

病例報告：加州鱸流行性潰瘍症候群

陳怡玟*、吳介豪、林育如

農業部獸醫研究所

摘要 流行性潰瘍症候群是由黴菌 *Aphanomyces invadans* 造成魚體表潰瘍的疾病，多為季節性感染，可感染多種淡水魚與河口魚。本病例報告以肉眼病變、組織病理學、特殊染色及分子生物學呈現加州鱸流行性潰瘍症候群病例。病魚體表可見大面積紅棕色潰瘍，組織病理學下可見潰瘍處由大區域結締組織包被之炎症壞死區，肌肉細胞斷裂並消失，高倍下可見病灶區有大量卵圓至長條狀厚壁中空黴菌菌絲。而經分子生物學檢測可增幅出 *Aphanomyces invadans* 特定基因片段。本病例為臺灣首次確診發生在加州鱸流行性潰瘍症候群之病例。

關鍵詞：加州鱸、流行性潰瘍症候群

緒言

流行性潰瘍症候群 (epizootic ulcerative syndrome, EUS) 是一種由黴菌所造成的魚類疾病，可感染百種以上的淡水魚及河口魚，在亞洲、澳洲、北美洲及非洲都有病例報告 [10]。本病首次報告於 1971 年日本香魚養殖場 [6]，隔年澳洲的河口魚，特別是鱸魚也發現類似症狀 [12]。之後在美國 (1978)、南亞及東南亞 (1986)、南非 (2007) 及加拿大 (2010) 等區域陸續有病例發生，目前至少有 28 個國家有 EUS 的病例報告 [7]。本病又被稱為紅斑病 (red spot disease, RSD)、黴菌性肉芽腫病 (mycotic granulomatosis, MG)、潰瘍性黴菌病 (ulcerative mycosis, UM)，於 2005 年有學者建議將本病重新命名為流行性肉芽腫性絲菌病 (epizootic granulomatous aphanomycosis, EGA) [2]。但目前最常使用的名稱仍是 EUS。

EUS 是由 *Aphanomyces invadans* 所引起，為一種水黴目 (Saprolegniales) 卵菌綱 (Oomycetida) 的真菌。*A. invadans* 具無隔膜菌絲，通常以孢子進行無性繁殖，因此被分類在絲囊黴屬 (*Aphanomyces*) [11]。此類真菌具兩種型態的游動

孢子，初級游動孢子及次級游動孢子。其孢子囊寬度窄小近似菌絲，內含單列的初級游動孢子，初級游動孢子會在孢子囊開口處被囊化聚集成團，並轉化為次級游動孢子，次級游動孢子具兩個側鞭毛，可自由在水中游動。*A. invadans* 的游動孢子會受魚類皮膚黏液成份吸引，當孢子接觸到魚體表後會滲入脆弱區域並開始發芽形成菌絲，菌絲會廣泛侵入周圍皮膚及深入到肌肉層，導致大範圍的組織破壞而形成潰瘍 [11]，菌絲最終會產生孢子囊並釋放出更多游動孢子。游動孢子如無法接觸到合適的宿主或環境不佳時，會被囊化等待適合環境，這也造成 EUS 一旦爆發後會反覆發生的緣故。

A. invadans 在實驗室條件下最佳生長溫度範圍是 19 - 22°C，在 37°C 下無法於體外培養，在自然環境下，*A. invadans* 於 20 - 30°C 的溫度範圍生長最好，水體鹽度超過 2‰ 可以阻止病原傳播 [8]。依據文獻紀錄，水溫在 10 - 33°C 都有 EUS 的病例發生 [3, 8]，且通常與大量降雨有關 [3]，而在 17 - 19°C 的環境中可以減緩魚類感染真菌的炎症反應 [4, 5]。正常情況下，健康具感受性魚種即便以 *A. invadans* 進行浸泡感染也不會有臨床症狀，但若有其他病原存在、

