

## 由Clostridium botulinum C型 毒素引起鴨群集體中毒

呂榮修<sup>1</sup> 東量三<sup>2</sup> 邱仕炎<sup>3</sup> 彭玄桂<sup>3</sup> 魏助協<sup>4</sup>

劉明本<sup>4</sup> 林地發<sup>1</sup> 李永林<sup>1</sup> 楊喜吟<sup>1</sup> 王金和<sup>1</sup>

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 日本農林水產省家畜衛生試驗場
3. 農林廳畜牧科
4. 台中縣家畜疾病防治所

1981年10月4日，在台中縣沿海地區龍井、梧棲、大安等3鄉鎮14養鴨戶所飼養之22,450隻鴨及火雞29隻，突然發生中毒死亡，在短短4日病程中死亡及淘汰7,230隻（32%），從病鴨未能檢出細菌及毒素，但從飼料中所添加魚漿原料之虱目魚肉檢出C. botulinum C型毒素，由此研判中毒原因為C型毒素污染飼料引起之鴨Botulism，亦即在本省首次發現由C. botulinum C型毒素污染魚肉引起鴨之中毒病例。

Clostridium botulinum 以芽胞形態廣佈在土壤中，本菌能產生強烈的神經毒，又該毒素依其抗原性之差異可分類A～G型等7型<sup>(6)</sup>。

1922年Bengtson<sup>(7)</sup>由蛆，Seddon<sup>(8)</sup>由發生延髓麻痺(bulbar paralysis)斃死牛分離到C型菌。

C型Botulinum毒素常對野禽，如野鳥及水鴨發生大量死亡<sup>(3,6)</sup>，對家禽如雞、雉雞、火雞、鴨等亦常發生中毒而死亡<sup>(5,6,12,15)</sup>，如1968～1975年在英國發生於2～9週齡之肉雞病例<sup>(9,15)</sup>及1969、1974年在美國<sup>(14)</sup>亦發生同樣病例等均頗受各方重視，而其他國家如荷蘭及日本也有C. botulinum C型毒素引起雞<sup>(5,6)</sup>或Mink中毒斃死例<sup>(2)</sup>。

在本省由C. botulinum引起家禽的Botulism迄今尚無病例報告，此次在台中縣沿海地區，發現多戶養鴨場突然發生由C. botulinum C型毒素污染飼料而引起Botulism病例。本病例因飼料中所加之魚漿中，含有甚高之C型毒素，致使鴨群死亡慘重，筆者等為明瞭其病因，曾深入探討，茲將所得成績列述供參考。

### 材料與方法

試驗鴨；產蛋中之蛋鴨，正蕃鴨種鴨，不拘年齡呈同一症狀死亡或瀕死邊緣之病鴨10隻供細菌檢查或病理檢查之用。

組織病理學檢查：中毒病（死）鴨，經解剖後採取主要臟器以10%中性福馬林液固定，石腊包埋、切片、H-E染色後鏡檢。

細菌學檢查：中毒鴨各主要臟器，問題飼

料，魚肉等使用 Trypticase Soy agar 或加 5% 馬血液之 Trypticase Soy agar, Cooked meat medium (Difco) Gifu Anaerobic Medium (GAM Broth, 日水) 培養或增菌，如用 Cooked meat medium 及 GAM Broth 增菌者，再以 60℃ 及 80℃ 分別加熱處理後接種於 5% 蛋黃加 GAM 培養基 (日水) 以 Gas pak (BBL) 方法厭氧培養 48 小時，又魚肉併用 Modified Viande Levure Agar Base (變法) 接種病材後，以東式瓦斯噴射法，厭氧培養法分離細菌。

虱目魚肉之毒素檢查：魚肉 1 g 用生理食鹽水製成 5 倍稀釋乳劑，經 3,000 RPM 遠心 20 分鐘後，取上清液 0.5ml 接種於小白鼠腹腔內，如 Botulinum 毒素存在時，被接種的小白鼠會呈現典型症狀而死亡。

魚肉毒素力價之測定：魚肉稀釋為 5, 10, 40, 80, 85, 100 倍，然後分別於 80℃ 20 分鐘加熱與不加熱兩組，各稀釋液接種 2 隻小白鼠，每隻腹腔內注射 0.5ml 觀察 4 日。

