

# 桃園及新竹地區養殖吳郭魚法朗西斯氏菌感染症之調查研究

鄧晶瑩<sup>1\*</sup>·陳嫩玫<sup>2</sup>·彭如賢<sup>2</sup>·楊雨樵<sup>2</sup>·張志堅<sup>1</sup>·蔡惠萍<sup>1</sup>·張錦宜<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

<sup>2</sup> 國立臺灣大學獸醫專業學院

## 摘要

近年來受到天氣異常變化及水源品質不穩定影響，臺灣養殖吳郭魚常在疾病感染時爆發大量死亡，其中又以法朗西斯氏菌 (*Francisella* spp.) 之感染最為嚴重，造成養殖業者鉅大之經濟損失。法朗西斯氏菌感染症 (Francisellosis) 早年又被稱為類立克次體感染症 (Rickettsia-like organism infection)，現已統一將此病原正名為法朗西斯氏菌。本病被報告發生於歐洲、南北美洲及亞洲 (包括臺灣) 等不同國家，可感染野生魚類和多種養殖魚種，造成水產養殖業嚴重的經濟損失。本研究於 2009~2011 年針對桃園及新竹地區養殖吳郭魚法朗西斯氏菌感染症於不同季節 (溫度)、臨床病變及水體傳播之關連性做一深入探討。研究結果顯示桃園及新竹地區養殖吳郭魚感染之法朗西斯氏菌，無法於一般人工培養基上分離培養，應用聚合酶鏈鎖反應檢測及基因序列鑑定其病原，証實其為 *F. noatumensis* subsp. *orientalis* 所感染。發病場經由水排放會導致下游埤圳養殖池皆會感染，並於 3~4 月及 10~11 月進入發病高峰期，因此時溫度約在 23~27 °C，最適於法朗西斯氏菌之繁殖，易導致疾病之爆發。

關鍵字：吳郭魚、法朗西斯氏菌感染症、水傳播

## 前言

吳郭魚在臺灣養殖已超過 60 年，因其對病害的抵抗力及環境的適應力很強，加上成長快速、肉質細緻且無細刺，較能被一般消費者接受，因此是目前臺灣主要淡水養殖魚類之一，也是世界性重要養殖魚種。

臺灣北部桃園縣及新竹縣因受地形限制，吳郭魚之飼養皆利用大型灌溉埤圳，與鱧、鯉、鰱及鱖等淡水魚混養，形成極具效益的立體式養殖，因此吳郭魚為北區埤塘最大宗之養殖魚種。近年來受到天氣異常變化及水源品質不穩定，常在疾病感染時爆發大量死亡，其中又以法朗西斯氏菌之感染最為嚴重，造成養殖業者鉅大之經濟損失。

自 2008 年起，即陸續出現桃竹區埤圳養殖吳郭魚發生大量異常死亡情形，現場業者敘述 2 月初魚隻開始發病，每日皆有 10~50 尾不等的零星死亡，自行使用光合菌或換水都無法改善疫情。若無藥物控制，1~2 週後即會出現大量死亡，總死亡量可高達 3,000~4,000 斤。因北區許多養殖埤塘皆有類似情形出現，現場瞭解發病狀況，發現發病埤圳上游池塘發病不久後，下一池塘亦出現類似病情，且其發病情形似乎與溫度及水體傳播有關。國內目前雖有法朗西斯氏菌之相關研究，但並無養殖池現場相關發病情形之研究。因此，本研究針對此病於不同溫度、月份 (季節)、發病率及水體傳播方式進行現場調查，並進行深入探討。

## 材料與方法

### 一、病材來源

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101  
轉 2804; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: ycdeng@mail.tfrin.gov.tw

2009 ~ 2011 年間，採集自桃園縣及新竹縣所飼養之吳郭魚養殖池（包括重覆採樣部分），共計 95 個樣本。其中包括收集自不同支流埤圳之養殖池共計 40 個埤塘，另於非發病期重覆採集 25 個發病場魚隻，進行疾病監測比對。

## 二、細胞學檢查

取血液及病灶區臟器製作塗抹片，施以 Liu's、Gram stain (Baso, Taiwan)、Giemsa stain 及 weak Ziehl-Neelsen stain (CMP., Taiwan) 進行染色。

## 三、組織病理學檢查

樣本魚隻進行解剖時，採集各病變組織臟器置入 10% 中性緩衝福馬林液中固定 24 h，再經 16 h 脫水、石蠟包埋，並於製成 5  $\mu$ m 厚度之切片後，再以蘇木紫及伊紅 (Hematoxylin-Eosin stain; H&E stain) 染色後、封片及進行病理學檢查。

## 四、細菌學檢查

剖檢時，以無菌操作方式自心臟、肝臟、脾臟及腎臟進行採樣。經以 5% 脫纖維綿羊血之血液培養基 (sheep blood agar; SBA)、胰蛋白酶大豆瓊脂培養基 (tryptic soy agar; TSA)、腦心萃取培養基 (brain heart infusion agar; BHI)、半胱氨酸培養基 (cyteine heart agar)、巧克力培養基 (chocolate agar) 及營養強化培養基 (enriched medium) 和馬康基培養基 (MacConkey agar; MCA) 上，置於室溫及 30  $^{\circ}$ C 培養 4 ~ 5 天 (細菌培養用培養基及試藥皆為 Difco Laboratories, USA; Oxoid, England 及 Sigma, USA)。

## 五、病原核酸萃取及純化

將採集之肝、腎、脾等註記編號置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用，採用商品化核酸萃取套組 MasterPure™ DNA purification kit for blood versions II (Bio-genesis, Taiwan)，依照說明書的指示操作。萃取之核酸置於 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中，以供後續聚合酶鏈鎖反應使用。

## 六、核酸萃取及聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

將所得之 DNA 作為 PCR 反應所需之模版，

法朗西斯氏菌專一性引子對 (FLB-16S-180f: 5'-GCGGATTAAGGTGGCCTTTG-3' 及 FLB-16S-456r: 5'-CCTGCAAGCTATTAACACTCACAGG-3') 參考自 Hsieh *et al.* (2007)。

