

養殖大嘴鱸魚之 *Nocardia* sp. 感染症之研究

Studies on the Infection of *Nocardia* sp. in Cultured Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*, Lacepede)

黎錦超·陳秀男·郭光雄

Lai Kam-Chiu, Shiu-Nan Chen and Guang-Hsiung Kou

Abstract

This study describes an investigation on an epizootics of Nocardiosis of Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) occurred in southern Taiwan during 1987. Pathogenicity for the pathogen against largemouth bass was also investigated using challenge test.

The results showed that nocardiosis present in the study was a chronic systematic infection in largemouth bass. Several disease fish showed sluggish swimming, darkening body surface and unilateral or bilateral ucler. Yellowish nodules scattering throughout gill, operculum, pronephron, liver, spleen, swim bladder and kidney were observed. The pathogen isolated from the diseased fish was demonstrated to be Gram positive and acid-fast. The presence of aerial hyphae incorporated with the results obtained from biochemical studies may suggest that this bacteria is *Nocardia* sp. Granuloma and macrophage infiltration in the tissues were also observed in the interal organs of infected fish with histopathological lesions. The most important target organs for *Nocardia* sp. infection in largemouth bass were mainly localized in tissues of pronephron, swim bladder, spleen and kidney.

前 言

臺灣水產養殖業發展蓬勃，一般具經濟價值的魚、蝦及貝類，在臺灣均有養殖，大嘴鱸魚(Largemouth bass; *Micropterus salmoides*, Lacepoda) 便為其中之一種，多年前被養殖業者引進臺灣進行養殖，由於其性不耐寒，故一直在臺灣之養殖範圍僅限於中部之員林到南部之屏東一帶，而以屏東地區最為密集。過去，大嘴鱸魚的養殖，一直未曾發生過嚴重的病例，但近二、三年來，於南部地區却不斷地有病例出現，亦有日益嚴重的趨勢，而且，所發現的病例其相似性十分高。

有關大嘴鱸魚的文獻，大部份為養殖方面的研究報告，而對於魚病方面的研究則十分有限。過去的研究結果顯示，大嘴鱸魚的細菌性疾病，多半與 *Aeromonas hydrophila* 有關。Hazen 等 (1978) 指出，大嘴鱸魚在被周纖毛蟲 (*Epistylis* sp.) 感染之後，若再受到 *A. hydrophila* 的二次感染 (Secondary infection)，魚體會產生出血性壞死，而後死亡。Noga (1986) 在美國 Chohan 河中曾採得外觀受到感染的大嘴鱸魚，自其皮膚之初期病灶中可發現有大量的橈腳類寄生蟲 *Lernaea*

cruciata 及 *A. hydrophila*。Esch and Hazen (1980) 發現用核能反應器所排出之熱水作為一種緊迫 (stress)，可使 *A. hydrophila* 較易感染大嘴鱸魚。Hazen 等 (1981) 指出受 *A. hydrophila* 感染之大嘴鱸魚，其體內之凝集抗體 (agglutinating antibody) 會激增。此外，Broomker, (1979) 曾利用一種來自魚體內器官的 Lencefield group D Streptococcus 對虹鱒，大嘴鱸魚及鯉魚等魚類進行感染，結果發現該菌會造成虹鱒的大量死亡，而不會感染大嘴鱸魚及其他魚類。有關本省養殖之大嘴鱸魚的魚病方面，只有一篇報告指出其受到一種寄生性黴菌 (*Ichthyoponus hoferi*) 的感染，被感染的魚體各內臟器官會有白色的癭結 (nodule) 的出現 (Tung, et al., 1986)。

有關魚類被 *Nocardia* sp. 感染的報告，早在 1962 年就由 Snieszko 等 (1964) 在美國之虹鱒孵化場中發現。後來不斷地在淡水魚 (Conroy, 1964; Campbell and MacKelvie, 1986) 及海水魚 (Kariya, et al., 1968; Kubota, et al., 1968; Sano and Fukuda, 1987; Kudo, et al., 1988) 中分離到 *Nocardia* sp.。在本省亦在鱧魚 Fomosa snakehead fish (*Channa maculata*, Lacepede) 中分離出 *Nocardia* sp.。到目前為止，已經被發表能使魚類產生 Nocardiosis 的菌種有 *Nocardia asteroides*, *N. kampfachi* (Austin and Austin, 1987; Roberts, 1978; Snieszko and Axelrod, 1976) 及 *Nocardia seriolae* sp. nov. (Kudo, et al., 1988)。此外，魚類對 *Nocardia* sp. 的免疫研究方面，有 Kusuda (1977) 利用 *Nocardia kampfachi* 之疫苗對青鯢鱒 (Yellowtail) 進行免疫攻擊之研究，Kusuda and Kawahara, (1987) 用直接及間接螢光抗體 (Direct and indirect fluorescent antibody) 法，來測試被感染的青鯢鱒體內之病原菌等報告。而在病理組織學上，則有 Kubota 等 (1968)，Kubota 等 (1982)，及 Kumamoto 等 (1985) 等人，對感染 *Nocardia* sp. 之青鯢鱒的組織病變進行研究。

對於大嘴鱸魚的 Nocardiosis 之病例，並未有報告發表。因此，本文對於大嘴鱸魚的 Nocardiosis 之病原性及病理組織變化進行探討，以究明本病之病因及瞭解病魚各組織的病理變化，做為本病防治上之參考。

材料與方法

(一) 病魚診斷

病材取自 1987 年養殖於屏東之大嘴鱸魚養殖場，採得病材後，先觀察外觀病癥，再解剖進行體內診斷，觀察各臟器之病癥。體表病灶則先用 70% 酒精拭擦後，再進行採菌。自各病灶中採得細菌後，進行革蘭氏 (Gram's) 及耐酸性 (Acid fast) 染色抹片觀察。同時把菌種入 BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO) 平板培養基及 Lowenstein medium, (DIFCO) 斜面培養基中，在 28°C 中培養。

自 BHI 平板培養基及 Lowenstein medium 斜面培養基上的菌落 (colony) 中，勾出不同形態的菌種，轉種入 BHI 平板培養基，Lowenstein medium 斜面培養基及 BHI 液體培養基中，同時培養在 28°C 中，並觀察其菌落之成長及細菌生長之情況。

細菌的生化特性測定，方法主要根據 Bergey's Manual Systematic Bacteriology Vol. 2 (Sneath, et al., 1986), Koneman, et al., 1983; Tsukamura, 1981a; 1981b; 等文獻所載並作部份修正。其中各生化試驗除了在醣類產生酸 (Acid produce from carbohydrate) 試驗中，用了三種不同基本培養基 (Basal medium) 之外，均與一般細菌生化試驗相同。另進行 Mitomycin C 及 5-Fluorouracil 之感受性 (Susceptibility of Mitomycin C and 5-Fluorouracil) (Tsukamura, 1981a; 1981b) 實驗。

