

鰻魚愛德華氏病之人工接種試驗及其致病機制之研討

STUDIES ON PATHOGENESIS OF EDWARDSIELLOSIS IN EXPERIMENTALLY-INFECTED EELS

簡茂盛 • 劉正義

Abstract

Studies on pathogenesis of Edwardsiellosis were performed in eels experimentally infected with *Edwardsiella tarda*, by means of bathing or oral method under different conditions. The presence of typical histopathological lesions and the distribution and concentration of the bacteria in internal organs of these inoculated eels at subsequent intervals after infections had been conducted to measure the pathogenesis of the disease.

In the bathing group (water contained *E. tarda* 10^6 CFU/ml). There were no death terminated during the bathing period in both subgroups of skin-intact and skin-cutting eels. only small amount of *E. tarda* were isolated from some organs of the eels without showing histopathological lesions. While in the subgroup of a combination of skin-cutting and intramuscular injection (*E. tarda* 10^6 CFU/ml), all the experimental eels died beginning from 12 hrs after I. M. injection and showed an extensive tissue distribution and high concentration of the *E. tarda*. The eels inoculated with lower concentration of *E. tarda* (10^4 CFU/ml) had less mortality but showed typical lesions of Edwardsiellosis.

The oral inoculation was performed to each eel by introducing the commercial feed mixed with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) once per day for several days. The mortality of the inoculated eels (15-20 g in body weight per eel) was 25%. No mortality was noticed in larger eels (70-80g in body weight per eel). Four days after inoculation, the bacteria could be reisolated from blood and several internal organs. This phenomenon pointed out a bacteriemia status and a wide distribution of the pathogens in these inoculated eels. Besides, the typical lesions of Edwardsiellosis found in parenchymatous organs, the small intestine also showed the figures of catarrhal to fibrinous enteritis in most of the inoculated small eels. Although without mortality, varying degrees of histopathological lesions and less extensive distribution and lower concentration of the *E. tarda* were noticed in the larger eels.

The results of this experiment presume that oral route might be the most important portal entrance of *E. tarda* to cause Edwardsiellosis than other infection route. It is also assumed that young eels are more susceptible to *E. tarda* infection than older ones.

緒 言

愛德華氏病 (Edwardsiellosis)，是養殖鰻重要的細菌疾病，據林等 1977 對臺灣養殖鰻疾病之統計分析報告中指出，愛德華氏病單獨發生或與赤鰭病 (*Aeromonas hydrophila*) 混合感染病例，佔所有引致鰻魚死亡的疾病的 37%，高居首位 (林等, 1983; 林等, 1977)。在日本，江草 1976 亦報告，愛德華氏病是日本養殖鰻最重要的細菌性疾病之一 (Egusa, 1976)。本病之病原菌由 Sakazaki 和 Murata 在 1959 年首先發現，而後陸續由 Hoshina, Ewing, 及 Wakabayashi 及 Egusa 等研究並證實 *Edwardsiella tarda* 乃引致愛德華氏病之主因。

有關本病及其病原菌之研究報告很多，特別是關於細菌之分離、鑑定、治療。及許多血清學研究和螢光抗體診斷等方面，已有良好之研究成果；惟其致病機制及組織病理學方面之研究則較欠缺。保科 1962 及伊藤 1979 等臆測體表之傷口及胃腸道為其可能之感染途徑。Roberts (Roberts, 1978)，則認為其可能之感染途徑是由皮膚潰瘍開始，由外向內入侵造成腹膜炎後再波及內臟器官。劉與蔡 1980 自病理變化推測，病原菌可能係在於胃腸道之機會性細菌，當宿主因外在因素使抵抗力減弱時，而後則趁機經門脈循環及體循環 (菌血症期) 進入肝臟及腎臟等實質器官，再增殖且破壞實質細胞，引起壞死灶。壞死灶破潰而呈腹膜炎，並波及體軀而顯現外表之潰瘍病徵。愛德華氏病之致病機制可能不如想像中之單純，水環境中錯綜複雜之理、化及生物因素可能係其外在之素因 (predisposition)，而鰻體先天及後天之抵抗力亦與感染是否引致典型之病變有關。本研究係以人工感染方式，採用較接近自然感染之不同條件及經體表和胃腸道等不同途徑接種本病病原菌。經感染後不同時間自體內各器官分離並測定細菌數，並以器官之組織病理變化來瞭解病原菌對鰻體之危害，以探討鰻魚愛德華氏病病原之致病機制。

材 料 與 方 法

(一)、供試鰻魚：

購自鹿港地區某養鰻場，大小為每尾體重 70~80g 及 15~20g 二種，飼養在 80. × 60. × 50. cm 大並附有打氣裝置之塑膠水槽中。試驗前由供試鰻隨機取樣自尾靜脈抽血，分離血清，依 Gibbs 等方法 (Gibbs, 1969) 行快速平板凝集試驗，證明為未曾感染魚後，先行放置七天，並曾用 Nitrofurazone 2ppm 或 Formaldehyde 20ppm 於第三天浸浴 24 小時，而做為本實驗之供試鰻。在整個試驗期間，所有供試鰻均無餵飼。

(二)、供試菌株：

以鹿港地區養鰻池之愛德華氏病自然感染病例所分離之菌株，經生化鑑定為 *Edwardsiella tarda* 後，用 Nutrient agar (Difco) 保存，標號 HAC-29，做為供試菌株。試驗前將本菌株用 Tryptose soy (TS) broth (Difco) 於 37°C. 24 小時培養後，其發育濃度為 1.0×10^9 CFU/ml，並用供試鰻 (70.~80. g/尾) 行人工腹腔接種，並重覆接種及回收三次，且其 LD₅₀ 之濃度為 10^4 ~ 10^5 CFU/ml。