毒素之中和試驗：將 C. botulinum C 型及 D 型毒素之家兔免疫血清各稀釋 10 及 100 倍，並分別取其 0.5ml，添加於稀釋 10、40 及 80 倍之魚肉毒素 0.5ml，混合後接種小白鼠腹腔內。

問題飼料之中毒試驗：以自由採食方式將發生中毒之飼料，餵飼 3 歲鴨 2 隻，6 個月齡鴨 2 隻，2 個月齡鴨 2 隻，4 週齡鴨 5 隻，6 週齡雞 10 隻，觀察 7 日。

含有 C 型毒素虱目魚對鴨飼養試驗：變壞虱目魚肉 160 g，經細切後經口投與 1 個月齡鴨 8 隻，每隻給與 20 g，另自市場購買新鮮虱目魚以上述用量用法給與同年鴨 4 隻，另設置 4 隻給與不添加魚肉混合飼料為對照組。

## 結 果

### 一、發生狀況

1981 年 10 月 4 日，在台中縣龍井鄉、梧棲鎮、大安鄉等沿海地區 14 養鴨戶之鴨隻，陸續發生中毒死亡，據龍井鄉忠和村海尾仔巷

陳及林畜主稱，其所飼養之蛋鴨共 7,400 隻，每日餵飼 3 次，早晨及中午給飼台糖公司新營副產加工廠出品之特配蛋鴨專用飼料，下午給飼統一牌蛋鴨用完全飼料，均為粒狀者，每餐另加日本製魚粉各 5 Kg，又每天加豆餅 132 Kg 並調配糠殼 20 Kg 飼養，且早餐飼料中特加配下雜魚漿約 60 Kg，所調配魚漿飼料限該餐餵完。如此飼養方法連續 2 年未曾發生差錯，但於 10 月 4 日晨，依法以下雜魚漿 (含有變敗之虱目魚) 調配台糖公司飼料給與鴨群餵完後，約經 5 小時部分蛋鴨開始軟腳，垂頭、垂翼匍伏地面，中毒較深者旋即死亡或苟延生命至 2 - 3 日，經調查全縣中有 3 鄉鎮，14 養鴨戶發生飼料中毒，其中包括種鴨場 10 戶，蛋鴨場 5 戶 (1 戶兼飼種鴨)，計共飼養 22,450 隻鴨及火雞 29 隻，合計 22,569 隻，病程 4 日 (10 月 5 日 ~ 10 月 8 日) 之統計有 7,230 隻中毒死亡，死亡率達 32% (表 1)。

分析 14 養鴨戶之中毒死亡率在 10-85.7%，高達 80% 以上者有 3 戶，又以中毒死亡率第 1 日為最高有 16.3%，以後逐日減半至第 5 日已漸恢復未再死亡。

### 二、C. botulinum C 型毒素污染飼料之中毒試驗。

由現場帶回鴨中毒飼料 (經過 3 日)，經餵飼 3 歲齡鴨，6 個月齡及 2 個月齡鴨各 2 隻，4 週齡鴨 5 隻及 6 週齡雞 10 隻，結果發現餵完飼料 6-12 小時開始發病，其中 2 個月齡鴨 2 隻中毒較深於第 4 日死亡，其餘 6 個月齡及 3 歲齡鴨均 4 - 5 日後恢復，而 4 週齡鴨及 6 週齡雞經觀察 7 日未見有症狀，但其食慾及精神稍差 (表 2)。

耐過中毒之 3 歲齡鴨，復於 10 日後再給與同一問題飼料，結果與表 2 成績類似於第 1 - 3 日仍發現嚴重中毒 (表 3)。

表 1 台中縣三鄉鎮發生 C. botulinum 中毒之死亡及淘汰鴨數

養鴨戶	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	計
	種鴨	蛋鴨	蛋鴨	種鴨	"	"	"	種鴨 種蛋	種鴨	"	"	蛋鴨	"	種鴨	
飼養隻數	600	7,400	3,560	2,700	1,500	500	500	850	520	490	600	1,350	1,550	449 <sup>*</sup>	22,569
經 1	326	1,132	673	368	147	136	21	160	10	190	190	125	120	88	3,686 (16.3)
過 2	118	394	128	109	86	62	15	160	25	178	200	255	260	110	2,100 (9.3)
日 3	42	126	76	72	42	34	9	90	15	40	110	165	145	33	999 (4.4)
數 4	19	38	23	30	25	18	5	10	0	12	10	55	60	28	333 (1.5)
計 (%)	505 (84.2)	1,690 (22.8)	900 (25.2)	579 (21.4)	300 (20)	250 (50)	50 (10)	420 (49.4)	50 (9.6)	420 (85.7)	510 (85)	600 (44.4)	585 (37.7)	259 (57.6)	7,118 (31.5)

