

農委會漁業特刊第四十二號
COA Fisheries Series No. 42

草蝦桿狀病毒之特性

陳秀男、張朴性、郭光雄



農委會漁業特刊第四十二號
COA Fisheries Series No. 42

草蝦桿狀病毒之特性

陳秀男、張朴性、郭光雄



行政院農業委員會編印

中華民國八十二年六月

005794

目 錄

一、前言	1
二、草蝦桿狀病毒檢驗法	4
1. 採樣	4
2. 抹片檢驗法	5
3. 組織病理檢查法	5
3-1 石蠟切片技術	5
3-2 組織切片染色	6
4. MBV包含體之糞便檢驗法	7
4-1 糞便之收集	7
4-2 糞便之處理	7
4-3 病毒包容體之檢驗	7
5. 免疫螢光抗體標識MBV包容體	8
6. 電子顯微鏡技術診斷法	8
6-1 穿透式電子顯微鏡技術	8
6-2 電子顯微鏡負染色技術	8
三、草蝦桿狀病毒之流行病學研究	16
四、草蝦流行病病理研究	20
1. 組織病理檢驗	20
2. 電子顯微鏡技術檢驗	21
3. MBV感染與草蝦流行性肝胰腺病變之關係	22
五、MBV感染草蝦與紅尾蝦肝胰腺細胞病理學研究	42
六、草蝦桿狀病毒對草蝦之病原性研究	50
1. 繁殖場草蝦苗密度與MBV感染率之關係	52
2. 已感染MBV之草蝦蓄養實驗	54
3. MBV感染率與蝦體大小之關係探討	55
4. 人工感染試驗	26

七、草蝦桿狀病毒複製研究	66
1. MBV之複製過程	67
2. MBV複製探討	69
八、草蝦桿狀病毒性狀研究	78
1. 包容體特性	78
2. MBV包容體之純化	79
2-1. 感染病毒草蝦之採集	79
2-2. 病毒離心純化法	80
2-3. 電子顯微鏡負染色技術	81
3. MBV病毒純化技術之探討	82
4. 病毒長度分析	83
5. MBV包容體SDS-膠體電泳分析(SDS-PAGE)	85
九、草蝦桿狀病毒分子生物學研究	94
1. DNA之萃取與純化	94
2. MBV DNA之聚合酶連鎖反應	95
3. 蝦苗肝胰腺直接進行PCR反應	96
4. DNA純化與PCR結果探討	96
十、草蝦桿狀病毒之防治研究	100
1. 母蝦之檢驗	100
2. 卵及無節幼苗之收集	100
3. 卵及無節幼苗之清洗	101
4. 實驗分組	101
5. 蝦苗之養殖	101
6. 蝦苗感染MBV檢驗法	101
7. MBV-FREE草蝦苗繁殖結果	102
8. MBV-FREE草蝦苗繁殖之可行性探討	107
十一、參考文獻	110

第一章 前 言

對蝦科 (Family Penaeidae) 屬於節肢動物門 (Phylum Arthropoda)，甲殼綱 (Class Crustacea)，十足目 (Order Decapoda)，為重要的經濟無脊椎動物養殖物，近年來已普遍且企業化的養殖。然而在繁殖、養殖期間，因不明原因的大量死亡，而造成業者的重大損失，因之深入探討其病因並謀求解決之道，實在是刻不容緩的。在諸多的病原中，一般認為草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type baculovirus; MBV) 是養草蝦最重要的病原之一。

草蝦桿狀病毒 (*P.monodon*-type baculovirus ; MBV) 是屬於動物病毒中的桿狀病毒科 (Baculoviridae)，桿狀病毒屬 (Baculovirus)。桿狀病毒是DNA病毒，具有桿狀的核酸鞘 (nucleocapsid) 和脂蛋白外膜 (lipoprotein envelope)。至目前發現至動物細胞的桿狀病毒，依其包容體 (occluded) 的存在及其性狀，可以分為下面三個外表群⁽⁶¹⁾：(1)顆粒性桿狀病毒 (Granulosis viruses)、(2)核多角體桿狀病毒 (Nuclear polyhedrosis viruses) 和(3)不形成包容體的桿狀病毒 (Nonocclusion body viruses)。對蝦桿狀病毒 (BP) 和草蝦桿狀病毒 (MBV) 是屬於第二類群^(54,96)，而中腸腺壞死桿狀病毒 (BMN) 則屬於第三類群⁽¹³³⁾，而第一類群桿狀病毒則大多出現於昆蟲。

鑑於台灣蝦類養殖近年來發展迅速，及病毒性疾病又是蝦病中相當重要的病原，本文主要針對本省養殖蝦類常感染之草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type baculovirus; MBV)，做一系列探討與整理，旨在使養蝦業者與對MBV有同樣興趣者對此病毒之性狀及其感染之防治方法有所了解討論。

有關草蝦桿狀病毒之流行病學方面的研究結果顯示，本省養殖草蝦受MBV感染情況已相當普遍；不分季節、地區、和蝦體的大小（除了後期幼生以前之各期），皆很容易發現病毒感染的樣品。病蝦的檢體常可發現大量的病毒包容體，亦可能伴隨肝胰腺系統性肉芽腫的發生，其殼外表污穢，常停靠池壁及浮游於池面。繁殖場的紅尾蝦苗 (*Penaeus penicillatus*) 亦發現感染了MBV，然而斑節蝦 (*P. japonicus*) 則未發現被感染。

調查自台灣及東南亞養殖草蝦體內之病毒感染情形亦顯示MBV感染最嚴重；種母蝦之感染率為14.1至94.3%不等，而蝦苗和幼蝦感染率為43-85%，

在每一批檢體皆可檢出MBV的感染。

MBV病毒之病原性的研究成果顯示：繁殖場草蝦苗的養殖密度會隨著蝦苗各期變態而逐漸減少，當後期幼生感染MBV以後，其密度會急速減少。MBV傳染很快，六天之內感染率由10%增加到85%以上；草蝦變態為後期幼生以前，沒發現有病毒包容體之形成，最早發現有包容體出現，是在變為後期幼生後第四天（PL4）起。

MBV感染草蝦苗後以酵素連結免疫吸附法檢測MBV抗原存在則發現在眼幼蟲（Zoea）一期即有正反應，垂死之眼幼蟲二期於病理切片發現已可發現MBV包容體。在後幼生期感染MBV會引起生長遲緩，族群平均體長比未感染之同期蝦苗小，體長標準機差則較大，活存率較低。PL110、PL80、PL50和 PL20以餵食方式進行感染MBV，十天後檢驗感染率分別為0%、13.3%、21.4%和 100%，此結果顯示蝦體愈大愈不易感染MBV。探討組織病理探討草蝦大量死亡之病變和MBV的關係後，可將採得樣品之病變分為急性、慢性病變和正常狀態三種類別，這些蝦子MBV感染率分別為44.3%、25.7%、及40.0%。慢性病變MBV感染率減少乃因組織發炎，細胞脫落、壞死之故。研究結果亦顯示MBV並非引發草蝦大量死亡之直接病原，蝦池環境刺激因子（Stressing factors）之增加會導致MBV在蝦體組織的大量增殖。

在病理學的研究結果顯示，草蝦肝胰細胞除了E細胞外，其餘F、B、R、M四種不同型態及功能的細胞皆發現會被MBV感染，MBV感染後引起的病理主要是脂蛋白膜的病變，並在細胞核內形成包容體，會將細胞脹破，瓦解的胞器及包容體和游離的病毒會流入肝胰腺之管腔中，隨糞便排至體外。

草蝦發生大量死亡常引起肝胰腺的病變，依發生的性狀可分為急性和慢性病變，前者常發生在突發性大量死亡時，肝胰腺組織引起炎症反應：細胞大量壞死、脫落，並有菌血現象和血球浸潤；慢性病變常見於持續性發病死亡之蝦池，肝胰腺外表萎縮黑變或透明病變，萎縮黑變組織形成肉芽腫；而透明病變是盲管間隙擴大，充滿組織液或纖維化，引發盲管的繼發性病變：細胞形態變性和基底膜剝離。以電子顯微鏡觀察，病變組織之細胞膜瓦解、染色質聚集、基底膜增厚和起皺摺，並在盲管內和盲管間隙發現桿狀的細菌。

在病毒複製研究結果顯示，MBV在肝胰腺細胞內複製，以穿透式電子顯微鏡觀察，可見到病毒基因基質、類似長管狀的鞘物質和核酸鞘的形成，外套膜的取得及包容體的形成等步驟。草蝦及紅尾蝦形成MBV包容體皆為

橢圓體至球形，為嗜伊紅性，與Schiff reagent有輕微的紫色反應，直徑約3-10 μ m，在pH11.5下攪拌2小時可將包容體部分溶解。

有關MBV形態學上的研究，在草蝦及紅尾蝦肝胰腺內發現之MBV型態之測定，並以t-test檢定，發現兩者之病毒體直徑（58.2nm; 47.8nm）、核酸鞘直徑（38.9nm; 34.6nm）和病毒體長度（325.9nm; 265.2nm）有顯著差異，而核酸鞘長度（250.6nm; 250.7nm）和多角體蛋白顆粒之對角長度（19.9nm; 20.8nm）二項無顯著差異。另以CsCl離心，測得MBV包容體密度為1.3147~1.3212g/ml。

MBV的純化材料目前只能取自活體，病蝦和後幼生期都可藉由蔗糖或氯化銣梯度離心取得，沒有人為的疏忽時，將可得到病毒包容體和游離病毒，密度分別為1.33和1.29 g/ml，以電泳分析包容體結構蛋白，多角體蛋白分子量約為62 Kd，MBV包容體在純化過程，多角體蛋白極易剝落，在掃描式電子顯微鏡下包容體表面極度粗糙，負染色觀察可同時見到大量多角體蛋白和病毒顆粒（occluded virus）。分析四組MBV蛋白質鞘長度，主要分布在250-280nm，平均約260nm，在其中兩組發現有約10%長度約150-160nm的短小病毒蛋白鞘。

有關MBV分子生物學上的研究結果則顯示MBV DNA可自純化後的病毒顆粒和包容體中萃取，以這些DNA進行聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction; PCR），並持用參照自昆蟲核多角體病毒多角體蛋白基因相似性極高的基因片段做為引子（Primer），結果可得到約600鹼基對之MBV DNA部份合成產物，以PCR直接進行蝦苗MBV DNA的檢測，感染MBV的蝦苗經PCR合成反應之後，亦在同一位置有單一的DNA帶，而草蝦、斑節蝦和東方對蝦體DNA皆無反應。此結果顯示本實驗所合成之MBV DNA有很高之特異性。

在MBV感染防治之研究結果顯示，草蝦育苗場蝦苗感染的MBV，並非由受精卵傳染之垂直感染，而是經口感染。自環境中病毒包容體或帶原蝦子的糞便是最主要的感染源。以乾淨海水、福馬林和碘仿清洗無節幼苗或受精卵，可有效的去除MBV的感染，而達到生產無MBV感染的蝦苗的目的。

第二章 草蝦桿狀病毒檢驗法

對蝦類是否感染對蝦桿狀病毒 (BP) 或草蝦桿狀病毒 (MBV) ，我們可以依據其感染後所形成的包容體 (occlusion body) 之特性，在濕抹片或組織切片下輕易檢驗出⁽⁹⁹⁾。而BMN的感染，並不形成包容體⁽¹³³⁾，因此欲診斷BMN的感染，必須依據其臨床症狀、組織病理學和穿透式電子顯微鏡等互相配合，方能正確診斷出是否因BMN感染了肝胰腺細胞而致病。Sano在1983年發展出螢光抗體技術，由此可以快速診斷BMN的感染。

研究。使用到的儀器包括解剖顯微鏡、光學顯微鏡、穿透式和掃描式電子顯微鏡。應用之技術主要有組織病理檢驗技術和電子顯微技術。檢體自現場採集後即進行外表檢驗和固定包埋的步驟，其簡明流程如圖2-1。

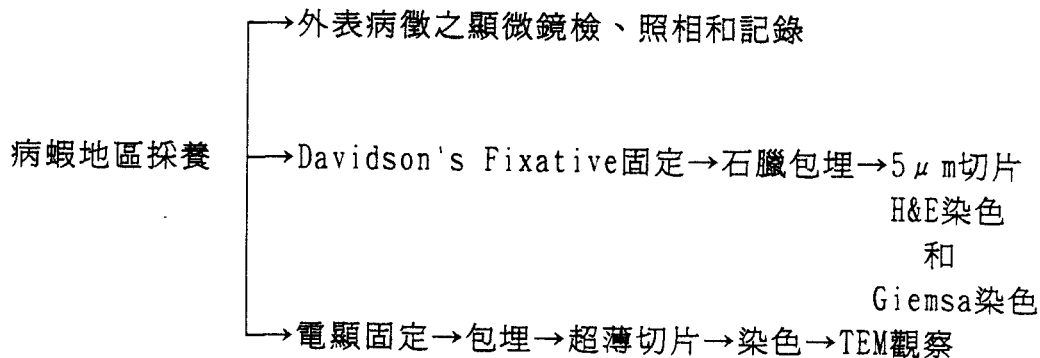


圖2-1、草蝦疾病調查流程圖

1. 採樣：

蝦苗繁殖場環境小，容易觀察，採樣容易，隨時撈取異樣的蝦苗在顯微鏡下觀察，並與正常蝦苗作比較。大蝦場樣本之採集是以發病蝦池為對象，而以鄰近蝦場正常的草蝦作對照。母蝦的採樣是以繁殖場內母蝦為主，購進之母蝦分開單獨蓄養2天，進行觀察，並進行MBV的檢驗。

檢驗之蝦苗之MBV檢驗方法有抹片及組織病理切片；而大蝦場採到的病蝦，由於運送活蝦麻煩，一般都採組織病理檢驗；種蝦價格昂貴，檢驗MBV包容體乃採糞便檢驗為主。特殊的病灶為了更深入的探索，才取發病部位進行戊二醛 (Glutaldehyde) 和鐵酸 (OsO₄) 固定，進行穿透式電子顯微技術檢驗⁽³⁾。

2. 抹片檢驗法:

將新鮮的蝦肝胰腺取出，大蝦取其肝胰腺之中間部份，小蝦取整個肝胰腺，較小的幼生期則取整個個體，置於載玻片上，滴一滴海水，或再滴一小滴0.05% 的孔雀綠或0.1%伊紅水溶液，蓋上蓋玻片，並施適當的壓力，將組織壓碎，之後即可以光學顯微鏡觀察。

檢查時，用100倍以上顯微鏡觀察，可見散開的肝胰腺細胞，再以孔雀綠或伊紅染色後，即可更容易觀察細胞結構，並且輕易分辨出油滴、細胞核、核仁。被MBV病毒感染之細胞，其細胞核顯然有腫大現象，可比正常細胞核大達三至四倍，核內有一個至多個球狀的包容體（圖2-2），有些包容體在高倍顯微鏡下可看到裂縫現象（圖2-2）。核內球形包容體是草蝦桿狀病毒的特徵之一。經孔雀綠染色後，細胞染成淡綠色，脂肪球則為光亮圓球形，不會染上顏色，包容體則被染成藍綠色（圖2-3）。用伊紅染色，細胞則染成淡紅色，病毒包容體為明顯的紫紅色（圖2-2）。

3. 組織病理檢查法：

3-1 石蠟切片技術

(1)固定：採集的蝦子若為後期幼生，直接將其浸以戴維生固定液（配方見附錄）。若為較大的蝦子，則以注射針筒將固定液打入肝胰腺、胃、胸腔及肌肉內，或將蝦體切成數塊，直接浸以Davidson固定液，確保固定液完全且快速地將組織固定，固定時間為12至48小時，固定後即可將組織塊移入50%—70%酒精貯藏。若於野外採集，可在固定後倒去固定液，蝦體以吸水紙瀝除固定液，並浸於70% 酒精20分鐘，然後將之撈起，以浸溼透70% 酒精的吸水紙包住蝦體以保持溼潤，然後裝入封口袋，確保不滲漏，寫上標籤，如此便於攜帶且可保存長久。待日後繼續進行。

(2)脫水：樣本以低濃度至高濃度的酒精（包括70%、80%、90%、95%、和100%兩次）逐次脫水，脫水時間視組織塊的大小而定，小蝦苗每一步驟只須10—20分鐘，大組織塊則須30—60分鐘。(3)置換：以二甲苯置換酒精，如果脫水不完全此時會出現白色混濁，必須重新用100%酒精再脫水一次。置換時間視組織塊大小而定，由10分鐘到2小時不等，須再換一次二甲苯，一直到整個組織塊呈現透明狀態。

(4)浸滲：經石蠟浸滲時須分兩個蠟槽，進行初步浸滲和完全浸滲每一步驟須時30分鐘至2小時，槽中之溫度須保持在62°C，不可過高。

(5)包埋：用來包埋之蠟必須無雜質，溫度約與浸滲時相同，包埋時可調整組織塊的位置，以利以後切片前之整修。

(6)切片：待石蠟凝結後極可取出整修，然後置於組織切片機上進行切片，狀況良好時 5 μ m 的薄片無括痕、不萎縮，且可形成連續切片，如果無法達到此狀態，可探索以下原因：刀片不鋒利、氣溫太高導致蠟塊太軟、刀口角度不對、石蠟塊內含有堅硬雜質或組織塊脫水及浸滲不完全。

3-2 組織切片染色：

3-2-1 蘇木紫與伊紅 (Hematoxylene & Eosin) 染色法：

(1)將玻片排放於染色架上，浸入 Xylene(一) 4 分鐘，將蠟溶掉。(2)換至 Xylen(二) 4 分鐘。(3)100%酒精 3 分鐘。(4)95%酒精 3 分鐘。(5)90% 酒精 3 分鐘。(6)80%酒精 3 分鐘。(7)70%酒精 3 分鐘。(8)50%酒精 3 分鐘。(9) Tap Water 3 分鐘。(10) Mayer Hematoxylene 染色 15 分鐘。(11) Tap water 3 分鐘。(12) Scott solution 3 分鐘。(13) Tap water 3 鐘。(14)50%酒精 15 秒。(15)70%酒精 15 秒。(16) Eosin (0.5% in 70%酒精溶液) 5 分鐘。(17)80%酒精 15 秒。(18)90%酒精 15 秒。(19)95%酒精 15 秒。(20)100%酒精 3 分鐘，二次。(21) Xylene 3 分鐘，二次。(22)取出玻片以 Entellan (contains Xylene and alkylacrylate) 封埋。

肝胰腺以石蠟切片，經過 H & E 染色後，被感染的肝胰腺細胞核呈腫大病理現象，內有一至數個 MBV 病毒包容體，被染成嗜酸性的紅色 (圖 2-4)。

3-2-2 Giemsa 染色法：

(1)將玻片排放於染色架上，浸入 Xylene(一) 4 分鐘，將蠟溶掉。(2)換至 Xylen(二) 4 分鐘。(3)100%酒精 3 分鐘。(4)95%酒精 3 分鐘。(5)90%酒精 3 分鐘。(6)80%酒精 3 分鐘。(7)70%酒精 3 分鐘。(8)50%酒精 3 分鐘。(9) Tap Water 3 分鐘。(10) Buffer solution 浸漬 30 分鐘。(11) Giemsa stain 120 分鐘。(12) Glacial acetic acid solution 退染。(13)95%酒精 15 秒。(14)100%酒精 3 分鐘，二次。(15) Xylene 3 分鐘，二次。(16)取出玻片以 Entellan (contains Xylene and alkylacrylate) 封埋

3-2-3 Feulgen reaction 染色法：

以 Feulgen reaction 特殊染色技術，用 Schiff reagent 染感染 MBV 的蝦肝胰腺組織切片，並以 Fast green 當背景，其結果如圖 2-5、2-6、細胞核內有大量的 DNA，經 Schiff reagent 作用後，變成紫色，可見到核腫大現象。腫大的核周圍紫色較深，而有包容體的地方紫色較淡。顏色較淡的位置經

Fast green染色後即可見到鮮艷的綠色，而其核周圍仍保持紫色，細胞質則變為較淡的綠色。

4. MBV包含體之糞便檢驗法:主要應用於種母蝦的MBV感染檢測

4-1 糞便之收集

準備小型的蓄養桶，事先以次氯酸鈉或福馬林之水溶液消毒過，注入乾淨海水並充分打氣。購入活力好的母蝦，以每桶蓄養一尾為限並給予餌料，蓄養為期二天，其糞便分別以吸管收集於離心管中，並編上號碼，此階段必須注意蝦子活力衰退之情形，水質需保持良好之狀態，殘餌必須常清除，必要時可適量換水。

4-2 糞便之處理

方法一：步驟4-1：收集的糞便以均質機打碎，並以離心機離心800xg 15鐘，小心去除上層液，病毒包容體會被離至底部，之後以定量清水懸浮之。

方法二：將收集之糞便分別加入n-Butanol: n-Hexane: 蒸餾水 = 4:1:10，再以均質機攪拌混合，經1500轉,15分鐘離心後，去上層液。若沉澱物多，則重覆上述程序1-2次。

4-3 病毒包容體之檢驗

以吸管吸取懸浮液滴於載玻片上，用倍率10×10以上的光學顯微鏡觀察之，若無類似包容體物質表示沒有被感染。若有，則可再用以下之染色法證明之。

(1)0.05%孔雀綠水溶液染色。

(2)0.1%伊紅水溶液染色。

草蝦桿狀病毒以糞便檢驗時，以吸管吸取糞便，經過研磨後，吸取少許塗抹於玻片上，直接以顯微鏡觀察，可在雜質堆之中發現病毒包容體，顯出近似圓形的顆粒（圖2-7、2-8）。以正己烷和正丁醇去除脂溶性物質之後，再以孔雀綠或伊紅水溶液染色，以光學顯微鏡觀察，可更清楚觀察MBV病毒包容體，分別顯出綠色及紅色（圖2-9），直徑約2 - 10 μ m，同時亦可見幾丁質殼碎片、砂子，藻類及牡蠣等雜質。圖2-7是草蝦苗眼幼蟲期之糞便抹片檢查，見到少量MBV包容體；圖八為吸取感染嚴重之病蝦白色糞便，直接將之塗抹於玻片，以相位差顯微鏡觀察，在粘稠液裡面含有相當大量的MBV包容體。

5. 免疫螢光抗體標識MBV包容體，步驟如下：

(1)將取得的糞便沈澱物塗抹於玻片上，在室溫下陰乾。(2)以PBST（含0.5%的Tween-20之磷酸緩衝液pH 7.2）洗2至3次。(3)滴上一滴200倍稀釋的抗MBV多角體蛋白（polyhedrin）血清，於室溫下的潮濕暗箱內作用1小時。(4)以PBST洗2至3次。(5)滴上一滴已經螢光色素（FITC）標識的抗家兔山羊血清（Goat-anti-Rabbit Antibody），同樣於潮濕的暗箱中作用1小時。(6)再以PBST沖洗3次。(7)在塗抹片上置上一滴甘油後蓋上玻片，並於螢光顯微鏡下（Olympus VANOX）下觀察。

糞便抹片以螢光抗體標識後，在螢光顯微鏡下觀察，可見到波長525nm黃綠色螢光（圖2-10）被標識上螢光的病毒包容體。

6. 電子顯微鏡技術診斷法

穿透式電子顯微鏡技術：

將樣本之肝胰腺取出，以利刃切成邊長約為1mm的立方體（後期幼生則取整個肝胰腺），以2.5% Glutaraldehyde / Phosphate buffer（0.1M, pH7.3）於4°C下固定1小時，然後以0.1M phosphate buffer / 5% Sucrose於4°C下清洗2次，每次15分鐘，接著以1% OsO₄ / phosphate buffer在室溫下固定1小時，再以0.1M phosphate buffer清洗兩次，每次15分鐘，然後以酒精逐漸脫水（50%10分鐘→70%10分鐘→80%10分鐘→90%10分鐘→95%10分鐘→100%15分鐘→100%15分鐘）。先以無水丙酮置換酒精，再以樹脂（spurr）（見附錄）與丙酮比例1:1（30分鐘）→3:1（30分鐘）→1:0（一小時）→1:0（一小時）逐次用樹脂將丙酮置換出。最後將組織塊取出置於膠囊內，加入樹脂（Spurr）進行包埋。在70°C恆溫箱內放置24小時，樹脂即可達到相當硬度。以超薄切片機切成500-800Å之薄片，置於銅網（grid）上，經醋酸鈾（染15分鐘）、草酸鉛（染4分鐘）之雙重染色後，於穿透式電子顯微鏡（TEM H-600 HITACHI Japan）下觀察並照相。使用電壓為75KV。

經由電子顯微鏡觀察感染草蝦桿狀病毒之草蝦肝胰腺細胞，可清楚分辨出游離的病毒粒子和包在多角體結晶蛋白間的病毒粒子（圖2-11）。

電子顯微鏡負染色技術：

Sample以少量的TE buffer（pH7.4）懸浮，取至少5μl滴於事先鍍好碳膜的300網目之銅網上，靜置一分鐘後以濾紙由邊緣吸除，然後滴2%磷鎢酸（Phosphotungstic acid, PTA）染30秒，染後以濾紙將染劑吸乾，陰

乾後以穿透式電子顯微鏡觀察。

負染色後觀察之病毒粒子為長桿狀，並同時可見分離的多角體蛋白晶體（圖2-12）。

組織抹片方法⁽⁹⁹⁾用來檢查MBV簡單方便且容易操作，但是筆者認為較不適用於較大的蝦子，由於肝胰腺中大量脂肪球與組織碎片干擾，容易產生誤判，輕微MBV的感染不易檢測到，除非蝦子受到嚴重感染，才可在抹片中看到MBV包容體。然而對於小蝦及蝦苗之檢驗則是一不錯之方法，只要在壓片時力道適當，蝦苗體內的肝胰腺細胞就會很均勻地散開，而得到相當準確的檢驗。此方法配合孔雀綠或伊紅染色，則更易於觀察。

組織病理檢驗法是以固定液事先將組織固定，石蠟包埋，切片，其方法與結果可在相當多報告中得到資料，但都只是判斷有無感染^(45,56,60,96)，很難在感染程度上做判斷，後幼生期以及小蝦的組織切片通常是大部分肝胰腺細胞受到感染，然而蝦子愈大，感染部位的相對愈小，在大蝦的切片，常只在少數肝胰管中發現被MBV病毒感染的細胞。而以連續切片進行病理檢驗時很難將整個肝胰腺切完，尤其大蝦肝胰腺盲管數以萬計，少數盲管的感染可能因切片疏忽而無法由組織病理切片檢驗到。

糞便檢查MBV包容體技術過去並未有相關報告，待檢之草蝦蓄養於約20升的小桶內，給予打氣，並定時給餌，且要時時注意水質是否惡變，如殘餌過多、脫殼或排卵，其常會造成大量泡沫出現，此時必須適量換水。一般蓄養兩天的草蝦，並不會因緊迫（stress）過大而引起死亡，經過長途運輸的母蝦已受到相當大的緊迫，有助於檢驗的準確性，因輕度感染的草蝦桿狀病毒包容體會因緊迫而增加，並隨糞便排出⁽⁴⁶⁾。給予餌料後，在12小時左右即可排糞，但少數蝦子則無，而在兩天的蓄養，每隻蝦子皆可採得足量的糞便以供檢驗。圖八是直接以蝦子糞便抹片檢查，發現大量病毒包容體存在於糞便中，但這只見於少數的例子，糞便仍須經過萃取及離心濃縮，才能準確檢疫。

經有機溶劑處理過的糞便，雖可以排除油滴的干擾，但非溶性的小量雜質仍常使我們誤判，而疑似包容體的物質可以滴入0.05%孔雀綠或0.1%伊紅水溶液染劑進行進一步之判別。孔雀綠染色時，由於MBV包容體是蛋白質結晶體^(46,99)，其對於染劑吸附力強，所以包容體被染成藍綠色。而MBV包容體有嗜酸的特性，以酸性伊紅水溶液染色，包容體很快被染成紅紫色^(3,99,100)，有些雜質在使用染劑時亦會被染上顏色，但以形狀和染色情形已足以判別是否為MBV，然而利用螢光抗體標識，MBV包容體經專一性的抗體

連結，在連結上帶有螢光染劑（Fluorescence isothiocyanate, FITC）的二次抗體，在紫外燈照射下，吸收495 nm光波而放出波長525 nm的光，此種方法較準確且專一，由本實驗結果證明由糞便看到的確為MBV包容體。昆蟲多角體病毒之螢光免疫檢驗法亦被利用於田間土壤的NPV包容體檢驗⁽⁷⁷⁾，而中腸腺壞死桿狀病毒（BMN）亦發展螢光抗體應用於檢疫⁽¹³²⁾。所以可用此方法來進行MBV的檢疫。

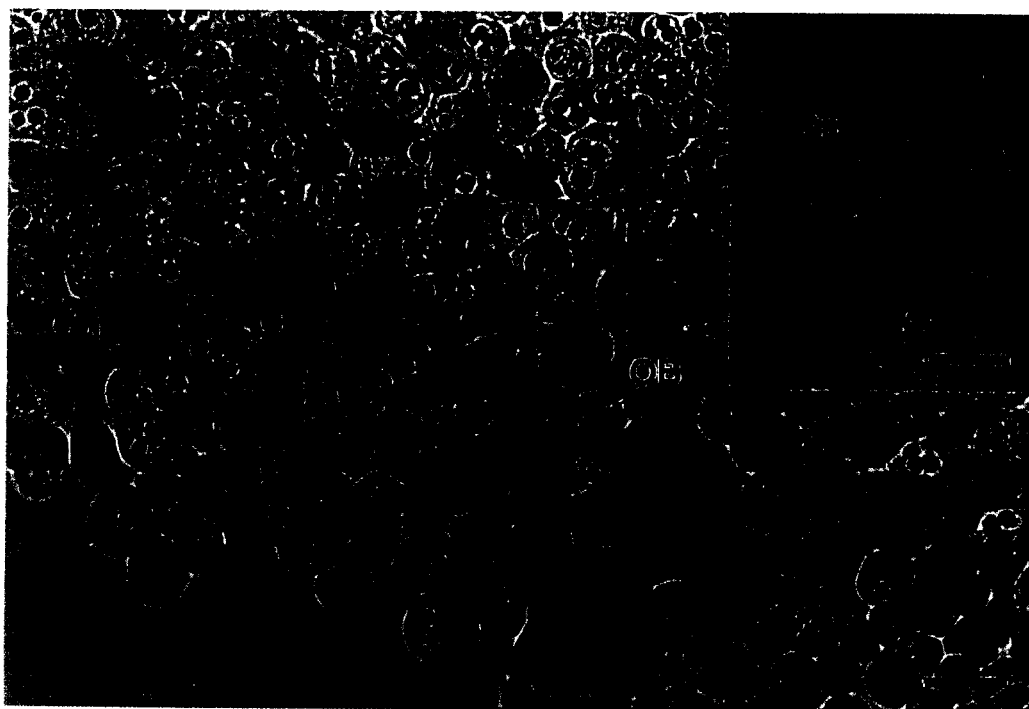


圖2-2 草蝦肝胰腺抹片，0.1%伊紅水溶液染色，草蝦桿狀病毒（*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV）包容體（OB）在細胞核內被染成紫色，bar=50 μ m。右上放大圖顯現包容體有裂開之特徵，bar=25 μ m。

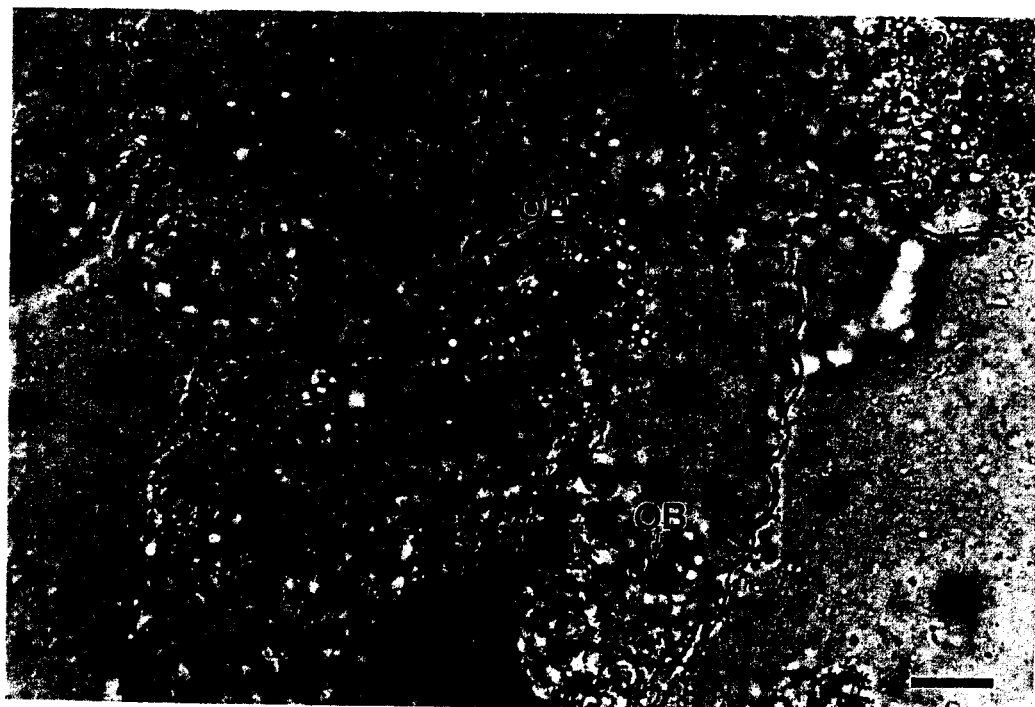


圖2-3 草蝦肝胰腺抹片，0.05%孔雀綠水溶液染色，草蝦桿狀病毒（*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV）包容體（OB）在細胞核內染成綠色。bar=50 μ m。



圖2-4 草蝦後幼生期 (postlarvae) 組織病理圖，肝胰腺細胞嚴重感染草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV)。蘇木紫與伊紅染色。bar=50 μ m。

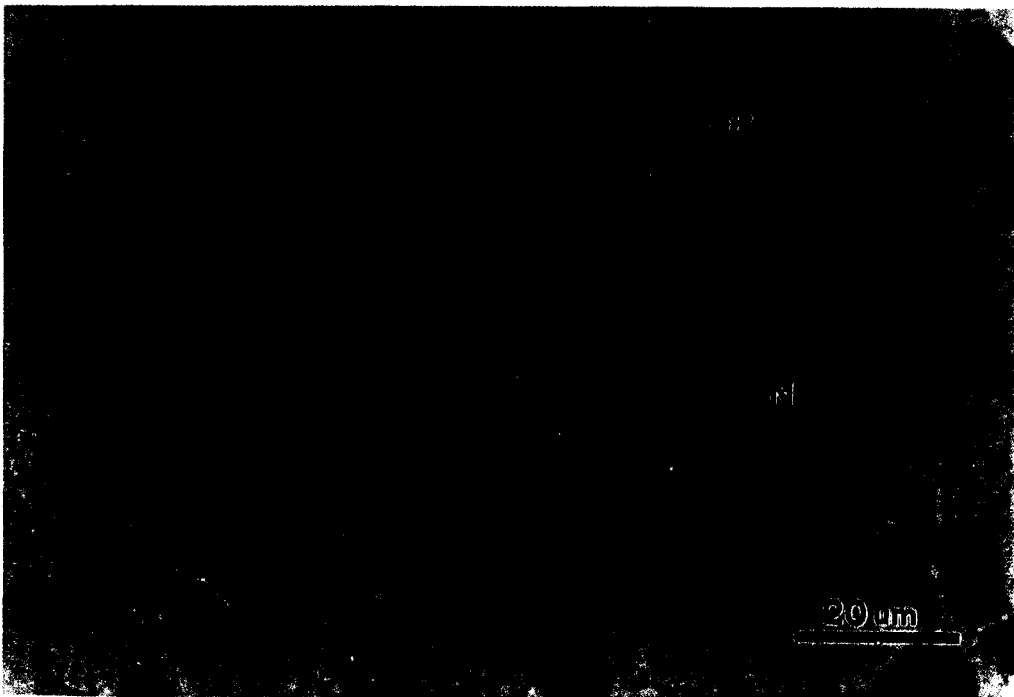


圖2-5 草蝦肝胰腺石蠟切片，以 Feulgen reaction 方法染色，Schiff reagent 使細胞核出現紫紅色反應。N：細胞核、OB：MBV 包容體。