(三) 供試菌液之製備：

用 HAC—29 菌株於 37°C 在 T S broth 中培養 24 小時後，用滅菌之生理鹽水 (0.85% NaCl) 稀釋成 10^6 CFU/ml 濃度之菌液，做為試驗中菌浴及肌肉接種等用途。而肌肉接種組又區分成高濃度 (10^6 CFU/ml) 及再以生理鹽水稀釋之低濃度 (10^4 CFU/ml) 組。口服菌液依每 5ml 10^6 CFU/ml 濃度菌液混以 1g 鰻用粉狀完全飼料，以胃導管行人工口服接種。每次試驗所用之菌液皆為新調配之菌液，以維持所需之固定濃度。

(四)、供試菌液之接種試驗：

總數 324 尾 (70~80g/尾 196 尾；15~20g/尾 128 尾) 供試鰻實施菌浴 (A 組) 及經口 (B 組) 二種

人工感染試驗（見表一）。菌浴組是以70公升水量含有*E. tarda*濃度 10^6 CFU/ml之菌液實行菌浴接種，並區分為三個處理分組。A—a為單純菌浴分組，依試驗鰻大小再分兩小組，A—a—1之試驗鰻為70~80g/尾，A—a—2則為15~20g/尾。A—b組之試驗鰻為70~80g/尾，係在菌浴前以冰塊麻醉供試鰻，再自肛門後方之左側體表以刀片割傷皮膚至肌肉層。第三分組（A—C）組亦為70~80g/尾。除皮膚割傷外，並以 10^6 CFU/ml（A—C—1） 10^4 CFU/ml（A—C—2）菌液濃度各注射於背肌內，再施於菌浴。各分組及小組皆有等數目及大小之鰻魚為照組。對照組除菌浴外其他處理與試驗組相同，惟A—C對照組係以T S broth肌肉注射。

經口接種組，則依供試鰻分B—1（70~80g/尾）及B—2（15~20g/尾）二分組。亦先用冰塊麻醉後，自鰻魚口中插入貓之導尿管 Cat catheter（Johnson; 3 FG）而做為胃導管，灌入含有飼料之菌液1.5ml，每日一回，共進行五天，對照組則以 T S broth 1.5ml 取代菌液。所有菌浴及經口

Table 1. Inoculation and Sampling Schedule

Group and subgroup	Number of eesl	Sampling
A (Bathing method)	a { 1 2	Eels died during test or termination by necropsy at 1/2, 1,2,3,4,5,7,10,14,…… 30 days post inoculation.
	b	
	c { 1 2	
B (Oral inoculation)	{ 1 2	

a : (a-1:70-80g in body weight per eel, a-2:15-20g in body weight per eel.)

b: Skin cutting before bathing.

c: Intramuscular injection with 10^6 CFU/ml(C-1)& 10^4 CFU/ml(c-2).

B: (B-1:70-80g in body weight per eel, B-2:15-20g in body weight per eel.)

*: Number in parenthesis is number of control eels in the respective subgroup.

接種之供試鰻，皆自感染後開始觀察，並於接種後12小時、1天、2天、3天、4天、5天、7天、14天等各解剖二尾並採樣行各項實驗。試驗中若供試鰻死亡亦即刻解剖及實驗，試驗結束（接種後30天）所有供試鰻亦行剖檢及採樣實驗。

(五)、試驗鰻內臟器官之 *E. tarda* 分離、鑑定及菌數測定：

當試驗鰻解剖時（包括對照組）或試驗期間斃死之鰻魚，以70%酒精棉花擦拭魚體表面，剖開體腔，以滅菌之白金耳自脾、腎、肝臟鈎菌並培養於 MacConkey agar 上，為測定內臟器官所分離之細菌數，將每尾試驗鰻依無菌操作法量取肝臟、腎臟、及胃腸道各0.5g，脾臟0.3g及靜脈血0.5ml（解剖前自尾靜脈採血）。各臟器分別用滅菌過之研鉢研碎後，加入9倍量之滅菌生理鹽水（0.85%NaCl），混合均勻，使成組織乳劑，然後再以生理鹽水以10倍稀釋法，將之稀釋達 10^{-10} 階段，各稀釋液以微量分注器（micropipet）吸取0.01ml，滴於 MacConkey agar 上並培養於 37°C，24小時後計算菌落數，為鑑定菌落，即將上述之可以菌落配合其對 Cytochrome oxidase 之反應，以確定其屬於腸內細菌科後，再接種於 TSI, SIM 及 Lysine decarboxylase broth 上，若細菌有 glucose 發酵，呈運動性，並產生 Indole，及 Lysine decarboxylase，且由 Urase Test 測知不利用 urca

後，則可初步判定為 *E. tarda*，其餘生化性狀之鑑定依常法進行。

(4)、肉眼及組織病理學檢查：

各試驗組採樣行細菌分離及組織病理學檢查前，先行外表及內部肉眼病理學檢查並記錄可疑之病變。供組織病理學等檢查之標本係採自肝、腎、脾、心臟、胃、小腸、大腸、鰓、接種部位皮膚及肌肉以及具有可視的肉眼病變之組織器官。採樣標本固定於10% Buffer Formaldehyde 溶液中至少二日以上，再經石臘包埋及切片步驟，以蘇木紫—伊紅 (Hemotoxylin—Eosin stain ;H & E) 染色後鏡檢。

