

黃臘鰺奴卡氏菌感染症

陳安琪 白又文 郭仁政

一、前言

奴卡氏菌感染症 (Nocardiosis) 是屬於一種慢性的細菌性疾病，該病可感染淡水魚與海水魚。特點是潛伏期長，其病情發展緩慢，但發病率和死亡率都高，所以一旦發病應及時診斷並對未發病魚隻給予預防性治療，治療越早，感染數量越少，治療率越高，倘未即時診斷並給予治療，多造成養殖業者重大損失。

黃臘鰺為鰺科 (Carangidae) 魚種，黃臘鰺俗稱紅衫，是世界上重要的養殖魚類，也是目前澎湖主要海水養殖魚類之一，一般市面上所見皆為養殖魚。黃臘鰺廣泛分布於印度-太平洋之暖水域，於台灣南部、東部海域皆可見，其幼魚主要棲息於近沿岸砂泥底質水域或砂泥底質的內灣，成魚則成群棲息於沿岸礁石底質水域，以生活於沙地之軟體動物或其它具硬殼之無脊椎動物為食 (1)。

本次病例探討黃臘鰺為對奴卡氏菌感受性極高的魚種之一，臨床上，魚隻奴卡氏菌感染症出現明顯病徵時死亡率皆已急速上升，因此早期診斷與早期投藥為減少損失的不二法門。藉由這次檢診報告，討論是否應著重預防醫學及飼養管理，並建議養殖業者於魚隻進苗後可先送檢做簡易的魚隻健康檢驗，來達到有效的疾病預防，降低藥物的使用率。

近年，本所於平日訪視及產銷班會時輔導養殖業者多加利用免費檢診服務，雖成效匪大，仍增加少數未曾送檢業者送件。希望藉由本病例報告能進一步探討奴卡氏菌感染原因，有助於日後對於奴卡氏菌感染症的預防與治療。

二、病歷

本縣西嶼鄉某一箱網養殖為主的養殖戶，主要養殖石斑 (龍膽石斑、青斑等)、黃臘鰺、海鱺、鮫魚、紅甘鰺、青嘴龍占及白蝦等。其中黃臘鰺飼養情形：業者目前主要分成陸上、海上以及半陸半海：於陸上魚塭育成約需 4 個月，於魚隻重達 300 公克 (約 20-30 公分) 以上開始販售；於海上箱網育成約需 8-12 個月，於魚隻重達 300 公克甚至 1 公斤重始販售。而半陸半海則視管理需求而定。

本所於 103 年 12 月 23 日接獲業者通報疫情，當日前往進行臨床訪視時，得知該養殖戶採自家種魚受精卵送至台南孵化，於 103 年 4 月陸續運送回澎湖飼養，共計 30 萬尾魚苗分至 20 口海上箱網養殖，自飼養日開始皆有零星死亡，於 9~10 月份魚隻受貝尼登吸蟲 (*Benedenia* sp.) 感染，每日死亡數約 50 尾，11 月 20 日箱網搬遷後翌日魚隻死亡數量增加，達每日約 150 尾，12 月份開始每日死亡隻數到達 400 多尾；直至 12 月 23 日才通知本所，本所於當日前往臨床訪視，並將病魚帶回剖檢。

死亡的魚隻外觀消瘦、眼球變黑、體軀變形、觸診有硬塊、部分病魚臟器暴露於排泄孔外且呈多發散佈突出小白點。發病魚較不願意進食，發病後約 1~3 天即死亡。

飼養管理人表示，該批黃蠟鰻自購入至今，未使用預防性或治療性藥物，僅偶爾使用含碘類消毒水 0.5PPM，並期待疫情得以控制和緩。

三、肉眼病變

外觀：

1. 雙眼角膜輕微混濁微凸。
2. 魚隻消瘦、部分體軀彎曲變形（如圖 1）。
3. 靠近鰓弓處可見乳白色結節突出（如圖 2）。
4. 咽喉部可見大小不一結節（如圖 3）。
5. 病魚脾臟、腸管暴露於肛門外且脾臟呈現多發白色結節（如圖 4）。

剖檢病變：

1. 頭腎腫大可見瀰漫性黃白色粟粒狀結節（如圖 5）。
2. 肌肉內有乳白色結節（如圖 6）。
3. 腎臟腫脹且可見多發局部黃白色粟粒狀結節（如圖 7）。
4. 脾臟腫脹且散佈黃白色粟粒狀結節（如圖 8）。
5. 脊髓可見乳白色乾酪樣物質（如圖 9）。
6. 腦部可見粗糙表面（如圖 10）。

四、實驗室診斷

1. 寄生蟲檢查：鰓絲壓片未見寄生蟲，於體表處可見貝尼登吸蟲 (*Benedenia* sp.)（如圖 11）。

2. 臟器壓片抗酸染色：由腎、肌肉做壓片，經抗酸染色，可見多量淡染細長絲狀菌（如圖 12、13）。
3. 細菌分離：以無菌白金耳（loop）從患病魚隻肝臟、脾臟、腎臟、腦部等處釣菌，接種於 5% 綿羊血豆胰蛋白培養基（TSA w/5% SRBC）、Mac Conkey 培養基、BHIA 培養基、TCBS 培養基與 Lowenstein-Jensen (L-J) Slant 上，於 25°C 下經 6 天培養，結果在血液培養基上可見白色隆起砂粒狀菌落（如圖 14），而在 L-J 培養基上可見黃色突起粒狀菌落（如圖 15），其餘培養基上未見菌落生長。
4. 生化性狀：可見細小黃白色表面粗糙有皺褶之菌落，革蘭氏染色呈陽性或不易染色，抗酸染色呈弱抗酸性長桿菌，菌體呈絲狀具分支、串珠樣，非發酵性，嗜氧性，不具運動性，Catalase 反應呈陽性，Oxidase 呈陰性。分離株委請行政院農業委員會家畜衛生試驗所進行核酸鑑定，經鑑定為 *Nocardia seriolae*。
5. 藥物敏感性試驗：
以紙錠擴散法測定奴卡氏菌對於各種抗菌劑之感受性。將分離之細菌依水產動物用藥使用規範所許可用於鱸形目之藥物進行藥物敏感性試驗，依據結果建議使用具敏感性之藥物。分別為 Doxycycline、磺胺劑、Erythromycin 或 OTC (Oxytetracycline) 等藥物有感受性，判讀比對結果如（表 1）。

五、分子生物學診斷

由罹病魚隻臟器所分離並經繼代純化之革蘭氏陽性菌菌株，取單一菌落以 Taco DNA/RNA Extraction Kit 進行菌體 DNA 之抽取，並保存於 -20°C 中備用。

1. DNA 萃取步驟如下：

- (1) 加 20 μ l Proteinase K、500 μ l Binding Buffer 於樣品中，渦旋 15 秒充分混勻樣品，室溫培養 10 分鐘。（如果需要去除 RNA，可在培養前在樣品中加入 10 μ l RNase A）。
- (2) 加入 200 μ l Lysozyme Buffer 室溫下放置 10 分鐘。
- (3) 短暫離心，將全部的溶液加入離心柱中，12,000 \times g 離心 1