\* 包括火雞 29 隻

表 2 C. botulinum C型毒素污染飼料之中毒試驗

禽 種	年 齡	鴨				雞
		3 年	6 個月 齡	2 個月 齡	4 週 齡	6 週 齡
經 過 日 數	1	2/2 *	2/2	2/2	0/5	0/10
	2	2/2	2/2	2/2	0/5	0/10
	3	2/2	2/2	2/2	0/5	0/10
	4	2/2	0/2	2/2 (死)	0/5	0/10
	5	0/2	0/2	0	0/5	0/10
	6	0/2	0/2	0	0/5	0/10
	7	0/2	0/2	0	0/5	0/10

註：\*分母為試驗隻數，分子為發病隻數

表 3 試驗鴨耐過中毒 10 日後再給與同一污染飼料發病情形

經 過 日 數	1	2	3	4	5	6
3 年 老 鴨	2/2 *	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
6 個 月 齡 鴨	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2

註：\*分母為試驗隻數，分子為發病隻數。

### 三 自然病例及試驗中毒病例之臨床症狀。

問題飼料餵食後 6 小時前後開始中毒發病，病鴨最初軟腳，垂翼即強迫走動時兩翼垂地站立呈企鵝狀姿勢（圖 1），羽毛逆立、垂頭喪氣或擺頭，排出黃綠色或水樣性下痢便，一般病鴨離群匍伏地面呈昏睡狀（圖 2），在水中者體軀半沈靜止不動有如死亡狀（圖 3），病程 1 - 4 日。

### 四 病理解剖

主要臟器均未發現特殊病變。

### 五 組織病理變化

NO. 2940 病例呈嚴重的腹膜炎病變，肝及脾漿膜面均有 1 層很厚的纖維性結締組織增生及多量嗜中性球，單核球及巨噬球的浸潤。其餘 9 個病例有 6 個病例肝呈輕~中等度的脂肪變性，在門脈區周圍有少量單核球浸潤（圖 4），其餘各臟器均無明顯病變（表 4）。

### 六 細菌檢查

從 10 隻病鴨各主要臟器，以一般細菌培養法及厭氣性細菌培養法，均未能分離有意義的細菌。

表 4 鴨 Botulism 病例之組織病理變化

oraan	P.M.NO.										
	2940	2941	2942	2943	2944	2946	2947	2953	2954	2955	
Liver	-	++	++	-	+	-	-	++	++	++	
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Esophagus							-				
Proventriculus			-	-		-	-	-	-	-	
Small intestine			-		-	-	-	-	-	-	
Pancreas			-		-	-	-	-	-	-	
Heart	-				-	-	-	-	-	-	
Trachea									-		
Lung			-		-	-	-	-	-	-	
Brain			-			-			-	-	

++ : Diffuse fatty change.  
 + : Slight fatty change.  
 - : No remarkable lesion.



