

# 水產病原性弧菌數檢測套組之研發

張錦宜、吳嘉哲、林金榮

水產試驗所水產養殖組

## 前言

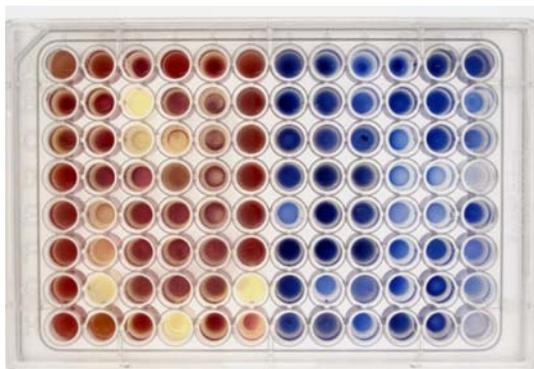
弧菌病 (vibriosis) 長期以來都是水產養殖產業的重大威脅之一，即使是養殖先進國家如日本，每年肇因於弧菌感染症的水產損失仍可達上千萬美元。早期認定的水產病原性弧菌有限，多半是以與人類醫學或公共衛生息息相關的弧菌為主要探討對象，如霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 及創傷弧菌 (*V. vulnificus*) 等；然而近來愈來愈多的文獻顯示，許多種類的海洋弧菌，如果在養殖環境中不正常地大量繁生，亦會造成水產生物的大量死亡，如 2002 年造成台灣養殖九孔苗大量死亡的溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、2007 年導致美國養殖牡蠣產業重大損失的塔氏弧菌 (*V. tubiashii*) 及 2008 年引爆法國牡蠣疫情的亮弧菌 (*V. splendidus*) 等。除此之外，具機會性感染的弧菌還包括：*V. aestuarianus*、*V. anguillarum*、*V. carchariae*、*V. campbellii*、*V. fluvialis*、*V. furnissii*、*V. harveyi*、*V. mimicus*、*V. natriegens*、*V. nereis*、*V. ordalii*、*V. pelagia*、*V. proteolyticus*、*V. salmonicida* 及 *Photobacterium damsela*。因此，在養殖健康管理上，需摒棄傳統只針對單一病原菌檢測的觀念，而應更廣泛地監測多種水產病原性弧菌的數量變化，以期在弧菌大爆發的初期，及早警覺，及早應變。

本所近年來致力發展快速、靈敏、省力的水產病原檢驗方法，開發出一系列能由養殖業者自行檢驗病原，不需假手技術人員，不需使用額外儀器，具簡易、快速、便宜等優點的「一點靈」簡單試劑，並逐年推出「鰻魚潰瘍症病原菌快速檢測套組」、「溶藻弧菌檢測套組」、「水質總生菌數檢測套組」及「親水性產氣單胞菌檢測套組」，其中部分研發成果已完成技術移轉。「一點靈」簡單試劑的主要產品(除了「水質總生菌數檢測套組」之外)，均是以單一菌種為檢測標的，本研究首次嘗試開發可同時標定多種水產病原性弧菌的檢測套組 (Multiple *Vibrio* detecting kit, 以下簡稱 MV-kit)，以降低養殖現場發生大規模疫病蔓延的風險，避免不當藥物的錯用、濫用，提高台灣水產養殖的國際競爭力。

## 細菌實體資料庫及工作母片的建立

本研究採用 54 株水產病原菌、10 株淡水環境常在菌、20 株海水環境常在菌及 8 株衛生指標菌，計有 22 屬、54 種、92 株不同細菌做為細菌實體資料庫，其中包括 17 種 (24 株) 曾有病例報導的水產病原性弧菌 (*V. aestuarianus*、*V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. campbellii*、*V. fluvialis*、*V. furnissii*、*V. harveyi*、*V. mimicus*、*V.*

*natriegens*、*V. nereis*、*V. parahaemolyticus*、*V. pelagia*、*V. proteolyticus*、*V. salmonicida*、*V. tubiashi*、*V. vulnificus* 及 *Photobacterium damsela*)，為本套組設定的目標菌株。上述 92 株菌被製作成可供多次複製分析的工作母片 (multiple inoculation master plate, 圖 1-a)，俾快速分析各菌株之特異性狀，篩選適合做為試劑開發之呈色反應。



a



b

圖 1 MV-kit 專一性試驗。(a)接種 92 株台灣水產常在菌標準菌株及養殖環境分離菌株的工作母片，顯示紅色者係淡水菌株，顯示藍色者係海水菌株。(b)上述 92 株測試菌株以 MV-kit 檢測的結果，有紅紫色呈色反應的均為病原性弧菌