分鐘，棄流出液。

- (4) 加入 500 μ l Clean Buffer 溶液（使用前請先檢查是否已加入無水乙醇），12,000 \times g 離心 30 秒，棄流出液。
- (5) 加入 500 μ l Wash Buffer 溶液（使用前請先檢查是否已加入無水乙醇），12,000 \times g 離心 30 秒，棄流出液。
- (6) 重複步驟(4)一次。
- (7) 12,000 \times g 離心 2 分鐘，徹底去除殘留的 Wash Buffer。
- (8) 將離心柱置於一乾淨的離心管中，在離心柱的中央加入 50 - 200 μ l 預熱 Elution Buffer 溶液（65 $^{\circ}$ C），或去離子水（pH>7.0）室溫靜置 1 分鐘，12,000 \times g 離心 1 分鐘，洗脫 DNA。
- (9) 可選步驟：為得到更多的 DNA，可進行第二次洗脫，在離心柱的中央加入 50-200 μ l 預熱 Elution Buffer 溶液（65 $^{\circ}$ C）或去離子水（pH>7.0）室溫靜置 1 分鐘，12,000 \times g 離心 1 分鐘，洗脫 DNA，洗脫出的 DNA 於-20 $^{\circ}$ C 保存。

2. 聚合酶鏈鎖反應：

引子對係參考 Ramos-Vara et.al., 2008 所述：16Sfa：

5' -GCT CAG ATT GAA CGC TGG-3'、16SFb：5' -GCT CAG GAY GAA CGC TGG-3' 與 16SR：5' -TAC TGC TGC CTC CCG TA-3'，以萃取出完成之菌體 DNA 作為模板進行 16SrDNA PCR，反應於 GeneAmp PCR System 2700 型中進行，其 PCR 反應程序如下：94 $^{\circ}$ C、5 分鐘 pre-denaturation 於 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘 denaturation、；58 $^{\circ}$ C、60 秒 annealing 及 72 $^{\circ}$ C、1 分鐘 extension，共 35 個循環，於 72 $^{\circ}$ C、7 分鐘終結，最後降溫至 4 $^{\circ}$ C。預期增幅產物為 320 bp。

總反應容積為 25 μ l，其中包含：D. W. 13 μ l、DNA template 5 μ l、10 \times PCR buffer 2.5 μ l、dNTPs mixture (2.5mM) 2 μ l、primer P1 (5 μ M) 1 μ l、primer P2 (5 μ M) 1 μ l、Taq DNA polymerase (2.5units) 0.5 μ l。

3. 電泳分析：

取 1 μ l 之 6X loading dye 與 5 μ l 之 PCR 產物均勻混合後，加入含有 1.5 μ g/ml 之溴化乙錠 (ethidium bromide；EtBr，Sigma) 之 2% agarose (Promega, USA) 之孔洞內，以 100V 電

壓行電泳分析 30 分鐘，將膠片置於紫外燈下觀察並拍照，得到產物大小為 320 bp (如圖 16)。

4. 核苷酸序列分析、定序及親緣性關係：

將定序之核苷酸序列輸入 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 進行比對，並利用 DNASTAR 軟體分析(將輸入 NCBI 的序列輸入)(如圖 17)。得到與 *N. seriolae* 相似度達 99.99%。

六、組織病變(各臟器切片)

切片抗酸染色(腎、肝)：病灶區可見多量弱抗酸絲狀菌(如圖 18、19)。

鰓絲：可見鰓薄板細胞融合，偶見壞死團塊(如圖 20)。

脾臟：多發性壞死，中央可見壞死細胞組織夾雜菌塊；壞死區周圍黑色素巨噬細胞(melano-macrophage)增加，可見 MMC (Melanomacrophage Center) 數量增加(如圖 21、26)。

腎臟：多發性壞死，可見不同階段與程度的慢性炎症至壞死性肉芽腫性結節；可見肉芽腫內再包覆肉芽腫；炎症細胞以巨嗜細胞為主其次為顆粒性白血球。多層的炎症細胞包被形成緻密的同心圓結構(如圖 22、23、24)。

肝臟：多發性壞死，與腎臟一樣可見不同程度的壞死肉芽腫，高倍可見大量細菌菌絲聚集其中。偶見肝臟內有乾酪樣壞死，病灶中央呈現一片灰藍色，外圍包被多層炎症細胞(如圖 25)。

骨髓：可見硬骨細胞因兩側大量炎症細胞擠壓，而彎曲或凹陷(如圖 27、28、29、30)。

肌肉：病灶中央可見肌肉變性至液化壞死，亦可見纖維化現象，膿瘍處四周黑色素細胞增加(如圖 31、32)。

眼球：未見特異病變。

七、類症鑑別

因本病例肉眼上可見各臟器呈肉芽腫症狀，所以特別將常見會導致肉芽腫的細菌性疾病做比較：

1. 分枝桿菌感染症

病原為 *Mycobacterium* sp.，目前已超過 167 種淡、海水養殖魚類及野生魚對分枝桿菌具感受性。*Mycobacteriosis* 是一種亞急性到慢性的疾病，研究發現本病感染必須攝入或宿主傷口接觸被污染的食物、水、排泄物、尿或其他含菌的分泌物；此菌普遍存在於水和池底沉積物，而魚類的生活環境又與土壤和水有緊密關係，因此魚類的分枝桿菌症感染普遍在全世界流行 (8)。在肉眼觀察時，可見體表的出血或潰瘍，多重器官尤其是脾臟及腎臟的白色肉芽腫病變，嚴重時可見腹水蓄積。病理組織切片下亦可發現內臟有多發性肉芽腫病變，以抗酸染色可見陽性抗酸分枝桿菌存在。罹患此病的魚隻不建議治療，應予淘汰。

2. 發光桿菌症

病原為 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*，屬格蘭氏陰性菌，以前稱為巴斯德桿菌 (*Pasteurella piscicida*)，其感染後導致臟器出現白色結節，很類似結核菌症，故又稱類結核菌症，是台灣箱網養殖海鱺的主要病害之一。發光桿菌普遍存在於海洋環境中和海洋生物體的體表，造成魚隻感染的病原以 *Photobacterium damsela* 最為人所熟知。臨床上分成急性及慢性兩種，急性較少看見肉眼的病變，偶爾可見體表、鰭基部及肛門周圍有皮膚出血，但在解剖下可見肝臟、腎臟及脾臟有多發局部壞死灶；慢性的病變則可發現肝、脾、腎表面及實質密發 0.5~2 mm 大小之灰白色壞死結節；大多數海水魚與半海水魚易罹病。而本所檢診結果為發光菌感染之魚隻，多與病毒性疾病或寄生蟲疾病感染相關，並伴隨皮膚潰爛或出血性傷口，甚少單獨僅發光菌感染結果而死或大量死亡 (2)，且多為海鱺魚發病。