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

皮膚損傷、水溫 (18 - 22°C)、低 pH 值 (6.0 - 7.0) 和水中溶氧低的情況都可能是發病的誘因 [9, 13]。

臨床上，感染魚隻會有食慾不振、昏昏欲睡、浮游等情形，一開始魚體可見針點狀的紅斑，中期會形成小型的皮膚潰瘍，最終魚體表會出現典型大範圍出血性、壞死性、開放性潰瘍。組織病理學檢查可見病變區域有無隔膜的黴菌菌絲及特徵性的肉芽腫性炎症反應。

本報告根據臨床症狀及肉眼病變做 EUS 的初步診斷，並進一步利用壓片檢查、組織病理學及分子生物學檢驗來確認其病原 [14]，並進行後續相關之研究。

材料及方法

病史

110 年 3 月 29 日新北市動物保護防疫處送檢一加州鱸養殖場病例。畜主表示該場共有 2 池，A 池於 10 日前引進約 40,000 尾加州鱸魚苗，最近 3 - 4 日均未進食，但未有死亡魚隻。B 池去 (109) 年 10 月進苗約 20,000 尾，飼養一個月後體表有發黴情形，養殖期間魚隻持續有死亡，至送檢時僅剩 2,000 餘尾，死亡率為 90% (18,000/20,000)。兩池的水源不互通，工具有避免共用，想確認新引入魚苗 (A 池) 是因緊迫而不進食或被 B 池魚隻感染。A 池送檢 13 尾活魚，平均體長約 7 公分，體重約 3.1 公克；B 池送檢 5 尾活魚，平均體長約 10 公分，體重約 15.3 公克。

寄生蟲學檢查

以剪刀取一小塊鰓組織置於載玻片上，覆蓋二次去離子水及蓋玻片，以光學顯微鏡進行濕壓片鏡檢。

細菌分離

兩池魚隻於肝臟、脾臟、腎臟及潰瘍處周邊肌肉組織以血液培養基進行細菌分離。

組織病理學檢查

包括蘇木紫 - 伊紅染色、PAS (Periodic acid-Schiff stain) 染色和 GMS (Gomori's methenamine

silver stain) 染色。以 10% 中性福馬林固定後的組織經修整、脫水、石蠟包埋及切片，再以蘇木紫 - 伊紅染色進行組織病理學判讀。檢查到疑似病灶後，切片再以 PAS 及 GMS 特殊染色後進行判讀。

分子生物學鑑定

- 核酸萃取：**送檢魚隻以五尾分為一組採樣，故 A 池魚隻共分為兩組，並將外觀異常魚隻集中於第二組。以滅菌的剪刀採取 200 mg 魚體 (含肝、脾、腎、鰓、腦及體表潰瘍組織)，置入 2 mL 均質管中後，注入 0.7 mL 的磷酸鹽緩衝生理鹽水 (phosphate buffered saline, PBS)。將均質管置入組織均質機中均質 4 次，每次 13 秒。均質後小離心管放入離心機內，以每分鐘 2,000 轉的速度離心 15 分鐘。製備好乳劑使用臺灣圓點自動核酸萃取儀及臺灣圓點核酸萃取套組並依其操作步驟進行。
- PCR 檢查：**依據世界動物衛生組織 (World Organisation for Animal Health, WOAH) 水生動物疾病診斷手冊 [14] 中公布之專一性引子對進行聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢測兩池魚隻是否帶有 *A. invadans* 之核酸。引子對序列為 Fwd Ainvad-2F : 5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3' 及 Rev Ainvad-ITSR1 : 5'-GCT-AAG-GTT-TCA-GTA-TGT-AG-3'，針對 *A. invadans* 的 ITS1 基因進行增幅，預期增幅產物為 234 bp。反應條件如下：加熱至 95°C · 2 分鐘，95°C (30 秒)、56°C (45 秒)、72°C (2.5 分鐘)，共進行 35 個循環，最後再以 72°C 反應 7 分鐘。

