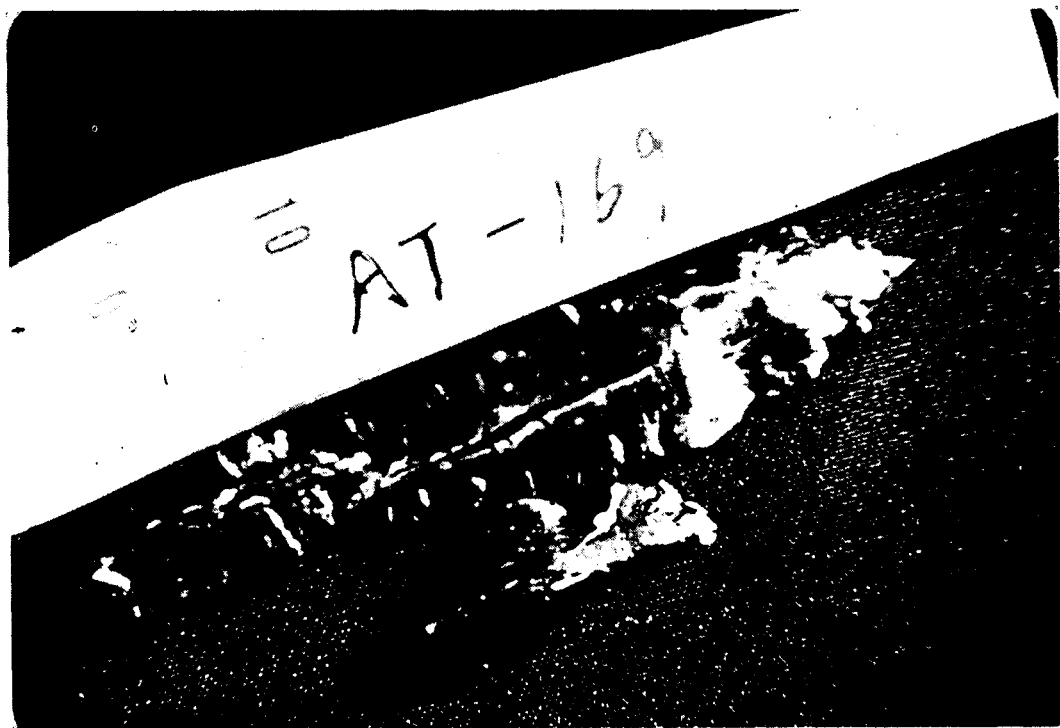


Fig. 1. Multiple, pin-point, white circumscribed spots in spleen and kidney.

山羊 RBC) 及 Trypticase Soy Agar 等培養基中添加 1.5% NaCl, 另外一組則使用一般 Blood Agar (BA), Trypticase Soy (TS) Agar 及 MacConkey Agar。細菌之鑑定則使用 TSI, SIM, MR-VP, Lysine, Simmon's Citrate 等培養基及 11 種不同醣類培養基 (全部培養基均添加 3% NaCl), 測試分離菌之生化學性狀。另以 14 種不同抗菌劑紙錠 (BBL Sensi-disc) 測定其對藥物之感受性。

4. 魚類感染試驗：

全長 14~17 cm 健康鱧魚，經實驗室內飼養觀察一週，並於試驗進行前剖檢 4 尾供細菌分離、血清抗體以及病理組織切片等之檢查，認為無 *Pasteurella* 感染及抗體而正常後，分兩批進行試驗感染。接種用 *Pasteurella* 菌經 BHI broth 在 25°C 增菌培養 18 hr，並行 10 倍連續稀釋之平皿接種試驗法，以計算每 ml 中之菌落數 Colony Forming Unit/ml (CFU/ml)。第一批接種試驗，每組 4 尾鱧魚，以腹腔內接種途徑感染，菌量分別為： $7.5 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^8$ CFU/ml，另外對照組則接種等量之無菌 BHI broth，總共區分為 8 組，第二批接種試驗，除每組接種鱧魚改為 3 尾及接種菌量降低為 $2.5 \times 10^{-1} \sim 2.5 \times 10^2$ CFU/ml 而外，其餘均與第一批相同，對照組亦同前，共分為 5 組。各組之試驗接種魚均分別飼養於水箱內並加以打氣，試驗期間不餵食，全程試驗期間為 16 天。每日除計算其死亡數外，全部試驗魚及對照組之魚，均進行細菌學及病理學血液學之檢查，以為判定感染之依據。