結 果

(一)、單純菌浴組 (A—a組)

試驗組 (A—a—1及A—a—2) 和對照組之所有試驗鯉在整個試驗期間均無死亡情形。試驗組於菌浴後12小時，可在試驗鯉之胃腸道及鰓部分離出 *E. tarda*，其細菌濃度為 10^{2-3} CFU/ml，但其餘臟器及血液中均不見本菌，直到菌浴後第5天 (A—a—1) 及第7天 (A—a—2)，才在脾、腎及肝臟等分離出少量 *E. tarda*。對照組則無分離出任何 *E. tarda*。(見表二)。

在肉眼下，除少數試驗鯉外觀呈胸及腹鰭輕度充血外，所有內臟器官，包括鰓部皆無任何病徵，所有檢體鏡下亦無特徵病變。惟少數試驗鯉則可在鰓絲見輕度之上皮細胞增加及粘連 (Fusion)，但不見炎症反應現象。

(二)、皮膚割傷菌浴組 (A—b組)

本組之試驗鯉在試驗期間亦無死亡情形。試驗組之細菌數測定與單純菌浴組相似，於菌浴後12小時可在胃腸道及鰓部分離出本菌，且維持整個試驗過程之 *E. tarda* 濃度 10^{1-3} CFU/ml。其他器官包括血液則菌浴後第3天可於脾臟 (10^1 CFU/ml) 和血液 (10^2 CFU/ml) 及第5天腎臟 (10^2 CFU/ml) 第10天肝臟 (10^1 CFU/ml) 分離到 *E. tarda*。(見表三)。

試驗鯉於皮膚割傷部位並無更進一步惡化而波及附近肌肉組織現象。體表割傷後5日以上之供試驗鯉其傷口已進行癒合，已呈現癒合現象者則可在傷害處見肉芽組織增生現象。鏡下除皮膚割傷部位外，其他臟器皆無任何病灶。

(三)、皮膚割傷、肌肉接種及菌浴組 (C—1; 10^6 CFU/ml; C—2; 10^4 CFU/ml)

高濃組 (A—C—1) 自接種後第2天開始有4尾試驗鯉死亡，第3天死亡5尾，第4、5天各死亡2尾，至第6天全部死亡。低濃組 (A—C—2) 則自接種後第7天有3尾死亡，第9天2尾，第10、11天各1尾，第16天最後1尾死亡。在細菌數測定上 (見表四) 高濃組 (A—C—1) 於接種後12小時，在血液及脾臟所測得的 *E. tarda* 菌數最高，達 10^9-10^{10} CFU/ml，依序為腎臟 10^8 CFU/ml，肝臟 10^7 CFU/ml，以胃腸道最低為 10^3 CFU/ml 惟在試驗鯉死亡前，脾、腎之細菌數目有略為增多而血液之細菌數有下降之趨勢。低濃組 (A—C—2) 之情形在接種後12小時以脾臟測得 *E. tarda* 菌數最多為 10^3 CFU/ml，而後各器官除鰓和胃腸道外，細菌數有逐漸上升之趨勢，至第7天後腎、脾之細菌已增殖達 10^8 CFU/ml，第10天後甚至高達 10^{10} CFU/ml，而肝、血液亦維持在 10^{7-9} CFU/ml 間。

本組試驗鯉在接種後12小時已有近半數呈體表肉眼病變，且幾乎所有試驗鯉都有活力降退，行動延緩或靜止不動之現象，死亡之鯉魚在肛門周圍、胸腹鰭、甚至在軀幹部體表可見明顯之充出血 (圖1)，但並無體表之潰瘍病徵，剖驗後，高濃組之內臟器官，尤其是脾及腎臟以明顯之充血為特徵。低濃組則除充血外，於接種後第9天在脾、腎及肝臟可見大小不等之多發性壞死點。而在第11天，有1尾於肝臟表面可見已破潰之液化壞死灶，並波及腹腔引致纖維素性腹膜炎 (圖2)。組織病理學檢查以實質器官肝、腎及脾臟呈壞死病變為特徵。在脾臟，血液 (Sinusoids) 明顯擴張，聚集大量血液，使得造血細胞數目相對減少，已呈核濃縮及核破裂之造血細胞散佈其間，或部分區域則有局部壞死灶，此外尚可見纖維素性滲出物堆積於小血管外之疏鬆組織 (圖3)。肝臟呈顯著及大小相當一

致之壞死灶，壞死灶中可見細胞之核濃縮、核破裂及核溶解，但無炎症細胞浸潤其間，也無其他之滲出液。除壞死灶外，其他之肝細胞無異常變化。腎臟之造血組織之病變與在脾臟所見大致相同，以造血細胞之壞死為主徵。惟在腎小管可見中度之急性細胞腫脹 (Acute cellular swelling) 的變性現象，部分腎小管腔內堆積少量之脫落細胞碎片 (圖 5)

低濃組有依接種感染後時間之短長而呈漸進性病變之趨勢。接種後四天以內之試驗鰻無肉眼病變，而顯微鏡下亦僅少數可見輕微之實質細胞壞死變化。但第五日以後則病變逐漸明顯，其肉眼與鏡下變化與高濃組大致相同，但炎症反應更為顯著。在脾臟，尚可見具有細胞吞噬作用意義之 Melano-macrophage centers 顯著增加，在肝臟則部分壞死灶已呈明顯之膿瘍 (Abscess) 並圍以結締組織外膜 (圖 4)，破潰之膿瘍造成腹膜炎，病變部肝被膜覆以一層纖維素性化膿性炎症層，大量之菌塊散佈其間，其他肝細胞也可見程度不一之脂肪變性，以及少數病例有肝細胞萎縮、分離及許多嗜伊紅性圓形球滴樣之小體充滿血竇或血竇與肝細胞之間。在腎臟，則壞死灶十分顯著，不僅間質，腎小管亦

Table 2. Distribution and concentration of *E. tarda* in eels after bathing in water contained 10^6 CFU/ml of *E. tarda*.