PCR 反應程序如下：Initial denaturation 為 94  $^{\circ}$ C、10 min，Denaturation 為 94  $^{\circ}$ C、30 sec，Annealing 為 58  $^{\circ}$ C、30 sec，Extension 為 72  $^{\circ}$ C、30 sec，進行 35 個循環，最後的 Extension 為 72  $^{\circ}$ C、7 min。增幅之 DNA 產物其特異性片段大小約為 286 bp。

## 七、PCR 產物之電泳分析及 16S rRNA 核苷酸定序

取 5  $\mu$ l 之 PCR 增幅產物，與 1  $\mu$ l 之 DNA dye 均勻混合後，加入 2% agarose gel 之孔洞中，於 0.5X TAE buffer 中，以電壓 100 伏特進行電泳 30 min 後，將電泳膠片置於紫外燈下觀察並照相記錄。

將 PCR 增幅產物送至明欣生物科技有限公司進行 16S rRNA 基因定序，將定序之核苷酸序列輸入 NCBI 網站之 BLAST 進行比對。

# 結 果

## 一、病原鑑定

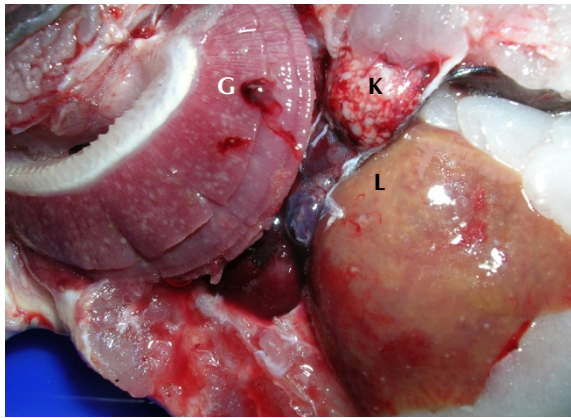
本實驗自 2009 年 3 月至 2011 年 8 月期間，於桃園縣及新竹縣 40 個埤塘於不同溫度及發病期共收集 95 個樣本，其中 25 個樣本為重覆採樣，以確認低溫期陽性感染魚隻是否呈現無臨床病變形態，結果顯示陽性感染池佔被調查養殖池之 86.7% (26/40 場)。

採集魚隻不論是否出現臨床症狀皆進行解剖、病原分離、組織固定與病原核酸萃取，以確定樣本為法朗西斯氏菌之感染病魚。發病魚隻臨床症狀：消瘦、泳姿不正常、體色異常、脫鱗、皮膚糜爛或潰瘍、眼球突出、高死亡率等非特異性症狀。肉眼病變則於病魚外體表呈現體色異常，鰓蓋、腹部、胸鰭基部或尾鰭基部充出血或潮紅，部分病魚體表有糜爛或潰瘍。

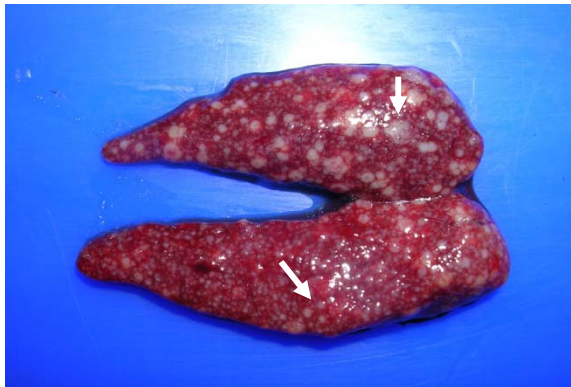
### (一) 剖檢病變

鰓：鰓絲充血，黏液增厚，鰓絲上密發白色

結節 (Fig. 1)。實質臟器之肝臟、脾臟、腎臟、心臟：腫大，密發大小不一白色結節 (Figs. 1~2)。



**Fig. 1** Severe granuloma, particularly in the gill (G), liver (L) and head kidney (K).



**Fig. 2** Gross pathological changes of the spleen: large and small white nodules (arrow) were found in enlarged morbid organ.

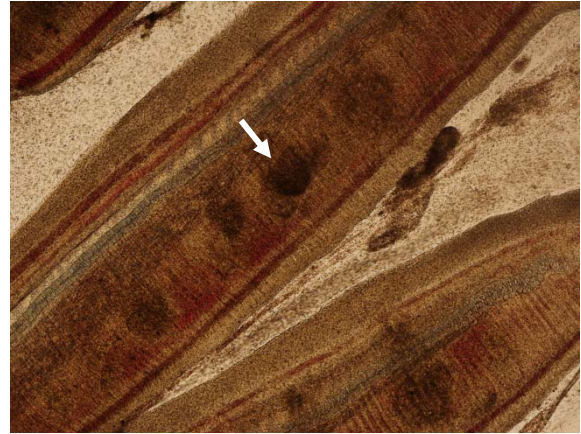
## (二) 濕壓片鏡檢

自病魚鰓部剪取部分初級鰓薄板進行檢驗，可見病魚鰓部黏液增厚，在初級鰓薄板間可見多發類結節樣物，部分檢體伴隨有車輪蟲、錨蟲等寄生蟲感染 (Fig. 3)。

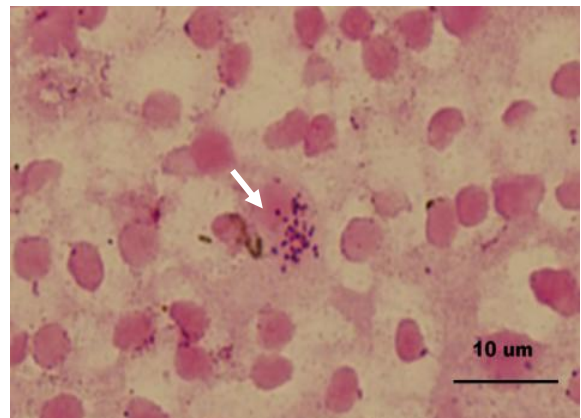
## (三) 病原菌分離

自病魚之心臟、肝臟、脾臟及腎臟進行鈎菌，培養於 BA、MCA 等常規性培養基，與 cystine heart agar、chocolate agar、enriched medium 等非一般性培養基，置於 30 °C、培養 4 ~ 5 天後，均無分離出法朗西斯氏菌及其他致病性病原菌。自病魚之血液、病灶區肝臟、脾臟及腎臟製作抹片製作塗

抹片，施以 Gram stain 及 Giemsa stain，可於染色抹片下觀察到吞噬細胞內有不等量革蘭氏陰性的球桿菌 (Fig. 4)。



**Fig. 3** Wet mount smear of infected tilapia: mucus hyperplasia and multiple nodular material were found from gill (100X).