圖1 中毒 蛋鴨兩翼垂地站立呈企鵝狀姿勢

呂榮修 東 量三 邱仕炎 彭玄桂 魏助協  
劉明本 林地發 李永林 楊喜吟 王金和



圖 2 中毒種公鴨匍伏地面呈昏睡狀態



圖 3 在水中半沉靜止不動之中毒鴨

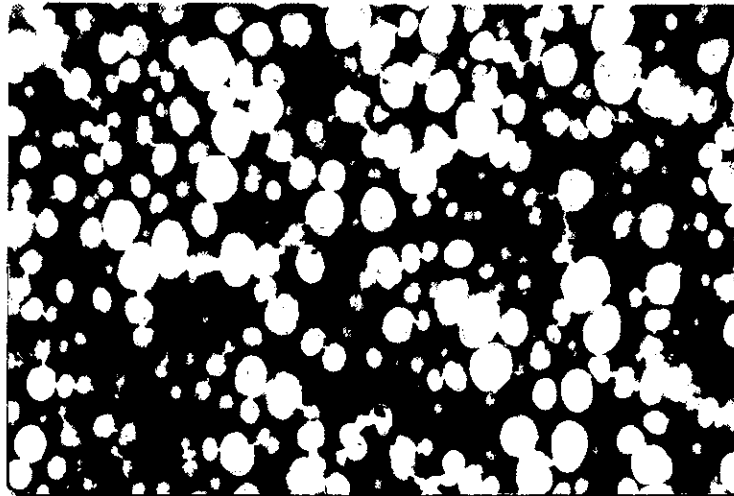


圖 4 肝呈脂肪變性 HE 染色 × 400

分離之 *C. bifermentans* 接種培養於毒素產生用培養基 (VFG medium)，取其上清液 0.5

ml 接種於 2 隻小白鼠尾靜脈內，結果未死亡而證實該菌不產生毒素。

表 5 由魚肉分離 1 厭氣性菌之生化學性狀

Hemolysin	+	Acid from	
Lipase	-	Glucose	+
Lecithinase	+	Lactose	-
Nitrate	-	Saccharose	-
Indol	+	Salicin	-
H <sub>2</sub> S production	+	Maltose	+
Digestion of Gelatin	+	Volatile fatty acid	A *
Milk	+	Toxicity for mouse	-
Urease	-		

註 \* A : acetic acid

又中毒飼料以 Cooked meat medium 或 G AM Broth 增菌培養 24 小時，然後取 0.1ml 培養液接種於 2 隻小白鼠腹腔內，經過接種後 48 小時均發病死亡。從其臟器均能純粹分離出 proteus SPP，但該菌對鴨人工接種並無病原性。

又從中毒飼料原因之魚漿原料之 1 條虱目魚肉裏，以瓦斯噴射厭氣性培養法分離 1 株厭氣性菌，分離菌經生物學性狀檢查同定為 *C. bifermentans* (表 5)。

七由魚肉分離 *C. bifermentans* 之毒素產生

能力。

分離自含有毒素魚肉之 *C. bifermentans* 1 株，經接種培養於毒素產生用培養基 (VFG medium)，取上清液 0.5ml 接種於 2 隻小白鼠尾靜脈內，結果並未死亡，證實分離之 *C. bifermentans* 不會產生毒素。

八含有毒素虱目魚對鴨人工發病試驗。

虱目魚肉 160 g，經細切後對 1 個月齡鴨，每隻鴨以人工填食 20g 至口中，結果鴨在 12 小時後中毒發病死亡 2 隻，18 小時後又死 4 隻，其餘 2 隻為正常，即試驗組 8 隻有 6 隻

(75%)死亡，又對照組以新鮮虱目魚肉同量口投之4隻，一般飼料飼養之4隻均為正常(表6)。

表6 含有C型毒素虱目魚對鴨人工投與試驗

經過時間	試驗組		對照組	
	含有C型毒素虱目魚	新鮮虱目魚	飼料*	料*
0	0/8 **	0/4	0/4	0/4
12	2/8	0/4	0/4	0/4
18	4/8	0/4	0/4	0/4
24	0/8	0/4	0/4	0/4
計	6/8 (75%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)

註\* 註\*：未添加虱目魚僅給與市售混合飼料  
\*\*分母為試驗隻數，分子為死亡隻數

表7 虱目魚肉毒素對小白鼠之病原性

魚肉毒素	稀釋倍數					
	5	10	40	80	85	100
80℃ 20' 加熱	0/2	0/2	0/2	0/2		
非加熱	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2

註 分母為試驗隻數，分子為死亡隻數

表8 虱目魚肉毒素對C. botulinum C及D型抗血清之中和試驗

毒素		稀釋倍數			
		10	40	80	
抗毒素血清	C 15	10倍	0/2	0/2	0/2
		100倍	0/2	0/2	0/2
	D 1873	10倍	2/2	2/2	0/2
		100倍	2/2	2/2	2/2

註 分母為試驗隻數，分子為死亡隻數

#### 九虱目魚肉毒素之鑑定

因自虱目魚肉所分離之 *C. bifermentans* 並不產生毒素，可能含有其他毒素，故再探討魚肉所含毒素之力價及其種類，魚肉以生理鹽水稀釋成爲 5, 10, 40, 80, 85, 及 100 倍後，各接種 0.5ml 於 2 隻小白鼠腹腔內，經

