

產氣單胞菌之病人分離株對養殖鰻的人工感染實驗

簡肇衡 林宗賢 賈愛華

國立陽明醫學院
生理研究所

以由腸炎病人分離之氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 菌株，對人工養殖鰻 (*Anguilla japonica*) 行人工接種試驗。其結果發現對健康鰻並不引起發病，若將實驗鰻禁食兩個月，則可誘導發病。經注射法所引發的病鰻，病原菌主要侵害皮下組織，肌肉組織引發劇烈出血性炎，病原並由血行擴展到血管，脾，腎，造血組織及肝臟引發血管炎造血組織萎縮及紅血球壞死肝脂肪變性等。由人體分離之病原菌與由病魚體分離之菌株，生化特性有差異，但其病理變化與自然經皮膚感染的病鰻相同，唯腸道無病灶。試驗感染之鰻血清滲透壓下降，鈣離子濃度上升，可能與肝，腎功能低下有關。

前 言

Aeromonas hydrophila 是一種條件性病原菌，在養殖鰻會引發嚴重的赤鰓病，造成很大的損失。可自魚體分離具強病原性及弱病原性的菌株(Lallier *et al.*, 1984)，當鰻受到 *Edwardsiella tarda* 與 *A. hydrophila* 兩種細菌混合感染時會提高發病率，當水中環境含氮廢物提高時，與含氮廢物低的比較其死亡率會提高 (Huang and Lin, 1986)。在鱸魚發現 *A. hydrophila* 產生的內毒素會縮短 prothrombin time，使得血液凝固作用發生改變 (Miller and Levin, 1984)，注射 *A. hydrophila* 到鯉魚觀察其組織生理及初級免疫變化的研究發現，抗原隨循環最初出現在脾臟的橢圓體 (ellipsoids)，頭腎及後腎，隨後擴散分佈至全身，抗體在第 9 天開始顯著增加，並於 15 天後達到顛峯 (Lamers, 1986)，*A. hydrophila* 可在不同的魚種，包括香魚、鮭、鯉、鯰、鱧等引起出血性敗血症，此外蛙、爬蟲類、哺乳類甚至人都有受 *A. hydrophila* 感染的報導 (Trust *et al.*, 1987)，臺灣近來親水性氣單胞菌在臨床上的分離率已高達百分之一點三，且長庚醫院的檢驗結果，更高達百分之三，國外很少超過百分之一 (蔡等, 1989)。而本研究採自魚及人所分離到的菌株對鰻試行接種，觀察其發病機轉，血液、組織之病變並比較自然感染病鰻之病理加以報導。

材料與方法

菌的來源由腸炎病人分離 (陽明醫學院微免所胡小婷副教授、蔡文城教授提供)。將菌種在 TSB (tryptic soy broth) (Difco Co.) 中，室溫下培養一個晚上後，先用 McFarland standard 標準比濁液對等比出菌液的大約濃度後，自菌液中取 0.02 ml 加 1.98 ml 無菌水作 100× 稀釋，再取稀釋液繼續作 100× 稀釋，如此可得 10⁻⁶、10⁻⁸ 兩種倍數，再自 10⁻⁶ 管中取菌液作 10 倍稀釋得 10⁻⁷ 管，最後由 10⁻⁷、10⁻⁸ 兩管中各取 0.1 ml 菌液滴在 TSA (tryptic soy agar) (Difco Co.) plate 上以無菌玻璃棒塗開室溫下培養一個晚上，以算出原液中的 CFU (colony forming unit)。在稀釋 10⁻⁸ 倍的平板上有菌株 17 顆，在稀釋 10⁻⁹ 倍的平板上有菌株 6 顆，表示原液中 *A. hydrophila* 有 1.7×10⁹ CFU/per ml。此菌接種前及發病後，由患部及內臟再分離，以 EB-20 kit 作生化反應實驗。

細菌鑑定：以傳統法鑑定、保存，要使用前再以 ID test EB-20 kit (日水製藥株式會社) 鑑定。鰻魚 (160-240 gm 不等) 買回後先在實驗室馴養 3-5 天，以皮上注射的方式，分別注射菌液 (原

