

雲林縣動植物防疫所病例報告

日本鰻愛德華氏病 (Japan Eel Edwardsiellosis)

黃糧期、張斐斐、杜弦逸、黃安進、廖培志

報告日期：104 年 7 月 3 日

一、前言

雲林縣為台灣目前飼養日本鰻的主要縣市之一，大多以活成鰻或半加工品外銷日本供為食用，多年來高居台灣魚類出口產值的前茅而極具經濟價值；目前養鰻所需之鰻苗，均由沿岸採捕鰻線馴養成鰻苗後，提供養殖業者放養，鰻線的採捕時間在每年 12 月至翌年 2~3 月於河川出海口或河口沿岸捕撈，因每年捕獲鰻苗數量無法控制，因此造成產量極不穩定，導致價格波動大。愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 在鰻魚細菌性疾病中是相當常見且重要的病原菌，台灣自 1976 年首度報告以來，一直是造成養鰻業者損失的主要原因之一，以水產動物疾病診療系統 (Treatment and Diagnosis System of Aquatic Animal Diseases, TDS) 統計本縣 94 年 1 月到 103 年 12 月這十年間日本鰻送檢病例，結果本病全年皆可發生，其中尤以每年的 3~5 月份最高。而本病主要流行在季節交替時，然水質不良、養殖現場管理不當等因素更是造成本病高發病率、高傳染力及高死亡率，而本病原菌可長存於養殖池中，除了早期發現即時投與有效之抗菌劑外，更須建立環境或病原菌例行性監測預警方式，才能有效預防及控制本病的發生。

二、病歷資料

本縣口湖鄉某一日本鰻魚養殖場，飼養業者表示該池於 102 年 12 月放養鰻魚苗，自 103

年4月27日即出現異常死亡，每日死亡約10~20多尾，直至送檢前已增加到每日50多尾，病魚有食慾減退、靠岸浮游、活動力減退、體表潰瘍穿孔等臨床症狀。業者於103年5月6日送檢2尾鰻魚及池水至本所位於台西之魚病檢驗站進行剖檢。該池發病日本鰻共飼養12,000尾，送檢平均重量約10尾/公斤（每尾100公克），至103年5月6日止共累計死亡約250餘尾，死亡率約2%，發病數量則因發病鰻魚躲藏於水中而難以估計。該池為土塘飼養，面積約為1.2分地，水深4呎，每日投餵浮料早晚各一次，每次約30公斤，就診前每天早晚餵飼添加Oxytetracycline 50%（150公克）藥物治療已連續3天，但未見明顯改善。

三、肉眼病變

送檢鰻魚平均體重約100公克，共2尾，解剖病變如下：

1. 外觀：病鰻腹部及肛門後方明顯膨大，體表皮膚可見明顯潮紅（圖1、圖2），肛門後方體壁有穿孔病灶，隱約可見內部臟器（圖2）。
2. 肝：肝臟明顯腫大、潮紅（圖3）。
3. 後腎：後腎明顯腫大、潮紅，並有小膿瘍病灶（圖4）。
4. 鰓：無明顯異常。

四、實驗室檢查

1. 水質檢查：總氮0.3 ppm、亞硝酸1.2 ppm、pH 8.1，判定為水質不良（亞硝酸濃度偏高）。
2. 濕壓片檢查：取鰓絲及體表黏液進行顯微鏡鏡檢，無寄生蟲寄生情形。
3. 肝臟塗抹片染色鏡檢：以劉氏染色鏡檢可見許多藍紫色短桿菌（圖5）。

五、初步診斷

依據病史、肉眼病變及實驗室檢查結果，初步診斷為日本鰻愛德華氏病。

六、組織病理學檢查

1. 肝臟：可見多發出血病變（圖 6），表面可見纖維素樣物質附著及單核炎症細胞浸潤，肝細胞間可見大量紅血球浸潤（圖 7）。
2. 後腎：腎小管間質可見少量紅血球浸潤及單核炎症細胞浸潤（圖 8）。