其他病原核酸檢測

利用 PCR、反轉錄聚合酶鏈反應 (reverse transcription PCR, RT-PCR) 或即時聚合酶鏈反應 (Real time PCR) 檢測兩池魚隻是否有其他加州鱸可能潛伏感染之病原核酸，檢測病原項目包含：巨大細胞屬病毒 (megalocytivirus)、嘉納虹彩病毒病 (red sea bream iridovirus disease, RSIVD)、石斑魚虹彩病毒 (grouper iridovirus, GIV)、蛙病毒屬

病毒 (ranavirus)、神經壞死病毒 (nervous necrosis virus, NNV)、掉鱗症病毒 (scale drop disease virus, SDDV) 及奴卡氏菌 (*Nocardia sereolae*)。

結果

肉眼病變

A 池·少數魚隻有腹部潮紅或尾鰭受損的情形·內臟均無明顯異常。

B 池·5 尾魚體表不同部位有局部掉鱗及潮紅情形(圖 1)·有一尾魚體表可見大範圍潰瘍灶(圖 2)·潰瘍病灶深入肌肉層。

寄生蟲學檢查

低倍視野下鰓絲無明顯異常·高倍視野下可觀察到少量原蟲。

細菌分離

Aeromonas hydrophila、*Aeromonas veronii*。

組織病理學檢查

1. **皮膚潰瘍處**：低倍下可見一大型結締組織包被之炎症壞死區·肌肉細胞斷裂並消失(圖 3)。高倍下可見病灶區有大量巨噬細胞及細胞壞死碎片(圖 4)·亦可見大量卵圓至長條狀厚壁中空黴菌菌絲(圖 5)。
2. **PAS 染色法**：低倍下可見肌肉組織及炎症細胞被染為綠色·炎症細胞及細胞壞死碎片中散布數個粉紅色長條至不規則形狀中空黴菌菌絲(圖 6)·高倍下可見卵圓形後壁中空的黴菌菌絲被炎症細胞包圍·及長條厚壁中空黴菌菌絲(圖 7)。
3. **GMS 染色法**：低倍下可見有一黑色長條後壁中空的黴菌菌絲貫穿綠色肌肉層(圖 8)。高倍下可見卵圓形後壁中空的黴菌菌絲被炎症細胞包圍(圖 9)。

分子生物學鑑定

1. A 池外觀異常魚隻及 B 池魚隻均可增幅出 ITS1 基因專一性片段(圖 10)·將產物進行定序並與 NCBI 基因資料庫進行 BLAST 比對·本病例之基

因片段與基因庫之 *A. invadans* 基因序列相似度高達 100%。

2. **其他病原核酸檢測**：Megalocytivirus、RSIVD、GIV、Ranavirus、NNV、SDDV 及 *Nocardia sereolae* 結果均為陰性。

綜合以上檢查結果為加州鱸流行性潰瘍症候群。

討論

本病例依據病理學檢查及分子生物學檢驗兩方面的結果配合·為我國首次通報世界動物衛生組織的流行性潰瘍症候群病例。但根據畜主所述·該場於前一年度養殖池(B 池) 就有疑似症狀之病魚·故難以在本次送檢病例中追蹤病原來源。另一方面·本所於本病例之前亦曾於其他送檢病魚檢測到 *A. invadans* 核酸·只是未能取得完整病材做病理學檢查·故推測在本病例之前·*A. invadans* 早已存在於我國環境。

