

動物衛生報導

第10期



行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 補助
雲林縣家畜疾病防治所 編印

中華民國101年8月
GPN:2009901542

強化畜禽動物疾病防治計畫
101管理-1.1-動防-01(2)



山羊肝蛭與化膿性支氣管性肺炎及其他寄生蟲性疾病混合感染症

蔡正偉、陳一明、廖哲賢、高淑娟、呂完教、陳志峯

報告日期：101年6月19日

一、前言

臺東縣乳肉用羊隻總飼養戶數最多時期是民國85年約400戶，總飼養頭數高達27,300頭，近年來因飼料成本高漲，如玉米、黃豆及乾草料等，考量獲利有限，大都離牧不再飼養，截至100年度總飼養戶僅剩85戶，總飼養頭數約5,300頭，為降低生產成本，大部份農戶多位於青草充足的偏遠地區，搭建簡易畜舍採放牧型態飼養。因其採放牧型態，故羊隻疾病檢診病例之腸胃道寄生蟲感染檢出比例偏高，彙整本所近6年來羊隻疾病檢診病例共143例，其中腸胃道寄生蟲感染症計70例，佔羊隻疾病檢診總病例數49 % (70/143)。羊隻一旦感染腸胃道寄生蟲常會導致營養不良、貧血、消瘦及下痢等症狀，進而使羊隻生長遲緩及飼料換肉率差，嚴重影響飼養戶的收益。

本次報告之病例為100年發生於臺東市某養羊場之病例，綜合剖檢3頭病羊之病理學檢驗結果及隨機採樣計90頭不同月齡羊隻糞便，進行寄生蟲檢查，發現該場羊隻有肝蛭、雙口吸蟲、捻轉胃蟲、腸結節蟲、糞桿線蟲、鞭蟲、條蟲及球蟲等8種寄生蟲，因肝蛭屬於人畜共通傳染病，所以特針對其周邊養羊場、養牛場和本縣其他鄉鎮養羊場，進行糞便中肝蛭蟲卵流行病學調查，以了解本縣羊隻感染肝蛭情形。此病例為本縣第一例肝蛭感染症，故特彙整相關資料提出報告。

二、病歷

臺東市建農里某飼養戶，共飼養約400頭努比亞雜交山羊，搭建高床畜舍，每日放牧飼養，其場內羊隻來源一為自家繁殖，二為自本縣其他羊場購入。本所防疫人員於去年6月前往該場進行口蹄疫及羊痘疫苗注射時，畜主表示該場羊隻近來有90 %呈消瘦及5 %呈嚴重下痢之情形，其死亡率較以往為高約20-30 %，過去10年以來屠宰時常會發現肝臟呈囊腫等病灶，防疫人員遂隨機採樣1歲齡以上2頭羊隻糞便回所檢查，糞便以昭和氏法檢查可見吸蟲蟲卵，另浮游法可見線蟲及球蟲蟲卵，畜主並分別於6月23日、7月5日及9月6日各送檢1隻消瘦虛弱羊隻至本所進行剖檢。

三、肉眼病變

	6月23日解剖 (A羊)	7月5日解剖 (B羊)	9月6日解剖 (C羊)
外觀	消瘦，水樣下痢，黏膜蒼白，頭部及四肢多處直徑約2-3 mm圓形脫毛。	消瘦，鼻吻部膿樣分泌物，黏膜蒼白。	水樣下痢，鼻吻部膿樣分泌物，黏膜蒼白。
呼吸系統	氣管黏液增加。	肺臟右側尖葉末端呈暗紅色，觸感硬實。	肺臟右側膈葉末端呈暗紅色，觸感硬實。
肝臟	表面多處癍痕，二個大小約1.5x1cm ² 之囊腫，膽囊腫大，膽汁鬱積，囊腫及膽管內有大量吸蟲蟲體，肝門淋巴結腫大。	表面多處癍痕，膽囊腫大，膽汁鬱積，膽管內有大量吸蟲蟲體，肝門淋巴結腫大。	表面多處癍痕，膽囊腫大，膽汁鬱積，膽管內有大量吸蟲蟲體，膽胰管腫大內有吸蟲蟲體，肝門淋巴結腫大。
脾臟、腎臟	腎臟多發白色斑點。	腎臟多發白色斑點。	脾臟呈灰白色，觸感硬實，切開內有黃褐色乾酪樣物。

消化系統	第一胃內可見雙口吸蟲蟲體，第四胃黏膜面多發白色斑點。	第一胃內可見雙口吸蟲蟲體。腸管漿膜面多發凸起白色結節。	第四胃內可見捻轉胃蟲蟲體。腸繫膜淋巴結腫大出血。
------	----------------------------	-----------------------------	--------------------------

四、組織病變

1. 肝臟：肝臟呈多發局部凝固性壞死，門脈區可見中等量的淋巴球及巨噬細胞浸潤。膽管擴張且上皮細胞因蟲體擠壓造成壞死，膽管內可見吸蟲蟲體，其特徵包括有：吸盤、無體腔、外皮棘狀突起 (cuticular spines)、消化道、雌雄同體 (精巢及卵巢) 等，膽管周圍有大量結締組織增生包被及膽管上皮增生 (圖9)。膽管黏膜層的上皮呈腺體樣增生，並且有中等量的淋巴球及嗜酸性球浸潤 (圖10)。某些區域可見膽管內有蟲卵，周圍有大量的結締組織增生及強烈的炎症反應 (圖11)。肝門淋巴結皮質區局部水腫變性。(A、B、C羊)
2. 肺臟：化膿性支氣管性肺炎，肺泡內有大量的炎症滲出物及少量的中性球，小支氣管內有大量的嗜中性球蓄積，周圍有大量的淋巴球浸潤。(B、C羊)
3. 腎臟：淋巴球性間質性腎炎，皮質區的腎小管呈輕微散發凝固性壞死，腎小管腔內有嗜伊紅性均質樣的玻璃圓柱 (hyaline cast)，間質可見大量的淋巴球浸潤。(A、B羊)
4. 脾臟：局部廣泛性凝固樣壞死，壞死區細胞結構完全消失，周圍大量的淋巴球浸潤。(C羊)
5. 消化系統：第四胃黏膜固有層內可見包被良好的大型球蟲之裂殖體，周圍有少量淋巴球及漿細胞浸潤 (圖12) (A羊)。空腸黏膜固有層可見強烈的炎症反應，有大量的淋巴球、漿細胞及少量的嗜酸性球浸潤，黏膜層上皮細胞內可見球蟲之卵囊及大、小配子體 (A、B羊)。腸管肌層多發局部慢性肉芽腫，中央呈礦質化 (B羊)。腸繫膜淋巴結局部出血，皮質區可見Langhan's cell浸潤。(C羊)

五、實驗室檢查

1. 微生物學檢查

- (1) A、B羊採鼻腔拭子，經行政院農業委員會家畜衛生試驗所 (以下簡稱畜衛所) 檢測 *Mycoplasma*，均為陰性。
- (2) A羊自肺臟、腎臟、肝臟及脾臟處釣菌，培養於Blood agar及MacConkey agar置於37 °C培養24小時，均無菌落發育。
- (3) B羊自肺臟、腎臟、肝臟及脾臟處釣菌培養，由肺臟釣菌培養於Blood agar上有菌落發育，經畜衛所以16S rDNA鑑定為 *Pasteurella multocida*，藥物敏感性試驗amoxicillin、ampicillin、oxytetracycline有明顯抑制圈。
- (4) C羊自肺臟、腎臟、肝臟、脾臟及腸繫膜淋巴結處釣菌培養，由肝臟及腸繫膜淋巴結釣菌培養於Blood agar及MacConkey agar上有菌落發育，經API 20E鑑定為 *E. coli*，藥物敏感性試驗enrofloxacin、ceftifuru有明顯抑制圈。

2. 寄生蟲檢查

- (1) 浮游法：取約2公克糞便於試管內，加入飽和食鹽水充份攪拌均勻後，再沿管壁加入飽和食鹽水使試管口因表面張力形成微凸，靜置約30分鐘後，以蓋玻片沾取試管口液面置於載玻片上鏡檢，可見線蟲蟲卵、球蟲蟲卵、鞭蟲蟲卵及條蟲蟲卵。
- (2) 昭和氏法：取約5公克糞便加水充分混合均勻後，倒入第1層濾網中，以水沖洗約2分鐘，然後拿掉第1層濾網，以水沖洗第2層濾網約15秒鐘，第3層濾網同第2層操作，第4層濾網則以水輕沖使殘渣集中於濾網中央，再以甲基藍進行染色後，將濾網倒置於漏斗上以水將殘渣輕沖進漏斗內，靜置使殘渣沉澱後，吸棄上清液，以滴管吸取殘渣液鏡檢，可見吸蟲蟲卵。

3. 血液學檢查 (如表1)

白血球總數上升，與 *Pasteurella multocida* 感染有關 (B羊)；紅血球總數、血紅素濃度及血容比皆降低，表示病羊有貧血現象；Albumin下降、Globulin上升及A/G值下降，呈現低白蛋白血症，表示病羊有慢性營養不良或慢性肝病等情形；總膽紅素量上升，與膽汁鬱滯有關；AST上升，應與吸蟲寄生破壞肝細胞所造成 (B羊)。

表1 A羊及B羊之血液學檢查數值

	參考值	A羊	B羊	單位
WBC	4000-13000	8700	39700 ↑	/μL
RBC	8-18	1.74 ↓	1.08 ↓	10 ⁶ /μL
Hb	8-12	7.7 ↓	2.3 ↓	g/μL
PCV	22-38	5.9 ↓	9.2 ↓	%
T-Bilirubin	0-0.1	0.5 ↑	0.5 ↑	mg/dL
T. Protein	6.4-7	7.4 ↑	5.3 ↓	g/dL
Albumin	2.7-3.9	1.9 ↓	0.9 ↓	g/dL
Globulin	2.7-4.1	5.5 ↑	4.4 ↑	g/dL
A/G	0.6-1.3	0.3 ↓	0.2 ↓	%
AST	167-513	147 ↓	978 ↑	U/L
ALT	24-83	10 ↓	54	U/L
ALP	93-387	22 ↓	235	U/L

六、類症鑑別

可於羊肝臟內寄生的寄生蟲，鑑別如表2：

表2 可於羊肝臟內寄生的寄生蟲鑑別如下

寄生蟲名	寄生部位	分布區域	臨床症狀	蟲體及蟲卵特色
牛羊肝蛭 <i>Fasciola hepatica</i>	膽管、肝實質	全世界	急性死亡、顯著的貧血、水腫、消瘦	蟲體呈褐色，長20-30 mm，寬8-13 mm，前部較寬，後部漸次細小，頭部像前突出形成口吸盤，後有相同大小之腹吸盤。蟲卵呈黃褐色，卵圓形，一端有小蓋，大小130-145×70-90 μm。
巨大肝蛭 <i>Faciola gigantica</i>	膽管、肝實質	非洲、亞洲	急性死亡、顯著的貧血、水腫、消瘦	蟲體呈褐色，長25-50 mm，寬5-12 mm，體前部與後部相差很小，腹吸盤較口吸盤為大。蟲卵形狀與 <i>F. hepatica</i> 相似，但較大，156-197×90-104 μm。
大吸蟲 <i>Fascioloides magna</i>	肝實質	北美洲、歐洲	急性死亡	蟲體厚而呈肌肉色，長100-300 mm，寬約30 mm。蟲卵109-168×75-96 μm。
槍狀肝吸蟲 <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	膽管	歐洲、亞洲、北美洲	顯著的貧血、水腫、消瘦	蟲卵殼厚，橢圓形，卵蓋不明顯，內含纖毛幼蟲，大小38-45×22-30 μm。
胰蛭 <i>Eurytrema pancreaticum</i>	胰管、膽管、十二指腸	東亞、巴西	飼料換肉率不佳	蟲體寬扁平，呈紅色似血塊、口腹吸盤相同大小。蟲卵50-80×35-40 μm。
肝條蟲 <i>Stilesia hepatica</i>	膽管	非洲	無致病性，屠宰時肝判定廢棄	屬裸頭條蟲科。
放射狀隧體條蟲 <i>Thysanosoma actinoides</i>	膽管、小腸	美西、南美洲	無致病性，屠宰時肝判定廢棄	屬裸頭條蟲科。