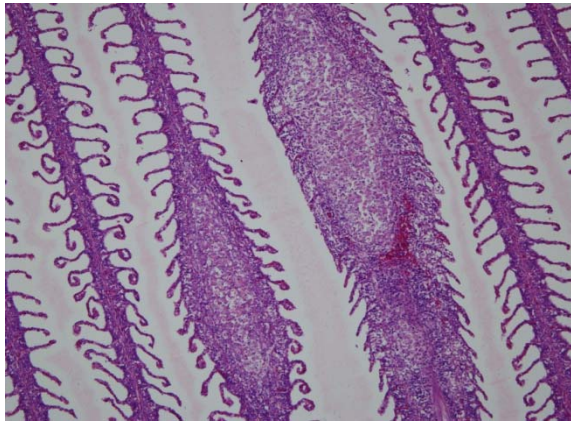


**Fig. 4** Spleen smear of infected tilapia: *Francisella* spp. bacilli were found in the cytoplasm of phagocyte (Gram stain, 1000X).

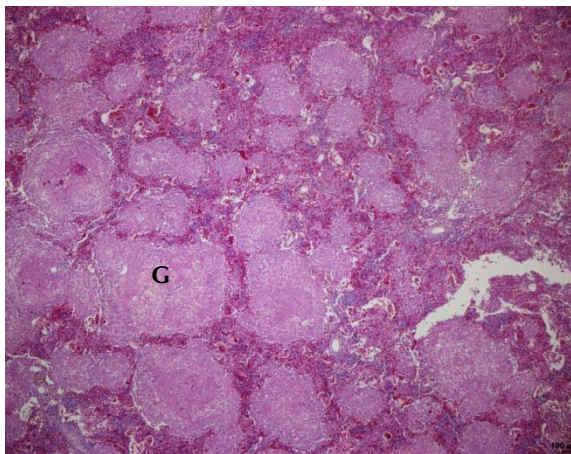
## (四) 組織病變

鰓絲呈多發性壞死灶，病灶區可見大量吞噬細胞浸潤，並可見脫落壞死細胞混雜其間，二級鰓薄板上皮增生而融合 (Fig. 5)。脾臟、腎臟、肝臟、心臟：多發壞死性肉芽腫，病灶區中央可見壞死區，周圍由多層類上皮細胞、吞噬菌體的巨噬細胞及纖維母細胞所圍繞 (Fig. 6)，以 H-E 染色切片觀察，部份吞噬細胞空泡內有不等量革蘭氏陰性球桿菌。部分魚隻胃腸道黏膜下層則出現水腫，腸炎病變。

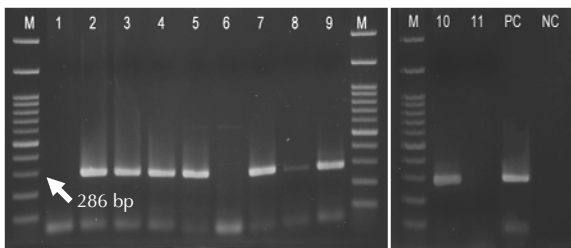




**Fig. 5** Histopathological finding of francisellosis in tilapia hyperplasia and hypertrophic primary and secondary gill lamella (H&E stain, 100X).



**Fig. 6** Histopathological lesions of the spleen reveal multiple necrotic granuloma (G) formations (H&E stain, 40X).



**Fig. 7** Polymerase chain reaction (PCR) product of *Francisella* spp. from lesion tissue of infected tilapia. (M: 100 bp ladder marker; Lane 1-11 different head kidney from infected farmed; PC: positive control; NC: negative control).

**(五) 病原菌核酸聚合酶鏈鎖反應**

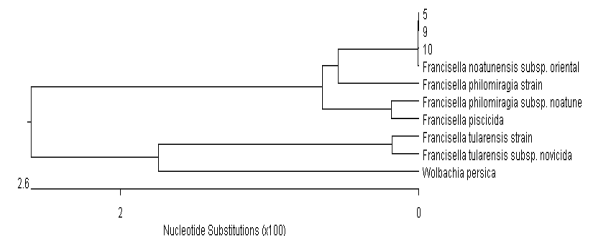
將 PCR 產物以 2% 瓊脂膠片於 100 伏特下進行電泳分析，並將陽性產物進行核酸定序 (Fig. 7)

經 NCBI 之基因庫比對，定序後之核苷酸序列與 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* strain 序列最為相近 (相似度 identities = 100%) (Figs. 8 & 9)。

綜合以上發病魚池之疫情、臨床症狀、解剖病灶、組織病理檢查、實驗室檢驗、病原核酸聚合酶鏈鎖反應及聚合酶鏈鎖反應產物定序等結果，確診本病為 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* 感染引起之法朗西斯氏菌症 (Francisellosis)。

		Percent Identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Divergence	1	100.0	100.0	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	1	5	
	2	0.0	100.0	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	2	9	
	3	0.0	0.0	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	3	10	
	4	0.0	0.0	0.0	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	4	<i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i>
	5	1.8	1.8	1.8	1.8	100.0	98.6	94.7	94.0	98.2	5	<i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatune</i>	
	6	1.4	1.4	1.4	1.4	0.4	100.0	95.1	95.1	94.3	98.6	6	<i>Francisella piscicida</i>
	7	5.5	5.5	5.5	5.5	5.1	5.1	100.0	95.8	94.4	7	<i>Francisella tularensis</i> strain	
	8	5.5	5.5	5.5	5.5	5.1	0.4	5.4	100.0	94.4	8	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	
	9	5.6	5.6	5.6	5.6	5.2	4.8	3.3	3.7	100.0	9	<i>Wolbachia persica</i>	
	10	1.1	1.1	1.1	1.1	0.7	5.1	5.1	4.9	4.9	10	<i>Francisella philomiragia</i> strain	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

**Fig. 8** Case of positive samples 5, 9, 10 *Francisella* strain with reference strains of sequence similarity. Use DNASTarMegAlign software compared to 16S partial gene sequence (nucleotides 180-465), which are 100% similar.