3. 類立克次體症

Piscirickettsia salmonis 早期一直誤將此病原菌歸類為立克次體，後經由基因序列的比對，現在重新將其歸類在 *Gammaproteobacteria* 綱 *Thiotrichales* 目 *Piscirickettsia* 屬 *salmonis* 種；革蘭氏陰性、營養需求高、絕對魚類細胞質內生長的細菌。臨床症狀：嚴重感染者體色變黑、食欲廢絕、無力游動。靠近岸



邊或水面游動。輕微感染者並無外表症狀。本病原菌主要感染海水鮭魚，部分魚隻剛開始體表出現白色小壞死點，後逐漸變為潰瘍，在慢性嚴重感染的病例，可見到腹水，脾臟及腎臟腫大，最明顯的病變出現在肝臟，呈現腫大、顏色變成白色或黃色、多發性局部、融合在一起的化膿性肉芽腫結節。組織病理切片下可在脾臟及腎臟的間質看到肉芽腫炎症反應導致造血細胞的流失，因此臨床上常看到感染 *Piscirickettsia salmonis* 的魚隻有貧血的狀況。

4. 愛德華氏菌

病原為 *Edwardsiella tarda*，發病魚可見迴旋游動而死亡，張口呼吸，皮膚病灶、鰓部蒼白、眼睛腫大、黏液過度分泌，鱗片糜爛及潰瘍。肛門腫脹及出血。在甚急性病例，常見魚體腹側皮膚充血。隨著病程進展，軀幹肌肉開始有膿瘍灶的發生，之後膿瘍灶會快速變大，產生大型空腔並充滿氣體。病灶處常有色素的流失，魚體的後半身會失去控之能力 (3)。

八、最終診斷

黃鱘鱒奴卡氏菌感染症

九、治療及預防處置

本病為慢性病，其病程常達數月之久，魚體感染後對肝臟、腎臟等重要器官損傷大，待病徵出現時常已無法治癒。因此，對於該病的控制還是要「預防為主、防重于治」，在平時應該加強消毒措施，建議使用 Benzalkonium chloride (BKC) 進行養殖水體消毒；清池時需長時間曝曬底泥，並撒佈生石灰或漂白粉消毒 (6)。而此次病例發生於海上箱網，消毒與治療成效不佳，且此病即使耐過其賣相也不佳，所以建議飼主將魚隻淘汰。在藥物防治方面，目前尚無針對奴卡氏菌的特效抗菌藥物。

此次病例病魚外觀可見結節，剖檢亦於各臟器看見黃白色結節，脊椎周圍及肌肉亦見特徵性壞死，加上於臟器抹片下發現呈弱抗酸的長絲狀桿菌聚集時，即初步診斷為奴卡氏菌症並建議養殖戶進行用藥治療，依「水產動物用藥品使用規範」建議養殖戶可先使用



Doxycycline 50mg/kg/日，連續使用 3-5 日後，詢問養殖戶魚隻狀況，養殖戶表示魚隻出現臨床症狀並死亡的數量有逐漸減少，但仍有部分陸續死亡，於是依據水產動物疾病防治及正確用藥手冊中病例防治的用藥建議養殖戶可再使用 7 天（停藥期 20 日）或選擇其他藥物感受性試驗有效的抗生素。所以再次給予建議。而在文獻中提及使用磺胺類藥物和其他抗生素併用會有良好的療效，例如 Sulfamethoxazole 可與 Trimethoprim 一同使用皆可提高治療的結果 (9)。此外，於後續疫情訪視輔導時告知飼主此病原具高傳染性且會存在底泥中，疫情有可能會再升溫，需提高警覺，並要徹底將病死魚撈除淘汰，避免傳播或造成海洋環境污染，也請飼主做好防護措施，避免人員因場內操作而受到感染。最終得知，飼主因殘活下來的魚隻賣相差無法販賣，而全數淘汰。

十、疫情追蹤調查

- 4 月 2 日：將孵化完成的黃臘鰱陸續運回澎湖飼養，前後共計 30 萬尾，分 20 口飼養於海上箱網中。
- 4 月 2 日：於放養日開始每日均零星死亡 2~3 尾。
- 約 9~10 月份開始，海上箱網魚隻受貝尼登吸蟲感染
- 11 月 20 日：北面箱網因死亡率較往年高，又擔心因北面風大易受低水溫影響，因而飼主遷移至南面箱網。
- 12 月 1 日：開始每日死亡達 400 多尾。
- 12 月 23 日：業者知會所內人員到場視察。
- 計算此次疫情從飼養日至送檢日其死亡率大約為 12%，估計發病率約 12~20%。

本病發生後，依臨床症狀及染色結果即先行建議用藥

(Doxycycline)，現場訪視時飼主說明魚隻仍持續死亡約 1~2 周後情況開始回穩，每日死亡數約 20 尾逐漸回穩，養殖戶也積極改善場內環境、增加消毒，加強人員防護。飼主最終處置仍全數淘汰。

而疫情發生的可能性很多，此次病例是將該場種魚的受精卵送至台南孵化後將吋苗陸續運回澎湖養殖，搬運的緊迫使得魚苗有零星死亡，加上後來貝尼登吸蟲感染與箱網遷移的相互影響下而使得魚隻死亡率急速增加；本病例傳染途徑是否在台灣孵化期間感染抑或者種魚即帶原？尚不明，但此病原微生物廣泛存在於土壤、流動

水、半腐敗植物、海洋或堆肥中，魚隻也可能經由環境中自然感染。

十一、討論

(一) 奴卡氏菌在台灣養殖業之病史：

奴卡氏菌症是一種慢性疾病，目前已知在水產動物感染奴卡氏菌，具病原性的有：*N. asteroides*、*N. seriolae*、*N. salmonicida*、*N. crassostreae* (6)。

而 *N. seriolae* 在台灣全年度都有高發生率且無特定好發季節，可感染的宿主非常廣泛，感染對象包括哺乳動物、禽類、淡水魚類、海水魚類及貝類等，黃蠟鰻亦為易感染魚種之一 (13)。台灣最早於 1977 年即有奴卡氏菌感染塘虱魚及鱧魚的病例報告，但當時未鑑定其菌種名，1997 年於雲林縣養殖七星鱸發生慢性肉芽腫病變，經生化性狀試驗及 16S rDNA 定序後，第一次鑑定其菌種為 *N. seriolae* (13)。