本病例感染吸蟲蟲體外觀呈褐色葉片狀，長10-30 mm，寬5-10 mm，蟲卵呈黃褐色，卵圓形，一端有小蓋，大小約150-170×70-90 μm，口吸盤和腹吸盤大小相同，可鑑別為*Fasciola hepatica*。

七、診斷

山羊肝蛭與化膿性支氣管性肺炎及其他寄生蟲性混合感染症。

八、疫情及流行病學調查

針對本病例該場（以下簡稱A場）羊隻以月齡區分，隨機採樣進行寄生蟲感染調查，檢測結果如表3。

表3 A場不同年齡層羊隻糞便中寄生蟲蟲卵檢出率

A場羊隻	吸蟲卵檢出率	球蟲卵檢出率	線蟲卵檢出率
3月齡以下	10 % (2/20)	80 % (8/10)	0 % (0/10)
3月齡以上至1歲齡	12 % (4/34)	91 % (10/11)	27 % (3/11)
1歲齡以上	86 % (31/36)	56 % (9/16)	69 % (11/16)

另針對A場周邊2場養牛場、5場養羊場及本縣其他鄉鎮養羊場，1歲齡以上羊隻，採樣進行糞便中寄生蟲感染情形調查，A場隔壁養羊場（以下簡稱B場）、A場東北方約2.5公里處養羊場（以下簡稱C場）及二場養牛場（以下簡稱D、E場）糞便樣品中皆有檢出吸蟲蟲卵，另E場還有圈飼4頭羊隻糞便樣品則未檢出吸蟲蟲卵，其餘周邊（以下簡稱F、G、H場）及其他鄉鎮養羊場糞便樣品皆未檢出吸蟲蟲卵，檢測結果如表4。

表4 A場週邊地區牛羊場及本縣其他鄉鎮羊場糞便中寄生蟲蟲卵檢出率

	吸蟲卵檢出率	球蟲卵檢出率	線蟲卵檢出率
A發病場	86 % (31/36)	56 % (9/16)	69 % (11/16)
B場羊	20 % (3/15)	100 % (15/15)	87 % (13/15)
C場羊	100 % (11/11)	91 % (10/11)	100 % (11/11)
D場牛	17 % (1/6)	17 % (1/6)	67 % (4/6)
E場牛	30 % (3/10)	未檢測	未檢測
E場羊	0 % (0/4)	100 % (4/4)	0 % (0/4)
F場羊	0 % (0/10)	80 % (8/10)	100 % (10/10)
G場羊	0 % (0/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)
H場羊	0 % (0/5)	80 % (4/5)	100 % (5/5)
其它地區羊場	0 % (0/71)	85 % (60/71)	56 % (40/71)

調查中發現A、B、D、E場的放牧區域有接觸及重疊，C場放牧區域因中間有溪流阻斷，而未與A、B、D、E場放牧區接觸或重疊，但據A場及E場畜主表示牛羊曾於C場現在放牧區域放牧過，可能因此導致互相交叉感染或是因中間宿主的移動使該區域也受到污染，另F場畜主表示偶爾會將羊隻趕至C放牧區域放牧，雖此次未檢出，後續仍須密切注意，G、H場則在畜舍周圍以圍籬圈出一固定區域放牧未與其它放牧區接觸，此次亦未檢出。

九、處理及預防控制

處理：目前國內並無合法藥物可用於治療肝蛭，建議畜主改變飼養型態，切斷肝蛭生活史。

預防控制：建議畜主以圈飼飼養暫停放牧，用乾草料及青草料餵飼，割取青草時應注意遠離池塘及溪流處為佳，勿割取太靠近根部並應以無露水之青草或木本科樹葉餵飼。如需放牧，放牧區應進行中間宿主的驅除，可撒佈石灰或茶粕殺滅中間宿主，並加強排水，放牧區不可有積水情形。此外肝蛭蟲卵在46℃，60分鐘就會死滅 [3]，故羊隻糞便應做堆肥處理充份發酵，利用內部高溫約可達60-75℃，將蟲卵殺滅後，才可做為肥料，避免蟲卵散布。該場羊隻除送往屠宰外，勿再出售至其他養羊場，避免疫情擴散。

十、疫情追蹤

本病例場在本所輔導下，改高床飼養不再放牧，羊隻以乾草料、高粱酒糟及碎稻穀混合餵飼，1年以來羊隻毛色、肥育情形均有明顯改善，死亡率也較之前大幅下降，疫情已獲控制及有明顯改善。

十一、討論

肝蛭 (*Fasciola*) 的生活史 (圖7) 大致可分為宿主體外和宿主體內二個時期 [2]。宿主體外發育期需有中間宿主 (螺蛳)，蟲卵孵化形成纖毛幼蟲 (miracidium) 後，經肉質部或呼吸器官侵入螺蛳，立即形成胞狀幼蟲 (sporocyst)，漸漸發育成雷氏幼蟲 (radia)，再移行至螺蛳的中腸腺部，形成尾動幼蟲 (cercaria) 後，離開螺蛳，遊於水中，於植物上形成囊狀幼蟲 (metacercaria)，囊狀幼蟲形成需7小時以上才具有感染性，經宿主食入消化後，肝蛭幼蟲在小腸內脫下被囊，穿過腸壁進入腹腔，移行至肝臟穿過肝包膜進入肝實質內，從膽管末梢移入總膽管，發育成成蟲開始產卵，經口感染後歷時約10週 [5]。

肝蛭在世界分佈廣泛，尤其是 *F. hepatica* 分佈世界各地 [7]，宿主為哺乳類動物，特別是草食性動物容易感染，主要寄生於膽管中。在畜養牛、羊興盛的國家是飼養上一大障礙，常造成飼養的家畜營養不良、消瘦、貧血、下痢、乳量減少、死亡等症狀，造成經濟上嚴重的損失。肝蛭感染的病害依侵入肝實質的幼蟲及膽管內寄生的蟲體數量而論，寄生蟲體少時，通常都無症狀，蟲卵也不易檢出，另有文獻指出肝蛭對羊隻性別感受性也有差異，在雌性山羊肝臟的傷害比雄性山羊嚴重 [9]。

肝蛭的症狀可分為急性期、衰弱期及恢復期三期 [3]；急性期是因肝蛭幼蟲穿過腸壁進入腹腔，由肝臟表面侵入肝實質之時期，常常顯示很高的死亡率，呈現發燒、食慾減退、消瘦、死亡等症狀，此時期蟲卵尚無法檢出。衰弱期是肝蛭侵入膽管內寄生之時期，症狀呈現主徵為消瘦、貧血、衰弱、下顎浮腫、下痢、死亡等症狀，此時期通常可檢出蟲卵。進入恢復期後，症狀減輕，糞便中蟲卵數會減少，有時未能檢出。肝蛭感染後至成蟲的時間依種類而異，蟲體的大小則會依宿主體形而異，寄生時期約1-2年，但有研究指出成蟲可在羊體存活11年之久 [6]，牛體內存活9-12個月，人體內可長達12年 [1]。

肝蛭為人畜共通傳染病，在有生食習慣的國家，為公共衛生上一大問題，人類可藉由生食水生植物感染，而後有腹痛、腹瀉、膽絞痛、黃疸、膽囊炎、膽結石等症狀，臺灣至今並無肝蛭人體病例報告 [4]。

預防方法以避免生飲受汙染的水源、生食或食用未煮熟的食物為主。人畜共通傳染病中，臺灣流行的中華肝吸蟲與肝蛭臨床症狀相似，但其蟲卵須經第一中間宿主 (淡水螺) 食入才能孵化，形成尾動幼蟲後被第二中間宿主 (淡水魚類和蝦) 食入，在第二中間宿主體內形成囊狀幼蟲，再經終宿主 (肉食哺乳動物) 食入感染，家畜中豬是近來重要的保蟲宿主，預防方式和肝蛭相同。

本病例經訪查肝蛭汙染區域內的各養牛、羊場共7場，除了2場羊場因圈飼未檢出及臺11線省道另一邊之F場放牧飼養但未檢出外，其中A、E場在該地區放牧牛羊時間最久，A場表示約10年前該場羊隻屠宰就約2成肝臟有病變，目前則幾乎每隻皆有病變，E場則不知牛隻有肝蛭感染，牛隻也無異常情形，直到糞便檢查結果才得知，因2場同時期就在該地區放牧，也少自外購入牛羊，而其間亦偶有人在此放牧牛隻，故無法確認本地區肝蛭感染最初來源。另本區域之前各有一場牛羊飼養場放牧，目前已離牧，經聯繫養牛場表示因牛隻都無生育而離牧，養羊場則表示因水災羊隻淹死而離牧。

防治肝蛭感染最好的方法是阻斷其生活史，避免一再重複感染，建議畜主不要放牧，改以高床圈飼，並勸導勿將牛羊販售給其他場飼養或移動至別處放牧，造成肝蛭汙染區域擴大。但因各場的人力及經營狀況不同，目前只有A場配合改採高床圈飼，C場因規模較小選擇離牧，並將羊隻全數販售給A場，B、E場改放牧至較高無積水的區域為主，D場仍在原地放牧。

為防止肝蛭的散佈，應限制受感染牛羊的移動，牧場糞便經堆肥處理充份發酵後，才可做為肥料，避免蟲卵隨糞便散佈。有文獻提到排泄物可以0.1 %漂白水浸泡30分鐘後沖入衛生下水道 [1]，本所遂以冰醋酸 (pH 1)、pH 4緩衝液、pH 10緩衝液及漂白水 (pH 14) 浸泡蟲卵，另將蟲卵加熱處理做試驗，每隔半小時觀察，只有經加熱沸騰處理，明顯可看到蟲卵內細胞遭到破壞變成均質化，其餘試驗經一天後觀察，蟲卵內結構仍正常。由此顯示糞便經堆肥處理時，發酵產生的高溫 (約60-75 °C)，可將蟲卵殺滅，有效達到防止肝蛭經糞便散佈的途徑。

近年來因飼料成本不斷的高漲，飼養戶為節省成本多改為放牧型態飼養，本病例之養羊戶即為一例，在長期放牧下，場內除肝蛭感染外，還有多種線蟲的感染，造成羊隻長期營養不良，仔羊育成率低，驅蟲藥使用，反而導致成本增加經濟收益更差，在建議改以高床圈飼

飼養半年後，畜主表示雖飼料成本增加，但節省了管理的人力，且羊隻健康及生長情況改善，仔羊育成率也提高，整體經濟收益比之前改善許多。在勸導飼養戶改變飼養型態時，飼養戶多數只考量到圈飼後，短期內飼養成本增加，而不願意嘗試，忽略長期下來育成率、飼料換肉率的增加及藥物使用減少，所帶來的經濟效益。