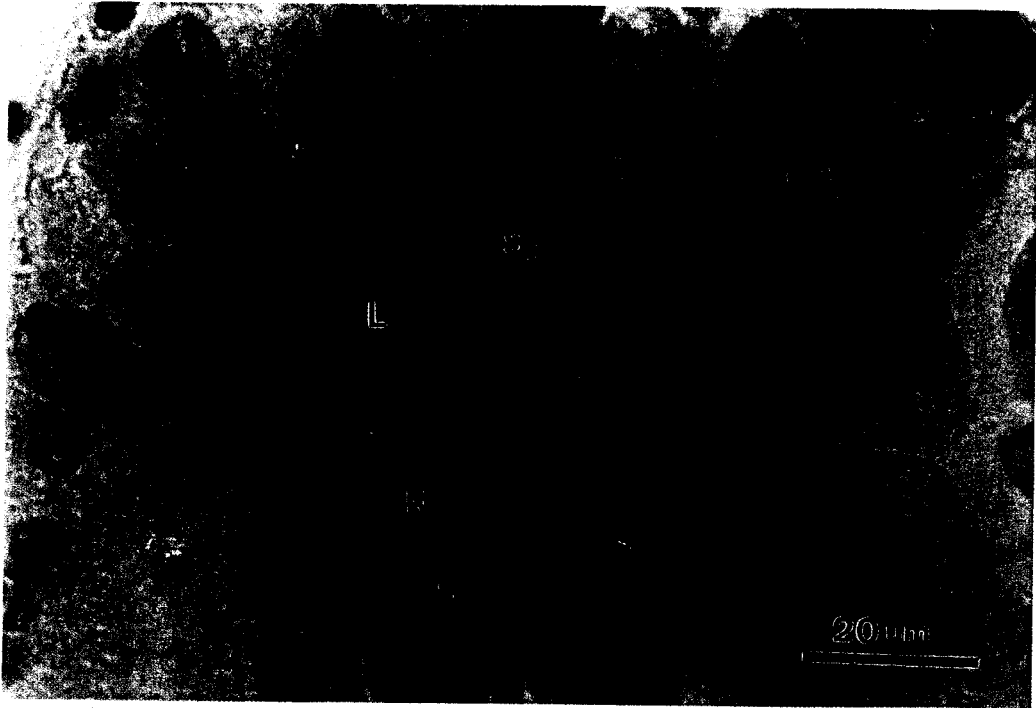


圖2-6 草蝦肝胰腺石蠟切片，以 Feulgen reaction 方法染色，Fast green 當背景色，與圖三比較，MBV 包容體顯出綠色反應，紫紅色為核酸部分。L：管腔、N：細胞核、OB：MBV 包容體、S1：初期感染的細胞核、S2：末期感染的細胞核。



圖2-7 草蝦眼幼蟲期 (Zoea stage) 檢驗草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon* -type Baculovirus; MBV)，自糞便 (FC) 中檢出 MBV 包容體 (OB)。伊紅染色。bar=100 μ m。

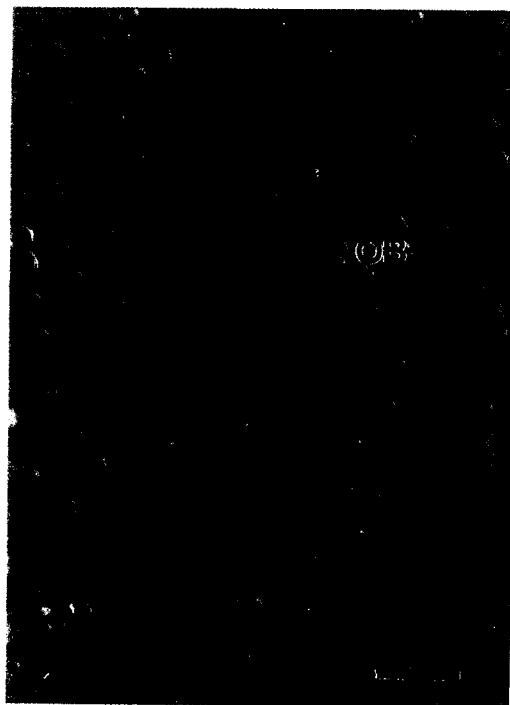


圖2-8 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon* -type Baculovirus; MBV) 檢驗法，自病蝦糞便抹片檢驗，在相位差顯微鏡觀察，存在大量 MBV 包容體。bar=25 μ m。

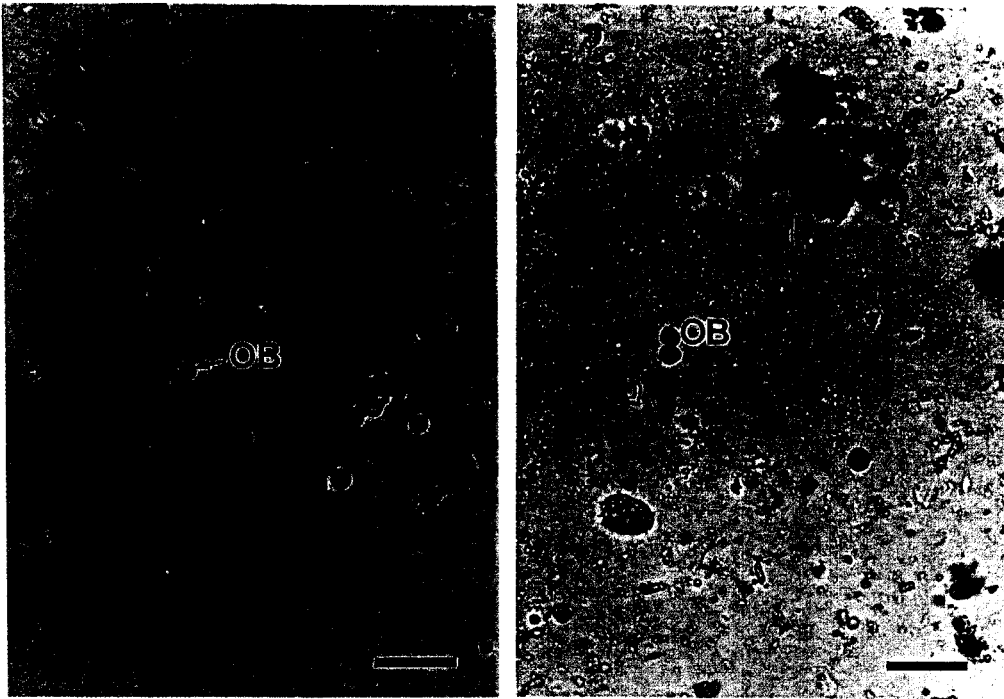


圖2-9 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 檢驗法，自草蝦糞便檢驗包容體 (OB)，分別以孔雀綠和伊紅染色。bar=50 μ m。

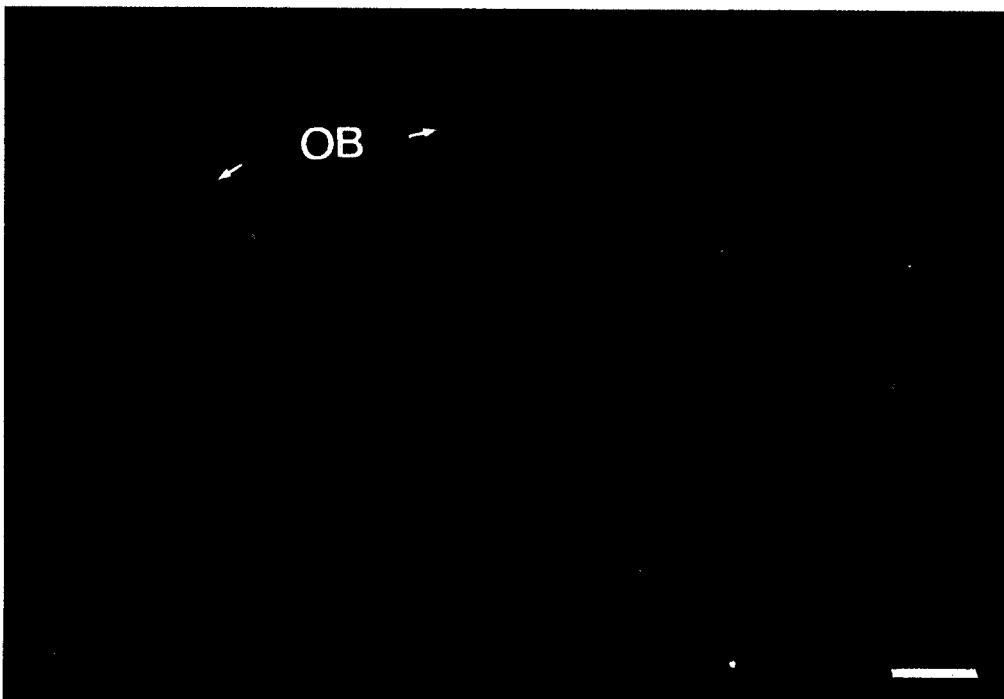


圖2-10 螢光 (FITC) 抗體標識糞便內草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 包容體 (OB)，在螢光顯微鏡下包容體顯出黃綠色螢光。bar=50 μ m。



圖2-11 高倍下的MBV包容體。E：外套膜、NC：核酸鞘、P：多角體蛋白。

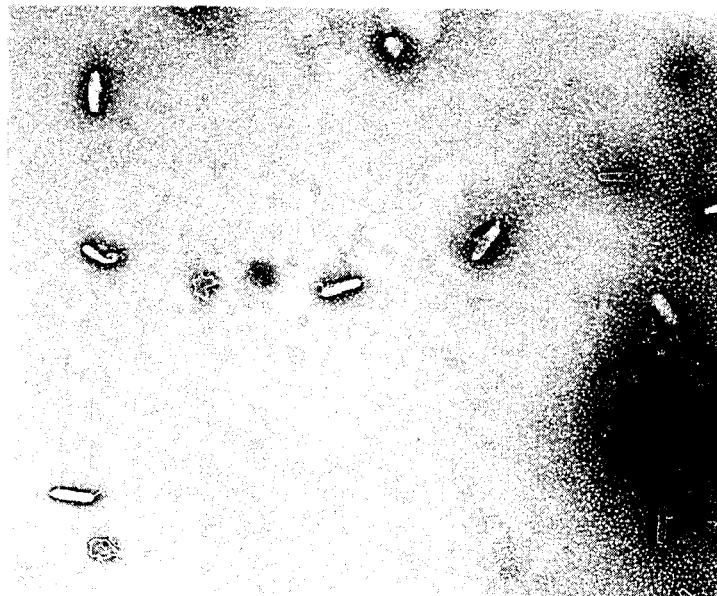


圖2-12 以負染色技術處理之MBV，在穿透式電子顯微鏡下觀察，放大倍率為17000倍。

第三章 草蝦桿狀病毒之流行病學研究

草蝦桿狀病毒 (MBV) 對草蝦 (*P. monodon*) 的感染, Lightner (1985) 曾在菲律賓、台灣、馬來西亞、新加坡、墨西哥、夏威夷、大溪地等地發現⁽⁹⁹⁾, 而感染 *P. merguensis* 則在新加坡、馬來西亞被檢出⁽³³⁾。在義大利的 *P. kerathrerus* 和波斯灣的 *P. semisulcatus* 亦曾發現感染了 MBV。除了 Lightner 發表的地區外, 日本、澳洲也相繼有報告, 來自台灣的種草蝦在日本進行人工繁殖, 在後幼生期檢出有 MBV 的感染⁽⁶⁴⁾。澳洲育苗場內的草蝦苗亦發現 MBV 感染, 而 *Penaeus merguensis*⁽⁵⁶⁾ 及 *P. plelejus* 亦發現會被 MBV 感染。對蝦桿狀病毒 (BP) 感染流行的區域和種類大多在美洲大陸, 如在佛羅里達及密西西比州的 *P. aztecus*、*P. duorarum* 和 *P. setiferus*^(54,119), 巴拿馬、哥斯大黎加、厄瓜多爾和德州的 *P. vannamei*、*P. stylirostris*⁽¹⁰¹⁾, 夏威夷的 *P. marginatus*⁽³⁴⁾ 等。BMN 的發現, 到目前為止只侷限於日本斑節蝦 (*P. japonicus*) 的養殖和繁殖場⁽¹³³⁾。

1984-1988年, 調查台灣養殖之草蝦及紅尾蝦感染草蝦桿狀病毒, 結果如表3-1, 自1984至1986的草蝦後幼生期樣本, MBV 感染率為17% 然而到1988年則增加為85%。在幼蝦階段, 1985至1986年 MBV 感染率只有15%, 而1987和1988之感染率分別為80和82%。而1989-1990年期間, 採樣自台灣與東南亞養殖之草蝦, 以戴維生固定液固定後, 進行組織病理檢驗, 每次採樣皆可檢出 MBV, 感染率43%-85% (表3-1)。

感染在草蝦體內之病毒種類主要以草蝦桿狀病毒為主, 其次如肝胰腺類微小DNA 病毒 (HPV) 和傳染性下皮及造血組織壞死病毒 (IHHNV) 偶而可發現, 而中腸腺壞死桿狀病毒 (BMN) 和對蝦桿狀病毒 (BP) 兩種桿狀病毒則皆未在所有草蝦檢體內發現感染。IHHNV (圖3-1) 與 HPV (圖3-2) 之感染率皆很低, 分別為0-5%及1-9%不等。

種蝦之 MBV 感染檢驗結果, 如表3-1, 採自繁殖場的母蝦有52%的感染率, 而直接採自外海的, 感染率為17%。1988年以後繼續較大規模之採樣調查, 母蝦來自本省沿海, 馬來西亞和印尼海域, 檢驗法是採糞便檢驗, 在1989-1990年間總共採得樣品10組, MBV 檢驗結果見表3-2, 發現感染率自14.1%至94%不等, 本省沿海在前2次採樣平均感染率為90.5%, 而在1989年底以後4次採樣平均值為48.8%, 有減少的趨勢, 而馬來西亞及印尼海域之 MBV 感染率平均約47%。

草蝦桿狀病毒感染養殖蝦類，Lightner於1987年曾在台灣進行蝦病調查報告⁽¹⁰³⁾，體重在0.15-12g的小蝦，MBV感染率為73%，筆者在1986-1988年對本省後幼生期之MBV感染率進行研究，其感染率常可達八成以上，而15g以內的小蝦MBV感染率為40%，母蝦感染率為20%（見表3-1）。在筆者實驗裡，種母蝦的MBV檢驗是由糞便中檢驗包容體，其感染率由14.1%到94.3%不等，進口的母蝦平均感染率在47%左右，而本省沿海產母蝦之MBV感染率在1989年初，兩次檢驗感染率平均90.5%，而在後來的數據平均降至48.8%與來自國外的種蝦47%相近，Fegan et al. (1991)發表泰國南部母蝦之MBV感染率，有17%及51%⁽⁶⁰⁾。因此推斷MBV感染的種草蝦分布區域包括了台灣海峽南部，麻六甲海峽一帶及印度洋泰國南部沿岸等，而且感染率皆在10%以上，平均約為50%。

表3-1 Investigation of Monodon Baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* and *Penaeus penicillatus* cultured in Taiwan and Southeastern.

台灣及東南亞之草蝦及紅尾蝦感染草蝦桿狀病毒 (Monodon Baculovirus, MBV) 感染率調查表

採樣年度	種類	採樣地點	樣本大小	樣本總數量 (採樣次數)	感染數*	感染率 (%)
1984-1986	草蝦	台灣	黑殼	125 (5)	22	17
1985-1986	草蝦	台灣	幼蝦	320 (70)	21	15
1987	草蝦	台灣	幼蝦	403 (49)	325	80
1987	紅尾蝦	台灣	幼蝦	75 (7)	21	28
1987	紅尾蝦	台灣	黑殼	252 (4)	78	30
1987	草蝦	台灣	種蝦 (採自孵化場)	25 (3)	13	52
1987	草蝦	台灣	種蝦 (採自海邊)	12	2	17
1988	草蝦	台灣	幼蝦	525 (95)	437	82
1988	草蝦	台灣	黑殼	46 (23)	39	85
1988	草蝦	台灣	種蝦 (採自海邊)	250	127	51
1988	草蝦	泰國	幼蝦	102 (10)	44	43
1989	草蝦	泰國	黑殼	66 (4)	52	79
1989	草蝦	菲律賓	幼蝦	15 (3)	7	47
1989	草蝦	印尼	幼蝦	45 (4)	24	53
1989	草蝦	台灣	幼蝦	65 (7)	32	49
1990	草蝦	台灣	黑殼	75 (3)	53	71

*：每一實驗蝦子肝胰腺至少切成三塊行組織病理檢驗。

表3-2. Examination of *Penaeus monodon* -type baculovirus (MBV) infection in imported and local broodstocks used in Taiwan.
台灣蝦苗繁殖場使用之種母蝦之MBV感染調查

日期	來源	採樣數量	感染數	感染率 (%)
01.26,1989	馬來西亞	122	67	54.9
02.01,1989	台灣	53	50	94.3
03.03,1989	馬來西亞	135	74	54.8
03.20,1989	印尼	99	14	14.1
03.27,1989	台灣	60	52	86.7
04.04,1989	印尼	78	50	64.1
10.02,1989	台灣	31	17	54.8
02.10,1990	台灣	25	13	52.0
07.20,1990	台灣	20	9	45.0
09.15,1990	台灣	23	10	43.5

MBV檢驗是以糞便檢驗法進行檢驗。

1988至1989年幼蝦之 MBV感染率調查，台灣、泰國、菲律賓及印尼不同來源幼蝦，以組織病理切片檢驗，MBV之感染率為43%-85%，Fegan et al. (1991) 在其報告裡提到泰國南部繁殖場後幼生期之MBV感染率為100%⁽⁶⁰⁾。由於種蝦與幼蝦之檢驗法不同，前者以糞便檢驗法為主，後者則以組織病理切片法，在較大的蝦子以組織病理切片檢驗法會有失誤。

由MBV流行調查，加上其他有關MBV之感染調查報告^(3,56,60,64,102)，可見只要有草蝦的養殖，就可發現MBV的感染。

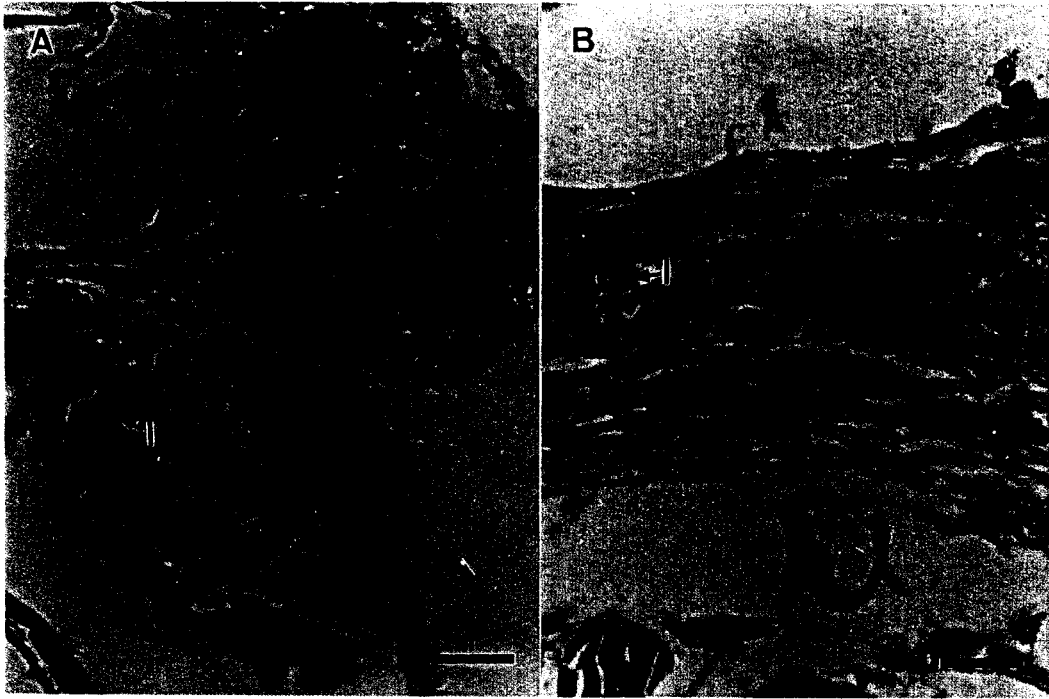


圖3-1 草蝦上皮組織 (A) 和神經纖維組織 (B) 感染傳染性下皮及造血組織壞死病毒 (IHHNV)。蘇木紫與伊紅染色。bar=25 μ m。

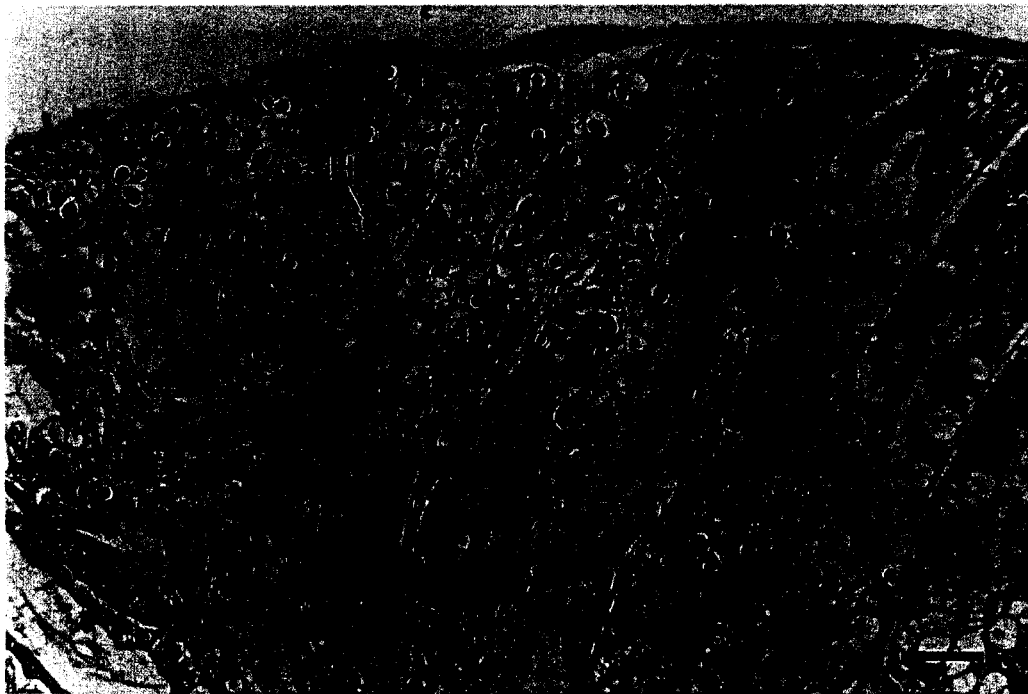


圖3-2 草蝦肝胰腺細胞嚴重感染肝胰腺類微小DNA病毒 (HPV)。蘇木紫與伊紅染色。bar=100 μ m。

第四章 草蝦流行病病理研究

1. 組織病理檢驗：

1989年自本省和東南亞草蝦病變流行地區採集病蝦，進行組織及細胞病理的研究，發病大多是放養1-2個月的池蝦，其主要病徵是厭食，活力減退，得病的小蝦體色變灰黑，嚴重者為紅棕色（圖4-1），沉於池底不喜游動，會引起大量死亡，其肝胰腺未見腫大，然亦呈現紅棕色，腸道有白色物質（圖4-1）；中、大蝦得病時大多靠岸邊，或時而浮在水面，無力地游動，身體上常有污穢物附著（圖4-2），體色亦變為暗灰。解剖病蝦觀察，其肝胰腺有發炎腫大的現象（圖4-3A、B），或是萎縮（Atrophy）透明病變（圖4-3D、E）或硬化黑變（圖4-4）；腸道內的物質為白色濃狀物或空無一物（圖4-4至4-6），腸道白色物主要為細胞碎片，然而部份病蝦發現為大量MBV 包容體（圖2-8）。另外罹病草蝦尾扇邊緣常見有退色現象（圖4-7）。

病蝦肝胰腺經組織病理檢驗，以 H&E和Giemsa染色，顯微鏡下觀察，發現急性死亡病蝦肝胰腺，部份盲管上的功能細胞大量脫落（圖4-8、4-9），同時核呈現濃染現象（pyknosis）（圖4-8）和有大量MBV 感染（圖4-9），以Giemsa染色後，以高倍率顯微鏡觀察，在脫落細胞病變區發現被染成深藍色的菌落（圖4-10、4-11），膨大的盲管間隙也見到細菌（圖4-12），這時應為菌血現象，在菌落分布處聚集了各型血球（均質性、半顆粒性及顆粒性血球）（邱，1988），進行吞噬及纖維化（圖4-12）；病蝦池在突發性大量死亡之後數日至數星期，會出現病蝦靠岸邊，持續性罹病和死亡，其肝胰腺通常可見大量血細胞包圍盲管，其外圍由類上皮細胞（epithelioid cell）包住，將盲管包圍，此時盲管內已無正常的肝胰腺細胞，此即形成肉芽腫（granuloma）病癥（圖4-13）。由於盲管間隙漲大後被纖維網取代，引起鄰近盲管細胞形態變性成為立方型（cubic type），甚至自基底膜剝離（圖4-14、4-15），形成繼發性肝胰腺盲管萎縮（secondary contracted lumen）。由於肝胰腺細胞大量流失，病變區即由纖維取代（圖4-16），最後引起肝胰腺組織纖維化，造成肝胰腺的萎縮，此時盲管間隙皆可見到菌落，而盲管內若有菌落，則會有血細胞的滲出（圖4-17），核出現濃染現象，盲管形成黑變組織。

2. 電子顯微鏡技術檢驗：

病變的肝胰腺組織以穿透式電子顯微鏡觀察，其微絨毛顯然已不完整（圖4-18），基底膜增厚且形成皺摺狀（圖4-18、4-19），細胞核內染色質也不正常的聚集（pyknosis）（圖4-19），有些部位細胞已開始溶解，細胞膜界線已不清楚（圖4-19），顯然引起細胞極大的病變，細胞並未發現MBV 感染；細菌可被發現在盲管腔（lumen）（圖4-19）與盲管間（sinus）（圖4-20），基底膜與外圍的肌細胞剝離（圖4-21）。

3. MBV感染與草蝦流行性肝胰腺病變之關係：

於1988-1989年在台灣南部、泰國中部、菲律賓和印尼爪哇等地進行病蝦採樣，以組織病理切片、H & E 及Giemsa染色法染色，檢驗MBV的感染率及感染程度，並觀察記錄其組織病理變化，探討其間之關係。

採樣對象有病蝦池與正常蝦池，病蝦池分急性病變與慢性病變。急性病變乃是池蝦不明原因吃餌突然減少，隔日即見大量病蝦靠岸；慢性病變乃是池蝦引起持續性的死亡。由採自各地區的草蝦肝胰腺進行病理學分析，檢測MBV感染程度、肝胰腺纖維化的程度和病理切片中細菌發現的有無，將之整理如表4-1-A、B、C和圖4-22。

表4-1 採樣自草蝦急性病變、慢性死亡及正常蝦池，其MBV感染程度、肝胰腺組織病變和細菌有無之組織病理檢驗表。

A、急性病變（共有七處來源，頻臨死亡草蝦樣本61隻）

MBV 感染程度	HP肉芽腫或纖維化程度	細菌之感染	代號	尾數(百分比)
有大量 MBV 集中感染	50%以上組織纖維病變	v	1	0
		x	2	0
	有纖維病變，少於50%	v	3	0
		x	4	0
	未見纖維病變	v	5	5 (13.1%)
		x	6	1 (1.6%)
有MBV 感染	50%以上組織纖維病變	v	7	0
		x	8	0
	有纖維病變，少於50%	v	9	2 (3.3%)

草蝦桿狀病毒之特性

於少數細胞		x	10	1 (1.6%)
	未見纖維病變	v	11	13 (21.2%)
		x	12	2 (3.3%)
未見MBV 感染	50%以上組織纖維病變	v	13	0
		x	14	0
	有纖維病變，少於50%	v	15	2 (3.3%)
		x	16	0
	未見纖維病變	v	17	32 (52.5%)
		x	18	0

B、慢性死亡（共有12處來源，頻臨死亡草蝦樣本82隻）

MBV 感染程度	HP肉芽腫或纖維化程度	細菌之感染	代號	尾數(百分比)
有大量 MBV 集中感染	50%以上組織纖維病變	v	1	0
		x	2	0
	有纖維病變，少於50%	v	3	1 (1.2%)
		x	4	0
	未見纖維病變	v	5	2 (2.4%)
		x	6	0
有MBV 感染 於少數細胞	50%以上組織纖維病變	v	7	1 (1.2%)
		x	8	0
	有纖維病變，少於50%	v	9	9 (11.0%)
		x	10	0
	未見纖維病變	v	11	8 (9.8%)
		x	12	0
未見MBV 感染	50%以上組織纖維病變	v	13	31 (37.8%)
		x	14	0
	有纖維病變，少於50%	v	15	22 (26.8%)
		x	16	0
	未見纖維病變	v	17	6 (7.3%)
		x	18	2 (2.4%)

C、正常草蝦（共採樣三處30隻）

MBV 感染程度	HP肉芽腫或纖維化程度	細菌之感染	代號	尾數(百分比)
有大量 MBV 集中感染	50%以上組織纖維病變	v	1	0
		x	2	0
	有纖維病變，少於50%	v	3	0
		x	4	0
	未見纖維病變	v	5	0
		x	6	2 (6.7%)
有MBV 感染 於少數細胞	50%以上組織纖維病變	v	7	0
		x	8	0
	有纖維病變，少於50%	v	9	0
		x	10	0
	未見纖維病變	v	11	0
		x	12	10 (33.3%)
未見MBV 感染	50%以上組織纖維病變	v	13	0
		x	14	0
	有纖維病變，少於50%	v	15	0
		x	16	0
	未見纖維病變	v	17	0
		x	18	18 (60.0%)

急性病變在肝胰腺極少有纖維病變，但是皆見肝胰腺細胞有壞死、脫落和核濃染現象，病理切片發現有細菌感染，統計結果有93.4%，且主要出現在盲管間的血腔中，血腔有擴大現象，並有血球聚集的情形。MBV感染率有44.3%。少有纖維或肉芽腫病變，約只佔6.56%（見表4-1-A和圖4-22）。

慢性病變常見的是病蝦肝胰腺萎縮黑變或透明病變，細胞形態顯然變性，盲管間隙之血腔有明顯的纖維病變和盲管肉芽腫病變，統計結果佔78.05%。然而在採樣時，仍然有採到病蝦樣本類似急性死亡之肝胰腺腫大之病變。此種草蝦病變之發生會持續一段時間。此種病變之MBV感染率較低，約佔25.7%（見表4-1-B和圖4-22）。

正常草蝦肝胰腺皆無纖維化、無細胞病變，顯微鏡下觀察亦皆未發現細

菌，有MBV 感染之個體佔40.0%（見表4-1-C和圖4-22）。

在正常的蝦體內，肝胰腺外觀正常，病理切片沒有壞死或肉芽腫的病變，但卻有 MBV感染（圖2-4），劉和簡（1988）亦指出 MBV感染肝胰腺症其外觀是正常⁽¹³⁾。又由病蝦肝胰腺組織病理與細胞病理觀察，說明了在部份病蝦的病灶處並未發現 MBV病毒的感染（圖4-8、4-18、4-19）。由表4-1—A和B指出，垂死病蝦不一定有MBV感染跡象。然而急性病變的病理切片可見壞死的細胞呈現核濃染，和大量菌落（圖4-10）。由實驗室蓄養感染MBV草蝦實驗證明並不引起死亡，以上證據說明了有MBV感染不一定引起病變，而病草蝦不一定能發現到MBV。

相反地，由表4-1—A與C數據比較，急性死亡病蝦之MBV病毒感染程度有比正常草蝦高之趨勢，Fegan et al.（1991）在其報告中也有提到這種現象⁽⁶⁰⁾。由部份病蝦（14.7%）病理切片之顯微鏡觀察，細胞剝落與大量病毒包容體被發現在病變的盲管內，然而只發現少數細菌之參與（圖4-11）。圖4-23是得病之後幼生期蝦苗病理切片，大量MBV包容體被類上皮細胞及纖維包圍，細菌孳生其間（圖4-24），即是所謂的肝胰腺病毒與細菌混合感染症⁽¹³⁾，而未感染MBV之部位則未發生這種病癥，但仍見到菌落（圖4-24）。所以 MBV感染嚴重的盲管較容易受到細菌的侵襲，由於 MBV感染肝胰腺細胞會引起消化功能的消失⁽³⁾。

以上病理學的証據顯示MBV的大量增殖與肝胰腺病變有關係，推測由於病蝦極少進食，消化作用停頓，盲管上細胞新陳代謝速率減低，導致MBV有足夠的時間感染和增殖。又由於MBV感染率在急性病變（44.4%）和正常草蝦（40.0%）之間並無差異，因此草蝦流行病變並非決定於MBV的感染與否，病蝦MBV感染程度變為嚴重，應是罹病後引起的結果。

急性和慢性病變之病蝦樣品組織病理檢驗結果，罹病又有MBV感染的樣品分別為44.3和25.3%，由肝胰腺病理研究推論其原因，乃由於慢性死亡病蝦之肝胰腺細胞壞死、流失和組織纖維化，因此慢性病變之病蝦MBV感染率較低。

草蝦養殖期間發生不明原因的大量死亡，研究人員之推測原因有很多，諸如水質原因^(102,122)、餌料不良、藥物濫用或是病原之感染等等。病原的研究最受重視，尤以弧菌屬之研究最多^(7,12,57)，筆者在進行草蝦桿狀病毒的電子顯微鏡檢時，亦發現外型疑似弧菌大量存在病蝦的肝胰腺內⁽³⁾。Liu（1989）亦在其研究結果發現病蝦肝胰腺內有大量桿狀的細菌⁽¹⁰⁴⁾。

草蝦之病原菌分離以 *Vibrio harveyi*, *V. nereis*, *V. damsela* *V.*

tubiashii 及 *V. anguillum* 為最主要⁽⁷⁾。在人工之感染下，*V. harveyi*、*V. nereis* 和 *V. damsela* 皆會使健康草蝦致病^(7,12)。Egusa et al. (1988) 在斑節蝦的組織病理報告裡，以 *Vibrio* sp. 浸泡感染兩小時，研究發病之病蝦組織病理變化，認為主要引起淋巴器官的病變，而肝胰腺亦發現少數黑化結節 (melanized nodules)。結節內有大量細菌，血細胞包圍成多圈，大多數血細胞核濃染 (pyknotic nuclei)⁽⁵⁷⁾。在此肝胰腺組織病理變化之觀察與黃 (1989) 之研究結果類似⁽⁷⁾，肉芽腫的描述則與 Egusa et al. (1988) 報告中提到的結節相同⁽⁵⁷⁾，且在切片染色後，觀察病變區域有大量的細菌。Cheng & Liu (1986) 指出肝胰腺肉芽腫病變是屬於敗血症的特徵病變⁽⁴⁹⁾。

細胞病理學研究結果主要有三種現象，細胞染色質的聚集，細胞的瓦解和基底膜褶起，這些結果與 Liu (1989) 之報告相似⁽¹⁰⁴⁾。由於大量細菌發現於肝胰腺盲管內與盲管間，推測細菌產生的有毒代謝產物引起細胞中毒與瓦解，例如 *V. damsela* 能產生細胞溶解酵素^(90,91)。

早期 Fontaine 和 Lightner (1974) 將洋紅 (Carmine) 以注射針筒打入白蝦 *Penaeus setiferus* 腹部肌肉，注射位置最後被血細胞包圍，並引起纖維化及黑化⁽⁶²⁾，這現象與黃 (1989)⁽⁷⁾ 及本節觀察之肝胰腺病理反應極相似，因此推論病灶纖維化及黑化是對蝦對疾病防禦的一個結果，Egusa et al. (1988) 亦有同樣的認點⁽⁵⁷⁾。蝦子血細胞在細菌侵入後，會具有吞噬細菌的功能⁽¹²¹⁾，又血細胞有趨化性^(24,76)，所以會導致血細胞聚集，一齊於細菌侵入處對付細菌，組織即起發炎反應。另外纖維細胞也會聚集，此行為有限制病原移動的作用。所以肉芽腫的形成是草蝦肝胰腺炎症的一種主要反應⁽⁶²⁾。

肉芽腫 (granuloma) 在蝦體內的形成時間，邱 (1988) 以細菌 *Vibrio parahaemolyticus* 進行肌肉注射，72小時即有肉芽腫形成⁽¹⁾；而黃 (1989) 注射 *V. harveyi*，肌肉的肉芽腫則在10天以後才形成，肝胰腺則在14天以後形成⁽⁷⁾。形成時間長短可能與蝦體大小、感染菌種及數量……等等多項原因有關，由於肉芽腫的形成，在本實驗觀察其意義是炎症的結果，具有保護正常組織的功能，如果肉芽腫大量發生在肝胰腺，則不管其形成多快，它將是造成病蝦慢性死亡的主要病癥。

草蝦急性死亡病變，以前蝦病報告並無明確分辨。鄭 (1989) 由其感染實驗結果，認為大量細菌 *V. damsela* 的侵入會因蝦體防禦機制無法消滅細菌而造成蝦體急性死亡⁽¹²⁾。經調查本省及東南亞養蝦區，草蝦放養一個月

內最容易發生，其體色變紅棕或暗褐色，肝胰腺亦為紅棕，引起大量死亡；一至二個月仍會發生，其體色變較黑，肝胰腺為白濁，體色不一，然而其病理學探討卻一樣，盲管瓦解，細胞壞死，少見血球浸潤，但見菌血現象，盲管少見細菌，此與黃（1989）以大量細菌感染草蝦，引起大量細菌侵襲肝胰腺細胞之結果⁽⁷⁾略有不同，推測細菌有毒代謝物引起敗血症，導致蝦子急性中毒死亡。