(二) 病原性實驗

自 BHI 平板培養基中，取出培養菌之一個菌落，轉種入 10 ml 之 BHI 液體培養基中，在 28°C

中培養七天，再把已長滿細菌之 10 ml 菌液，注入 2,000 ml 之 BHI 液體培養基中，於 28°C 之搖動恒溫培養箱 (Shaking incubator) 中培養。七天後將上述之菌液取出，注入四倍容量為 500 ml 的無菌離心瓶，經過平衡後用低溫離心機 (HIMAE centrifuge, HITACHI) 在 4°C 及轉速為 8,000 rpm 下，離心 30 分鐘，再用滅菌的生理食鹽水 (0.85% NaCl) 清洗沉澱三次，再用經海波 (Hypo) 處理過之自來水配製成濃度為 0.1 g/l 之菌液 20 公升，以供病原性實驗之用。病原性實驗採浸泡性之感染，分為實驗組及對照組，兩組之供試魚各為 25 尾體長為 15~20 cm 之間的健康大嘴鱸魚，分別收養於兩個同體積之 FRP 桶 (體積為 120 cm×100 cm×100 cm) 中，水深 60 cm，實驗前一星期就收養於 FRP 桶中，打氣並投餌。進行浸泡時，將魚自 FRP 桶中用手摸網撈出，入配製好的菌液中進行三分鐘浸泡，並打氣，完畢後，將魚用手摸網撈出放回原來的桶中，觀察五分鐘，看魚體有否不適。當天不投餌，翌日開始觀察，觀察期間，每天作一次不計量之投餌，並記錄各實驗組之情況。浸泡後，每隔十天取實驗組中外觀有病癥之魚的半數進行解剖，觀察各內臟器官的病況，並自較嚴重之病灶中採菌，作細菌之分離與鑑定。

(三) 病理組織切片之研究

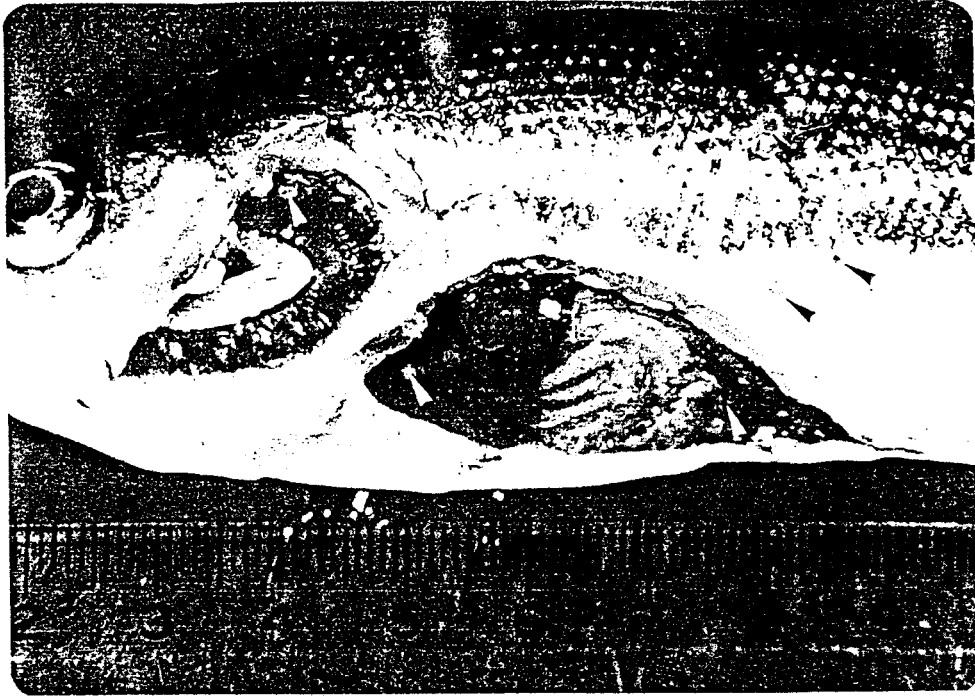
自養殖場及病原性實驗所得之病材，以逢機採樣方法，將體外病灶及體內各器官如：腦 (Brain)、前脾 (Pronephron)、肝臟 (Liver)、腸道 (Intestine)、胃 (Stomach)、脾臟 (Spleen)、鰓 (Swim bladder)、腎臟 (Kidney)、心臟 (Heart) 及腸繫膜 (Mesentery) 等組織，固定於 Davidson's 固定液中，固定過夜後，經脫水，浸蠟及包埋等過程，製成石蠟標本，用切片機切成 5 μm 厚之石蠟切片。再以蘇木紫及伊紅 (Hematoxylin and Eosin) 革蘭氏 (Taylor's Brown-Brenn modified Gram) (Sheehan and Hrapchak, 1980) 及 Price's Giemsa (Luna 1968) 染色法染色。並用光學顯微鏡判讀組織中之病理變化。

結 果

(一) 病魚診斷

取自養殖場及病原性實驗的病材，其外觀及內臟病癥均一致，魚體兩側有明顯的潰爛 (ulcer)，鰓、鰓蓋內側、肝臟、脾臟、前腎、腎臟、鰓及鰓內均有明顯的黃色瘤結 (nodule) 存在 (圖一)。被感染的腎臟有潰爛現象。一般而言，在體內各器官發現有病癥時，體外與鰓部較少發現明顯的病灶。主要發現病癥的器官為肝臟、腎臟、脾臟，前腎及鰓等器官，通常以腎臟，前腎及鰓被感染較嚴重，若以器官中癥結的多寡，區分病癥之嚴重，則以腎臟、前腎及鰓最嚴重，肝臟及脾臟次之，鰓、鰓蓋、體表及腸繫膜再次之，而心臟、腦及胃等器官則未發現有癥結。自病材中取得的細菌，直接作成抹片，進行革蘭氏及耐酸性染色，發現該菌為革蘭氏陽性，弱耐酸性，有分枝狀之桿菌自病材中取出之細菌，種入 BHI 平板培養基及 Lowenstein medium 斜面培養基中培養，七天後，產生黃色菌落。此菌生長非常緩慢，且所用之培養基為高營養培養基，若被其他細菌污染後，則無法分離出本菌。尤其在體表病灶中採菌，必需徹底清除其他雜菌，以增高採出本菌之成功率。