魚類真菌性疾病最常見為水黴菌病症 (oomycetosis)·其主要病原為水黴目 (Saprolegniales) 水黴科 (Saprolegniaceae) 下水黴屬 (*Saprolegnia*) 及綿黴屬 (*Achlya*) 兩屬·主要感染魚隻淺層皮膚及鰓。臨床上常見為棉絮樣物附著於病魚皮膚及鰓。而流行性潰瘍症候群的臨床症狀主要是魚體側腹或背部可見紅棕色的壞死樣病灶·因其病原 *A. invadans* 的菌絲會深度侵入到肌肉層·導致大範圍的組織破壞而形成潰瘍。臨床上兩者不同的病癥可做為區別診斷·但流行性潰瘍症候群病例亦可能混合感染水黴屬及綿黴屬真菌·要鑑別這三屬真菌可經由黴菌分離培養·觀察其無性生殖的孢子囊形態以做區別。絲囊黴屬 (*Aphanomyces*) 真菌可見平直中度分支的無分隔營養菌絲·其孢子囊寬度窄小近似菌絲·內含單列的初級游動孢子·初級游動孢子會在孢子囊開口處被囊化聚集成團·再釋出次級游動孢子。水黴屬真菌可見較細長的無分隔分支菌絲·其孢子囊中孢子不規則排列著·游動孢子會分別地離開孢子囊。綿黴屬真菌可見較粗胖的無分隔分支菌絲·其孢子囊中孢子不規則排列著·孢子囊會經由分出側枝而重生·此一時期的孢子會集中孢子囊開口處被囊化聚集成團·再釋出游動孢子 [1]。

臨床上·流行性潰瘍症候群目前尚無有效的治療

方式，且一旦在自然環境中（如：河水）爆發則無法控制，但若是人工養殖的小型封閉性水體，可透過清除病魚、以石灰消毒及改善水質等方法，有效降低死亡率 [11]。本病例在輔導畜主淘汰病魚，消毒及改善養殖環境後，A 池魚隻的病情也順利控制住未再擴大。另外，也有文獻指出將養殖池水的鹽度提升超過 2‰，可以有效抑制流行性潰瘍症候群疫情爆發 [8]。而常見的化學消毒劑都可用來消毒被 *A. invadans* 污染的環境及器械 [9]。病例場在出清後，應徹底清池、曝曬、消毒後，再引入新一批魚隻來飼養。若養殖場反覆爆發本病，建議可改養對 *A. invadans* 較無感受性的魚種，如吳郭魚、虱目魚、鯉魚等 [7]。

在本病例後，隔（111）年 7 月本所另收到一件宜蘭縣香魚養殖場的流行性潰瘍症候群病例，送檢三隻分別於鰓蓋、尾鰭及背部可見潰瘍病灶（圖 11），剖檢內臟均無異常，組織病理學檢查亦可見黴菌菌絲（圖 12、13），PCR 檢驗病魚體表潰瘍處組織及內臟，可在潰瘍處組織檢出 *A. invadans*（圖 14）。輔導該場淘汰病魚及清潔消毒養殖場環境後，後續送驗其餘外觀健康魚隻則未再檢出 *A. invadans*。並於宜蘭縣動植物防疫所積極協助下，檢驗周邊香魚養殖場之健康魚隻，均未檢出 *A. invadans*。顯示流行性潰瘍症候群在我國維持零星散發狀態，且病例均在北部縣市水溫較低的養殖環境發生，未擴及至我國主要養殖漁業縣市，推測可能原因為我國主要養殖漁業縣市（屏東、臺南等）全年水溫多高於 22°C，不利 *A. invadans* 生長，且我國主要淡水魚養殖物種吳郭魚、虱目魚均對 *A. invadans* 有抵抗力，故不易發生相關病害。

流行性潰瘍症候群目前於我國為散發性的疾病，但已在兩種魚種（加州鱸、香魚）及兩縣市（新北、宜蘭）發現本病，故相關從業人員應對本病有認識並提高警覺，如現場發現有疑似病例應妥善處理病魚，並加強環境的消毒與清潔，避免造成 *A. invadans* 擴散造成更大範圍的流行。