接種 6 小時小白鼠呈現腹部陷凹之特殊症狀，經過 12-48 小時後即死亡。魚肉中所含毒素對小白鼠之力價爲 85 LD<sub>50</sub>/0.5ml，但經 80℃ 20 分鐘加熱之魚肉稀釋液對小白鼠並無毒性，亦即魚肉中所含有之毒素爲易熱性毒素(表 7)。



又魚肉毒素與硫胺分劑所精製之C及D型毒素免疫家兔血清中和試驗，結果C型免疫血清與魚肉毒素完全中和，而D型免疫血清並不中和，由此成績證明虱目魚肉中所含之毒素為C. botulinum C型毒素（表8）。

## 討 論

在1908年至1913年，美國及加拿大，以鴨為主的水禽發生大量死亡，以後其他各地亦相繼發生野禽死亡而被稱為“western duck sickness”，及至1930年始由野禽屍體，或從發生地區之水及土壤裡分離出C型Botulinum細菌，由此推測水禽為之致死原因為Botulism<sup>(1)</sup>。該菌C型毒素之來源，一般存在於水棲植物，western duck sickness屍體上，或由C型菌污染的鳥禽屍體，以及斃死禽體所發生之蛆和本菌濃厚分佈而導致鵝及鴨斃死場所之土壤中，在台灣很早以前，養鴨人家就常有放飼鴨，因食用死禽肉蛆而引起急性中毒死亡例，林<sup>(2)</sup>曾以利用死鴨腐爛後所產生之肉蛆，對3個月齡土蕃鴨餵食25隻(2gm) 50隻(4gm)、80隻(5gm)、及100隻(8gm)，結果餵食100隻(8gm)者於4-5小時後發病，並延至5小時後死亡，其餘各組均呈輕~重度中毒症狀後耐過。但餵食人糞蛆100隻者未有中毒而懷疑肉蛆含有某種毒素，但也有人懷疑為Ptomainotoxism，至今對此因尚無報告。

此次台中縣14養鴨戶，總數22,450隻鴨及29隻火雞，在短短4日內即有7,230隻(32%)集體中毒致死，為本省首見最嚴重的中毒病例，發生鴨場之死亡率在10-86%，平均31.5%，其死亡率之不一可推測飼料中所混合之魚漿(中毒物質)多寡及混合飼料之營養成分有關。

對於本病之死因探討，因其病理解剖上並無特殊病變，故可將由P. multocida引起之家禽霍亂及鴨瘟等疾病排除，以問題飼料餵飼鴨之人工中毒試驗結果却證實該病由飼料所引起，且與飼料中所添加之魚漿有所關連，筆者等對飼料予以細菌檢查未能檢出C. botulinum，但由供魚漿所用之虱目魚肉，以厭氣性培養法分離1株C. bifermentans，但該菌之培

養濾液中並無毒素之產生，而虱目魚肉對試驗鴨及小白鼠却有致死性毒素，由此證明虱目魚肉中之毒素並非C. bifermentans所產生，據文獻<sup>(3)</sup>記載C. bifermentans對人及各種動物有病原性，但也有非病原性菌株之存在。對於該菌之病原性有待探討。

腐敗虱目魚肉對小白鼠有85LD<sub>50</sub>/0.5ml毒素力價，發病小白鼠均腹部凹陷症狀，此與其他報告一致<sup>(4)</sup>。又該毒素經80℃20分鐘加熱後毒性消失，為對熱敏感性毒素，該毒素以小白鼠作中和試驗，結果不與D型毒素免疫血清中和，能與C型毒素抗血清中和，由此成績顯示虱目魚中含有C型毒素。

人之肉中毒(Botulism)以A, B, E, F型毒素為主<sup>(5)</sup>，C, D型毒素不引起人中毒，此次梧棲鎮民童氏者曾購買該批6條虱目魚，經去肚後以煮或煎供全家8人作膳而無恙，這與C型毒素主要引起家禽之中毒而對人並不能引起中毒，且該虱目魚經加熱處理而破壞毒素有關。