將本菌種入 BHI 平板培養基及 Lowenstein medium 斜面培養基中，七天後均呈黃色菌落，但因所用的培養基不同，故菌落的形態有差異。在解剖顯微鏡下觀察，可發現 BHI 平板培養基中之菌落表面呈凹凸不平狀，Lowenstein medium 斜面培養基中之菌落無此現象。而在 BHI 液體培養基中培養之細菌，在附有恒溫系統之倒立顯微鏡下觀察本菌在 24 小時中之生長情況，發現本菌呈分枝狀生長。將上述培養於液體培養基之細菌，在 28°C 中培養七天後，部份菌體浮於培養基之表面呈膜狀，但輕輕加以振盪即沉澱，部份菌體則沉於培養基底部。依上述之觀察，可知本菌為生長緩慢之分枝菌。將本菌作耐酸性染色，結果顯示，採自魚體病灶中癥結的細菌呈弱耐酸性，但採自培養基之細菌則不呈耐酸性。本菌的生化測定根據 Bergey's manual 等所示，其結果如表一所示。沒有孢子形成，有菌絲



圖一 在病魚的體側有明顯的潰爛(黑色箭頭)，鰓、肝臟及脾臟均有明顯的黃色瘤結(白色箭頭)。

表一 細菌之生化測定

Character	Response	Character	Response
Gram stain	+	Sodium Lactate (0.1)	-
Acid-fastness (weakly)	+	Sodium Succinate (0.1)	+
Strictly aerobic	+	<i>Decomposition of</i>	
Aerial hyphae	+	Urea	-
Catalase	+	<i>Hydrolysis of</i>	
Endospore	-	Esculin	+
Cytochrome-oxidase	-	Tween	-
Molite	+	Starch	-
Nitrate	+	Gelatin	-
<i>Acid produced from</i>		<i>Susceptibility to</i>	
Glucose	-	Mitomycin C ($\mu\text{g/ml}$)	
<i>Growth on carbon source (% w/v)</i>		10	-
L-Arabinose (1.0)	-	5	-
Galactose (1.0)	+	2.5	-
Inositol (1.0)	+	1.25	-
Mannitol (1.0)	+	5-Fluorouracil ($\mu\text{g/ml}$)	
Mannose (1.0)	+	40	-
Sodium Acetate (0.1)	+	20	-
Sodium Benzoate (0.1)	+	10	-
Sodium Formate (0.1)	+	5	-

，Catalase 呈陽性反應，Cytochrome Oxidase 呈陰性反應。而且對 Mitomycin C 及 5-Fluorouracil 無感受性，由上述的結果將本菌歸為 *Nocardia* sp.。

(二) 病原性實驗

本實驗分兩組進行，一為實驗組，一為對照組，實驗進行四十天，每天觀察，並作一次不計量之投餌。其結果如表二及表三所示。由表二中可以看到，細菌攻擊後第十天，已有體色變黑及體側有潰爛的病魚出現，爾後病魚的數目日益增加，實驗結束時，只有八尾魚體表沒有病癥。在此實驗中，體色變黑及體側潰爛的魚，均行動遲緩並不攝餌，唯實驗後期 (30~40 天) 時，發現有一尾體色變黑及體側有

表二 病原性實驗中各魚的外觀病癥

細菌 攻擊後 天數	實驗魚隻 總數	現存病魚 隻數	解剖魚隻 數目	累計病魚 總數	外 觀 病 癥			
					體色變黑	體表潰爛	停止攝餌	行動遲緩
10	[25]	[3]	[1]	[3]	[1]# [2]+	[1]+	無	無
20	[23]	[4]	[2]	[5]	[2]# [2]+	[2]# [2]+	[2]#	[2]#
30	[21]	[10]	[5]	[13]	[4]# [2]+	[4]# [4]+	[4]#	[4]#
40	[16]	[8]	[8]	[16]	[3]+	[3]# [3]# [2]+	[2]#	[2]#

+：病癥輕微；#：病癥明顯；#：病癥嚴重 [尾數]

表三 病原性實驗中各實驗魚的內臟肉眼觀察病癥

細菌 攻擊後 天數	解剖 魚隻 數目	目 視 病 癥*										
		腦 部	鰓 部	鰓 蓋	前 腎	心 臟	肝 臟	消 化 道	脾 臟	魚 鰾	腎 臟	
		癭 結	癭 結	癭 結	癭 結	癭 結	癭 結	癭 結	癭 結	癭 結	潰 爛	
10	[1]	[0]	[0]	[0]	[1]+	[0]	[1]+	[0]	[1]+	[1]+	[1]+	[0]
20	[2]	[0]	[1]+	[1]+	[2]#	[0]	[2]+	[0]	[2]#	[2]#	[2]#	[2]+
30	[5]	[0]	[1]+	[1]+	[5]#	[0]	[2]# [3]+	[0]	[5]#	[5]#	[5]#	[2]# [3]+
40	[8]	[0]	[1]# [2]+	[3]# [1]+	[8]#	[0]	[3]# [3]+	[0]	[7]# [1]#	[8]#	[8]#	[8]#

註：*：各內臟中僅腎臟出現潰爛現象 [尾數]

+：病癥輕微

#：病癥明顯

#：病癥嚴重

潰爛之魚行動正常並攝餌。由表三可以明白除腦、心臟及消化道外，前腎、肝臟、脾臟、鰾及腎臟均有瘤結出現，而以前腎、鰾及腎臟最為嚴重。另外各器官中，只有腎臟出現潰爛的病變。由罹病之實驗魚，均能再次分離出攻擊菌。又本實驗進行四十天，並未有實驗魚死亡。而本實驗之感染率為 68%，不可謂不高，且感染實驗之第 20 天才出現 20% 之感染率（表二），故可推測本菌感染大嘴鱧魚為慢性感染症。