液以滅菌過的生理食鹽水 0.85% NaCl 稀釋) 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU 及滅菌過的生理食鹽水當對照組。經 3 天後，將實驗魚冰浴並由體軀幹穿刺採血，兩星期後，犧牲並採血（由心臟），內臟取出以 Bouin 液固定，石臘包埋 (Shandon Citadel 1000)，另一組成鰻 (160-240 gm 不等) 在饑餓兩個月後，分為對照組與實驗組，實驗組分別以 10^6 及 10^8 CFU/per ml 注射於發病後採血作血液抹片，發病第五天採血並犧牲取出內臟組織及患部，用 Bouin 液固定，經石臘包埋後做成切片，以 Giemsa 及 H-E 染色觀察並照像，血液則量鈣離子濃度 (Calcette-Automatic Calcium Analyzer Precision system) 及 Osmolality (Multi-Osmet computerized Microosmometer)。

結 果

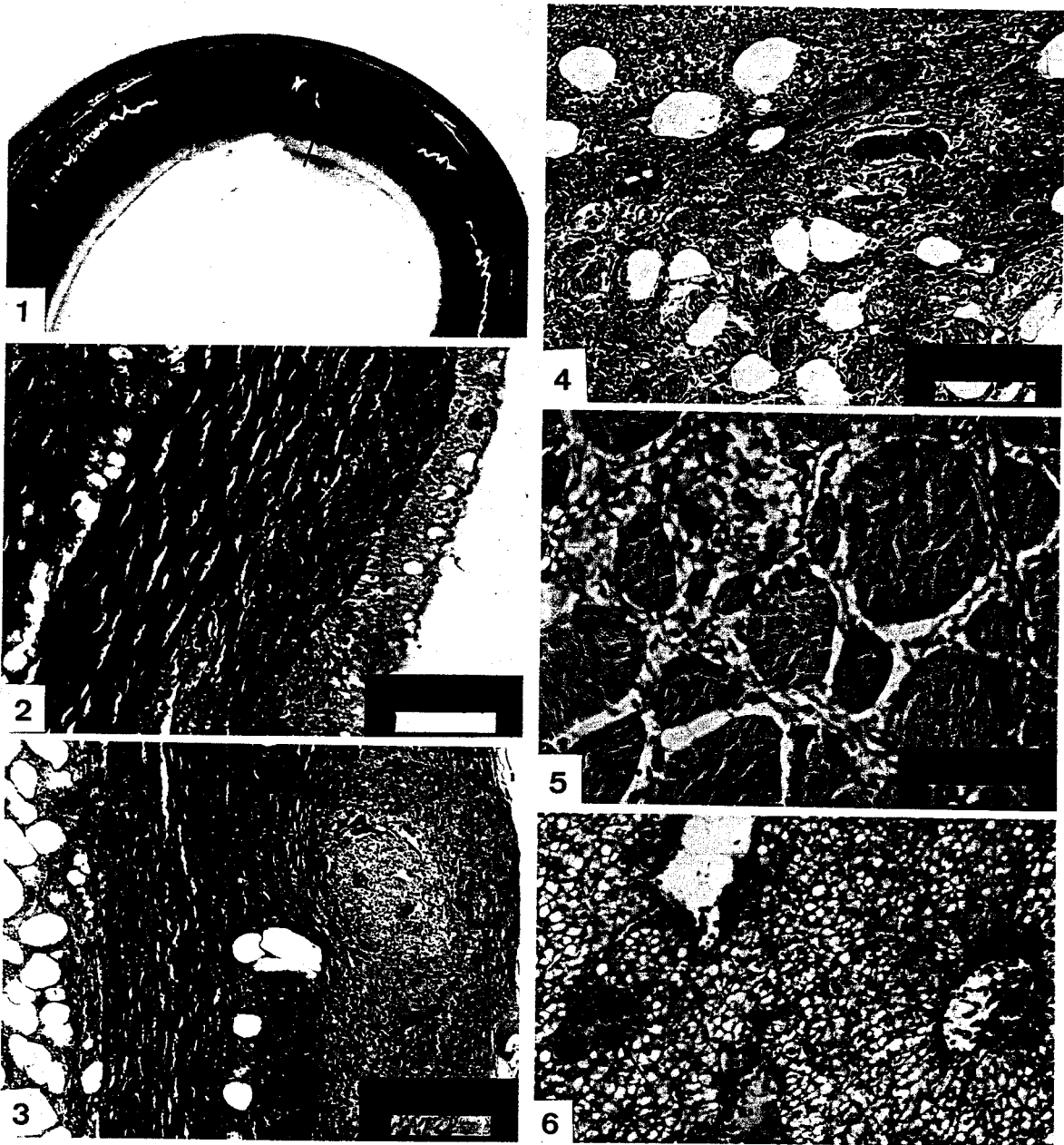
A. *hydrophila* 由病人所分離到的與由病鰻 (Fig. 12) 所分離的病原株其生化特性有差異 (表一)。

