

農發會魚病研究專集(五)

農發會漁業特刊第九號

CAPD Fisheries Series No.9

魚病研究專集(五)

Reports on Fish Disease Research (V)



行政院農業發展委員會編印

中華民國七十二年一月

目 錄

Contents

	Page
臺灣地區魚病研究之回顧.....林敏雄、陳秀男、郭光雄 A Review of Literature on the Studies of Fish Diseases in Taiwan..... Min-Hsiung Lin, Shiu-Nan Chen and Guang-Hsiung Kou	1
幾種水產藥品及化學物對吳郭魚之毒性及病理研究.....簡肇衡、李福銓、余廷基 Toxicological Studies of Some Drugs in Sarotherodon.....Chou-Heng Chien, Fu-Chuan Lee and Ting-Chi Yu	10
Study on Serotypes of <i>Vibrio anguillarum</i> Isolated from Cultured Fishes in TaiwanChyuan-Ying Chang and Guang-Hsiung Kou	22
感染潰瘍病細菌 <i>Edwardsiella tarda</i> 之 ϕ ET-1 噬菌體之生物性質研究吳金洌、趙偉真、劉國鈞 Biological Properties of the Bacteriophage ϕ ET-1 which Infect <i>Edwardsiella</i> <i>tarda</i>Jen-Leih Wu, Wei-Jen Chao and Kuo-Chun Liu	31
Iodophor 應用於鰻魚病原菌消毒試驗劉朝鑫、馮安東 Disinfection Study of Iodophor on the Pathogenic Bacteria of Eels..... Chaw-King Liu and Antonio A. Fong	41
化學治療劑對於虱目魚紅斑病之藥浴效果.....林清龍、丁雲源 Effect of Chemotherapeutic Agents by Medicated Bath on the Red Spot Disease (Vibriosis) of Milkfish (<i>Chanos chanos</i>).....Ching-Long and Yun-Yuan Ting	51
虹鱖鰓部斑點之病例.....簡秋源 An Enzootic of Gill Spot Disease in Rainbow Trout.....Chiu-Yuan Chien	62
自羅鐮微病之養殖日本鰻魚所觀察到之病毒.....劉國鈞、麥麗敏、簡肇衡 Viral Particles in the Branchiomyces Infected Gill Tissue of Cultured Eels (<i>Anguilla japonica</i>).....Kuo-Chun Liu, Lee-Min Mai and Chau-Hing Chien	65
簡報 Notes	
潰瘍病鰻魚所分離之 <i>Edwardsiella ictaluri</i> 菌.....鍾虎雲、郭光雄 <i>Edwardsiella ictaluri</i> Isolated from Cultured Eel in Taiwan.....Hun-Yun Chung and Guang-Hsiung Kou	69

臺灣地區魚病研究之回顧

A Review of Literature on the Studies of Fish Disease in Taiwan

林敏雄¹·陳秀男²·郭光雄²

Min-Hsiung Lin¹, Shiu-Nan Chen² and Guang-Hsiung Kou²

Abstract

The present papers aims to review the studies on fish disease in Taiwan. Furthermore, research works should be undertaken in this country within the next few years are also discussed.

1. 前 言

隨著水產養殖技術的發展，高密度以及企業化的養殖方式逐漸普及，養殖魚類受到病原體侵襲的機會增加，一旦發生病害，每每造成養殖魚戶重大之損失。本省魚病研究之歷史為時並不長。民國六十二年開始，由國科會及農發會開始資助各大學及水產試驗所，從事一連串之魚病調查、防治及基礎研究工作，對本省常發生或易引起重大損失之重要魚蝦貝類疾病進行深入的探討，並尋求其預防及治療的方法。經過幾年來之努力，已逐漸建立本省魚病之基礎資料，並且在某一些研究領域上，依其成就而言已漸居世界之領先地位。十餘年來之魚病研究報告有八十篇之多，而以鰻魚為主，以細菌性疾病為重。茲就病因及疫病學之觀點，針對過去臺灣魚病之各項研究加以整理，簡述於下列各節，以供今後魚病研究者之參考。

2. 內 容

(一)細菌性疾病之研究：

1967年安⁽¹⁾調查臺灣之罹病(赤)鰻病鰻魚之病因，認為是由 *Aeromonas punctata* 及 *Paracolobactrum anguillimortiferum* 感染所引起，並且由實驗證實於飼料中添加適量的 Sulfaguanidine 或 Chloromycetin 可達到預防的效果。郭(1972)⁽²⁾ 利用 *Aeromonas* 菌接種於實驗魚，發現此病原體經數次通過魚體後，其病原性可由弱轉強，其原因可能與細菌內毒素之產生有關。

鍾及郭(1973, 1974a, 1974b)^(3,4) 提出有關本省養殖鰻，體內外細菌相分析之報告，指出由病鰻或外觀健康鰻體內外皆可分離出 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Achromobacter-Alcaligenes* 及 unidentified gram-negative rods 等6種細菌，不拘病鰻或外觀健康之鰻，皆以 *Aeromonas* 之出現率為最高，推論 *Aeromonas* 比較容易侵入魚體內。另，鰓、腸內、內臟(肝、腎)及池水之細菌相皆同一組成，推測細菌侵入魚體之門戶，除了皮膚之破損處或寄生蟲寄生之部位外，最主要之侵入門戶還是在鰓及腸，且魚體內之細菌相受外圍環境水域之細菌相所支配。*Aeromonas* 等6

1. 國家科學委員會生物科學發展處

Department of Life Science, National Science Council, Republic of China.

2. 國立臺灣大學動物系

Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China.