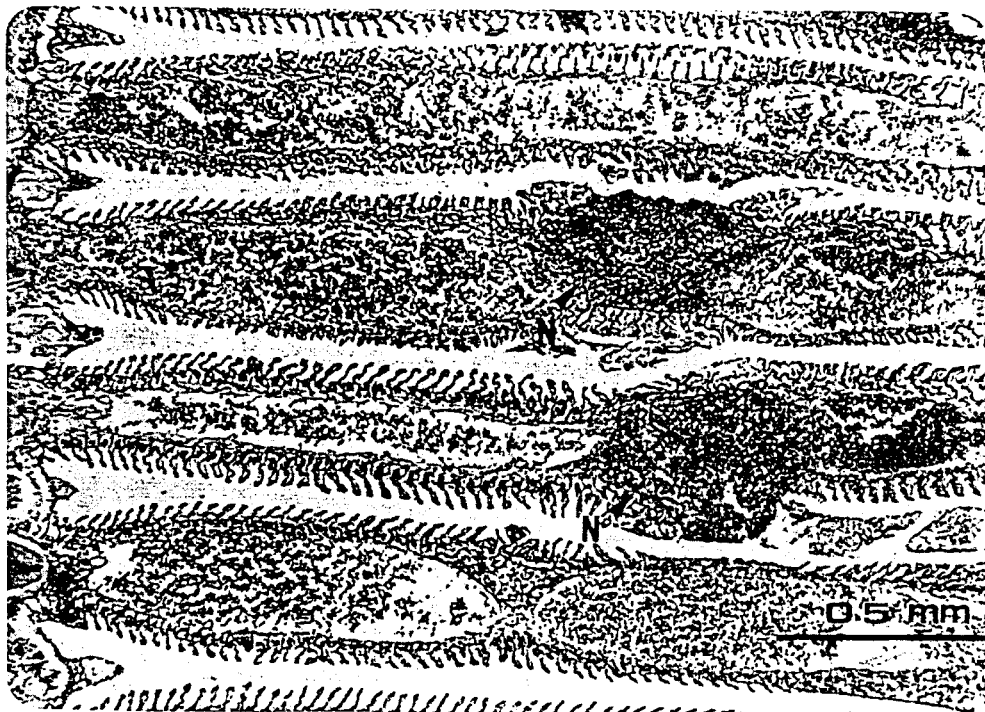
(三) 病理組織切片之研究

從大嘴鱧魚養殖場及病原性實驗中取得之病材，製成切片後，在顯微鏡下檢查，發現兩者的病理變化有一致性，即細菌會侵襲全身各器官，感染最嚴重的器官為腎臟（前腎、中腎及後腎）、鰾，其次為肝臟、脾臟、腸繫膜、鰓及鰓蓋，在心臟及腸道較少發現嚴重感染之病例，然而腦部及胃部組織則未發現有明顯之病癥。此外，在皮膚的病變中，皮下脂肪組織 (Adipose tissue) 及結締組織 (Connective tissue) 之病變比較嚴重，而肌肉組織 (Muscular tissue) 的病變較為輕微。

各器官及組織之病變分述如下：

鰓 (Gill)

細菌侵入鰓部組織造成黃色瘤結病灶的病例不多。一般而言，鰓的感染部位，包括鰓耙 (Gill raker)、鰓絲 (Gill filament) 及鰓薄板 (Gill lamella)。在鰓耙及鰓絲可發現實質細胞因壞死而形成之膿瘍以及炎症細胞浸潤的現象（圖二）。在鰓薄板可觀察到因其上皮細胞增生而癒合之病變，並可在此病變部位發現 *Nocardia* 菌及大量炎症細胞的存在。鰓蓋內側之粘膜層 (Mucosa layer) 出現明顯的病變。另在粘膜上皮組織中出現大型的膿瘍，並可明顯看到炎症細胞存在。病灶周圍的粘膜組織中有大量嗜酸性血球 (Eosinophore)，嗜中性血球 (Neutrophore) 及巨噬細胞 (Macrophage) 等炎症細胞的聚集，粘膜上皮細胞亦有變性壞死及炎症細胞侵入的情形（圖三）。



圖二 鰓部感染病灶，細菌入侵鰓絲形成膿瘍 (N) 鰓絲實質細胞壞死，而病灶周圍之鰓薄板上皮細胞有增生癒合的現象。(Giemsa Stain)



圖三 鰓蓋內側之病灶區周圍有大量炎症細胞出現。(H-E Stain)

前腎 (Pronephron)

此器官為嚴重感染組織之一，細菌感染以後，組織細胞大量變性壞死，多數膿瘍出現於前腎組織中，導致前腎組織嚴重破壞。膿瘍被多層之類上皮細胞包圍，部份膿瘍之中心區域呈乳酪化壞死 (Caseous necrosis) 的現象 (圖四)。在輕微感染病例可看到細菌侵入前腎的實質細胞 (圖五)。在前腎的基底層 (Basal layer) 組織內，出現敗發性的細菌菌落。前腎與肌肉間的結締組織中亦見到大型膿瘍，似乎為數個膿瘍融合 (fusion) 形成，其周圍的結締組織中有充血的現象，並且在前腎附近的肌肉層外緣肌束膜間質 (Perimysial septum) 結締組織中發現細菌存在。

心臟 (Heart)

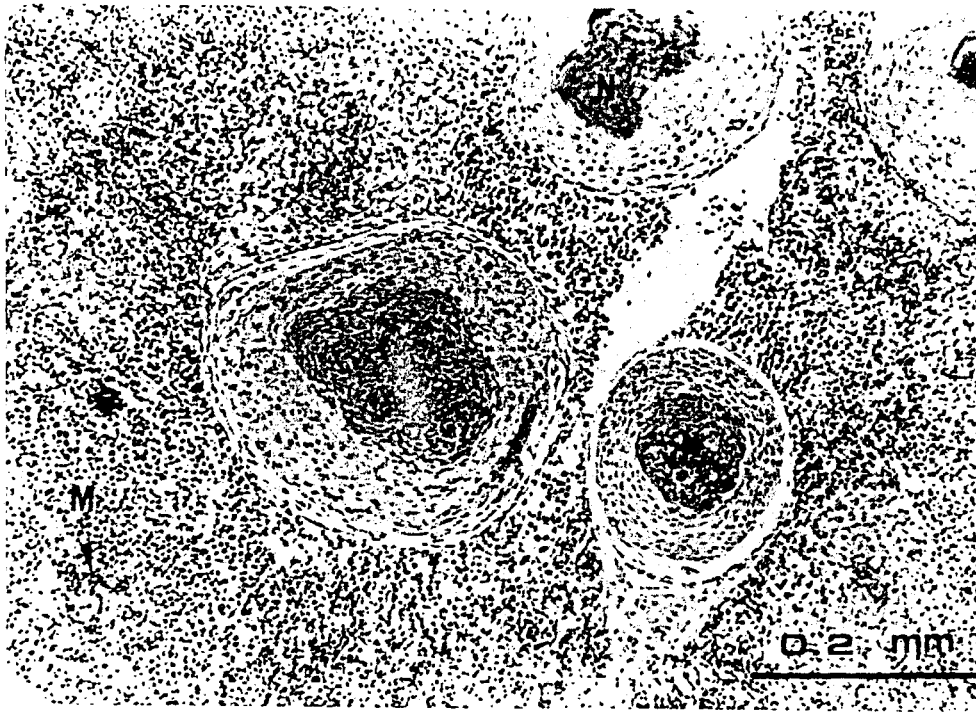
心臟較少發現病例，一般心臟出現之病變較為輕微，並且外觀上無明顯異狀，少數病例中，心肌出現膿瘍，並有大量炎症細胞聚集，顯示心肌炎症狀。心外膜 (Epicardium) 之結締組織中亦出現膿瘍。