病例報告：加州鱸流行性潰瘍症候群



圖 1、B 池加州鱸外觀，5 尾魚體表不同部位有不同程度病變包括體表局部掉鱗及潮紅和大範圍潰瘍灶。



圖 2、B 池加州鱸外觀，其中一尾體表可見大範圍潰瘍灶，潰瘍病灶深入肌肉層。

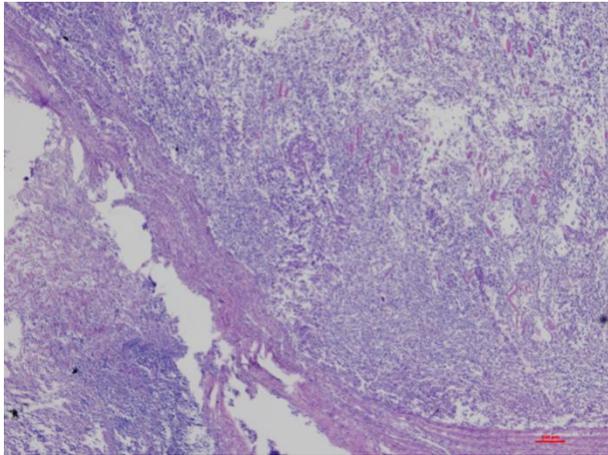


圖 3、加州鱸皮膚潰瘍處有一大型結締組織包被之炎症壞死區。(H&E 染色，bar=100 μm)

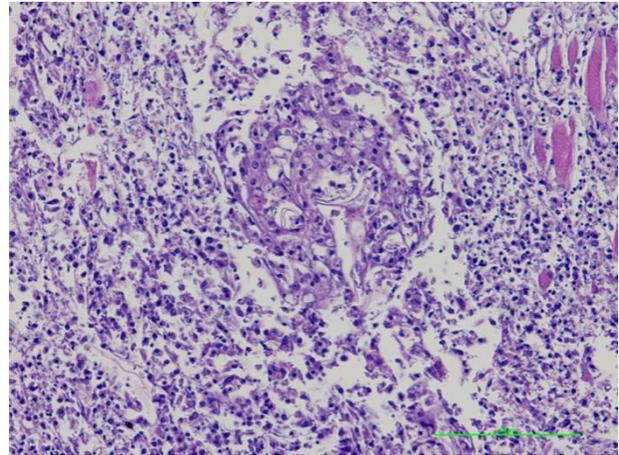


圖 4、加州鱸皮膚壞死區有明顯肌肉組織斷裂並消失，可見大量巨噬細胞浸潤及細胞壞死碎片。(H&E 染色，bar=100 μm)

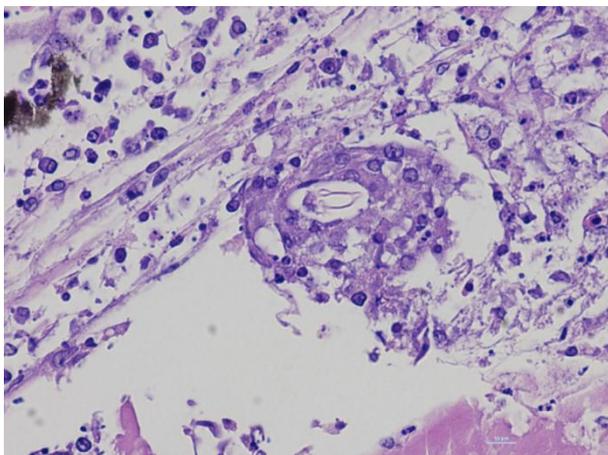


圖 5、加州鱸皮膚壞死區有可見卵圓至長條狀厚壁中空黴菌菌絲，菌絲被巨噬細胞包圍。(H&E 染色，bar=10 μm)