Cheng & Liu（1986）研究斷鬚和斷尾病蝦常見菌血現象，其推論是因受傷而導致病原菌侵入，形成二次感染⁽⁴⁹⁾。

草蝦慢性肝胰腺病變，乃當草蝦遭受細菌侵入感染，在肝胰腺所引發病變，可以分為兩種，即肝胰腺黑變硬化症與透明病變，兩者皆為纖維病變，皆會萎縮，但前者萎縮較巨且會硬化，由盲管內含有大量細菌，推論是肝胰腺盲管內受細菌感染之原發性疾病，血細胞大量浸潤盲管內進行吞噬作用，最後形成黑化，與劉、和簡（1989）提到之肝胰腺肉芽腫性炎相同⁽¹³⁾，亦與黃（1989）描述病蝦感染細菌14-21天之肝胰腺病變類似⁽⁷⁾。而透明病變是肝胰腺大部分纖維化或盲管細胞形態變性，推測有兩個原因，一是細菌自其他部位，如淋巴器官，藉由血液移動（migration）至肝胰腺盲管間隙（sinus），另一是受鄰近病變盲管的影響，病變區由於細菌侵犯盲管間隙，導致纖維化，必須注意的，大部份盲管內雖未被細菌侵犯，但彼時四周血液運輸功能已不正常，肝胰腺細胞因而變性成立方形態（cubic），最後會由基底膜剝落，並由纖維或組織液取代，是屬於繼發性的病變。Egusa, et al.（1988）與黃（1988）之病菌感染研究，證明在其他器官亦有細菌感染，尤其淋巴器官^(7,57)。

組織病理研究中有取自東南亞的樣品，其病理變化與台灣的樣品相似，外表病徵也沒有太大的差異，在探討各地區草蝦疾病的過程中，發現肝胰腺在不同健康狀況下，有不同顏色的變化，其顏色變化由白、黃、棕、黑各不相同，而病蝦的肝胰腺都以白黃、藍黑或有透明感的藍色。腫脹發炎的肝胰腺為白濁，萎縮的階段為藍黑色，這其間的變化依據病理學研究結果，我們可以由觀察到的結果整理出一個模式如圖4-25。

得病的池蝦若處理得當，水質未惡化，死蝦能及時清除，最後仍會有殘存的蝦子，並能正常攝餌及長大。在劫後餘生的蝦子肝胰腺石碇切片中，我們發現少數盲管仍保持發炎病徵，而大多數的盲管細胞形態仍保持正常（圖4-26）。由於盲管末端的胚細胞（E-cell）分裂能力很強⁽²⁰⁾，所以草蝦在罹病之後，只要能夠進食，且能夠順利度過蛻殼期，則病蝦仍能活下並成長（

實驗中觀察)，病蝦的死亡大多由於進行蛻殼，因營養不足導致衰弱而亡，有些蛻殼後，有些則蛻殼前死亡，其由肌肉下陷和肝胰腺有發炎後的萎縮現象可得到證明。

對蝦類消化道內有常在菌⁽⁷⁴⁾，猜測可供應寄主維他命及某些氨基酸⁽¹⁵⁴⁾。草蝦腸內菌相與環境菌相有正相關性⁽⁴⁾，而腸內菌相的改變是否引起寄主成長不良或甚至得病，值得加以研究。外在環境或蛻殼週期都會影響消化生理⁽²²⁾，任何恆溫或變溫動物都會有消化不良或甚至腸炎的現象，草蝦肝胰腺是其消化與吸收最主要之所在，病菌在盲管孳生當然會引起發炎現象。所以欲解決草蝦肝胰腺肉芽腫之慢性疾病問題，應從環境上著手--諸如水質改善和生物防治，而且蝦苗場和大蝦場並重。

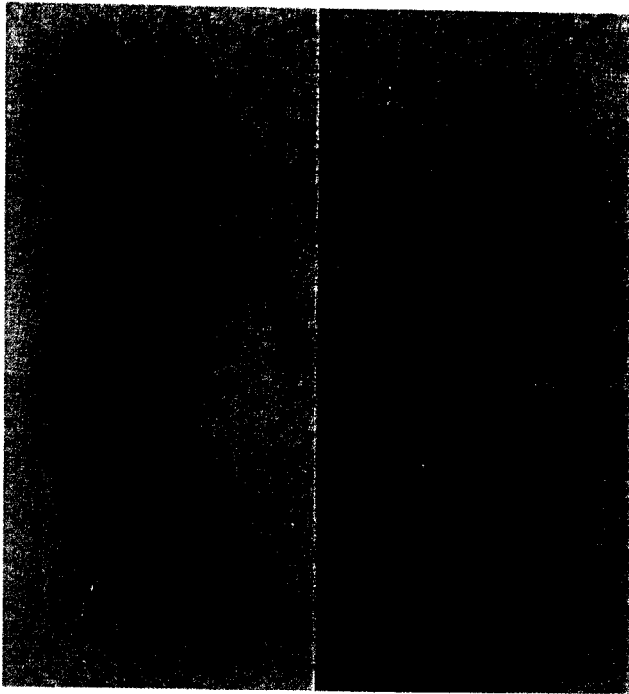


圖4-1 大量死亡幼草蝦病癥，外表體色和肝胰腺呈紅棕色，腸道有白色物（箭頭）。



圖4-2 持續性死亡之病蝦池，常見靠岸病蝦體表污穢（箭頭）

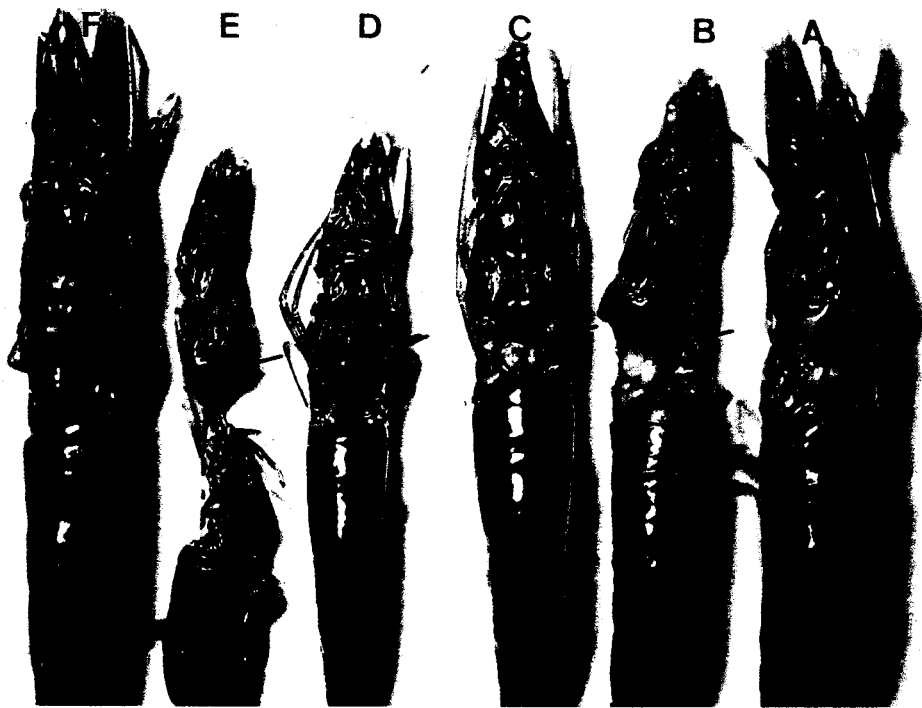


圖4-3 持續性死亡之病蝦池，病蝦肝胰腺出現各種不同狀態，A-C為發病泛白腫大；D-E為透明病變；E為正常狀態。

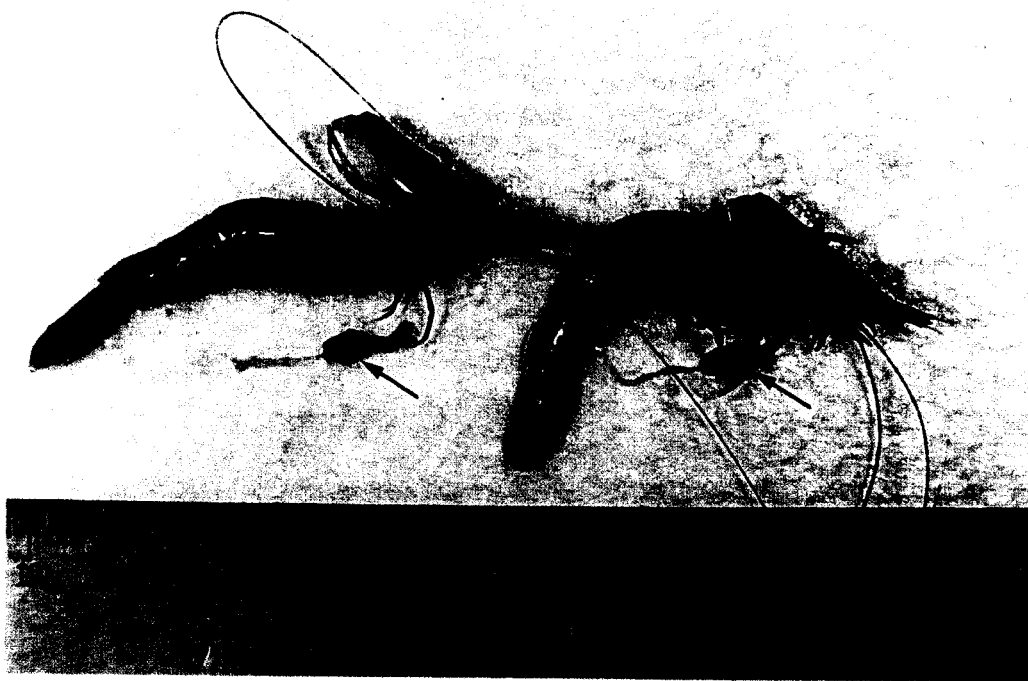


圖4-4 垂死病蝦肝胰腺變黑硬化症（箭頭）。

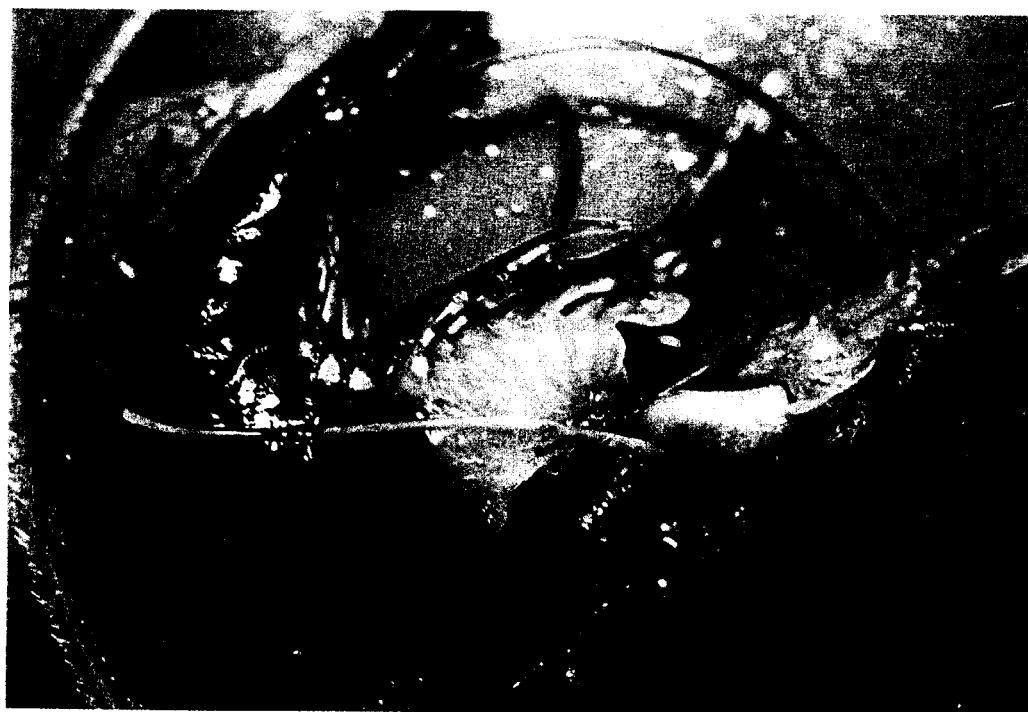


圖4-5 垂死草蝦腸道排出白色濃狀物（箭頭）。

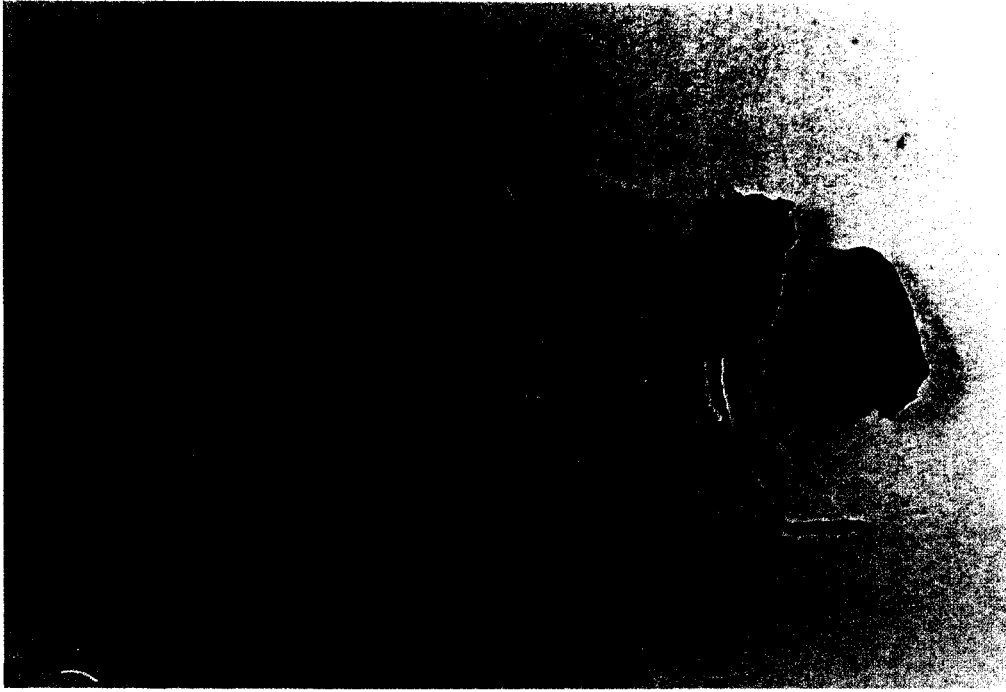


圖4-6 草蝦肝胰腺變黑硬化症與正常者比較，箭頭指示病變組織嚴重變黑，腸道空無一物。



圖4-7 病蝦外表症狀，A為正常蝦，B和C為病蝦，尾扇邊緣色素消失（箭頭）。



圖4-8 病蝦肝胰腺急性壞死症，肝胰腺細胞局部壞死及脫落，蘇木紫與伊紅染色。
° bar=100 μ m °

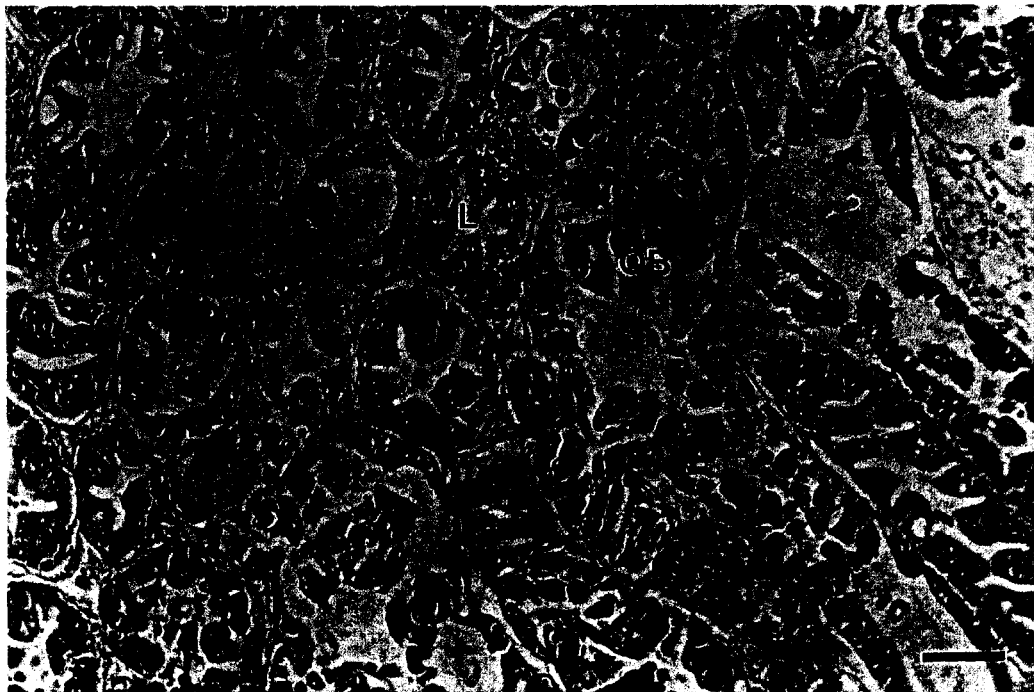


圖4-9 病蝦肝胰腺急性壞死症，局部肝胰腺盲管細胞嚴重感染草蝦桿狀病毒（*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV）、壞死和脫落。蘇木紫與伊紅染色。bar=100 μ m °

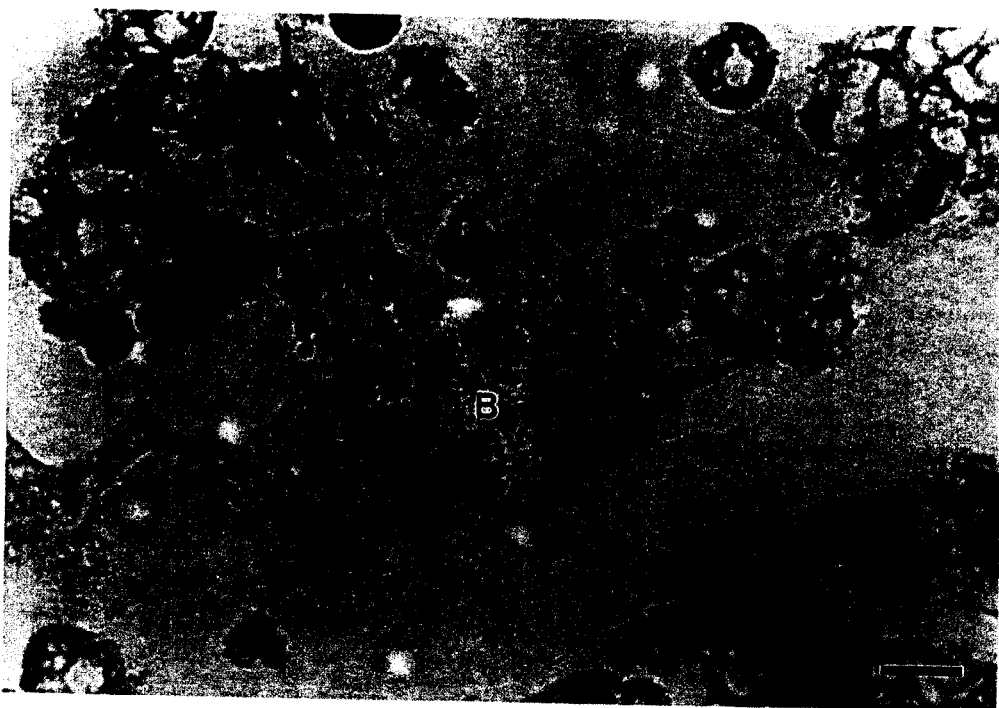


圖4-10 病蝦肝胰腺急性壞死症，壞死組織碎片見大量菌落（B）。Giemsa染色。
bar=25 μ m。

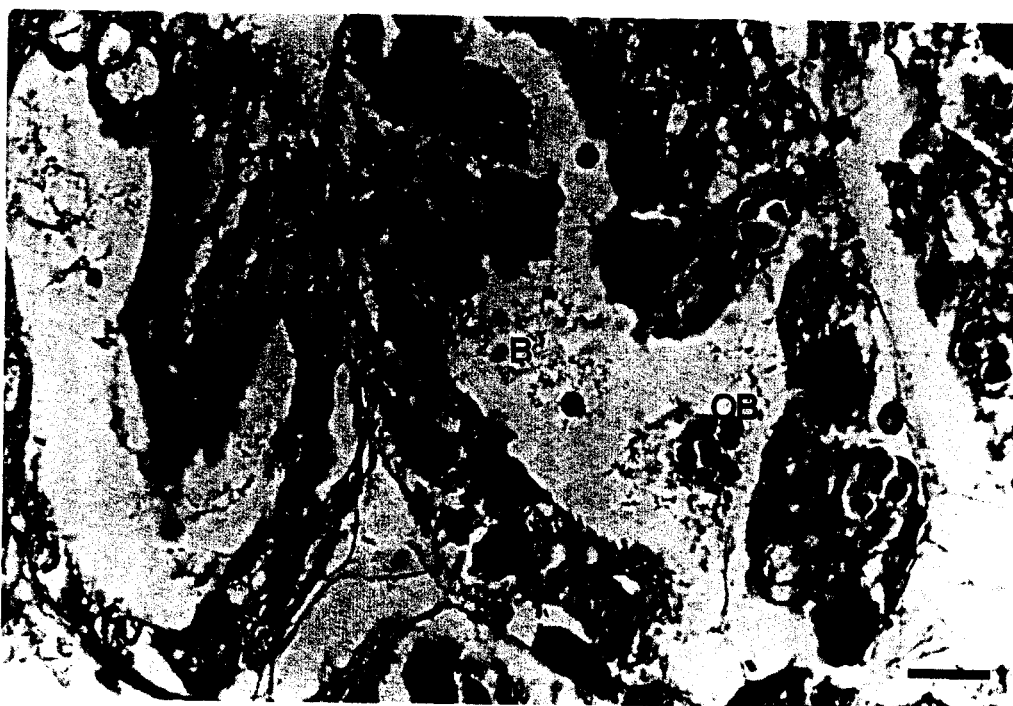


圖4-11 草蝦肝胰腺急性壞死症，壞死脫落細胞嚴重感染草蝦桿狀病毒（*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV），亦發現少量細菌（B）在盲管內。
Giemsa染色。bar=50 μ m。



圖4-12 草蝦肝胰腺腫大症，盲管間隙擴大，有血球細胞之浸潤，並有纖維細胞（F）開始堆積，以及菌血現象。Giemsa染色。bar=25 μ m。



圖4-13 草蝦肝胰腺盲管病灶處形成肉芽腫，類上皮細胞（EC）包圍濃染血球和組織碎片。蘇木紫與伊紅染色。bar=25 μ m。

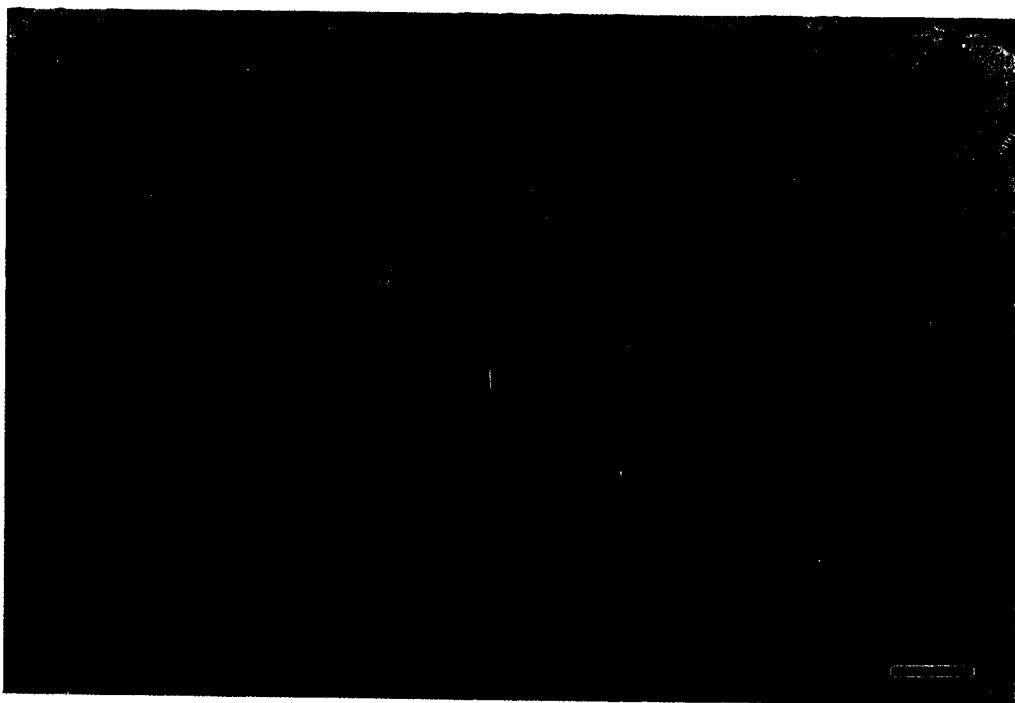


圖4-14 病蝦池持續性死亡病例，肝胰腺透明病變組織病理圖，盲管皮層細胞形態變性，基底膜剝離（箭頭），盲管間隙（S）擴大及纖維化。蘇木紫與伊紅染色。bar=50 μ m。

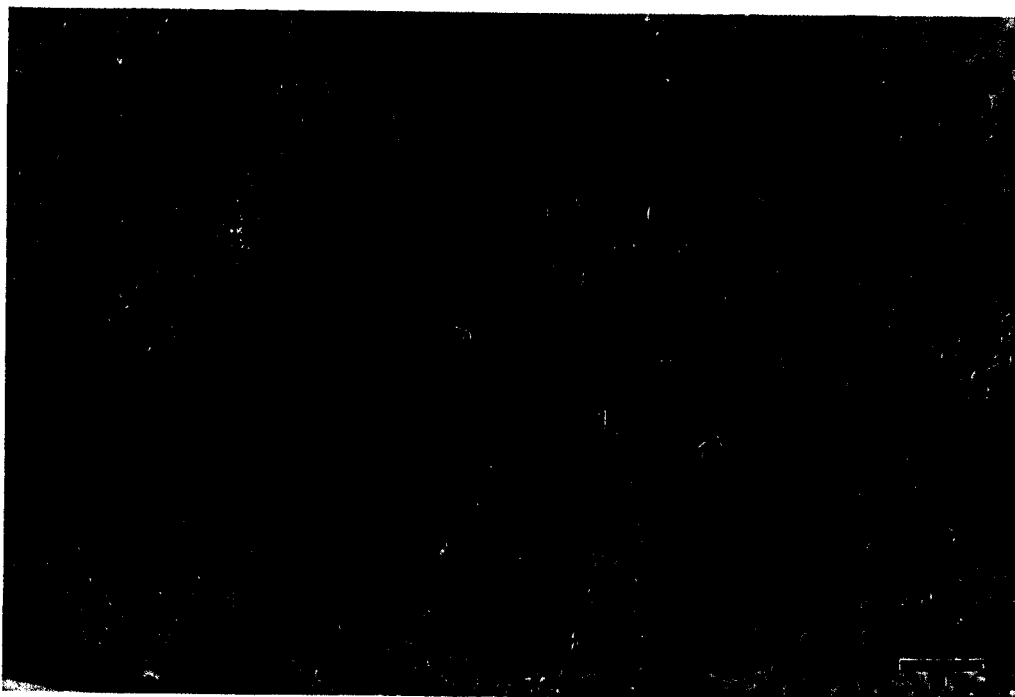


圖4-15 草蝦肝胰腺透明病變組織病理圖，盲管間隙（S）充滿組織液，部份盲管已形成肉芽腫（G），部份盲管則形成繼發性病變--基底膜剝離（箭頭）。蘇木紫與伊紅染色。bar=50 μ m。

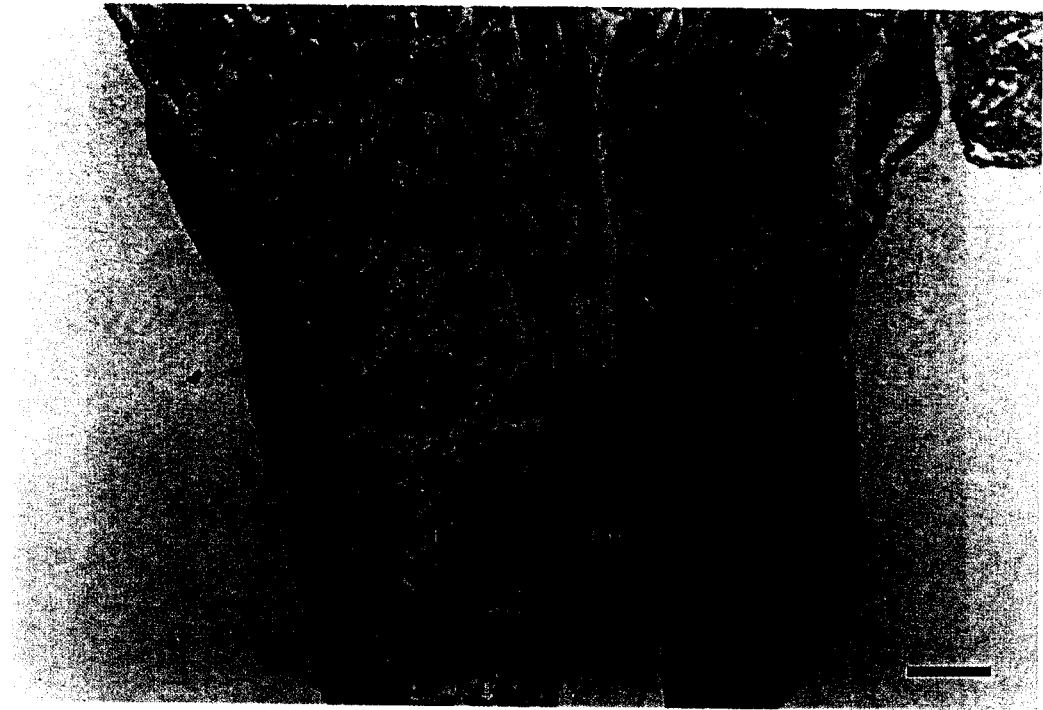


圖4-16 草蝦肝胰腺黑變硬化症組織病理圖，肝胰腺（HP）組織完全變性，中間為腸道（IN）。蘇木紫與伊紅染色。bar=250 μ m。

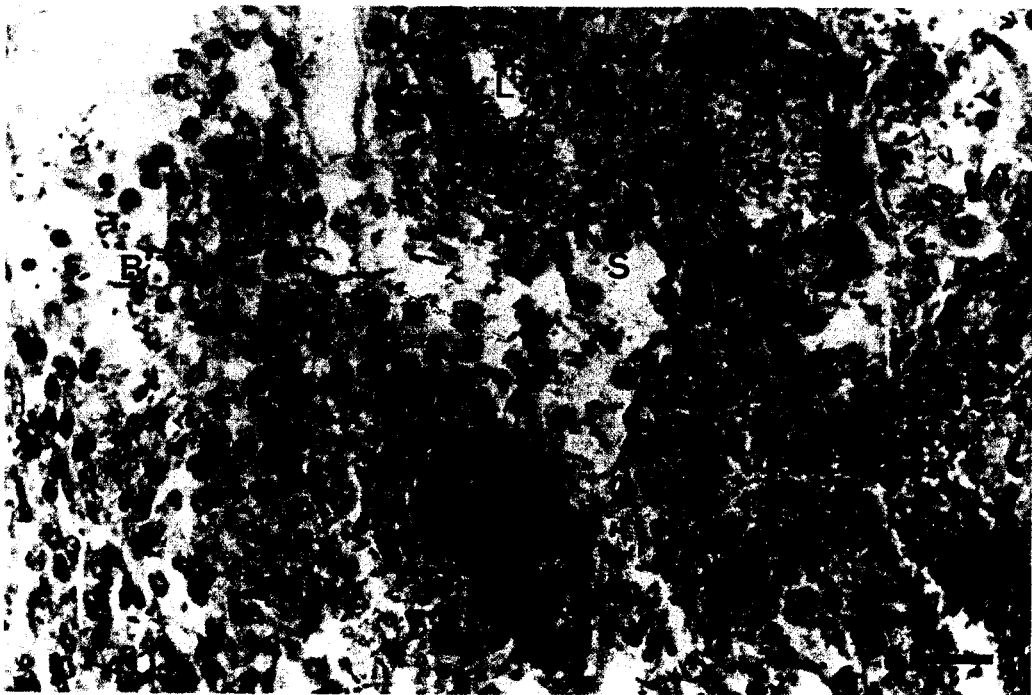


圖4-17 草蝦肝胰腺嚴重病變，細菌（B）充滿盲管腔（L）與盲管間隙（S）。Giemsa染色。bar=25 μ m。

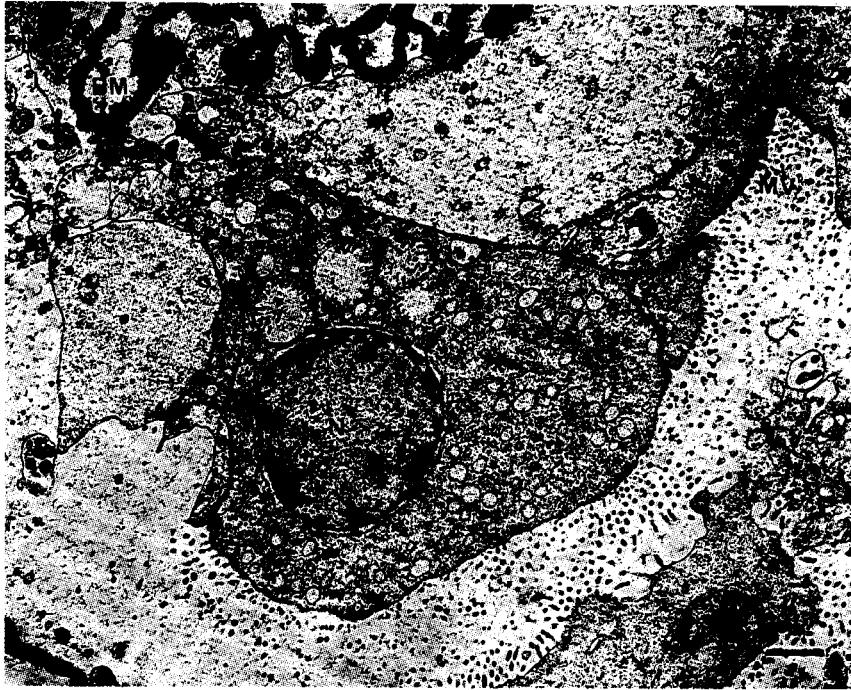


圖4-18 草蝦肝胰腺病變組織之電子顯微鏡檢驗，微絨毛 (MV) 顯然不完整，基底膜 (BM) 增厚，呈現皺摺狀。bar=1 μ m。

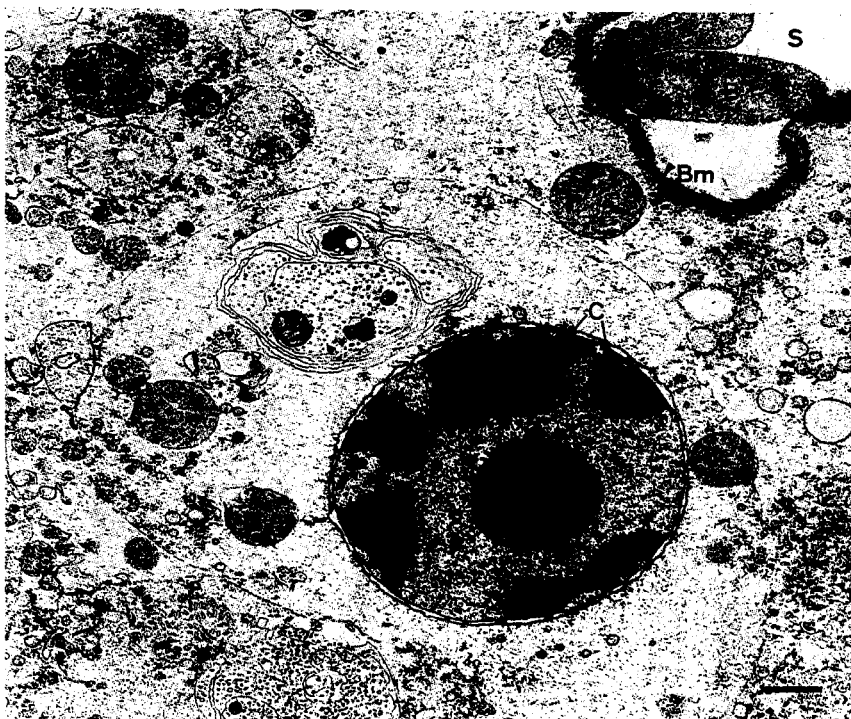


圖4-19 草蝦肝胰腺病變組織電子顯微鏡檢驗，核仁染色質 (C) 呈現濃染，基底膜 (BM) 增厚呈皺摺狀，並可見細菌 (B) 在盲管間隙 (S)。bar=0.7 μ m。