Organ Days	Spleen	Liver	Kidney	G-I tract	Gill	Blood	Bathing water
1/2	*/-	-/-	-/-	** 2.00/3.00	3.95/2.60	-/-	5.95/3.95
1	‡/§ -/-	-/-	-/-	2.70/2.85	1.48/2.78	-/-	4.30/4.60
2	-/-	-/-	-/-	2.95/2.60	2.60/1.30	-/-	3.70/4.60
3	-/-	-/-	-/-	1.60/3.70	3.70/3.85	-/-	3.60/2.78
5	1.30/-	-/-	1.60/-	2.85/2.60	2.85/3.70	2.60/-	2.48/2.70
7	-/2.90	2.30/-	-/-	3.60/1.90	2.95/2.95	-/-	1.70/1.30
10	1.48/-	-/-	-/1.70	2.70/1.48	1.60/1.00	2.78/2.48	2.95/1.70
14	1.48/-	-/-	2.70/1.48	3.85/2.78	3.70/2.60	-/-	3.48/2.85

* No *E. tarda* was isolated.

** Presented in \log_{10}

‡/§ a-1/a-2 (70-80g/15-20g in body weight)

Table 3. Distribution and concentration of *E. tarda* in eels after skin cutting and bathing in water contained 10^6 CFU/ml of *E. tarda*

Organ Days	Spleen	Liver	Kidney	G-I tract	Gill	Blood	Bathing water
1/2	- *	-	-	3.70	2.78	-	4.70
1	-	-	-	4.60	3.30	-	3.95
2	-	-	-	2.48	2.49	-	5.60
3	1.85**	-	-	2.78	3.00	2.90	3.70
5	-	-	2.90	1.30	1.85	-	2.48
7	-	-	-	2.85	3.78	-	1.90
10	1.70	1.48	2.60	2.60	2090	1.70	3.90
14	-	1.7.	-	2.48	3.70	3.48	1.78

* No *E. tarda* was isolated.

** Presented in \log_{10} .

Table 4. Distribution and concentration of *E. tarda* in eels after skin cutting, intramuscular inoculation and bathing in water contained 10⁶CFU/ml *E. tarda*.

Organ Days	Spleen	Liver	Kidney	G-Itract	Gill	Blood	Bathig water	No. of eel died
1 / 2	9.48/3.85	7.70/1.30*	8.78/2.60	3.48/2.95	4.48/2.30	10.70/2.78	5.85/3.60	0/0
1	# \$ 9.60/4.00	7.30/2.85	9.48/3.48	3.85/2.48	3.85/3.78	10.70/1.67	4.70/2.48	0/0
2	9.30/5.90	8.48/4.48	10.30/5.78	4.48/2.60	3.95/2.48	9.95/3.78	5.48/1.90	4/0
3	10.70/6.30	8.30/3.78	9.70/4.30	3.60/1.30	4.30/1.85	10.30/4.85	5.00/3.70	5/0
4	10.48/6.70	8.60/5.70	9.78/5.95	2.95/3.78	4.60/3.70	9.60/6.78	4.70/2.30	2/0
5	10.00/7.78	8.78/5.78	9.70/5.70	4.95/2.48	3.95/3.60	8.70/5.95	5.60/3.78	2/0
6	10.70/	8.85/	9.48/	4.85/	4.48/	7.00/	4.48/	1/0
7	/ 8.48	/6.95	/8.95	/2.85	/2.00	/6.30	/3.60	/3
9	/10.60	/6.90	/10.85	/4.48	/3.00	/7.95	/2.85	/2
10	/10.70	/7.95	/10.90	/1.30	/2.78	/7.70	/1.30	/1
11	/ 9.85	/6.00	/10.48	/3.78	/2.95	/7.48	/1.00	/1
14	/ 9.60	/6.70	/10.78	/2.85	/4.30	/6.60	/2.70	/0
16	/ 7.48	/5.48	/ 8.30	/2.95	/3.70	/4.30	/1.78	/1

* Presented in log₁₀

#/\$ c-1/c-2 (#=10⁶CFU/ml *E. tarda* \$=10⁴CFU/ml *E. tarda*)

Table 5. Distribution and concentration of *E. tarda*. in eels after oral inoculation with 10⁶CFU/ml of *E. tarda*.