**Fig. 9** Phylogenetic tree is based on partial 16S rRNA sequences of *Francisella* spp. gene in the NCBI.

**二、水體傳播追蹤調查**

為瞭解法朗西斯氏菌於桃竹地區埤圳養殖池塘感染情形，上下游及水體傳播間之關係，2011 年針對桃竹水利灌溉區之光復圳及相關上下游之桃園大圳各養殖場進行現場調查。

光復圳共有 12 支線，65 個埤塘，灌溉區面積有 3,886 ha。針對本次感染區域內之埤圳共計調查 9 個支線，25 個埤塘 (Fig. 10)，調查結果如下：

光復圳部分第 1 支線共有 4 池：1-2 池為發病

**Fig. 10** Distribution of tilapia farms in Taoyuan and Hsinchu areas. White figures indicate main canals, 1-12 are the canals in Guangfu, 13 is the lateral canal in Xinfeng. The ponds with Francisellosis outbreaking are marked in red. Downstream infected ponds are marked in orange.

池 (魚隻出現肉眼病變), 1-3 及 1-4 皆有感染 (有病菌感染, 但無肉眼病變)。2 支線共有 10 池: 2-2 池為發病池, 2-3 及 2-9 皆有感染。3 支線共有 2 池: 3-1 池為發病池, 3-2 亦有感染。4 支線共有 3 池: 4-2 池為發病池, 4-3 及 4-5 皆有感染。5 支線共有 5 池: 5-1 池正常, 5-2 池為發病池, 5-3 及 5-5 皆有感染。6 支線共有 3 池: 6-1 池為發病池, 6-2 及 6-3 皆有感染。8 支線共有 17 池: 8-4 池及 8-11 池正常, 8-12 池為發病池, 8-13 及 8-17 皆有感染。9 支線共有 3 池: 9-2 池為發病池, 9-3 也有感染。新豐和興線有 2 池為發病池。因光復圳承接桃園大圳之尾水, 故對桃園大圳 12 支線末端池進行採樣檢驗。12 支線共有 20 池: 12-2 池為發病池, 12-6 池亦出現感染。發病場經由水排放導致下游埤圳養殖池皆有感染情形, 由以上結果推測証實。

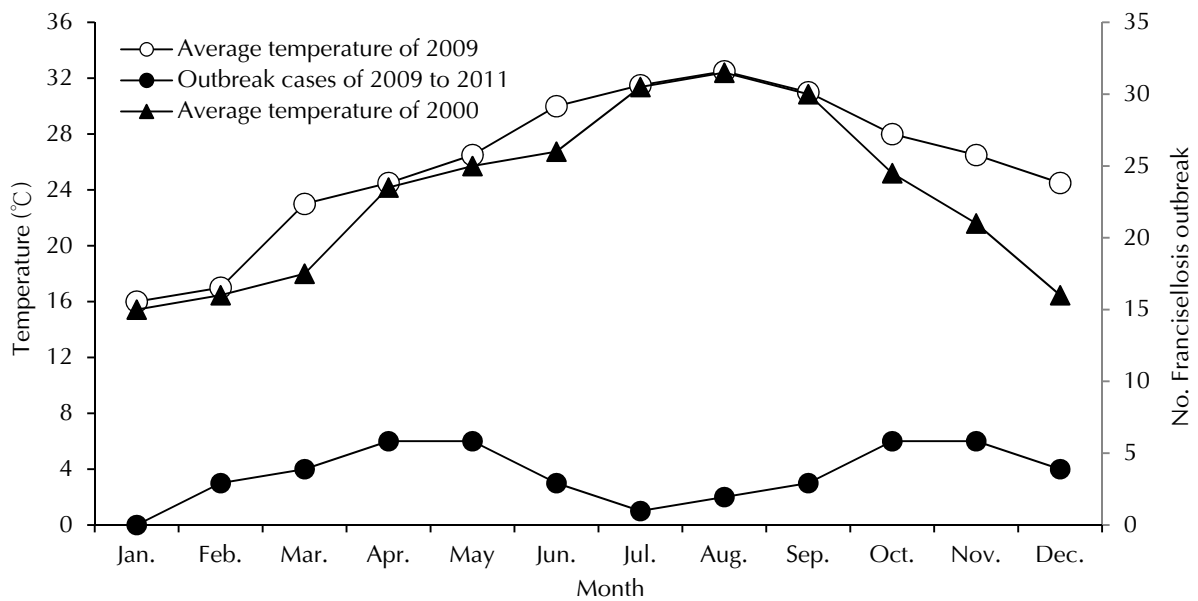
### 三、溫度對臨床病變及發病率之影響

2009 ~ 2011 年間的 3 ~ 4 月及 10 ~ 11 月溫度, 大約為 23 ~ 27 °C 及 24 ~ 27 °C, 此時進入法朗西斯氏菌症發病高峰期, 發病池皆有出現臨床

症狀並造成死亡, 3 ~ 5 月及 11 ~ 12 月這 5 個月則為發病高峰期, 則與溫度有明顯的關連性。6 ~ 8 月發病場則逐下降至 0, 此時溫度由 25 °C 增高至 33 °C (Fig. 11)。2011 年 6 ~ 8 月的調查中, 另針對曾發病且大量死亡的埤圳進行採樣, 共計 25 場。檢驗剖檢魚隻, 10 場無肉眼病變, 15 場後腎可見少量結節, 而這 25 場臨床病變魚隻後腎的組織切片下皆可見到肉芽腫病變存在。

## 討 論

法朗西斯氏菌 (*Francisella* spp.) 目前歸類於 Bacteria 界、Proteobacteria 門、Gammaproteobacteria 綱、Thiotrichales 目、Francisellaceae 科、*Francisella* 屬, 是一種絕對需氧、兼性細胞內寄生、無運動性、革蘭氏陰性、球桿狀菌, 具有微弱的 catalase 正反應, oxidase 負反應。本菌感染的自然宿主非常廣泛, 包括多達 200 多種的哺乳動物 (包括人類)、鳥類、兩棲類、甲殼類及壁蝨等 (Sjosted, 2005)。在環境中的土壤、水也可分離到本菌, 它可引起急性到慢



**Fig. 11** The average water temperature curve and numbers of francisellosis outbreaks at tilapia farms in Taoyuan and Hsinchu from 2009 to 2011.