文獻研究中以花身雞魚分離株來進行實驗，在腹腔內注射接種幼魚，於腹腔內接種魚隻肉眼病變可發現腹膜肉芽腫，接種魚隻則在心臟、肝臟、脾臟、腎臟和鰓等多處發現肉芽腫，此結果與花身雞魚自然感染之病例有相同的病變，經脾臟和腎臟可回收此菌，首次證實了在數個海水養殖魚塢 *N. seriolae* 可引起爆發性的疾病感染，研究的結果亦顯示出在台灣的養殖魚類奴卡氏菌的感染以 *N. seriolae* 最具病原性，這也是首次證明了花身雞魚、金錢魚、紅魚、黃蠟鰻、烏魚、金鐘和海水石斑感染 *N. seriolae* 的報告。其他相關實驗結果亦證實台灣養殖魚類奴卡氏菌的感染以 *N. seriolae* 最具病原性 (12)。

奴卡氏菌可感染多種海水魚類，而其最不利的因素為長期性潛伏感染；病魚於體表會出現鱗片脫落及深淺不一之潰瘍，奴卡氏菌不會引起敗血症或急性免疫反應，相反的，此菌會逐步入侵各類型宿主細胞上並於內臟實質組織形成多發性結節病變 (22)，當病魚於各器官出現無數大小不一的結節時，病況通常已進入中期或末期，組織器官會因此失去大部分的功能，雖然魚隻不會隨即死亡，但於水質不良、寄生蟲感染或緊迫發生時，導致罹病魚容易再遭受其他病害的二次感染，也對環境巨大變動之抵抗力減弱，因此容易發生長期潛伏、緩慢或突然大量死亡之情形 (22)。

黃臘鰺屬於鰺科 (*Carangidae*) 魚類，廣泛分布於印度-太平洋之暖水域。台灣主要養殖分部於南部、東部海域，幼魚主要棲息於近沿岸砂泥底質水域或砂泥底質的內灣，成魚則成群棲息於沿岸礁石底質水域。以生活於沙地之軟體動物或其它具硬殼之無脊椎動物為食，一般市面上所見皆為養殖魚(1)。澎湖目前陸上魚塢養殖約9成皆為石斑類魚種，而海上箱網養殖的鰺科魚類則以短鰭黃臘鰺為主其次為紅甘鰺，短鰭黃臘鰺為最大宗約47萬尾，每年放養量近50萬尾苗。每年收穫量約500公噸，每年收穫時間大多於下半年，約9月份陸續開始出售。早期研究指出，長鰭黃臘鰺在水溫14°C時，2天後就會凍斃，短鰭黃臘鰺則對低溫具有較高的耐受度。若有養殖魚類過冬經驗及備有越冬池（或池水深度夠深）與防風棚可減緩溫度驟降，對於黃臘鰺越冬必定有幫助，不過若面臨強烈寒流來襲時，還是會有死亡的可能，通常會提早出售以減少損失(4)。

(二) 病例簡述：

此次病例是將該場種魚的受精卵送至台南孵化後將吋苗陸續運回澎湖養殖，搬運的緊迫使得魚苗零星死亡，後期因貝尼登吸蟲感染加上箱網遷移的相互影響下而使得魚隻死亡率急速增加；此疾病傳染途徑尚不明（是否在台南孵化期間感染抑或者種魚即帶原？）業者為經常性送檢之養殖戶，其種魚至今健康狀況良好，未有送檢病例，故推測非由種魚帶原，而此病原微生物廣泛存在於土壤、流動水、半腐敗植物、海洋或堆肥中，魚隻也可能經由環境中自然感染，目前推測可能來源為食餌及育苗場，而環境也是可能的因素之一，但因本縣近4年內未有接獲魚隻感染奴卡氏菌的案例，故環境因素列於最後。在本病例中魚隻於飼養初期雖每日固定少量死亡約10尾，但，因未送檢且 *N. seriolae* 屬慢性疾病，推測應是搬運造成部分免疫力不佳的魚隻陸續死亡，而飼養後期魚隻受貝尼登吸蟲寄生，加上遷移箱網的事件而使疫情開始升溫在在合理推測後期死亡率大幅攀升與緊迫有關。

該場飼養管理人為何突然遷移魚隻？經瞭解後，得知飼主認為魚隻飼養於北面海上箱網易受寒害影響，其養殖狀況較南面箱網差，且每日魚隻死亡數逐日攀升遠高出以往，因而於12月10日將部份



黃蠟鰱移往較無風(寒)害之南面海上箱網養殖，以減少損失。然，其北面箱網飼養魚隻雖每日會有數十尾魚隻死亡，未有大量發病暴斃，卻因魚隻移動而造成緊迫發病，翌日開始大量死魚。所幸該批魚隻即早送檢，並初步判斷為奴卡氏菌，先行建議使用有效之抗生素投藥，於投藥後約 7~14 日疫情即逐漸獲得緩和。

一般研究顯示魚隻極可能是因傷口抑或由消化道攝入，經由血液循環造成菌血症，長時間感染而逐漸產生肉芽腫病變；可能的傳播原因推測：

1. 此菌可由餵飼幼魚食用未煮熟魚組織而感染（活的、生的或冷凍的），所以使用下雜魚品質應慎選或烹煮過。

2. 與受感染或發病魚一同飼養也是促成因素，文獻研究表示與發病魚飼養於同一空間 3 個月後雖然外部並無明顯症狀，但其脾臟已有白色斑點（22）。

3. 文獻研究顯示貝類能保有奴卡氏菌與分枝桿菌的遺傳物質，所以應重視病原體、環境與保菌者之間可能對魚群的影響（22）。

罹病魚在感染初期無症狀反應或僅出現輕微症狀，所以容易忽略而失去最佳的送檢及治療時期，嚴重時可見皮膚上產生單一或成對乾燥膿腫，每個皆包含大量菌體，此疾病的典型傷害可造成：魚體消瘦、皮膚結節（單一、多發、合併）、皮膚潰瘍、鰓部鰓絲基底呈不規則破壞、1~2 mm 黃白色肉芽腫在肝、脾、腎中最明顯，但可在任何臟器中發現；此白色斑點易與分枝桿菌、發光桿菌混淆，尤其是發生在混合感染時。其明顯的免疫反應於 melano-macrophage 中有黑色顆粒排列（22）。

細菌培養上，培養基可使用 Blood agar、BHIA 等 25~30°C，5~7 天培養，長出細小、黃白色、粗糙砂粒狀之菌落；長期培養菌量多時菌落呈皺摺隆起，如黴菌菌落；另有選擇性抗生素 agar 試管如 Lowenstein-Jensen (L-J) 斜面可使用，培養時間約 4~10 天，天數取決於培養溫度，生長的菌落呈黃白色凸起顆粒狀乾燥堆疊，此菌可耐多種常用抗生素。

(三) 奴卡氏菌快速診斷：

鑑定奴卡氏菌之方法包括生化性狀、抗生素敏感試驗及組織病理學檢查等，

1. 由於本菌生長較慢，因此生化性狀判讀通常必須 2 周以上，既費時又費力，且要藉由傳統生化性狀方法準確的鑑定細菌是困難的 (Conville et al., 2000) (25)。