七、微生物學檢查

1. 細菌分離：由病鰻之肝臟及後腎，以無菌操作釣菌培養於血液培養基（Blood agar plate）及 MacConkey agargplate 上，於 25°C 下培養 24 小時，結果於肝臟及後腎均可分離到細小透明平滑菌落，經染色後為革蘭氏陰性短桿菌，以市售套組 Microgen[®] Gn A+B-ID kit 檢測，得其生化性狀為：LYS(+)、ORN(+)、H₂S(+)、GLU(+)、MAN(-)、XYL(-)、ONP(-)、IND(+)、UR(-)、VP(-)、CIT(-)、TDA(-)。經 Microgen[®] Gn A+B-ID System 電腦軟體鑑定結果為 *Edwardsiella tarda*（100%）。
2. 病毒分離及病毒核酸檢測：將病鰻心臟、肝臟、脾臟、鰓絲及頭腎各取一部分組織，委請行政院農業委員會家畜衛生試驗所針對鰻魚常見之 Eel herpesvirus 及 Eel birnavirus 進行病毒檢測，檢測 Eel herpesvirus 使用之引子為 F1：5'-GTG TCG GGC CTT TGT GGT GA-3' 及 R1：5'-CAT GCC GGG AGT CTT TTT GAT-3'，其預期產物大小為 400 bp，檢測 Eel birnavirus 使用之引子為 WB-1：5'-CCG CAA CTT ACT TGA GAT CCA TTA TGC-3' 及 WB-2：5'-CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG-3'，其預期產物大小為 206 bp，檢測結果 Eel herpesvirus 及 Eel birnavirus 均未檢出（圖 9）。

3. 核酸序列分析結果：針對病鰻所分離到細菌進行純化，並採取單一菌落抽取核酸進行 16S rDNA 部分基因片段做增幅，以參考 Ramos-Vara J.A. 2008[6]所述之引子對，16SFa: 5'-GCT CAG ATT GAA CGC TGG-3'、16SFb: 5'-GCT CAG GAY GAA CGC TGG-3'及 16SR: 5'-TAC TGC TGC CTC CCG TA-3'，進行 16S rDNA PCR，其反應為：Predenature 94°C 5 分鐘→(Denature 94°C 1 分鐘→Annealing 58°C 1 分鐘→Extension 72°C 1 分鐘) 35 個循環→Final Extension 72°C 7 分鐘，然後降溫至 4°C 保存，其預期產物大小為 320 bp (圖 10)。將所得產物經定序後所得之結果與 NCBI 基因資料庫(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比對後，得到與 *Edwardsiella tarda* 標準株序列相似度達 98% 以上，根據序列分析結果確定為 *Edwardsiella tarda*。

八、藥物敏感性試驗

選擇純化後之 *Edwardsiella tarda* 菌落以無菌生理食鹽水製成 0.5 號 McFarland 比濁管濃度，取 100 μ L 均勻塗於 Mueller-Hinton agar，選擇 5 種可供鰻魚使用之抗菌劑濾紙片進行藥物敏感性試驗，包括：Amoxicillin、Florfenicol、Flumequine、Oxolinic acid、Oxytetracycline，結果本菌對 Florfenicol 具高敏感性 (表 1)。

九、類症鑑別

與鰻魚親水性產氣單胞菌感染症及鰻魚假單胞菌感染症進行類症鑑別 (表 2) [2,3,6]。

十、最終診斷

日本鰻愛德華氏病 (Japan Eel *Edwardsiellosis*)。

十一、治療及預防處置

1. 治療建議：於飼料中添加 Florfenicol 10 mg/每公斤體重/日，每日投餵飼料量改為 12 公斤，於早上投餵飼料，連續治療 5 日；池水需做換流水，池底水排出總池水量約 1/4，並適量補足池水，換水後可使用優碘 0.3 ppm 作池水消毒。
2. 預防處置：水產動物疾病發生的原因有很多，大多與養殖現場管理不當有關。建議飼主在本病好發季節應注意投餌量，並注意水質環境管理，加強池水曝氣量，並降低飼養密度，亦可適度使用優良之益生菌改善池水菌相，避免疫情再度發生。