肝臟 (Liver)

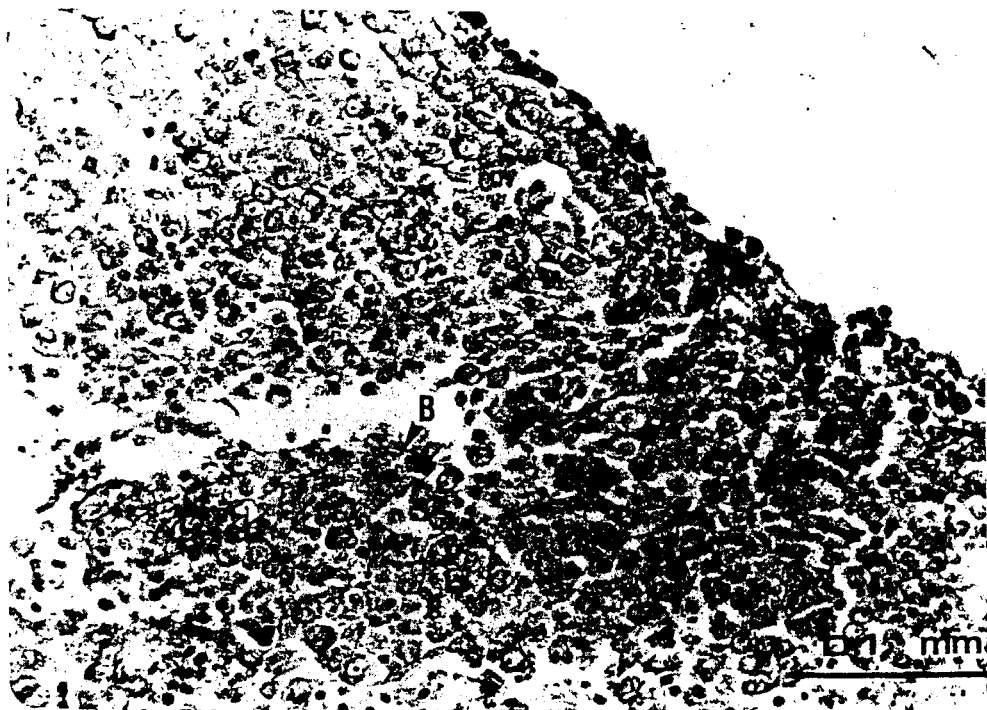
肝臟之實質組織出現膿瘍，實質細胞變性壞死並且有減數萎縮的現象出現。輕微感染病例中，細菌侵入肝臟，導致肝臟細胞壞死。但尚未形成膿瘍。膿瘍病灶常被類上皮細胞包圍，其周圍的細胞有時部份變性壞死，並且可發現大量的嗜酸性血球及聚成的菌落在細胞內出現。(圖六)。細菌並侵入膿瘍之類上皮細胞。

腸道 (Intestine)

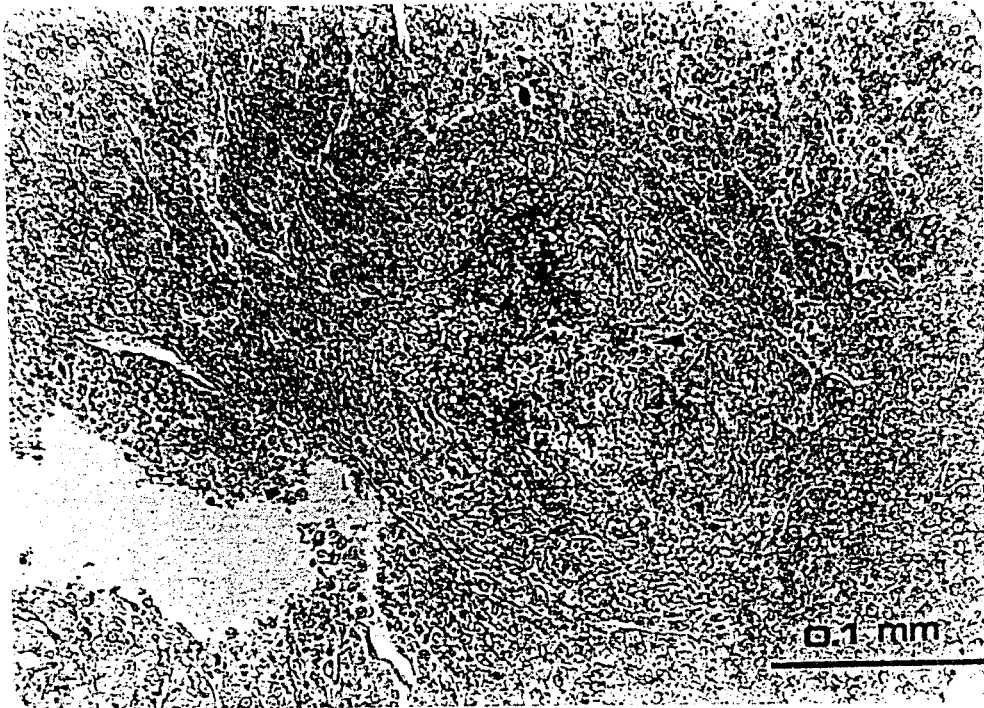
細菌主要侵襲腸的粘膜固有層 (Lamina propria)，固有層組織嚴重壞死，並形成膿瘍，導致粘膜上皮細胞剝離。腸繫膜組織亦會遭受細菌侵襲，可看到癰結，為由上皮細胞包圍之膿瘍，其周圍大量聚集嗜酸性血球及嗜中性血球等之炎症細胞。



圖四 前腎實質體組織中之膿瘍 (N)，膿瘍被類上皮細胞包圍。(H-E Stain)



圖五 細菌 (B) 入侵前腎實質組織中，可明顯看到細菌分佈。(Giemsa Stain)



圖六 肝臟組織之初期膿瘍中，可見到大量細菌集結（黑色箭頭）。（Giemsa Stain）

脾臟 (Spleen)

實質細胞大量壞死而形成多數膿瘍，在嚴重感染病例中，膿瘍密布於脾臟組織中，細胞大量壞死，類纖維組織 (Fibrinoid tissue) 散布於脾組織中 (圖七)。

鰾 (Swim bladder)

鰾內及鰾之外側存在多數被類上皮細胞包圍，中間為膿瘍的癭結，而造成實質組織嚴重變性壞死的情形 (圖八)。

腎臟 (Kidney)