組羣中, *Flavobacterium*, *Achromobacter-Alcaligenes* 及 *unidentified gram-negative rods* 不具病原性。

陳與郭(1981)⁽¹¹⁾ 檢討養鰻池細菌分布之情況, 指出 *Edwardsiella* 和 *Aeromonas* 之生態分布不同, 前者時常存於池中及健康鰻魚體內, 而後者則為池中及鰻體內之常有細菌。自郭等(1976)⁽¹²⁾ 分離出鰻潰瘍病 (*edwardsiellosis*) 之病原菌, *Edwardsiella anguillimortifera* (*E. tarda*) 後, 劉與蔡(1980)⁽¹³⁾, 自屏東地區罹患潰瘍病之鰻魚分離出31株 *E. anguillimortifera*, 就其對常用水產藥物之抗藥性加以檢討, 發現本菌對磺胺劑及四環黴素均具有抗藥性, 指出此可能與濫施藥物有關, 因最常使用之藥物為磺胺劑, 四黴素、氯黴素及呋喃劑(林及蕭, 1977)⁽¹⁴⁾。另, 陳及郭(1978)⁽¹⁵⁾ 指出本省養鰻池中以。磺胺劑 (*Su*, *sulfamonomethoxine*) 菌出現率最高, 抗四環黴素 (*Tc*) 菌與抗氯黴素 (*Cm*) 菌次之, 抗呋喃劑 (*Nf*, *P-7138*) 菌最少, 而抗 *Su* 菌中有45%為 *R⁺* 菌株為最多, 抗 *Nf* 菌僅2%為 *R⁺* 菌為最少。郭與鍾(1978)⁽¹⁶⁾ 再次檢討養鰻池中, 具有 *R⁺* 因子抗藥菌之出現情況, 發現102株抗藥菌中仍以抗磺胺菌之23.4%之出現率為最高, 而以抗 *Nf* 菌之2.9%為最低。徐與郭(1977)⁽¹⁷⁾ 由罹患爛鰓及爛尾之病鰻, 分離出一種當時認為是黏液性細菌 (*Myxobacteria*), *Flexibacter columnaris* (*Chondrococcus columnaris*) 之細菌, 確定其為病原菌, 同時指由病鰻之內臟無法分離到本菌, 不過可由組織切片觀察到本菌的存在。郭等(1978)⁽¹⁸⁾ 由爛鰓、腫鰓及爛尾之病魚(包括鰻、香魚、金魚及吳郭魚)採得滑動性細菌 (*gliding bacteria*) 125株, 其中68株被鑑定為 *Flexibacter columnaris*, 其餘之57株被鑑定為 *Flexibacter* spp., 而無法確定種別, 更正徐與郭之 *myxobacteria* 為 *gliding bacteria*, 同時檢討影響病原性試驗之因子, 指出在止水水中病性菌株之出現率較流水中為高, 菌浴法較腹腔接種法易使鰻魚感染本菌。柳等(1982)⁽¹⁹⁾ 再次檢討流水式, 止水式及打氣式水槽影響鰻對本菌之感受性, 指出經本菌浸浴後之鰻, 蓄養24小時內之死亡率仍以流水式水槽為最低, 打氣式居次, 而止水式最高, 推測此可能跟溶氧與溶氮有關。

蕭及陳(1977)⁽²⁰⁾ 調查臺灣地區之生蛙、淡水長腳大蝦及淡水養殖魚類之病害, 而發現牛蛙、鱸魚、草魚、香魚及鯉魚皆受 *Aeromonas hydrophila* 之侵襲, 而 *Pseudomonas aeruginosa* 感染淡水長腳大蝦及草魚, *E. tarda* (*E. anguillimortifera*) 感染塘虱魚及鰻魚, 香魚及鱧魚分別受 *Vibrio anguillarum* 及 *Norardia* sp. 感染, 而這些疾病及病原體大都在1~4月中出現。劉(1977)⁽²¹⁾ 調查臺灣之泥鰍疾病, 認為臺灣之養殖泥鰍易受 *Flexibacter columnaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* 及 *Edwardsiella anguillimortifera* 等細菌之感染, 並出現明顯之病徵。另, 1977年春季郭及郭(1978)⁽²²⁾ 發現臺灣各地養殖鰻魚, 罹患赤點病而大量死亡之病原為 *Pseudomonas anguilliseptica*。

Vibrio anguillarum 為淡水及鹹水養殖魚之重要病原菌之一。本省每年於越冬期, 虱目魚受本菌感染發生紅斑病而死亡者約15%以上(陳及劉; 沈及江, 1972)^(23,24)。黃(1977)⁽²⁵⁾ 從頻臨死亡之越冬魚苗分離出 *Vibrio anguillarum*, 而確認其為虱目魚紅斑病之病原菌。另, 郭等(1976)⁽²⁶⁾ 由淡水養殖香魚的病魚分離出一種具廣鹽性之病原菌, *V. anguillarum*。又, 楊等(1978)⁽²⁷⁾ 由新竹地區養殖的文蛤分離出一種不同種別之 *Vibrio*, *V. parahaemolyticus*。

(二) 免疫學研究

利用免疫法來預防病原體的感染, 是衆所周知的事, 而在人類醫學上相當普遍。我國目前魚類免疫學之研究, 以瞭解鰻之免疫系統及對 *E. anguillimortifera* (*E. tarda*) 疫苗, 利用侵泡法免疫鰻魚之效果及其機制之探討為主。宋等(1976)⁽²⁸⁾ 利用皮下注射方法, 接種經處理之 *A. hydrophila* 抗原(弱毒活性活菌、福馬林死菌、加熱死菌及聲波萃取物)之鰻魚, 皆產生有效抗體, 而以弱毒性活菌之效果較高。指出 *E. anguillimortifera* 之加熱死菌及福馬林死菌抗原, 由腹腔接種, 免疫鰻魚可產相當高之抗體, 同時發現 *A. hydrophila* 與 *E. anguillimortifera* 有部分抗原決定基團 (*Antigenic determinants*) 相同, 且此相同部分對 *E. anguillimortifera* 之抗體產生量有加強作用。宋及郭(1977, 1980)^(29,30)。

Song 及 Kou (1979)⁽³⁷⁾ 發現細胞性免疫機制在鰻魚之免疫系統中佔很重要的地位，指出經 *E. anguillimortifera* 抗原處理之鰻魚，其白血球之 phagocytosis 有增強之現象。宋等 (1982)⁽³⁸⁾ 針對 *E. anguillimortifera* 疫苗，測定及評價利用浸泡法免疫鰻魚之效果，認為疫苗濃度每毫升 10^8 細胞之效果良好，浸泡 3 分鐘就有免疫效果，且浸泡一次即有效果，而以三次之效果最佳，同時指出體重 6 克以上之鰻魚浸泡疫苗始有免疫反應。宋等 (1980)⁽³⁹⁾ 與林等 (1982)⁽⁴⁰⁾ 對美國出產之 *Vibrio anguillarum* 疫苗，HIVAX，進行對虱目魚罹患赤斑病之預防效果試驗，結果顯示體重 0.3 克以上之虱目魚經 20 秒浸泡於這種疫苗中，則一星期後即可產生免疫反應，而這種免疫力可維持 5 個月。而且 HIVAX 疫苗對虱目魚是安全而無毒性的。由上述之實驗結果可證實利用疫苗來預防鰻魚罹患赤斑病與肝腎病（潰瘍病）或虱目魚罹患紅斑病是可行的。