十二、疫情追蹤

看診後當天飼主先進行池水換流，並停止投餌，於隔日起每日使用 10 % Florfenicol 150 公克混合 20 公斤浮料，連續使用藥物後第三天起已有明顯改善，第五天後每日死亡數已降至個位數。

十三、討論

(一) 病因及流行病學探討

愛德華屬 (Genus *Edwardsiella*) 細菌可分為 3 個種別，*Edwardsiella tarda*、*E. ictaluri* 和 *E. hoshinae*，屬腸道桿菌科 (Enterobacteriaceae) [1]。本病由 *E. tarda* 所引起，為 Gram's (一) 通性嫌氣性桿菌，大小為 $2-3 \times 1 \mu\text{m}$ [1,2,5]。特性：革蘭氏陰性，桿狀周鞭毛、運動性極強，如 TSA 20°C 培養 24 小時後，其菌落直徑 0.5mm 菌落周邊完整隆起呈灰白色，於 Rimler-Shotts media 上經 37 °C 24 小時的培養後其菌落周圍呈綠色，而中心則為黑色 [3]。

本菌為養殖池中的常在菌，養殖池的保菌魚及病魚為主要傳染源，*E. tarda* 可由病魚分離出，另池水、底泥、健康魚腸內亦可分離到，飼料來源也可能含有本菌，魚隻在遇緊迫的情況，常常會爆發本病 [3]，台灣於秋、春季節間氣溫遽變時多發，一般而言全年皆可發生 [2, 3]，台灣主要流行季節在 3-6 月及 9-11 月，有時會混合產氣單胞菌症同時感染 [2]。

本菌會造成鰻魚肛門紅腫、皮膚發紅、肝、腎組織壞死等特徵，為一全球性的疾病，本菌最早於 1962 年由 Sakazaki 及 Muratac 報告，而後陸續由 Hoshina、Ewing 等、Sakazaki 等研究和證實[3]。一般而言，*E. tarda* 之感染力不高，但可長存於養殖水中，亦被發現存在於被有機物污染的水中[3,7]。

以水產動物疾病診療系統 (Treatment and Diagnosis System of Aquatic Animal Diseases, TDS) 統計本縣 94 年 1 月到 103 年 12 月這十年間日本鰻送檢病例，結果本病全年皆可發生，其中尤以每年的 3~5 月份最高，進一步分析相關氣候因子存下情形下是否會增加本病發生機會，結果平均氣溫 (°C)、高低溫差 (°C) 及是否降雨等 3 種因子具顯著性，針對此 3 種因子進一步分析其與本病發生率之關係性，結果高低溫差 ($r=0.61$) 及是否降雨 ($r=0.49$) 具顯著關係性，由此可以證明本病好發於節氣交替氣溫日夜溫差較大時，若有降雨因素加乘影響，造成水池環境變化大更易引起本病之發生。

(二) 致病機制及可能之感染途徑

本病又稱為“肝腎病”，此乃因病鰻以肝臟及腎臟為主要病變區而命名之[2, 3]，本病在外觀上以肝、腎部腹側軀幹之潰瘍病變為主要特徵，為方便辨認，並可與其他在肝、腎引起病變的疾病區分，所以稱之為鰻魚潰瘍病[3]。

受感染的鰻魚主要病徵可區分為：(1) 肝臟腫大潰瘍型—病變主要出現於肝臟，患病魚腹面肝臟部位明顯發生腫大及潰瘍，嚴重病例在胸鰭下方皮膚可見潰瘍灶；(2) 腎臟腫大潰瘍型—病變主要出現於腎臟，患病魚之腎臟部位明顯發生腫大及潰瘍；(3) 肝腎腫大潰瘍型—病變主要出現於肝臟和腎臟，病魚之肝、腎均發生腫大及潰瘍[2]。