性的病症 (Anda *et al.*, 2001; Fryer and Hedrick, 2003; Petersen *et al.*, 2009; Foley *et al.*, 2010)。依據最新的分類，目前法朗西斯氏菌可分為 3 個屬，分別為 *F. tularensis*、*F. philomiragia* 及 *F. hispaniense*，其中最為人所熟知的病原菌為 *F. tularensis*，是引致兔熱病的病原，也是重要的人畜共通傳染病原，有發展為可怕生化武器的潛能 (Ottem, 2007; Foley and Nieto, 2010)。能造成魚類疾病之主要病原菌為 *F. philomiragia* 屬的亞種，*F. noatunensis* subsp. *noatunensis* 及 *F. noatunensis* subsp. *orientalis*，前者主要感染冷水域的鱒魚、鮭魚而後者主要感染溫暖水域的吳郭魚 (Nylund *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2006; Birkbeck *et al.*, 2007, 2011; Ottem *et al.*, 2007)。

法朗西斯氏菌症在魚類被認為是新興疾病的原因，是之前一直無法由病魚分離到病原，這是因為 *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* 及 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* 對培養基極為挑剔，無法由實驗室常規使用的培養基培養分離，直到 Olsen *et al.* (2006) 及 Hsieh *et al.* (2006) 分別發表在挪威的亞特蘭大鱒魚與臺灣海水、淡水吳郭魚皆分離到病原菌並確認其為法朗西斯氏菌後，陸續在哥斯大黎加、美國、英國、印尼等國均有鱒魚、鮭魚與吳郭魚確診病例 (Soto *et al.*, 2009; Jeffrey *et al.*, 2010)；其他品種如美國的雜交條紋

鱸、日本三線雞魚也有感染的案例 (Kamaishi *et al.*, 2005; Mauel *et al.*, 2005, 2007; Jeffrey *et al.*, 2010)。最近甚至發現感染軟體動物—鮑魚的病例 (Kamaishi *et al.*, 2010; Birkebeck *et al.*, 2011)。

臺灣最早被發表的病例在 1992 年 10 月，記載吳郭魚被一種細胞內寄生微生物所感染的病例。法朗西斯氏菌是一種兼性細胞內寄生的微生物，外型呈多形性球桿狀，與立克次體相同，必需用細胞培養，而無法以一般的培養基來培養分離，因此一直被誤認為是類立克次體 (*rickettsia*-like organism) (Chen *et al.*, 1994; Chern and Chao, 1994)。直到近年，因分子生物技術的進步，現在已重新釐清這些被混淆的微生物，將其重新定位而確認為 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* (Ottem *et al.*, 2009)。如今吳郭魚感染法朗西斯氏菌已遍及全臺各地，不論是淡水或鹹水養殖的吳郭魚都無法倖免 (謝, 2006; 劉等, 2011)。

法朗西斯氏菌之感染病魚臨床症狀會出現消瘦、泳姿不正常、體色異常、脫鱗、皮膚糜爛或潰瘍、眼球突出、高死亡率等非特異性症狀，而與多種細菌感染導致之症狀類似。但本病剖檢病變以鰓絲充血，黏液增厚，鰓絲上密發白色結節，剪取病魚鰓絲進行濕壓片鏡檢，可見病魚鰓部黏液極度增厚，在初級鰓薄板間可見多發類結節樣物；實質臟器之肝臟、脾臟、腎臟、心臟等可見

到臟器腫大及密發大小不一白色結節。臨床感染病變會形成多發性肉芽腫結節的細菌性感染大致有奴卡氏菌症 (Nocardiosis)、分枝桿菌症 (Mycobacteriosis)、發光桿菌症 (Photobacteriosis)、Piscirickettsiosis 及非典型癰瘡病 (Atypical furunculosis)。奴卡氏菌可感染的魚種非常廣泛，不管是海水魚或是淡水魚，都有其感染病例。*Nocardia asteroides*、*N. seriolae* (之前稱為 *N. kampfii*)、*N. salmonicida* 與 *N. crassostreae* 等皆曾自感染魚臟器分離 (Labrie *et al.*, 2008)。臨床上可見病魚典型病變為皮膚潰瘍，在鰓部、腎臟、心臟、肝臟、及脾形成肉芽腫病變，骨骼肌局部壞死，以 fite 弱抗酸染色，可見呈現弱陽性反應串珠樣或分枝狀長桿菌 (鄧等, 2011)。不論是海水魚或淡水魚均會感染分枝桿菌，目前文獻指出超過 160 種的魚類發生感染，引起魚類感染的分枝桿菌有 *Mycobacterium marinum*、*M. chelonae piscarium*、*M. fortuitum*、*M. anabanti*、*M. neoaurum*、*M. poriferae*、*M. scrofulaceum*、*M. shottsii*、*M. gordonae*、*M. pseudoshottsii*、*M. piscium* 及 *M. platyocillus* 等。

上述幾種亦會造成人類皮膚或全身性的感染。在肉眼觀察時，可見體表的出血或潰瘍，多重器官尤其是脾臟及腎臟的白色肉芽腫病變。病理組織切片下亦可發現內臟有多發性肉芽腫病變，但型態與法朗西斯氏菌感染所造成之肉芽腫病變略有不同，以 Ziehl-Neelsen 抗酸染色可見陽性抗酸分枝桿菌存在。發光桿菌普遍存在於海洋環境中和海洋生物體的體表，造成魚隻感染的病原以 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 最為人熟知，慢性感染魚隻的臟器表面，尤其是脾臟及腎臟，可見多發灰白色肉芽腫病變，細菌可自感染魚隻分離出，經革蘭氏染液染色後可見具兩端濃染的陰性桿菌。*Piscirickettsia salmonis* 早期一直誤將此病原菌歸類為立克次體，後經由基因序列的比對，現在重新將其歸類在 Gammaproteobacteria 綱、Thiotrichales 目、Piscirickettsiaceae 科、*Piscirickettsia* 屬、*salmonis* 種。本病原菌主要感染海水鮭魚，部分魚隻剛開始體表出現白色小壞死點，後逐漸變為潰瘍，在慢性嚴重感染的病例，可見到腹水，脾臟及腎臟腫大，肝臟顏色較蒼白且有多發乳白色結節。組

織病理切片下可在脾臟及腎臟的間質看到肉芽腫炎症反應導致造血細胞的流失，因此臨床上常看到感染 *Piscirickettsia salmonis* 的魚隻有貧血的狀況 (Fryer *et al.*, 2003)。