鍾與郭 (1979)⁽⁴¹⁾ 為瞭解病原菌侵入魚體後，負責吞食細菌之各種白血球變動的情形，將鰻魚赤斑病之病原菌 *A. hydrophila* 經由動脈球 (arteriosus bulbus) 接種入鰻魚血液中，發現血液中且噬菌作用之中性球 (Neutrocyte) 在白血球中所佔之比例，隨時間之增長而增加，但淋巴球 (lymphocyte) 之出現率呈降低之現象，而單核球 (monocyte) 之出現率則呈不規則之變化。郭及郭 (1977)⁽⁴²⁾ 指出利用經 FITC 標識之抗 *E. anguillimortifera* 血清，可迅速地鑑定出 *E. anguillimortifera* 菌，且此種螢光抗體具特異性。郭等 (1977)⁽⁴³⁾ 利用同樣的螢光抗體法檢查凹凸病之幼鰻，而能成功地將肌肉中存在之 *Plistophora anguillarum* 孢子或孢子囊體 (cyst) 染上螢光，且具有特異性。陳及郭 (1982)⁽⁴⁴⁾ 曾利用免疫電泳法以判別同科或非同科之魚類細胞株。

(三) 寄生性水黴菌之研究

本省在冬季寒流來襲，水溫驟降時養殖魚類極易感染水黴菌，而造成重大的損失。鍾 (1973)⁽⁴⁵⁾ 及簡 (1979)⁽⁴⁶⁾ 之報告顯示本省養殖鰻之水黴菌，主要是 *Saprolegnia* spp. 所引起的。郭及郭 (1980)⁽⁴⁷⁾ 探討 *Saprolegnia ferax* 對鰻線感染之各種可能性，認為水黴菌無法感染健康之鰻魚，但對於皮膚受傷或接種 *E. anguillimortifera* 或浸 *F. columnaris* 菌液之魚體，則極易感染。簡及簡 (1980)⁽⁴⁸⁾ 分析養殖鰻魚之真菌性肉芽腫症之病理組織，發現胃、脾之病變組織以及新生微血管中有菌絲之存在，而推定菌絲是由消化道侵入魚體。簡 (1980)⁽⁴⁹⁾ 自虹鱖之患部分離出 *Saprolegnia diclina* 及 *Aphanomyces laevis* 兩種黴菌，另由虹鱖之死卵上分離出 *Pythium deharyanum*。簡 (1976)⁽⁵⁰⁾ 自養殖之淡水蝦分離出 *Saprolegnia* 黴菌。劉 (1978)⁽⁵¹⁾ 對感染 *Branchiomyces* sp. 之鰻魚的鰓進行組織病理觀察，而發現鰓組織有嚴重的壞死現象，且鰓簿板亦有排列零亂之情形。簡等 (1978)⁽⁵²⁾ 對罹患 Branchiomycosis 之鰻魚做了相同的觀察，而認為此黴菌可由鰓之病灶侵入，並轉移到心臟與脾臟外膜之細動脈，而引起血管之栓塞。

魚類組織病理之研究

鍾等 (1976)⁽⁵³⁾ 發現錦鯉罹患上皮瘤 (Spontaneous epithelioma) 之病例，指出其與哺乳類及其他脊椎動物之上皮瘤，在組織病理學上頗為相似。赤田等 (1977)⁽⁵⁴⁾ 觀察幼鰻罹患凹凸病之組織病理變化，而將之區分為三個變化期，從而推斷其感染途徑，指出病原蟲 *Plistophora* 可能經由鰓直接進入鰻體內。徐與張 (1977)⁽⁵⁵⁾ 研究鰻魚孢子蟲白點病之病理，而發現病魚皮膚表皮下寄生許多黏液孢子蟲之囊胞，病灶上之多層扁平上皮細胞呈各種不同程度之退化與慢性炎細胞之浸潤。劉 (1978)⁽⁵⁶⁾ 收集各種具鰓部病變之鰻魚（包括腐鰓病、黏液細菌性鰓病、黴菌性鰓病、黏孢子蟲性爛鰓病、車輪蟲症及指環蟲症），研討其肉眼及組織病理學變化以爲診斷之憑據，其中由 *Branchiomyces* sp. 引起之黴菌性爛鰓病係臺灣首次之報告例。劉等 (1982)⁽⁵⁷⁾ 就正常日本鰻 (*Anguilla anguilla*) 之皮膚、心臟、食道、胃、小腸、肝臟、膽囊、胰臟、脾臟、鰓、鰾、氣腺及腎臟等十三種器官做組織學之觀察，並提出詳細之描述報告。

有關魚類腫瘤之病理研究，簡述如下，徐及張 (1977)⁽⁴⁴⁾ 提出鱖橫紋肌瘤之病理報告，而指出肌纖維周圍無肉膜 (sarcolemma) 或結締組織之增生，亦無炎症細胞之浸潤。簡及余 (1980)⁽⁴⁵⁾ 於鹿港地區獲得罹患腫瘤之福壽魚，經病理學觀察診斷為胸腺淋巴瘤。簡及余 (1982)⁽⁴⁶⁾ 發現金魚罹患有柄乳狀突上皮腫瘤之病例，指出腫瘤之基質為基底細胞、纖維組織、微血管、黏液細胞及變形骨質等所構成。簡 (1982)⁽⁴⁷⁾ 收集到左眼罹患腫瘤之白鰻，經由病理觀察而鑑定此腫瘤為惡性上皮性腫瘤，是由上皮細胞之增生所造成的。劉及簡 (1982)⁽⁴⁸⁾ 描述患鰓腎炎病鰻的腎小管上皮細胞內玻璃體之超微結構，指出玻璃狀小球外覆被膜，內含不明之物質，其形態可分兩類小球，第一類具顆粒狀內含物，第二類具多重膜狀內含物。徐等 (1977)⁽⁴⁹⁾ 檢查發生慢性肉芽腫性疾病的鰻魚，發現其為受 *Nocardia* 之感染而引起的。本病之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。