感染途徑以經口感染可能性最高，皮膚、鰓的損傷部位亦為感染的門戶，細菌由皮膚小傷口或經口感染→菌血症→到達肝、腎；臨床症狀及肉眼病變則因魚種不同而不同，肉眼病變臟器呈現點狀白色壞死灶，鰭、體表出血、充血，肛門腫大變紅、突出；肝臟及腎臟二型可同時發生，或單獨發生；鰻魚的嗜中性球具有吞噬的功能，細菌少時，被吞噬掉但未必死亡而會隨血流跑到腎，含細菌的嗜中性球在肝、腎中增殖，造成組織的壞死進而形成膿瘍[3]；

肝、腎的損傷（細菌溶解組織）→膿跑出→纖維素性化膿性炎症→腹壁肌肉炎症或壞死→穿孔、潰瘍，而致肝、腎暴露在外[3,7]。

在日本，江草報告鰻魚潰瘍病是日本養殖鰻魚最重要的細菌性疾病之一[3]。我國於 1977 年由郭等首度報告分離出鰻魚潰瘍病之病原菌以來，至今已蔓延並流行全省，造成重大之經濟損失，成為養殖鰻重要的細菌性疾病之一[3]。

本菌已證實為養殖環境中的常在菌，因其病原性與血清型之關係密切，本菌已成為鰻魚及其他養殖魚類爆發疾病的潛在威脅，並且本菌對藥物的抵抗性有顯著增加的趨勢，更增加治療本病的困難[3,7]，目前已有報告指出對 tetracycline 具有抗性的 *E. tarda*[5]。

而飼養管理方面，台灣養鰻所需之鰻苗，均是從沿岸採捕鰻線馴養成鰻苗後，提供養殖業者放養，鰻線的採捕時間大概是在每年的 12 月至翌年 2~3 月於河川出海口或河口沿岸捕撈，目前主要因鰻苗供應的不穩定，價格波動大，導致生產成本偏高，產量無法控制[1]。且鰻線時期馴餌主要絲蚯蚓為主[1]，但以絲蚯蚓馴餌易發生病菌或寄生蟲的感染，而影響鰻線的生長及存活率[1,4]。鰻魚愛德華氏菌經常可以由絲蚯蚓體內檢測到[4]。

在本病例中，推測是因為當時正值季節變化之時，水溫變化較大，而本病病原在水體中為常在菌，且於正常魚隻腸道中亦可發現，而池水中常因魚隻緊迫又加上過量餵飼，吃不完的飼料或消化不完全的糞便增加，導致池中有機質增加，亦容易導致病原菌大量增殖，造成鰻魚緊迫使抵抗力下降而發病。

本病自 1976 年首度報告以來，一直是造成台灣養鰻業者損失的主要原因之一，難以清除原因除了因為愛德華氏菌為環境常在菌以外，常見的原因有過度密飼緊迫造成抵抗力下降、過度投餌造成消化不良緊迫或水池有機質變高而滋生病原菌，另外目前台灣的鰻魚飼養型態也是造成病原難以清除的原因，推測主因鰻苗來源僅能靠野外捕抓，品質參差不齊，鰻苗時期投餵生餌易造成病菌潛伏或帶原；無法做到統進統出養殖操作模式，往往同池鰻魚全部出清可達三年以上，造成池底累積過多有害物質及清池後無法充份消毒後再放養；養殖過程因須經常須進行體型小大選別，常因操作不當造成過度緊迫或受傷而感染發病。