臺灣因氣候溫暖潮濕，為肝蛭生存適區，之前在南投縣、花蓮縣及屏東縣亦曾在牛、羊、山羊及鹿檢出，除了勸導農戶高床圈飼不要放牧，或清除放牧區螺蛭減少感染外，對已感染肝蛭之家畜是否可採積極的方式予以治療，核准國外用於治療肝蛭之藥物進口，減低農戶的損失。

十二、致謝

本病例報告承蒙國立中興大學獸醫學院董光中教授，行政院農業委員會家畜衛生試驗所李淑慧組長、涂央昌助理研究員、黃子鳴助理研究員，屏東縣家畜疾病防治所蔡睦宗獸醫師等之協助與指導，謹此致謝。

十三、參考文獻

1. 行政院衛生署疾病管制局等。人畜共通傳染病臨床指引。臺北，行政院衛生署疾病管制局，312-314，2009。
2. 李永基。家畜寄生蟲學。臺北，藝軒，18-35，1994。
3. 張甘楠、尤金岳。家畜寄生蟲病診療學。臺北，藝軒，144-156，1979。
4. 劉振軒等。簡明人畜共通傳染病。臺北，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局，249-252，2004。
5. Jones TC, Hunt RD, King NW. Veterinary pathology. 6th ed. Williams & Wilkins, USA, 658-661, 1996.
6. Maxie MG. Pathology of domestic animals. 5th ed. Saunders, USA, 359-364, 2007.
7. McGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed. Mosby, USA, 437-439, 2007.
8. Smith MC, Sherman DM. Goat medicine. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 359-385, 1994.
9. Talukder S, Bhuiyan MJ, Hossain MM, Uddin MM, Paul S, Howlader MMR. Pathological investigation of liver fluke infection of slaughtered Black Bengal Goat in a selected area of Bangladesh. Bangl J Vet Med 8: 35-40, 2010.

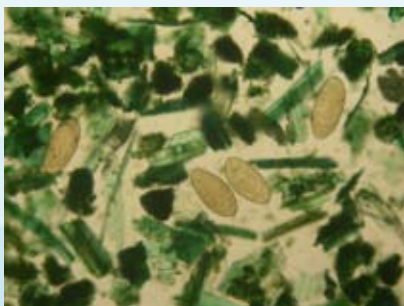


圖1 昭和氏法檢查糞便，可見吸蟲蟲卵。

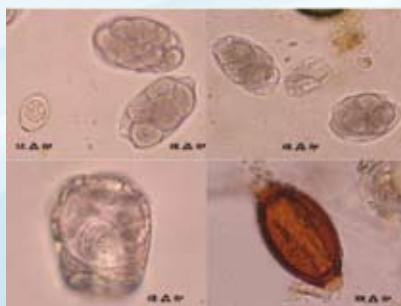


圖2 浮游法檢查糞便，可見球蟲、線蟲、條蟲及鞭蟲蟲卵。



圖3 膽囊腫大，膽汁鬱積，膽管內大量吸蟲蟲體。

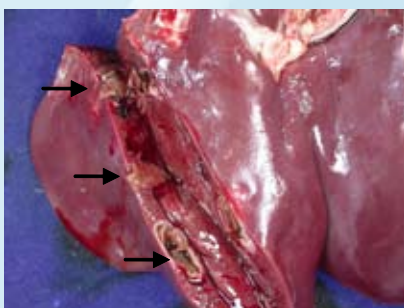


圖4 肝臟切面亦可見膽管及囊腫內有大量吸蟲蟲體。



圖5 第一胃內可見紅色橢圓形雙口吸蟲蟲體。



圖6 第四胃內可見紅色捻轉胃蟲蟲體。

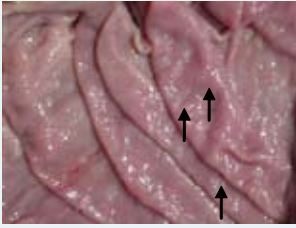


圖7 第四胃黏膜面可見多發白色斑點。



圖8 腸管漿膜面可見多發凸起白色結節。

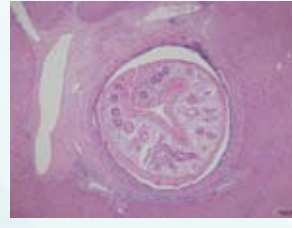


圖9 膽管上皮壞死，管腔內可見無體腔、外皮棘狀突起、精巢及卵巢等特徵之吸蟲蟲體，膽管周圍有大量結締組織增生包被及膽管上皮增生。(H&E stain)

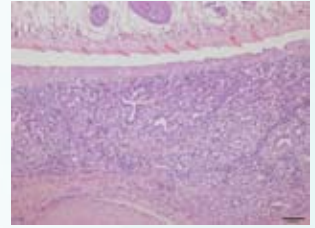


圖10 膽管黏膜層的上皮呈腺體樣增生，並且有中等量的淋巴球及嗜酸性球浸潤。(H&E stain)

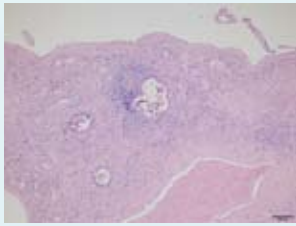


圖11 膽管內有吸蟲蟲卵，周圍有大量的結締組織增生及強烈的炎症反應。(H&E stain)

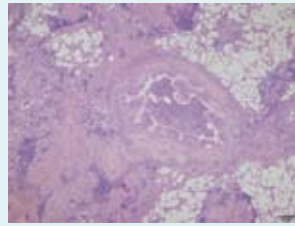


圖12 化膿性支氣管性肺炎，肺泡內有大量的炎症滲出物及少量的中性球，小支氣管內有大量的嗜中性球蓄積，周圍有大量的淋巴球浸潤。(H&E stain)

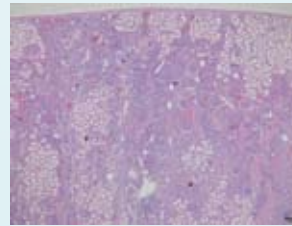


圖13 淋巴球性間質性腎炎，皮質區的腎小管呈輕微、散發凝固性壞死，腎小管腔內有嗜伊紅性均質樣的玻璃圓柱，間質有大量的淋巴球浸潤。(H&E stain)

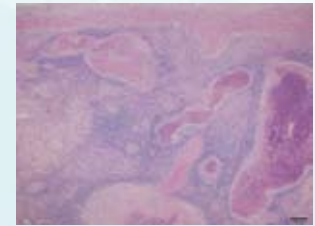


圖14 局部廣泛性凝固樣壞死，壞死區細胞結構完全消失，周圍大量的淋巴球浸潤。(H&E stain)

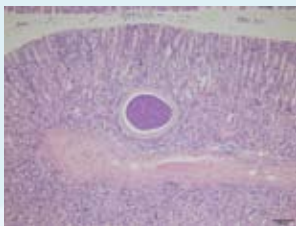


圖15 第四胃黏膜固有層內可見包被良好的大型球蟲之裂殖體，周圍有炎症反應。(H&E stain)

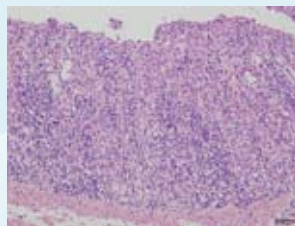


圖16 空腸黏膜固有層可見強烈的炎症反應，有大量的淋巴球、漿細胞及少量的嗜酸性球浸潤，黏膜層上皮細胞內可見球蟲之卵囊及大、小配子體。(H&E stain)



圖17 結腸肌層有一局部慢性肉芽腫，中央呈礦質化。(H&E stain)

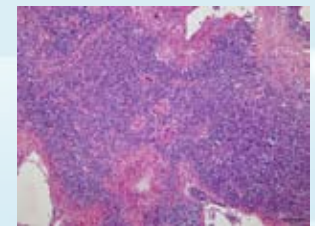


圖18 腸繫膜淋巴結局部出血，皮質區可見Langhan's cell浸潤。(H&E stain)

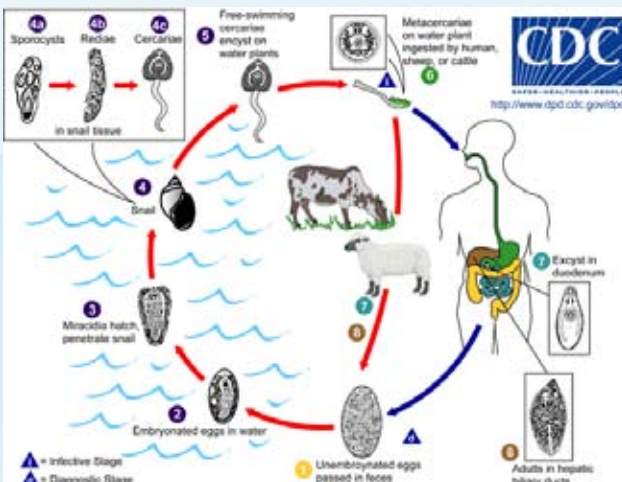


圖19 肝蛭生活史。(圖片摘自CDC/Alexander J. da Silva/Melanie Moser)



圖20 肝蛭污染區空照衛星圖。(圖片摘自<http://maps.google.com.tw/>)



養殖龍膽鏈球菌感染症

(Streptococcus infection in captive giant grouper)

趙嘉本 曾嘉川 陳穗平 涂明義 陳威智 吳宗穆 林渝翔 楊忠訓 柯尚余
報告日期：101年6月19日

一、前言

鞍帶石斑魚 *Epinephelus lanceolatus*，中文俗名龍躉、龍膽石斑、槍頭石斑魚、倒吞鰲、鴛鵞鱸、紫石斑魚，常見英文俗名 Giant grouper、Brindle bass 及 Queensland grouper。是石斑魚類中體型最大者，鞍帶石斑魚是一種具有高經濟價值的食用魚，目前在臺灣、澳洲、海南及香港等地區已能進行人工繁殖，分類上屬於鱸形目 Perciformes、鮨科 Serranidae、石斑魚屬 *Epinephelus*。本市龍膽養殖中魚苗主要位於林園室內繁殖場，而成魚養殖則位以永安、彌陀地區為大宗。

鏈球菌感染症 (Streptococcosis)，造成全世界水產養殖之重大經濟損失，自 Hoshina 於 1958 年發表 rainbow trout 感染鏈球菌症之後，便有許多相關的報告陸續被提出，在日本、美國及中東等地區也有相關病例報導，尤其在溫水養殖魚類 [6, 7, 12, 17, 18, 19, 20, 21]。因此本病已成魚類相當重要之細菌性疾病。

本省淡水、海水養殖魚類亦有因鏈球菌感染而造成死亡病例發生，魚種包含金目鱸 (giant seaperch; *Lates calcarifer*)、吳郭魚 (tilapia; *Oreochromis nilotica*, *O. aurea*, *O. mossambicus*)、石斑魚 (grouper; *Epinephelus malabaricus*)、午仔 (striped threadfin; *Polydactylus plebeius*)、銀紋笛鯛 (silver snapper; *Lutjanus argentimaculatus*)、豆仔魚 (borneo mullet; *Liza macrolepis*)、烏魚 (striped mullet; *Mugil cephalus*) 及海鱸 (cobia; *Rachycetron canadum*) 等魚種。本市自 98 年起於檢診病例中陸續出現龍膽石斑亦受鏈球菌之感染，並造成業者之損失，因此作此報告以供相關單位防疫參考。