2. 而**抗生素敏感試驗**結果的差異，或許有助於鑑定某些 *Nocardia* species，但至今尚未建立一套標準結果，所以仍有爭議性 (Conville et al., 2000 ; Roth et al., 2003) (25)。

3. **PCR 檢測**是目前應用在偵測魚類細菌性疾病，最常見的方法，不僅準確性高且能快速鑑定病原菌，若進一步基因序列定序，更可得知期間的差異 (Laurent et al., 1999 ; Miyoshi and Suzuki, 2003)。依細菌 16S rDNA 為高度保留性基因，應用 16S rDNA 做為鑑定菌種，分析菌種基因間之差異，已是非常普遍的方法 (25)。

(四) 澎湖箱網養殖：

目前台灣共有三處發展海上箱網養殖漁業，除了包括進行學術研究的小琉球大鵬灣區附近，還有澎湖外海及屏東楓港、枋寮外海一帶；澎湖西嶼鄉內從事箱網養殖業尤以內垵、竹灣為大宗，其中竹灣內海因為擁有廣闊海域、風平浪靜、水深適中、水流通暢，是一天然的優良養殖港灣，箱網養殖就屬澎湖養殖漁業的一種特色，是經由日本、挪威引進的技術，當初引進是因經過學術分析澎湖海域之自然環境、地理條件及漁業概況，認為此區擁有得天獨厚的條件，澎湖成了台灣的重要漁場 (16)。

而目前澎湖箱網存在的缺陷分為兩方面 (16)：

自然方面：

1. 夏秋之際，經常受颱風侵襲，加上澎湖本地的強風，形成強勁的海浪；使得海面上的箱網組織易受損；颱風所挾帶的豪雨與梅雨季帶來的大雨，使得海裡的懸浮微粒增多，造成水質惡化，令魚種罹患疾病的機率提高。
2. 近年來全球氣溫詭譎冬溫年年創新低，就連屬較溫暖的澎湖也難逃寒害的魔掌，使得魚隻於一夜間集體暴斃死亡。
3. 過度飼養或投餵餌料易造成內灣養殖污染嚴重問題

人為方面：

1. 雖箱網養殖為良好的養殖方式，但大多數業者仍存在著「成本過高」與「風險過大」的觀念
2. 且箱網養殖需要較高的經營技巧、專業人員技術、整合漁業的海上操作技巧、漁具設計能力、魚群行為的掌握以及可能虧損的承受力。

(五) 公共衛生：

人類奴卡氏菌症，奴卡氏菌在人類的感染中主要是經由吸入污染本菌的灰塵，或者傷口的創傷而接觸到土壤中的奴卡氏菌，因而感染奴卡氏菌症，以呼吸道感染為主，常見感染結果為肺臟、皮膚和皮下感染，但感染擴及全身時則會造成中樞神經的感染，其中以皮膚感染最為常見症狀為足菌腫（9.15）。

N. asteroides 和 *N. brasiliensis* 及 *N. otitidis-caviarum* 為 *Nocardia* 屬內最常致病的菌，又以星狀土壤絲菌 (*N. asteroides*) 是最常見的人類致病菌。其病程可由急性至慢性，肺部的感染通常是經由吸入性的途徑，常出現於器官移植、愛滋病、惡性腫瘤、膠原病等免疫不全的狀況、慢性阻塞性肺疾病、肺蛋白沉著症及嗜酒的病人。全身性散佈則是經由血路傳播，尤以腦膿瘍或腦膜炎最為常見。會引起人體肺部機緣性感染奴卡氏菌病和足菌腫。奴卡氏菌病是一種慢性化膿性感染病，發生於局部或形成全身性感染（15）。

全身性感染通常為淋巴瘤或經免疫抑制治療的併發症。若從血液擴展到腦膜或腦部則會造成腦部膿種。此病不會傳染，可由外科切除或引流，但是主要應治療潛在之病。胸部 X 光表現可由輕微的肺浸潤至大面積有開洞的腫塊，病灶數目可單一或多發，約一半病人會出現肋膜積液甚至膿胸（15）。

土壤絲菌病預後與感染的部位及病人的免疫狀況有關，單純的肺部感染治癒率在九成以上。若造成遠處的擴散感染，治癒率大為下降，合併腦膿瘍的死亡率約為百分之五十。磺胺類抗生素為首選治療藥物，一般用藥需三至六個月（15）。

(六) 預防與防治：

奴卡氏菌一旦感染魚體，對魚體的肝臟、腎臟等內臟器官損傷較大，治癒難度相當大，因此對於該病的控制還是要「預防為主，



防重於治」。

1. 本所於日常訪視時即鼓勵養殖戶定期送魚至所內做健康檢查，以利及早發現，並預防性治療。
2. 應選擇健康的苗種，放養時對損傷、擦傷和已有病症的魚種一定要選出。
3. 放養密度要合理，不宜過大。
4. 儘量投餵新鮮天然餌料和優質的配方飼料，定期添加維生素，氣溫變化大時應適量減料，一般建議攝餌量的 60~70%；若發生疾病要及時調整飼料，降低飼料中的脂肪含量，適當提高蛋白質比例，加大維生素 C 的使用量，保持飼料的新鮮度，增強餌料的誘食性和適口性等 (14)。
5. 定時巡視漁塭，留意觀察魚群活力、攝食情況，及時撈出殘餌和病死魚，並請業者可定期將新鮮死魚送檢以早發現病原及早治療。
6. 環境突變時須注意預防水質、底質的惡化，可定期用生石灰調節水質。(☆僅限魚塭養殖適用, 箱網不適用)
7. 平時應該加強消毒措施，可使用 BKC 進行養殖水體消毒。(僅限魚塭養殖適用, 箱網不適用)
8. 藥物防治方面，目前尚無針對奴卡氏菌的特效抗菌藥物。可用 Doxycycline、Sulfamethoxazole 或用 Rifampicin 等抗生素治療，應依藥敏試驗結果建議用藥。
9. 奴卡氏菌會長久存活於土壤中，清池需徹底，長期曝曬翻整底泥，並撒佈生石灰或漂白粉消毒 (僅限魚塭養殖適用, 箱網不適用)
10. 投予藥物僅可以殺滅血液或體液中游離之細菌無法殺滅結節內部躲藏的細菌，且病魚復原後結節仍存在無法消除，故病魚建議淘汰，用藥以預防為重，針對未發病之魚群做治療。

因多種水產性疾病為人畜共通，於檢診過程除了該注重各項生物安全防護工作，且於適當時機可輔導飼養管理人注意個人衛生防護，以避免遭受感染。於治療方面，奴卡氏菌感染症發生後，可依照藥物敏感性試驗結果，於飼料中添加適量的水產動物用藥品使用規範裡核准有效抗生素來口服治療，一般現場常用的抗生素為