(四) 水產寄生蟲學研究

使用藥物以防治養殖魚類病害的發生，是目前病害防治的各種方法中，最為有效及切合實際的方法之一，因之藥理學之研究自有其重要性。劉及王 (1978)⁽⁵⁰⁾ 曾就六種常用之水產藥物包括 Chloramphenicol, Chlorotetracycline hydrochloride, Spectinomycin, Neomycin sulfate, Nifurpirinol 及 Nitrofurazone，檢討其鰻之急性及慢性毒性，並找出其使用之安全濃度及期間。李及郭 (1978)⁽⁵¹⁾ 研究經 Sodium Sulfamonomethoxine 藥浴後，鰻體內吸收之情形，而證實此藥物可於鰻體內存在四天，若增加水中 NaCl 之量，鰻魚對 Sodium Sulfamonomethoxine 之吸收則會增強。廖等 (1978)⁽⁵²⁾ 進行 Panfuran-S 對虱目魚苗毒性之實驗，求出 TL₅₀ 為 6.4 ppm，以 0.4 ppm 藥浴 4 小時，對這些魚苗而言，毒性並不大。劉 (1980)⁽⁵³⁾ 進行硫酸新黴素在鰻魚體內之吸收與排泄的研究，而發現此藥物經口投藥後，停藥期應為 5 天。陳及張 (1980)⁽⁵⁴⁾ 針對甲基藍與孔雀綠對鰻池生物之毒性，進行一系列的研究，而認為二種藥物對生物之安全濃度應在 0.033 ppm 之下，目前此兩種藥物已為政府明令禁止使用於養殖魚類病害之防治。

水產寄生蟲學研究

臺灣地處亞熱帶，水溫偏高，因之魚類寄生蟲症之發生乃是難免。李及陳 (1972)⁽⁵⁵⁾ 針對臺灣養殖魚類之寄生蟲進行調查，指出侵犯本省養殖魚類之寄生蟲包括原生動物，節肢動物及吸蟲類。黃等 (1977)⁽⁵⁶⁾ 發現寄於養殖鰻後腎之黏孢子蟲，指出本蟲以腎細管間支持組織及鮑氏隔周圍為主要寄生部位，且屬組織浸潤之寄生。鍾與郭 (1977)⁽⁵⁷⁾ 發現本省養殖的德國鱘鯉被 *Myxosoma* sp. 寄生的病例，指出受本蟲感染之鱘鯉的死亡率可高達 50%。羅等 (1978)⁽⁵⁸⁾ 檢視彰化地區文蛤養殖場受害之情形，發現文蛤受條蟲 (*Tylocephalum*) 之球形幼蟲嚴重感染。自 1980 年開始，羅等 (1980; 1982)^(59, 60) 進行一連串有關寄生於香魚之黃吸蟲 (*Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1819) 的生活史，感染性狀以及幼蟲形態變化等之研究，而使得有關本省黃吸蟲之生態及生理學上之研究更為透徹。徐及林 (1980)⁽⁶¹⁾ 進行為害牡蠣甚大之扁蟲 (*Stylochus inimicus*) 的產卵率，幼蟲之發生，以及鹽度對扁蟲捕食率和生長率影響的研究，並實地檢討養殖扁蟲與牡蠣死亡之關係，而發現扁蟲吞食牡蠣之速率隨海水鹽度之升高而增加，同時指出澎湖牡蠣養殖區之大量死亡，與扁蟲的大量發生有密切的關係。羅等 (1980)⁽⁶²⁾ 對嚴重危害本省養殖牡蠣 (*Crossostrea gigas*) 之柯螺 (*Thais clavigera* Kuster)，進行電子顯微鏡之觀察，而發現它具有特殊之吻部及鑽孔補助器，因而能鑽入牡蠣殼內，擊取柔軟組織。

(五) 病毒及組織培養研究

從五年前開始臺灣之魚病研究者開始進行一連串有關臺灣重要養殖魚類的組織培養研究。1981 年陳等⁽⁶³⁾ 首先發表了全世界第一個鰻魚卵巢細胞株。相繼的陳及郭 (1982)⁽⁶⁴⁾ 以及陳等 (1983a, b)^(65, 66)

發表鰻魚及腎臟細胞株及吳郭魚之組織細胞株的研究報告。最近陳 (1983)⁽⁷⁴⁾ 再提出有關鯉魚及泥鰱之鰓細胞株的研究論文。這些研究成果使我國在溫水魚類之組織細胞培養上，居於世界領先之地位。

有關菌毒研究，陳等 (1983)⁽⁷⁵⁾ 及上野 (1983)⁽⁷⁶⁾ 等調查臺灣養殖魚類感染病毒之情形，而發現臺灣養殖魚類中鰻魚及吳郭魚受歐洲鰻魚病毒 (EVE) 感染之百分率相當高，而鱒魚亦受感染性胰臟壞死病毒 (IPNV) 的侵襲。Hedrick 等 (1983)⁽⁷⁷⁾ 更進一步的證實臺灣之 EVE 與 IPNV 之 AB strain 的血清型很相近。陳等 (1983)⁽⁷⁸⁾ 更由日本進口之虹鱖分離出血性壞死病毒 (IHNV)，指出受此病毒感染之魚卵，在孵化後全部死亡。

(六) 生物防治研究

生物防治乃是一項以生物來控制生物繁殖的方法。魚病上之利用較有價值者，乃是利用噬菌體 (phage) 以控制病原菌的繁殖。吳等 (1981)⁽⁷⁹⁾，和吳及趙 (1982)⁽⁸⁰⁾ 已分別自池水或下水道內之水樣品中，分離出對 *Aeromonas hydrophila* 及 *Edwardsiella tarda* 具專一性的噬菌體。並於實驗室中，證明此兩種噬菌體，可有效的控制上述兩種魚類病原菌的繁殖，但噬菌體田間試驗之效果，則有待進一步之探討。