結 果

1. 血液及病理組織學檢查：

染色之血液抹片及脾臟組織擦壓片中均可見多數具有特徵性之兩端濃染性桿菌及部分被吞噬細胞吞噬之細菌 (圖 2)。脾、腎組織病理學之變化為臟器實質部呈限局性組織急性壞死及組織間隙及微血管內散佈大小不等之菌塊 (圖 3, 4)，惟未見有類上皮細胞之肉芽腫之慢性病變。

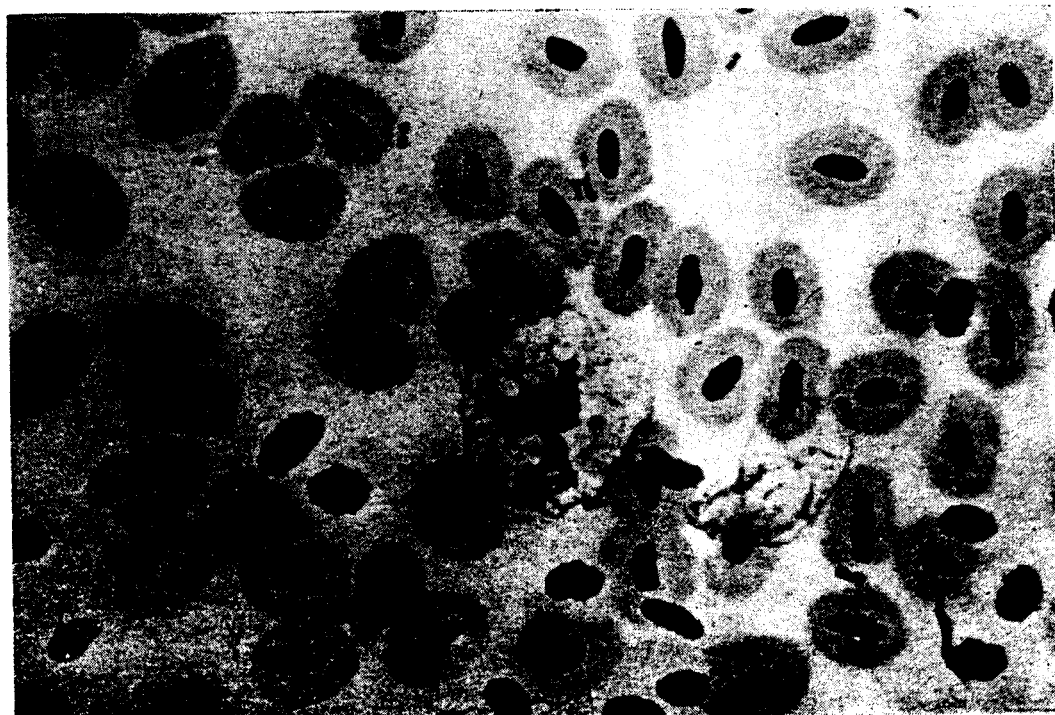


Fig. 2. Blood smear. Liu's stain. $\times 1000$. Note the characteristic bacilli with bipolarity and the phagocyte with multiplying, engulfed bacilli.