Doxycycline，持續投藥給予 7~14 天後，通常可見死亡情況明顯改善。

本病常見復發病例，除了細菌特性與環境潛伏外可能也與養殖業者未確實投藥，包括投藥劑量不足及投藥天數未達療程有關。*N. seriolae* 對水產動物用藥品使用規範中所核准的抗革蘭氏陽性菌抗生素皆具有感受性，但在臨床上使用時，停藥後常會有疾病復發之情形，顯示若未改善環境水質，單靠投予抗生素的治療效果有限(6)。

本所建議水產業者可多使用含碘類消毒水定期做魚塢消毒，並定期送檢魚到所裡做健檢而於疫情發生初期，也會建議業者先使用含碘類消毒水，以避免疫情擴散或二次性細菌感染，大部分病例會待藥物敏感性試驗結果出來依結果再建議業者適當藥物。

十二、致謝

本報告承蒙國立屏東科技大學陳石柱老師實驗室、國立台灣大學獸醫學系邱慧英博士、行政院農業委員會家畜衛生試驗所涂堅組長、黃子鳴博士、涂央昌獸醫師提供諸多寶貴意見與協助，僅此感謝。

十三、參考文獻：

1. 台灣魚類資料庫 <http://fishdb.sinica.edu.tw/>。
2. 水生動物疾病行動診斷輔助系統<http://m6.nvri.gov.tw/>。
3. 陳縱宇、張本恒。愛德華氏病（鰻魚肝腎病）。水生動物疾病診斷輔助系統。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。
4. 陳榮華。台灣鯛之飼養與管理。水產動物生產醫學教育訓練專輯(七)，2012。
5. 趙嘉本。金目鱸繁殖及疾病介紹，水產動物生產醫學教育訓練專輯(六)，2012。
6. 陳旭德。海水魚奴卡氏菌之鑑定、病原性及快速診斷方法之研究，2006。
7. 沈等、Lin&Shao。台灣漁類誌，1999。
8. 行政院農業委員會水產試驗所全球資訊網
<http://www.tfrin.gov.tw/ct.aspxItem=265558&ctNode=1310&mp=2>
9. 高維隆。養殖魚類奴卡氏菌之鑑定及抗菌劑感受性試驗，2007。
10. 施義哲、邱文彥。澎湖箱網養殖的環境衝擊及發展之評估，2009。
<http://aqua.nvri.gov.tw/disSheet.aspxid=XOp%2byZJSIdk%3d>
11. 徐榮彬等。赤鰭笛鯛奴卡氏菌症。九十二年組織病理研討會專輯。中華民國獸醫病理學會。118-121。2003。



12. 賴金鞠。條紋鱸魚奴卡氏菌感染症。水生動物疾病診斷輔助系統。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。
13. 鄧晶瑩等。星雞魚奴卡氏菌感染症。一百年組織病理研討會專輯。中華民國獸醫病理學會。83-87。2011。
14. 魚類諾卡氏菌病的防治技術。
<http://www.59baike.com/index.phpdoc-view-2902>
15. 陳正昱等。肺土壤絲菌病。臨床醫學。52: 392-6。2003。
16. 王佳玲。探討澎湖箱網養殖之現況與發展。5-6。2009。
<http://www.shs.edu.tw/works/essay/2009/11/2009111509043446.pdf>
17. SHIMAHARA Yoshiko et al. Growth characteristics and morphological changes of fish pathogen *Nocardia seriolae* in submerged culture : *Aquaculture Sci.*58 (3) ,429-431,2010.
18. Wang Pei-Chi ,Ming-An Tsai,Yu Chi Liang et al.*Nocardia seriolae*, a causative agent of systematic granuloma in spottedbutterfish,Scatophagus,Linn : Vol.8 (38) ,pp.3441-3452,17 September,2014.
19. Shimahara Yoshiko ,Yun-Fen Huang et al. Immune response of largemouth bass, *Micropterus salmoides*,to whole cells of different *Nocardia seriolae* strains : *Fish Sci* 76:489-494. 2010 .
20. Wang P-C, S-D Chen et al. *Nocardia seriolae* infection in the three striped tigerfish, *Terapon jarbua* (Forsska^o 1) : *Journal of Fish Diseases* 2009, 32, 301-310.
21. Wang G-L, S-P Yuan and S Jin. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson) : *Journal of Fish Diseases* 2005, 28, 339-345.
22. Takuji Kudo, I* Kishio Hatai et al. *Nocardia seriolae* sp. nov. Causing Nocardiosis of Cultured Fish : *Journal of Systematic Bacteriology*, 173-178 . 1988.
23. Meyer and Bullock, Padros et al. *Edwardsiella tarda* infection in Korean catfish, *Silurus asotus*, in a Korean fish farm, 2006.
24. Mohanty B.R., Sahoo P.K. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.* 32(7), 1331-1344, 2007.
25. Mark Sheppard, Sakana Veterinary Services Ltd., *Nocardia seriolae* - A Chronic Problem , 2006.
26. Conville PS, Fischer SH, Cartwright CP, Witebsky FG. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 38: 158-164, 2000.
27. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 37: 99-102, 1999.



圖 1. 雙眼角膜輕微混濁微凸、魚隻消瘦、部分體軀彎曲變形。



圖 2. 靠近鰓弓處可見乳白色結節突出。



圖 3. 咽喉部可見大小不一結節。



圖 4. 病魚脾臟、腸管暴露於肛門外且脾臟呈現多發白色結節。



圖 5. 頭腎腫大可見瀰漫性黃白色粟粒狀結節。



圖 6. 肌肉內有乳白色結節。



圖 7. 腎臟腫脹且可見多發局部黃白色粟粒狀結節。



圖 8. 脾臟腫脹且散佈黃白色粟粒狀結節。



圖 9. 脊髓可見乳白色乾酪樣物質。



圖 10. 腦部可見粗糙表面。



圖 11. 以淡水洗落的貝尼登吸蟲 (*Benedenia*)。

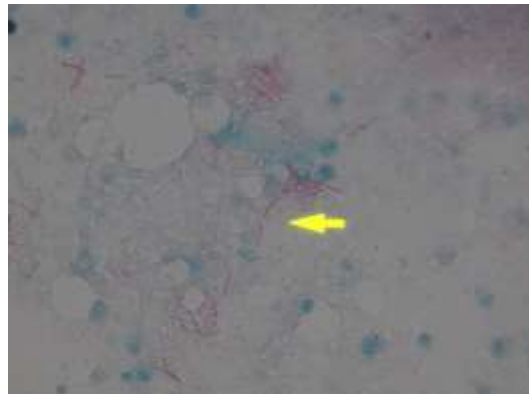


圖 12. 肌肉結節抹片，可見大量呈粉紅色細絲狀菌體，抗酸染色。(1000X)



圖 13. 腎臟結節抹片，可見大量呈粉紅色細絲狀菌體，抗酸染色。(1000X)