圖4-20 草蝦肝胰腺病變組織電子顯微鏡檢驗，盲管內發現大量細菌（B）。
bar=0.7 μ m。

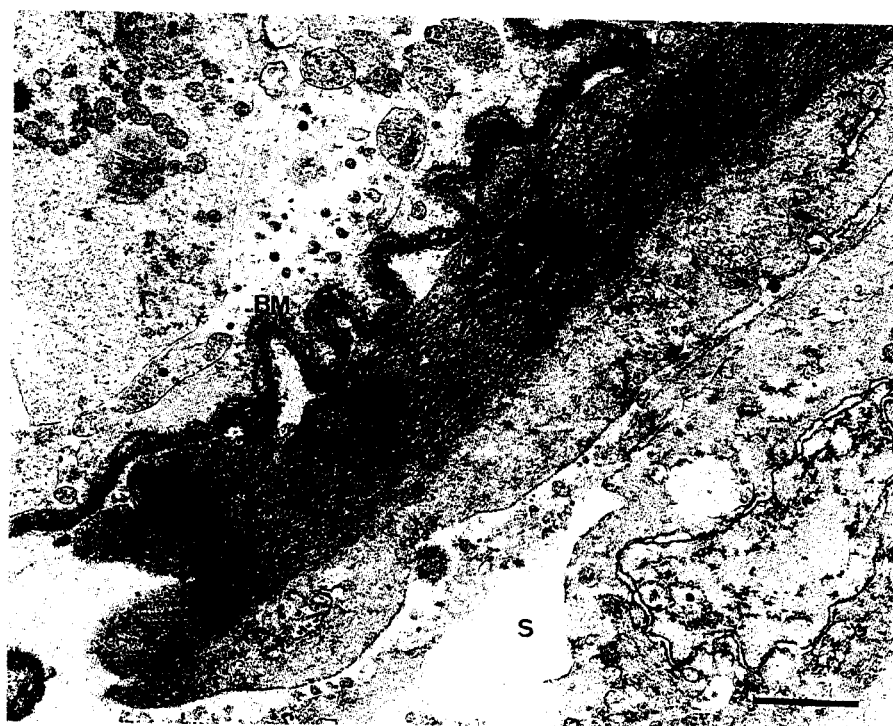


圖4-21 草蝦肝胰腺病變組織，電子顯微鏡下可見盲管外圍肌纖維（MF）和起皺摺基底膜（BM）。bar=0.7 μ m。

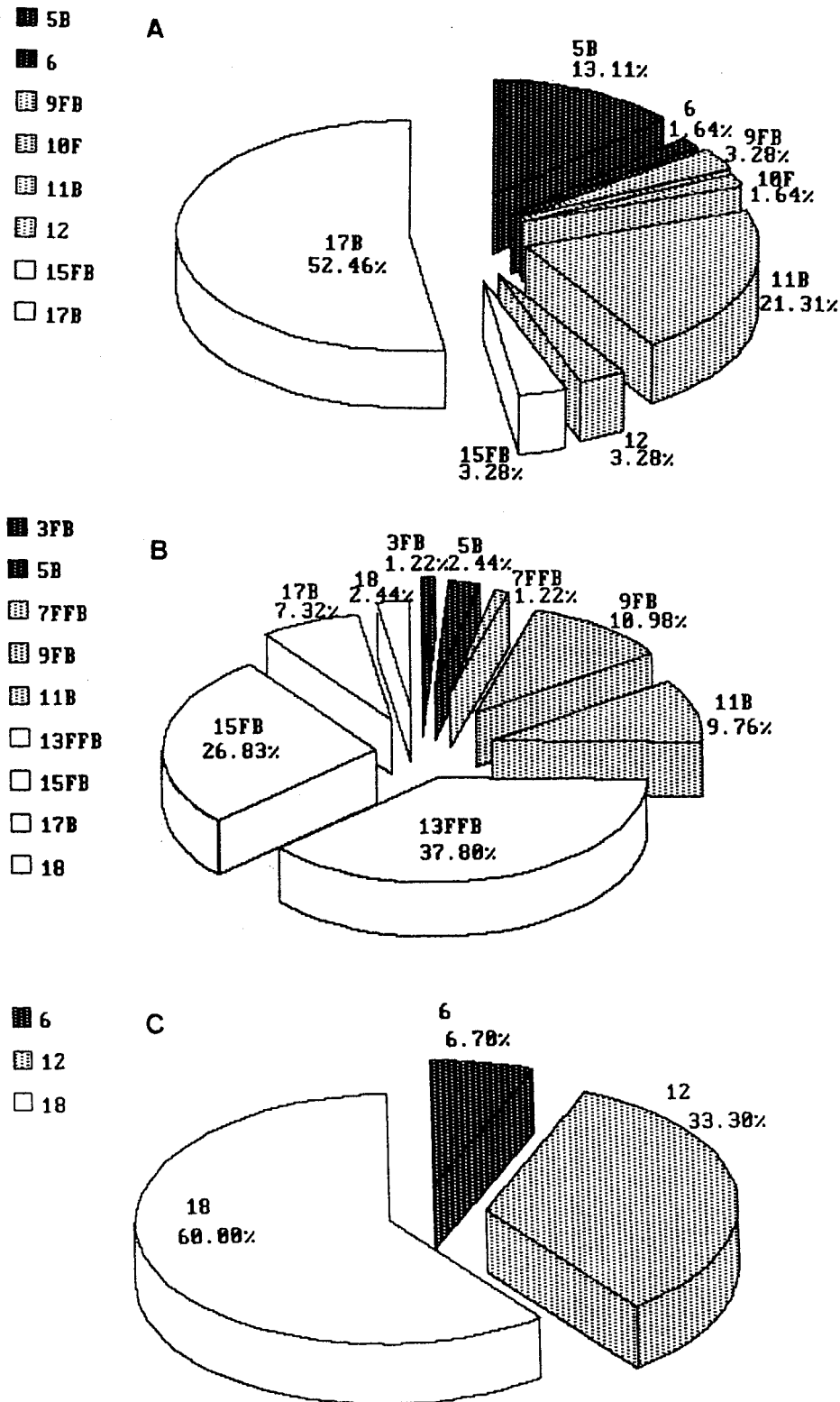


圖4-22 表4-1簡明百分比圖，顏色深淺表示MBV 感染程度嚴重或輕微；FF，組織嚴重纖維化；F，輕微纖維化；B，病理切片中發現細菌。



圖4-23 草蝦苗肝胰腺肉芽腫 (G) 病變，部份肝胰腺形成肉芽腫，內含大量MBV 包容體 (OB)，未感染MBV 之盲管組織正常。蘇木紫與伊紅染色。 bar=100 μ m。

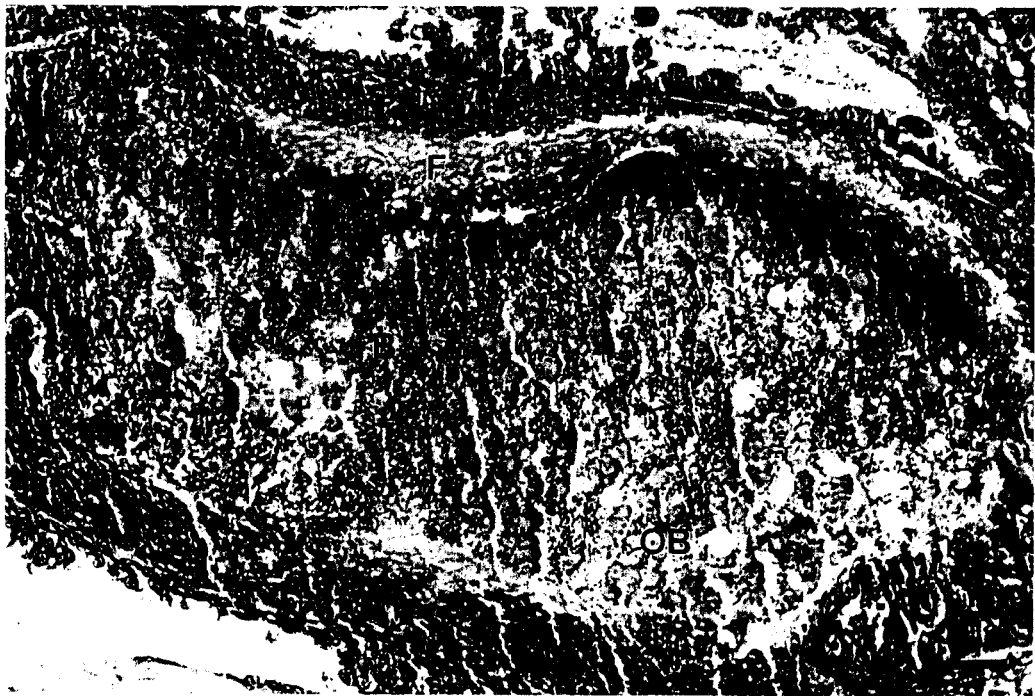


圖4-24 草蝦苗肝胰腺肉芽腫病變，Giemsa染色，內含大量菌落 (B) 和MBV包容體 (OB)。bar=50 μ m。

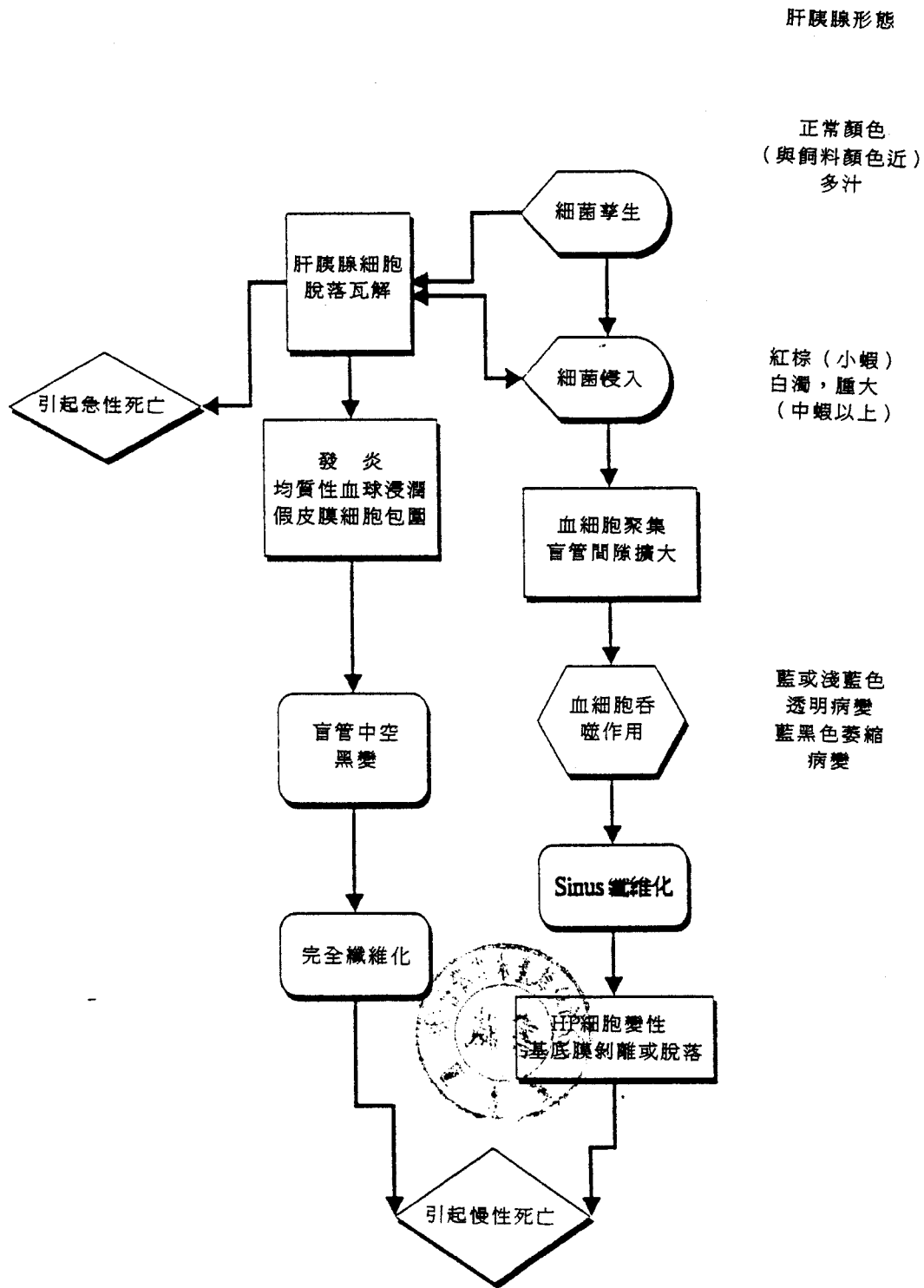


圖4-25 草蝦肝胰腺疾病組織病理模式。



圖4-26 痊癒後之病蝦肝胰腺組織病理切片，少數盲管形成肉芽腫（G），部份盲管間隙（S）擴大纖維病變，大部分盲管皮層細胞正常。蘇木紫與伊紅染色。bar=50 μ m。



003798

第五章 MBV感染草蝦與紅尾蝦肝胰腺細胞病理學研究

已知三種蝦類桿狀病毒都是感染寄主之肝胰腺和中腸的上皮細胞^(54,96,133)。肝胰腺 (hepatopancreas)，又稱中腸腺 (midgut gland)，是對蝦類主要的消化器官，體積大且組織緊密，占據頭胸腔的大部分，位於胃 (或稱前腸) 的後面，後腸的前方，心臟的前下方，分為左右兩葉，皆由緊密的盲管組成，其開口在胃的幽門部和中腸前部交接處的腹面。盲管為肝胰腺的消化單位，內有E細胞 (embryonic cell)，F細胞 (fibrillar cell)，B細胞 (blister-like cell)，R細胞 (resorptive cell)⁽²¹⁾和M細胞 (midgut cell)⁽²³⁾，其在對蝦類肝胰腺具有消化、吸收和貯藏的功能^(19,20,21,22,23)。

三種對蝦類桿狀病毒所產生的主要傷害是破壞其肝胰腺細胞，阻礙其消化和吸收功能。Couch (1974)，Sano et al. (1981)，Lightner et al. (1983b) 分別就BP、BMN和MBV對寄主所引起的病理變化有詳細的探討，但並沒有提到這些桿狀病毒對其寄主肝胰腺內各型的細胞是否有選擇性感染。BP感染對蝦類 *P. anororum*、*P. vannamei*、*P. stylirostris*、*P. setiferus* 和 *P. aztecus* B, MN感染斑節蝦 (*P. japonicus*) 的後期幼生，MBV感染草蝦 (*P. monodon*)，其感染器官都是局限於肝胰腺和中腸前段上皮細胞 (Anterior midgut epithelium)^(51,96,133)，其所形成的細胞核內包容體 (occlusions)，BP 為嗜伊紅性，單一或多個的錐體 (pyramidal) 形狀⁽⁵¹⁾；BMN在斑節蝦體內不形成包容體⁽¹³³⁾；MBV的包容體為嗜伊紅性，單一或多個的球形或橢圓體⁽⁹⁶⁾。

MBV感染草蝦肝胰腺所引起的細胞病理變化，Lightner et al. (1983b) 將之分為三個階段，並對感染後與感染前之中腸前段上皮細胞和肝胰腺細胞的核徑變化作一比較，他指出正常的中腸前段上皮細胞核徑約為 $5.6 \times 9.4 \mu\text{m}$ ，感染後第一階段變為 $8.2 \pm 2 \times 10.1 \pm 1 \mu\text{m}$ ，第三階段變為 $9.7 \pm 2 \times 10.9 \pm 3 \mu\text{m}$ ；肝胰腺正常細胞核徑為 $6.9 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ，感染後第一階段為 $7.7 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ，第二階段變為 $9.8 \mu\text{m}$ ，第三階段為 $13.0 \pm 3.1 \mu\text{m}$ 。他並透過電子顯微鏡，對各感染階段的細胞質、細胞核及細胞內胞器的變化，做詳細的描述。第一階段的細胞核變化為：核腫大，核仁移至核邊緣，病毒基因基質 (virogenic stroma) 的出現，並有病毒外套膜、鞘和少數成熟病毒的出現。細胞質的變化為：高爾基體的增殖，平滑內質網的增加，脂肪顆粒和分泌顆

粒的減少。到了第二階段，細胞核繼續腫大，包容體開始形成，更多的成熟病毒顆粒出現，微絲狀體也成束出現。在細胞質中，膜的網狀迷器（membranous labyrinths）增大；自體消化泡（Autophagocytic vesicles）增加，游離的核糖體增加，顆粒性內質網減少，微絲狀體成束出現，以及多角體蛋白的出現。到了第三階段，細胞核繼續腫大，會有特異的凸出，包容體增大，大量成熟病毒顆粒和成束微絲狀體出現。細胞質的體積會減少，游離的核糖體增多，膜的網狀迷器益發增大，出現不正常增大的粒線體，成束的微絲狀體亦存在細胞質中。MBV感染草蝦肝胰腺細胞，對於其感染的細胞型態是否有專一性，及其所引起的病理變化，本文中均有進一步的探討。

病蝦經過固定、包埋、切片、染色，以光學及電子顯微鏡檢查草蝦桿狀病毒的感染情形及其病理變化，發現其感染位置多在草蝦及紅尾蝦的肝胰腺，而以肝胰腺的感染最普遍。感染試驗的紅尾蝦則只在中腸前段膨大部的柱狀細胞發現，在其他組織切片並未發現有病毒感染。後期幼生（postlarvae）之肝胰腺受感染，沒有特定感染聚集區，整個肝胰腺皆可找到受感染的細胞。較大的蝦子（約0.5g以上）其肝胰腺已有相當數目的盲管，因而嚴重感染的蝦子，MBV包容體可在多數盲管上的細胞發現；較輕微者只有少數盲管受感染。在盲管上有E、F、B、R、M 五種型態與功能不同的細胞，除了E細胞外，MBV病毒對其餘四種細胞沒有選擇性感感染（如圖5-1至圖5-5）。

E細胞是位於盲管最遠端，是很容易進行有絲分裂的胚細胞，以電子顯微鏡觀察時，並未檢出有感染的例子。

B細胞的胞質病變：內質網由細長型變為囊泡狀，數量減少；膜的網狀迷器出現；粒線體數量減少，體積增大，膜脊變粗且數量增多；成束的微絲狀體出現。（如圖5-1、5-2）。

F、B、R、M 四種細胞經MBV感染後，核的變化都是會腫大（hypertrophic），核仁消失，病毒的基因基質在核內靠近核膜處形成，微絲狀體成束出現於核內，核酸鞘形成，靠近核內膜處有囊泡出現，成熟的病毒散佈於核內，或包於包容體內。偶而可見少數的類似外套膜物質（如圖5-3）。

R細胞的胞質病變：內質網成囊泡狀；粒線體腫大，感染末期膜脊鼓起成囊泡狀；成束的微絲狀體出現；感染初期仍有少量脂肪球和肝糖，感染末期則無。（如圖5-3、5-4）。

M細胞的胞質病變：內質網成囊泡狀，粒線體腫大，游離的核糖體散於胞質內，成束的微絲狀體出現。（如圖5-5）。

M細胞是脫殼間期（intermoult）經長期饑餓後產生的細胞⁽²³⁾，配合電子顯微鏡證明，這類受感染的細胞較緻密（如圖5-5）。

F細胞的胞質病變：內質網漸減少，且由長型變為囊狀；膜的網狀迷器（membranous labyrinths）出現；粒線體數量減少且體積增大，膜脊（cristae）數量增多；高爾基體減少；游離的核糖體增多（如圖5-6、5-7、5-8）；成束的微絲狀體出現。

在草蝦桿狀病毒感染的草蝦肝胰腺細胞內，會有膜的網狀迷器（membranous labyrinth）在細胞質中出現。Couch（1974, 1981）在對蝦桿狀病毒（B.P.）感染 *P. duorarum* 病理研究中，認為出現的網狀迷器是由核膜增生而形成的，在本章節之草蝦病理研究中，認為應是高爾基體病變形成，與Lightner等（1983b）研究結果相同。而桿狀病毒感染紅尾蝦所引起之膜的網狀迷器可在F細胞和B細胞中發現（如圖5-9），R細胞和M細胞並未發現有此病變。*P. duorarum* 感染對蝦桿狀病毒（BP）形成的包容體是多角形⁽⁵¹⁾，*P. japonicus* 感染中腸腺壞死病毒（BMN），沒有包容體形成，Lightner等（1983b）指出MBV病毒所引起的包容體是球形，在草蝦感染MBV後所引起的包容體亦是橢圓體或球形。而在紅尾蝦肝胰腺細胞受桿狀病毒感染後，形成的包容體亦是橢圓體或球形。Couch（1974）發現游離的BP病毒在細胞質囊泡中出現或由核膜以出芽（budding）方法離開細胞核，在草蝦與紅尾蝦的電子顯微切片，並未發現有這些情形。Lightner等（1983b）在草蝦感染MBV後也沒發現有此現象，感染末期是核膜被撐破，接著細胞膜破裂、游離病毒和包容體及胞器一起排列於管腔（lumen）中，因此MBV的感染、發病區都是集中在同一盲管或鄰近的盲管，是否有游離的病毒通過肝胰腺盲管基底膜（basement membrane）而藉血淋巴的循環到其他組織，就不得而知。在其他組織切片中並沒有感染MBV病毒的包容體出現，也沒有核腫大的現象，而在肝胰腺有感染MBV之母蝦的卵巢以電子顯微鏡觀察並沒有感染的跡象。

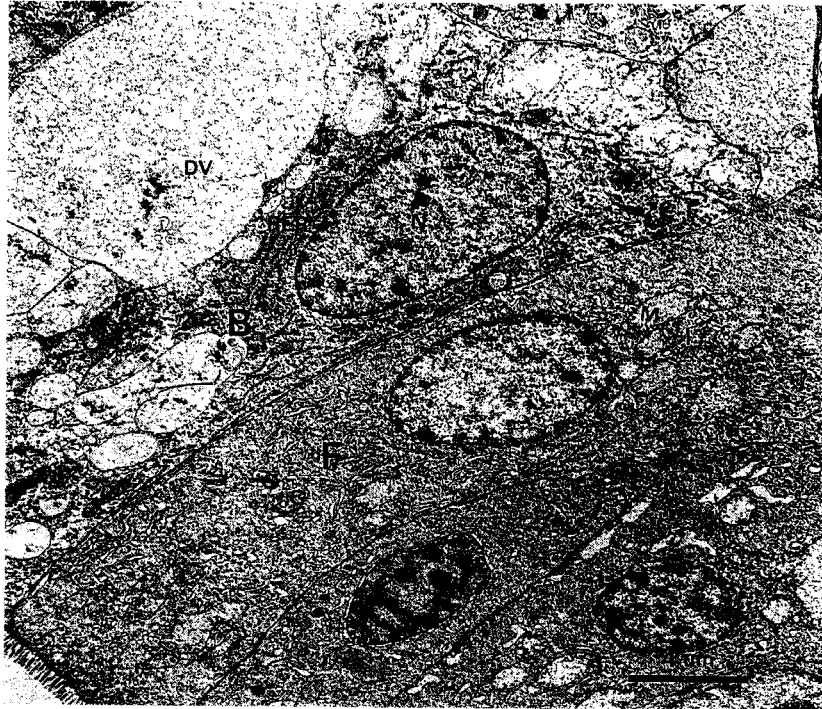


圖5-1 正常的草蝦肝胰腺F細胞和B細胞，B細胞有大的消化泡（DV）和顆粒內質網（RER）在細胞質內。G：高爾基體、M：粒線體、N：細胞核。

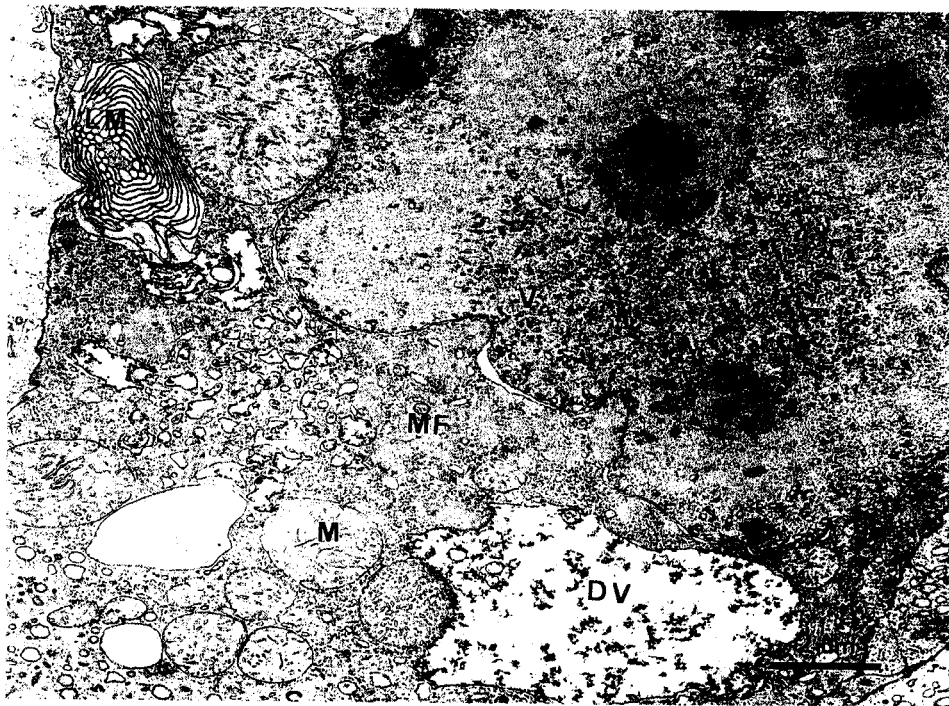


圖5-2 已感染MBV病毒的草蝦肝胰腺B細胞，核內可見病毒基因基質（VS）和MBV病毒（V），細胞質中粒線體（M）腫大。DV：消化泡、LM：膜的網狀物質、MF：微絲狀體。



圖5-3 已感染MBV病毒的草蝦肝胰腺R細胞，核內可見病毒基因基質（VS）、病毒顆粒（V），類似外套膜的物質（EL）和核內膜形成的囊泡，粒線體（M）腫大，尚有脂肪體（LP）和肝糖顆粒（GL）存在。G：高爾基體。

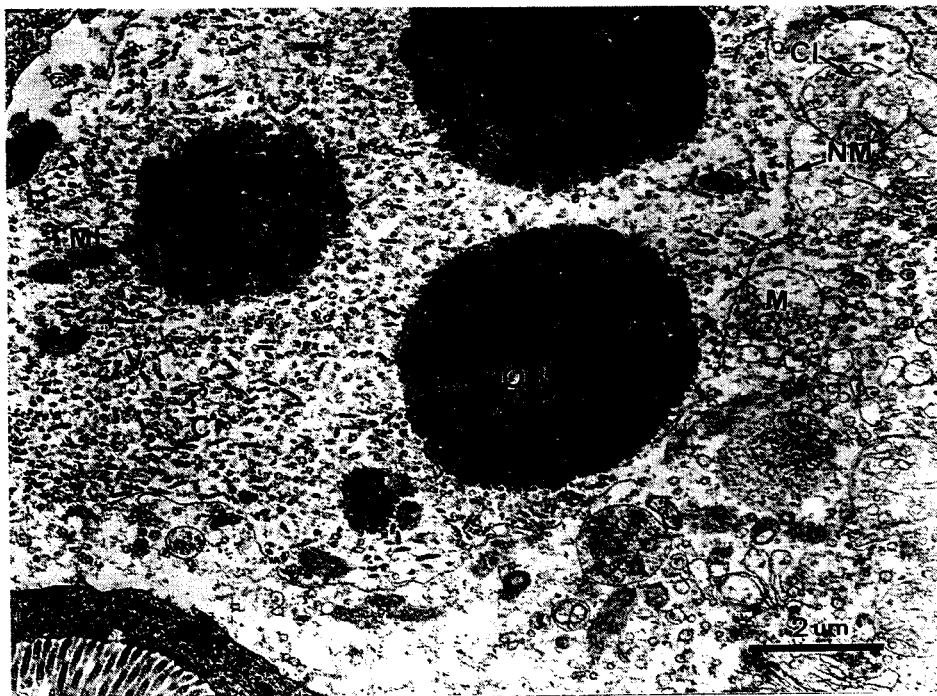


圖5-4 草蝦肝胰腺R細胞，為感染MBV病毒末期，核內有大量病毒顆粒（V），核膜（NM）已不完整，粒線體（M）內的膜褶（CI）成囊泡狀。C：病毒鞘、MF：微絲狀體、OB：包容體

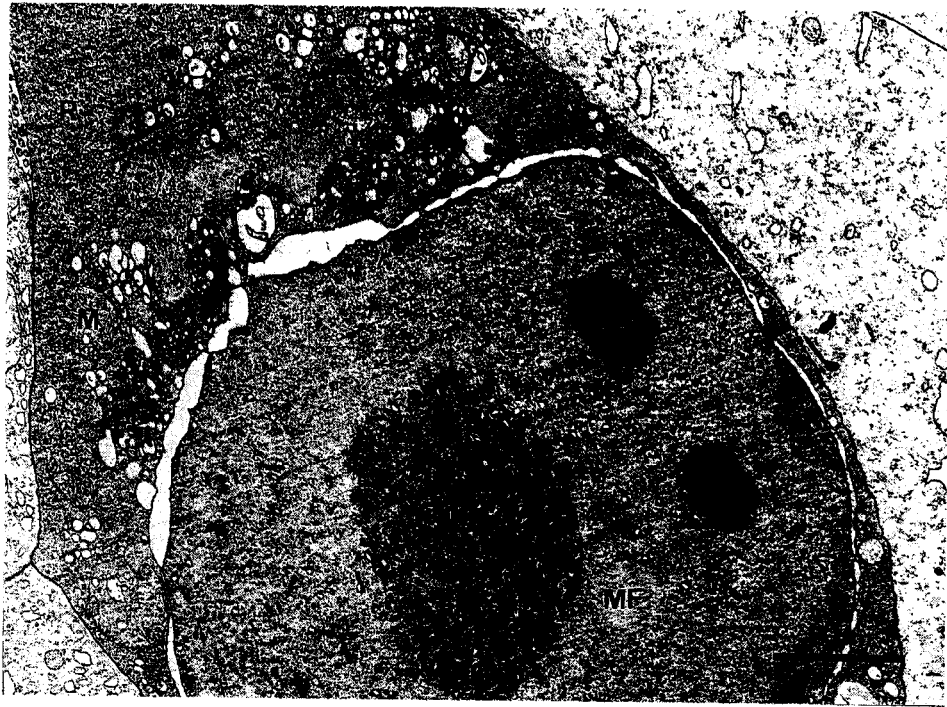


圖5-5 已感染MBV病毒的草蝦肝胰腺M細胞。ER：內質網、M：粒線體、MF：微絲狀體、OB：包容體、R：核糖體、V：MBV病毒、VS：病毒基因基質。

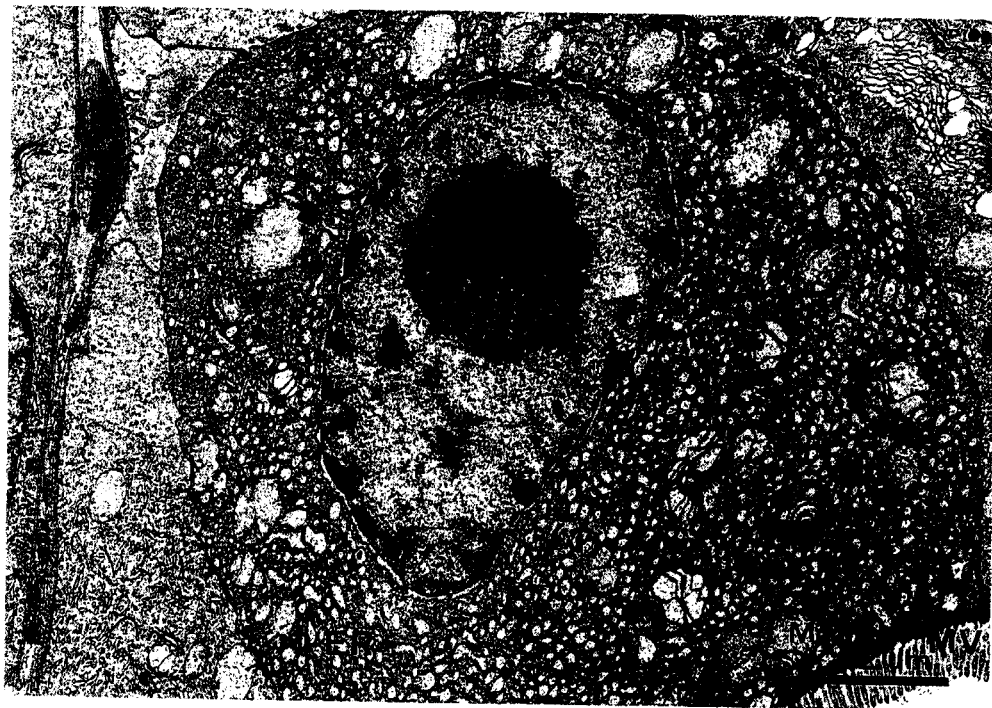


圖5-6 低倍率下之草蝦肝胰腺F細胞，核仁有病毒基因基質（VS）聚集，內質網（ER）成囊泡狀。G：高爾基體、M：粒線體、MV：微絨毛。

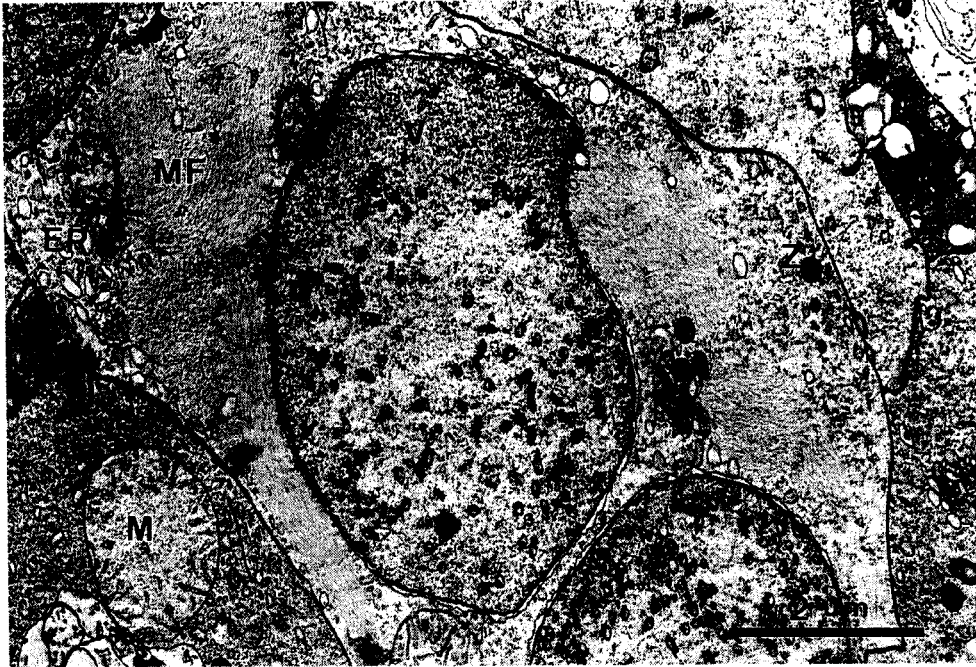


圖5-7 草蝦肝胰腺F細胞，已有MBV病毒（V）形成。ER：內質網、M：粒線體、MF：微絲狀體、Z：酶原。



圖5-8 低倍下草蝦肝胰腺F細胞，已有病毒（V）成熟，包容體（OB）開始形成，粒線體（M）不正常地腫大，高爾基體成網狀迷宮狀（LM）。ER：內質網、L：管腔、MF：微絲狀體、R：核糖體。