表一 由病人與病鰻分離出的 *A. hydrophila* 生化特性之比較

Character	Response	
	Patient	Trout
production of		
H ₂ S	—	—
Indole	+	+
lysine decarboxylase	—	+
arginine dihydrolase	+	+
ornithine decarboxylase	—	—
β-galactosidase	+	+
degradation of		
aesculin	+	+
urea	—	—
V-P reaction	+	+
utilization of sodium citrate	+	+
production of acid from		
maltose	+	—
adonitol	—	—
inositol	—	—
raffinose	—	—
rhamnose	—	—
sorbitol	—	—
sucrose	—	—
mannitol	—	—
arabinose	—	+

組織病理學之觀察

沒有饑餓處理過的鰻，經注射菌液，並沒有顯著的外部症狀，亦無明顯的病灶。饑餓後經注射 10^6 , 10^8 CFU 菌量產生明顯病灶的鰻 (Fig. 1)，生成一周邊皮膚稍白擴大的血斑，隨時間的延長而變大，



- Fig 1. An eel with *A. hydrophila* injecting lesion (arrowed).
- Fig 2. Subdermis with severe hemorrhage and a petechiae on epidermis. H-E $\times 100$
- Fig 3. An infected lesion, epidermis ulcer, in the stratum spongiosum, the stratum compactum and hypodermis severe hemorrhage. H-E $\times 100$
- Fig 4. Infected fatty tissue and musculature. There are degeneration of musculature, haemorrhage and fibrin precipitation. H-E $\times 100$
- Fig 5. A skeletal muscle necrosis lesion and lymphocytes infiltration between the perimysium. H-E $\times 200$
- Fig 6. Severe fatty liver, an inflammatory lesion (left arrowed) and the wall of hepatic vein with lymphocytes infiltration (right arrowed). H-E $\times 200$