實質細胞及上皮細胞因受細菌之破壞而變性壞死，漸漸形成中間為膿瘍而四周被類上皮細胞包圍之癭結，散發在腎組織中，因此可看到細尿管上皮細胞、鮑氏囊實質組織及腎實質組織之壞死 (圖九)。

肌肉 (Muscle)

肌肉組織較少發現病變，只有在外觀上發現有紅點或潰爛的區域。在皮下疏鬆結締組織 (Loose connective tissue) 可發現有大量細菌存在，造成肌肉組織嚴重性壞死及炎症細胞浸潤而形成膿瘍。同樣的病變也發生在脂肪組織 (Adipose tissue) 中。

卵巢 (Ovary)

細菌也會侵入卵巢組織中產生膿瘍，但是細菌侵入卵巢組織的病例不多。

其他組織 (Other tissue)

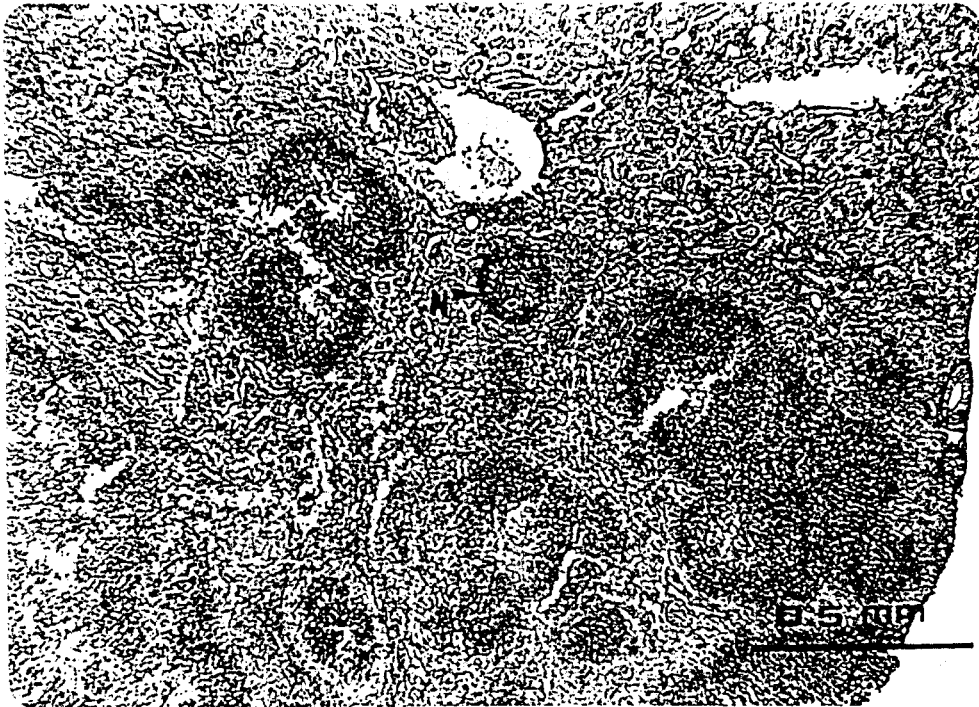
腦部、脊椎及胃部組織等均未發現有細菌侵入及病變的情形。



圖七 脾臟病變區之實質組織中充滿類纖維組織 (F)，及實質細胞壞死。(H-E Stain)



圖八 脾內之大型膿瘍 (N)，附近組織中有炎症細胞浸潤。(H-E Stain)



圖九 腎臟組織中有大量膿瘍 (N) 漫於實質組織中。(H-E Stain)

討 論

本省南部養殖之大嘴鱸魚，常發生行動緩慢、體色變黑及體側出現潰瘍之病例。經解剖觀察，發現病魚體內各器官出現黃色瘤結狀之病狀；由此病灶可分離出一種革蘭氏陽性，弱耐酸性及呈分枝狀之細菌。依其生化學特性（表一），形態鑑定為 *Nocardia* sp. (Austin and Austin, 1987; Campbell and MacKelvie, 1986; Hsu, *et al.*, 1977; Kariya, *et al.*, 1968; Kubota, *et al.*, 1968; Kumamoto, *et al.*, 1985; Roberts, 1978; Sano and Fukuda, 1987; Snieszko and Axelrod, 1976)。

Nocardia sp. 是一種生長在泥土中的細菌，為動物及人類之病原菌。*Nocardia* 感染症 (Nocardiosis) 為一種系統性感染症，主要感染部位為肺，而其他如腦部及腎臟均亦會被感染 (Singleton and Sainsbury, 1988)。被感染的動物包括牛、山羊、狗、馬、猴、天竺鼠、家禽及魚類等 (Hsu, *et al.*, 1977)。在魚類中，被 *Nocardia* sp. 感染的病例並不多，却包括了熱帶魚、淡水魚及海水魚。其魚種為 Neon tetras (Conroy, 1963)，虹鱒 (Snieszko, *et al.*, 1964)，Brook trout (Campbell and MacKelvie, 1986)，鱧魚 (Hsu, *et al.*, 1977) 及青魮 (Kariya, *et al.*, 1968; Kubota, *et al.*, 1968; Kumamoto, *et al.*, 1985; Kudo, *et al.*, 1988) 等。*Nocardia* sp. 感染大嘴鱸魚之病例，過去沒有，本病例為首例。

本菌直接採自病材，分別作革蘭氏及耐酸性染色，發現本菌為革蘭氏陽性，弱耐酸性，菌體呈分枝狀。若自培養基中採菌，作與上述相同之染色，發現本菌為革蘭氏陽性，菌體呈分枝狀，但不呈耐酸性，而且病材體側潰爛及各內臟器官有黃色瘤結出現，即知本菌為 *Nocardia* sp. (Snieszko and Axelrod, 1976; Hsu, *et al.*, 1977)。本病之外觀及解剖觀察之結果如：體側潰爛，肝臟、腎臟等內臟器官均有黃色瘤結等病徵，其他學者所述之病徵相似 (Austin and Austin, 1987; Campbell and MacKelvie, 1986; Hsu, *et al.*, 1977; Kariya, *et al.*, 1968; Kubota, *et al.*, 1968; Kumamoto,

et al., 1985; Roberts, 1978; Sano and Fukuda, 1987; Snieszko and Axelrod, 1976)。

Nocardia sp. 在 BHI 平板基中，於 28°C 培養作 24 小時的觀察，發現為分枝狀生長 (Beaman and Shankel, 1969) 與本菌在 BHI 液體培養基中，於 28°C 作 12 小時觀察所得之結果有一致性。*Nocardia* sp. 在培養基上會產生周邊不平滑之菌菌 (Gordon and Mihm, 1957; 1962; Gordon, 1966) 與本菌生長於 BHI 平板培養基中所產生的菌落相同。