## MV-kit 之研發

利用上述工作母片，逐一進行各菌株之

形態、色素、運動模式、氧氣需求、代謝途徑、適溫、適鹽、血清學等特性分析及 16S rRNA、16S-23S rRNA 序列之比對，並利用 BIOLOG™、API™、MICROBACT™ 等生化試驗套組，分析 27 項生理、生化性狀，95 項碳源利用及 19 項酵素活性，以篩選出目標菌株獨有、且具呈色反應之特異性性狀。經比較分析各初選性狀，汰除容易因不同檢體背景 (淡水、海水、高鹽、高糖、富含動物組織及 pH 變化等) 而導致呈色反應不穩定的項目，並確定最終反應肉眼可清晰辨明，藉由系列濃度測試 (serial concentration assay)，逐一找出最適反應條件，以增加檢測之靈敏度。最後開發出的檢測套組原型為體積約 125 $\mu$ L 之液狀試劑，檢測時僅需滴加 40 $\mu$ L 之檢體，於 28 $^{\circ}$ C 反應 6–48 小時即可以肉眼判讀，若試劑從無色變為紅紫色 (圖 2)，則表示檢出水產病原性弧菌。

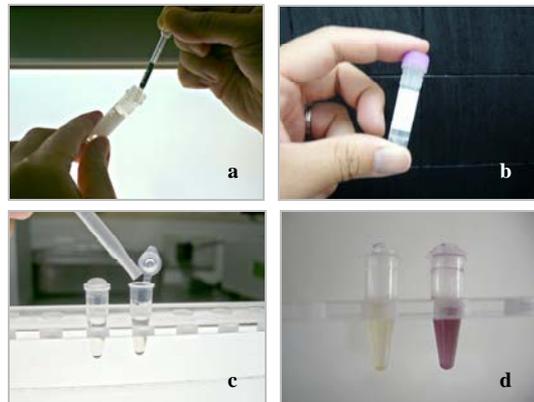


圖 2 使用「水產病原性弧菌檢測套組」的標準步驟。(a)以吸管取檢體 1 滴添加於接種液中；(b)將接種液劇烈搖晃充分混合；(c)再以吸管自混合後的接種液取 1 滴添加於 MV-kit 試劑中；(d)於 6-48 小時後觀察，若 MV-kit 變為紅紫色表示檢體有水產病原性弧菌

## 專一性測試

以 0.85% NaCl 溶液將上述植入工作母片的 92 株菌株製成濁度為 Mcfarland No.5 的細菌懸浮液，逐一添加 40  $\mu$ L 入 MV-kit 中，於 28 $^{\circ}$ C 培養持續觀察 48 小時，以驗證專一性反應結果。結果顯示，只有前述 17 種弧菌會出現紅紫色之呈色反應 (圖 1-b)，此呈色反應可輕易以肉眼判別。但 *V. vulnificus* 對本套組卻有種內菌株差異性，本研究測試的 92 株細菌中有 2 株 *V. vulnificus*，其中一株如預期出現紅紫色呈色反應，另一株則未變色。

### 定量檢測之分析

將 18 株不同種類的弧菌參考菌株以 0.85% NaCl 溶液依 10 倍稀釋分別製備成  $10^9$  –  $10^1$  CFU/mL 的細菌懸浮液，逐一添加 40  $\mu$ L 入 MV-kit 中，於 28 $^{\circ}$ C 持續觀察其呈色反應所需的時間，以進行定量檢測分析，每 6 小時判讀一次，三重複試驗。結果顯示，若 MV-kit 於 28 $^{\circ}$ C、在 24 小時之內變色，表示檢體中總弧菌的數量  $> 4.2 \times 10^6$  CFU/mL；若 MV-kit 於 28 $^{\circ}$ C、在 24–30 小時期間變色，表示檢體中總弧菌的數量介於  $4.2 \times 10^6$  –  $1.1 \times 10^5$  CFU/mL；若 MV-kit 於 28 $^{\circ}$ C、在 30–36 小時期間變色，表示檢體中總弧菌的數量介於  $1.1 \times 10^5$  –  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL；若 MV-kit 於 28 $^{\circ}$ C 超過 42 小時之後才變色，表示檢體中總弧菌的數量少於  $2.1 \times 10^1$  CFU/mL。

### 靈敏度測試

上述 18 株弧菌製備成的 10 倍連續稀釋

懸浮液，先以傳統平板計數法計算細菌數目，再依本套組標準使用程序 (圖 2) 進行檢測與判讀，以測試本套組所能偵測的最小濃度。與標準微生物學方法比較，本套組對不同弧菌的檢測靈敏度可達 1–100 CFU/mL (圖 3)。其中在  $10^0$  CFU/mL 細菌濃度等級即可被檢出者有 *V. mimicus* 及 *V. proteolyticus*；在  $10^1$  CFU/mL 細菌濃度等級可被檢出者有 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. campbellii*、*V. fluvialis*、*V. harveyi*、*V. natriegens*、*V. parahaemolyticus*、*V. pelagia*、*V. salmonicida*、*V. tubiashi* 及 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*；在  $10^2$  CFU/mL 細菌濃度等級可被檢出者有 *V. aestuarianus*、*V. furnissii*、*V. nereis* 及 *V. vulnificus*。