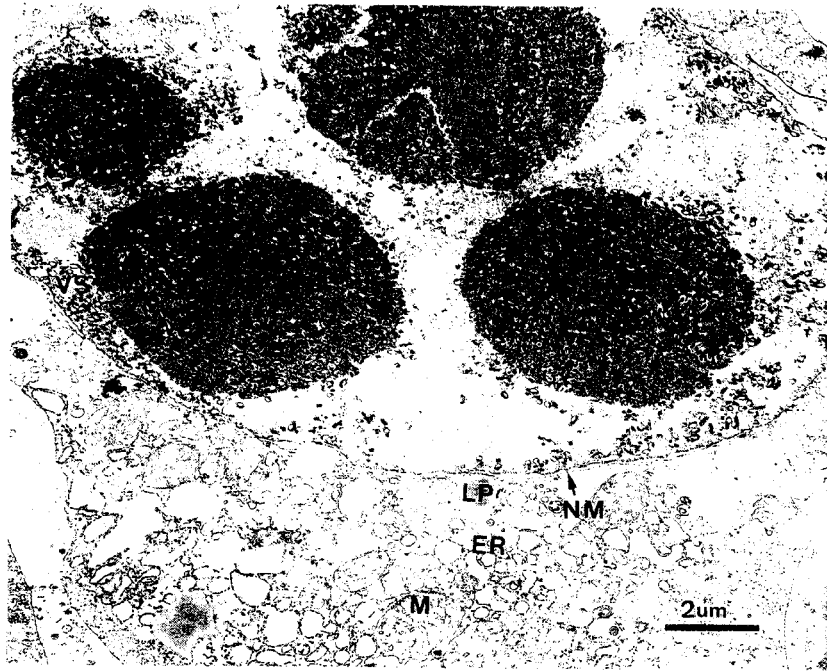


圖5-9 感染MBV之紅尾蝦肝胰腺R細胞。ER：內質網、LP：脂肪體、M：粒線體、NM：核膜、OB：包容體、VS：病毒基因基質。

第六章 草蝦桿狀病毒對草蝦之病原性研究

隨著養蝦事業的發展，單位面積放養愈高和養殖區愈密集，蝦類疾病的發生愈來愈頻繁，疾病種類愈多，也就愈複雜難理解。早期有關本省草蝦疾病調查及研究報告，大多著重於環境因素分析，如廖等（1976）、陳（1978）、陳與黃（1979）和陳（1981）皆對本省養殖草蝦疾病發生提出有價值的觀點^(8,9,11,95)，其中認為病因包括了重金屬中毒、高密度養殖、水質污染、底質惡化與老化等，這些錯綜複雜的因子導致蝦苗和成蝦的病變，常見於報告的疾病如紅鰓、黑鰓、爛尾、變紅症、絲藻附著或藍肉症（天空蝦）等⁽⁹⁵⁾。近幾年來由於池蝦不明原因導致大量死亡，相關單位更是決心徹底解決草蝦疾病問題，一系列有關蝦類養殖池環境的調查以及改善的研究，著實對本省的水產研究做了一大整合，其中包括了水質、病原、環境污染、底泥、微生物和浮游生物的探討。另外，針對病原的發現與較深入之研究，如廖等（1985）、黃（1989）和鄭（1989）等，其中包括了病因的探究、病理學的檢驗、感染實驗和病菌的鑑定^(7,12,94)，黃（1989）自罹病草蝦分離細菌，其中弧菌占84.6%。弧菌在近幾年草蝦流行病占很重要角色⁽⁷⁾；Cheng & Liu（1986）則以病理檢驗方法分析與歸納草蝦疾病種類，其中有論及肝胰腺病變，包括系統性肉芽腫和包涵體性肝胰腺炎（49）；而Liu（1989）針對罹病草蝦肝胰腺進行組織病理學的探討，並初步鑑定病原為桿狀菌的一種，其集結造成肝胰腺組織的傷害⁽¹⁰⁴⁾；邱（1988）對草蝦血球及發炎反應做了探討，認為草蝦血球在組織炎症中扮演的角色有浸潤、吞噬及包圍，最後並形成肉芽腫，且肉芽腫的形成是無脊椎動物大部分組織炎症反應的結果⁽¹⁾。至於針對MBV病毒感染之疾病研究則較少見，Lightner et al.（1987）和Chen et al.,（1989）針對台灣養殖蝦類MBV疾病進行調查，認為台灣養殖草蝦（45,103）、紅尾蝦⁽⁴⁵⁾和砂蝦⁽⁴⁸⁾會被MBV感染，且Chen et al.（1990）報告指出MBV的感染有漸趨嚴重的情形。

隨著台灣養殖蝦業興盛後，東南亞地區的國家之蝦類養殖也跟著興起，鑑於東南亞地區蝦病的發生有步台灣蝦病後塵之勢，然而卻少有報告，有關MBV之報告有Fukuda et al.,（1988）和Doubrovsky et al.,（1988）僅止於發現MBV感染於草蝦，未做進一步研究^(56,64)。Fegan et al.,（1991）則有對泰國南部ABV的流行進行深入探討⁽⁶⁰⁾，包括MBV感染調查和病理檢驗，並進行生殖巢的電子顯微切片，認為MBV不藉由生殖細胞感染。然而

有關於草蝦肝胰腺病變的報告則很少，Chen et al., (1990) 在東南亞草蝦病毒性疾病調查中有提到肝胰腺的病變，發現病蝦肝胰腺發炎症狀、脂肪病變和肉芽腫病變。

Nash (1988) 則針對東南亞紅樹林地區的酸性土壤引起草蝦病進行組織病理的探討，其認為會引起嚴重鰓和殼的不正常疾病 (118)。

前面曾針對草蝦桿狀病毒之流行情形做了調查報告，發現這種病毒之分佈極廣，只要有養殖草蝦的地方就可發現這種病毒，由育苗場到大蝦養殖場甚且大海野生的種蝦都可檢測到這病毒的感染，由於草蝦疾病在各地大肆流行，草蝦桿狀病毒的各項研究草蝦受到重視，其致病程度的研究更是吾等亟望瞭解。

MBV的病原性過去的研究多只限於MBV 檢驗時，做進一步的推測，並配合死亡率的計算^(45,99)。外表病徵的描述，Lightner et al. 首先發表，認為經由MBV嚴重感染的草蝦，在後幼生期 (Polstarvae)，其體色較暗 (由濁青灰色到暗藍黑色，活力較差，並容易受浮游生物附著⁽⁹⁹⁾)，在Chen et al. (1989) 亦有相同看法⁽⁴⁵⁾，池蝦族群中有體色較黑、體型特小、殼軟者，是為MBV嚴重感染的表徵。Cheng & Liu (1986) 在研究報告中指出MBV 引起之肝胰腺炎，外表無特異病癥⁽⁴⁹⁾。

MBV感染率的突然增加會引起蝦苗族群之大量死亡，此現象常發生在環境之改變或蝦苗遷移的時候⁽⁴⁵⁾，在BP和BMN兩種病毒也有類似的報告^(51,133)，但皆沒有確實數據加以證明。就台灣及東南亞地區之蝦苗繁殖技術而言，都未注意MBV 感染之問題，也尚未有防疫之觀念，因此每一批蝦苗都或多或少感染了MBV，蝦苗的產量也就無法穩定。在美洲大陸BP常引起白蝦 *P. vanameni* 和藍蝦 *P. semilattus* 蝦苗嚴重疾病及死亡⁽⁵¹⁾，在日本BMN對斑節蝦幼蝦期引起感染問題都引起相當大的損失⁽¹³³⁾，昆蟲的核多角體病毒感染其特有寄主，亦會在幼蟲期引起組織壞死和死亡⁽¹¹⁰⁾，而成蟲時的感染只會使寄主成為帶原者。大草蝦對於MBV的感染，推測有很强的容忍度，不會引起死亡⁽⁶⁰⁾，並發現環境的緊迫會引起MBV感染量的增加⁽⁶⁰⁾。

MBV的感染研究過去未曾有報告，而BP和BMN則在近年來分別進行了感染蝦苗之報告^(114,120)，皆對蝦苗在病毒感染後之影響加以探討，BP在糠蝦期以後才能檢出包容體，與Chen et al. (1989a) 之MBV 調查報告結果相似⁽⁴⁵⁾，且BP在後幼生期人工感染一至二天即發現包容體⁽¹²⁰⁾；BMN感染斑節蝦苗，眼幼蟲期即引起肝胰腺細胞和腫大的病理特徵，且引起後幼生

期成長遲緩⁽¹¹⁴⁾。病毒對大蝦的感染，Couch (1978) 在BP研究報告中指出，BP對於大蝦人工感染不易，二十天長期感染，只有20% 感染成功⁽⁵³⁾，其後又以昆蟲核多角體病毒AcMNPV感染白蝦，*Paiaemonetes vulgaris*，不引起感染和類似病理變化⁽⁵⁰⁾。

繁殖場草蝦苗密度與MBV感染率之關係：

繁殖場蝦苗繁殖期間，自無節幼生 (nauplius) 到後期幼生 (postlarvae) 的紅筋幼蝦，每隔一日採樣一次。用1公升的瓢子自繁殖池採樣 (採樣前充份攪拌) 至少採樣三次，算其平均數量記錄之，並隨機採約50尾的蝦苗，以Davidson固定液處理，以光學顯微鏡檢驗MBV，計算其感染率，在採樣的同時，檢查鐘形蟲、絲狀菌等的感染情形和其他的病徵。

採自同一繁殖場之草蝦苗有三組，第一、二組為同一批，在各個不同變態期 (包括zoea、mysis和postlarvae) 採樣，計算其密度和感染MBV 的比例，將之整理於表6-1，並繪製成曲線圖6-1，在採樣的同時，並檢查鐘形蟲和絲狀菌在體表附著的情形。其觸角扭曲的病徵亦將之列於表6-1。

第一、二組蝦苗經光學顯微鏡組織病理檢查，從眼幼蟲期到後期幼生第二天 (Postlarvae-2 days; PL2)，皆未發現有MBV的包容體出現，而PL4的肝胰腺已有核腫大 (nucleohypertrophic) 現象，自PL7開始的採樣即有 MBV包容體的出現，且在六天之內，感染率由10%增加到85%以上。第三組蝦苗肝胰腺核腫大現象是在PL2開始出現，MBV包容體的出現則在PL4的檢體，感染率在5天之內由8%快速增加至75%。密度的急遽減少在第一、二組發生兩次，第一次為眼幼蟲期到糠蝦三期，第二次為PL9以後，第三組則只在PL4以後有密度驟減的情形。至於鐘形蟲和絲狀菌的附著，在糠蝦三期 (M3) 以後才陸陸續續發生，且沒有規則變化，其出現與否與所施放的防治藥物有關係。

觸角扭曲是在此次採樣時發現的。畸型的蝦苗其觸角 (Antenna) 和觸角鱗片 (Scaphocerite) 的位置向下或向兩側扭曲，嚴重者平躺於池底，無法靈活游動，其死亡率很高。第一、二組自 PL2即開始出現此病徵，且比例緩慢增加，第三組則未發現。

表6-1 繁殖場草蝦苗密度及草蝦桿狀病毒感染率比較試驗

採樣日期	組別	期別 *	密度(尾/升)	MBV 感染率(%)	其他病原及病徵		
					鍾形蟲	絲狀菌	觸角扭曲(%)
870708	1	Z1	270	-	-	-	-
	2	Z1	---	---	---	---	---
	3	---	---	---	---	---	---
870710	1	Z3	208	-	-	-	-
	2	Z3	212	-	-	-	-
	3	Z1	114	-	-	-	-
870711	1	M1	170	-	-	-	-
	2	M1	---	---	---	---	---
	3	---	---	---	---	---	---
870713	1	M3	159	-	+	-	-
	2	M3	122	-	+	-	-
	3	Z3	104	-	-	-	-
870715	1	PL2	110	-	+	+	-
	2	PL2	112	-	+	+	2
	3	M1	98	-	-	-	-
870717	1	PL4	103	NH	-	+	7
	2	PL4	110	NH	-	+	2
	3	M3	100	-	+	-	-
870720	1	PL7	88	10	+	++	4
	2	PL7	76	15	+	++	5
	3	PL2	82	NH	-	+	-
870722	1	PL9	---	33	+	+	10
	2	PL9	72	41	+	+	11
	3	PL4	72	8	+	-	-
870724	1	PL11	10	>85	+	+	8
	2	PL11	15	>85	+	+	10
	3	PL6	31	49	+	+	-
870726	1	PL13	---	---	---	---	---
	2	PL13	---	---	---	---	---
	3	PL8	15	75	+	+	-

- : 無感染

+ : 輕微感染

++ : 嚴重感染

NH : 肝胰腺細胞核腫大

-- : 未檢驗

* Zx : 眼幼蟲期

Mx : 糠蝦幼蟲期

PLx : 後期幼蟲

本省蝦苗的繁殖技術雖已經相當純熟，然而繁殖的過程卻偶而會有不明原因的大量死亡，這與水質環境不良，病原的孳生和藥物的濫用都有關係。本次在繁殖場連續採樣，針對活存率、病毒感染率和其他病徵的探討，發現MBV的包容體在postlarvae才會出現，而且感染率在短時間內急速增加的同時，postlarvae的存活率相對地減少。鐘形蟲與絲狀菌的存在與否，可能與藥物的使用有關，一般過於營養的水質，鐘形蟲和絲狀菌很容易孳生⁽⁹⁵⁾，但在繁殖場，這些外寄生物已可以用藥物有效地防治。觸角的扭曲是一嚴重畸型病徵，會導致死亡，真正發生原因不明。此次採樣只在第一、二組發現，第三組未發現，而第一、二組在zoea到mysis有一次持續的大量死亡，可能是導致畸型的原因，推測這與蝦苗無節幼蟲的品質有關。

昆蟲NPV病毒的傳染是靠多角體蛋白結晶的保護通過帶有酸性的前腸，到中腸時，在鹼性和酵素的作用下，病毒由多角體蛋白結晶中釋放出來並感染寄主細胞^(31, 140)。MBV的感染是否與NPV相同，到目前還未經證明。一般推測草蝦會吃進環境中的包容體和含包容體的肝胰腺而感染⁽⁹⁹⁾，所以高密度的養殖就成為快速傳染的原因。繁殖場的水溫通常在34°C左右，會促使新陳代謝速率加快和殘食行為的增加，此亦是加速MBV傳播的因素。

已感染MBV之草蝦蓄養實驗

為了證明感染MBV的草蝦是否會引起死亡，因此進行室內蓄養實驗，自大蝦場撈取50尾草蝦，體重5-8g，分別單獨飼養在30公升的塑膠桶，定時餵食，每天兩次，且隨時保持良好水質，每天吸取糞便進行MBV包容體之檢驗，以血球計數器估算MBV排放量，探討MBV感染與草蝦死亡關係。

事先以糞便檢驗MBV包容體法對實驗室蓄養感染病毒之草蝦進行MBV感染量之連續偵測，將病毒包容體排放量分為三級， 10^4 個以下、 10^4 — 10^5 和 10^5 個以上，分別代表輕度、中度和嚴重感染。MBV感染的草蝦每天排放的糞便皆可發現包容體，然而糞便中每天MBV包容體排放量為一無規律之數據，20天的偵測數據皆處於輕度感染只佔4%；變化於輕度與中度感染佔78%；而變化於中度與嚴重感染佔18%。實驗進行中，所有MBV感染的個體皆不引起外表的病癥，死亡率為零。

由實驗室之蓄養草蝦研究，不同程度之MBV感染，20天的養殖實驗，其死亡率為零，可見細心的照顧，即使嚴重感染的個體仍然吃餌正常，脫殼正常，不致引起死亡。因此MBV的引發病變是有條件性，Couch (1978, 1981) 和Lightner et al., (1983) 分別認為養殖環境之緊迫因子才是決定BP和

MBV致病因素^(53,54,99)，本結果推論觀點與之相同。由於E cell不斷地分裂⁽²⁰⁾及肝胰腺的盲管數量隨蝦齡增加而增加（圖6-2、6-3），所以MBV在寄主體內的影響性隨蝦齡的增加而漸減少，MBV在草蝦不同時期的感染有不同的影響。

由糞便檢驗法檢驗MBV包容體的試驗中，發現包容體數量的變化並無規律，推測應與蝦子的消化生理和桿狀病毒的生活史有關。Al-Mohanna & Nott（1987）指出對蝦肝胰腺消化週期為24小時或以上，且當消化過程部份近端的老細胞會脫離盲管被排出，而由遠端胚細胞（Embryonic cell）進行有絲分裂不斷補充新細胞⁽²⁰⁾；又病毒包容體會足夠大後會將寄主細胞漲破⁽⁴⁶⁾，游離的病毒會散出，進而感染鄰近的細胞⁽⁴⁶⁾；另外在前面推論MBV的包容體在感染後24小時內形成。由以上各項原因可知MBV感染週期和再感染的細胞數目是決定糞便中包容體數量之兩個主要因素。糞便中包容體的量是肝胰腺感染程度的一指標。持續20天皆可測到包容體，表示MBV在肝胰腺內是造成持續性的感染。參考自切片檢驗，由於MBV的感染只在部份盲管發生，所以MBV的再感染是以同一盲管的細胞為主，Lightner et al.（1983）對MBV之病理研究，亦有此看法，且近端比遠端細胞更容易被MBV感染⁽⁹⁹⁾。

MBV感染率與草蝦大小關係探討：

由糞便檢驗病毒包容體，確實無MBV感染之PL110（變態為後幼生期之後110天，平均體重11.2g）、PL80（平均體重4.9g）、PL50（平均體重1.7g）和PL20草蝦各30尾，每尾分別飼養於單獨Tank，採集嚴重MBV感染之草蝦後幼生期蝦苗，以投餵方式感染，投餵量約與體重成正比，每天感染一次，另投餵人工飼料二次，第10天後分別以糞便檢驗法檢查MBV感染情形，並計算感染率。

PL20、50、80和110分別經口感染MBV，第10天後以糞便檢驗法檢驗，測得感染率分別為100%、21.4%、13.3%和0%，活存率分別為83%、93%、100%和97%（見表6-2）。感染實驗中死亡蝦子由於MBV檢測不易，所以未計入感染率的計算。

表 6-2 不同時期草蝦以人工經口感染MBV之第10天感染率及活存率

成長期	採樣數	人工感染10天後 MBV 感染率 (%) *	活存率 (%)
PL20	30	100.0	83
PL50	30	21.4	93
PL80	30	13.3	100
PL110	30	0.0	97

* MBV 感染以糞便抹片檢驗法進行

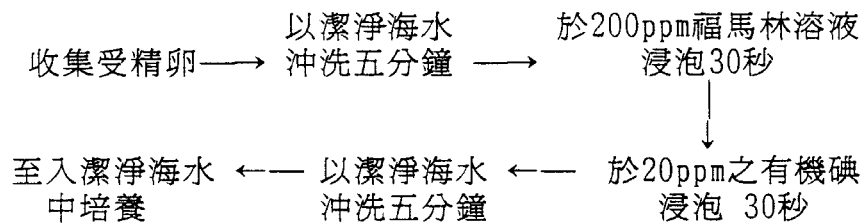
由人工感染實驗結果顯示，相同感染活性的MBV 在草蝦不同時期引起不同的感染率，後幼生第二十期（PL20）經過10天的感染，感染率為100%，PL50為21.4%，PL80為13.3%，而PL110在第10天後測MBV感染率為0，所以愈大的草蝦愈不容易被外來之MBV感染，Couch（1978）報告亦指出以BP餵飼小蝦或大蝦，不易感染成功，二十至三十天後才有20%被感染⁽⁵³⁾，因此MBV與BP同樣在小蝦以後不易進行感染，其可由對蝦之消化生理解釋，因幼蝦期以後已發育前腸構造，有研磨、篩選及初步消化功能⁽¹⁵⁴⁾，以胃石（gastric mill ossicles）磨碎食物；以濾篩（filter-press）進行篩選，食物粒子小於 $1\mu m$ ，才會被擠壓進入肝胰腺內完成消化作用；食物在前腸腔與來自肝胰腺的消化酵素進行混合及初步消化作用，酵素主要為蛋白酶，pH值5-7。誤食之病毒包容體在此環境下易被消化，不易侵入肝胰腺。所以較大草蝦發的MBV主要是來自蝦苗期之感染。

人工感染MBV試驗

準備容量500公升的FRP桶六個，分別以100ppm次氯酸鈉溶液消毒，並清洗乾淨，分別放入草蝦無節幼苗（無節幼苗之清洗消毒見圖6-4），密度約100隻/升，餵養方法均相同，其餵養食物隨各變態而改變（見圖6-5）。六桶均分為A和B兩組，A組三桶為實驗組，在無節幼蟲第六期開始變態為眼幼蟲第一期時即開始餵飼矽藻類，並添加MBV包容體（ 3.2×10^3 個/ml），以進行口服感染；另三桶為對照組，飼餵餌料及方法完全相同。此兩組確實隔離，器具分開使用，並預防打氣時因小水珠飛散而污染。在飼養期間，眼幼蟲期須每天抽除糞便，糠蝦期以後隔日換水，以避免污染，導致水質惡化

。每天記錄死亡和變態的情形，並採樣固定做組織病理切片及-20°C 冷凍各期蝦苗進行酵素連結免疫吸附法（Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）檢驗。進入後期幼生以後即在解剖顯微鏡下進行體長測量工作，比較其成長差異。

(A) 受精卵去除MBV感染的方法



(B) 無節幼蟲（蝦）去除MBV感染之處理方法

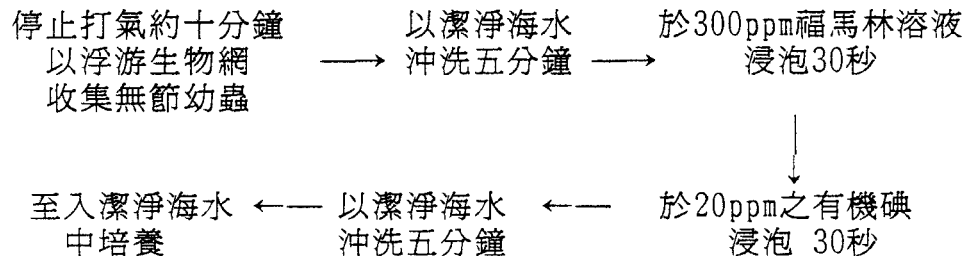


圖6-4 草蝦苗繁殖場去除MBV之處理步驟

在MBV病毒之去除操作及蝦苗培育的各組實驗過程中，每天任意選取五十隻以上的各變態期幼苗，經戴維生氏固定液（Davison's Fixative）固定，石蠟包埋後以組織切片機切5 μ m厚度之連續薄切片，再以Hematoxylin及Eosin（H & E）之染色法染色後，以200-400倍光學顯微鏡檢查這些草蝦之肝胰腺是否有MBV的包容體。

自各組採來之樣本，以戴維生固定液固定之，然後經包埋、切片，以H & E染色後檢查MBV感染，進行MBV感染之實驗組在早期未見有MBV包容體，只有眼幼蟲第二期的一次採樣，發現肝胰腺腔內有嗜伊紅性MBV包容體，有細胞核腫大現象，亦有核內包容體出現（圖6-6）。而在PL1時即有少數感染（3%），且感染率直線增加（表6-3），一直到PL 19已有九成以上感染了MBV，然而對照組在各變態期的採樣皆未發現有病毒包容體或疑似

之病理變化。

自各組採來新鮮之各期幼苗，以均質機打碎，進行ELISA測MBV，有感染MBV的實驗組在眼幼蟲第一期開始即有輕度的反應，一直到後幼生期，都有或強或弱的反應，而對照組則皆未見有明顯的呈色反應（表6-3）。

實驗組在繁殖期間，常會發生蝦苗死亡，以光束照射桶內水流，即可見發白的蝦苗屍體隨水流動，尤其在眼幼蟲第二期、糠蝦第三期及後期幼生早期，而對照組的情形較順利，只有眼幼蟲第一期和糠蝦第三期發生少量死亡（表6-3）。得病蝦苗攝餌不良，身體白皙、瘦弱，在低倍顯微鏡下肝胰腺和腸道瘦小，顏色淺，蠕動緩慢，此類蝦苗在實驗組常見，終會死亡。正常之同期蝦苗則腸道飽滿，體色較深（圖6-7）。最後存活率，實驗組平均低於10%，而對照組平均為18%。

在後幼生期第三期至第十九期（PL3-PL19）分別就實驗組與對照組做隨機採樣（random sampling），在低倍解剖顯微鏡下測量其體長，結果見表6-3，對照組之蝦苗成長顯然比實驗組成長快。未經病毒感染之蝦苗體長均勻，活力佳，而早期即進行口服感染MBV的蝦苗，體型細小，且常有大小參差不齊的現象（圖6-8）。感染MBV之實驗組蝦苗PL19時體長範圍9.9-17.2mm，而其標準機差（standard deviation, SD）為3.15；然而同期的對照組蝦苗（未感染MBV），體長範圍16.5-19.7mm，標準機差為1.69（表6-3）。

以ELISA檢測蝦苗各變態期MBV感染的情形，在眼幼蟲期即有MBV的反應，一直到後幼生期；然而在組織病理切片檢驗不易發現早期蝦苗體內的病毒包容體，但在靈敏度較高的ELISA檢驗法能檢出，所以認為MBV在眼幼蟲期及糠蝦期階段為潛伏感染或是發病快速，導致無法由組織病理法檢出，此由垂死的眼幼蟲第二期之組織病理切片中，發現肝胰腺腔內及細胞內有少數嗜伊紅性MBV圓球形包容體得以證明。BMN的感染斑節蝦苗實驗亦與本結果類似，其在無節幼蟲期未能感染成功，然而在眼幼蟲二期則有100%感染⁽¹¹⁴⁾。

MBV病毒包容體可在眼幼蟲二期肝胰腺內發現，由於眼幼蟲一期變態為二期須時約24小時，故推測MBV自感染後到包容體的形成應在24小時內，而根據昆蟲桿狀病毒的感染研究，約10-16小時即有polyhedrin的形成，18小時內也就開始聚集成包容體^(72,84)。

MBV主要感染草蝦肝胰腺⁽⁴⁶⁾，而肝胰腺是對蝦類的主要營養器官^(20,21,22)，Overstreet在1990年針對BP感染白蝦眼幼蟲期的報告中指出，眼幼

蟲期的肝胰腺只是由少數幾百個細胞組成，病毒的感染對其威脅很大，往往引起急性死亡或變態緩慢或攝餌不良⁽¹²⁰⁾，與本實驗觀點相同。在實驗過程之中，實驗組在變態過程，常可見身體白暫、攝餌不良的蝦苗，體質虛弱，容易死亡，推測應是病毒感染發病所引起，BMN人工感染斑節蝦亦有此現象⁽¹¹⁴⁾。但是這並不是表示只要是這類的病徵都是病毒引起的，因為水質惡化或藥物之傷害等問題^(3,7,8,10)，都會引起類似的病徵。重金屬污染更會引起大量死亡⁽¹⁰⁾。所以在病蝦診斷的時候務必小心。而對照組繁殖順利，不易見大量死亡的情景，所以 MBV嚴重影響草蝦苗的繁殖，實在不容忽視。

MBV對草蝦苗成長影響，由本實驗結果得知，其影響程度很大，受 MBV病毒感染的蝦苗成長較慢，且到後幼生十九期時，其體長分布範圍越大，造成蝦苗參差不齊，由表6-3中之較大的標準偏差可得知，BMN感染斑節蝦苗亦有類似的現象⁽¹¹⁴⁾。而未被 MBV感染的蝦苗體型細長，活力佳，大小亦較均勻，其標準偏差較小。據觀察，受MBV感染的蝦苗由於池中常有死亡蝦苗，所以殘食嚴重，病毒傳染也快，再則病毒感染的蝦苗會引起消化吸收障礙，變態延後，但並不是每一隻蝦苗都會被感染，感染程度也不一定相同，所以同一族群就容易造成成長上的差異，那些小型體弱的蝦苗到後來常會死亡，因此活存率也就更低。無 MBV感染的蝦苗成長快速，體型均勻，活存率高是其特性。

表6-3 MBV對草蝦育苗過程之感染及成長影響表

Larvae	MBV infected			MBV non-infected		
	Histopatho.	ELISA ^b	Mortality ^c	Body Length(mm) ^d (Range;SD) ^e	Mortality ^c	Body Length(mm) ^d (Range;SD) ^e
Fertile- eggs	0	n	-	ND	-	ND
Nauplius- III	0	n	-	ND	-	ND
Nauplius- V	0	n	-	ND	-	ND
Zoea- I	0	p	+	ND	+	ND
Zoea- II	a	p	++	ND	-	ND
Zoea- III	0	pp	-	ND	-	ND
Mysis- I	0	p	+	ND	-	ND
Mysis- II	0	p	-	ND	-	ND
Mysis- III	0	p	-	ND	-	ND
PL-1	3%	pp	++	ND	+	ND
PL-3	8%	pp	+	4.3(4.5-5.2; 0.25)	-	4.9(4.5-5.5; 0.27)
PL-5	12%	pp	-	5.5(4.8-6.2; 0.63)	-	5.7(5.1-6.5; 0.55)
PL-7	20%	pp	+	6.8(5.1-7.7; 1.30)	-	7.5(7.1-8.5; 0.62)
PL-9	33%	pp	+	8.0(6.3-8.5; 1.05)	-	9.5(8.0-10.3; 0.91)
PL-12	70%	ppp	+	9.2(6.9-13.2; 2.31)	+	11.9(10.2-14.0; 1.42)
PL-19	90%	pp	++	13.7(9.9-17.2; 3.15)	-	17.4(16.5-19.7; 1.69)

^a MBV occlusion bodies was detected in the hepatopancreatocytes of zoea stage.

^b Degree of color reaction for ELISA is expressed as n, p, pp and ppp, "n", negative reaction; "p", weak positive reaction; "pp", moderate positive reaction; "ppp", strong positive reaction.

^c Degree of mortality is expressed as -, +, ++, +++, "-", no mortality was found; "+", 10 or less than 10% of mortality rate was found; "++", 10-50% of mortality rate was found; "+++", more than 50% mortality rate was found.

^d Body Length was derived from mean of a total of 50 specimens. ND, not done.

^e Range and SD, the range and standard deviation of body length.

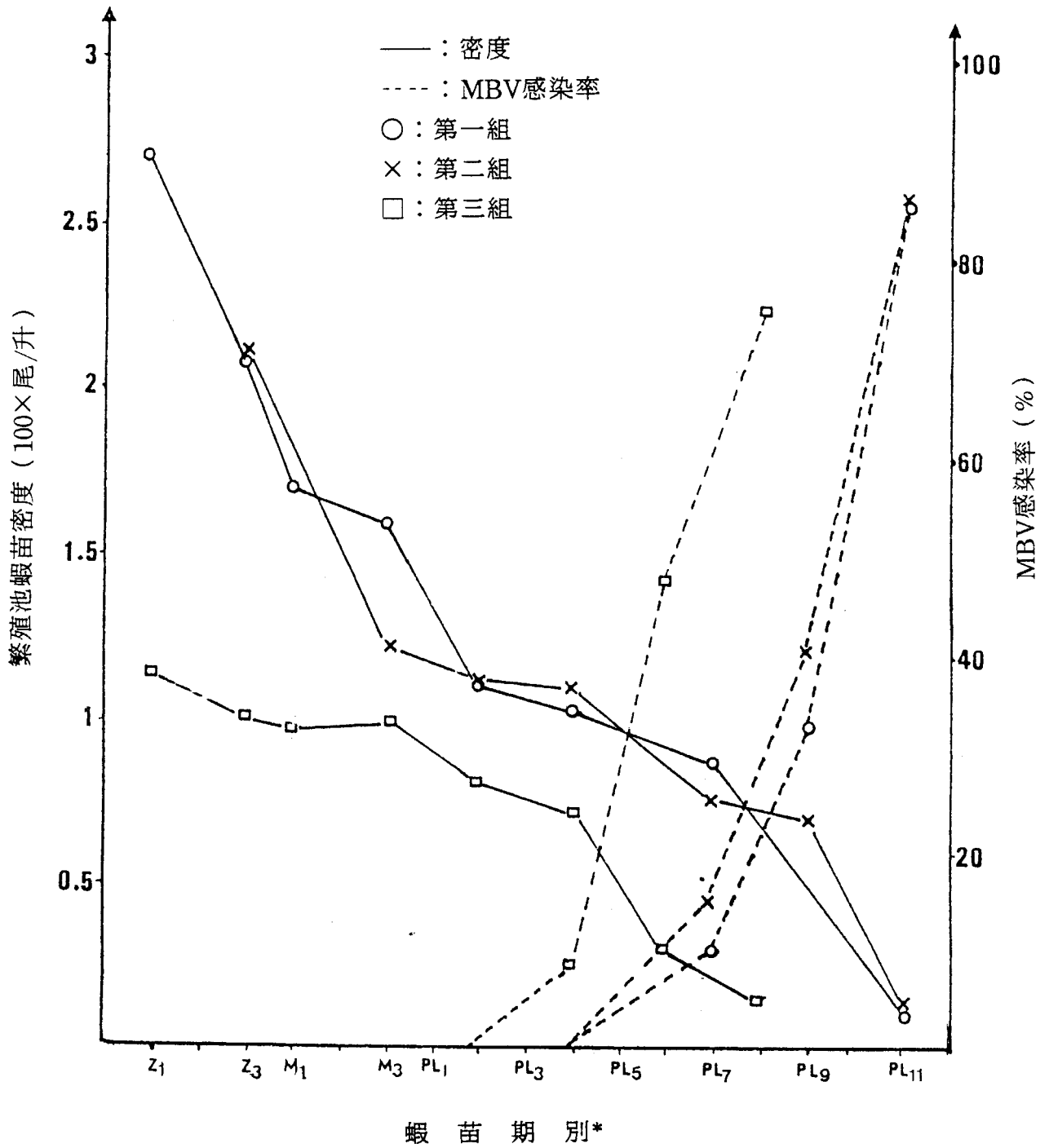


圖6-1 繁殖場草蝦苗及草蝦桿狀病毒 (MBV) 感染率之比較

*Zx : 眼幼蟲期 (Zoea)

Mx : 糠蝦幼蟲期 (Mysis)

PLx : 後期幼生 (Postlarvae)



圖6-2 小蝦肝胰腺掃描式電子顯微鏡解剖圖，大量肝胰腺盲管（T）構成肝胰腺包圍住前腸（FG）。bar=500 μ m。

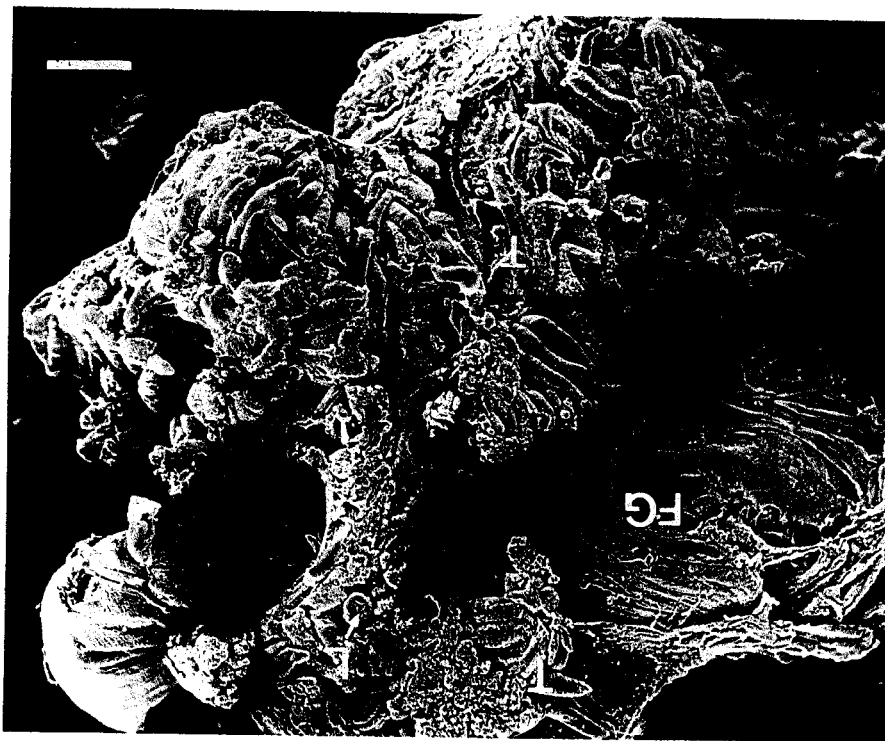


圖6-3 不良方法純化 MBV 包容體，其內部病毒（occluded virus）大部分病毒（EV）已被破壞而失去DNA，只有少部份（FV）仍保持完整。bar=1.6 μ m。

STAGES	Nauplius → Zoea → Mysis → Postlarvae																	
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Algaes	—————																	
Artificial feeds	—————																	
Shrimp flake	—————																	
Plankton Powder	—————																	
Micro-capsulate Feed	—————																	
Corpuscle Feed	—————																	
Rotifer	—————																	
Brine Shrimp	—————																	

* The quantity of feed is expressed by width of black lines.

圖6-5 Feeding Schedule for *Penaeus monodon* Larvae in Hatchery.