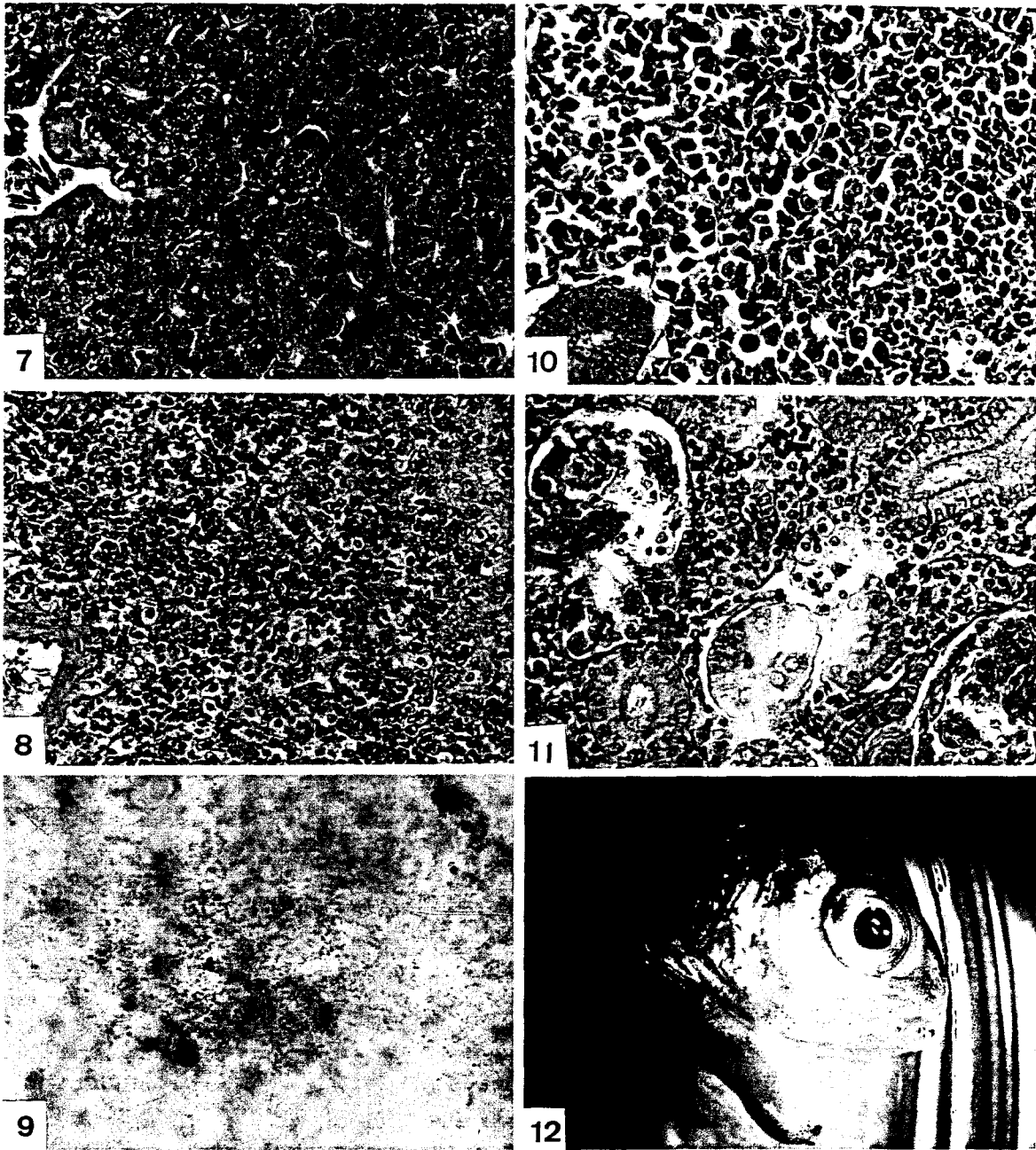


Fig 7. Control fast eel it's liver hepatic cells a little fatty degeneration and atrophy. H-E $\times 200$

Fig 8. Infected spleen red pulp. splenic cells and red blood cells necrosis were observed. H-E $\times 200$

Fig 9. Bacteria multiply extensively in the red pulp and sheathed tissues. GS $\times 1250$

Fig 10. Kidney haematopoietic tissue atrophy in the left lymphocytes and proliferation area in the right. H-E $\times 240$

Fig 11. Glomeruli and renal tubules necrosis. H-E $\times 240$

Fig 12. A rainbow trout nature infected by *A. hydrophila* it's submaxilla was dissociated.

在肌肉截面出現發炎組織。表皮組織出現點狀出血 (Fig. 2)，真皮疏鬆結締組織，緻密結締組織及脂肪組織呈彌漫性出血 (Fig. 3)，肌肉組織亦受侵襲呈彌漫性出血，引起肌纖維變性、類纖維素變性 (Fig. 4)，嚴重者肌纖維變性及凝固壞死、消失，肌節間有炎性細胞浸潤 (Fig. 5)。

肝臟：肝實質細胞嚴重脂肪變性，肝門脈有炎症細胞浸潤的病灶 (Fig. 6)。

脾臟：紅髓壞死。脾髓充滿紅血球，且紅血球的壞死頻繁 (Fig. 8)，並有細菌的侵入病巢出現 (Fig. 9)。

腎臟：造血組織局部萎縮，且有淋巴球增殖巢出現 (Fig. 10)，血管炎及絲球體局部水腫變性壞死，腎小管混濁腫脹或壞死 (Fig. 11)，腎小管內常有栓子出現。

表二 鰻發病後血清滲透壓及鈣離子濃度變化

	Osmolality (mOsm)	[Ca ²⁺] (mg/l)
control ^a	278	8.83
10 ³	280	10.36
10 ⁴	259	10.01
10 ⁵	245	6.75
10 ⁶	219	16.16

^a control 為 12 尾鰻的平均值

討 論

本研究利用從腸炎病人身上分離出的 *A. hydrophila* 注射至養殖鰻來進行實驗，主要是鑑於 *A. hydrophila* 這種過去被認為是人的次級或機緣性感染的細菌，最近已躍居為主要的病原菌，在榮總、長庚醫院有許多敗血症病人體內有氣單胞菌被分離出，根據統計 *A. hydrophila* 在臨床上的分離率已高達百分之一點三⁽⁶⁾；由本實驗的結果可知從體分離出來的 *A. hydrophila* 可以感染養殖鰻，而其生化特性與一般從魚體分離出的差異很小 (表一)，因 *A. hydrophila* 是虱目魚、鰻魚等食用魚主要的病原菌，有學者認為 *A. hydrophila* 擴散的現象可能並非與國人近年嗜食海鮮有關，而是食品衛生處理不當及病原鑑定技術改進的結果有關。