(三) 預防與控制

1. 維持良好環境：降低緊迫因子，例如飼養過密、營養不良、水溫、pH 值及溶氧量的驟變[2,3,4,5,7]，魚塭老化、密飼是普遍的狀態，相對的衍生出許多問題，即高發病率、高傳染力、高死亡率，更增添了水產動物疾病防治的困難度，環境不良往往會伴隨疾病的發生[2,5]。
2. 抗菌劑使用：感染早期可以透過有效的抗菌藥劑進行疫情的控制[2,3,4,5,7]，愛德華氏菌在預防上可於流行季節控制餵食量，需要時應作停料動作[2]。細菌性疾病治療上，魚隻如願進食，於飼料中添加有效抗菌劑，應可獲得良好的控制[2,5]。
3. 抗緊迫物質添加：例如益生菌(*Lactobacillus rhamnosus*、*Bacillus subtilis*、*Lactobacillus acidophilus*、*Clostridium butyricum* 及 *Saccharomyces cerevisiae*) 可以提高非特異性免疫力[5]。
4. 疫苗使用：目前疫苗因單價高、保護力不如預期及操作費時費力等缺點，世界各國使用並未普及，而台灣目前也尚未引進[5]。
5. 免疫促進劑 (immunostimulants) 使用：如 levamisole 及脂多醣體 (β -1,3 glucan)，也曾有業者以大劑量的維他命 C 及維他命 E 投予飼料，以增加魚隻本身對病原抵抗力[5]。
6. 免疫球蛋白使用 (IgY)：口服使用愛德華氏菌 IgY 免疫蛋黃粉，其方法為使用不活化之 *Edwardsiella tarda* 疫苗，接種於產蛋雞誘發蛋雞產生針對 *Edwardsiella tarda* 之抗體，收集完成免疫後的蛋雞所生產的蛋，取蛋黃並測定其力價後，製成蛋黃粉，可以經口服方式產生保護力，目前現場使用上有保護力不如預期及持續時間不長等問題。
7. 環境病原菌監測模式建立：應用市售快速診斷套組，例行性監測水中病原菌數量，早期進行水池消毒措施，降低感染本病機會。
8. 氣候因子預警模式建立：長時間收集疾病與氣候因子並建立資料庫系統，透過例行性分析，找出造成疾病之高風險因子，進而建立預警與處置方式，配合上述各項處理方式，更能有效預防本病的發生。

誌 謝

本報告承蒙行政院農業委員會家畜衛生試驗所的協助及指導，謹此致謝。

十四、參考文獻

1. 白志年、劉富光。鰻魚。台灣淡水魚養殖(上)。行政院農業委員會水產試驗所，基隆，47-60，2010。
2. 李建霖。愛德華氏病。水產動物疾病防治及正確用藥手冊。財團法人台灣養殖漁業發展基金會，台北，30-32，2009。
3. 張鴻猷。腸內菌。水產動物疾病細菌篇黴菌篇。雲林縣家畜疾病防治所，雲林，87-92，2001。
4. 謝嘉裕。生物安全管理。養殖水產動物健康管理手冊魚類篇。財團法人台灣養殖漁業發展基金會，台北，56-59，2014。
5. Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: a brief review. J. Biosci. 32(7), 1331–1344, 2007.
6. Ramos-vara JA, Wu CC, Mitsui I, Lin TL, Miller MA. Metritis, valvular endocarditis, and septicemia by *Actinobacillus equuli* in a gilt in the united states. Veterinary Pathology 45(4): 495-499, 2008.
7. Roberts JR. The bacteriology of teleosts. Fish pathology. 4th ed. Wiley-Blackwell, 339-382, 2012.