非典型癰瘡病 (Atypical furunculosis) 造成感染的病原菌為 atypical *Aeromonas salmonicida*，在肉眼觀察下，此病的臨床病變與法朗西斯氏菌症非常的相似，厭食、高死亡率及皮膚潰瘍，還有脾臟、腎臟及心臟的肉芽腫病變，但只要做組織學的檢查，可看到感染區域同時有急性與慢性病變出現，而以毒性造血組織之壞死及多型性白血球壞死腫塊，局部肌纖維細胞由變性、壞死至廣泛性出血性敗血症等特徵性病變，即可與法朗西斯氏菌症有所區別 (Soto *et al.*, 2009)。非典型癰瘡病和法朗西斯氏菌也曾有合併感染的病例出現 (Mauel *et al.*, 2007; Colquhoun and Duodu, 2011)。雖然有多種疾病會引致與法朗西斯氏菌感染類似之病變，但經由不同的染色方法，病原形態、病原分離與鑑定技術，都可對疾病之類症鑑別做明確區別診斷。本次病材樣本出現之肉芽腫病變除了進行病原分離外，皆以弱抗酸及抗酸染色對組織肉芽腫進行鑑別診斷以排除為奴卡氏菌及分枝桿菌之感染，得到之結果皆為法朗西斯氏菌引致之肉芽腫病變，另配合抹片染色及病變組織細胞中所見到之革蘭氏陰性、球桿狀菌，證明確為法朗西斯氏菌之感染。

大部分的法朗西斯氏菌無法生長於一般實驗室常規使用的培養基上，這當中也包含了造成魚類感染的菌種，文獻記載需額外添加氨基酸 cysteine 的培養基才有辦法幫助法朗西斯氏菌生長 (Olsen *et al.*, 2006; Mauel *et al.*, 2008; Birkbeck *et al.*, 2011)。本次研究將發病臟器鈎菌於一般培養基及添加 cysteine 氨基酸的培養基，並置於室溫及 30 °C 培養，皆無法朗西斯氏菌生長發育。Kamaishi *et al.* (2005) 將自行感染法朗西斯氏菌之日本三線雞魚之脾臟，使用添加 1% 血紅蛋白之 cysteine heart agar 進行培養，亦未能成功分離到此菌。但比較謝 (2006) 採集臺灣具臨床症狀之發病吳郭魚使用一般例行性人工培養基，放置於 23、30 及 35 °C 三種不同溫度下，培養 7 天，此菌皆無法發育；若培養於 Thayer-Martin agar 上於 23 °C 下 3~6 天，可培養出呈現光滑、灰白色色澤之

菌落。因 *Francisella* spp. 生長速度較為緩慢，一般最適合之生長溫度介於 23 ~ 28 °C，而無法於 35 °C 以上生長。因此，與 Duncan 或 Birkbeck 應用僅添加 cysteine 或血鐵素的特殊培養基即可培養到病原菌之結果不同；但本實驗符合於感染溫暖水域的吳郭魚菌種 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* 於 30 °C 以上即不會生長發育之結論，目前已知魚類分離出的法朗西斯氏菌均無法在 35 °C 的溫度下生長，且實驗指出將  $5 \sim 7 \times 10^7$  cfu/ml 的菌量注射到實驗鼠的腹腔，也無法造成實驗鼠的感染，也沒有自實驗鼠臟器分離到細菌，因此推斷造成魚類感染的法朗西斯氏菌並不會造成人畜共通傳染病 (Duodu and Samuel, 2011)。

因為本菌使用一般之培養基不易分離，通常須另外添加 cysteine、牛血或血鐵素等不同配方的特殊培養基，在適合的溫度下培養，細菌才會生長發育。因此應用 16S rRNA 及 16-23S internal transcribed sequence 方式增幅檢測方法便成為本病臨床常用之診斷方法 (Soto *et al.*, 2010, 2011; Duncan *et al.*, 2011)。本次實驗雖未能分離到 *Francisella* spp. 細菌，但將病材進行核酸萃取並應用謝 (2007) 的序列檢測聚合酶鏈鎖反應，定序後之核苷酸序列結果與 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* strain 序列最為相近 (相似度 identities = 100%)，證實本次研究中無論出現臨床症狀與否之吳郭魚皆由 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* 所感染。比較 Hsieh *et al.* (2006, 2007) 利用聚合酶鏈鎖反應檢測感染之慈鯛科觀賞魚及吳郭魚，其 16S rRNA 基因序列產物與 *Francisella philomiragia*、*F. tularensis* subsp. *novicida* 及 *F. tularensis* subsp. *tylarensis* 相似度分別達 98.7%、97.4% 與 96.2%，只能認為其確實為 *Francisella* spp. 之感染。在國外之報告中利用 16S rRNA、loop mediated isothermal amplification (LAMP) 或 RT-PCR 等方法檢測到 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* 感染之魚種有吳郭魚與三線雞魚，野生鱈魚及野生鮭魚則感染 *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* 菌種 (Ottem *et al.*, 2008; Duncan *et al.*, 2011)，此次研究結果經由上述方法進行檢測，其結果證明桃園及新竹縣埤塘飼養之吳郭魚感染菌種為 *F. noatunensis* subsp. *orientalis*，已較 Hsieh *et al.* (2006; 2007) 更進一步證實感染菌種，亦與國外之報告結果相符合。

許多文獻証實法朗西斯氏菌在低於適合細菌生長溫度的溫度時，即使感染病原菌，也不會造成感染魚的發病死亡。Colquhoun and Duodu (2011) 實驗指出 *F. noatunensis* 在經過 8 °C、30 天或 12 °C、16 天的環境下，可轉變成休眠但無毒力的狀態。以上與本研究統計 2009 ~ 2011 年 8 月的檢測確診病例時間及溫度分佈圖相同 (Fig. 10)。本次病例樣本以 3 ~ 4 月及 10 ~ 11 月這 4 個月為發病高峰期，此時期埤圳的水溫大約為 23 ~ 27 °C，為法朗西斯氏菌的最適生長溫度，因此細菌大量增生引發全身性、多發性肉芽腫病變導致死亡。在 1、2 月份水溫過冷約於 20 °C 以下，7 ~ 9 月份水溫則超過 30 °C，現場發病情形及死亡遂逐漸停止。針對發病場於 6 ~ 8 月採集樣本進行檢驗，發現肉眼病變消失或只在後腎有少量結節出現，此結果亦與溫度之變化呈相對應關係；但以上樣本後腎組織切片下皆可見少量肉芽腫病變，這也與文獻指出法朗西斯氏菌在非最適溫度時呈現休眠的狀況符合。