Organ Days	Spleen	Liver	Kidney	G-Itract	Gill	Blood	Bathing water	No. of eel died
1 / 2	- / -	* - / -	- / -	5.85/4.30	- / -	- / -	1.48/-	0/0
1	# \$ - / -	- / -	- / -	2.48/5.70	- / -	- / -	- / 2.78	0/0
2	- / -	- / -	- / -	3.95/5.95	1.30/-	- / -	3.60/4.48	0/0
3	- / -	- / -	- / -	3.70/4.78	- / 2.30	- / -	- / 2.30	0/0
4	- / 2.90**	- / -	- / -	4.70/5.48	- / -	- / 2.85	3.85/2.70	0/0
5	- / 3.85	- / -	- / 2.60	3.78/2.90	2.85/-	- / 2.48	2.95/1.60	0/0
7	1.78 / -	- / -	- / 3.70	1.90/1.00	1.30/3.00	2.90/2.85	- / -	0/0
10	- / -	2.30 / 1.48	2.85 / 3.60	2.60/3.00	- / -	- / 2.70	- / -	0/2
13	/ -	/ 2.60	/ 2.95	/ 2.78	/ -	/ 3.78	/ -	0/2
14	1.90 / 4.95	- / -	2.48 / 3.85	1.61/2.70	- / -	2.70/2.95	- / -	0/1
16	/ 3.30	/ -	/ 3.00	/ 2.90	/ -	/ -	/ -	0/3

* No *E. tarda* was isolated.

** Presented in log₁₀.

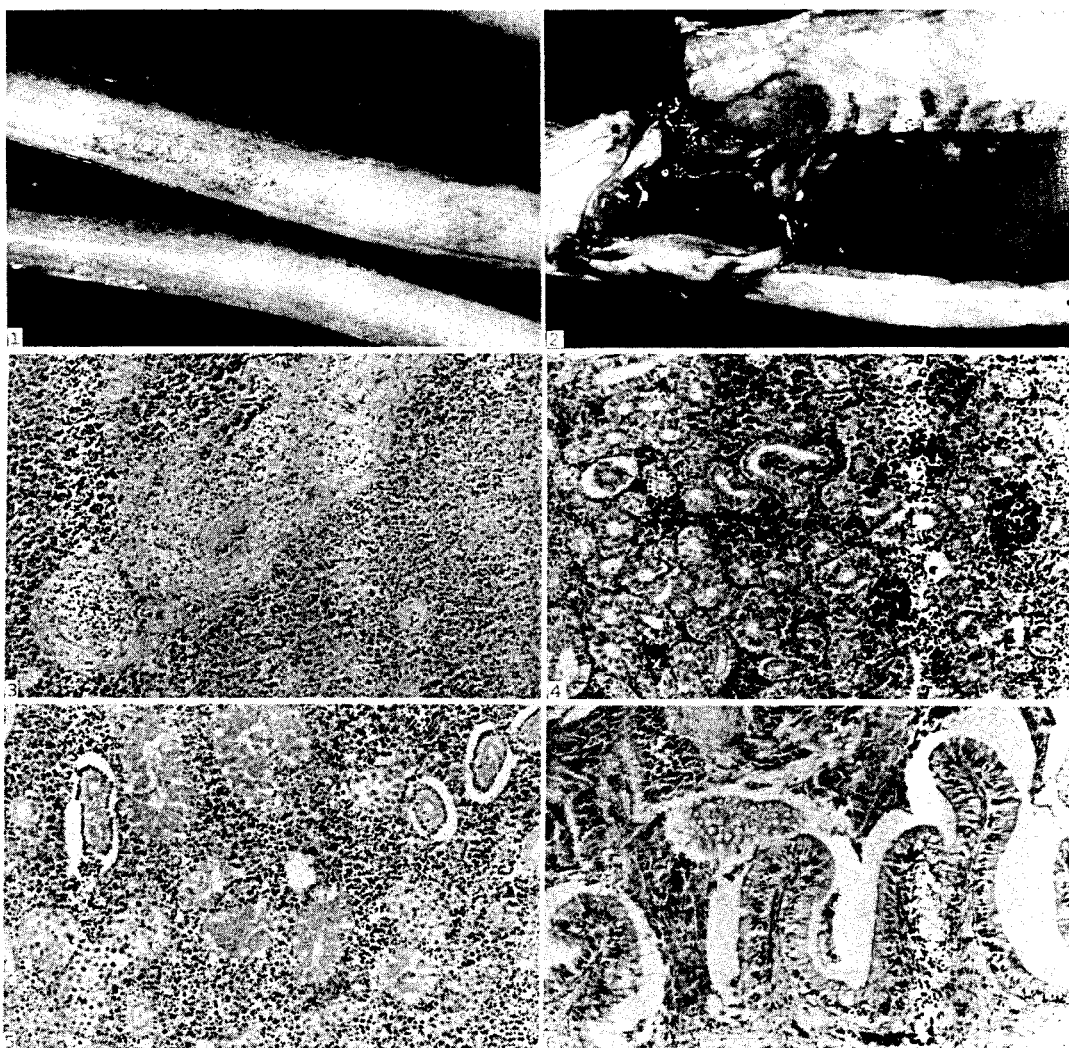
#/\$ B-1/B-2 (70-80g/15-20g in boody weight per eel)

被波及。

(四)、經口接種組 (B—1; 70~80g/尾; B—2: 15~20g/尾)

中鰻組 (B—1) 及其對照組在兩試驗過程中均無死亡; 但幼鰻組 (B—2) 則在接種後第10天及13天各死亡2尾, 14天1尾, 16天3尾, 但其對照組則無死亡情形。在細菌數測定方面兩分組之對照組皆未測出本菌, 但試驗組則在接種後12小時, 於胃腸道可分離出 10^{4-5} CFU/ml *E. tarda*, 但幼鰻組 (B—2) 在接種後第4天及中鰻組 (B—1) 在第7天可在部分內臟器官及血液中分離出 *E. tarda* (見表五)