圖 1. 病鰻腹部及肛門後方處明顯膨大，體表皮層可見明顯潮紅。



圖 2. 肛門後方體壁穿孔，隱約可見內部臟器。



圖 3. 肝臟及後腎明顯腫大、潮紅。



圖 4. 肝臟及後腎明顯腫大，後腎有小膿瘍病灶。

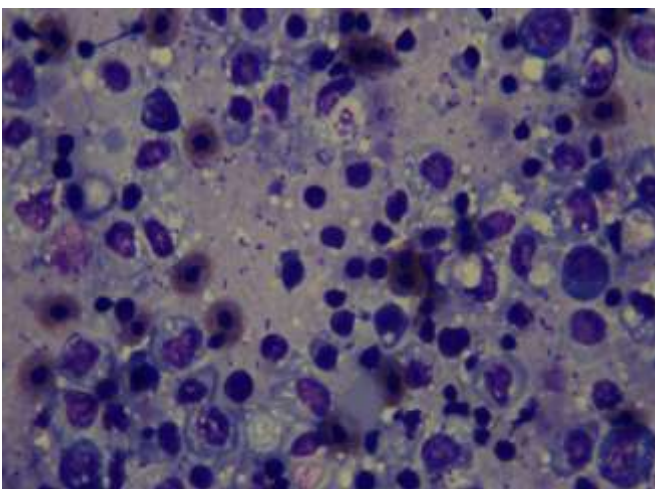


圖 5. 肝臟塗抹片行劉氏染色鏡檢可見許多藍紫色短桿菌。Liu stain, 1000X。

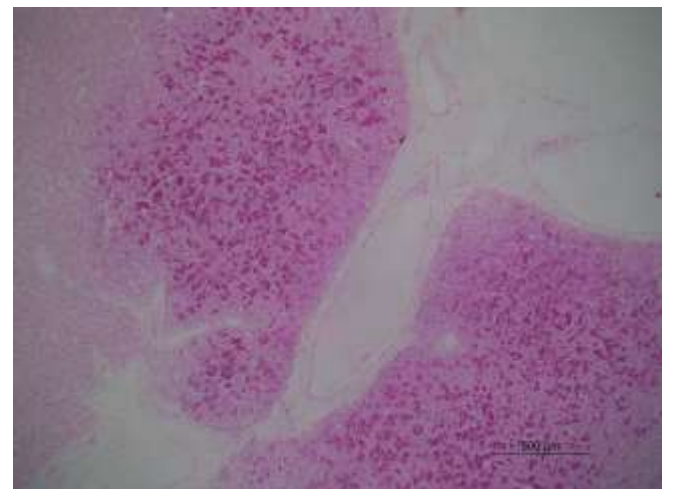


圖 6. 肝臟可見多發出血區塊。H&E, 40X。

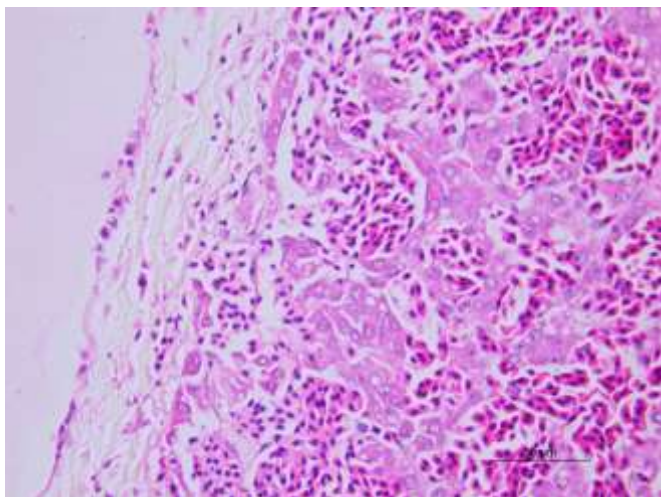


圖 7. 肝臟表面可見纖維素樣物質附著及單核炎症細胞浸潤，肝細胞間可見大量紅血球浸潤。H&E，400X。

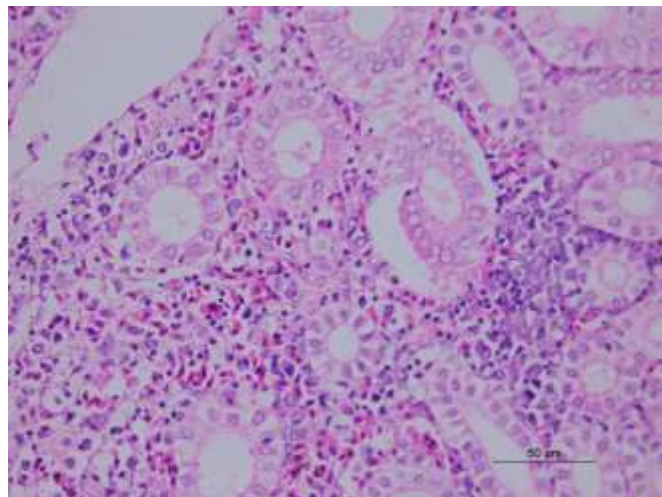


圖 8. 腎小管間質可見少量紅血球浸潤及單核炎症細胞浸潤。H&E，400X。

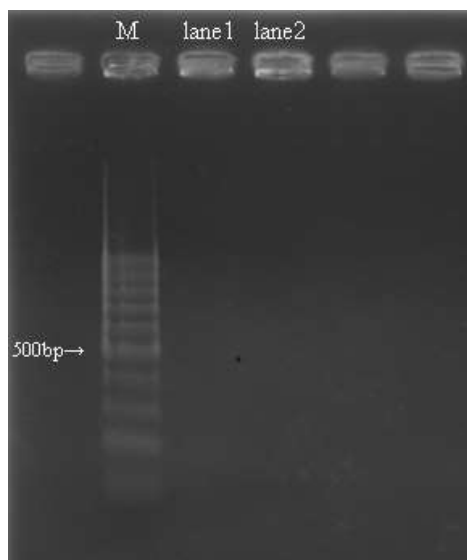


圖 9. 針對鰻魚常見之 Eel herpesvirus 及 Eel birnavirus 病毒進行病毒檢測結果均未檢出。

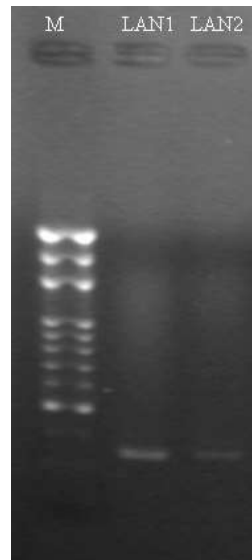