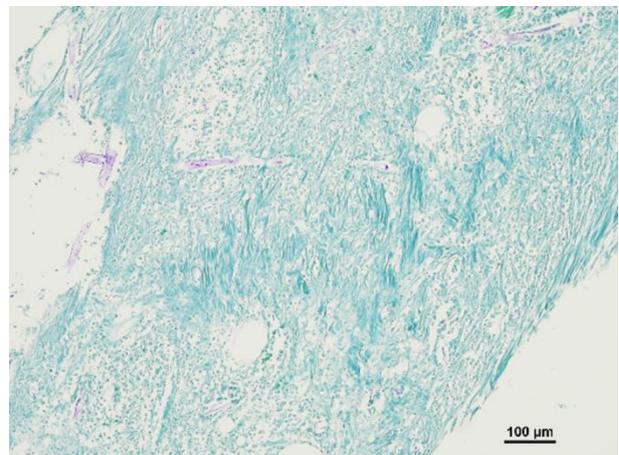


圖 6、加州鱸皮膚壞死區可見炎症細胞及細胞壞死碎片中散布數個粉紅色長條至不規則形狀中空黴菌菌絲。(PAS 染色，bar=100 μm)

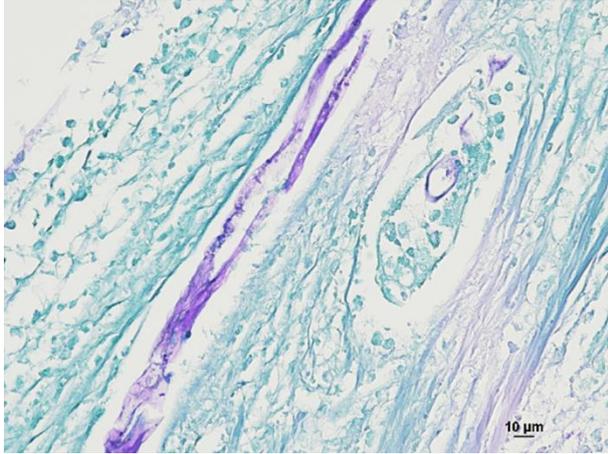


圖 7、加州鱸皮膚壞死區高倍下可見明顯黴菌菌絲。(PAS 染色, bar=10 μm)

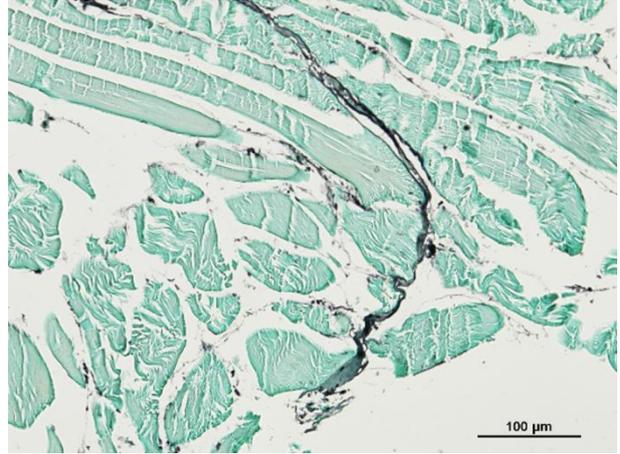


圖 8、加州鱸皮膚壞死區高倍下可見明顯黴菌菌絲。(GMS 染色, bar=100 μm)

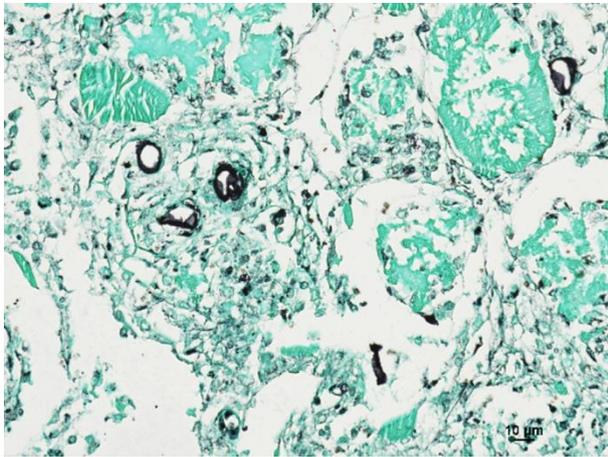
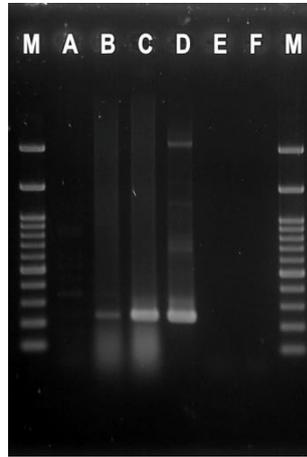