試驗組不管鰻魚大小 (B—1 及 B—2 組) 在外觀上均無體表病徵, 但幼鰻組自接種後第10天於少數, 特別是斃死鰻見有肝臟之局部壞死灶。組織學檢查發現中鰻組在第5及第10天所解剖的二尾試驗鰻見有輕微的腸卡他, 但其他器官均不見任何病灶。而幼鰻組則自第7天起, 包括8尾斃死鰻在內的13尾試驗鰻, 在肝、脾及腎臟皆有如同前述 (A—C組) 的特徵性鏡下病變, 但程度上較為輕微。此外, 在腸管, 特別是小腸前端, 有部份試驗鰻呈輕微之卡他性腸炎或中等性之纖維索性壞死性腸炎。腸絨毛上皮脫落, 部分腸腺壞死以及被覆以纖維索性炎症滲出物 (圖6)。本試驗組或對照組雖以胃導管注入混以飼料之菌液或 T S broth, 惟並無引致胃粘膜之病變。



- Fig. 1. Eels. One day after intramuscular injection with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and bathing in water contained with the same concentration of *E. tarda*. Showing petechial hemorrhage in body surfaces and marked hyperemia in ventral fins.
- Fig. 2. Eel. 11 days after intramuscular injection with *E. tarda* (10^6 CFU/ml). Note multifocal ulcers (ruptured abscesses) with peritonitis involving the muscle of the ventral wall.
- Fig. 3. Spleen. 5 days after intramuscular injection with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and bathing in water contained with the same concentration of *E. tarda*. Marked focal necrosis was noticed in the parenchyma. The trabecula was widened by distinct edematous fluid rich in fibrin. x160. H & E.
- Fig. 4. Kidney. Intramuscular injection with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and bathing in water contained with *E. tarda* (10^6 CFU/ml). Marked hyperplasia of Melanomacrophage centers. x100. H & E.
- Fig. 5. Kidney. Orally inoculated with *E. tarda* (10^6 CFU/ml). Acute swelling and hyaline degeneration of the renal tubules. The interstitium (hematopoietic tissue) also showed mild necrotizing change. x160. H & E.
- Fig. 6. Intestine. Orally inoculated with *E. tarda* (10^6 CFU/ml). Catarrhal enteritis. Mucus secretion was evidently found in most villi. A few of the villi underwent necrotizing change. The intestinal lumen contained some tissue debris mingled with mucus. x250. H & E.

討 論

有關魚類的細菌感染試驗，一般都採用腹腔或肌肉內注射以探討接種細菌之病原性。惟欲探討其致病機制，則必須使接種感染條件儘量符合自然發病狀態。本試驗以不同條件之浸浴法及經口接種乃期能較客觀的探討本病鰻魚之致病機制。

本病之自然感染病例常在外觀上看到體表之潰瘍病徵 Roberts (Roberts, 1978) 認為其感染途徑是由皮膚開始，由外向內侵入所造成。保科 1962 則認為體表之傷口為其可能之感染途徑之一，且 Mayer (Mayer, 1973) 報告本菌侵犯鯰魚 (Channel catfish) 會造成體側肌肉組織腐爛之現象。本試驗由單純菌浴組及皮膚割傷後菌浴組發現所有之試驗鰻在整個試驗期間皆無任何危害情形。細菌數測定方面，因菌浴量保持較穩定之細胞數，所以其胃腸道及鰓部在試驗過程中皆保持平均 10^{2-3} CFU/ml 之 *E. tarda* 濃度。但是試驗鰻在肝、腎及脾臟等實質器官則只少數且不規則的被分離出少量之細菌。所有試驗鰻並無本病之特徵病變，即使皮膚割傷部位亦無更進一步惡化現象。割傷後第 5 天起反而有癒合情形。

本試驗之肌肉接種後菌浴組顯現最嚴重之危害。以 10^6 CFU/ml *E. tarda* 濃度肌肉注射組在 12 小時後之細菌數以脾、腎、血液等較高，肝臟次之，而以胃腸道最少，此與 Kusuda 及 Ishihara 1981 所做試驗結果相同。所有試驗鰻皆在接種後第 6 天死亡，體內器官之菌數高達 10^8 CFU/ml 左右且實質器官呈壞死灶，可以判定係死於敗血症，但是斃死鰻並無如同自然感染病例之體表潰瘍病灶。若降低攻擊濃度為 10^4 CFU/ml，則試驗鰻可在肝臟見有典型之多發性壞死灶，且破潰並波及腹壁及鄰近之肌肉層。但是肌肉接種部位及割傷部位均不見有任何潰瘍及進一步惡化情形，且經由血液至肝、脾及腎臟後大量增殖並破壞實質細胞現象。根據 Ullah 及 Arai 1983 之報告，本菌有二種皮膚型毒素 (dermatotoxin) 係具有致病性之外毒素 (exotoxin) 對魚類皮膚有強親合性可引致皮膚壞死。是否本試驗接種細菌並不具有皮膚型毒素而有其他毒素則需進一步研究方能確定。然而綜合菌浴各組之病理學變化及細菌數測定結果，則已顯示本病在鰻魚並非經由體表及其傷口為感染途徑似可定論。