圖 10. 進行 16S rDNA 部分基因片段做增幅，其預期產物大小為 320 bp。

表1、藥物敏感性試驗。

Antimicrobial agents	Potency	Inhibitory zone(mm)	Susceptibility zone(mm)
Amoxicillin	25µg	0	≥ 18
Florfenicol	30µg	35	≥ 19
Flumequine	30µg	32	≥ 27
Oxolinic acid	2µg	12	≥ 11
Oxytetracycline	30µg	10	≥ 19

表2、與鰻魚親水性產氣單胞菌感染症及鰻魚假單胞菌感染症做類症鑑別。

病名	病因	肉眼病變	組織病理
鰻魚愛德華氏病	<i>Edwardsiella tarda</i>	鰻魚肛門紅腫、皮膚發紅、肝或腎部腹側軀幹潰瘍或穿孔	腎臟壞死，肝臟細胞壞死，常可見纖維素性化膿性炎症反應
鰻魚親水性產氣單胞菌感染症	<i>Aeromonas hydrophila</i>	鰓部及體表皮膚有嚴重程度不一之充血及潰瘍灶、肝臟及脾臟腫大出血、腸道表面潮紅	腎臟可見腎小管上皮細胞萎縮壞死、肝臟組織有壞死病灶、脾臟組織則發現組織壞死而變得空洞
鰻魚假單胞菌感染症	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	下顎、腹部、肛門周圍皮膚有點狀出血、肝臟有暗紅色出血點	腹膜炎、心外膜炎、心內膜炎、皮膚毛細血管充血