圖6-6 草蝦眼幼蟲第二期組織病理檢驗，肝胰腺腔 (L) 及細胞核內有MBV包容體 (OB)。蘇木紫與伊紅染色。bar=50 μ m。

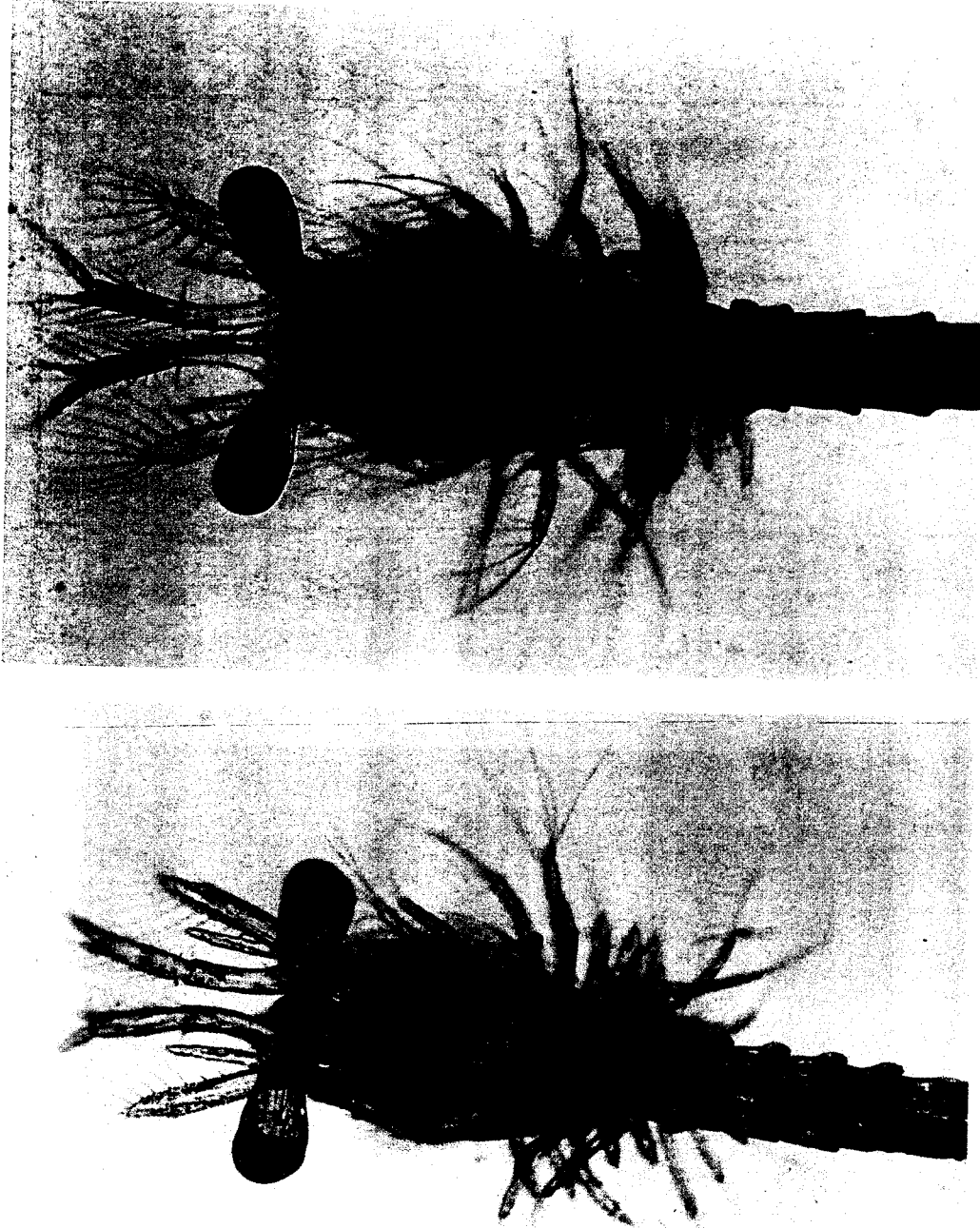


圖6-7 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon* -type Baculovirus; MBV) 感染實驗，左為實驗組感染MBV眼幼蟲第三期蝦苗，右為對照組正常之同期蝦苗。注意腸道(箭頭)之差異。

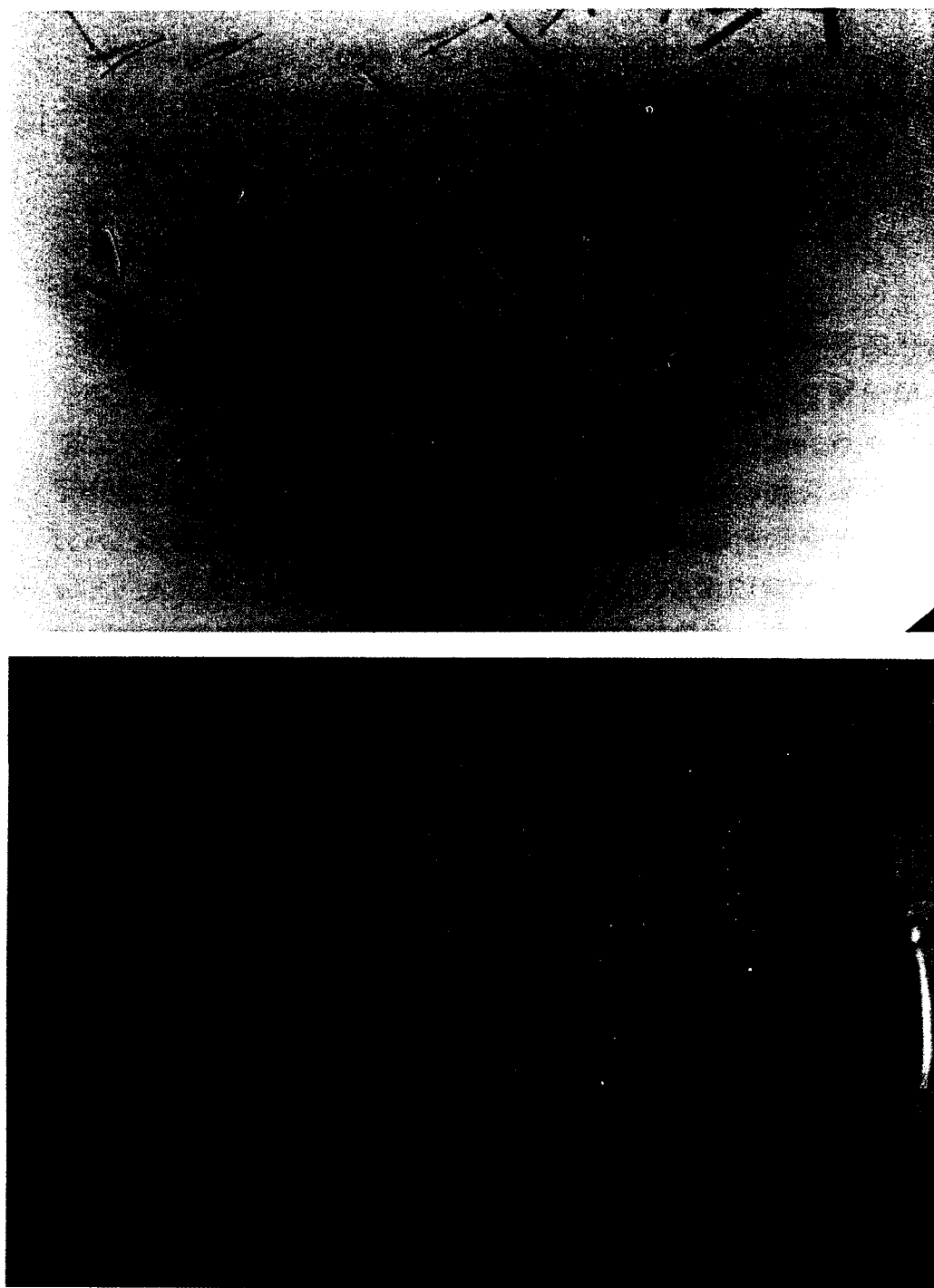


圖 6-8 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 感染實驗，在後幼生 12 期 (PL12) 體型上有顯著差異，左為感染 MBV 實驗組，右為正常蝦苗。

第七章 草蝦桿狀病毒複製研究

對於BP.MBV和BMN等複製情形的研究，到目前除了筆者對MBV發表的報告之外⁽⁴⁶⁾，尙未有其他相關報告。而對於感染昆蟲的核多角病毒(NPV)之複製研究報告很多，在本文整理過程提供了多項佐證^(16,35,36,37,38,66,67,68,71,84,134,136,141,153)，茲將過去對桿狀病毒複製研究有關之論文回顧於後。

病毒於感染寄主之後，其核酸和蛋白質的合成，在定性和定量二方面的研究大多在環境穩定之培養的細胞下進行^(86,149)，少數在活體下研究。Tjia等(1979)以 *Autographa californica* NPV感染 *Spodoptera frugiperda* 的細胞株，指出感染後16~18小時，病毒的DNA合成速率快速增加。Hitoshi(1972)以放射性標示的電子顯微技術研究 NPV病毒在蠶 *Bombyx mori* 的脂肪細胞內DNA合成的情形，指出感染後1-2小時，³H-thymidine 開始在細胞的染色質上聚集，感染後5小時，細胞的染色質內已有裸露的病毒出現。10小時之後，大量裸露的病毒出現，且已有成熟的病毒位於染色質外，也可看到被包入核多角體內⁽⁷³⁾。Benz和Wager(1971)以放射性元素標示，研究顆粒性病毒(GV)感染 *Capocapsa pomonella* 幼蟲的核酸代謝情形，感染後60-70小時，被感染的細胞RNA之總合成速率為正常細胞的三倍，此時DNA合成速率達最高點，為正常細胞的30倍。

桿狀病毒感染細胞之後，首先可以見到的改變是細胞核的增大和高密度顆粒類似染色質的物質，被稱為病毒基因基質(Virogenic stroma)的聚集⁽¹³⁶⁾，此顆粒物質首先會散佈核內，短時間後顯然會聚集於核仁，成一高密度的物質。它是病毒核酸鞘形成的地方，在核酸鞘形成前會先有“鞘(capsid)”出現^(71,72,84)。

病毒有複製現象出現的時間，與病毒和寄主的種類及環境皆有關連。Hiruml等(1975)以 *A. californica* NPV感染 *Trichoplusia ni* 的細胞株，指出感染後3小時，少數細胞形態已有改變，大多數細胞在感染後6-12小時形態會改變。核酸鞘的出現在感染後24-48小時，此時無外套膜的病毒亦在病毒基因基質邊出現。Knudson和Harrap(1976)發現 *Spodoptera frugiperda* 的核改變是在感染後8小時看到，9小時後有裸露的病毒顆粒出現，而Raghow和Grace(1974)指出 *Bombyx mori* 的NPV感染，16小時後病毒基因基質才會出現，24小時後核酸鞘才出現，一直到32小時還未發現

有外套膜形成。Summers (71) 在研究 NPV 複製時，在感染 T.ni 的中腸細胞核內發現有長條類似管狀但無分枝的鞘蛋白質 (capsid protein)，在 GV 感染的脂肪細胞之細胞質內發現的是相似的管狀物，但卻有分枝⁽¹³⁷⁾。一般推測其可能為核酸鞘形成的最初階段^(137,143)。

桿狀病毒外套膜的取得方式，可分為兩類，無包容體和有包容體。Adams 等 (1977) 及 Hess 和 Falcon (1977) 以 *Heliothis zea* NPV 感染 *H. zea* 細胞株，這 NPV 是無包容體的 NPV 病毒。當其核酸鞘成熟後，以出芽方式自細胞膜出去，並包上外套膜。在有包容體的病毒，其外套膜的取得方式不相同。昆蟲及蝦子的病毒，在核內即有已包上外套膜的病毒出現，這外套膜是從何處來的？Stoltz 等 (1973) 以連續切片方式研究被感染的核內一種有開口的膜狀物質 (open-ended membrane profiles)，指出它並沒有與核膜有任何接觸，被感染的細胞其核膜顯然與正常的細胞沒有兩樣，而且也沒有發現具有模板的功能，能用來製造類似外套膜的物質。Mackinnon 等 (1974) 的研究報告亦有同樣的結果，他們認為這有開口的膜狀物質是病毒外套膜的先驅物質。

包容體的形成是在核鞘取得外套膜之後^(84, 128, 144)，在組織培養方面，包容體的開始形成，是在感染後 18 小時^(72,84)，而多角蛋白 (polyhedrin) 是在感染 10-16 小時後開始合成^(43,82,155)，而包容體是這種 peptide 聚合而成。病毒的外套膜上，似乎有結合位置，其對多角蛋白有專一性，是聚合作用的起始點，但這種聚合作用的機制並沒有經過證明^(68, 84, 144)。

Lightner 等 (1983 b) 研究 MBV 病毒時，以電子顯微鏡觀察，可在內質網四周發現多角蛋白 (polyhedrin) 的結晶，故認為多角蛋白是在寄主細胞的內質網內合成。

MBV 之複製過程：

本文述及有關 MBV 病毒的複製是以電子顯微鏡觀察，再與昆蟲的核多角病毒和顆粒性病毒的複製情形做一比較，以瞭解 MBV 在草蝦的肝胰腺細胞內複製的情形。

被 MBV 感染的草蝦肝胰腺以 glutaraldehyde 和鐵酸固定後，經由包埋、超薄切片、染色之後，以穿透式電子顯微鏡觀察，可以在感染的細胞核內找到病毒的基因基質 (virogenic stroma)，類似長管狀的鞘 (capsid) 的物質之形成，核酸鞘 (nucleocapsid) 的形成，外套膜的取得及包容體的形成等，茲將複製過程敘述如下。

1. 病毒基因基質 (virogenic stroma) 的形成

在圖7-1有肝胰腺盲管上的F細胞和R細胞。R細胞是感染初期，有高電子密度的顆粒性物質散佈在整個核內，此時細胞核尚未腫大，微絨毛 (microvilli) 仍是正常形狀。其右邊的F細胞，核已腫大，高電子密度的顆粒性物質顯然已聚集在核仁的中心，而此時微絨毛已有萎縮現象。Smith (1977) 將此類似染色質 (chromatin-like) 的高電子密度顆粒，稱為基因基質 (virogenic stroma)。

2. 病毒遺傳物質的形成

基因基質是形成核酸鞘的先驅物質⁽¹³⁶⁾。以電子顯微鏡觀察MBV感染的細胞核，在細胞核內靠近核膜邊緣處，發現高電子密度之長條狀物質纏繞在一起，直徑約為20.0nm，其間夾雜著微絲狀體 (microfilament) (如圖7-2、7-3)，在正常的蝦肝胰腺細胞核內，沒有這類物質，在病毒感染後的細胞才有發現。

3. 類似長管狀之鞘物質 (capsid material) 的形成

圖7-4是類似長管狀的鞘，長度大於 $1.67\mu m$ ，管徑約36.7nm，在細胞核膜邊緣發現。長管狀中有電子密度較高的段落 (箭頭處)，被認為已有病毒的遺傳物質套入。

4. 核酸鞘 (nucleocapsid) 的形成

在圖7-5中可發現，在感染了MBV病毒之草蝦肝胰腺細胞核膜邊緣，有類似長管狀的鞘 (capsid) 和病毒的核酸鞘 (nucleo capsid)。核酸鞘的形成，是固定長度的病毒核酸先與管狀的鞘結合，形成長管的鞘和病毒核酸共存 (如圖7-4、7-5)，沒有與核酸結合之鞘，會被某種酵素消化掉，結果會形成長度大約相等的桿狀核酸鞘。由圖7-4、7-5和7-6，可知草蝦桿狀病毒核酸鞘的複製，是以排列整齊的長條狀整束大量複製。

5. 套膜 (envelope) 的取得

受MBV病毒感染的蝦肝胰腺細胞，在核質內靠近核膜處會有小囊泡出現 (如圖7-3、7-5、7-7)，似乎是由核內膜突出形成。當核酸鞘形成後，就會進行包裝步驟，類似外套膜的小囊泡會被核酸鞘的一端打破，小囊泡的膜便將核酸鞘包住 (如圖7-5)，而形成具外套膜的成熟病毒顆粒。所以MBV為SNPV (singly-enveloped nucleocapsid) 的一種。

6. 包容體 (inclusion body) 的形成

只有含外套膜的核酸鞘才會被多角體蛋白 (polyhedrin) 包圍而形成包容體。含有外套膜的成熟病毒顆粒，其外圍常有多角體蛋白附著 (如圖7-8

），而在核質內亦散佈多角體蛋白的結晶顆粒，細胞質接近核孔的位置亦可發現此類多角體蛋白結晶塊（圖7-7）。當多角體蛋白附著於外套膜後，其他多角體蛋白會跟著附著，一直累積上去形成固定的結晶格，病毒顆粒就被包在裡面。當包容體的數量和體積達到一定程度時，會將核膜撐破（如圖5-4），再將細胞膜撐破（如圖7-9），而將所有胞內的東西全部排入肝胰腺管腔（lumen）中（如圖7-9、7-10）。紅尾蝦肝胰腺細胞內形成包容體，在電子顯微鏡下觀察，常會發現有龜裂的現象（如圖7-10、5-9）而龜裂間又可見微絲狀體（microfilament）相連接（如圖7-11）。將包容體大致維持成球形或橢圓體。

草蝦與紅尾蝦之肝胰腺細胞內形成之包容體，以電子顯微鏡觀察，並未發現有外膜包住。

MBV複製探討

有關病毒複製的研究，應包括病毒與細胞的接觸和侵入（attach ment and penetration）、核酸鞘進入細胞核、寄主細胞的核酸和蛋白質停止生產、感染後引起異類蛋白質的產生、病毒核酸和蛋白質的合成、病毒核酸鞘的形成、外套膜的取得和包容體的形成等步驟。然而本實驗病毒複製的觀察是在自然感染的草蝦肝胰腺細胞，以穿透式電子顯微鏡觀察，並未發現病毒與細胞的接觸和侵入。

草蝦桿狀病毒（MBV）在草蝦肝胰腺細胞內複製的情形，以電子顯微鏡觀察結果，大致與昆蟲NPV和GV的有關研究報告結果類似，在感染的細胞中，可以清楚地見到病毒基因基質（virogenic stroma），其型態與Smith（1977）的描述一樣，是一種高密度的物質。Lightner等（1983b）在MBV感染的草蝦肝胰腺細胞亦發現病毒基因基質，並認為其會移到核膜邊緣，這與本文描述結果相吻合。圖7-1有各不同感染階段的細胞，其基因基質有分散與聚合的情形。在Asayama（1977）的博士論文中，提到鱗翅目細胞株感染了顆粒性病毒後，在其染色質中有點狀粒子出現，認為這點狀粒子會伸長形成核酸鞘。本實驗觀察到的點狀物是纏繞的條狀物橫切而形成的，其直徑平均約為20.0nm，與所測量的病毒核酸直徑約21.2nm，以t-test測定並沒有顯著差異。

Summers（1971）及Knudson和Harrap（1976）認為鞘是一長管狀的物質，未與核酸結合的鞘常可存在細胞核中。在圖7-4中亦發現同樣物質在感染MBV的草蝦肝胰腺細胞內，Burley等（1982）以X射線研究桿狀病毒核

酸鞘的結構，認為鞘是由十二條多胜鏈環繞而成管狀，中間則是雙股DNA結合多胜肽而形成的柱狀核心，所以由前人的研究報告和本實驗觀察結果，認為纏繞的條狀物是病毒的遺傳物質，即為已結合多胜肽的雙股 DNA。病毒核酸和鞘是分別形成後再套上去的，此與Hiruml等（1975）、Federici（1980）、Summers（1971）的觀察結果相同。圖7-4是一長條的鞘，其中有密度較高的段落，應是有核酸進入，在沒有核酸進入的鞘，其密度較低。圖十九的電子顯微鏡觀察照片，有含核酸的鞘和不含核酸的鞘同時存在，與Federici（1980）研究感染蚊子之桿狀病毒複製，亦有類似的結果。

圖7-5中，核酸鞘已經形成，其長度約略相等，最初排列整齊，後來漸散開，開始套上外套膜，與成束核酸鞘同時包入同一外套膜的MNPV（multiply-enveloped nucleocapsid）有別，而與SNPV（singly-enveloped nucleocapsid）類似。在昆蟲病毒複製之電子顯微鏡切片，可以發現在細胞核內有雙層脂蛋白的膜物質，它被認為是病毒的外套膜（105），在圖5-3、7-1亦發現有此類似物質，但並未如 NPV感染昆蟲細胞所描述為末端開口的囊狀物，而是在超薄切片下為長條狀。

在圖7-3、7-5、7-7發現感染MBV的細胞核會有囊泡出現，當核酸鞘的一端碰到囊泡，這囊泡就會出現破洞，核酸鞘就進入囊泡中而被包起，變成有外套膜的核酸鞘。在Federici（1980）的研究報告亦發現有相同的情形。Stoltz等（1973）以連續切片研究外套膜的來源，指出所發現的膜物質並未與核膜相連接，感染的細胞核膜亦與正常的細胞膜沒差異，所以Stolt等（1973），Mackinnen等（1974）他們認為NPV之有包容體病毒的外套膜是重新形成（*de novo* morphogenesis）的，這與本研究結果不同。實驗中亦發現脂蛋白的膜物質可能是破裂囊泡的變異。

包容體的形成是桿狀病毒第二類群--核多角病毒（NPV）的特性。MBV感染草蝦和紅尾蝦肝胰腺細胞和中腸前段膨大部的柱狀細胞亦會形成一個至多個球形包容體，故屬於第二類群。Lightner等（1983b）以電子顯微鏡觀察 MBV感染的草蝦肝胰腺細胞，發現在內質網周圍，尤其是接近核仁的內質網周圍有很多核多角蛋白（polyhedrin）的結晶。由圖7-7，我們可以推斷核外的多角體結晶是經由核孔進入核內，但進入時是以散開方式進入，因此在細胞核內、外套膜和包容體周圍可發現散佈的多角體蛋白。

草蝦桿狀病毒（MBV）在包容體內並沒有一定的排列和數量，是隨意散佈在包容體中，並且包容體可以無限制地累積多角體蛋白，一直到把細胞脹破為止，且細胞內的包容體由一個到多個不等。感染昆蟲的 NPV，其包

容體數量很多，由數十個到數百個不等，且大多在包容體外又有一層膜包住。在紅尾蝦的肝胰腺細胞發現的包容體常可見龜裂現象，而在龜裂之處，以高倍電子顯微鏡觀察，它們以微絲狀體相連接，故在桿狀病毒感染細胞後，會產生大量的微絲狀體，其有鞏固包容體的功能，使包容體形成球形或橢圓體。

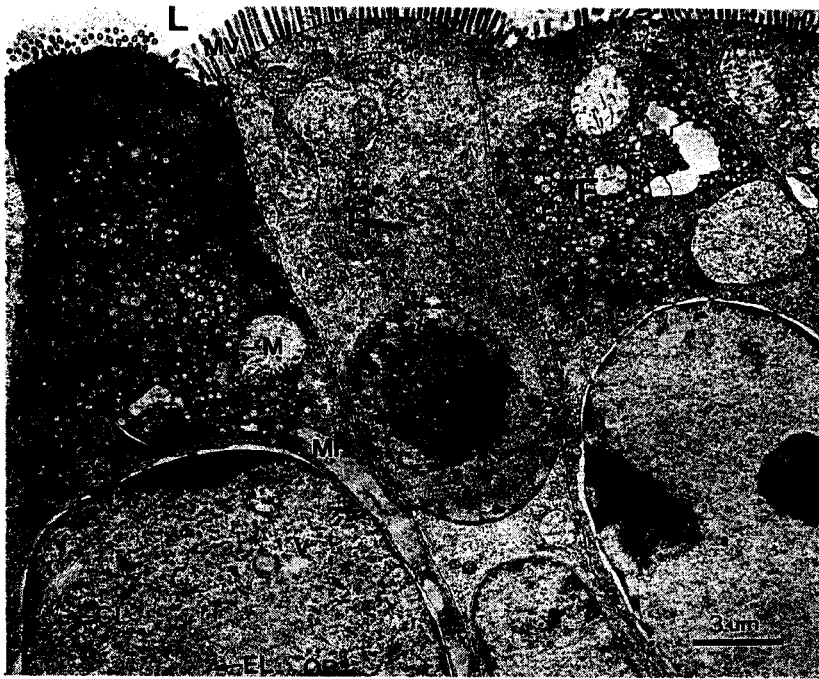


圖7-1 草蝦肝胰腺細胞，圖左和圖右為兩個不同感染階段的F細胞，圖左F細胞核內已有病毒（V）和包容體（OB）形成，類似鞘（CL）和類似外套膜（EL）的物質亦出現在核中，內質網（ER）已成囊泡狀，微絨毛（MV）已有瓦解現象；圖右 F細胞核內病毒基因基質（VS）成凝集狀態。圖中為R細胞，其核內病毒基因基質（VS）是分散開的。L：管腔、M：粒線體、MF：微絲狀體。

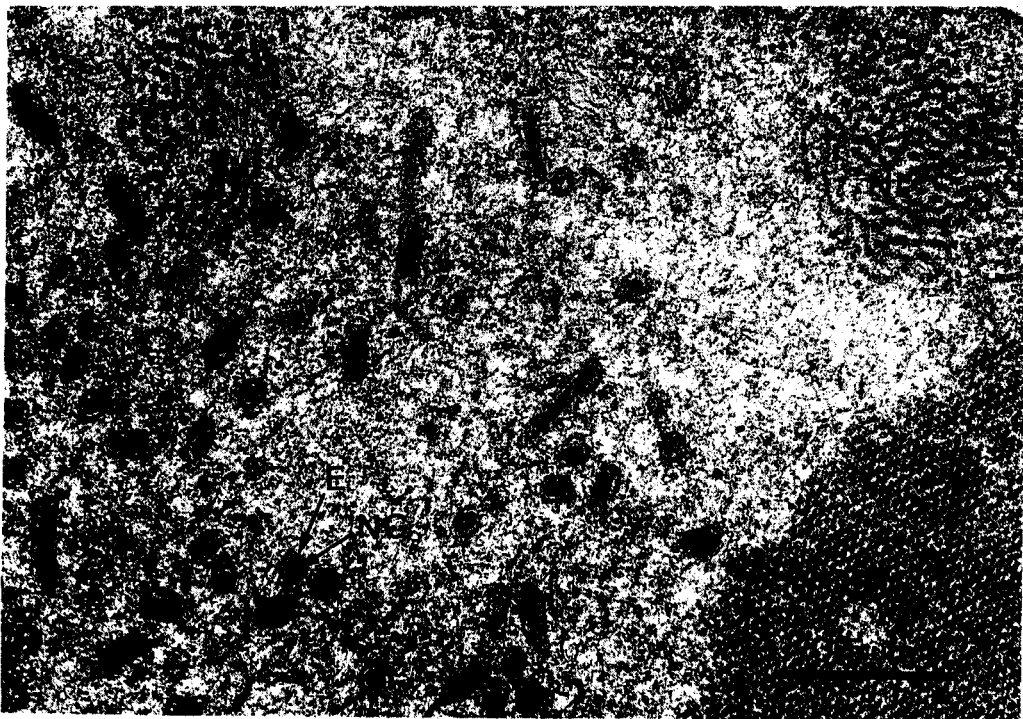


圖7-2 草蝦肝胰腺細胞核內類似病毒核酸物質（NL）成纏繞狀。E：外套膜、NC：核酸鞘、OB：包容體。



圖7-3 感染MBV的草蝦肝胰腺細胞，大量類似外套膜來源的囊泡（VE）由核內膜褶起形成。MF：微絲狀體、OB：包容體、V：病毒、VS：病毒基因基質。

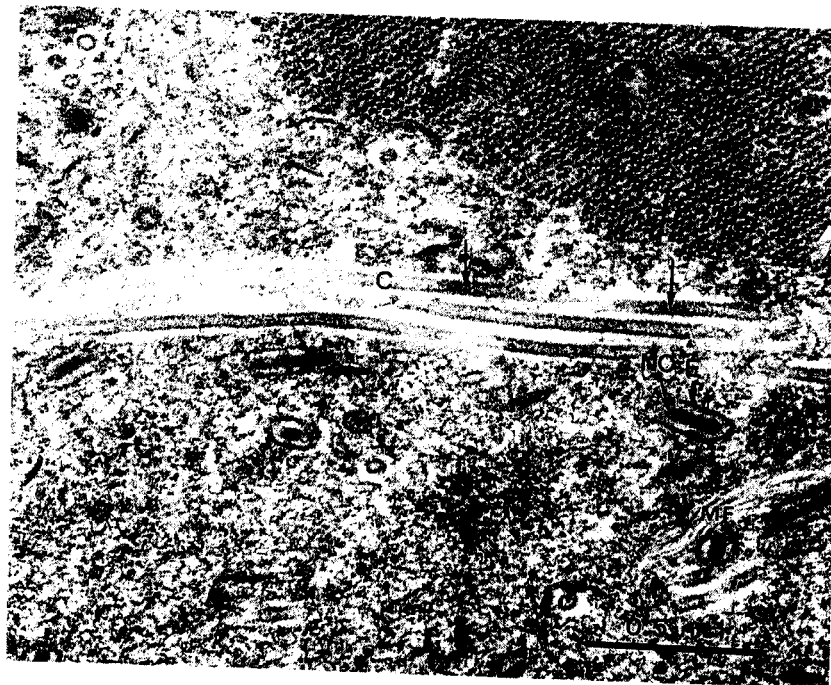


圖7-4 草蝦肝胰腺細胞核內之類似長管狀的病毒鞘（C）之高倍放大圖，箭頭指示高密度處可能已套上病毒核酸、E：外套膜、MF：微絲狀體、NC：病毒核酸鞘、P：多角體蛋白晶體。

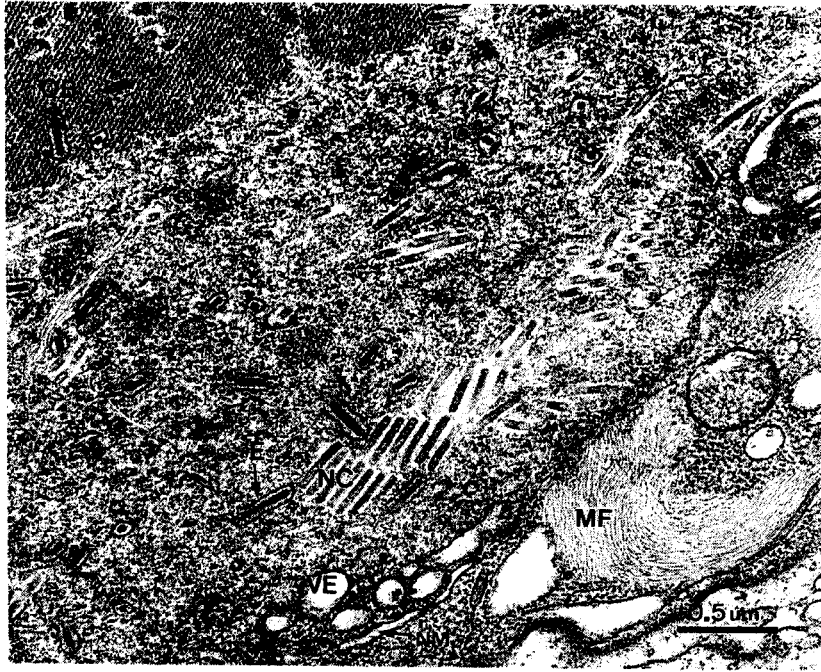


圖7-5 草蝦肝胰腺細胞內 MBV核酸鞘複製情形，核酸鞘 (NC) 整齊排列於核膜 (NM) 邊，圖中可見核酸鞘套 上外套膜 (E) 的過程，由核內膜形成的囊泡 (VE) 出現在核酸鞘旁。M：粒線體、MF：微絲狀體、OB：包容體

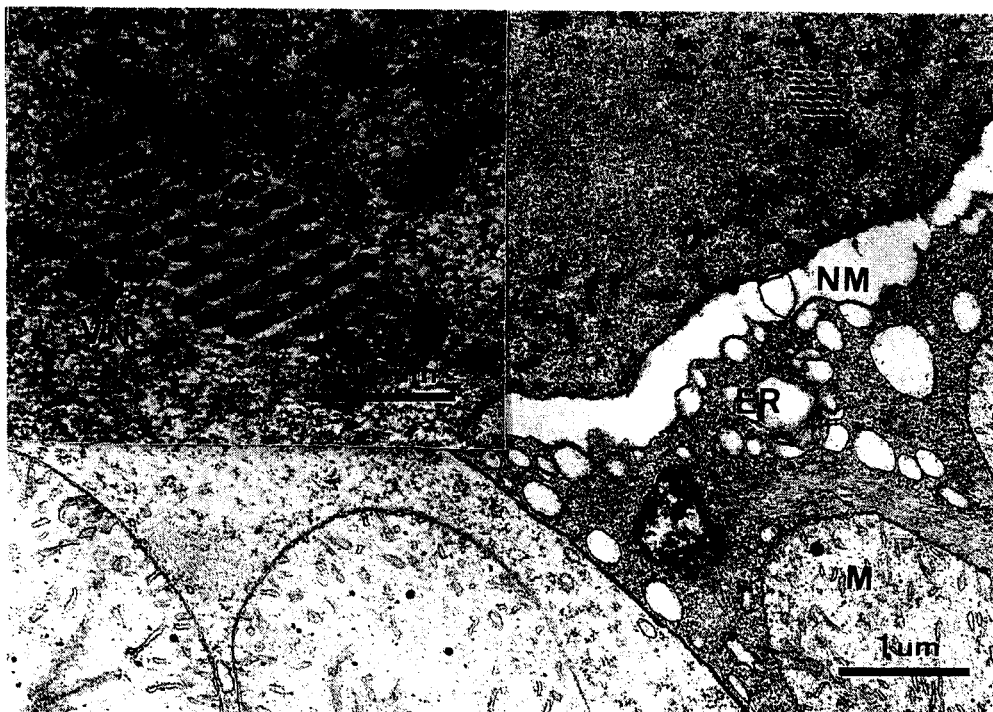


圖7-6 草蝦肝胰腺細胞核內之類似病毒鞘 (C) 成束排列，左上為其放大圖，其鞘內有些已有病毒核酸 (VN)。ER：內質網、M：粒線體、NM：核膜。

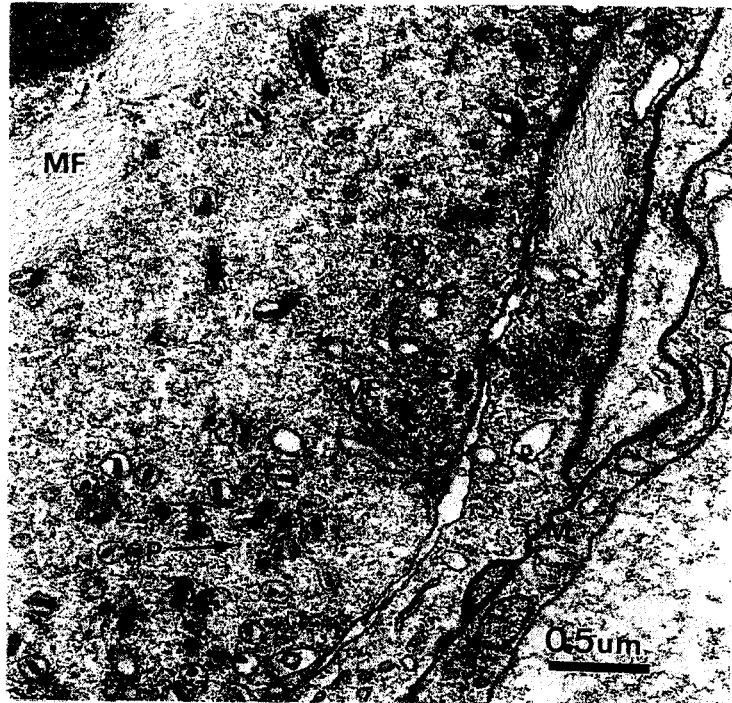


圖7-7 感染MBV之草蝦肝胰腺細胞，在細胞質中發現之多角體蛋白結晶（P），核內有類似外套膜之囊泡（VE）和游離的多角體蛋白晶體（P）。CM：細胞膜、MF：微絲狀體。

