

# 魚類 Nocardiosis 在臺灣發生之報告

徐興鎔·朱海楣·翁仲男

An Enzootic of Nocardiosis in Fish.

Frank S. Hsu, H. M. CHU and C. N. WENG

An outbreak of Nocardiosis in Formosa snakehead fish is described. The disease was experimentally reproduced with cultures of pathogens orally and contactually but not intramuscularly and intraperitoneally.

The disease was characterized by high morbidity and mortality. Pathologically, numerous disseminated abscesses encapsued by granulation tissue were commonly observed in the pleura and viscera. Some characteristics of the *Nocardia* spp. are described.

## 一、緒 言

Nocardiosis 是由 *Nocardia* 屬細菌引起動物罹患一種全身性肉芽腫的疾病，最早於 1890 年 Eppiger<sup>(1)</sup> 在人腦膿瘍中分離出來。其後又於各種動物如牛、山羊、狗、馬、猴、天竺鼠、家禽和魚等分離出此種細菌<sup>(1)</sup>，但由魚體分離出此種細菌的報告較少。1962~1963 年間，Smieszko<sup>(2)</sup> 等人於美國西維吉利亞州立國家養鱒場中首度發現鱒苗有 *Nocardia* 菌感染的現象。但發病率不高，且未向外擴散，屬於慢性疾病。1963 年 Conroy<sup>(3)</sup> 在阿根廷水族館中之熱帶魚 neon tetras 發現疑似由 mycobacterium 感染，後經人確證為 *Nocardia* 感染，其病魚症狀是魚體消瘦、背鰭附近色素消失，同時細菌染色結果呈 acid-fast, gram-positive。1965 年於德國亦曾發現七種魚類患有此病<sup>(4)</sup>。1968 年加拿大境內在河鱒 (brook trout) 體內發現有 *Nocardia* 感染<sup>(4)</sup>，進一步接種實驗，於接種後 40~60 天左右，魚體致死。此外日本對 *Nocardia* 引起魚類疾病之報告較多<sup>(5-8)</sup>，但對病理變化甚少詳細探討。

1976 年三月初，筆者等人在南港私人養魚場調查魚病發生情形，發現該養魚場四口魚池之一口有類似此病症的魚體，該口魚池放養鱧魚五千餘尾，平均重量 300~600 gm，塘虱魚一萬餘尾，平均重量 100~200 gm。該魚池餌料 95% 為家禽小腸再混以少量的人工飼料和魚漿，發病的鱧魚都游至池旁，行動遲緩，缺乏食慾，腹部腫脹，有些體腹側有潰瘍現象，嚴重者一兩天後死亡，此病於調查時三個月前發生，發病率為 15%，死亡率達 10% 左右。

## 二、材料與方法

### (一) 材 料：

取發病鱧魚 9 尾，每尾重 300 gm，塘虱魚 2 尾，每尾重 200 gm。

### (二) 方 法：

#### (1) 病理檢查：

(a) 肉眼檢查：除詳細檢查各部組織與臟器外，並採取病變部、肝、腎、心肌、胰、肌肉、骨骼、

腦，分別固定於 10% 中性福爾馬林 (Buffered neutral formalin) 以備切片檢查。

(b) 組織病理切片檢查：包埋切成厚約  $6\mu$ ，以哈氏蘇木紫伊紅 (Hematoxylin and Eosin 簡稱 H & E), P. A. S (Periodic acid-Schiff) 和 Acid-fast 染色鏡檢。

(2) 細菌檢查：

(a) 細菌塗抹染色：取新鮮病魚之病巢與臟器，塗抹玻片，做 Gram, Wright, PAS 與 Acid-fast 染色。

(b) 細菌培養：將細菌接種於 5% 山羊全血 (BP) 培養基中於  $22^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  下培養，觀察菌落形態。

(3) 人工感染試驗：

(a) 試驗處理：選取重約 25 gm 之鱧魚 20 尾，分成五組處理，第一組為對照組，第二組肌肉注射，第三組腹腔注射，第四組經口感染，第五組病原注入水中 (表 1)。

表 1 人工感染試驗處理方法及結果

組 別	尾 數	處 理 方 法 (劑 量) *	結 果
第 一 組	4	對照組	無病症
第 二 組	4	肌肉注射 (0.1 ml)	無病症
第 三 組	4	腹腔注射 (0.1 ml)	無病症
第 四 組	4	口服 (0.1 ml)	三尾在 20 日內死亡，無病症， 一尾 27 日後死亡，其腹腔及腎臟組織有黃白色結節
第 五 組	4	接種材料 (8.5 ml) 投入水浴中	二尾在 20 日內死亡，無病症， 二尾 25 日後剖檢，其腹腔及腎臟組織有黃白色結節