二、病例

(一) 99u1649 位於彌陀養殖區，該區主要以養殖虱目魚、石斑及金目鱸為主，業者於 99 年 6 月購入體重約 500-600 公克之龍膽石斑，主要以人工合成料為餌，其兩分地 3 台水車約放養 3,000 尾，該放養池旁為金目鱸養殖池區，且該區近 3 年來每到春夏間皆會有金目鱸感染鏈球菌疫情，附近流浪狗與野鳥族群豐富且多樣性，購入半個月後發現魚隻陸續死亡，每日由 2-3 尾增加至 5-6 尾，之後業者將剛死亡龍膽送至永安水產動物疾病檢驗站檢驗，經確診及相關之處置本池之死亡率約 11 %。

(二) 100u2968 位於永安某純海水養殖場，於 100 年 4 月自林園地區購入體重約 500 公克之龍膽，並以各種下雜魚 (如鯖魚骨、頭或其它) 為餌，其 2.5 分地 3 台水車，共放養 4,000 尾龍膽，並於同年 9 月業者發現有魚隻死亡情況，業者將病魚送至永安水產動物疾病檢驗站求診，經確診及相關之處置本池之死亡率約 10 %。

(三) 100u4056 位於彌陀養殖區者，本年已放養第三年之龍膽石斑，體重平均約 3-5 公斤，面積約近 2 分地水深約近 5 尺，放養數約 600 尾，平常每 2 天給料一次，主要以竹筴魚及鯖魚等餌料，本池於 100 年 6 月份曾有感染虹彩病毒 (iridovirus)，當時其死亡率約 12 %，病程約近 1.5 月之後未發現魚隻死亡。但於 100 年之 10 月又發現魚隻死亡，初 2 天死亡 1 尾之後陸續增加至每日約 2-3 尾，病魚無力游於岸邊或表層水中，業者將剛死亡之龍膽送至永安水產動物疾病檢驗站檢驗，本病例經適當處置後其死亡率約近 15 %。

備註：永安水產動物疾病檢驗站成立於 91 年 6 月 17 日，目前每日上午皆有派 2 位以上獸醫師駐診，近 2 年站內每年檢驗件數皆超過 3,800 件，水質檢測超過 20,000 項次以上。

三、臨床實驗室檢查

(一) 水質檢驗

水質檢驗中亞硝酸-氮測定以 Wood-Armstrong-Richard method、總氮-氮以 Indophenol (自配)、pH 使用 Sontex pH meter (PC310)、鹽度使用 ATAGO (S-10E) 鹽度曲折計測定，各病例其水質檢測結果及發生季節 (如表 1)。

(二) 臨床與解剖病變

調查病例於臨床與解剖皆有相似情形，初期業者常發現魚池每天有死亡多日之魚隻1-2尾，日後漸增至每日死亡3-5尾時，通常可於池邊發現病魚，病魚無力浮游於池邊，尤其下風或排水口處。解剖上各感染病例常可見腹膜炎、腹水，於肝、心表面常可見白色纖維素（圖1），脾臟明顯腫大，偶可見眼球腫大出血等病變。

(三) 壓片檢查

剪下部份鰓絲及刮下部份體表黏液進行濕壓片檢查，鰓絲之二級鰓薄板微血管內偶可見球狀之細菌，鰓絲及體表常可見少量的車輪蟲寄生，少數病例偶有指環蟲寄生。

(四) 內臟抹片檢查

將病魚之脾、腎及肝臟等臟器之抹片以劉氏染色法染色 (Baso 劉氏染色液 A&B) 後觀察，可見球狀之細菌分布於血球間及吞噬細胞內（圖2）。

四、細菌培養、生化、耐鹽性及藥物敏感性試驗

(一) 細菌培養

以無菌操作分別由病魚之肝、脾、腎、心、眼等臟器以無菌方式鈎菌培養於 Brain Heart Infusion agar (BHI, Merck) 或血液培養基 (Blood Agar plate) 上，於28 °C下經24-48小時培養，可見細小之菌落，所分離為*S. iniae*感染病例 (99u1649、99u1727、99u2275、100u2683、100u2968、100u3022及100u4056於血液培養基皆具有 β 溶血)，而其它為99u3039及100u3180為 α 溶血。其中99u3039於BHI之菌落相較於其它分離株其生長慢且具有粘性（圖3），100u4056菌落有時不呈圓型，Gram 染色皆為Gram 陽性球菌。

(二) 生化試驗

將已純化之細菌依API 20 Strep 進行試驗，先使用0.85 %生理鹽水將Brain Heart Infusion agar上的菌落稀釋成約近3號比濁管的菌液濃度，從VP to ADH 均加入100 μ L稀釋菌液，再將0.5 ml的稀釋菌液與 GP medium 混合均勻，並依說明分別加菌液由 RIB 到 GLYG，其中RIB至Glyg須加入礦物油，並培養於28 °C中，於24小時後觀察並判讀其結果如（表2）。但由生化所得之鑑定與核酸序列之結果判讀有所差異。

(三) 分離菌株之耐鹽度試驗

將純化之各病例細菌分別培養於含有1 % NaCl、3 %NaCl及6.5 % NaCl 之BHI borth (Merck) 中置於28 °C恆溫培養箱中培養，持續觀察5天並紀錄其生長情形（表3）。

(四) 藥物敏感性試驗

所分離之細菌依水產動物用藥使用規範所許可用於龍膽石斑之藥物Amoxicillin、Erythromycin、Florfenicol、及Oxytetracycline 等進行藥物敏感性試驗其結果大部份抗生素對上述菌株具敏感性（如表4）。

五、病理學檢驗

脾臟：淋巴細胞為類上皮細胞或單核炎症細胞所取代，於細胞間或類上皮細胞質中可見球狀細菌。

心臟：心外膜炎 (epicarditis) (圖4)、心肌炎 (myocarditis)，於體型較大，如體重大3公斤之龍膽以心外膜炎為主要之病變。

腦：腦膜炎其浸潤細胞主要為單核炎症細胞。

肝：常見肝外膜有纖維素及單核炎症細胞浸潤，並常可見脂肪變性。

其它：腎之部份造血細胞被單核炎症細胞取代，並可見球狀細菌分布其間或於吞噬細胞質中。

六、虹彩病毒檢驗

(一) Megalocytivirus檢驗：

虹彩病毒 (iridovirus)：依據Chao等 (2002) 方法或使用市售之抽取kit (Viogen or Qiagen) 抽取病魚脾、腎等內臟之genomic DNA 並以引子對CY15n-F、R引子對及RY16-F、R引子對進行巢式聚合酵素鏈鎖反應 (PCR)。PCR反應試液中包含dNTP (四種核苷酸各0.16 mM)，引子各 0.1 mM，聚合酶 0.02 U/ μ L (DynaZyme II, Wspoo, Finland)，混合後加二次蒸餾水至100 μ L，再分裝成4管，每管含有24.5 μ L。檢測管內加入欲檢測之DNA樣本，對照組管內則分別加入健康魚為陰性對照及虹彩病毒感染樣本之陽性對照DNA各0.5 μ L (濃度為 20 ng/ μ L)。反應使用TaKaRa TP600反應機進行PCR反應，條件為 94 °C下 3 分鐘，30 循環 94 °C下1 分鐘，60 °C下1分鐘及72 °C下1分鐘，最後 72 °C下7 分鐘。結果於100u4056可得到約300 bp (Nest-PCR之產物) 之虹彩病毒特有之產物，其它皆無病毒核酸之反應。

(二) 其它iridovirus檢測：

另依據Could等 (1995) 所設之引子對reverse primer 5'-AAA GAC CCG TTT TGC AGC

AGC AAA C-3'及forward primer 5'- CGC AGT CAA GGC CTT GAT GT-3'，其標的為Ranavirus之coat protein gene，其結果皆無產物。

七、鏈球菌之鑑定

將已分離並經純化之細菌依Viogen kit之細菌核酸抽取步驟進行菌體genomic DNA之抽取，之後經分光光度計定量為20 ng/uL並保存於-20 °C中備用。

1.Lactate oxidase (lctO) gene 分析：

依據Mata 2004所述其引子對分別為LOX-1：5' -AAG GGG AAA TCG CAA GTG CC-3'及LOX-2：5' -ATA TCT GAT TGG GCC GTC TAA-3'，PCR反應於TaKaRa TP600型中進行，反應條件修飾為94 °C下3分鐘，30循環於94 °C、55 °C及72 °C分別為1分鐘、1分鐘及1分10秒，最後72 °C下7分鐘，取出5 μL之PCR產物與1 μL之6X sample buffer混合後，以水平電泳槽進行電泳，膠體經ethidium bromide染色後，於紫外燈下觀察並照相。

於9株由龍膽所分離之鏈球菌中計有7株分別為99u1649、99u1727、99u2275、100u2683、100u2968、100u3022及100u4056有約870 bp之產物，而99u3039及100u3180則無產物(圖5)。另將部份產物電泳染色後於波長365 nm之紫外燈觀察箱中(UV-illuminator)，使用乾淨之切片刀切下該DNA片段，並以gel extraction kit進行回收(QIAquick Gel Extraction kit，Qiagen，編號28740)。回收後之DNA片段以分光光度計測量後定量為20 ng/μL。使用pGEM-T vector system (Promega corporation，Madison，WI，USA)進行ligation，已完成ligation之載體(pGEM-T vector加DNA)，以DH-5α進行轉殖(transformation)。並將轉殖成功之菌體送定序公司定序，其序列於<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>進行比對。其比對結果與*Streptococcus iniae*相同度達99%。

2.dnaJ gene 分析：

依據Itoh等人之研究方法分析dnaJ gene之核苷酸序列，使用之引子分別為ST-F 5'-GAA ATC AAA AAR GCT TAT CG-3'及ST-R 5'-AAR AAR CCT TTT TTC TTT GGA T-3'，菌體genomic DNA依照Viogen kit中之細菌核酸抽取方法進行(自配LRS solution)，PCR反應條件為94 °C下3分鐘，35循環於94 °C、50 °C及72 °C分別為30秒、30秒及1分鐘，最後72 °C下7分。於調查中之9株皆有產物(如圖6)，其產物經gel extraction kit進行回收並經轉殖(transformation)後送定序，片段之大小分在1080 bp至1025 bp之間，其各別大小分別為99u1649 (1044 bp)、99u1727 (1046 bp)、99u2275 (1046 bp)、99u3039 (1025 bp)、100u2683 (1046 bp)、100u2968 (1080 bp)、100u3022 (1046 bp)、100u3180 (1025 bp)、100u4056 (1046 bp)，並經由<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>比對後99u1649、99u1727、99u2275、100u2683、100u2968、100u3022及100u4056與accession AB238712.1相似度達98%以上屬於*Streptococcus iniae*，而99u3039、100u3180與accession AB238696核苷酸序列其相同度為98%以上屬於*Streptococcus agalactiae*。所得之dnaJ gene核苷酸序列片段經由omiga 2.0軟體比較後其核苷酸序列之相同度百分比如(表5)。

3.P14引子分析：

以p14 (P14:5'-GAT CAA GTC C-3')引子對調查病例進行聚合酶鏈鎖反應[4，14]，其反應條件為94 °C下3分鐘，35循環於94 °C、42 °C及72 °C分別為1分鐘、1分鐘及1分20秒，最後72 °C下5分鐘，屬於*S.agalactiae*之99u3039及100u3180則無約750 bp之產物，編號99u1649、99u1727、99u2275、100u2968及100u4056等其產物相似且具有約750 bp之產物。

八、人工感染試驗

於裝有60公升海水之橘色塑膠桶中，各濃度皆使用3尾，體長約12-15公分之龍膽石斑，各組皆以26號針腹腔注射，實驗中維持良好之水質，並連續觀察10天，其結果(如表6)，接種後如於48小時內之急性死亡，其脾臟明顯腫大，腹腔有少許之纖維素，於臟器抹片中大量球狀之細菌分佈於血球間及吞噬細胞內，切片上很少見心外膜炎及腦膜炎，但可於脾、腎等器官見炎症細胞浸潤及大量球菌菌塊出現。

九、治療與追蹤

各病例中所分離之鏈球菌並未出現明顯抗藥性菌株，因此建議業者以口服Amoxicillin (40mg/每公斤魚重/天)或Erythromycin (50 mg/每公斤魚重/天)連續7-14天，同時改善養殖環境，如適度換水、增加溶氧、降低水中之氨-氮及亞硝酸-氮值等。並建議業者將病死魚隻做適當處理，勿隨意丟棄於池邊或排水溝造成二次污染，所使用之器具應消毒處理後方可再使用。經環境改善與抗生素治療後大多可獲明顯改善，但仍有3個病例於停藥後之2星期仍再復發，因此本病之治療仍應謹慎追蹤觀察。

十、討論

於99及100年間本所(處)共受理龍膽鏈球菌感染症病例分別有32及37件，分別佔全年病例數之0.67 % (32/4757) 及0.65 % (37/5708)，99年所發生季節全於高水溫之夏季(6-10月間)，但於100年病例中有些發生於較低水溫計有1例。此狀況與其它魚種感染相似，皆好發於高水溫期，結果顯示已有部份菌株於高鹽度下(6.5 %)仍生長良好，顯示本病往後於純海水養殖中將更易傳播。永安、彌陀地區附近有永安濕地、彌陀海濱遊樂區，可提供各種野鳥良好之棲息地，近年來本區流浪狗數量漸增多加以動保法之實行，使得本區疫病之發生已如生物時鐘出現。

本區域於龍膽所發生之鏈球菌種(*S.iniae*、*S.agalactiae*)亦可能引起人類之蜂窩性組織炎(cellulitis)之報告[15]，彌陀地區某養殖業者因疑似感染鏈球菌而造成手局部發炎而送醫治療之經驗，因此亦於講習宣導中常呼籲業者，於處理治療鏈球菌感染症之魚隻，除遵守水產動物用藥使用規範外，於養殖及捕獲出售過程應留意人魚共通傳染問題。

細菌之鑑定上*S.iniae*與*S.agalactiae*使用*dnaJ* gene之核苷酸序列之相同度百分比(約70-80 %之相同度)與16s rRNA gene相較更易區別，因此本段序列有裨益於往後鏈球菌鑑定之參考。人工接種實驗中顯示大部份之菌株於低濃度之菌量即可導致體長約12-15公分之龍膽於短時間內(通常於60小時)死亡，證實這些菌株對於養殖龍膽產業會造成影響。

Kim 2007等人之研究顯示 *Streptococcus iniae* 可於海洋所捕獲之下雜魚中如 *Mysidacea Neomysis awatschensis*、*Japanese Anchovy Engraulis japonicus*及*Pacific cutlass Trichiurus lepturus*等魚種，研究中以培養方法確認內臟含有*S.iniae*。且Evans *et al.*, 2004 研究中顯示*S.agalactiae*於冰凍下仍可穩定存活，因此目前龍膽養殖亦有可能發生於以下雜魚為餌料而造成鏈球菌感染。

於100u4045病例中，病菌經鑑定為*S.iniae*，且現場觀察養殖環境與水質檢驗皆相當良好，魚隻體型亦較99u1649及100u2968為大，人工感染死亡情況數據中與其它病例相似，但現場之死亡率與其它由*S.iniae*所引起之病例有明顯偏高。Siwiki 2001研究中顯示iridovirus會影響吞噬細胞活性(macrophage activity)，推論可能megaloctyivirus亦如同其它之iridovirus可能對龍膽之免疫系統亦會造成某程度之影響。因此當感染疾病時維持良好之養殖環境以增強魚隻免疫力是相當重要。

鏈球菌於本省養殖漁業危害已久[3]且近數年來有漸趨嚴重之情勢，尤其養殖金目鱸、吳郭魚、烏魚等[1]，目前國內防治僅能大量使用抗生素治療，且由經驗顯示常會復發，因此不但細菌容易產生抗藥性，同時易造成藥物殘留問題及增加養殖成本。疫苗免疫在大規模商業養殖工業中扮演著相當重要的角色，國際上，已有多家公司如Intervet International(荷蘭)、Novartis Animal Health(瑞士)、Schering-Plough Animal Health(美國)、Pharmaq(挪威)以及Bayer Animal Health(Bayotek) Microtek等投入全球的水產疫苗產業。挪威的鮭魚經驗就是水產疫苗成功的例證，大日本製藥的「虹彩病毒·鏈球菌混合不活化疫苗ビケン」商品為例，目前疫苗使用的普及率，在紅甘鰺約40 %、縱帶鰺約50 % [2]，因此基於公共衛生，疫苗之研發及使用有其迫切性。

十一、參考文獻

- 1.王翠嶺、陳木榮、李朝全。吳郭魚、虱目魚無乳鏈球菌感染症。動物衛生報導92-101，2003。
- 2.周信佑。石斑魚健康種苗之建立與疫苗開發策略。農業生技產業季刊 15: 47-50，2008。
- 3.董明澄 陳石柱 蔡信雄。臺灣南部箱網養殖吳郭魚之鏈球菌感染。農委會漁業特刊：魚病研究專集 4: 95-105，1985。
- 4.Brachrach, Zlotkin GA, Hurvitz A, Evans DL, Eldar A. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. Applied and environmental microbiology 67: 3756-3758, 2001.
- 5.Chao CB, Yang SC, Tsai HY, Chen CY, Lin CS, and Huang HT. A nested PCR for the detection of grouper iridovirus in Taiwan (TGIV) in cultured hybrid grouper, giant seaperch and largemouth bass. Journal of Aquatic Animal Health 14: 104-113, 2002.
- 6.Duremdez D, Al-Marzouk A, Qasem JA, Al-Harbi A, and Gharabally H, Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (euphrasen), in Kuwait. Journal of Fish Disease, 27: 307-310, 2004.
- 7.Evans JJ, Klesius PH, Gilgert PM, Hoemaker CA, Al. Sarawi MA, Landsberg J, Duremdez

- R, Marzouk AAI, and Zenki SAI. Characterization of α -hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, Sparus auratus L., and wild mullet, Liza klunzingeri (day), in Kuwait. Journal of Fish Disease 25: 505-513, 2002.
8. Evans JJ, Alyssa A, Wiedenmayer PHK, and Shoemaker CA. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. Aquaculture 233: 15-21, 2004.
9. Gould AR, Hyatt AD, Hengstberger SH, Whittington RJ, Coupar BEH. A polymerase chain reaction (PCR) to detect epizootic haematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus. Diseases of Aquatic Organisms 22: 211-215, 1995.
10. Hoshina, Sano TT, and Morimoto Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. Journal of Tokyo University fisheries 44: 57-58, 1958.
11. Itoh Y, Kawamura Y, Kasai H, Shah MM, Nhung PH, Yamada M, Sun X, Koyana T, Hayashi M, Ohkusu K, and Ezaki T. *dnaJ* and *gryB* gene sequence relationship among species and strains of genus streptococcus. Systematic and Applied Microbiology 29: 368-374, 2006.
12. Kaige N, Miyazaki T, and Kubota SS. The pathogen and the histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. Fish Pathology 19: 173-179, 1984.
13. Kim JH, Gomez DK, Choresca Jr CH, and Park SC. Detection of major bacterial and virus pathogens in trash fish used to feed cultured flounder in Korea. Aquaculture 272: 105-110, 2007.
14. Lahav D, Eyngo M, Hurvitz A, Ghittino C, Lubin A, Eldar A. *Streptococcus iniae* type II infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms 62: 177-180, 2004.
15. Lau SKP, Woo PCY, Tse H, Leung KW, Wong SSY, and Yuen KY. Incasive *Streptococcus iniae* infections outside north America. Journal of Clinical Microbiology 41:1004-1009, 2003.
16. Mata AI, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayza JF, and Gibello A. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. Veterinary Microbiology 101: 09-116, 2004.
17. Miyazaki T, Kubota SS, Kaige N, and Miyashita T. A histopathological study of streptococcal disease in tilapia. Fish Pathology 19: 167-172, 1984.
18. Muzquiz JL, Royo FM, Ortega C, De Blas I, Ruiz I, and Alonso JL. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 19: 114-119, 1999.
19. Perera RP, Collins MD, Johnson SK, and Lewis DH. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* X *T. aurea*. Journal of Aquatic Animal Health 6: 335-340, 1994.
20. Perera RP, Johnson SK, and Lewis DH. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture 152: 25-33, 1997.
21. Robinson JA, and Meyer FP. Streptococcal fish pathogen. Journal of bacteriology 92: 512, 1996.
22. Siwicki A, Pozet F, Morand M, Terech-Majewska E, and Bernard D. Pathogenesis of iridovirus: In vitro influence on macrophage activity and cytokine-like protein production in fish. Archives of Polish Fisheries 70: 451-456, 2001.

表1 調查病例其鹽度、總氮-氮、亞硝酸-氮、pH及發生季節，測定時間皆為上午9-11點間

病例編號	鹽度(%)	總氮氮	亞硝酸氮	pH	發生季節
99u1649	3.2	0.2	0.3	7.56	夏
99u1727	3.4	0.1	0.1	7.68	夏
99u2275	3.1	0.2	0.2	7.99	夏
99u3090	3.0	0.1	0.2	7.89	夏
100u2683	3.5	0.2	0.2	7.85	夏
100u2968	3.0	0.3	0.5	7.37	夏
100u3022	2.9	0.5	0.5	7.53	夏
100u3180	3.0	0.1	0.02	7.87	夏秋
100u4056	3.5	0.1	0.05	7.80	秋

表2 調查病例於API 20 Strep生化反應 24小時之結果

編號	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	β HEM
99u1649	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
99u1727	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
99u2275	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
99u3039	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100u2683	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
100u2968	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
100u3022	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
100u3180	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
100u4056	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+

表3 各分離菌株之耐鹽度試驗結果

編號	NaCl 含量	1%	3%	6.5 %
99u1649		+	+	-
99u1727		+	+	+(生長慢)
99u2275		+	+	+
99u3039		+	+	+(生長慢)
100u2683		+	+	+
100u2968		+	+	+
100u3022		+	+	+(生長很慢)
100u3180		+	+	+(生長慢)
100u4056		+	+	+

+：表示細菌正常生長 -：表示細菌無生長

表4 調查病例藥物敏感試驗結果

編號	藥物種類 抑制圈(mm)	Erythromycin	Amoxicillin	Florfenicol	Oxytetracycline
99u1649		22	28	21	24
99u1727		22	25	22	24
99u2275		23	26	22	23
99u3090		25	28	25	25
100u2683		16	20	19	20
100u2968		23	25	23	26
100u3022		23	24	23	22
100u3180		19	20	20	17
100u4056		23	24	23	22

Erythromycin 藥物濃度15 ug 敏感範圍(mm) ≥ 23 mm、Amoxicillin藥物濃度30 ug敏感範圍(mm) ≥ 20 mm、Florfenicol 藥物濃度30 ug 敏感範圍(mm) ≥ 19 mm、Oxytetracycline 藥物濃度 30 ug敏感範圍(mm) ≥ 19 mm。

表5 各病例之 *dnaJ* gene其核苷酸序列之相同度百分比

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	100	99	99	77	99	99	99	99	78	76	99	100u2683
2		100	99	77	99	99	99	99	78	76	100	100u2968
3			100	77	99	99	99	99	78	76	99	100u3022
4				100	78	77	77	77	99	98	75	100u3180
5					100	100	99	99	78	76	100	100u4056
6						100	99	99	78	76	100	99u1649
7							100	99	78	76	99	99u1727
8								100	78	76	99	99u2275
9									100	98	75	99u3039
10										100	76	ab238696
11											100	ab238712

表6 調查部份病例人工接種死亡數量

死亡數 菌量	編號	99u1649	99u3039	100u4056	100u3180
10^8			3		
10^7			2		
10^6		3	1	3	3
10^5		3	0	3	3
10^4		3		3	3
10^3		3			3
10^2					
10^1					

各組3尾 框內為接種後之死亡數



圖1 解剖上於肝表面常可見白色纖維素與腹水出現。

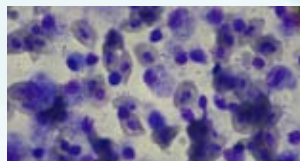


圖2 龍膽脾臟之抹片染色觀察，可見球狀之細菌分布於血球間及吞噬細胞內。



圖3 培養48小時後之99u3039 (右邊培養基) 於BHI之生長情形。其生長速度較其它菌株緩慢。

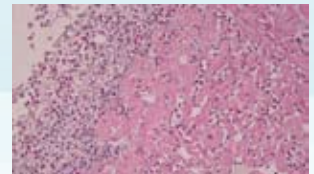


圖4 心外膜炎 (epicarditis)，其炎症細胞主要以單核炎症細胞為主。

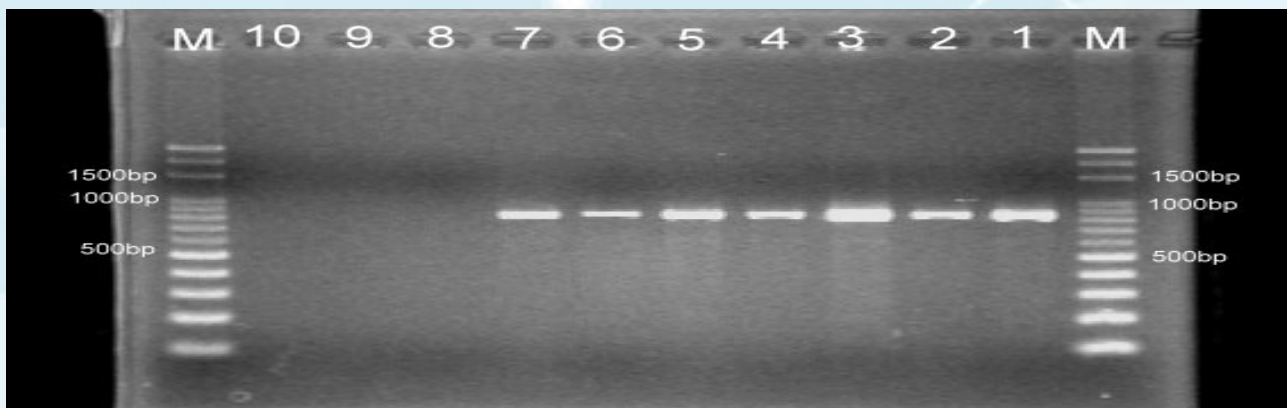


圖5 *lctO* gene 產物電泳分析，除99u3039 (lane 8) 及100u3180 (lane 9) 之外其它菌株皆有產物，lane 10 (陰性對照)，M：100 bp ladder marker。

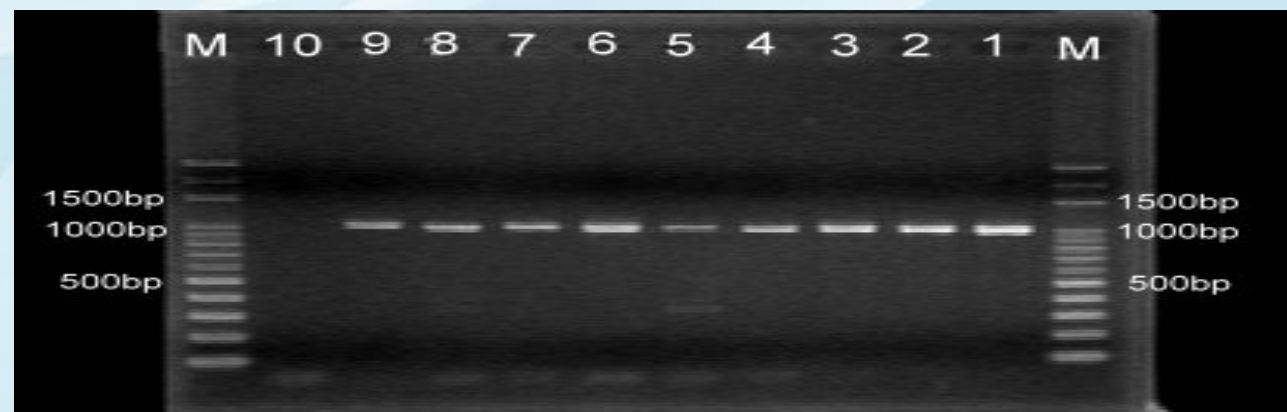


圖6 Itoh 等人之研究方法分析 *dnaJ* gene 各菌株之PCR結果皆有產物，1:99u1649、2:99u1727、3:99u2275、4:99u3039、5:100u2683、6:100u2968、7:100u3022、8:100u3180、9:100u4056、10: negative control、M: 100bp ladder marker。



鱘龍魚鏈球菌及親水性 產氣單胞菌複合感染病

(Co-infection of *Streptococcus iniae*
and *Aeromonas hydrophila* in Sturgeon)

林洋演、劉冠志、童莉娜、謝弘斌、黃國榮

報告日期:101年6月19日

一、前言

鱘龍魚屬於硬骨魚綱，魚體為軟骨魚，有硬鱗，在地球上已存活一億四千多萬年，由於頑強的耐受力，能抵抗大自然變遷和氣候的變化，依然保留古時期魚類基本特徵，所以有「水中活化石」之稱。鱘龍魚除肉、骨、魚卵外，其鰓、皮、肝、胃等均為可利用，全身利用率高達90%以上，肉質鮮美故屬於高經濟價值之魚種，目前臺灣已有許多業者引進及養殖。

鏈球菌 (*Streptococcus*) 為革蘭氏陽性菌，Hoshina於1958年發表虹鱘感染此菌病例，此報告是魚類感染鏈球菌症首例 [6]，此後便有許多相關報告陸續被提出，本病遂成為魚類一種重要疾病，本菌感染症常爆發於高水溫季節，並造成養殖業者嚴重經濟損失。

產氣單胞菌 (*Aeromonas*) 在水中為一種常在細菌，呈桿狀，具單端鞭毛，有運動性，在水產動物疾病中極為常見，於魚隻健康狀態不佳時，細菌會侵入魚體，常引起赤鰭病 (red fin disease)、紅嘴病 (red mouth disease)、腸炎、出血性敗血病、立鱗病、及青蛙的紅腿病 (red-leg disease) 等 [3]。

二、病歷

本處自去年 (100年) 10月中旬接獲三峽一養殖場鱘龍魚異常死亡通報本處。該場所飼養品種為雜交鱘，魚齡大約8個月，共飼養約2千尾；畜主敘述於1-2月前開始可見到發病魚隻游泳無力、魚體變白及死亡，之後每日皆有3-4尾不等零星死亡 (累積死亡率17.5%)，業者曾自行將病魚進行隔離，以BKC及優碘消毒養殖池，使用Oxolinic acid投藥也都無法改善疫情，畜主遂於10月14日將剛死亡之4尾鱘龍魚送至本處進行檢驗。

三、臨床症狀

病魚呈現游泳緩慢、無力、體色異常、鰓充血等非特異性症狀。

四、肉眼病變

- 1.外觀：體色蒼白，肛門、胸鰭、腹鰭基部充出血或潮紅，魚體表面有粘液增加之情形 (圖1)。
- 2.腹腔：暗紅色腹水 (圖2)。
- 3.鰓：鰓絲充血、黏液增厚。
- 4.腎臟：充血潮紅及腫大。
- 5.肝臟：散發大小不一出血點 (圖3)。
- 6.心臟：心外膜散發大小不一白色結節 (圖4)。

五、初步診斷

根據病歷、臨床症狀及肉眼病變，初步懷疑為細菌所造成之細菌性敗血症或其他病毒引起之點狀出血及壞死相關疾病，或是會造成內臟肉芽腫之菌類。

六、組織病變

- 1.脾臟：多發局部凝固樣壞死，壞死病灶中出現細菌團塊 (圖5、圖6)。
- 2.肝臟：多發局部凝固樣壞死，壞死灶中心之肝索結構消失並伴隨有大量紅血球之出現 (圖7)。
- 3.腎臟：局部區域之腎小管上皮細胞呈現凝固樣壞死 (圖8)。

4.肌肉：肌肉組織呈現局部廣泛性之岑克氏變性(圖9)。

七、實驗室檢驗

(一) 寄生蟲學檢查

濕壓片鏡檢：自病魚鰓部剪取部分初級鰓薄板進行壓片檢驗，可見病魚鰓部黏液增厚，此外並未見到有外寄生蟲感染。

(二) 微生物學檢查

細菌培養：自病魚之心臟、肝臟、脾臟及腎臟進行鈎菌，培養於Blood Agar 及MacConkey Agar，置於室溫下培養24-48小時，觀察菌落生長狀況及選取獨立菌落，進行革蘭氏染色、過氧化氫酶試驗 (Catalase test) 及氧化酶試驗 (Oxidase test) 等相關生化試驗。脾臟及肝臟於Blood Agar培養出直徑大小約1.0-1.5 mm之灰色菌落，可形成 β 溶血現象(圖10)，此菌落以革蘭氏染色為陽性球菌，Catalase test為陰性反應，以API 20 Strep Kit進行生化鑑定，結果為*Streptococcus* spp. (表1)；此外肝臟及腎臟於MacConkey Agar上培養出直徑大小約1.5-2.0 mm之粉紅色菌落(圖11)，此菌落以革蘭氏染色為陰性菌，Oxidase test為陽性反應，以API 20 NE Kit進行生化鑑定，結果為*Aeromonas hydrophila* (表2)。

(三) 抗酸染色 (Acid fast stain)

於心臟結節及其他臟器病灶處直接製作塗抹片，進行抗酸染色，於顯微鏡鏡檢下並無見到如分枝桿菌及奴卡氏菌等抗酸菌。

(四) 分子生物學檢測

1. 細菌分子生物學檢測：

將分離到的2株細菌送至明欣生物科技公司，以PCR增殖放大16S rDNA片段序列進行定序，將定序後核苷酸序列之結果與PubMed BLAST進行比對，鑑定結果分別為*Streptococcus iniae*及*Aeromonas hydrophila* (表3、表4)。

2. 病毒分子生物學檢測：

將所採集之組織以商品化純化套組萃取核酸，將所得之DNA及RNA分別應用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction；PCR) 及反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction；RT-PCR) 做病原檢測，本次檢測中所使用之核酸序列引子如表5。

(1) 嘉納虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus；RSIV) 及傳染性脾腎壞死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus；ISKNV) PCR反應條件：Pre-denaturation 95 °C，5分鐘；接著進行34個循環，每個循環包括三步驟 (94 °C 變性作用 (denaturation) 30秒、58 °C 黏合作用 (annealing) 60秒及72 °C 聚合作用 (extension reaction) 60秒)，最後以72 °C、10分鐘之final extension reaction後結束反應，預期大小產物為570 bp。

(2) 神經壞死病毒 (Nodavirus) RT-PCR反應條件：Pre-denaturation 94 °C，2分鐘；接著進行29個循環，每個循環包括三步驟 (94 °C 變性作用 (denaturation) 40秒、50 °C 黏合作用 (annealing) 40秒及72 °C 聚合作用 (extension reaction) 40秒)，最後以72 °C、7分鐘之final extension reaction後結束反應，預期大小產物為426 bp。

反應產物以2 %瓊脂膠片於100伏特下進行電泳30分鐘後，將瓊脂膠片置於0.5 μ g/mL ethidium bromide溶液中染色10分鐘，再以清水退染，經數位化影像分析系統，於紫外光下觀察，結果iridovirus及nodavirus無預期產物(圖12、圖13)。

(五) 電子顯微鏡檢查

將病魚臟器乳劑製成超薄切片經負染色後以穿透式電子顯微鏡觀察，並無見到任何病毒顆粒存在。

八、類症鑑別

本病例魚隻體表及實質臟器有多發出血點，須與細菌感染造成之敗血症區別，且肉眼可見病魚心臟心外膜散發大小不一白色結節，所以仍須與會造成內臟肉芽腫病變之奴卡氏菌症、分枝桿菌症及癰瘡病等作區別診斷(表6)。

九、最終診斷

本病例報告綜合上述病歷、臨床症狀、肉眼病變、組織病理學檢查及實驗室檢驗等結果，最終診斷為鱒龍魚鏈球菌及親水性產氣單胞菌複合感染病 (Co-infection of *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila* in Sturgeon)。

十、抗微生物劑感受性試驗

將分離之細菌使用6種微生物劑紙錠片進行抗微生物藥品感受性試驗，包括:Amoxicillin (AML10)、Ampicillin (AP10)、Flumequine (UB30)、Tetracycline (TE30)、Sulphamethoxazole (RL25)、Oxolinic acid (OA2)，結果對*Streptococcus iniae*具感受性藥物為Amoxicillin、Ampicillin及Tetracycline，對*Aeromonas hydrophila*具感受性藥物為Flumequine、Oxolinic acid及Tetracycline (表7、表8)。

十一、處理與預防

- 1.依據抗微生物劑感受性試驗結果，本處隨即建議畜主可使用有感受性藥物進行治療，以控制鏈球菌及親水性產氣單胞菌感染，同時也提醒畜主需依據我國水產動物用藥品使用規範，注意藥物投藥之用法、用量及停藥期等相關規定。
- 2.一般而言疾病發生與環境及動物生理上的緊迫有關，因此本處告知畜主降低每池飼養密度、定期清池及消毒養殖池在預防疾病感染上相當重要。
- 3.對於鏈球菌，國內目前尚未有商品化疫苗 [1]。

十二、疫情追蹤調查

於2011年10月28日及11月4日再次拜訪該場，建議可使用之藥物治療，畜主表示已加強飼養管理並將已發病魚隻隔離及淘汰，減少緊迫發生，後因天氣轉涼水溫降低，雖仍有零星魚隻死亡情形，但數目已較之前大為減少，顯示疫情已趨緩。

十三、討論

鏈球菌為革蘭氏陽性球菌，屬於乳桿菌目(Lactobacillales)、鏈球菌科 (Streptococcaceae)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)。鏈球菌感染症於魚類最早是在日本1957年養殖虹鱒 (rainbow trout) 被發現，此後有許多相關報告陸續被提出，魚種範圍相當廣泛，分布於亞洲、澳洲、歐洲及美洲，且包括海水魚、半鹹水魚及淡水魚。此外不論野生魚隻或養殖魚隻皆有感染報告。由此可知魚類鏈球菌感染症，是一種遍及全世界的重要魚類疾病。本病造成主要病原有*Streptococcus iniae*、*Streptococcus agalactiae*及*Lactococcus garvieae*等，其中*Str. iniae*及*Str. agalactiae*皆有感染人之病例，屬於人畜共通傳染病 [1]。

*Str. iniae*以BHIA在30℃下培養24小時可見直徑1 mm的菌落。不產生catalase，但會產生alkaline phosphatase、arginine dihydrolase、 β -glucuronidase、pyrrolidonylarylamidase和leucine arylamidase等酵素。可生長於37℃的環境中，而在10或45℃不生長；於含40%膽鹽的環境下或含6.5%氯化鈉的環境中不生長，但會生長於pH 9.6的環境中。根據南區魚病中心的研究發現本菌在含5%氯化鈉的環境中仍可生長 [1]。

根據國外報告魚類鏈球菌感染症大多好發於夏季或水溫高季節，冬季則呈散發狀態 [8]，此情形與臺灣南部養殖魚類鏈球菌感染症常發生於夏季高水溫情形相似。此菌於高水溫時，生長情況良好，可在水中大量存在，加上高密度之養殖環境，導致魚隻感染的機會增加。在低水溫季節，此菌發育情形不佳，便潛藏於底泥之中伺機感染魚隻 [2]。

感染本菌魚隻於臨床上會有體色變黑 (darkening)、浮游於池面、異常泳姿及倦躺於池邊。剖檢上各種魚種主要可見體表多處出血病灶，部份魚隻可見眼球突出、角膜混濁、鰓蓋內充出血、鰓絲潮紅，腹水、脾臟腫大及肝臟充出血，另於金目鱸之鏈球菌感染症中偶可見肌肉出血等病變 [9]。顯微鏡檢下可見鰓上皮細胞剝離，並於二級鰓薄板微血管腔中見到球形之細菌，肝臟細胞則可見腫脹、空泡化及壞死等病變，脾臟有單核炎症細胞浸潤，淋巴球流失且被類上皮細胞所取代，心臟則有心外膜炎及心肌炎，金目鱸病例偶可見肌肉出血，肌肉呈均質樣變性 (hyaline degeneration) 並於肌束間可見球形細菌出現 [9]。

對於*Str. iniae*治療的建議用藥包括Ampicillin、Doxycycline、Erythromycin、Kitsamycin、Lincomycin、Oxytetracycline、Tetracycline及Spiramycin，另有報告提到Amoxicillin可有效控制鏈球菌之感染，其建議量為80 mg/kg body weight連續使用8-12天，如使用劑量及連續天數不足時，有可能會導致治療失敗 [4]；此外有研究報告提及此細菌之抗藥性可能會隨著每個養殖區域而有所不同，因此使用投藥前藥物敏感性試驗，來建議養殖場治療之藥物是有其必要性 [5]。於使用疫苗來預防控本疾病方面，國內目前尚未有疫苗上市可供防治使用，但國外已有相關研究，用於預防吳郭魚感染*Str. agalactiae* (group B) 上，且結果顯示已有相當程度之保護效果 [7]。

親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 為革蘭氏陰性桿菌，因具有極性的單鞭毛，使其具有移動性。多數所有年齡層之養殖魚類及野生淡水魚都對其具感染感受性，尤其是冷水魚類。此病原不會垂直感染，只會水平感染，且廣泛分佈於水中及池底沉積物，也可藉由腸道分泌物及皮膚損傷處傳播，此外寄生蟲損傷或上皮的黴菌感染也可引起細菌進入而導致感染。

臨床上由於受到感染的魚鰭部和軀體部皮膚呈現出血，所以通常被稱為赤鰭病 (red fin disease)，組織病理學變化可見到鰭部與軀幹之真皮層和胃部黏膜下層微細血管出血，肝細胞及腎小管上皮細胞變性，腎絲球體出血壞死且伴隨漿液性滲出液及纖維素蓄積。此外由於*A. hydrophila*易於腸道內繁殖，造成卡他性出血性腸炎，因其毒性代謝產物可經由腸道吸收而引起腸毒血症 [3]。

治療方面*A. hydrophila*對Chloramphenicol、Florfenicol、Tetracycline、Sulphonamide、Nitrofurantoin Derivatives與Pyridonecarboxylic Acids皆具感受性，但抗生素的濫用將增加*A. hydrophila*的抗藥性，目前已被發現抗藥性之菌種與攜帶轉移性R質體具有多重抗藥性的菌種廣泛分佈於養殖環境中 [3]。

預防及控制方面，由於*A. hydrophila*是經由養殖魚類的腸道、池底沉積物及富含有機物的池水中快速增殖傳播，所以此疾病的爆發通常和環境因子的改變極為相關，此外其他緊迫因子，包含溫度迅速改變、過度擁擠、高溫、營養不良、水中低含氧量及黴菌和寄生蟲感染等，上述等因素皆會促成魚體生理條件的改變且提高對*A. hydrophila*的感受性。

十四、致謝

本病例報告承蒙行政院農業委員會家畜衛生試驗所涂堅組長及蔡佳錚助理研究員、行政院農業委員會水產試驗所張志堅先生之協助與指導；以及鱒龍魚飼養畜主林先生配合採樣，謹此致謝。

十五、參考文獻

- 1.趙嘉本。鏈球菌感染症。水生動物疾病診斷系統網站。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。
- 2.蔡信雄、謝嘉裕、吳宗炳。石斑魚疾病防治。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版、行政院農業委員會南區魚病診斷中心、國立屏東科技大學獸醫學系編印，臺北，62-69，2007。
- 3.謝嘉裕。親水性產氣單胞菌。水生動物疾病診斷系統網站。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。
- 4.Darwish AM, Ismaiel AA. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. J Aquat Anim Health 15:209-214, 2003.
- 5.Darwish AM, PlaceCityHobbs MS. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in blue tilapia. J Aquat Anim Health 17:197-202, 2005.
- 6.Hoshina T, Sano T, Morimoto Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. Journal of Tokyo University of Fisheries 44: 57-68, 1958.
- 7.Joyce J, Evans A, Phillip H. Klesius B, Craig A. Shoemaker Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. Vaccine 22: 3769-3773, 2004.
- 8.Nguyen, H, Kanai TK, Yoshikoshi K. Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese

flounder *Paralichthys olivaceus* Fish Pathol 36: 40-41, 2001.

9. Tung MC, Chen SC, Tasi SS. General septicemia of streptococcal infection in Cage cultured Tilapia, *Tilapia mossambica*, in Southern Taiwan. COA fisheries series No4 Fish Disease Research VIII: 95-105, 1985.

表1 病魚脾臟及肝臟分離之細菌API20 Strep生化試驗結果

試驗項目	生化反應	試驗項目	生化反應
VP	-	ARA	-
HIP	-	MAN	-
ESC	-	SOR	-
PYRA	+	LAC	-
α GAL	-	TRE	+
β GUR	-	INU	-
β GAL	-	RAF	-
PAL	+	AMD	+
LAP	+	GLYG	+
ADH	+	β HEM	+
RIB	+		

表2 病魚肝臟及腎臟分離之細菌API20 NE生化試驗結果

試驗項目	生化反應	試驗項目	生化反應
NO ₃	+	MAN	+
TRP	-	NAG	+
GLU	+	MAL	+
ADH	+	GNT	+
URE	-	CAP	+
ESC	+	ADI	-
GEL	+	MLT	+
PNG	+	CIT	-
GLU	+	PAC	-
ARA	+	Oxidase	+
MNE	+		

表3 定序結果菌株為*Streptococcus iniae*

CGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAAT
CCGAAGTGAAGATTGGCTTTAAGAGATTAGCTTGCCGTCACCGGCTTGCGACTCGTTGTA
CCAACCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTATTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGC
AACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTCTGTCCCAGGAAATCCTATCTCTAGG
ACGGTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGT
ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTAAGCCCCGAAAGGGCCT
AACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC
CCACGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTTCGCCACCGGTG
TTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCCCTTCTGCAC
TCAAGTTCTACAGTTTCCAAAGCATACAATGGTTGAGCCACTGCCTTTTACTTCAGACTT
ATAGAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTCGAGACCTACG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGTTAGTTACCGTCACGTA

ATGGATTTTCCACTCCCATTACCGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAAC
CTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTCCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTC
TCAGGTCGGCTATGTATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATAAA
CGCAGGTCCATCTCATAGTGAAGCTTTTGTCTCTTTTAAATTGAGTACATGTGTACTCTA
GTGTCATGCGGTATTAGCTATCGTTTCCAATAGTTATCCCCCGCTATGAGGTAGGTTACCT
ACGCGTTACTACCCGTTTCGCAACTCTTTGGATTAGTGCAAGCACCAATCCTCAGCGTT
CTACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCTGA

表4 定序結果菌株為 *Aeromonas hydrophila*

CCGCAGCGTGAAAGTACGCGTTGCTACTTTTGCCTGTGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCA
GTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
GCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGGGAAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAG
GTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCC
CCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCTTGTGACG
TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATC
CTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGTCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGG
TGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGC
GCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCCAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTC
GACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGATTCA
TGACTGGGGTGAAGTCG

表5 本報告中聚合酶鏈鎖反應使用之引子

Pathogen	Primer	Sequences (5' to 3')	Size of Product (bp)
Iridovirus	IF	CTC AAA CAC TCT GGC TCA TC	570 bp
	IR	GCA CCA ACA CAT CTC CTA TC	
Nodavirus	F2	CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT	426 bp
	F2	CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT	

表6 類症鑑別

病名	病因	病變
鏈球菌症 (Streptococciosis)	<i>Streptococcus</i> spp.	魚隻體表可見多處出血病灶、肝臟充血、脾臟腫大、腹水、多發性漿膜炎、偶有肌肉發炎及出血。
親水性產氣單胞菌症	<i>Aeromonas hydrophila</i>	魚體鰭部及軀體皮膚出血、易於腸道內繁殖造成出血性卡他性腸炎、肝細胞及腎小管上皮細胞變性、腎絲球體出血伴隨漿液性滲出液及纖維素蓄積。

乳酸球菌症	<i>Lactococcus garvieae</i>	魚隻眼球周圍、鰭基部、肛門周圍及嘴部出血，腹水，內臟有不同程度出血，脾局部壞死，組織病理切片下可見眼球廣泛性纖維素性炎症反應，眼球廣泛出血，腦炎，腦膜炎。
分枝桿菌症 (Mycobacteriosis)	<i>Mycobacterium</i> spp.	魚隻體表出血或潰瘍，多重器官(尤其是脾臟及腎臟)的白色肉芽腫病變，組織病理學切片下亦可發現內臟有多發性肉芽腫病變，以Ziehl-Neelsen抗酸染色可見陽性抗酸分枝桿菌存在。
奴卡氏菌症 (Nocardiosis)	<i>Nocardia</i> spp.	病魚典型病變為皮膚潰瘍，在鰓部、腎臟、心臟、肝臟及脾臟形成肉芽腫病變，骨骼肌局部壞死，以Fite抗酸染色，可見呈現串珠樣弱陽性反應。
癰瘡病 (Furunculosis)	<i>Aeromonas salmonicida</i>	病魚有厭食、皮膚潰瘍及高死亡率等臨床症狀，和弗朗西斯氏菌症非常相似，需做區別診斷，此外脾臟、腎臟及心臟有肉芽腫病變。

表7 *Streptococcus iniae*抗微生物劑感受性試驗結果

Antimicrobial agents	Potency	Inhibitory zone (mm)	Resistance zone (mm)	Intermediate zone (mm)	Susceptibility zone (mm)
Amoxicillin	10 μ g	25	≤ 11	12-19	≥ 20
Ampicillin	10 μ g	30	≤ 18	19-21	≥ 22
Flumequine	30 μ g	0	≤ 16	17-19	≥ 20
Oxolinic acid	2 μ g	0	≤ 10	-	≥ 11
Sulphamethoxazole	25 μ g	0	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetracycline	30 μ g	20	≤ 14	15-18	≥ 19

表8 *Aeromonas hydrophila*抗微生物劑感受性試驗結果

Antimicrobial agents	Potency	Inhibitory zone (mm)	Resistance zone (mm)	Intermediate zone (mm)	Susceptibility zone (mm)
Amoxicillin	10 μ g	0	≤ 11	12-19	≥ 20
Ampicillin	10 μ g	0	≤ 18	19-21	≥ 22
Flumequine	30 μ g	28	≤ 16	17-19	≥ 20
Oxolinic acid	2 μ g	25	≤ 10	-	≥ 11
Sulphamethoxazole	25 μ g	13	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetracycline	30 μ g	21	≤ 14	15-18	≥ 19



圖1 體色蒼白，肛門、胸鰭、腹鰭基部充出血或潮紅



圖2 腹腔可見暗紅色腹水



圖3 肝臟散發大小不一出血點



圖4 心外膜散發大小不一白色結節

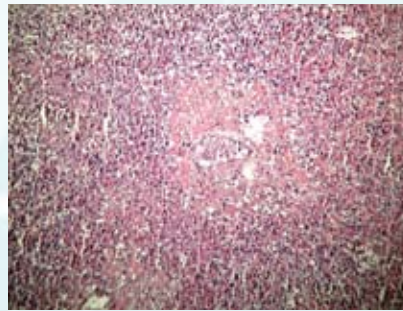


圖5 脾臟多發局部性壞死，病灶區壞死部位呈現粉紅色均質樣之凝固樣壞死病變 (H&E stain)。

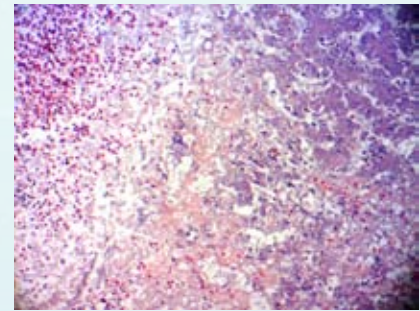


圖6 脾臟多發局部凝固樣壞死病灶中有細菌團塊的出現，發生凝固樣壞死之細胞則為包圍菌塊而環繞組成之巨噬細胞 (H&E stain)。

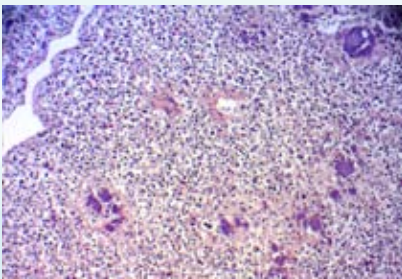


圖7 肝臟多發局部凝固樣壞死灶，壞死灶中心之肝索結構消失並伴隨有大量紅血球之出現 (H&E stain)。

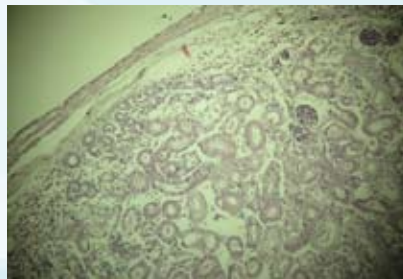


圖8 腎組織局部區域之腎小管上皮細胞呈現凝固樣壞死 (H&E stain)。

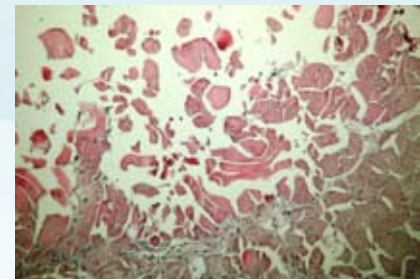


圖9 肌肉組織呈現局部廣泛性之岑克氏變性 (H&E stain)。

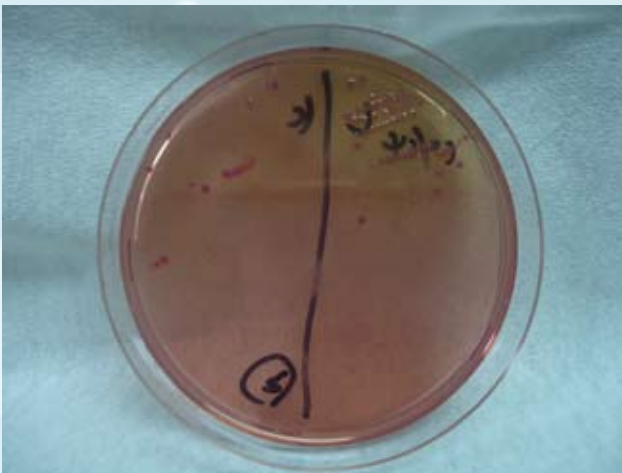


圖10 病魚脾臟及肝臟於Blood Agar培養出直徑大小約1.0-1.5 mm之灰色菌落，可形成 β 溶血現象。



圖11 病魚肝臟及腎臟於MacConkey Agar上培養出直徑大小約1.5 -2.0 mm之粉紅色菌落。

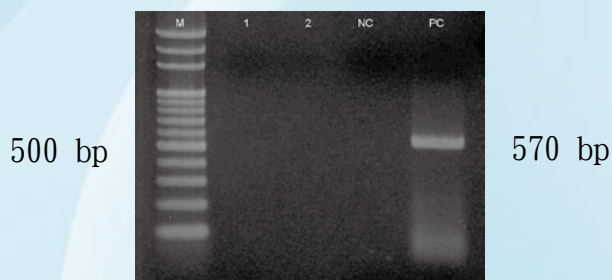


圖12 以PCR檢測RSIV及ISKNV之電泳結果:
Lane M: 100 bp marker
Lanes 1-2: samples
Lane NC: negative control
Lane PC: positive control

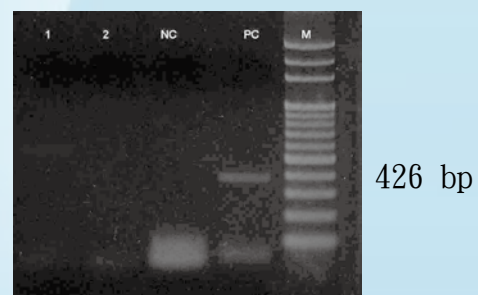


圖13 以RT-PCR檢測Nodavirus之電泳結果:
Lane M: 100bp marker
Lanes 1-2: samples
Lane NC: negative control
Lane PC: positive control

目錄

臺東縣動物防疫所病例報告

02 | 山羊肝蛭與化膿性支氣管性肺炎及其他寄生蟲性疾病混合感染症

高雄市動物保護處病例報告

09 | 養殖龍膽鏈球菌感染症

新北市政府動物保護防疫處病例報告

16 | 鱒龍魚鏈球菌及親水性產氣單胞菌複合感染病

發行單位：雲林縣家畜疾病防治所

發行人：張鴻猷

地址：雲林縣斗六市雲林路二段517號

電話：05-5523250

編輯委員：邱垂章 蔡向榮 李淑慧 莊士德

陳秋麟 張志成 蔡信雄 張聰洲

執行編輯：黃安進 吳宣樺

設計印刷：曦望美工設計社

下載網址：<http://www4.yunlin.gov.tw/livestock>。

首頁 > 便民服務 > 表單下載。

本刊著作權屬發行單位，轉載、擷取需經著作權單位同意