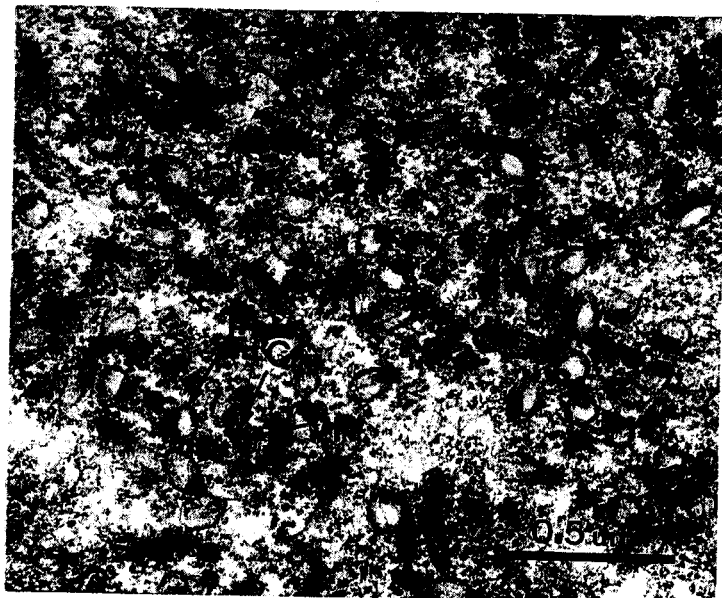


圖7-8 紅尾蝦肝胰腺細胞內之高倍放大圖，顯示多角體蛋白晶體（P）吸附於病毒的外套膜（E）上。C：病毒鞘、VN：病毒核酸。

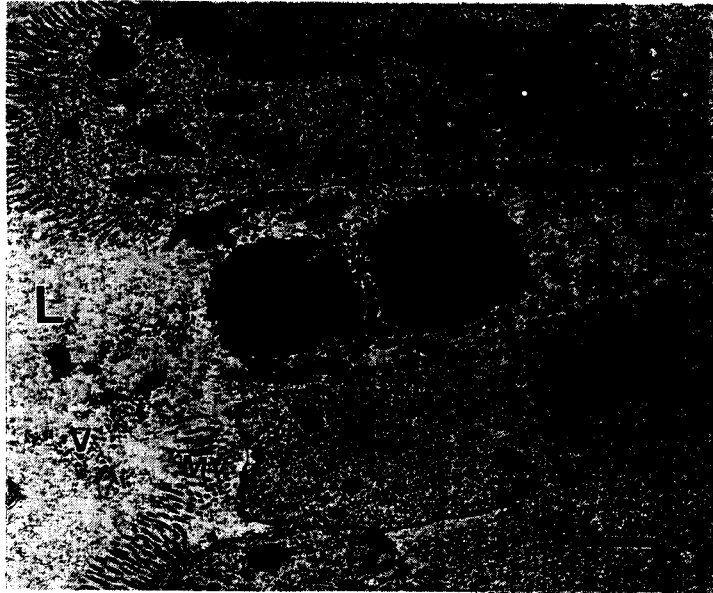


圖7-9 低倍率下之草蝦肝胰腺電子顯微鏡照片，感染MBV後之肝胰腺細胞破裂，包容體 (OB) 和大量病毒顆粒 (V) 排入管腔 (L) 中。MV：微絨毛。

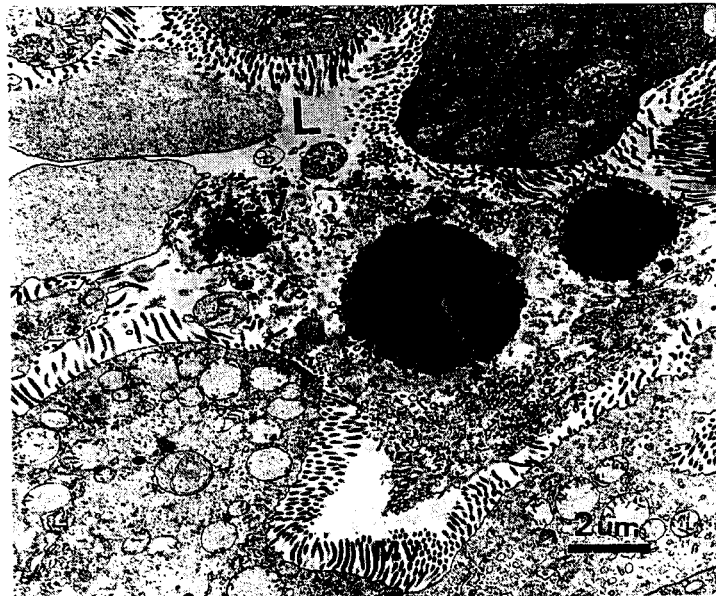


圖7-10 低倍率下之紅尾蝦肝胰腺電子顯微鏡照片，在管腔 (L) 中有MBV病毒 (V) 和包容體 (OB)。MV：微絨毛。

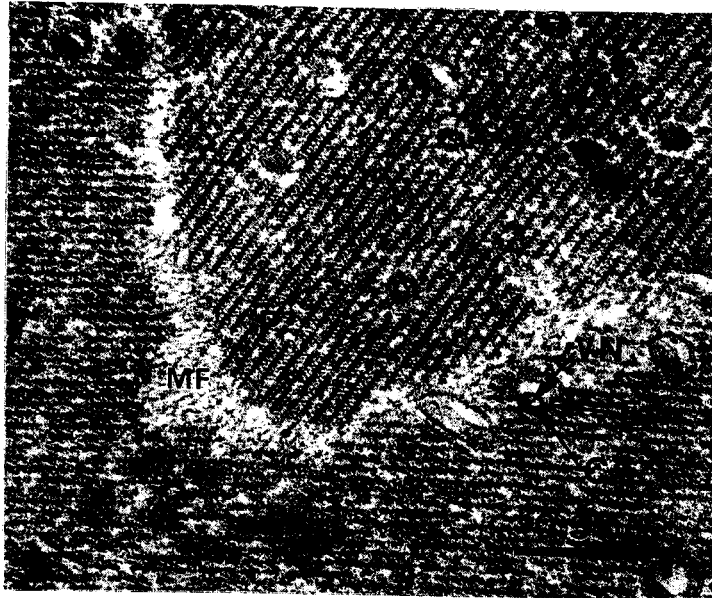


圖7-11 紅尾蝦肝胰腺細胞核內形成之包容體高倍放大圖，顯示包容體之裂縫以微絲狀體（MF）連接。C：病毒鞘、E：外套膜、P：多角體蛋白晶體、VN：病毒核酸。

第八章 草蝦桿狀病毒性狀研究

草蝦桿狀病毒的性狀研究，這些年來已有相關報告如3,29,67，由於病毒取得不易，所以研究倍感困難，經筆者多年的努力結果，才在這方面的研究有所進展。在感染蝦類的三種桿狀病毒之性狀研究，過去只有Summers (1977) 在針對BP的研究較完整。由於病毒的研究常必須要有細胞體外培養加以配合，而MBV至目前尚無法於培養的細胞大量收集，在蝦類組織培養方面只有Chen & Kou (1988) 發表草蝦桿狀病毒感染草蝦造血組織之突破性報告⁽⁴⁷⁾，然而因感染細胞數量少，以至沒有純化的價值。所以草蝦桿狀病毒研究，過去皆直接純化自活體，本文將研究過程得到之結果列於後，以茲對MBV有進一步之了解。

1. 包容體特性：

MBV在草蝦肝胰腺細胞內會形成一個至多個包容體（如圖8-1、8-2），直徑約3~10 μ m，在紅尾蝦肝胰腺細胞核內亦形成多個包容體，包容體的形狀亦為球形或橢圓體。以濕的抹片法檢驗 MBV的感染，發現與組織塊分離的細胞其核內有多個顏色較深的包容體（如圖8-1）。

以Feulgen reaction特殊染技，用Schiff reagent染感染MBV的蝦肝胰腺組織切片，並以Fast green當背景，其結果如圖2-5、2-6，細胞核內有大量的DNA，經Schiff reagent作用後，變成紫色，可見到核腫大現象。腫大的核周圍紫色較深，而有包容體的地方紫色較淡。顏色較淡的位置經Fast green染色後即可見到鮮艷的綠色，而其核周圍仍保持紫色，細胞質則變為較淡的綠色。

Schiff reagent是與分子中的胺基和醛基反應，Feulgen reaction是利用Schiff reagent的特性，針對DNA的染色技術⁽⁷⁸⁾。由感染MBV之肝胰腺組織切片的染色結果和TEM觀察的結果對照，可以得知被感染的細胞核內之病毒，可分游離病毒和包容體病毒。包容體病毒量比游離病毒少，因此以Schiff reagent染色，有包容體的位置紫色較淡，而有病毒基因基質的核周圍，紫色較深，當以背景色fast green染後，包容體吸附多量染劑，而變成綠色，因此可加以證明草蝦桿狀病毒是屬於DNA病毒，且桿狀病毒包容體和一般病毒所聚集而成的包涵體（inclusion body）有所不同。

MBV包容體的內徑可達10~20 μ m，一般昆蟲的多角體只有1~4 μ m，

形狀多為立方或幾近圓球型⁽³⁴⁾，MBV包容體形狀亦近乎圓球型，外表沒有核多角體外套膜（polyhedron envelope）包裹，與對蝦桿狀病毒（*Baculovirus penaei*）相同⁽¹⁰⁰⁾，而昆蟲NPV病毒包容體一般皆有envelope包住⁽⁶⁸⁾。

2. MBV包容體之純化

2-1. 感染病毒草蝦之採集（Sampling）

2-1-1 取自病蝦

採自病蝦池大量死亡的幼蝦或市場上的病蝦，將肝胰腺自蝦體分離下來，盡量去除前腸（胃），加入TE buffer（pH 7.4），其中肝胰腺與buffer的比例約1：10。在低溫下以均質機打碎，打碎之均質液先以150網目（150 mesh/cm²）的尼龍網濾除大顆粒物質，包括大量的幾丁質碎屑，過濾時勿用手擠壓，讓其自然的通過，最後留在濾網上的物質再以TE buffer沖洗數次；前面的濾液再以300網目的細網過濾，此時更細的碎屑會被濾除，病毒的包容體會隨buffer通過網目流至濾液內。將濾液分裝於50 ml離心管進行離心，離心力480 xg，時間5分鐘。離心完後到去上層液，底下的沈澱物再以TE buffer懸浮，懸浮液再以300網目的細網過濾，所得的濾液以前述方法離心，離心下來的沈澱物以含1%SDS, 4M urea, 0.5M NaCl溶液作用10分鐘，作用後再離心，可將大部份細胞碎片作用，以利包容體純化，然後以離心的方法將上述的溶液清洗掉，最後所得之沈澱物即可用來進行離心純化。

2-1-2 取自蝦苗

採自台灣南部草蝦苗繁殖場和蝦苗蓄養場之草蝦後幼生期10-20（Postlarvae stage 10-20），以肝胰腺抹片檢查法（參閱第二章方法）檢查病毒感染嚴重程度，有高感染率之蝦苗即以活蝦運送之方式，送至實驗室蓄養並盡速進行解剖工作（最好在一兩天之內完成）。

蝦苗以細網撈起在培養皿內，並以TE buffer（pH7.4）清洗乾淨，留下少許之buffer，然後置於解剖顯微鏡下將肝胰腺分離下來，浸入裝有TE buffer之eppendroff，其容量每1 ml的buffer可裝入100-300個肝胰腺。在取肝胰腺時，盡可能不要取到附肢，且一切操作以冰浴降低溫度，防止肝胰腺內消化酵素的活化及DNase的作用。取下的肝胰腺須防止其聚於管底，盡可能使其懸浮，肝胰腺細胞在buffer中即開始會游離出來，並在低張的buffer中會漲破，細胞內的病毒和包容體此時即會游離於buffer中，開始受到外在

環境的影響。使肝胰腺懸浮及細胞游離的方法，我們使用了rotex或無菌牙籤及micropipet的攪動，皆可達到其效果。冰浴中的sample經離心13000 rpm 60分鐘，吸除上清液，pellet以TE buffer懸浮，懸浮液亦儲存於冰浴中，待收集到相當數量，方才進行下一步驟。

2-2 病毒離心純化法

2-2-1 氯化銣濃度梯度離心法

將一11ml離心管中依次加入不同濃度的氯化銣（in 0.02M Tris buffer），40% 4 ml、30% 3 ml和20% 2 ml。於最上層加入上述未純化之包容體，以200,000 $\times g$ 離心16小時，可得到白色帶狀部分事先以光折射儀量取每一條band的折射率，查表將之換算成密度。將之取出以TE buffer（pH7.4）稀釋，然後再以離心法將病毒和包容體離下，取少部份進行負染色觀察，以電子顯微鏡檢測，所得之病毒與包容體置於-20°C下保存。

將初步純化的病毒液進一步以氯化銣梯度離心純化，在200,000 $\times g$ 16小時的離心後，可得到兩條分離清晰的白色帶（圖8-3），將之分別收集，並以負染色技術處理後，在電子顯微鏡下觀察，上面的帶為病毒（圖8-4），而底下為病毒與多角體蛋白形成的包容體（圖8-5），測其氯化銣折射率分別為1.3620及1.3651，將之以內差法換算，求得密度為1.29g/ml及1.33 g/ml。BP的包容體以蔗糖濃度梯度離心，得其密度為1.1~1.3g/ml（142），而Bruce et al.（1991）以CsCl等密度離心定出BP的密度，分別為1.33和1.32g/ml（37,142）。

2-2-2 蔗糖濃度梯度離心法：

事先配製70%及35%的蔗糖無菌溶液，用梯度製作儀器，以35 ml離心管做成35-70%的連續蔗糖濃度梯度液，將上述的懸浮液加於蔗糖梯度液上方，緊接著進行離心，100,000 $\times g$ 30分鐘，記錄其結果，並收集每一條band。band以TE buffer（pH7.4）將蔗糖稀釋五倍以上，然後再以離心100,000 $\times g$ 30分鐘將病毒及包容體離下，倒除上清液後，pellet 以適量的TE buffer懸浮，儲存於冰浴中，待以電子顯微鏡之負染色技術檢測病毒顆粒。

初步純化的病毒液以蔗糖梯度離心純化法，以35%~70%的蔗糖連續梯度濃度離心 100,000 $\times g$ ，時間30分鐘，在離心管得到四條白色帶（圖8-6-A），分別抽取並去除蔗糖成份，同樣以磷鎢酸（PTA）進行負染色，以電子顯微鏡觀察，最上白色帶為組織碎片，第二條帶含為組織碎片和少數的病毒粒子（圖8-7），第三條帶之病毒粒子多且純（同圖8-4），最下面的較粗白

色帶為包容體 (occlusion body)，電子顯微鏡下可見病毒粒子 (virion) 和大量內徑約20nm的多角體蛋白晶體 (polyhedrin) (圖8-8)。

2-3 電子顯微鏡負染色技術：

Sample以少量的TE buffer (pH7.4) 懸浮，取至少5 μ L滴於事先鍍好碳膜的300網目之銅網上，靜置一分鐘後以濾紙由邊緣吸除，然後滴2%磷鎢酸 (Phosphotungstic acid, PTA) 染30秒，染後以濾紙將染劑吸乾，陰乾後以穿透式電子顯微鏡觀察。

草蝦桿狀病毒的顯微結構，其最外層包裹著外套膜 (圖8-9)，內部則有核酸鞘，核酸包在長桿狀的蛋白質鞘內；核酸鞘兩端末端有爪狀的結構，而爪狀物頂端有乳頭狀凸起 (nipple) (圖8-9)，當nipple遺失時，我們見到的爪狀結構是張開的，否則是合著的，而爪狀結構若是張開的核酸鞘，由電子顯微鏡圖片顯示其內部是空的，核酸已經失去，只能稱作蛋白質鞘 (capsid) (圖8-8)。

桿狀病毒科病毒顆粒之外套膜是由脂多醣蛋白組成⁽⁸³⁾，完整的草蝦桿狀病毒，其外套膜內只包單一的核酸鞘，是屬於桿狀病毒科的SNPV，其外套膜是密封的，上面無特殊的花紋結構，與一般昆蟲的核多角病毒 (NPV) 一樣⁽⁸⁰⁾。

MBV的核酸鞘外型就如Teakle (1969) 對 *Anthela varia* (Lepidoptera: Anthelidae) 的NPV病毒描述的⁽¹⁴⁷⁾，為長桿狀，兩端末端有爪 (Claws)，而只有其一端看到有nipple。在觀察MBV核酸鞘，有如Teakle所說的nipple，常在閉鎖的爪狀物頂端發現，並認為nipple與爪狀物打開和控制遺傳物質游離出蛋白質鞘的機制有關⁽¹⁴⁷⁾。

草蝦桿狀病毒的DNA是以去氧核糖核蛋白 (deoxyribonucleoprotein) 存在蛋白質鞘內，圖8-10中直徑約10nm之扭曲長條狀之物質，推測是由蛋白質鞘內因未知原因而散出的病毒遺傳物質，因外力所致，有些已斷裂為長短不一的片段。

MBV包容體是一趨近圓球型的多角體 (polyhedron)，在掃描式電子顯微鏡下可見表面多處隆起，推測應是病毒的突起 (圖8-11)，而90%以上的包容體在純化後成不規則形狀，高倍率顯微表面是粗糙的凹凸形態 (圖8-12)，顯然是多角體蛋白 (polyhedrin) 剝落的現象。此推測MBV包容體在純化過程易遭到外力的破壞而裂開，因此在純化結果中，包容體的帶 (band) 純化後，以負染色技術在TEM下觀察，就可見到病毒與核多角蛋白

(polyhedrin) 同時存在，這兩者是在操作過程由核多角體 (polyhedron) 散落出來的。在其他桿狀病毒尚無此種現象之報告。

3. MBV病毒純化技術探討：

草蝦桿狀病毒的純化在本實驗室已嘗試了五年，方法上也一再修改，本章節所使用的方法是有較好之效果的。由於草蝦桿狀病毒感染草蝦比率很高（第三章結果），所以可以隨處採到帶MBV病毒的草蝦，但是採集方法依據本章的方法去選擇病蝦，才能得到較好的結果，一般而言欲純化大量病毒，必須大量的採集病蝦的肝胰腺。病蝦的選擇是有條件的，若肝胰腺已萎縮，或是內部已有黑色的結核組織塊，則乃因肝胰腺的正常上皮細胞以被纖維組織所取代（見第四章結果），初步純化時雜質會較多，且病毒包容體少，所以也不適合做純化病毒用，只有當病蝦開始厭食數天，或病蝦開始大量死亡時，才是採集的大好時刻，如果實驗池中之活蝦，在欲純化前兩、三天就開始斷食，則純化時之工作會較順利些。再則就是發炎的肝胰腺（肝胰腺變白色，有腫脹），病毒包容體含量高，適合用來純化病毒，蝦子再脫殼時有斷食的情形，亦適合用來純化病毒。由於體態健康的草蝦，雖然為MBV帶原者，但由於其攝餌正常，消化酵素活性強，MBV感染不嚴重，肝胰腺通常呈現人工餌料的顏色一棕色，當取下肝胰腺，內部棕色消化液即流出，純化時包容體量少，容易被消化液所消化，游離病毒更是無法取得。

草蝦苗受MBV病毒感染的比例很高，達90%以上，是很好的MBV純化材料，但由於蝦體小，必須藉由解剖顯微鏡，才能準確地取更細小的肝胰腺，必須花很多時間才能採到足夠的病毒，但相對地組織碎片量少，在純化時干擾的情形就少，因此也就不須要利用清潔劑去除大量雜質；病蝦肝胰腺大，相對地組織碎片多，會干擾純化，必須設法排除，利用清潔劑的結果雖然能純化得到包容體且也能保持完整，但是包容體外的游離病毒一定會漏失。

過去在純化過程曾利用有機溶劑Butanol和Hexane的親合力特性，很容易將肝胰腺均質液中的膠質、脂質及有機碎片分離於上層⁽³⁾，再利用離心方法將MBV包容體沈於試管底部，但這些包容體以低溶點洋菜膠聚成塊，進行超薄切片檢驗病毒之完整性，發覺大部份包容體內的病毒顆粒只剩外套膜或病毒蛋白質鞘（圖8-13），而病毒DNA已經消失不見，是有機溶劑使然？亦或是酵素的作用？有待更精密實驗設計並證明之。Robert et al. (1981) 在其活體感染報告中指出，自活體分離AcNPV病毒可使用1 (W/V) Sodium dodecyl sulfate, 4M Urea和0.5M NaCl的混合液，用來除去大部分

膠質及脂質⁽¹²⁷⁾，包容體不會受傷害，其內的病毒（occluded virus）也不會受傷害，但游離的病毒（free virus）將會被破壞，無法得到，如圖8-6之B所示，蔗糖梯度純化結果少了游離病毒的帶。本實驗採用了此配方，結果很好，但必須在後面用TE buffer清洗數次，直到SDS及Urea不復存在。

蔗糖及氯化銨梯度離心純化法，在本實驗都使用過，都可以得到很好的結果，蔗糖梯度離心法，使用成本低，轉速低，所用時間短其優點，但濃度梯度製作必須完美，分離的band不夠清晰是其缺點。氯化銨濃度梯度使缺點恰與蔗糖相反，又由於長時間高離心力使然，會使MBV包容體破裂以及DNA被擠出，是一大缺點，但高轉速短時間（200,000xg，60分鐘），仍然能使病毒與包容體形成band，但純化效果及品質如何？並無進一步實驗證明。

純化的好壞乃由電子顯微鏡中經負染色處理的病毒完整性判斷，完整的MBV病毒顆粒呈子彈型，由於有外套膜的保護PTA無法侵入，而堆積在病毒四週，而死的病毒，如外套膜破裂，DNA消失等，都可輕易判別，PTA可侵入使我們清楚見到內部。實驗中常可見空的蛋白鞘，其真正原因是實驗過程的疏失（如短暫溫度提高），應可避免。因此在未完全瞭解MBV的所有生化特性之前，快速地進行純化工作，且盡可能保持低溫，避免肝胰腺內酵素作用是必須的。

4. 病毒長度分析：

草蝦和紅尾蝦感染的桿狀病毒以電子顯微鏡觀察，比較其病毒之核酸、鞘和多角體蛋白型態和大小，分析結果列於表8-1，其平均值如核酸鞘直徑、含外套膜的病毒直徑和長度以t-test檢定有顯著差異，而核多角蛋白結晶顆粒大小並沒有顯著差異。檢定出的草蝦桿狀病毒大小為 276.0~360.0 nm × 54.0~64.0 nm，核酸鞘大小為220.68~280.0 nm × 35.3~44.1 nm，多角體蛋白結晶顆粒大小為17.1~22.4nm。紅尾蝦感染的桿狀病毒大小為 250.0~302.1 nm × 43.8~56.3 nm，核酸鞘大小為227.1~281.3 nm × 31.3~37.5 nm，多角體蛋白結晶顆粒為 18.0~24.0 nm。表8-1並比較由圖7-2發現之類似病毒核酸物質的直徑和成熟病毒之直徑，其平均值分別為21.2nm和20.0 nm，以 t-test檢定沒有顯著差異。

表8-1 草蝦 (*Penaeus monodon*) 和紅尾蝦 (*P. penicillatus*) 肝臟腺感染之桿狀病毒型態測定與分析

項 目	MBV核直徑 (nm)	類似MBV核 酸物質直徑 (nm)	核 酸 鞘 直 徑 (nm)		核 酸 鞘 長 度 (nm)		病 毒 顆 粒 直 徑 (nm)		病 毒 顆 粒 長 度 (nm)		多 角 體 蛋 白 結 晶 顆 粒 對 角 長 度 (nm)	
			P.m	P.p	P.m	P.p	P.m	P.p	P.m	P.p	P.m	P.p
種類												
測量數量(n)	14	15	24	20	23	17	22	19	18	15	19	17
範圍	19.3-25.0	17.6-22.7	35.3-44.1	31.3-37.5	220.6-280.0	227.1-281.3	54.0-64.0	43.8-56.3	305.0-360.0	250.0-302.1	17.1-22.4	18.0-24.0
平均值(x)	21.2	20.0	38.9	34.6	250.6	250.7	58.2	47.8	325.9	265.2	19.9	20.8
標準機差(s)	1.91	2.05	2.52	1.80	15.44	13.17	2.22	3.59	20.72	12.33	1.50	1.50
t 值		1.63	6.58*		0.02		10.95*			10.41*		1.80
t 值		2.15	2.08		2.10		2.10			2.12		2.11

a. P.m : *Penaeus monodon*

b. P.p : *Penaeus penicillatus*

$$c. t \text{ 值} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{2}{n_1} \frac{n_2}{n_1 + n_2}}}$$

$$d. t' \text{ 值} = \frac{t_1^2 s_{x1}^2 + t_2^2 s_{x2}^2}{s_{x1}^2 + s_{x2}^2}$$

* |t| > |t'|, 差異顯著

MBV核多角體蛋白晶體大小約19.9nm，遠比BP和昆蟲NPV的核多角體蛋白晶體要大得多。BP約為12nm⁽¹⁴²⁾，而昆蟲NPV polyhedrin約只4-7nm⁽⁶⁸⁾。

以病毒純化的方法所得到之病毒，以負染色技術在電子顯微鏡下以高倍率照相之後以游標尺量取核酸鞘（nucleocapsid）的長度，將之記錄並加以分析每一不同來源其長度是否有差異。計算四批不同來源之MBV長度之平均值，分別為261.8nm、265.3nm、250.1nm和262.0nm，由圖8-14可清楚看出每一組病毒鞘長度主要分布在250nm-280nm之間，然而組一和四尚有少數（約10%）短小的capsid，其長度約在150-160nm（圖8-14）。為正常病毒長度的3/5，疑似為昆蟲桿狀病毒常見的缺陷性干擾粒子（Defective interfering particle; DIPs）。

分析之四組病毒分別採自不同族群的蝦苗，但同樣都是來自台灣南部，由條形圖上可清楚知道本MBV病毒蛋白質鞘主要長度為250-280nm之間，而Chen et al.（1989）報告為250.6nm⁽⁴⁶⁾，Lightner（1983）發表MBV capsid長度範圍221-256nm⁽⁹⁹⁾，與本實驗之第三組數據約略相同。而實驗中一、二和四組數據則有偏高的趨勢，是否有種別差異，尚待進一步探討。

4. MBV 包容體蛋白質SDS-膠體電泳分析（SDS-PAGE）

將純化的病毒包容體以SDS-PAGE電泳技術，進行結構蛋白質分離與分析。本實驗使用10%膠體電泳，電壓110Volts。

MBV之核多角體結構性蛋白電泳結果可見一條相當主要的帶，其分子量為62,000 daltons，那即是核多角體蛋白（polyhedrin）（圖8-15）。除了最主要的核多角體蛋白帶之外，另外尚有數條較主要的結構蛋白帶，分別約為分子量 160 KD、130KD、120KD、106KD、60KD、55KD、50KD、45KD、38KD、32.5KD、30KD和25KD。

BP polyhedrin分子量約為50KD⁽¹⁴²⁾，而昆蟲桿狀病毒約只有27KD-34KD⁽¹³⁰⁾。

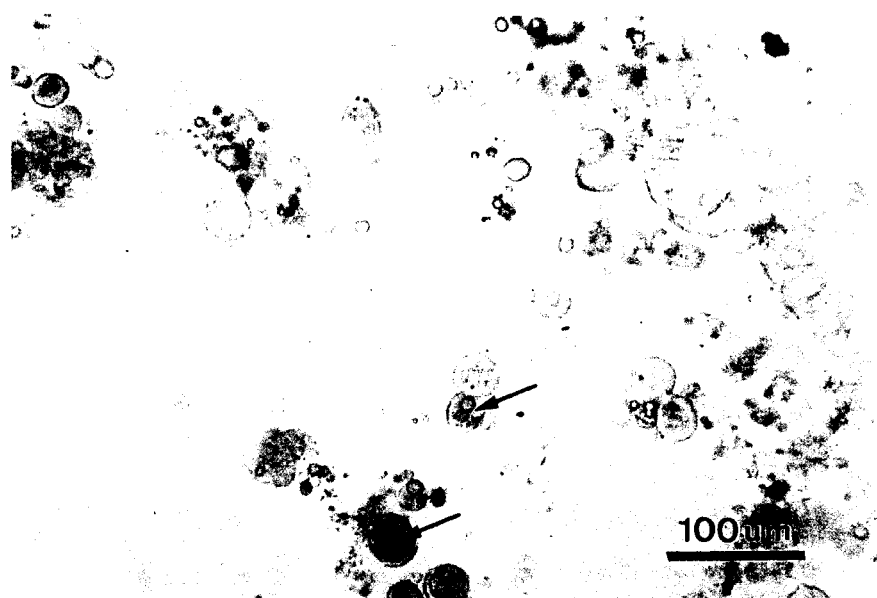


圖8-1 草蝦肝胰腺濕抹片，以0.05%的孔雀綠染色，箭頭指示為草蝦桿狀病毒 (MBV) 的包容體 (occlusion body)。

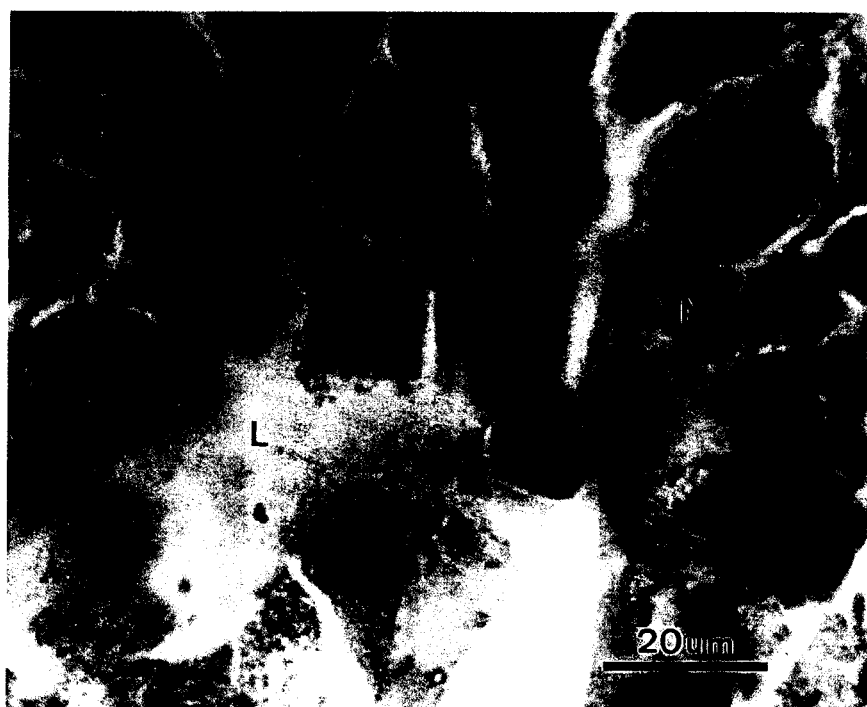


圖8-2 草蝦肝胰腺石蠟切片，以H & E 染色，受草蝦桿狀病毒感染細胞核有腫大現象，並有嗜伊紅性包容體 (OB) 形成。L：管腔、N：細胞核。

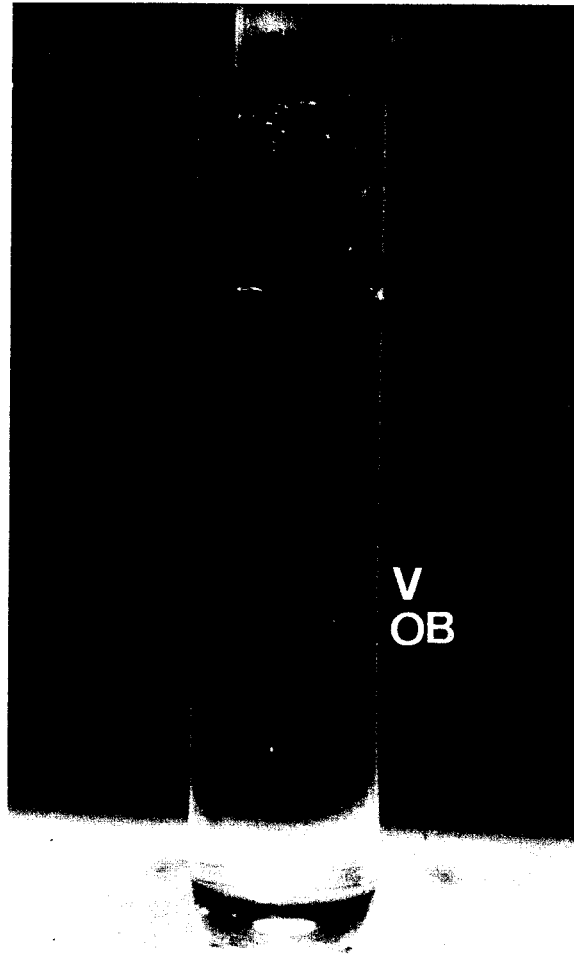


圖8-3 氯化鈉 (20%-40%) 等密度離心，純化MBV 病毒，(V) 為游離病毒粒子帶，(OB) 為病毒包容體帶。

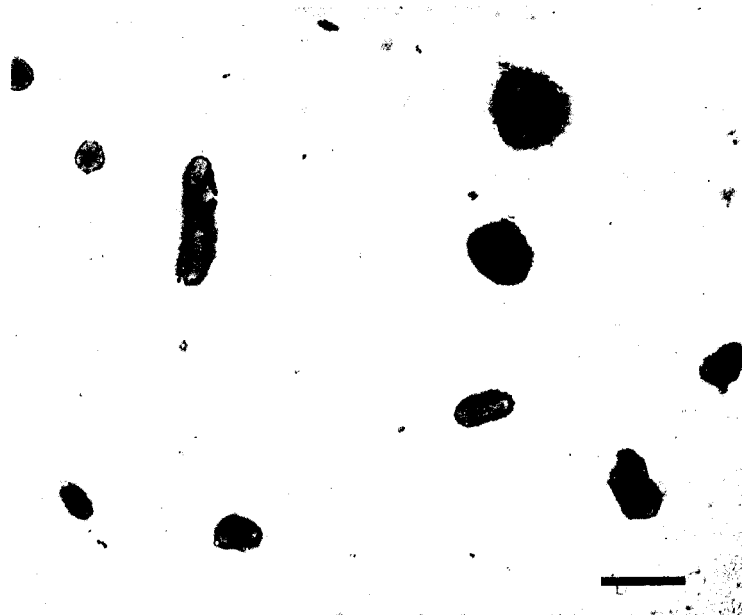


圖8-4 MBV純化後之游離病毒，以負染色技術染色在穿透式電子顯微鏡下觀察。
bar=400nm。

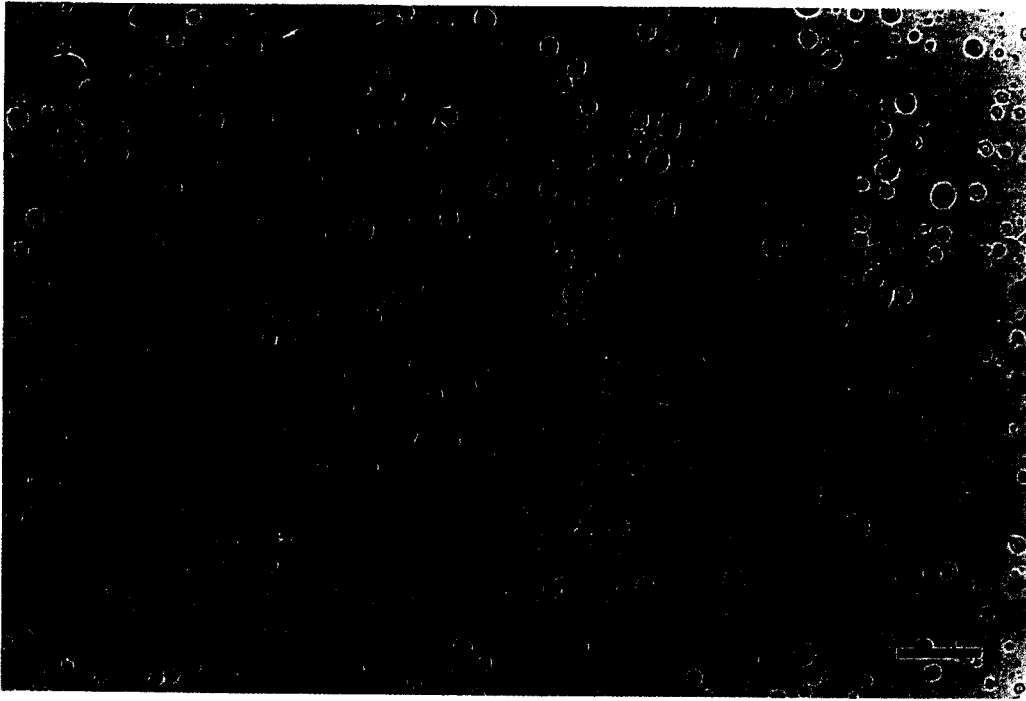


圖8-5 純化後MBV包容體以光學顯微鏡觀察。bar=50 μ m。

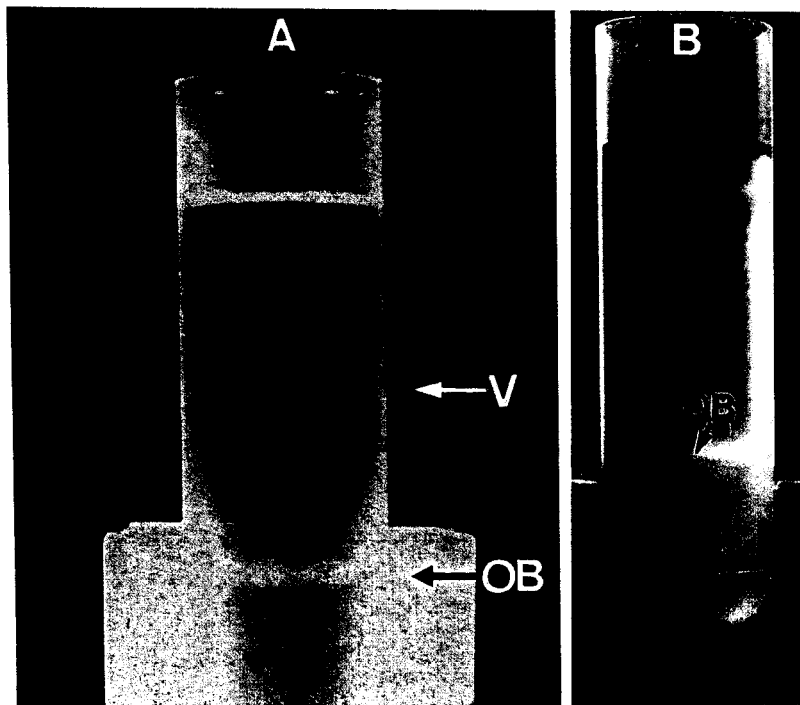


圖8-6 35-70%連續蔗糖梯度離心純化草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV)，V) 為游離病毒帶，整OB) 為MBV包容體帶。注意B管游離病毒白色帶消失，是因實驗方法上的失誤。