多位學者曾証明法朗西斯氏菌可經由水體傳播造成人類與水生動物感染疾病 (Mignani *et al.*, 1988; Duodu and Colquhoun, 2010)，此種微生物已自小龍蝦、麝鼠及水被分離培養，並利用 PCR 檢測方式被確認為法朗西斯氏菌 (Jensen *et al.*, 1969; Forsman *et al.*, 1995; Anda *et al.*, 2001)。1994 年前研究發表造成吳郭魚大量死亡之疑似立克次體感染疾病皆發生於臺灣南部 (Chern and Chao, 1994; Chen *et al.*, 1994)，但後續研究則發現此種疑似立克次體感染症已造成全臺養殖吳郭魚之感染，並經由分子生物學証實此病原菌為法朗西斯氏菌 (Hsieh *et al.*, 2006)。法朗西斯氏菌的傳播必須藉由直接接觸的方式如接觸感染動物、污染的水或食物及蚊蟲叮咬等，但對於魚類，無須所謂的直接接觸，其生存的環境—水即是一個非常好的傳播途徑，只要有適當的溫度及相關環境因子的配合，即可造成大規模的感染 (Forsman *et al.*, 1995; Anda *et al.*, 2001; Duodu *et al.*, 2010)。有實驗顯示，將魚隻放置於含病原菌的水體中，10 天後有 80% 的死亡率，病變和自然感染的病變相同 (Lanrie *et al.*, 2008)。另一實驗顯示，將腹腔注射病原菌的感染魚隻放置於實驗池中 73 天後，即造成原池中 50% 的魚隻感染死亡 (Birkbeck *et al.*,



2011)。雖然此次未能將 65 個埤塘全面進行採樣，但以上文獻結果與本研究針對湖口灌區轄內之光復圳及桃園大圳發生場及相關下游埤圳感染之調查結果相符合，這或許可說明了為什麼法朗西斯氏菌現在如此普遍存在於臺灣各養殖池中。

目前對於法朗西斯氏菌的感染及傳播機制尚未非常的瞭解，且並不是所有的感染魚隻都有臨床上或組織學上的病變，而一般使用的常規培養基又無法分離培養到此菌，因此還有很多潛藏的感染場尚未被發現。隨著環境的變遷，野外捕捉的魚量巨幅減少當中，養殖漁業勢必成為未來魚貨的重要來源，而法朗西斯氏菌造成吳郭魚產業嚴重的經濟損失，已逐漸受到各界的重視。現尚未有疫苗或藥物有效的預防及控制法朗西斯氏菌症，若能針對本病發展一套有效的監測方法或疫苗來預防此病發生，將會是吳郭魚養殖業者的最大福音 (Oyston and Griffiths, 2009)。

## 參考文獻

- 劉俊廷, 莊金玉, 莊惟超, 蔡信雄, 李朝全 (2011) 吳郭魚法朗西斯菌感染症. 中華民國獸醫病理學會組織病理研討會專輯, 行政院農業委員會家畜衛生試驗所編印, 88-90.
- 鄧晶瑩, 彭如賢, 陳嫩玫 (2011) 星雞魚奴卡氏菌感染症. 中華民國獸醫病理學會組織病理研討會專輯, 行政院農業委員會家畜衛生試驗所編, 83-87.
- 謝嘉裕 (2006) 慈鯛科魚類法朗西斯樣菌感染症之研究. 國立屏東科技大學博士論文.
- Anda, P., J. S. Del., J. M. Pozo., D. Gracia., R. Escudero., F. J. Garcia Pena, M. C. Lopez Velasco., R. E. Selleck., M. R. Jimenez Chillaron., L. P. Sanchez Serrano and J. F. Martinez Navarro (2001) Waterborn outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.*, 7: 575-582.
- Baumgartner, W. (2011) Bacterial Granulomatous Disease in Fish-Varied Staining Methods Identify Pathogens. *Global Aquacul. Advocate*, 1: 35.
- Birkbeck, T. H., S. W. Feist and D. W. Verner-Jeffreys (2011) *Francisella* infections in fish and shellfish. *J. Fish Dis.*, 34: 173-187.
- Birkbeck, T. H., M. Bordevik, M. K. Froystad and A. Baklien (2007) Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., I Chile. *J. Fish Dis.*, 30: 505-507.
- Chen, S. C., M. C. Tung., S. P. Chen, J. F. Tsai, P. C. Wang, R. S. Chen, S. C. Lin and A. Adams (1994) Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. *J. Fish Dis.*, 17: 591-599.
- Chern, R. S. and C. B. Chao (1994) Outbreak of disease caused rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. *Fish Pathol.*, 29: 61-71.
- Colquhoun, D. J. and S. Duodu (2011) *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet Res.*, 42: 47.
- Duodu, S. and D. Colquhoun (2010) Monitoring the survival of fish – pathogenic *Francisella* in water microcosms. *FEMS Microbiol Ecol.*, 74: 534-541.
- Fryer, J. L. and R. P. Hedrick (2003) *Piscirickettsia salmonis*: a gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.*, 26: 251-262.
- Foley, J. E. and N. C. Nieto (2010) Tularemia. *Vet. Microbiol.*, 140: 332-338.
- Forsman, M., A. Nyren, A. Sjostedt., L. Sjkvist and G. Sandsterom (1995) Identification of *Francisella tularensis* unnatural water sample by PCR. *Fed. Europ. Microbio. Soc.*, 16: 83-92.
- Hsieh, C. Y., Z. B. Wu, M. C. Tung and S. S. Tsai (2007) PCR and in situ hybridization for the detection and localization of a new pathogen *Francisella*-like bacterium (FLB) in ornamental cichlids. *Dis. Aquat. Organ.*, 75: 29-36.
- Hsieh, C. Y., M. C. Tung, C. Tu., C. D. Chang and S. S. Tsai (2006) Enzootic of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Suisanzoshoku*, 254: 129-138.
- Jeffrey, K. R., D. Stone, S. W. Feist and D. W. Verner-Jeffreys (2010) An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Dis. Aquat. Organ.*, 91: 161-165.
- Jenaen, W. I., C. R. Owen and W. L. Jellison (1969) *Yersinia philomiragia* sp. N., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra zibethica*). *J. Bacteriol.*, 100: 1237-1241.
- John, D. H., B. Samantha and N. V. Lucia (2009) Role of IFNG in granuloma formation in a zebrafish model of *Francisella* infection. *J. Immunol.*, 182: 134-94.
- Kamaishi, T., S. Miwa, S. Goto, T. Matsuyama and N. Oseko (2010) Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantean* caused by a *Francisella* sp.