\* 細菌濃度  $10^9/\text{ml}$

(b) 細菌劑量：將培養皿的細菌用白金耳鈎出，用生理鹽水稀釋，以紅血球計數器計算細菌數目，使其達於  $10^9/\text{ml}$ ，而後接種魚體，每日記錄水缸溫度及魚體發病情形。每日以豬內臟切碎煮熟餵食，連續觀察一個月。

(4) 細菌生化特性測定：

依照 Robert Bailery 著診斷微生物學 (Diagnostic Microbiology) 方法辦理。

### 三、結 果

1. 病理檢查：

(a) 肉眼檢查之病變：

鱧魚：腹部積水，表皮潰瘍，腎、肝、胰臟、脂肪組織、心肌、腹膜及肌肉等可見許多圓形或不規則之黃白色結節，其大小直徑為 0.5~2.0 cm 左右，結節內充滿黃白色，乳酪狀膿液。(見 Fig. 1, 2, 3)

塘虱魚：魚體亦有透明腹水，其積水部位附近之肌肉水腫，內臟無病變。

(b) 組織病理切片檢查：

腎、肝、胰臟、心肌、脂肪組織有局部性壞死小點與膿瘍，病巢中心為深紫色或藍色之細菌堆以及白血球和壞死細胞，其外圍有淋巴球、單核球及增生之結締組織。(Fig. 4, 5)

2. 細菌檢查：

(a) 細菌塗抹染色：由新鮮塗抹片染色後為 Gram positive (Fig. 6)，細菌為分枝或不分枝鏈鎖或者是單獨呈桿狀或球狀之形態，Acid-fast 染色反應呈陰性。

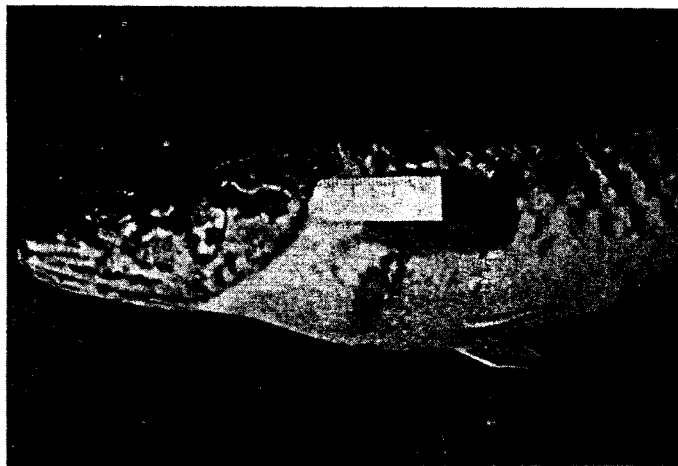


Fig. 1. Formosa snakehead with bloated abdomen, superficial ulceration and hemorrhage.



Fig. 2. Formosa snakehead. showing yellow white cheesy pus, bean-sized tubercle on the liver and adipose tissue.



Fig. 3. Encapsulated abscess or tubercles of various size scattered about the kidneys and adjacent to peritoneum.



Fig. 4. Purple bacterial clumps and necrotic debris in the necrotic foci, the beaded rods are still visible. PAS stain:  $\times 960$ .



Fig. 5. Pancreas with diffuse granulomatous and mixed inflammatory response, those necrotic foci had purple bacterial clumps in the center and surrounded by thick fibrous tissue. H & E;  $\times 115$ .



Fig. 6. Stained smear of *Nocardia* spp. from 4 day culture medium, gram positive, beaded, branching rods. (Gram stain).

(b)細菌培養：在 22°C，有氧狀況下培養，3~5 日後，培養基劃線上出現許多 2~4 mm 光亮、淡黃色、圓形，不溶血之菌落，以白金耳環鉤出細菌塗抹染色與形態檢查，此菌之形態特性與新鮮塗抹之細菌結果相同。無運動性。在 37°C 下細菌亦可生長，但其速度較慢。

### 3. 人工感染：

(a)接種材料：細菌利用 0.85% saline 稀釋，其細菌濃度為 10<sup>9</sup>/ml。

(b)人工感染之病魚其病症、病理及細菌檢查等所得結果與自然病例者相同 (表 1)。

### 4. 生化測定：

*Nocardia* 的生化測定結果是細菌可產生硫化氫 (H<sub>2</sub>S)，對觸酶 (Catalase) 呈強陽性反應。不產生靛基質 (Indole)，不能使硝酸鹽還原為亞硝酸鹽。對脲酶 (Urease) 呈陰性反應。