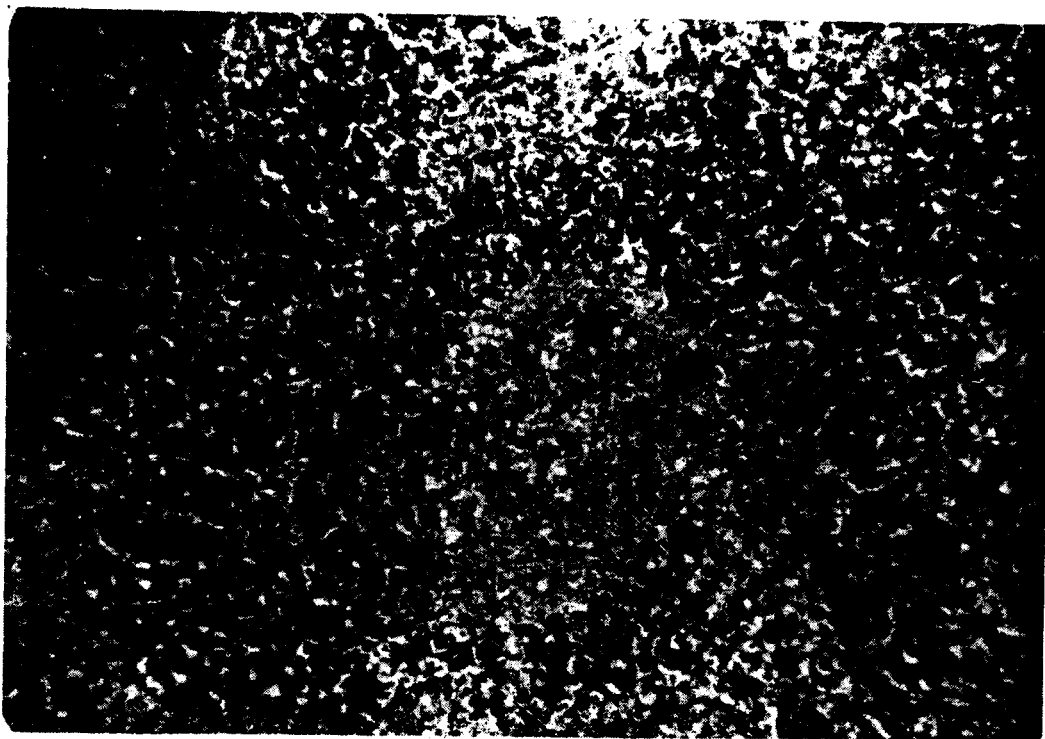


Fig. 3. An acute focal necrosis with many bacterial clumps in spleen parenchyma.

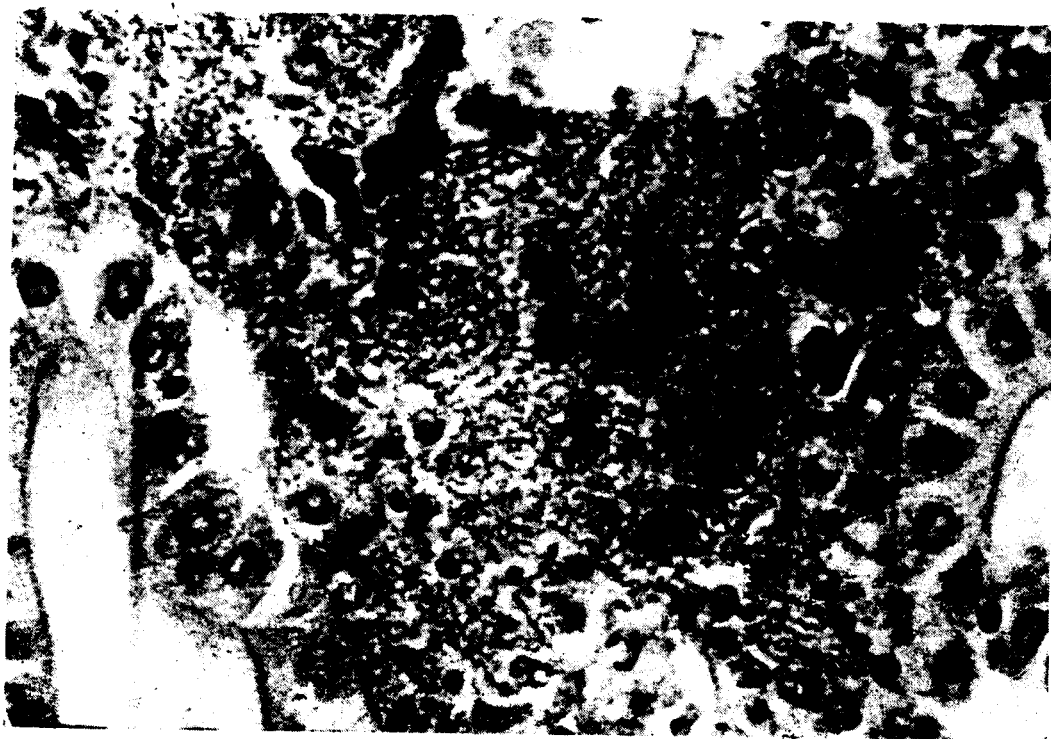


Fig. 4. Mass of bacteria in kidney interstitial tissue.

2. 細菌培養、鑑定及抗菌劑感受性試驗：

本菌之初次分離在 MacConkey 及 TS Agar 上均無發育，惟添加 1.5~3% NaCl 之 BHI, BA 及 TS Agar 則發育良好，形成露滴樣之透明，無溶血之小菌落，不添加 1.5~3% NaCl 之 BA，雖在 48 hr

以後形成稀少之細小菌落，其發育顯然比添加 NaCl 者差。分離菌經以 21 種不同生化學及形態學等性狀鑑定為 *Pasteurella* 菌（表 1）。

抗菌劑之感受性，除少數藥劑如 Bacitracin 及 Erythromycin 無感受性而外，其餘所測試之 12 種抗菌劑均有感受性（表 2）。經處方 Chleramphenicol 口服後即完全控制該病，追蹤結果亦無再發流行。