水產毒物學研究

自然界中存在多種黴菌的芽胞，這些芽胞在適當之環境下，可在飼料中生長，並產生毒素，若養殖魚類吞食此種飼料會發生疾病而死亡。據周 (1979)⁽⁸¹⁾ 之報導，稱黃麴毒素 (Aflatoxin) 中如 Aflatoxin B₁、Aflatoxin 5 及 Aflatoxin 10 可引起虹鱖、銀鮭及河魴之急性中毒，其中 Aflatoxin B₁ 之毒性最強，極少量就可引發惡性之肝腫瘤。本省養殖業者使用人工飼料非常普遍，但是有關上述具有毒素之飼料，對魚類之傷害則缺乏調查與研究。李及陳 (1981)⁽⁸²⁾ 曾針對十一種水稻田使用之農藥，對大肚魚及吳郭魚之急性毒進行調查，指出 Phenthoate 及 Endosulfan 對大肚魚 (*Gumbusia patruelis*) 及吳郭魚 (*Tilapia sp.*) 之毒性不小。林及林 (1981)⁽⁸³⁾ 進行農藥 Radapon 及硫酸銅對絲藻、龍鬚菜、虱目魚、吳郭魚、草蝦及沙蝦之毒性測定，而指出利用硫酸銅來清除龍鬚菜池中之絲藻是不可行的，另一方面，龍鬚菜池若混養吳郭魚及虱目魚則不宜用 Radapon 來清除絲藻，但若僅混養草蝦及沙蝦則因安全性高，可以使用。

蝦類疾病之研究

自民國57年草蝦之人工繁殖技術被確定後，草蝦養殖已成為本省重要水產養殖事業之一，其前途將不下於鰻魚之養殖。由於集約養殖之結果，帶來了許多疾病上之困擾，尤其近幾年來，由於疾病的不斷發生，而引起養殖蝦類之死亡，已達不可忽視之地步。但有關這方面之研究尚不多。1977年廖等⁽⁸⁴⁾ 針對養殖蝦類病害進行全面調查，指出原蟲感染症、絲藻附著症、蝦體彎曲症及變紅症的發生，對養蝦業者而言最為嚴重，同時提出此類病害發生的可能原因及其防治對策。陳及黃 (1979)⁽⁸⁵⁾ 調查蘭陽地區四個草蝦養殖區，認為養殖之草蝦周年均有疾病發生，以四至八月最嚴重，其中以黑腮病之危害最大，佔全部疾病之 72.75%，其次為腐腮病及變紅症。對這些病症至今缺乏治療及防治方法，因此為臺灣之蝦類養殖之前途着想，蝦病之研究乃是一項刻不容緩的課題。

綜觀上述，臺灣之魚病研究雖已頗具成果，工作之層次亦由淺而入深，可是仍有許多嚴重之病害尚待瞭解以尋求防治之道，例如草魚之腸炎，虹鱖之病毒性疾病，文蛤、牡蠣、草蝦之成蝦及苗，以及箱網養殖吳郭魚等之大量死亡，牛蛙之紅腿病 (敗血症)，甲魚腫脹症、鰻魚之腹水症，草蝦之紅腮或黑腮病……等等。除此之外，由於藥物使用之氾濫，導致抗藥性細菌增加及其抗藥性之多樣化，而對病害防治與公共衛生上形成莫大威脅之問題。由於引進新品種，大量進口魚苗，種蝦與受精卵等而引進新病原體，尤其是病毒，而使得我國養殖魚類受到很大的傷害，引發進口魚類檢疫之問題。病害之發生，往

往非為單一之成因，譬如因餌料不良或不全，造成營養性傷害，使得病原體有機可乘；寄生蟲大量寄生，尤其腮部受到寄生，對魚體造成莫大之壓迫 (stress) 或傷害，使得病原體乘虛而入；水質問題（如水中含有過量之銅，鎘或鋅等重金屬，水中動物性浮游生物過多所造成之氧氣不足或氮過多，池底因老化而產生多量之硫化氫， H_2S ）而導致魚體衰弱，使病原體有機可乘，因此魚體與如此複雜之魚病成因之間，關係如何之問題。當吾人發現池中有病魚出現時，其病情已相當嚴重，使用藥物治療已太遲，僅能挽救病癥未出現之罹病魚，因此早期診斷技術開發之問題，防治上除使用藥物外尚有方法，如生物控制法與免疫法，就免疫法而言，亦即魚用疫苗之開發，在對魚類免疫系統尚未充分瞭解及一般接種及口服方式使魚類得到免疫為非常不切合實際下，除非加緊瞭解魚類免疫系統外，更應多方面進行菌浴方式免疫魚體之實驗。

爲了更進一步增強臺灣魚病之研究內容，更使魚病研究者能更進一步的合作而謀共同問題之解決，茲提出下列研究重點以供參考。

- 1) 魚病防治研究
 - a) 抗藥菌及其抗藥性之研究。
 - b) 病原體之分離及其病原性機制之研究。
 - c) 病原性簡速檢出法及檢疫系統之建立。
 - d) 免疫機制及魚用疫苗之究明與開發。
 - e) 組織病理學之研究。
- 2) 魚類營養性疾病之研究
 - a) 臺灣重要養殖魚蝦貝類之營養性疾病之調查。
 - b) 各種營養與魚類疾病之關係。
- 3) 水質與魚類之關係
 - a) 臺灣地區各養殖水域之水質調查。
 - b) 各種水中污染因子對魚蝦貝類之影響及其發病機制之研究。
 - c) 各種污染因子之防止或去除方法之研究。
- 4) 病毒之研究
 - a) 病毒之分離及其特性之研究。
 - b) 病毒感染之簡速診斷方法的建立。
 - c) 遺傳工程及融合瘤技術應用於疫苗開發之研究。
 - d) 開發重要魚蝦貝類之永久細胞株以供病毒研究之用。