在生化測定方面，*Nocardia* sp. 之生化特性為：革蘭氏陽性，弱耐酸性，有菌絲 (Aerial hyphae)，非發酵性 (Non fermentation)，絕對嗜氧 (Strictly aerobic)，Catalase 呈陽性，Cytochrome oxidase 呈陰性等 (Bergey's manual, 1986; Gordon and Mihm, 1957; Jones and Bradley, 1964; Koneman, *et al.*, 1979; Schneidau and Shaffer, 1957; Tsukamura, 1969; Tsukamura, *et al.*, 1979)。與本菌之生化特性相同。而且 Tsukamura (1981a, b) 發現 *Nocardia* 對 Mitomycin C 濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ 與 5-Fluorouracil 濃度為 40 $\mu\text{g/ml}$ 沒有感受性。此與本菌之反應亦為相同，於是便可鑑定本菌為 *Nocardia* sp.。

在種的測定方面，根據 Bergey's manual 指出，若用生化測定的方法來界定 *Nocardia* sp. 之種別是不準確的。一般文獻指出，大部份的 *Nocardia* sp. 均能利用葡萄糖而產生酸。本菌在此一測定上，用三種不同的基本培養基 (Basal medium) 測定能否利用葡萄糖產生酸，但三組實驗均顯示，本菌能利用葡萄糖，但却不產生酸。在 Bergey's manual 中指出，*N. brevicatena* 能利用大部份的醣類，但却不產生酸，此與本菌相同。但本菌却能產生 Nitrate reductase，而 *N. brevicatena* 却不能。而且 *N. brevicatena* 在 acid from glycerol, Utilization of Berzonate 之實驗中，之結果亦與本菌不同。而 Schneidau and Shaffer (1957) 指出，自人及陸上動物中分離出的 *Nocardia* sp. 均能利用葡萄糖產生酸，及分解 Urease，並且可以利用 Paraffin。與本菌的反應結果不同。因此，本菌只能定出屬名，未能定出種名。

有關 *Nocardia* sp. 對魚類的病原性實驗，過去的文獻並不多。Campbell 與 MacKelvie (1968) 指出，用 80 mg 的乾菌，經注射法，感染 Brooktrout，經過 43 天後，發現有一尾死亡。而 Hsu, 等 (1977) 用 0.1 ml/魚的劑量，以口服法，感染鱧魚，25 天後發現死亡。但若使用劑量為 8.5 ml，作長期浸泡法感染鱧魚，於 27 天後，發現死亡。本實驗中，使用低濃度 (0.1 gm/ml) 短期 (三分鐘) 浸泡，並未發現死亡。但十天便能引發病徵，因此，可以知道，本菌感染魚類所產生的感染症為慢性感染症。雖本菌為慢性感染症，却能造成魚類各器官很大的傷害。

有關組織病理觀察之文獻並不多，一般指出，病灶周圍有大量炎症細胞浸潤，而其主要的病變為膿瘍 (Kubota, *et al.*, 1968; Kubota, *et al.*, 1982; Kumamoto, *et al.*, 1985) 與本文結果相同。Kumanoto 等 (1985) 指出，用注射法感染青蚶鰓則發現在鰓、腎、脾及心臟中有膿瘍出現，而在自然感染，則不會在心臟發現膿瘍。本實驗中發現腎及脾中有大量的膿瘍，心臟中的膿瘍較少。此與 Kumanoto 等 (1985) 中所述之自然感染相同。而在各文獻中，所載的膿瘍均被類上皮細胞或類纖維細胞所包圍。而且在膿瘍中，均為炎症細胞、細菌、細胞碎片或嗜酸性物質；較嚴重者中心呈乾酪化壞死 (Kubota, *et al.*, 1968; Kubota, *et al.*, 1982; Kumanoto, *et al.*, 1985)。而本實驗之病理切片中，可觀察到所有膿瘍均被類上皮細胞所包圍。而且在膿瘍中心亦能找到炎症細胞、細菌、細胞碎片、嗜酸性物質或乾酪化壞死。唯本實驗却未找到有被類纖維細胞所包圍之膿瘍出現。而本實驗中所觀察之組織病理，均與前人所述相似。

對於本菌的防治方面，Austin 和 Austin (1987) 中載有利用藥物 Sulphisoxazole 治療觀賞魚類，劑量為 10 mg/g of food，經二十一天的投餵，有良好的效果。Kusuda (1975) 用 *Nocardia kampfachi* 菌苗免疫青蚶鰓，但效果不佳。Kusuda 及 Kawahara (1987) 利用直接及間接螢光抗體法，來測試被感染之魚體中之抗體，效果良好。

綜觀上述之結果，對於本症的病原體之測試，藥物治療及防禦方面，未見有較完整的文獻發表。而

本省大嘴鱸魚罹患本感染症之病例日益嚴重。而本感染症為慢性感染症，魚體中會造成各器官的嚴重傷害，故此，若發現魚體有病癥出現時，體內器官已造成很大的傷害。故有必要發展更精確的診斷法。大嘴鱸魚有搶餌的情況出現，故往往在攝食時會造成傷害，此為一感染途徑。因本菌為嗜氧性菌，在水中的菌量不多，故本菌的來源可能來自餌料。所以，對於餌料的新鮮度及菌量應該加以控制，並且改良魚池的管理，應該是良好的預防方法。同時，發展有效的疫苗及發展有效的治療藥物亦是必要的研究。

摘 要

本實驗針對於 1987 年在南臺地區罹患土壤絲菌症 (Nocardiosis) 之大嘴鱸魚 Largemouth bass 進行細菌之分離，鑑定及其感染後之組織病理學進行研究，同時利用所分離之細菌進行人工感染實驗，以了解其病原性。本感染症為全身性之慢性感染，病魚行動遲緩，體色變黑且體側出現潰爛之病灶。鰓、鰓蓋內側、肝、脾、鰾及腎等器官中出現散發性或密集性之黃色瘤結，此為膿瘍及巨噬細胞浸潤之病變。本症之病原菌為革蘭氏陽性，具弱酸性及呈分枝狀。在生化測定上，發現該菌為 *Nocardia* sp. 在組織病理上，所有發現病癥之內臟器官，其主要病變為膿瘍及巨噬細胞浸潤。在病理組織切片中，均發現該菌之存在。感染最嚴重的器官為前腎、腎、鰾及脾等。