在經口接種組方面，幼鰻組（15~20g/尾）於接種後第10天開始至實驗結束共有8尾試驗鰻死亡，死亡率為25%，中鰻組（70~80g/尾）則無死亡，故幼鰻組對經口接種本菌之感受性比中鰻組高。而比較其細菌數，雖然皆於接種後12小時可在胃腸道有平均 10^{4-5} CFU/ml之*E. tarda*濃度，且幼鰻組在接種後第4天於脾臟及血液中分離出本菌，並陸續於肝、腎出現細菌；但中鰻僅能在第7天於脾臟及血液中分離出本菌，其臟器之出現率及菌數均比幼鰻組少且較不規則。在病理變化方面，中鰻組除接種後第5天及第10天所解剖的二尾試驗鰻有輕度之腸卡他外，其他器官均無病變，但幼鰻組包括8尾斃死鰻，共有13尾呈現肝、腎及脾之壞死灶，且其病變程度與細菌數多寡有正性相關。保科1962、伊藤1979、Ishihara及Kusuda 1981等用飼料混合菌浴經口餵食鰻苗（Evers），分別有17%、39.4%及50%的死亡率，Ishihara並認為較大之鰻魚對本菌之抵抗力較強，故致病性有年齡之差異，唯其判定標準是以死亡率來決定其感染與否，並不以病理變化來證明其致病性。這些證據顯示，小鰻對*E. tarda*之感受性強，較易感染本菌而造成重大危害，此與自然感染病例可見幼鰻有災難性之危害是一致的。（劉、蔡1980）

反町等1964研究絕食鰻腸內之細菌消長情形，指出腸內之細菌數會因絕食而漸減。Iida等1984，則認為鰻魚腸內之細菌叢（flora）比例與餵飼之餌料有絕對之相關性，不同之動物性餌料或是一般完全飼料，改變使用時皆會引致腸內各細菌比例之變化。經口接種組與菌浴組之試驗鰻雖然在接種後12小時皆可在胃腸道出現細菌，但是經口組是直接灌入含有飼料之菌液，不僅細菌濃度高而且因有飼料存在，有利於改變腸內正常細菌叢之平衡關係。因此可能導致腸道代謝異常，並破壞腸粘膜而引致腸炎病變，並且有較高濃度之細菌數進入肝臟及其他實質器官以引致該器官之病變。觀之一般較有經驗的鰻魚養殖戶遇天氣突變、換池前後、或是要長程運輸時，皆會停止餵飼，以減少鰻病發生和死亡，實有其科學之憑據。

Iida等1983研究包括鰻魚等5種魚類之血清性質，認為血清中制菌或殺菌之能力對*Vibrio anguillarum*及*E. tarda*二種細菌數效果最差。另Ullah及Arai 1983報告*E. tarda*兼具有adhensins及對抗宿主防禦系統之某種slimes物質，可能和其致病力有關。此外本菌可能具有多種毒素及hemolysin，因此會破壞實質器官引致壞死灶。因此，若由本試驗各組之細菌分佈、細菌數及病變推測，*E. tarda*雖具病原性，但致病力與鰻魚體內細菌濃度有絕對關係，且自然發生病例係經由胃腸道感染，特別是飽食的情況下之鰻魚對於本菌之感受性較高，更有利於本菌之增殖、散播及危害。經由胃腸道之途徑再經門脈及體循環，而在具親合性之實質器官增殖，以破壞實質器官，再因嚴重之實質器官如肝之破潰導致腹膜炎而波及鄰近肌肉層，更進而穿孔而呈體表之潰瘍灶，可能是自然感染病例之感染途徑及其致病機制。

以人工接種試驗探討本病之致病機制難免有人為因素會影響試驗結果，例如選擇之菌株毒力之強弱，感染方式之差異，試驗鰻大小及抵抗力強弱等。本試驗選取之菌株經由三次鰻魚活體接種而提高其致病力，供試驗鰻以血清凝集反應以證明並無感染過本菌，且用胃導管以避免因經口接種菌量差異，以及應用冰塊麻醉以減少因麻醉劑影響細菌數測定等，均在刻意減少人為之差，並期能在較接近自然感染方式下客觀、精確地探討本病之致病機制。惟養殖鰻自然發生病例尚存有許許多多外在因素諸如水環境中之理、化、生物學因素之影響，這些都無法以人工接種試驗予以克服，因此，自然感染病例與人工接種試驗之結果總有一些差異的。

摘 要

利用菌浴及經口感染途徑配以不同條件組合實施鰻魚之*Edwardsiella tarda*人工接種試驗；並以接種後不同時間，在體內各器官所呈現之組織病變，細菌分佈相及細菌數以研討鰻魚愛德華氏病*Edwardsiellosis*之致病機制。

在菌浴方面，於 10^6 CFU/ml *E. tarda*菌浴濃度下，單純菌浴組和皮膚割傷後菌浴組之試驗鰻

均無死亡，雖可於少數臟器分離到少量細菌，但各臟器皆無任何本病典型病徵。惟行皮膚割傷並肌肉注射後菌浴組，可於接種後12小時後於體內各器官分離到高量細菌，且劑量愈高死亡率愈大，以病變而言，注射較低濃度 (10^4 CFU/ml) 之菌液比較高濃度 (10^6 CFU/ml) 呈現顯著的本病典型病變。

經口接種係利用胃導管灌入混有飼料之 10^6 CFU/ml 濃度菌液，在中鰻組 (70~80g/尾) 並無死亡，且其臟器細菌分佈及菌數皆比幼鰻組 (15~20g/尾) 少且較不規則，亦無明顯之病理變化；但幼鰻組則有25%之死亡率，且在接種後第4天可陸續在血液及各臟器中分離出本菌，並可見腸卡他性至纖維索性腸炎以及肝、腎及脾臟等實質器官呈現本病典型之壞死病變等。