參 考 文 獻

1. 安可倫(1969)鯉魚鱗紅病之防治試驗。中國水產，149，8-10。
2. 郭光雄(1972)，魚類病原 *Aeromonas liquefaciens* 之研究—II 注射魚體後產生之病原性變化。臺灣水產學會刊，2(2)，16-19。
3. 鍾虎雲、郭光雄(1973)。魚體常有細菌之研究—I 存在外觀健康鯉魚之腮，腸血液及內臟之細菌。臺灣水產學會刊，2(2)，20-25。
4. 鍾虎雲、郭光雄(1974 a)。魚體常有細菌之研究—II 存在於病鯉內臟及血液中之細菌。臺灣水產學會刊，3(1)，23-28。
5. 鍾虎雲、郭光雄(1974 b)。鯉魚肌肉接種魚類病菌 *Aeromonas hydrophila* 後血液肝脾、及腎臟等之接種菌之消長。臺灣水產學會刊，3(2)，15-20。
6. 陳昭德、郭光雄(1978)養殖鯉細菌分布之研究，魚病研究專集(一)，15-32。
7. 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄(1977)。養殖鯉潰瘍病病原菌 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之分離，

魚病研究專集(-)1-6。

8. 劉正義、蔡正雄(1980)，臺灣養殖鰻之潰瘍病，魚病研究專集(=)。
9. 林曜松、蕭世民(1977)，臺灣魚池生態環境與魚病關係之研究 (I) 臺灣鰻魚疾病之統計分析，魚病研究專集(-)，57-61。
10. 陳宏遠、郭光雄(1978)。水產養殖抗藥細菌之研究。I. 養殖鰻抗藥菌之抗藥性。魚病研究專集(II)，1-13。
11. 郭光雄、鍾虎雲(1978)。養鰻池之 R⁺ 抗藥菌，魚病研究專集 (III)，1-8。
12. 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄(1978)。魚類滑動性細菌之鑑定與病原性之研究，魚病研究專集(=)，52-63。
13. 徐大全、郭光雄(1977)。魚類病原性黏液細菌 *Flexibacter columnaris* 之研究。水產學會刊，5(2)，41-54。
14. 柳家瑞、鍾虎雲、郭光雄(1982)。Flexibacter columnaris 病原性之研究—I 溶氧及氮影響 Flexibacter columnaris 對鰻之病原性。魚病研究專集(=)，57-61。
15. 劉正義(1978)。養鰻鰓病之病理研究，魚病研究專集(=)，45-57。
16. 蕭世民、陳孝禹(1977)，臺灣地區牛蛙 (*Rana catesbiana*)、淡水長腳大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 及淡水養殖魚類發現細菌及寄生蟲病。魚病研究專集(-)，19-21。
17. 劉富光(1979)，臺灣養殖泥鰱之疾病，中國水產，324，14-18。
18. 郭上卿、郭光雄(1978)，養鰻赤點病病原。魚業試驗所研究報告，3(3)，19-23。
19. 陳弘成、劉熾揚(1972)，虱目魚越冬期之生態研究，JCRR Fisheries Series No. 12, 35-49。
20. 沈時霖、江永棉(1972)。虱目魚，鹽褐水之防治，JCRR Fisheries Series No. 12, 50-53。
21. 黃銀河(1977)。虱目魚越冬期間細菌性疾病之研究—初步報告，魚病研究專集(-)，50-54。
22. 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄(1976)。淡水養殖香魚 *Vibrio anguillarum* 之分離。臺灣水產學會刊，4(2)，21-24。
23. 楊美桂、羅竹芳、扈伯爾、郭光雄(1978)，新竹地區文蛤病原菌 *Vibro parahaemolyticus* 之分離。魚病專集(=)，59-67。
24. 宋延齡、陳秀男、郭光雄(1976)，*Aeromonas hydrophila* (*A. liquefaciens*) 免疫鰻魚 (*Anguilla japonica*) 後之凝集抗體與保護作用。臺灣水產學會刊，4，25-49。
25. 宋延齡、郭光雄(1977)。日本鰻 (*Anguilla japonica*) 對 *Edwardsiella anguillimortiferum*、*Aeromonas hydrophila* 抗原之免疫反應。臺灣水產學會刊，6(1)，65-72。
26. Song, Y. L. and G. H. Kou (1980) The immuno-responses of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studied by the immersion method. Fish Pathol., 15(3/4), 249-255.
27. Song, Y. L. and G. H. Kou (1979) Immune responses of eel (*Anguilla japonica*) against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguillimortifera* (*E. tarda*) Infection, Proceedings of Republic of China—United States Cooperative Science Seminar on Fish Disease, National Science Council, ROC, 107-114.
28. 宋延齡、郭光雄、陳冠英(1982)。Edwardsiella anguillimortifera 疫苗免疫鰻魚 (*Anguilla japonica*) 之條件。魚病研究專集(=)，18-25。
29. 宋延齡、陳秀男、郭光雄、林清龍、丁雲源(1980)。HIVAX *Vibrio anguillarum* 疫苗免疫虱目魚魚苗 *Chanos chanos* 的效果。魚病研究專集(=)，101-108。
30. 林清隆、丁雲源、宋延齡(1982)。再探討 HIVAX *Vibrio* 疫苗免疫虱目魚魚苗 (*Chanos chanos*) 之效果。魚病研究專集(=)，80-83。