圖 14. 在血液培養基上培養 6 天可見多量黃白色隆起砂粒狀菌落。



圖 15. 在 L-J 培養基上培養 6 天可見黃白色突起皺褶粒狀菌落。

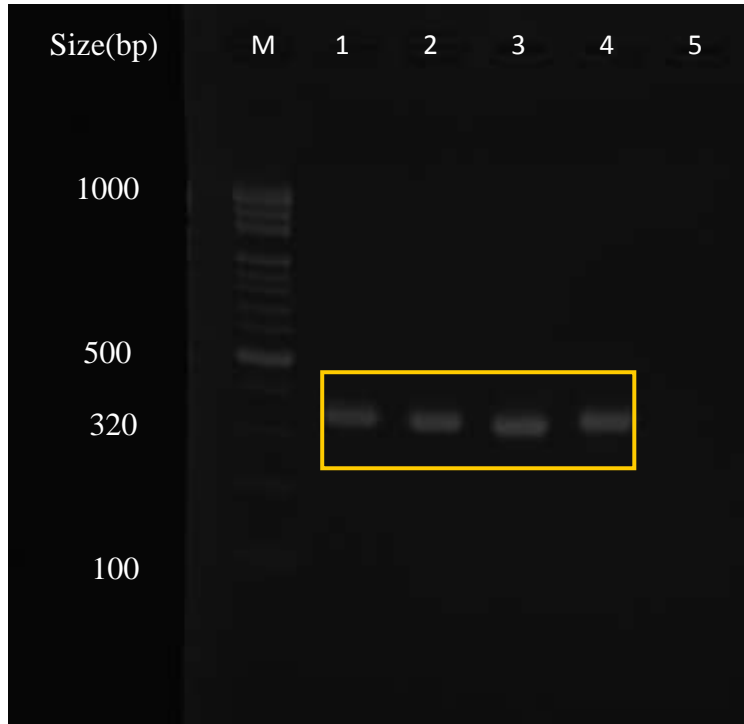


圖 16. 16S rDNA 之聚合酶連鎖反應之電泳圖。Lane M 為 marker，Lane 1 為陽性對照組（320 bp），Lane 2、3、4 為感染奴卡氏菌病例分離株，Lane 5 為陰性對照組。

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain YJ-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F834069.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain NH-2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F834067.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain ZJ0503 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	96%	1e-14	99%	U595589.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: MS00019	521	521	96%	1e-14	99%	G255702.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NUF27	521	521	96%	1e-14	99%	G255701.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 5850	521	521	96%	1e-14	99%	G255700.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: KNI205	521	521	96%	1e-14	99%	G255689.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: OTTS	521	521	96%	1e-14	99%	G255688.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain H031016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F846841.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain NA114K 16S ribosomal RNA, partial sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F380938.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae 16S ribosomal RNA, complete sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F380937.1
<input type="checkbox"/> Nocardia sp. 98-37268A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F421563.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F017474.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain NA117 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F254421.1
<input type="checkbox"/> Nocardia seriolae strain NA118 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	521	521	96%	1e-14	99%	F254420.1

圖 17. 黃臘鱒奴卡氏菌分離株 16S rDNA 序列的 BLAST 比對相似度。

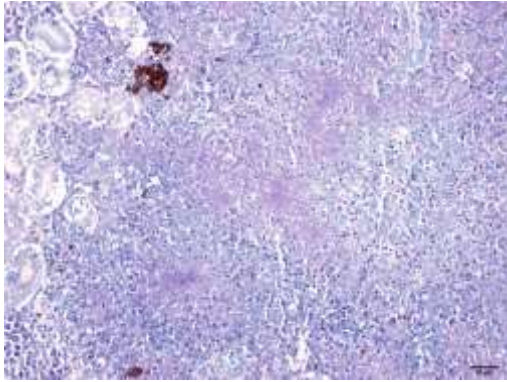


圖 18. 腎臟抗酸染色，病灶區可見多量弱抗酸絲狀菌。(200X)

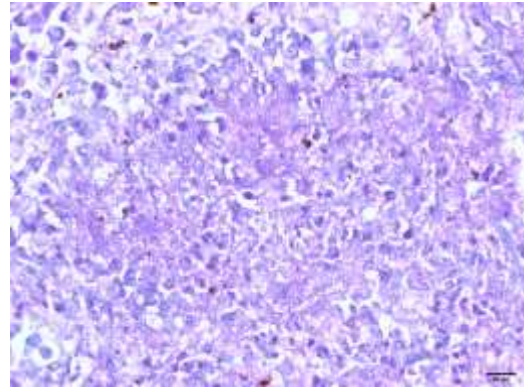


圖 19. 肝臟抗酸染色，病灶區可見大量弱抗酸絲狀長桿菌。(1000X)

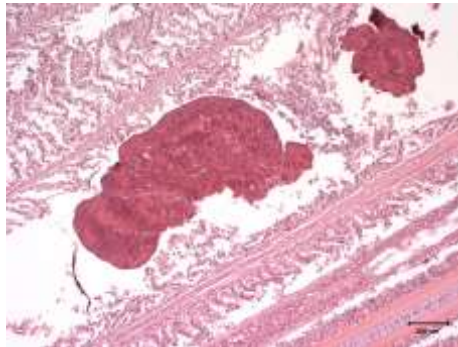


圖 20. 鰓絲之間可見 2 個細菌團塊，H&E (400X)。

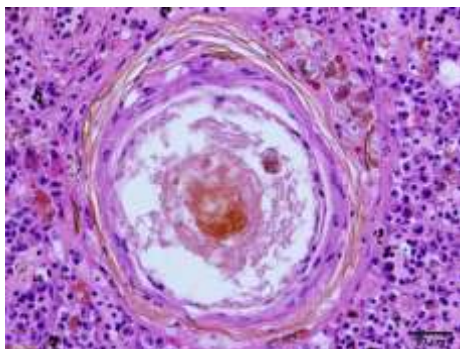


圖 21. 脾臟內的肉芽腫，可見中央壞死碎片，外圍則由巨噬細胞與結締組織包被，H&E。(1000X)

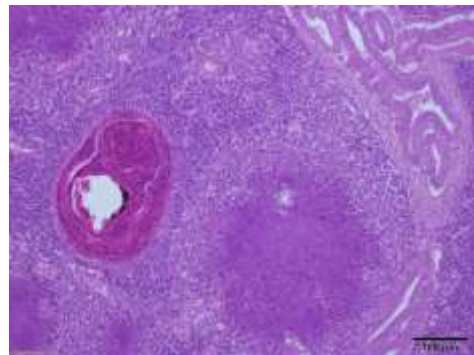


圖 22. 腎臟內可見不同程度的肉芽腫與炎症反應，H&E。(400X)

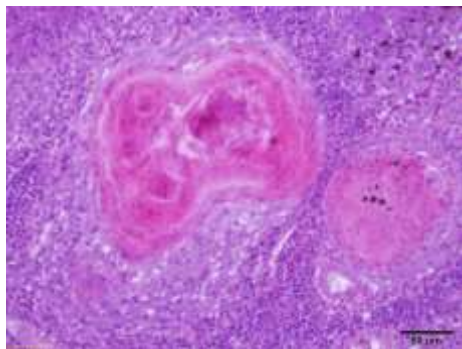


圖 23. 腎臟，可見肉芽腫中還包覆另一個肉芽腫，可見菌絲於其中 H&E。(1000X)