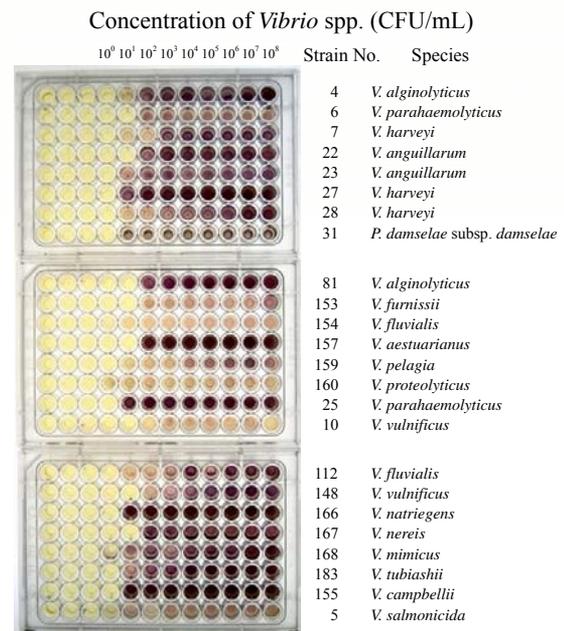


圖 3 MV-kit 靈敏度試驗。以 10 倍連續稀釋的弧菌懸浮液進行 MV-kit 檢測，結果顯示樣本中不同弧菌濃度達約 1–100 CFU/mL 即可產生呈色反應

## 藥物敏感性測試

將目標菌株以 0.85% NaCl 溶液製備的 Mcfarland No.5 細菌懸浮液，逐一添加 40  $\mu$ L 入內含氟甲磺氯黴素 (florfenicol)、氟滅菌 (flumequine)、歐索林酸 (oxolinic acid)、經四環黴素 (oxytetracycline)、磺胺一甲氧嘧啶 (sulfamonomethoxine) 的 MV-kit 藥物敏感性檢測套組 (MV plus susceptibility assay kit) 中，於 28 $^{\circ}$ C 持續培養觀察 48 小時。此外，另以 NCCL standard method 之藥物敏感性試驗 (susceptibility test) 同步進行檢測。結果顯示，以 MV-kit 藥物敏感性檢測套組所得的試驗結果均與 NCCL 標準方法結果相符 (圖 4)。

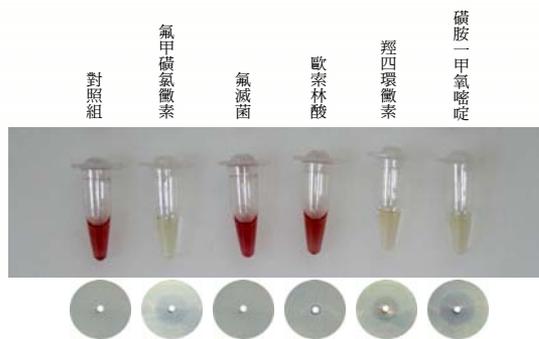


圖 4 MV-kit 藥物敏感性試驗(上圖)與 NCCL 標準方法(下圖)所得結果之比較

## 結論

本套組可準確地檢測出 17 種水產病原性弧菌，推估出檢體中弧菌的平均數量，並可快速篩選出有效藥物，提供菌株抗藥性的警訊；又因為不需使用到繁雜的技巧或特殊的儀器設備，故適合實際應用於養殖現場之健康管理。若能對每一養殖池均建立長期連

續的監測記錄，如此，當水中病原性弧菌數量異常增加時，即可在第一時間做最適當的處理。善用此一簡易、快速的病原菌檢測工具，當可真正落實「預防勝於治療」的健康管理原則。

與現有的文獻報導病例比較，本研究開發出的 MV-kit 仍有如 *V. carchariae*、*V. ordalii* 及 *V. splendidus* 等水產病原性弧菌不能檢出，此亦為後續研究尚待努力的部分。

MV plus susceptibility assay kit 之開發，主要目的在縮短傳統藥物敏感性試驗所需的時間，每一種藥物之用法、用量及停藥期均可參考農委會「水產動物用藥品使用規範」，惟其中涉及處方用藥的部分，仍應依法諮詢合格獸醫師開立處方箋，據以購買合法之水產動物用藥。

養殖健康管理措施中，藥物治療為不得不採取的最後手段。當 MV-kit 超過 36 小時才變色，顯示水中病原菌數量仍屬安全或低危險指數 ( $< 10^3$  CFU/mL) 時，建議優先使用換水、改善底質環境、調整投飼量及檢討生鮮餌料衛生等對策，疫情緊急時才考慮使用藥物。

不同時、地分離到的弧菌抗藥性往往不同，如果只從書本查詢適用藥物，很可能會選到無效藥物。適當地使用 MV plus susceptibility assay kit 不僅可以確認有效藥物，還可以大幅減少抗藥性病原菌發生的機率。因為 MV plus susceptibility assay kit 每次可選出超過一種以上的有效藥物，儘管每種藥物的價格有高低差異，建議養殖業者不要貪圖小便宜，應確實作好藥紀錄，同一養殖池不要在短時間內重複使用相同藥物。