31. 郭光雄、鍾虎雲(1979)。魚類病原菌 *Aeromonas hydrophila* (*A. liquefaciens*) 之研究—VI經由動脈球接種後鰻魚血液中細菌及白血球之變動。Aquiculture, 2(3), 17-21。
32. 郭上卿、郭光雄(1977)。養殖鰻潰瘍病原菌 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之螢光鑑定法。臺灣水產學會刊, 6(1), 43-48。
33. 郭光雄、陳秀男、鍾虎雲(1977)。鰻感染微孢子蟲 *Pleistophora anguillarum* 之螢光抗體診斷法。科學發展, 10(2), 103-108。
34. 陳秀男、郭光雄(1982)。日本鰻魚之腎臟及卵巢細胞株的雙向擴散及免疫電泳研究。魚病研究專集(四), 1-7。
35. 鍾虎雲(1973)。臺灣淡水魚類水黴菌之初步研究。臺灣水產學會刊, 2(1), 47-55。
36. 簡秋源(1979)。感染性水黴菌引起之魚病。生物中心專刊, 9, 15-25。
37. 郭上卿、郭光雄(1980)。鰻線感染水黴菌 *Saprolegnia ferax* 之因子。魚病研究專集(三), 86-93。
38. 簡肇衡、簡秋源(1982)。養殖鰻之真菌性肉芽腫症。魚病研究專集(四), 92-95。
39. 簡秋源(1980)。數種虹鱒寄生水黴菌的分離。魚病研究專集(三), 94-100。
40. Chien, Chiu-Yuan (1976) Preliminary survey on the *Saprolegniaceae* fungi parasites of fresh water shrimp (Crustaceans) in Taiwan. Proc. Nat. Sci. Council 9, 39-47.
41. 簡肇衡、宮崎照雄、窪田三朗(1978)。臺灣魚黴菌性腮病 (Branchiomycosis) 之組織病理所見。魚病研究專集(三), 7-98。
42. 鍾虎雲、郭光雄(1976)。錦鯉上皮瘤之一例。經濟部、國立臺灣大學合辦漁業生物試驗所研究報告, 3(2), 1-3。
43. 赤田幸雄、簡肇衡、余廷基(1977)。鰻魚凹凸病之組織變化研究。魚病研究專集(三), 40-49。
44. 徐興鎔、張文發(1977)。鰻孢子蟲白點病之病理研究。魚病研究專集(三), 47-49。
45. 劉朝鑫、韓海倫、王和金(1982)。日本鰻 (*Anguilla japonica*) 組織學之研究。魚病研究專集(四), 62-73。
46. 徐興鎔、張文發(1977)。鰻魚橫紋肌瘤。魚病研究專集(三), 55-56。
47. 簡肇衡、余廷基(1980)。福壽魚胸腺淋巴肉瘤之病例報告。魚病研究專集(三), 118-119。
48. 簡肇衡、余廷基(1982)。金魚有柄乳狀突腫瘤病例報告。魚病研究專集(四), 84-91。
49. 簡肇衡(1982)。白鰻上皮腫瘤病例報告。魚病研究(四), 88-91。
50. 劉國鈞、簡肇衡(1982)。患腮腎炎養殖鰻 (*Anguilla japonica*) 之腎小管上皮細胞內玻璃球體之超微結構。魚病研究(四), 74-79。
51. 徐興鎔、朱海摺、翁仲男(1977)。魚類 Nocardiosis 在臺灣發生之報告。魚病研究專集(三), 22-27。
52. 劉朝鑫、王和金(1978)。水產藥物對鰻魚毒理學之研究。魚病研究專集(三), 33-43。
53. 李明仁、郭光雄(1978)。Sodium Sulfamonomethoxine 藥浴之鰻體內吸收情形。魚病研究專集(三), 69-75。
54. 廖一久、楊富榮、羅秀婉(1978)。Panfuran-s 藥浴對虱目魚苗存活及其成長之影響試驗。魚病研究專集(三), 89-95。
55. 劉朝鑫(1980)。硫酸新黴素在鰻魚體內之吸收、分佈與排泄。魚病研究(三), 66-73。
56. 陳弘成、張金豐(1980)。甲基藍與孔雀綠對鰻池生物之毒性研究。魚病研究(四), 74-85。
57. Li, Y. P. and S. N. Chen (1972) Some Parasites found in pond fishes of Taiwan (I). JCRR Fisheries No. 12, 54-65.
58. 黃仲嘉、羅竹芳、王重雄、扈伯爾(1977)。鰻腎黏孢子蟲之組織病理和組織化學研究。魚病研究專集(三), 5-11。
59. 鍾虎雲、郭光雄(1977)。一種寄生於德國鱘之孢子蟲病初報。魚病研究專集(三), 34-39。

60. 羅竹芳、王重雄、扈伯爾(1977)。文蛤寄生蟲 *Tylocephalum* 之球形幼蟲之研究。魚病研究專集(三), 77-87。
61. 羅竹芳、郭光雄、扈伯爾、劉富光(1980)。黃吸蟲 *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1981 之研究 I. 寄生香魚 (*Plecoglossus alivelis*) 之後搖尾幼蟲, 魚病研究專集(三), 9-16。
62. 羅竹芳、王重雄、扈伯爾、郭光雄(1980)。黃吸蟲 *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1819 之研究 II. 黃吸蟲之生活史, 魚病研究專集(四), 26-56。
63. 徐瑞雲、林曜松(1980)。危害牡蠣之扁蟲 (*Stylochus inimicus*) 的生物學研究。魚病研究專集(三), 39-50。
64. 羅竹芳、王重雄、扈伯爾、沈振中(1980)。臺灣蚶螺 *Thais clavigera* Küster 鑽孔器之研究。魚病研究(三), 25-38。
65. Chen, S. N., Y. Ueno and G. H. Kou (1981) A cell lines derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary. *Fish Pathology*, 16(3), 129-137.
66. Chen, S. N. and G. H. Kou (1982) A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) Kidney. *Proceedings of the National Science Council, Part B, Basic Science*, 6(1), 93-100.
67. Chen, S. N., Y. Ueno, S. C. Wen and G. H. Kou (1983a) Establishment of a cell line from kidney of tilapia, *Fish Pathology* (In press).
68. Chen, S. N., S. C. Chi, Y. Ueno and G. H. Kou (1983b) A cell line from tilapia ovary. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist* 3, 1-4.
69. 陳俊宏(1983)。鯉魚及泥鰕鱗細胞株之建立反其生物學上之研究。國立臺灣大學碩士論文。
70. The occurrence of viral infection of fish in Taiwan, *Fish Pathology* (In press).
71. Ueno, Y., S. N. Chen, G. H. Kou, R. P. Hedrick and J. L. Fryer (1983) Characterization of virus isolated from Japanese eel (*Anguilla japonica*) with nephroblastoma. 中央研究院動物研究所集刊, 22 (付印中)。
72. Hedrick, R. P., J. L. Fryer, S. N. Chen and G. H. Kou (1983) Characteristics of birnavirus isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathology* (In press).
73. 陳秀男、文少清、施秀惠、郭光雄(1983)。臺灣養殖鱒魚出血性壞死病毒 (IHNV) 之分離。研究集刊(付印中)。
74. Wu, J. L., H. M. Lin, L. Jan, Y. L. Hsu and L. H. Change (1981) Biological control of fish bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by bacteriophage AH1. *Fish Pathology*, 15, 271-276.
75. 吳金洲、趙偉真(1982)。感染潰瘍病菌 *Edwardsiella tarda* 之新噬菌體株 ET-1 之研究。魚病研究專集(四), 8-17。
76. 周詩頓(1979)。飼料中數種常見之黴菌毒素及其養殖魚之影響。中國水產, 315, 15-17。
77. 李國欽、陳朝明(1980)。常用農藥對二種魚類之急性毒性研究。中國水產, 340, 17-24。
78. 林明男、林國彥(1980)。農藥 RADAPON, 硫酸銅對龍鬚菜、絲藻、魚蝦之毒性。中國水產, 343, 3-9。
79. 廖一久、楊富榮、羅秀婉(1977)。養殖蝦類常見之二三病害之原因及其對策。魚病研究 (I), 28-33。
80. 陳弘成、黃本(1977)。蘭陽地區養殖草蝦疾病之調查。中國水產, 3-8。