從各項試驗結果顯示本病之自然感染途徑可能以經口感染為主要，雖然由體表傷口亦可能感染，但需大量細菌於感染部位增殖以達一定菌量方可引致病害。又鰻魚有年齡愈小對 *E. tarda* 之感受性愈高之現象。

Reference

- 林敏雄、陳秀男、郭光雄 (1983, 臺灣地區魚病研究之回顧, 農發會漁業特刊第九號。魚病研究專集 II。P 1—9。
- 林曜松、蕭世民, (1977)。魚池生態環境與魚病關係之研究 (I), 臺灣鰻魚疾病之統計分析, 魚病研究專集 I。P、57—61。
- 劉正義、蔡信雄, (1980)。臺灣養殖鰻之潰瘍病。農發會漁業特刊第3號, 漁病研究專集 III 抽印本。臺灣水產養殖要覽。1977。漁牧科學叢書 5, 漁牧科學雜誌社編印。
- 伊藤進。(1979)。昭和53年度愛知水試業務報告。P138—141
- 保科利。(1962)。鰻魚赤鰭病之研究。東京水產大學特別研究報告。6 (1) : 1—104。
- Aoki, T, and Kitao, T. (1981). Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish from fish culture ponds. *Fish Pathology*, 15 (3/4): 277-281.
- Egusa, S. (1976). some bacterial disease of freshwater fishes in Japan. *Fish path*, 10 (2): 103-114.
- Ewing, w. H., Mcwhorter, A. C., Escobar, M. R., and Lubin, A. H. (1965). *Edwardsiella* a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *Internatl. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.* 15(1): 33-38.
- Gibbs, B. M. and Skinner, F. A. (1969). Identification method for microbiologist part A. Academic press London and New York.
- Horiuchi, M., Sato, T., Takagi, H., and Tozuka K. (1980). Studies on rapid diagnosis system of main bacterial diseases of pond cultured eels in Japan-- I. *Fish. path.* 15 (1):49-55.
- Horiuchi, M., Sato, T., Takagi, H., and Tozuka, K., (1980). Studies on rapid diagnosis system of main bacterial diseases of pond cultured eels in japan-II *Fish. Path.*, 15(2):63-67.
- Hoshira, T. (1962). On a new bacterium, *Paracolobactum anguillimortiferum* new species. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 28(2):162-164.
- Iida, T. and Wakabayashi, H. (1983) Bactericidal reaction by the alternative pathway of fish complement. *Fish Path.*, 18(2):77-83.
- Iida, T., Yamamoto, A., and Wakabayashi, H. (1984). Changes in intestinal flora of the juvenile eel, (*Anguilla japonica*), after beginning to feed. *Fish. Path.*, 19(3)

- :210-204.
- Ishihara, S. and Kusuda, R. (1981). Experimental infection of elvers and anguillettes with *Edwardsiella tarda* bacteria. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47(8):999-1002.
- Kashiwagi, S., Sugimoto, N. and Matsuda, T. (1980). Chemotherapeutical studies on Furazolidone against Edwardsiellosis in cultured eel. *Fish. Path.*, 15(1):31-36.
- King, B. M. and Adler, D. L. (1964). A previously undescribed group of *Enterobacteriaceae*. *Amer. Jour. Clin. Path.* 41:230-232.
- Kusuda, R. and Ishihara, C. (1981). The fate of *Edwardsiella tarda* bacteria after intramuscular injection of eels (*Anguilla japonica*). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47(4):475-479.
- Liu, C. I. (1981). The pathology of the major diseases of eel in Taiwan. NSC Symposium Series. No. 3.
- Liu, C. K. (1981). A study on the application of Neomycin sulfate for diseases of cultured eels. NSC Symposium Series. No. 3. p. 123-128.
- Liu, C. K. (1983). Evaluation of Trimethoprim and Sulfonamide in bacterial diseases of eels. NSC Symposium Series. No. ISSN p. 88-92.
- Meyer, F. P. and Bullock, G. L. (1973). *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Appl. Microbiol.* 25(1). p. 155-156.
- Miyazaki, T. and Egusa, S. (1976). Histopathological studies of Edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anquille japonica*)-I. Suppurative intersital nephritis. *Fish. Path.*, 11(1):33-43.
- Miyazaki T. and Epusa, S. (1976). Histopathological studies of Edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)-II. Suppuratitits. *Fish. Path.*, 11(2):67-75.
- Miyazaki, T. and Egusa, S. (1976). Histopathological studies of Edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)-III. Elvers and anguillettes. *Fish. Path.*, 11(3):127-133.
- Miyazaki, T. (1980). Histopathological study on bacterial infections in fishes. *Bull. Fish. Mie univ.*, No. 7. p. 63-149.
- Roberts, R. J. (1978). *Fish Pathology*. Bailliere Tindall London. p. 190.
- Sakazaki, R. and Murata, Y. (1962). The new group of the *Enterobacteriaceae*, the Askusa group. *Japn. Jour. Bacteriol.* 17:616-617.
- Sakazaki, R. (1965). A proposed group of the family *Enterobacteriaceae*, the Asakusa group. *Inter. Bull. Bacteriol. Nomen.Taxon.* 15(1):45-47.
- Sakazaki, R. and Tamura, K. (1957). Priority of the sepecific epithet *anguillimortif-*