圖 9、加州鱸皮膚壞死區高倍下可見明顯黴菌菌絲。(GMS 染色, bar=10 μm)



M : marker
 A : A池外觀正常魚隻
 B : A池外觀異常魚隻
 C : B池外觀異常魚隻
 D : positive control (234bp)
 E : negative control
 F : DDW

圖 10、加州鱸之 *Aphanomyces invadans* PCR 檢驗結果顯示 A 池外觀正常魚隻未增幅出片段 (lane A)。A 池外觀異常魚隻增幅出輕微片段 (lane B)。B 池外觀異常魚隻增幅出明顯微片段 (lane C)。陰性對照及水未增幅出片段 (lane D and E)。



圖 11、香魚：體表不同部位有不同程度病變包括體表局部掉鱗及潮紅和大範圍潰瘍灶。

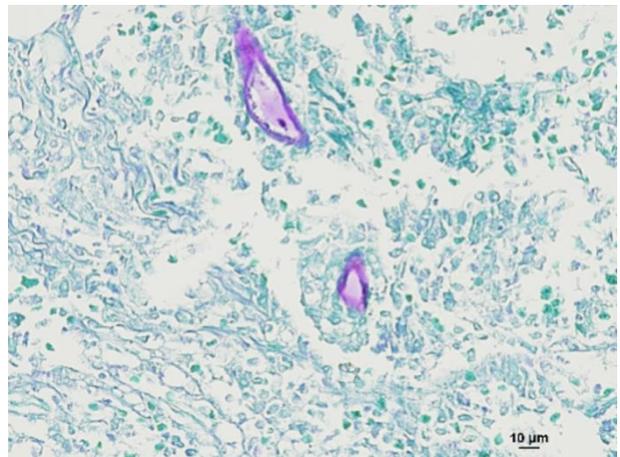


圖 12、香魚：皮膚潰瘍灶可見粉紅色不規則形狀中空黴菌菌絲。(PAS 染色, bar=10 μm)

病例報告：加州鱸流行性潰瘍症候群

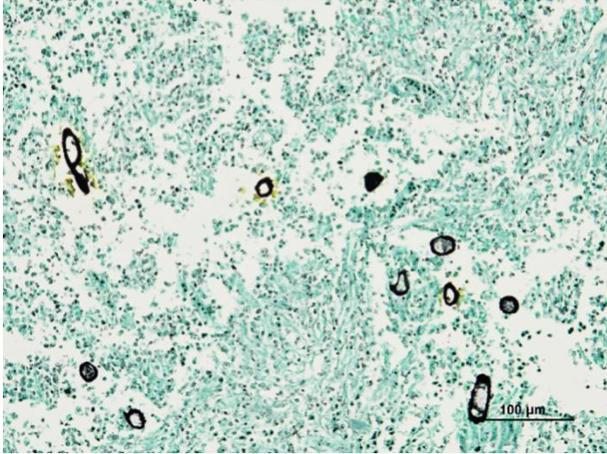
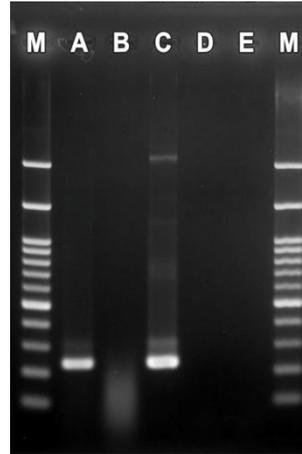


圖 13、香魚：皮膚潰瘍灶 PAS 染色可見散布數個不規則形狀中空黴菌菌絲。(GMS 染色，bar=100 μm)