幾種水產藥品及化學物對吳郭魚之毒性及病理研究

Toxicological Studies of Some Drugs in Sarotherodon

簡 肇 衡 · 李 福 銓 · 余 廷 基

Chau-Heng Chien, Fu-Chuan Lee and Ting-Chi Yu

Abstract

This report aims to investigate the acute toxicity effect of eight compounds including copper sulfate, silver nitrite, methylene blue, nitrofurazone, furazolidone, oxytetracycline, trichlorophone and iodophore against hybrid Sarotherodon fry.

緒 言

吳郭魚 Sarotherodon 為本省目前最重要的養殖魚之一，年產量已達五萬餘噸。在養殖發展過程中，對病害的種類、原因等已加以鑑定分類，現以幾種水產藥物及化學藥品對吳郭魚進行毒性試驗其結果加以報導，以供養殖及研究之參考。

材 料 與 方 法

試驗所用之吳郭魚苗為本分所自行繁殖者，平均體長 2.85 cm、體重 0.42 gm，試驗前均在室內蓄養 2 天以上，所用之藥品有，Copper Sulfate, Silver Nitrate, Methylene blue, Nitrofurazone, Furazolidone, Oxytetracycline, Trichlorophone, Iodophore 等八種，其中 Nitrofurazone, Furazolidon, Oxytetracycline 較難溶於水，各以 95% 酒精 10 ml 溶解。試驗係於 45×30×25 cm 之水族箱中進行，於 10 l 之藥液水中放入 10 尾吳郭魚苗，以靜水式進行試驗，並在試驗水槽外層用地下水調整水溫，使其保持在 25±1°C，試驗期間隨時觀察，發現死魚即行撈其，以免污染水質，生物死亡之判斷係以玻璃棒觸之，如無反應即判定死亡。試驗所用之水係地下水經砂層過濾，曝氣兩天後使用，其 DO 為 7.8 ppm，pH 值為 8.1，水質分析如表一。

試驗結束時，依 Doudoroff 及 Vander Waerden⁽¹⁾ 方法計算 48 hrs 之 TLM，經處理過的魚每組取 5 尾，以 Bouin's fluid 固定酒精脫水，石臘包埋做成 4~6 μ 切片，以 Hematoxylin 及 Eosin 液染色，藉顯微鏡觀察其病理結果⁽²⁾。

結 果

表二、係以 Copper Sulfate 處理吳郭魚之情形及結果，48 小時之 TLM 值為 83.3 ppm。

硫酸銅處理之試驗魚主要呈現消化道之腸粘膜壞死，剝離及肝臟之脂肪變性，如圖 1，59.6 ppm，48 hrs。

Table 1. The water quality analysis of testing water.

Items (ppm)	Fresh-water	Items	Fresh-water
Pb	—	NO ₂ -N (ppb)	15
Mn	0.011	NO ₃ -N (ppb)	400
Zn	0.03	NH ₄ ⁺ -N (ppb)	58
Co	—	NH ₃ -N (ppb)	7
Fe	—	Ca (ppm)	2.4
Cd	0.066	SiO ₂ -Si (ppm)	10.05
Cu	—	SO ₄ ⁻ (ppm)	11
Cr	—	COD (ppm)	0.16
Ni	—	Total hardness (ppm)	152

Table 2. The hybride Sarotherodon treated with copper sulfate.

Concentration of copper sulfate (ppm)	Times	
	24 hrs	48 hrs
Control	0	0
30.52	0	0
38.125	0	0
47.68	0	1
59.6	0	1
74.5	0	3
93.13	0	7
116.41	3	8
145.31	5	10



Fig. 1. After treated with copper sulfate, the mucosa necrosis, erosion of intestine, liver cells with severe fatty degeneration. H-E stain ×40

表三、係以 Silver Nitrate 處理吳郭魚之情形及結果，48小時之 TLM 值為 0.1377 ppm。

Table 3. The hybrid Sarotherodon treated with silver nitrate.

Concentration silver nitrate (ppm)	Times	
	24 hrs	48 hrs
Control	0	0
0.022	0	0
0.033	0	0
0.05	0	0
0.075	0	1
0.113	0	2
0.169	0	7
0.253	2	10

硝酸銀處理之試驗魚主要呈現局部神經節內之神經細胞萎縮，變性及壞死圖 2。腸粘膜浮腫圖 3，0.05 ppm, 48 hrs。



Fig. 2. Nerve cells are atrophy, degenerated and necrosis in a focal nerve node by treated with AgNO₃. H-E stain ×125



Fig. 3. Mucosa oedema of intestine by treated with AgNO_3 . H-E stain $\times 125$

表四、係以 Methylene Blue 處理吳郭魚之情形及結果，48小時之 TLM 爲 117 ppm。

Table 4. The hybrid Sarotherodon treated with methylene blue.

Concentration of methylene blue (ppm)	Times	
	24 hrs	48 hrs
Control	0	0
72	0	0
88	0	2
108	2	4
132	4	6
162	8	9
198	10	10
243	10	10
298	10	10

甲基藍處理之試驗魚主要呈現肝脂肪變性。鰓呼吸上皮，身體之表皮圖 4。局部脾髓壞死病巢出現圖 5。腸之粘膜等色素沉積圖 6，108 ppm, 48 hrs。



Fig. 4. The methylene blue pigment deposit was engulfed by a macrophage. H-E stain $\times 500$



Fig. 5. There is some focal necrosis lesions in white pulp of the spleen by treated with methylene blue. H-E stain $\times 40$