3. 魚類感染試驗：

鱧魚人工感染試驗（表 3）顯示，鱧魚對本菌之感受性極強，其 LD₅₀ 為 10^{1.9} CFU/ml，對照組未有死亡。接種菌量偏高時，鱧魚發生極明顯之菌血症，但在自然感染病例之內臟所見之白色局限性壞

Table 1. Biological Properties of *Pasteurella* Isolated from Formosa Snake-head Fish

Test	Result	Test	Result
Gram stain	— ^a	Glucose	+
Bipolar stain	+ ^b	Galactose	+
Hemolysis (Goat RBC)	—	Fructose	+
Cytochrome Oxidase	+	Mannose	+
Catalase	+	Maltose	(+) ^d
TSI	R/Y ^c	Lactose	—
Motility (SIM)	—	Sucrose	—
Indole (SIM)	—	Trehalose	—
H ₂ S (SIM)	—	Dulcitol	—
VP	—	Mannitol	—
MR	—	Sorbitol	—
Citrate Utilization (Simmon's)	—		
Lysine Decarboxylase	—		

* All media used were supplemented with 3% NaCl

a Negative reaction

b Positive reaction

c R=Red, Y=Yellow

d Delayed positive reaction

Table 2. Sensitivity to Antimicrobial Agents of the *Pasteurella* isolate

Sensitive	Resistant
Ampicillin	Bacitracin
Chloramphenicol	Erythromycin
Colistin	
Gentamycin	
Kanamycin	
Lincomycin	
Nalidixic Acid	
Neomycin	
Nitrofurantoin	
Penicillin	
Polymyxin B	
Tetracycline	

Table 3. Experimental Infection of Formosa Snake-head Fish to the *Pasteurella* Isolate*

Trial No.	Inoculum ^b (CFU/ml)	No. of Fish			Infectivity (%)
		Tested ^c	Died	Survived ^d	
I	7.5×10^3	4	4	0	100
	7.5×10^2	4	4	0	100
II	2.5×10^2	4	3	1	75
	2.5×10^1	4	2	2	50
	2.5×10^0	3	1	2	33
	2.5×10^{-1}	3	0	3	0
I-C	0	4	0	4	0
II-C	0	3	0	3	0

- a. Infectivity data from those inocula of 7.5×10^1 to 7.5×10^5 CFU/ml are excluded. $LD_{50} = 10^{1.9}$ CFU/ml (Calculated by Reed and Muench Method)⁽¹³⁾
- b. Intraperitoneal inoculation.
- c. Healthy Formosa snake-head fish of 14–17 cm in length.
- d. Trials were terminated at the end of 16th day postinoculation.
- e. Uninfected control.

死病灶則未能觀察到，惟接種菌量較 LD_{50} 略高 (7.5×10^3 , 7.5×10^4 , 7.5×10^5 CFU/ml) 之感染發病斃死魚，則可見有極明顯之菌血症而外，尚形成與自然感染魚病例相同之白色限局性壞死病灶，又接種感染魚均再分離到原接種細菌。

討 論

本菌引起之鱧魚急性敗血症感染，經診斷並分離鑑定為 *Pasteurella* 菌感染，經處方 Chloramphenicol 經口投與後迅速控制該病。本省養殖魚類由本菌引起之感染尚屬首次，而鱧魚感染 *Pasteurella* 在國外文獻亦未曾有記載。

本菌之培養特性，形態學及生化學之性狀與美國 White Perch^(8,15) 或日本 Yellow-tail 感染所分離之 *Pasteurella piscicida*^(4,5,9,14) 比較極為相似，僅有本病例分離之細菌在 MacConkey Agar 不能發育及 Methyl Red 反應陰性而外，其餘均相吻合。另外 Hastein and Bullock 報告⁽⁷⁾ 在挪威由 Brown trout 及 Atlantic salmon 感染之急性敗血症病例共分離 36 株菌，其性狀部分與 *Pasteurella piscicida* 相同，但部分菌株有 Methyl red 及 Arginine decarboxylase 陰性，又數種醣類之分解情形與 *P. piscicida* 略異。鱧魚分離菌尚有部分生化性狀未試驗，有待今後進一步之比較試驗證實及完成其菌種之鑑定。