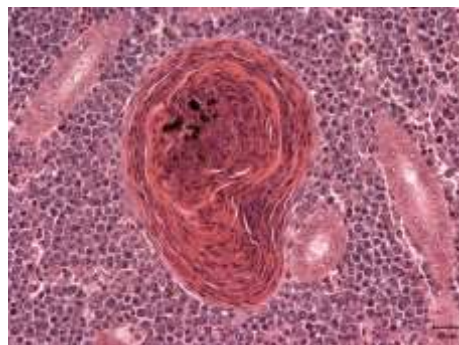


圖 24. 腎臟，壞死性肉芽腫性結節，因病程時間長，可見巨噬細胞擠壓變形包圍壞死中心形成同心圓結構，H&E。(1000X)

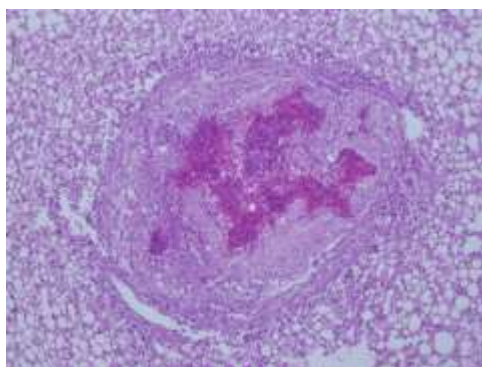


圖 25. 肝臟，可見肝細胞脂肪變性與菌絲於肉芽腫內，H&E。(1000X)



圖 26. 脾臟，可見肉芽腫內成乾酪樣壞死灶，多層炎症細胞包被，H&E。(1000X)

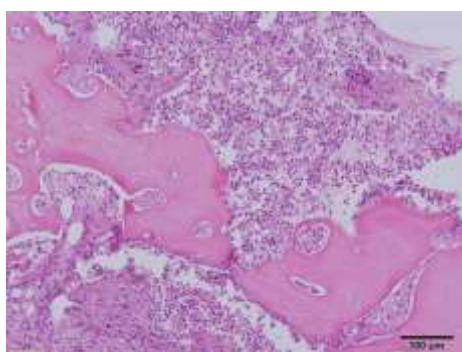


圖 27. 脊柱，可見因兩側大量炎症細胞擠壓造成骨頭彎曲凹陷，H&E。(400X)

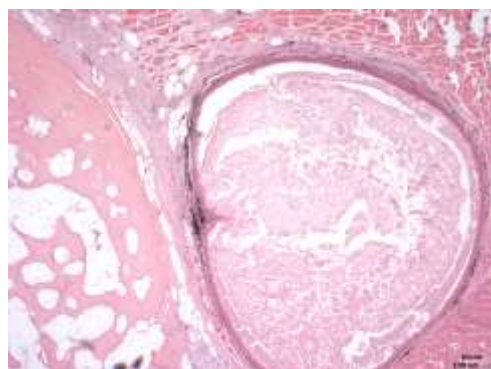


圖 28. 肌肉，肉芽腫外圍有炎症細胞包被，可見色素細胞聚集，H&E。(400X)

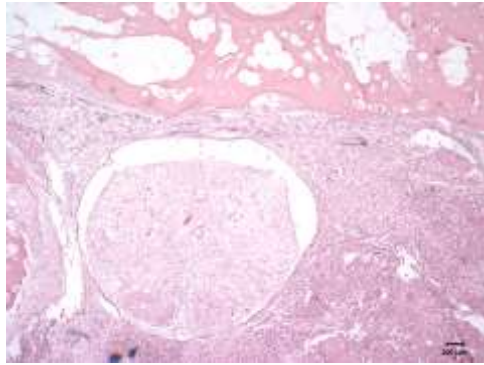


圖 29. 脊髓，可見包覆的脊柱已溶解且炎症細胞增加甚至有纖維化現象，H&E。(200X)

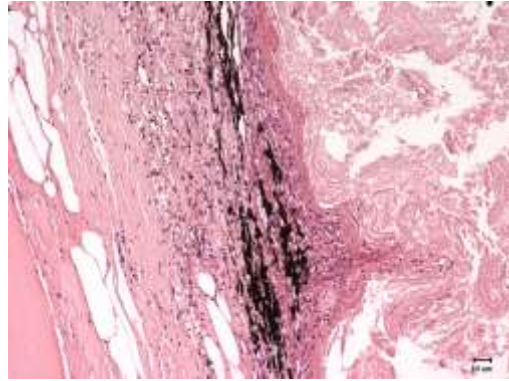


圖 30. 脊柱與肌肉間，可見骨膜增生，肌肉溶解壞死，由巨噬細胞與結締組織包圍壞死灶，色素細胞明顯增加，H&E。(200X)

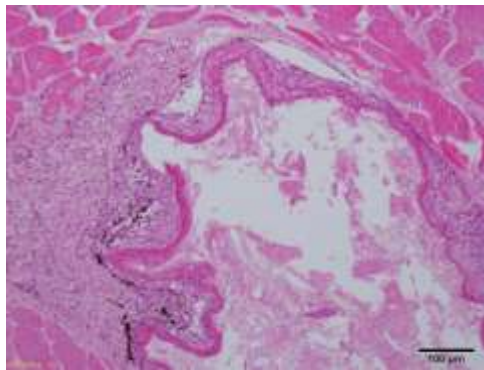


圖 31. 肌肉，可見此肉芽腫包被一層厚厚的炎症細胞，兩側可見其他肉芽腫形成與漿細胞浸潤，H&E。(200X)

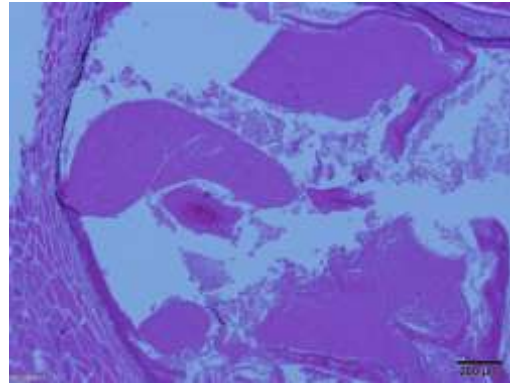


圖 32. 肌肉，可見大膿瘍中有大量細胞壞死碎片，外圍有被膜包被，H&E。(200X)

表一. 奴卡氏菌藥物敏感性試驗結果

藥物名稱	有效直徑 (mm)	試驗直徑 (mm)
Amoxicillin	18	0
Doxycycline	16	34
Erythromycine	23	26
Sulfamethoxazole	18	30
Oxytetracycline	26	28



行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHRI