

2010年養殖魚類革蘭氏陽性球菌感染調查報告

嘉義縣家畜疾病防治所

彭郁棠、陳亮君、盧彥伶、鄒玉玲、黃羿萍、蔡明吉、翁有助

前言

魚類鏈球菌症在世界各主要水產動物養殖國家常發生，對溫帶、熱帶和亞熱帶地區養殖魚類危害更為嚴重。藉由形態學之觀察、生理生化試驗及結合16S rRNA分子生物學的基因序列分析方法，針對魚類鏈球菌症流行病學情況，如易感染之魚種、不同魚種易感染之病原菌種別、病原菌之分離鑑定及病原菌藥物敏感性試驗等各方面進行綜合鑑定，期望本調查報告有益於魚類鏈球菌診斷及治療。

背景

鏈球菌是一種廣泛分佈於自然界中的革蘭氏陽性球菌，許多國家和地區的水產養殖業均深受其害，遭受鏈球菌感染的魚類包括多種海水及淡水魚類，其中以溫水性魚類最為嚴重，且病原可在不同魚種間交叉感染，甚至可透過傷口感染人類。

鏈球菌不具有運動性、氧化酶(oxidase)試驗、過氧化氫酶(catalase)試驗呈陰性反應之革蘭氏陽性球菌。細菌直徑大小為0.7~1.4 mm，最適溫度為28~37℃。水溫降至20℃以下則較少發病，在高水溫季節，罹病魚隻之死亡高峰期可持續2~3週；在低水溫季節，病魚則是慢性發病或零星死亡，相對病程較長。

鏈球菌症臨床上一般呈現食慾不振、身體失去平衡、運動遲緩、單眼或雙眼突出，並伴隨眼睛出血和角膜混濁症狀(圖

1，圖2)，罹病魚隻常見在水面呈迴旋或狂游等神經症狀，肉眼可見體表、腹部及尾部出血，肝臟、膽囊及脾臟腫大，腸道和腹腔積水，腸黏膜充血出血等病症。在急性鏈球菌症發生時，大量鏈球菌透過血液循環迅速蔓延至各組織臟器，導致全身各臟器如肝、脾、腎、心臟、大腦、眼睛和腸道出現炎症反應及出血性病徵。

魚類之鏈球菌感染症主要由 *Streptococcus iniae* (SI) 和 *Streptococcus agalactiae* (SA) 所引起，由於鏈球菌症廣泛分佈於世界各地且爆發時造成嚴重經濟損失，因此，其防治的重點在於對病原快速準確鑑定，以及發病後之處理與預防。

材料與方法

1. 樣品收集

收集2010年嘉義縣家畜疾病防治所、東石檢驗中心及義竹防治中心送檢罹病魚隻病例，進行剖檢、病原菌分離培養及鑑定。首先進行外觀檢視，檢查是否有脫鱗、體表潮紅、眼睛混濁、充血及突眼等病變，再以蓋玻片刮取魚體表黏液與剪下的鰓絲作成濕壓片，以光學顯微鏡觀察，有無細菌、寄生蟲及黴菌等感染。操作解剖過程中，解剖器械以75%酒精棉花擦拭，經火焰消毒使其達無菌狀態，再進行剖檢觀察臟器肉眼病變，並將肝、脾、腎及腦等臟器作成塗抹片，並以劉氏 (Liu's stain) 及革蘭

氏染色法 (Gram's stain) 檢查。

2. 微生物培養

自罹病魚隻，以無菌白金耳 (loop) 從肝臟、脾臟、腎臟、眼睛及腦等病變處釣菌，接種於含 5 % 綿羊脫纖維血之 Blood agar plate (BAP, Difco) 等培養基，於 28 °C 下經 24~48 小時的培養，觀察菌落生長狀況及溶血現象選取獨立菌落，進行革蘭氏染色、過氧化氫酶試驗及氧化酶試驗。

3. DNA之萃取

由罹病魚隻所分離純化之革蘭氏陽性鏈球菌株，取單一菌落培養於 3 mL 之 Brain heart infusion broth (BHIB, Difco) 增菌 1 天，將菌液放至 1.5 mL eppendorf 中，以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，棄上清液，保留下層細菌團塊，加入 1 mL 滅菌蒸餾水震盪 30 秒，重複此步驟一次。再以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，棄上清液，保留下層細菌團塊，加入 250 μ L 滅菌蒸餾水震盪 30 秒。將 eppendorf 置於 100 °C 水浴中 10 分鐘，之後於 3,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液置入新的 1.5 mL eppendorf 內，此即為 DNA solution。

引子對係參考吳 (2003) 所設計 16S rRNA 之革蘭氏陽性鏈狀球菌引子對，針對魚隻有致病性的鏈狀球菌之 16S rRNA 部分基因片段作增幅，引子為 P1 (5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA AG-3') 及 P2 (5'-TTT GCT CCC CAC GCT TTC GAG-3')，預期增幅產物為 750 bp。

4. 聚合酶連鎖反應之進行

總反應容積為 50 μ L，其中包含

Sterile water 16 μ L、DNA solution 5 μ L、2x PCR buffer 25 μ L、primer F (10 μ M) 2 μ L 及 primer R (10 μ M) 2 μ L。其 PCR 反應程序如下，95 °C 5 分鐘 predenature，95 °C 1 分鐘 denaturation，55 °C 1 分鐘 annealing，72 °C 1 分鐘 extension，共 30 個循環，於 72 °C 10 分鐘 final extension，最後降溫至 4 °C。

5. 電泳分析

取 1 μ L loading dye 與 5 μ L 之 PCR 產物均勻混合後，加入含有 1.5 μ g/mL 之溴化乙錠 (ethidium bromide; EtBr, Sigma) 之 2 % agarose (Promega, USA) 之孔洞內，以 100 V 電壓進行電泳分析 30 分鐘，將膠片置於紫外燈下觀察並拍照。

6. 核苷酸序列分析、定序及親緣性關係

將定序之核苷酸序列輸入 GenBank 進行比對，並利用 DNASTAR 軟體分析。

7. 藥物敏感性試驗

本試驗是以紙錠擴散法測定鏈球菌對於各種抗菌劑之感受性。選用水產動物用藥品使用規範之抗菌劑分別為 Amoxicillin (AMC)、Doxycycline (DO)、Erythromycin (E)、Florfenicol (FFC) 及 Oxytetracycline (OTC) 等五種。

8. 結果分析

將判讀及比對結果，以 Microsoft Excel 2003 及 DNASTAR 軟體建檔及分析。

結果

1. 樣品收集及微生物培養

收集 2010 年嘉義縣家畜疾病防治