本菌引起之病變，係以急性敗血症為主之變化，即在腎、脾等吞噬功能特強之實質器官引起急性壞死及大量之菌塊分佈，顯示魚體之吞噬已達飽和而此類防禦無能克服細菌之侵犯，而使該菌於該等組織內大量繁殖，本病例未見有類上皮細胞堆積為肉芽腫或被結締組織包圍之慢性病變。本病例因此與 White perch⁽¹⁶⁾ 及 Yellowtail^(4,5) 之慢性類結節病變有異，與挪威發生之 Brown trout 及 Atlantic salmon⁽⁷⁾ 急性敗血症有近似之處，惟鱧魚之感染未見有體表之水泡、潰瘍及出血等病變，此種病變上之差異是否因不同品種魚類之感受性不同，抑或係各分離菌株之毒性強度及感染途徑不同而造成，則有待日後再探討。

本菌之培養必須添加食鹽以促進其發育，且常發生於海水魚類或飼餵海產生餌有關⁽²⁾，本病例之發生其來源可能亦來自污染該菌之海產下雜魚餌料，由於受檢之時已無法採得餌料樣品而無法證實，惟經

以抗生素治療控制，且改善其飼料後追蹤觀察未再感染之情形推測，顯然海產下雜魚之污染為本病之傳染源，因此採用生海產魚為餌料應注意防範該魚餌可能媒介之各種疾病。

摘 要

1983年3月，在屏東縣某淡水鱧魚養殖場爆發細菌性急性敗血症感染。病魚在外觀上並無特殊異常，惟驟然發生活力衰減，離羣下沉後斃死。該場到送檢為止之累計死亡率高達30%(1500/5000尾)。罹病魚染色血液抹片及脾臟塗壓片中可見特徵性兩端濃染桿菌。主要肉眼病變在脾、腎等實質器官散發針頭大小之限局性白色病灶，組織病理學上呈限局性急性壞死病變及散在大小不等之菌塊。根據分離菌之培養特性、形態及生化學性狀，乃鑑定為 *Pasteurella* 菌。分離菌對多數抗菌劑有感受性，並經 Chloramphenicol 投與後完全控制。

本菌對鱧魚之人工感染試驗結果，其50%致死量為 $10^{1.9}$ CFU/ml，顯示本菌對鱧魚具有相當高之病原性。接種魚除出現與自然發生例相同之病變而外，亦再分離到原接種菌。

致 謝

本研究之完成承蒙農發會之資助 [CAPD 72-農建-41-產-73-(10)]，謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. 劉禎輝。Personal communication。
2. 江草周三 (1978)。魚の感染症，pp. 177-187。恒星社厚生閣，東京。
3. 楠田理一、三浦航 (1972)。養殖アユから分離された病原性 *Pasteurella* 菌の性狀について。魚病研究，7: 51-57。
4. 楠田理一、山岡政興 (1972)。養殖ハマチの細菌性類結節症の病原菌に関する研究——I. 形態學的ならびに生化學的性狀による種の同定。日水誌，38: 1325-1332。
5. 窪田三朗、木村正雄、江草周三 (1970)。養殖ブリ稚魚の細菌性類結節症の研究——I. 病徵學及び病理組織學。魚病研究，4: 111-118。
6. Ajmal, M. and B. C. Hobbs (1967)。Species of *Corynebacterium* and *Pasteurella* isolated from diseased salmon, trout and rudd. Nature, Lond. 215: 142-143.
7. Hastein, T. and G. L. Bullock (1976)。An acute septicemic disease of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) caused by a *Pasteurella*-like organism. J. Fish Biol. 8: 23-26.
8. Janssen, W. A. and M. J. Surgalla (1968)。Morphology, physiology and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). J. Bacteriol. 96: 1606-1610.
9. Koike, Y., A. Kuwahara and H. Fujiwara (1975)。Characterization of "*Pasteurella piscicida*" isolated from white perch and cultivated yellowtail. Jap. J. Microbiol. 19: 241-247.
10. Lewis, D. H., L. C. Grumbles, S. McConnell and A. I. Flowers (1970)。*Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay. J. Wildl. Dis. 6: 160-162.
11. Muroga, K., T. Sugiyama and N. Ueki (1977)。Pasteurellosis in cultured black seabream (*Mylio macrocephalus*). J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ. 16: 17-21.

12. Paperna, I. and D. E. Zwerner (1976). Parasites and diseases of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), from the lower Chesapeake Bay. *J. Fish Biol.* **9**: 267-287.
13. Reed, L. J. and H. Muench (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.
14. Simidu, U. and S. Egusa (1972). A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38**: 803-812.
15. Snieszko, S. F., G. Bullock, E. Hollis and J. G. Boone (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay Tide water areas. *J. Bacteriol.* **88**: 1814-1815.