## 四、討 論

細菌染色呈 Gram positive，而且引起魚類慢性肉芽腫性病變者計有棒狀化膿桿菌 (*Corynebacterium* sp.)、葡萄狀菌 (*Staphylococcus*)、結核菌 (*Mycobacterium* sp.) 及 *Nocardia* spp.<sup>(4)</sup>。由本實驗新鮮病材之細菌塗抹染色及魚體外觀形態觀察之結果知本病原菌非棒狀化膿桿菌或葡萄球菌。雖結核菌之病變頗似 *Nocardia* 感染，但其 Acid-fast 絕對呈正反應且細菌不分枝，而 *Nocardia* 細菌為弱或負的 Acid-fast 反應。本實驗魚體病理組織切片及塗抹標本的 Acid-fast 測定，皆呈負反應，故而可推測為 *Nocardia* 感染<sup>(9-10)</sup>。生化測定結果與前人所做未盡完全相同<sup>(11)</sup>，關於種名，尚無法確定。

本實驗中之人工感染，20尾實驗幼鱧接種病原菌後，其中對照組、肌肉注射組、腹腔接種組三組中魚體死亡時皆無病巢出現，可能因實驗魚體因接種細菌後引起食慾不振或所飼餌料不合胃口，在病巢未出現時已因饑餓衰弱而死亡。病原菌口服接種和細菌注入水中，於第 27 天發現典型病變，此現象符合 Snieszko<sup>(2)</sup> 所述，經 *Nocardia* 感染 30~90 天有病症出現，可視為慢性疾病。

筆者調查發病魚池四周環境皆為民家與豬舍，污水經排水溝導入魚池而被使用。由人工感染實驗知病原菌經口服或投入水中者，皆能引起魚體再感染現象。該魚池 95% 之餌料係鷄鴨之腸管和內臟，而 *Nocardia* 對家禽亦有病原性<sup>(1)</sup>，故可推斷病原菌由排入污水而污染魚池，或者飼料中存有大量病原菌，魚體攝食後導致發病。關於此點有待將來進一步說明。

## 五、中 文 摘 要

臺灣鱧魚發生慢性肉芽腫性疾病。經由細菌檢查、生化特性測定、人工感染以及病理切片檢查等方法證明為 *Nocardia* 菌感染。本病特徵為發病率及死亡率均高，魚體肌肉、胸腔及腹腔各臟器可見許多肉芽組織包圍之膿瘍。

## 誌 謝

本研究承蒙農復會支持，得以順利完成，特此謹申謝忱。

## 參 考 文 獻

1. BRUNER and GILLESPIE (1973). "Hagan's Infectious Disease of Domestic Animals" Six Edition p. 467-480.
2. SNIESZKO S. F., G. L. BULLOCK, C. E. DUNBAR, and L. L. PELTIJOHN, (1964). "Nocardial Infection in Hatchery-reared Fingerling Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)" J. Bacteriol. vol. 88, 1964. 1809-1810.
3. CONREY D. A. (1964). "Nocardiosis as a Disease of Tropical Fish" The Veterinary Record. June 20th, 1964, vol. 76, No. 25, 37-38.

4. RIBELIN W. E. and MIYAKI G. (1975), "Pathology of Fishes" 82-84.
5. 楠田理一、中川敦史（高知大農）：養殖ハマチの病原菌 *Nocardia kampachi* の生態に関する研究-I. 種種条件下における生存能。昭和 50 年日本水産学会秋季大会講演要旨集。336。
6. 楠田理一、滝秀雄、竹内照文：養殖ハマチのノカルディア症に関する研究-II. 鰓結節症のハマチから分離された *Nocardia kampachi* の柱状」Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 40(4): 369-373 (1974).
7. 保科利一、狩谷貞二、「淡水魚類の細菌性疾病」昭和 42 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム。
8. サケ・マス類、アコ・タイ。魚病診断指針。
9. C. H. COLLINS, M. I. BIOL., F. I. M. L. T. Microbiological Methods. 287-288.
10. JOHN E. BLAIR, Manual of Clinical Microbiology, 137-142.
11. RUTH E. GORDON and JOAN M. MIHM (1962). "The Type Species of the Genus Nocardia." J. Gen. Microbiol. 27, 1-10.