- bacterium. *Dis. Aquat. Organ.*, 89: 145-154.
- Kamaishi, T., Y. Fukuda, H. Nishiyama, H. Kawakami, T. Matsuyama, T. Yoshinaga and N. Oseko (2005) Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-lined grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Fish Pathol.*, 40: 67-71.
- Labrie, L., J. Ng, Z. Tan, C. Komar, E. Ho and L. Grisez (2008) Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia. *Dis. Asian Aquacul.*, VI: 297-312.
- Larson, C. L., W. Wicht and W. L. Jellison (1955) A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water. *Public Health Rep.*, 70: 253-258.
- Mauel, M. J. and D. L. Miller (2002) Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infection in fish: a review. *Vet Microbio.*, 87: 115-123.
- Mauel, M. J., C. Ware and P. A. Smith (2008) Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *J. Vet Diag. Inves.*, 20: 213-214.
- Mauel, M. J., E. Soto, J. A. Moralis and J. Hawke (2007) A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J. Aqua. Anim. Health*, 9: 27-34.
- Mauel, M. J., D. L. Miller, E. Styer, D. B. Pouder, R. P. Yanong, A. E. Goodwin and T. E. Schwedler (2005) Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States. *J. Vet Diagn. Invest.*, 17: 601-605.
- Mignani, E., F. Palmieri, M. Fontana and S. Marigo (1988) Italian epidemic of waterborne tularemia. *Lancet (Letter)*, 2: 1423.
- Nylund, A., K. F. Ottem, K. Watanabe, E. Karlsbakk and B. Krossoy (2006) *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadu morhua*) farming. *Arch. Microbiol.*, 185: 383-392.
- Olsen, A. B., J. Mikalsen, M. Rode, A. Alfjorden, E. Hoel, K. Straum-Lie, R. Haldorsen and D. J. Colquhoun (2006) A novel systemic granulomatous disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua*, associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *J. Fish Dis.*, 29: 307-311.
- Ottem, K. F., A. Nylund, E. Karlsbakk, A. Friis-Moller and T. Kamaishi (2009) Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 106 (4): 1231-1243.
- Ottem, K. F., A. Nylund, E. Karlsbakk, A. Friis-Moller, B. Krossoy and D. Kanppskog (2007) New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Arch. Microbiol.*, 188: 547-550.
- Oyston, P. C. and R. Griffiths (2009) *Francisella* virulence: significant advances, ongoing challenges and unmet needs. *Expert Rev. Vaccines*, 8: 1575-1585.
- Petersen, J. M., J. Carlson, B. Yockey, S. Pillai, C. Kuske, G. Garbalena, S. Pottumarthy and L. Chalcraft (2009) Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48: 663-667.
- RuthEllen, K. B., S. T. Clyde, Mc. H. Kathleen and K. F. Bradley (2008) *Francisellosis* in Tilapia. *CTSA Pub.*, 158 pp.
- Sjosted, A. (2005) Genus I *Francisella* Dorofèev 1947, 176a. *Bergey's of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria*, 2: 200-210.
- Soto, E. and F. Revan (2012) Culturability and persistence of *Francisella notaunensis* subsp. *Orientalis* (syn *Francisella asiatica*) in sea- and freshwater microcosms. *Microb. Ecol.*, 63 (2): 398-404.
- Soto, E., B. A. Stephanie and R. Flooyd (2012) Effect of temperature and salt concentration on *Francisella notaunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Dis. Aquat. Organ.*, 101: 217-223.
- Soto, E., J. P. Hawke, D. Fernandez and J. A. Morales (2009) *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), in Costa Rica. *J. Fish Dis.*, 32: 713-722.
- Soto, E., D. Bowles, D. Fernandez and J. P. Hawke (2010) Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Dis. Aquat. Organ.*, 89: 199-207.
- The health situation in Norwegian aquaculture (2008) The National Veterinary Institute, 22-25.

## The Investigation on the Infection of Francisellosis in Farmed Tilapia in Taoyuan and Hsinchu Areas

Ching-Ying Deng<sup>1\*</sup>, Meei-Mei Chen<sup>2</sup>, Ju-Hsien Peng<sup>2</sup>, Yu-Chiao Yang<sup>2</sup>, Chih-Chien Chang<sup>1</sup>,  
Hui-Ping Tsai<sup>1</sup> and Chin-I Chang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

### ABSTRACT

In recent years, climate changes accompanied by unstable water quality have often caused outbreaks of diseases, followed by mass mortality of farmed tilapia in Taiwan. Francisellosis was previously known as piscirickettsiosis (rickettsia-like organism infection), but now the pathogens involved have been renamed to *Francisella* spp. The disease has been reported as occurring in different countries in Europe, North and South America, and Asia (including Taiwan), causing infections among a variety of wild fish and farmed fish, and resulting in serious economic losses to the aquaculture industry. This paper investigated the francisellosis infections of farmed tilapia in Taoyuan and Hsinchu areas during different seasons, considering clinical signs and the relation of water transmission from 2009 to 2011. The results showed that *Francisella* spp. found in Taoyuan and Hsinchu areas cannot be isolated on common artificial media. The pathogen can be identified as *F. noatunensis* subsp. *orientalis* by polymerase chain reaction and DNA sequence assay. Downstream pools may be infected by water transmission from the drainage of upstream farms. There are two peak periods for francisellosis outbreaks, March-April and October-November, due to these periods are the most suitable temperature for the reproduction of *F. noatunensis* subsp. *orientalis*.

**Key words:** tilapia, Francisellosis, water transmission

---

\*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2463-3101; FAX: (02)2462-8138; E-mail: ycdeng@mail.tfrin.gov.tw