C. botulinum常污染河川<sup>(6)</sup>，又本菌芽胞在水域或污泥中能感染魚，有些在魚腸道內常發現少量的本菌，使清洗過程中常污染魚肉，導致人畜中毒<sup>(7)</sup>。

## 誌 謝

本論文承國立屏東農業專科學校董明澄教授指正謹致謝忱。

## 參考文獻

1. 飯田廣夫 1968. クロストリジウム屬，獸醫微生物學，平戶勝七編，養賢堂・東京。
2. 伊藤 武，坂井千三，田淵清，今井信實，江木敬之. 1976. 北海道のミンク養殖場で發生したボツリヌスC型菌による中毒斃死例について，麻獸大研報1(2) 29-35。
3. 伊藤 武，齊藤香彦，坂井千三，田淵清. 1978. 野鳥のボツリヌスC型中毒に關する研究—特にC型毒素の產生とカモに對する毒素の感受性。麻獸大研報3(1) 75-81。
4. 林恒雄. 1963. 肉蛆對鴨子之中毒試驗，台灣省畜牧獸醫工作報告5.1 34-34。
5. 坂口玄二，梶 玲子. 1980. 鵝ボツリヌス症

- ，鶏病研報 16・増刊號 37-49。
6. 山部邦展，古閑雄二郎・1982・ブロイラに見られた *Clostridium botulinum* C型菌によるボツリヌス症，鶏病研報 18，21-24。
  7. Bengtson, I.A. 1922. Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. publ. Hlth. Rep. 37, 164-170
  8. Blandfrd, T.B., T.A. Roberts, and W.L.G. Ashton. 1969. Losses from Botulism in Mallard Duck and other Fowl. Vet. Rec. 85, 541-543.
  9. Blandford, T.B., and T.A. Roberts. 1970. An outbreak of Botulism in Broiler chickens. Vet. Rec. 87, 258-261.
  10. Bryan Frankal. 1980. Epidemiology of Disease Transmitted by Fish, Shelfish and Marine crustaceans in the United Stats, 1970-1978. Journal of Food protection. Vol. 43No. 11, 859-876.
  11. Hariharan, H., and W. Mitchell. 1977. Type c botulism the agent, host spectrum and environment. Vet. Bull. 47, 95-103.
  12. Graham, R., and I.B. Boughton. 1923. *Cl. botulinum* type C associated with a limberneck-type disease in chickens and ducks. Bull. 246, Illinois Agri. Expt. Sta. 34.
  13. Kautter Donald., and R.K. Lynt. 1978. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual for foods. 5th ed. Association of official Analytical chemists. Washington, D.C. XIV-1-XIV-16.
  14. Page, R.K., and O.J. Flectcher. 1974. An outbreak of type C botulism in three-week-old broilers. Avian Dis. 19, 192-195.
  15. Roberts, T.A., A.I. Thomas, and R. J. Gilbert. 1973. A third outbreak of type C botulism in broiler chickens. Vet. Rec. 92 107-109.
  16. Sedden, H.R.. 1922. Bulbar paralysis in cattle discussion on the relationship of the Condition to forage poisoning (botulism), J. Camp. pathol. Therap. 35, 147-190.
  17. Smart, J. L. and Roberts, T. A. 1977. An outbreak of type C botulism in broiler chickens. Vet. Rec 100, 378-380.

## POISONING OF DUCKS BY CLOSTRIDIUM BOTULINUM TYPE C

Y. S. LU<sup>1</sup>, RYOZO AZUMA<sup>2</sup>, S. Y. CHIU<sup>3</sup>, S. Q. PENG<sup>3</sup>, C. S. WEI<sup>4</sup>,  
M. B. LIU<sup>4</sup>, D. F. LIN<sup>1</sup>, Y. L. LEE<sup>1</sup>, S. Y. YANG<sup>1</sup>, C. H. WANG<sup>1</sup>

1. *Taiwan Provincial Institute for Animal Health.*
2. *Hokkaido Branch Laboratory, National Institute of Animal Health.*
3. *Dept. of Forestry and Agriculture Taiwan Provincial Government.*
4. *Taichung Hsien Livestock Disease Control Center.*

Poisoning of ducks occurred in 14 duck ranches with 22,450 ducks and 29 turkeys at 3 towns, Long-Gin, Wu-Chi, and Ta An, Taichung County on Oct. 4, 1981. Seventy thousand two hundred and thirty (32%) of them were discarded within 4 days of outbreak. Toxin of *C. botulinum* type C was isolated from milkfish but not from the feed. This was the first case of *Clostridium botulinum* type C contaminated milkfish poisoning in Taiwan.