A. hydrophila 感染與否取決於鰻之健康與注射菌之濃度。病原侵入後，主要是經由菌血，細菌隨循環破壞血管及脾和腎之造血組織。且在肝細胞造成嚴重的脂肪變性，可能因長時期的饑餓加上病原侵入後所助長之結果。對照組之鰻經饑餓亦可發現肝臟實質細胞輕微脂肪變性及萎縮 (Fig. 7)。由消化道自然感染的鰻，常可發現嚴重的腸黏膜上皮剝離及細菌的病灶 (Kubota *et al.*, 1982)，以注射法感染之鰻觀察其腸道並無病變 *A. hydrophila*。感染鰻除了由消化道感染外，至於由皮膚的損傷等亦有可能發病，而其致病時的生理條件則有待進一步的研究。

最近的標準法已成功的將 *Aeromonas* strains 依其特性將過去的 *Aeromonas* 細分為五種 (Balows *et al.*, 1991) *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii*。所有的方法都顯示，臨床上分離出的 *Aeromonas*，具有相當大的差異性，而非因單一菌株毒性增加造成感染。由病人及魚所分離的病原，其生化特性雖有差異，其病理反應並不改變。

誌 謝

本研究承農委會提供經費支持 (81農建12.2-漁-02)，又承臺大郭光雄教授、陳秀男教授等的大力

贊助，鹿港水產實驗所及輔導會養殖處彰化分場李福銓先生提供病鰻，陽明微免所蔡文城教授提供寶貴意見，技術員黃素霞小姐的技術幫忙，生理所王錫崗教授的鼓勵，高毓儒副教授幫忙修改論文，助理董玉凡幫忙測血清，寄生蟲學科范秉真教授慷慨借用顯微照像設備得以完成，謹此致謝。

參 考 文 獻

- 蔡文城、吳竹蘭、王健家、汪安明、李寧、周尚芳 (1989)。臺灣大型醫院臨床分離菌的種類及比例。中華微免雜誌 22: p. 46-59。
- Balows, A., W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, H. J. Shadomy (ed.) (1991) *Aeromonas and Plesiomonas*, Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp 396-401.
- Huang S. T., and C. I. Lin (1986) Experimental studies on the pathogenicity of *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila* in eel, *Anguilla japonica*. COA Fisheries Series No. 8 Fish Research (VIII), 12: 40-55.
- Kubota, S. S., T. Miyazaki, and S. Egusa. (1982) Color Atlas of Fish Histopathology. (Vol. 1) Shin-Suisan Suinbun-Sha, Ltd. press. Tokyo, Japan.
- Lallier R., F. Bernard, and G. Lalonde (1984) Difference in the extracellular products of two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish. J. Microbiol. 30: 900-904.
- Lamers COR H. J. (1986) Histophysiology of primary immune response against *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.) The J. of Experiment Zoology 238: 71-80.
- Miller, T. K. and J. Levin (1984) The effects of multiple injection of bacterial endotoxin on blood coagulation in the toadfish, *Opsanus tau*. Biol. Bull. 166: 189-205
- Trust, T. J., J. S. G. Dooley, T. Sakata and R. J. Belland (1987) Surface structure of pathogenic *Aeromonas*. Experientia. 43: 371-372.

The Artificial Injection of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Human to Induce Bacterial Septicemia in Culture Eel (*Anguilla japonica*)

C. H. Chein, T. S. Lin and E. J. Chein

Department of Physiology
National Yang-Ming Medical College

To study the pathological influences of *Aeromonas hydrophila* on eels, this type of bacteria was isolated from enteritis patients and was injected into cultured eels (*Anguilla japonica*) hypodermically. The pathogen did not infect the control eels whereas it did induce various pathological consequences in the eels prefasted for a two-month period. The pathogen invaded the stratum spongiosum and stratum compactum, and caused hemorrhage, fibrinoid degeneration, muscle bundle hyaline degeneration, and necrosis, as evidenced by the histopathological changes. In addition, the infected eels showed a general inflammation in the systemic vasculature, an atrophy in the haematopoietic tissues of the kidneys and fatty liver. The infected eels also exhibited a decrease in blood osmolality and an increase in Ca^{2+} concentration of serum, suggesting a dysfunction of the kidneys and livers. Although the biochemical characteristics are different between the *A. hydrophila* isolated from human and eels, the symptoms observed in this study were similar to those found in the sick eels infected by a nature route. The similarity of the symptoms may imply the enteritis patients are associated with their fish diets. These results show the feasibility of a model to study the mechanisms of pathological development in eels infected by *A. hydrophila*.