謝 辭

本實驗承農業委員會計畫 78-農建-7.1-漁 06(2-1) 支持下完成，謹此誌謝。

參 考 文 獻

- Austin, B. and D. A. Austin, 1987. Bacterial Fish Pathogens, disease in farmed and wild fish. John Wiley & Son Press, N. Y., pp. 67-70.
- Beaman, B. L. and D. M. Shankel, 1969. Ultrastructure of *Nocardia* cell growth and development on defined and complex agar media. J. Bacteriol., 99(3): 876-884.
- Boomker, J., G. D. Imes, Jr., C. M. Cameron, T. W. Naude and H. J. Schoonbee, 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. Onderstepoort J. Vet. Res., 46(2): 71-78.
- Campbell, G. and R. M. MacKelvie, 1968. Infection of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by nocardias. J. Fish Res. Bd. Canada, 25: 51-52.
- Conroy, D. A., 1964. Note on the incidence of piscine tuberculosis in Argentina. Prog. Fish Culturist, 26: 89-90.
- Esch, G. W. and T. C. Hazen, 1980. Stress and body condition in a population of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): implications for red-sore disease. Trans. Am. Fish Soc., 109(5): 532-536.
- Gordon, R. E., 1966. Some strains in search of a genus *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* or what? J. Gen. Microbiol., 43: 329-343.
- Gordon, R. E. and J. M. Mihm, 1957. A comparative study of some strains received as nocardia. J. Bacteriol., 73: 15-27.
- Gordon, R. E. and J. M. Mihm, 1962. The type species of the genus *Nocardia*. J. Gen. Microbiol., 27: 1-10.
- Hazen, T. C., M. L. Raker, G. W. Esch and C. B. Fliermans, 1978. Ultrastructure of red-sore lesions on largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Association of the

- ciliate *Epistylis* sp. and the bacterium *Aeromonas hydrophila*. J. Protozool., 25(3): 351-355.
- Hazen, T. C., G. W. Esch and M. L. Raker, 1981. Agglutinating antibody to *Aeromonas hydrophila* in wild largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Trans. Am. Fish Soc., 110(4): 514-518.
- Hsu, F. S., H. M. Chu and C. N. Weng, 1977. An enzootic of nocardiosis in fish. JCRR Fish Ser., 29: 22-27.
- Jones, L. A. and S. G. Bradley, 1964. Relationships among Streptomyces, Nocardiae, Mycobacteria and other Actinomycetes. Mycologia, 56: 505-513.
- Kariya, T., S. Kubota, Y. Nakamura and K. Kira, 1968. Nocardial infection in cultured yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *S. purpurascens*): I. Bacteriological study. Fish Pathol., 3: 16-23.
- Koneman, E. W., S. D. Allen, H. M. Sommers, 1983. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2nd ed., J. B. Lippincott Co., London.
- Kubota, S., T. Karita, Y. Nakamura and K. Kira, 1968. Nocardial infection in cultured yellowtails (*Seriola quinquecadiata* and *S. purpurascens*): II. Histological study. Fish Pathol., 3: 24-33.
- Kubota, S. S., T. Miyazaki and S. Egusa, 1982. Color Atlas of Fish Histopathology. Shin-Suisan Shinbun-Sha Ltd., Tokyo.
- Kudo, T., K. Hatai and A. Seino, 1988. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing Nocardiosis of cultured fish. Int. J. Syst. Bacteriol., 38(2): 173-178.
- Kumamoto, H., Y. Horita, K. Hatai, S. S. Kubota, M. Isoda, S. Yasumoto and N. Yasunaga, 1985. Studies of fish nocardiosis. Bull. Nippon. Vet. Zootech. Coll., 34: 110-118.
- Kusuda, R., 1977. Bacterial disease of marine cultured fishes and treatment by vaccine. In Proceedings of the Fifth Japan-Soviet Joint Symposium on Aquaculture, Motoda, S. (ed.), Tokai University, Tokyo, pp. 229-243.
- Kusuda, R. and E. Kawahara, 1987. Direct and indirect fluorescent antibody identification of yellowtail pathogens. Jap. Bull. Soc. Sci. Fish., 53(3): 389-394.
- Luna, L. G. (ed.), 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed., McGraw-Hill Book Co., London, pp. 127-128.
- Noga, E. J., 1986. The importance of *Lernaea cruciata* in the initiation of skin lesions in largemouth bass, *Micropterus salmoides* in the Chowan River, North Carolina, U. S. A. J. Fish Dis., 9(4): 295-302.
- Roberts, R. J., 1978. Fish Pathology. Macmillan Publ. Co. Inc., N. Y.
- Sano, T. and H. Fukuda, 1987. Principal microbial disease of mariculture in Japan. Aquaculture, 67: 59-69.
- Schneidau, J. D., Jr. and M. F. Shaffer, 1960. Studies on *Nocardia* and other actinomycetales: I. culture studies. Am. Rev., Respira. Dis., 76: 770-788.
- Sheehan, D. C. and B. B. Hrapchak, 1980. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd ed., The C. V. Mosby Co., London, pp. 144-235.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.), 1986. Bergey's Manual

- of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Williams & Wilkins, London.
- Snieszko, S. F., G. L. Bullock, C. E. Dunbar, L. L. Pettijohn, 1964. Nocardiae infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmon gairdneri*). J. Bacteriol., 88: 1809-1810.
- Snieszko, S. F. and H. R. Axelrod, 1976. Disease of Fish. (Bacteria). T. F. H. Publ. Inc., Neptune, N. J.
- Tsukamura, M., 1981a. Test for susceptibility to Mitomycin C as aid for differentiating the genus *Rhodococcus* from the genus *Nocardia* and for differentiating *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* from other rapidly growing mycobacteria. Microbiol. Immunol., 25(11): 1197-1199.
- Tsukamura, M., 1981b. Differentiation between the genera *Mycobacterium Rhodococcus* and *Nocardia* by susceptibility to 5-Fluorouracil. J. Gen. Microbiol., 125-208.
- Tsukamura, M., S. Mizuno, S. Tsukamura and J. Tsukamura, 1979. Comprehensive numerical classification of 369 strains of *Mycobacterium Rhodococcus* and *Nocardia* Int. J. Syst. Bacteriol., 29(2): 110-129.
- Tung, M. C., S. T. Huang and S. S. Tsai, 1986. An epizootic in largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepede, caused by *Ichthyophonus* in freshwater pond in southern Taiwan. COA Fish. Ser. no. 8, Fish Dis. Res. VIII: 6-13.
- Valdez, I. E. and D. A. Conroy, 1963. The study of a tuberculosis-like condition in neontetras? (*Hyphessobrycon innesi*). II. Characteristics of the bacterium isolation. Microbiologia Espanola, 16: 249-253.