M : marker
A : 潰瘍灶周邊組織
B : 內臟
C : positive control
(234bp)
D : negative control
E : DDW

圖 14、香魚：*Aphanomyces invadans* PCR 檢驗結果皮膚潰瘍灶周邊組織增幅出明顯微片段(lane A)。內臟未增幅出片段(lane B)。陰性對照及水未增幅出片段(lane D and E)。

參考文獻

1. Afzali SF, Hassan MD, Abdul-Rahim AM, Sharifpour I, Sabri J. Isolation and identification of *Aphanomyces* species from natural water bodies and fish farms in Selangor, Malaysia. *Malays Appl Biol* 42: 21-31, 2013.
2. Baldock FC, Blazer V, Callinan R, Hatai K, Karunasagar I, Mohan CV, Bondad-Reantaso MG. Outcomes of a short expert consultation on Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS): re-examination of casual factors, case definition and nomenclature. In: Walker P, Bondad-Reantaso MG ed. *Diseases in Asian Aquaculture V, Fish Health Section*. Manila: Asian Fisheries Society, 555–585, 2005.
3. Bondad-reantaso MG, Lumanlan SC, Natividad JM, Phillips MJ. Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. In: Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR ed. *Diseases in Asian Aquaculture I, Fish Health Section*. Manila: Asian Fisheries Society, 475–490, 1992.
4. Catap ES, Munday BL. Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol* 33: 327–335, 1998.
5. Chinabut S, Roberts RJ, Willoughby GR, Perason MD. Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J Fish Dis* 18: 41–47, 1995.
6. Egusa S, Masuda N. A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol* 6: 41–46, 1971.
7. FAO. What you need to know about epizootic ulcerative syndrome (EUS) – An extension brochure for Africa. Rome, 2020.
8. Hawke JP, Grooters AM, Camus AC. Ulcerative mycosis caused by *Aphanomyces invadans* in channel catfish, black bullhead, and bluegill from southeastern Louisiana. *J Aquat Anim Health* 15: 120–127, 2003.
9. Iberahim NA, Trusch F, Van West P. *Aphanomyces invadans*, the causal agent of epizootic ulcerative syndrome, is a global threat to wild and farmed fish. *Fungal Biol Rev* 32: 118–130, 2018.
10. Kamilya D, Baruah A. Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish: history and current status of understanding. *Rev Fish Biol Fisheries* 24: 369–380, 2014.
11. Lilley JH, Callinan RB, Chinabut S, Kanchanakhan S, MacRae IH, Phillips MJ. *Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook*. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, 1998.
12. McKenzie RA, Hall WTK. Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust Vet J* 52: 230–231, 1976.
13. Oidtman B. Review of biological factors relevant to import risk assessments for epizootic ulcerative syndrome (*Aphanomyces invadans*). *Transbound Emerg Dis* 59: 26–39, 2012.
14. WOAHA, Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 2023. Retrieved from https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.01_EUS.pdf.

Case report: Epizootic ulcerative syndrome in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

IW Chen*, CH Wu, YJ Lin

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract Epizootic ulcerative syndrome (EUS) is caused by the oomycete fungus *Aphanomyces invadans*. It is a seasonal disease that is characterized by the presence of necrotizing ulcerative lesions in multiple freshwater and estuarine fish. This report describes an epizootic ulcerative syndrome in a largemouth bass farm, presented with gross, histopathology, special stains, and molecular analysis. Grossly, large reddish-brown ulcers can be seen on the body surface. Microscopically, locally extensive necrotizing granulomatous dermatitis with severe myonecrosis is observed. Pleomorphic aseptate fungi can also be observed. The diagnosis was confirmed by histopathology and molecular diagnosis. This is the first report of the epizootic ulcerative syndrome of largemouth bass in Taiwan.

Keywords: *Largemouth bass, Epizootic ulcerative syndrome, Aphanomyces invadans*