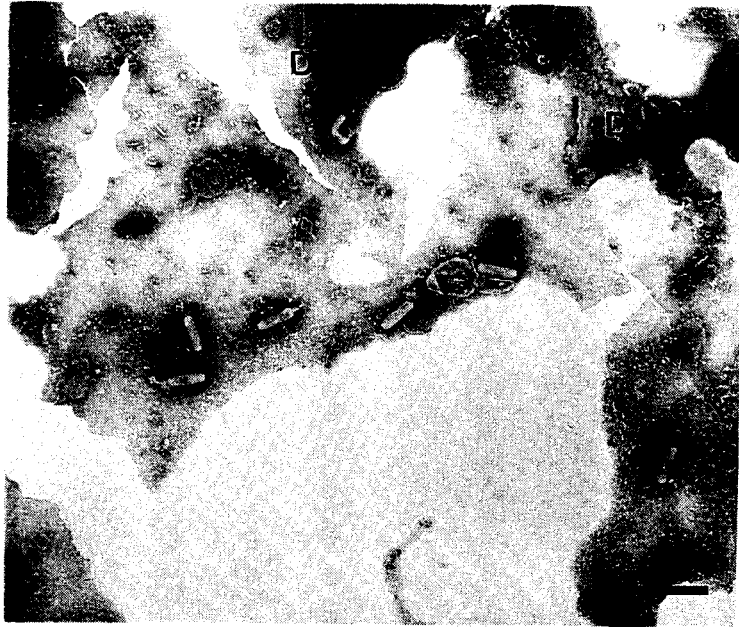


圖8-7 梯度蔗糖純化MBV，組織碎片（D）與游離病毒不易分開。bar=500nm。

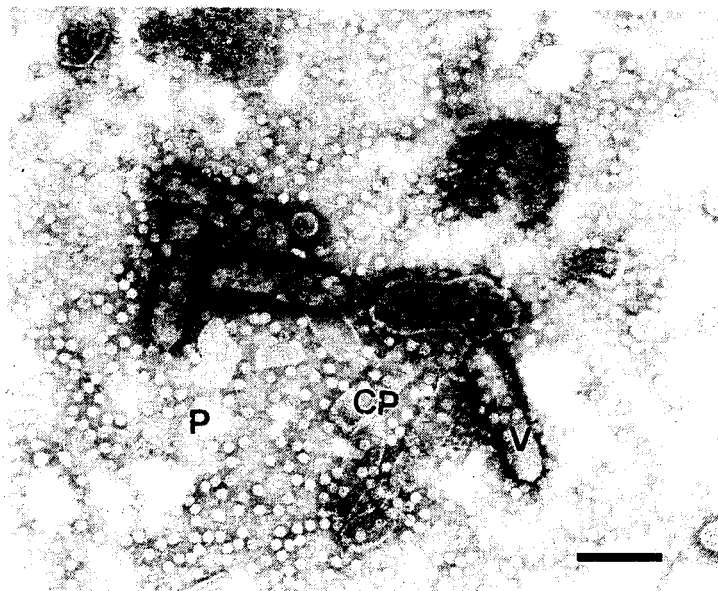


圖8-8 病毒包容體以負染色技術在電子顯微鏡下觀察，見大量多角體蛋白晶體（P），失去DNA之蛋白質鞘（CP），和 Occluded virus（V）。bar=167nm。

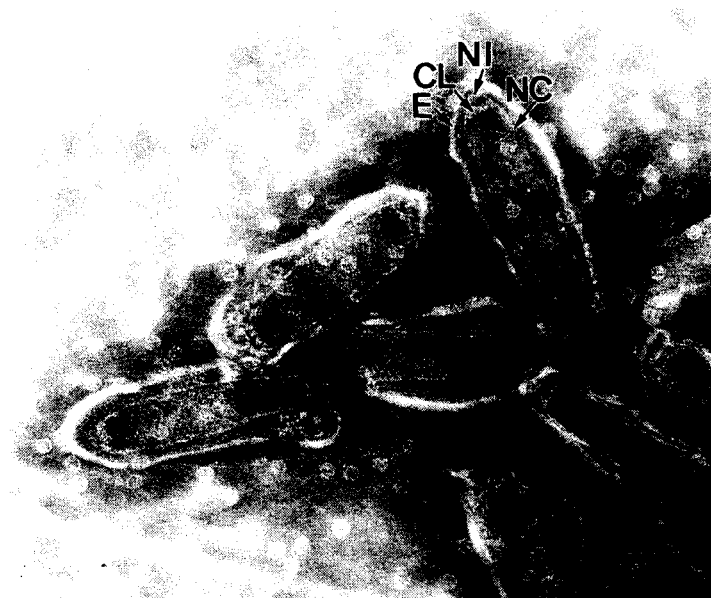


圖8-9 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 以高倍率電子顯微鏡放大，病毒結構--外胞外套膜 (E)，內有核酸鞘 (NC)，鞘兩端有凸起之爪狀物 (CL)，其頂端有一乳頭狀凸起 (NI)。bar=100nm。

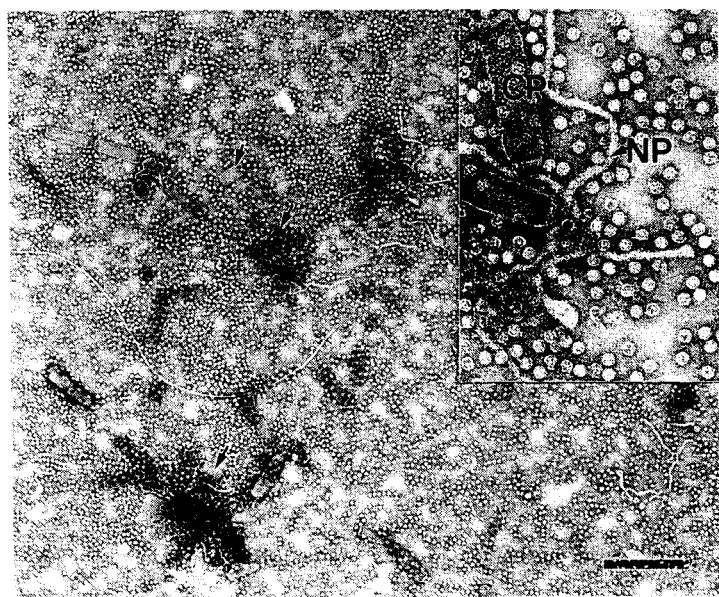


圖8-10 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 核酸鞘內遺傳物質 (NP) 已流出，成為空的蛋白質鞘 (CP)，箭頭指示短小蛋白質鞘疑似缺陷性干擾粒子 (DIPs)。bar=500nm。

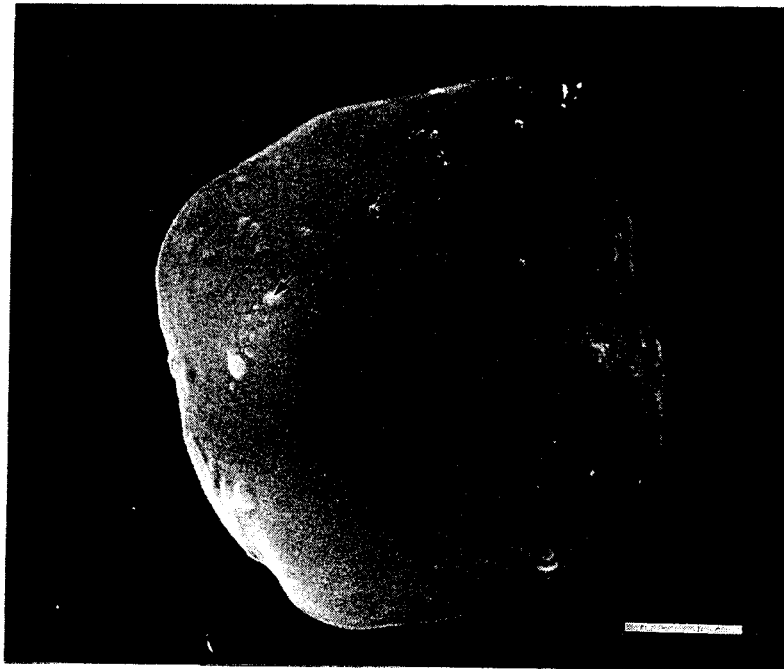


圖8-11 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 包容體以掃描式電子顯微鏡觀察放大圖，箭頭指示疑為Occluded virus凸起。bar=2 μ m。

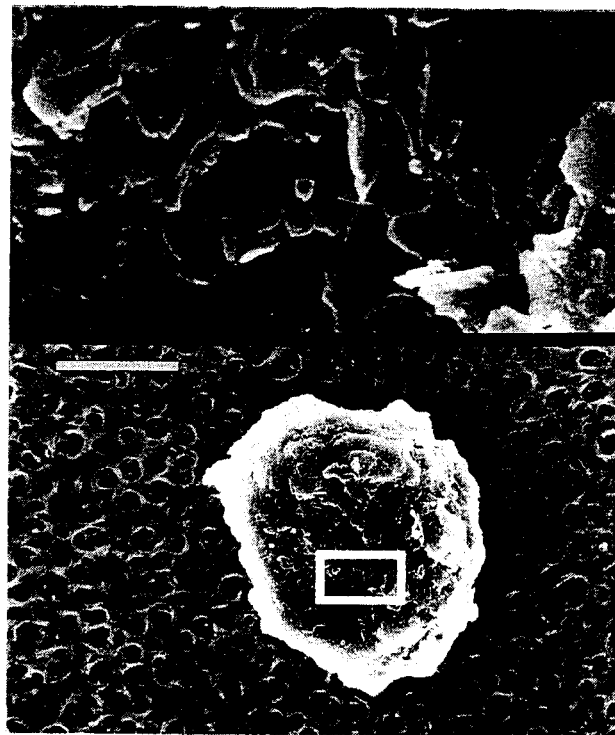


圖8-12 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 包容體以掃描式電子顯微鏡觀察放大圖，表面嚴重剝落現象，圖下為部份放大。bar=10 μ m。

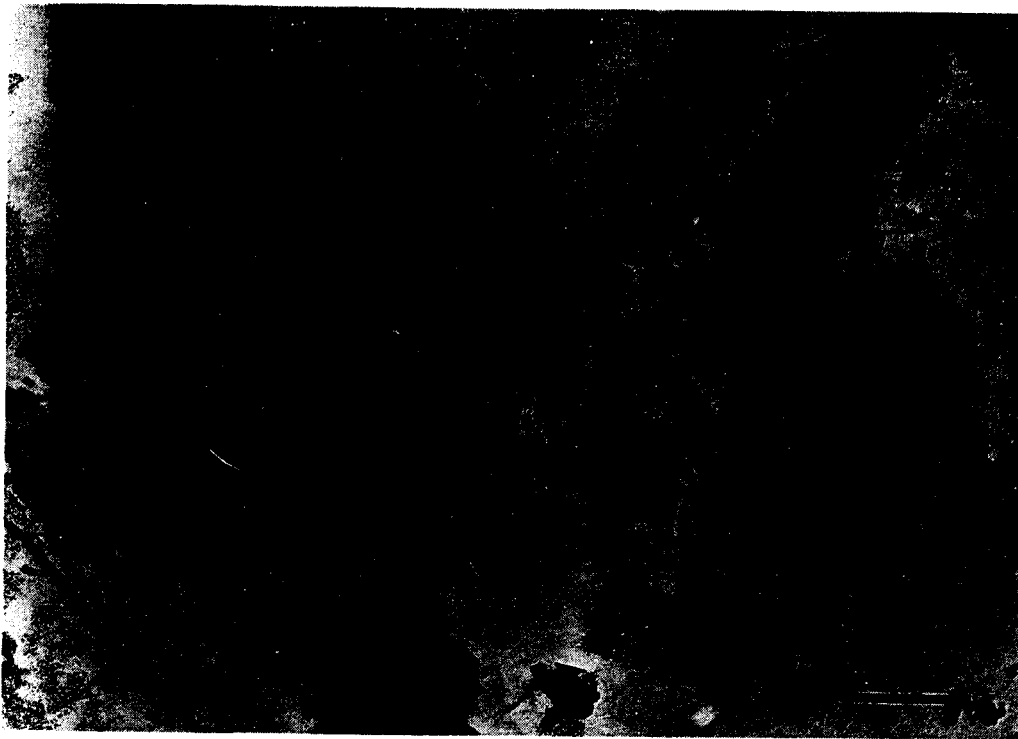


圖8-13 不良方法純化 MBV 包容體，其內部病毒 (occluded virus) 大部分病毒 (EV) 已被破壞而失去DNA，只有少部份 (FV) 仍保持完整。bar=1.6 μm。

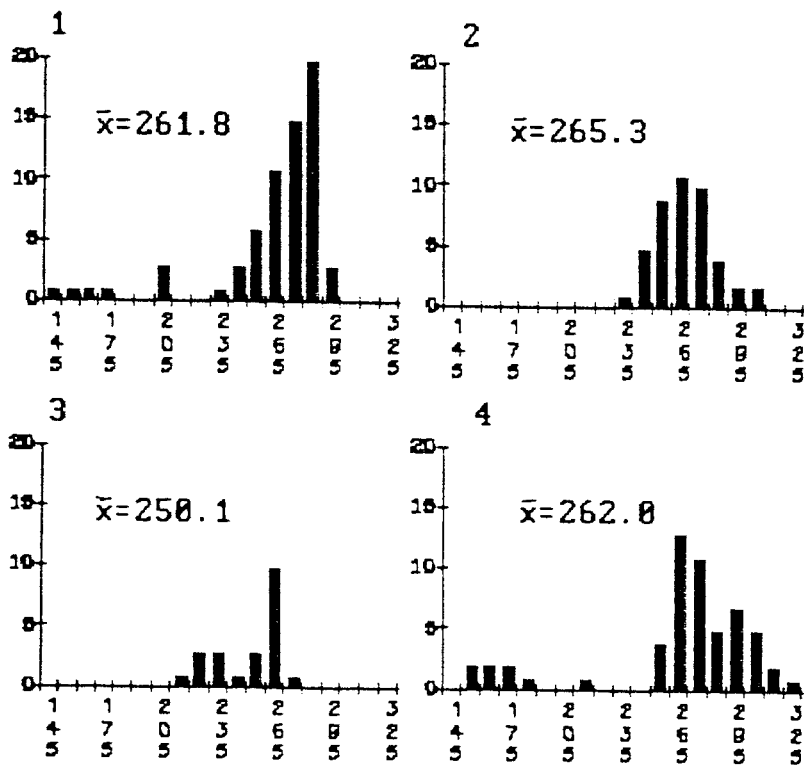


圖8-14 四組不同來源之MBV蛋白質鞘長度分布圖，X軸表示長度 (μm)，Y軸表示數量， \bar{x} 為平均值。

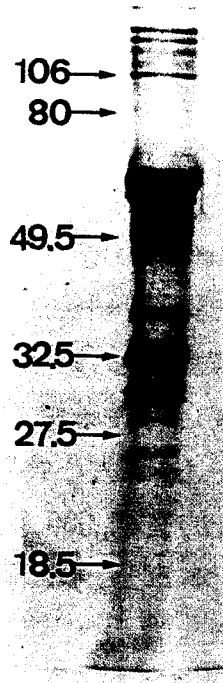


圖8-15 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 包容體以SDS-PAGE分析結構蛋白質，polyhedrin分子量為62Kd。

第九章 草蝦桿狀病毒分子生物學研究

草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) 的分子生物學方面之研究，由於病毒純化不易，所以自1981年Lightner發現此病毒至今，在世界各地對MBV之進一步研究工作極少，因此有關於分子生物學方面的報告很少。同樣感染於對蝦類的對蝦桿狀病毒 (*Baculovirus penaei*; BP)，Summers (1977) 發表之特性研究⁽¹⁴²⁾，其中談到了BP DNA的萃取與電子顯微鏡觀察，推測BP DNA大小為 75×10^6 ，接近114,000 base-pairs。Bruce et al. (1991) 則報告約有48,000 base-pairs⁽³⁷⁾。有關MBV DNA，在本實驗室將做深入研究，本章對DNA萃取工作進行初步探討。DNA之萃取方法已見於工具書⁽¹⁰⁸⁾，本章之MBV DNA萃取將以Phenol/Chloroform萃取法進行。

昆蟲桿狀病毒常被用於植物病蟲害之生物防治，早期即開始研究其特性，分子生物學方面的探討在近幾年更是發展迅速，利用多角體蛋白基因 (Polyhedrin gene) 的特性進行基因工程研究者眾，昆蟲桿狀病毒之多角體蛋白基因序列已有報告^(75,130)，發現AcMNPV、OpMNPV和OpSNPV的Polyhedrin gene有75%相似。由於本文討論到MBV的特性，有許多與昆蟲桿狀病毒相異之處，可由DNA結構方面進行探討。

聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 首見於Mullis et al. (1987) 及Saiki et al. (1984)，利用此方法，可在很短的時間內，準確地將某一段特定的DNA序列進行量的放大^(116,131)，其原理是藉由溫度及時間的控制，從雙股DNA打開 (denaturation)、引子 (primer) 的結合 (annealing)、及引子的延伸作用 (extension)，反覆地進行複製反應，其中使用的DNA聚合酶 (Polymerase) 是對高熱穩定的 *Thermus aquaticus* DNA Polymerase。由於此反應產物數量以等比級數增加，再則引子的使用對於DNA模板是有專一性，所以PCR自開始發展以來，已廣被應用於各項研究，諸如基因研究，病毒診斷及刑事科學上等。

本實驗PCR之DNA放大反應乃截取昆蟲polyhedrin gene其中二小段相似性很高的基因片段當引子，對MBV DNA進行PCR反應，並探討PCR直接對蝦苗進行MBV感染檢驗，對草蝦苗前期進行MBV感染檢測之可行性探討。本實驗結果發表於J.of Invertebrate Pathology (Chang et al.,1993)。

1. DNA之萃取與純化:

1-1 Proteinase K的處理

將純化得之病毒粒子，以1×TE buffer稀釋到適量，加入1/10體積的1 M KCl 10% SLS (sodium lauryl-sarcosine) 及 proteinase K (5mg/ml)，使之作用 1 – 3 小時。

1-2 酚萃取 (Phenol extraction)

上述經 proteinase K處理過後的溶液加入等體積的酚 (phenol)，輕輕搖晃一下使之混合均勻，1500 rpm離心5分鐘，取上面水層，加入一倍酚及一倍的chloroform: isoamylalcohol=24:1，1500 rpm離心5分鐘，取上面水層加入2×體積之chloroform: isoamyl Alc.=24:1，2000 rpm離心5分鐘後取水層。

1-3 酒精沉澱

上述取得之水層，加入 2 × 體積的100%酒精 (ethanol) 及1/10體積的 3 M醋酸鈉 (NaOAc)，置於-20°C 1小時或隔夜。自冰箱取出後，以1000 xg 離心 1 小時，把DNA沉澱下來，倒去上清液加入70%酒精洗去鹽類，將離心管倒置，等酒精完全揮發後加入50 μl 0.1×TE buffer，並將之放入微量離心管，65°C水浴15–20分鐘讓DNase失去活性，然後將此DNA保存在-20°C冰箱。

1-4 洋菜膠電泳分析法

將純化所得之DNA用事前製備好之0.75%含Ethidium Bromide (EtBr) 之洋菜膠片電泳分析其DNA。電壓50 Volts. 15分鐘後，於UV燈上觀察結果。電泳同時以λ phage /Hind III當做分子量大小之標準。

MBV DNA的萃取是由純化的病毒及包容體得到，所以萃取的量與純度與病毒純化過程有密切的關係，事先以電子顯微鏡觀察，若是屬於完整的病毒顆粒 (圖8-4)，則經萃取步驟處理即可得到MBV DNA。

MBV DNA以洋菜凝膠電泳檢測，DNA所在的位置在高分子位置，大於23Kb (圖9-1)，但無法準確得知其DNA 的大小。

2. MBV DNA之聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction)

2-1 引子 (primers) 的選取: (No.35和36 primer是提供自動物系羅竹芳教授實驗室)

參閱Rohrmann (1986)，截取自多種昆蟲桿狀病毒多角體蛋白基因 (polyhedrin gene) 內的相似性很高的基因片段 (conserved sequence) (鹼基對46-75和691-722) ⁽¹³⁰⁾，製作成之一對複合引子 (primer)，其鹼基

序列如下：primer 35：⁵AC (CT) TA (CT) GTG TAC GAC AAC AAA TA (CT) TAC AAA³ primer 36：⁵GG (TC) GCG TC (TG) GG (TC) GCA AA (CT) TC (CT) TT (TA) AC (TC) TTGA AA³

2-2 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR)

MBV DNA 1 μ l (約10-50 ng) 當作模板 (template)，加1.25 mM dNTP 18 μ l， primer 35及36各0.5 μ l，Taq DNA polymerase 0.5 μ l，10X Taq buffer 10 μ l，最後加無菌水至100 μ l，上層並加50 μ l的礦物油防止作用時水分的蒸發。反應的溫度及時間如下：denature temperature 94 °C 1 min，annealing temperature 42°C 2 min，extention temperature 72 °C 3 min，共進行35個循環，然後72°C反應30分鐘，最後停於4°C，反應後以agarose凝膠電泳測其結果。

經過35個週期的放大，取10 μ l加 1 μ l染劑，在洋菜凝膠電泳分析後，可在600 base pairs的位置出現單一band (圖9-2)，此即為PCR放大反應後之產物，而在低分子量尚有不清楚的亮帶是作用剩下來的引子。

2-3 蝦苗肝胰腺直接以PCR放大反應進行檢測MBV感染方法

以抹片法在光學顯微鏡下檢查是否有病毒感染，記錄之，將肝胰腺分別放入ependorf，加入buffer A (50mM KCl, 10mM Tris HCl pH8.3, 0.1mg/ml gelatin, 0.45% Nonidet (NP40), 0.45% Tween 20) 50 μ l及1 μ l proteinase K，水浴 60°C 1小時，消化掉蛋白質之後置入100°C沸水中煮10分鐘，除去proteinase K，拿出在室溫下加入primer 35及36各0.5 μ l，dNTP (1.25 mM) 18 μ l，buffer B 5 μ l (Buffer B, 10X detergent buffer A, 25mM MgCl₂) 及Taq DNA polymerase 0.5 μ l和無菌水25.5 μ l，最上面加50 μ l的礦物油，之後即開始進行PCR反應，條件如上述。結果亦以agarose gel檢測。

蝦苗肝胰腺直接進行PCR反應：

事先檢驗MBV感染，再將整個肝胰腺處理，進行PCR反應，結果如圖9-3，有感染的蝦苗顯然有PCR產物，而對照的草蝦 (*Penaeus monodon*)、斑節蝦 (*P. japonicus*)、東方對蝦 (*P. orientalis*) 體DNA在PCR反應後無600bp的PCR產物，無感染MBV蝦苗肝胰腺在PCR放大後亦無反應。

DNA純化與PCR結果探討：

草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon* type Baculovirus; MBV) 的DNA萃取，在本實驗是利用proteinase K直接將結構蛋白質消化，必須被消化的蛋白質包括polyhedrin、virial envelope、virial capsid和附著在DNA上的蛋白質等。昆蟲之桿狀病毒的報告裡，欲純化病毒顆粒，皆以鹼性溶液處理^(20,55)，將核多角體蛋白溶去，以取得病毒，然後再消化病毒顆粒內結構蛋白質，取得病毒DNA。然而MBV以這種方法處理則無法達到目的。

聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 可用來作為檢驗之工具，其專一性很高，自此技術發展以來^(117,131)，已有多方面的研究利用這種技術進行研究^(42,89,106,109)，專一性極高，與南方點墨法 (Southern blot) 結合，可檢測到的DNA量為0.01 pg。以PCR應用於MBV檢驗研究，本實驗為首次的研究，有MBV感染的蝦苗初步可得到單一DNA band，與正對照組得到的在同一位置，而沒有感染者及取自肌肉的 DNA則無法製作出同樣產物，因此本實驗PCR產物應是MBV DNA的一專一性表徵。

由於本文所使用的引子 (primer) 是參考自AcMNPV、Bm SNPV和OpMNPV的polyhedrin基因⁽¹³⁰⁾，其已知可應用於多種桿狀病毒的PCR反應，是對桿狀病毒有專一性，MBV是桿狀病毒科之一種，也證明可用此Primer進行PCR放大反應，且反應產物為一純的DNA片段，因此我們認為MBV的基因與其他桿狀病毒polyhedrin gene有conserved sequence，然而其相似性有多高？必須進行基因讀序方可確定。

以PCR檢驗MBV的感染與否，必須要找到MBV獨特的基因片段，然後做成primer，如此檢驗時才是針對MBV的專一性，否則如本實驗使用的primer是對一些桿狀病毒的專一性，檢驗MBV時會受他種桿狀病毒的干擾，由於草蝦感染的桿狀病毒，截至目前為止，只發現MBV一種，所以本實驗結果未受到干擾，可以採信。由於MBV在分子生物學領域的研究，目前尚屬起步階段，很多相關問題仍待繼續研究。

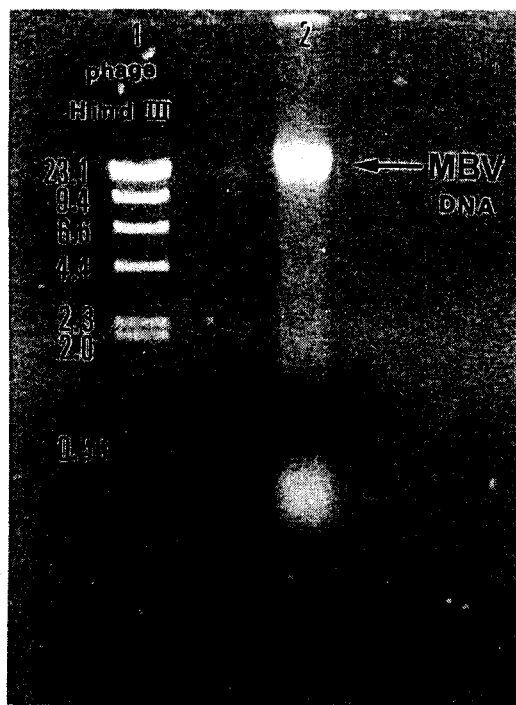


圖9-1 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) DNA凝膠電泳分析。Lane 1, Lambda DNA/Hind III marker; Lane 2, MBV DNA。

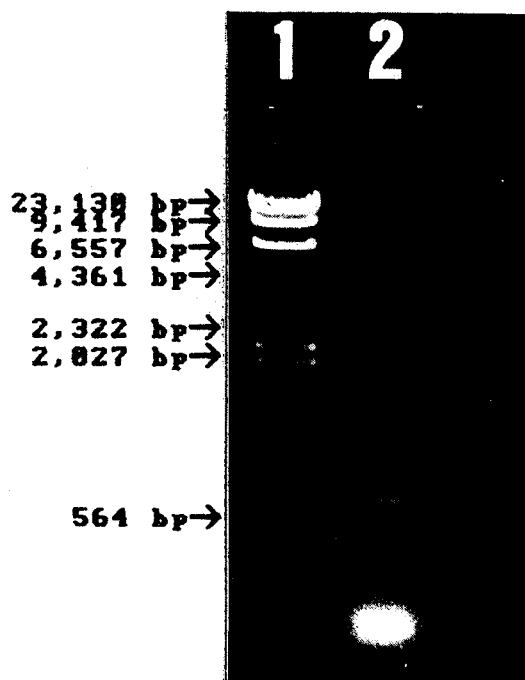


圖9-2 草蝦桿狀病毒 (*Penaeus monodon*-type Baculovirus; MBV) DNA聚合酶連鎖反應 (PCR) 凝膠電泳分析。Lane 1, Lambda DNA/Hind III marker; Lane 2, MBV DNA之PCR產物。

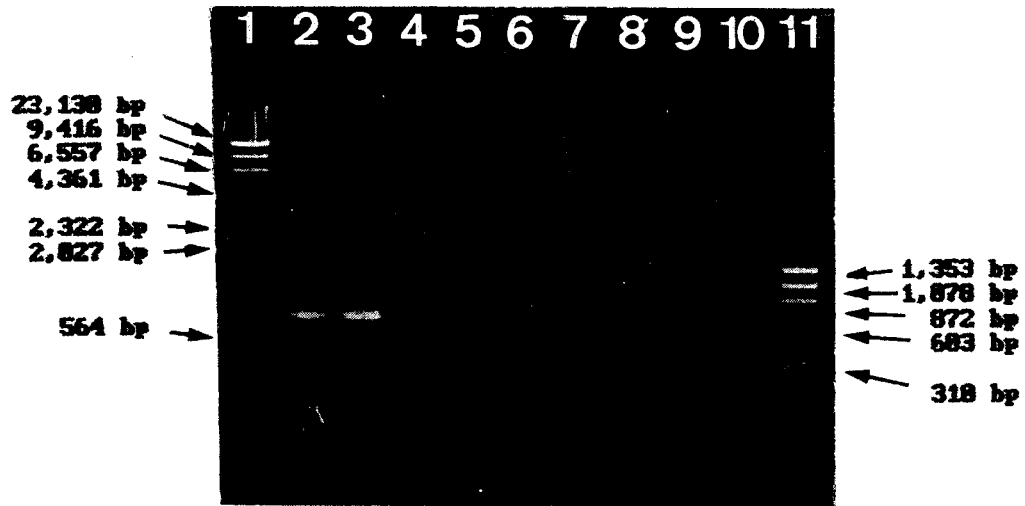


圖9-3 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測蝦體內的MBV DNA。Lane 1, Lambda DNA/Hind III；Lane 2&3, 有MBV感染的草蝦苗；Lane 4-7, 無MBV感染之草蝦苗；Lane 8, 草蝦DNA；Lane 9, 斑節蝦DNA；Lane 10, 東方對蝦DNA；Lane 11, ϕ x174 DNA/HaeIII marker。

第十章 草蝦桿狀病毒之防治研究

MBV自1981年被發現感染於草蝦後幼生期⁽⁹⁶⁾，1987發現台灣草蝦檢體有MBV感染⁽¹⁰³⁾，之後的調查發現黑殼場的蝦苗及養殖池中的中、小型至大型草蝦皆有不同程度之感染，甚至連臺灣沿海及進口之種蝦亦不能免於感染⁽³⁾，由於草蝦病變事件，使得MBV廣受重視，雖然MBV感染池蝦受到各方面之重視，然而真正解決方案至本實驗開始進行之時，仍未見有正式之相關報告。

關於同樣感染於對蝦類的桿狀病毒，如對蝦桿狀病毒 (*Baculovirus penaei*; BP) 和中腸腺壞死桿狀病毒 (Baculoviral midgut necrosis virus; BMN) 分別引起白蝦類和斑節蝦的幼苗期大量死亡^(5,33)，然而亦未見有效解決方法，也無去除病毒之相關研究報告。

MBV在本省蝦苗繁殖場普遍感染於紅筋苗 (PL8-12)，其感染率有達九成以上^(3,45)，且發現感染率與蝦苗之死亡有相當程度之關聯性，因此有關於MBV 在育苗場的去處工作極為重要，本文將針對此目的而提出有效的解決方法。

有關於桿狀病毒感染途徑研究，草蝦桿狀病毒的感染途徑研究在過去尚未見到相關的報告。Lighthner (1983) 推測是自母蝦的傳染⁽⁹⁹⁾。昆蟲NPV活體感染試驗證明是寄主因誤食病毒包容體而感染^(31,139)。Sano et al. (1981) 以BMN感染斑節蝦試驗，亦認為BMN是經口感染的⁽¹³³⁾。本實驗是在“草蝦桿狀病毒是經由口侵入感染蝦苗”之假設感染途徑下進行病毒去除試驗，因此如果我們在蝦苗未進食之前，亦即於無節幼蟲期 (Nauplius)，或是受精卵時期，利用適當的藥浴與清洗步驟，而使MBV 病毒去除感染活性和洗去病毒包容體，則預期可達到生產無病毒蝦苗之目的。

1. 母蝦之檢驗:

挑選頭胸甲寬大、體色正常無泛紅及無紅鯉病變之母蝦進行蝦苗繁殖。母蝦感染MBV 檢測自糞便，方法見檢驗法。

2. 卵及無節幼苗之收集:

母蝦通常在夜晚產卵，在產完卵之後約12-18小時，受精卵會孵化無節幼苗 (nauplius)，無節幼苗必須經過6次之脫殼變態才會變成幼蟲期，在30°C下這段時間約有40小時，無節幼苗的收集必須這段時間之內完成，本實

驗之進行是在無節幼苗 (Nauplius) 第二至三期，約孵化後 6 小時。卵的收集是在母蝦產完卵 6-8 小時內進行，這時卵期發育約在原腸期。收集卵及無節幼苗是以 200 網目之浮游生物網收之。收集時必須小心，避免受到機械性的傷害。

3. 卵及無節幼苗之清洗:

受精卵及無節幼苗在收集之後即進行清洗步驟，其中包括濾過之清潔海水、福馬林和碘仿等，簡明處理流程如前所述 (圖 6-4)。

4. 實驗分組:

清洗過之卵或蝦苗分成以下七組，簡述如表 10-1。

- (1) 經檢驗未感染 MBV 之母蝦，使其產卵於 Tank 中、孵化，並不將無節幼苗 (蝦) 搬離，在同一 Tank 育苗至後幼生期。
- (2) 經檢驗證實感染 MBV 之母蝦，直接產卵於 Tank 中、孵化成無節幼苗、未經清洗而直接育苗至後幼生期。
- (3) 經檢驗未感染 MBV 之母蝦，產卵後孵化成無節幼蟲，以浮游生物網撈起處理，步驟如圖 10-2 所示，然後移至另一消毒過之池子育苗。
- (4) 經檢驗證實有感染 MBV 之母蝦，產卵後孵化成無節幼蟲，同樣以浮游生物網收集清洗，步驟如圖 6-4，然後在另一消毒過之池子育苗至無節幼苗。
- (5) 在第三組育苗實驗期間，另外投入含 MBV 包容體之母蝦糞便，然後育苗至後幼生期。
- (6) 收集 MBV 感染之母蝦的卵，部份經過圖 6-4 所述方法處理，部份則不經處理，分別育苗至後幼生期。
- (7) 證實感染 MBV 母蝦，收集生產之無節幼苗，只以濾過海水清洗，育苗後檢驗 MBV 感染率。

5. 蝦苗之養殖：

蝦苗的養殖乃依一定的養殖系統養殖，其所使用之餌料及使用之量如圖 6-5。在無節幼苗 1-6 期由於仍帶有卵黃囊所以並不餵食，但當第六期變為眼幼蟲一期時，必須投餵矽藻。矽藻投餵量在眼幼蟲三期達到最高峰，其他如人工配合餌料、輪蟲及豐年蝦之投餵皆有其適當之投餵期。

6. 蝦苗感染 MBV 檢驗法:

在育苗過程不定期、逢機採樣，以組織切片檢驗 MBV 感染。組織病理切片檢驗法，參閱 MBV 檢驗法一章。記錄各組之 MBV 檢驗結果，討出 MBV 感染源和生產 MBV-FREE 蝦苗的方法。

表10-1 MBV感染草蝦苗途徑與MBV-FREE 蝦苗生產實驗方法簡表。

組別	開始育苗期	種母蝦 MBV 感染	實驗處理步驟與方法
1	Nauplius	-	在產卵池直接育苗
2	Nauplius	+	在產卵池直接育苗
3	Nauplius	-	以圖二所述方法處理
4	Nauplius	+	以圖二所述方法處理
5	Nauplius	-	以圖二所述方法處理，另投入含MBV 包容體之母蝦糞便
6	Fertile Eggs	+	一、以圖二所述方法處理
			二、未以圖二所述方法處理直接進行育苗
7	Nauplius	+	Nauplius 只以濾過海水清洗

7.MBV-FREE草蝦苗繁殖結果：

本實驗為得知草蝦幼苗感染MBV之感染源與探討繁殖無MBV病毒感染草蝦苗的可行性而進行如表一所示之七組實驗，第一組及第三組的無節幼苗乃是取自未感染MBV之母蝦，在室內培育過程中採樣檢驗未發現任何MBV感染之幼苗，但一移往室外黑殼池，則第三天採樣就檢驗到MBV 的感染（見表10-2第一與三組結果）。

第二組與第四組實驗之無節幼苗取自感染MBV之母蝦，而第二組不做任何處理，第四組則經過處理過程。第二組蝦苗在室內育苗池中養至糠蝦第二期（M2）以後，就開始發現有MBV之感染。但第四組則在室內育苗池亦未見有任何蝦苗感染MBV之現象；同樣地，這些蝦苗一移出室外的黑殼池就會有感染MBV之現象（見表10-2第二與四組結果）。

第五組取自未感染MBV母蝦的無節幼苗，在育苗過程初期另外添加感染MBV母蝦的糞便，則發現在這些蝦苗發育至糠蝦第三期（M3）就檢驗到

有MBV包容體（見表10-2第五組結果）。

第六組的實驗中，分別將取自MBV感染母蝦的受精卵，予以如圖二之方法處理及不處理，且此實驗始終於容量五噸水的玻璃纖維桶進行實驗，而未將蝦苗移往黑殼池，實驗結果顯示：經處理後的受精卵孵化後，至後幼生第三十期（PL30）蝦苗皆未有MBV感染之現象，而未處理組則在後幼生第二期（PL2）就檢驗出MBV 包容體（見表10-2第六組之結果）。

未進行如圖6-4之步驟處理，而只以乾淨海水清洗，並無法達到去除草蝦桿狀病毒感染的效果，在育苗過程採樣檢驗，後幼生期可檢出MBV的感染（見表10-2第七組之結果）。

由以上之結果顯示MBV病毒傳染途徑是經由口吃進感染，而母蝦感染MBV，並不藉由卵將病毒傳染下一代，而是帶病毒的糞便污染了育苗池水，無節幼蟲期以後開始吃食物，將水中包容體吃入而感染。所以育苗場MBV病毒來源顯然來自母蝦糞便，而蝦苗至室外池感染才遭感染，其MBV另有來源，應是環境中殘留。無感染MBV之蝦苗生產可使用清洗及消毒同時進行而達到目的，簡明結果見圖10-1所述。

圖10-1 Summarization of the Result Obtained from Table 10-2.

MBV Infection of Broodstock and Treatment	Initiation Stage	Move to Nursery Pond
	E ↓ N Z1 Z2 Z3 M1 M2 M3 P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11 P12 P15 P20 P30 P40	
MBV (-) (28-33°C)		MBV (-)
MBV (+) (28-33°C)		MBV (+)
MBV (-) + Clean sea water + (28-33°C) Formalin+Iodophore		MBV (-)
MBV (+) + Clean sea water + (28-33°C) Formalin+Iodophore		MBV (+)
MBV (-) + Excrement from (28-33°C) MBV (+) -Shrimp		MBV (-)
MBV (+) + Clean sea water (28-33°C) +Formalin +Iodophore		MBV (+)
MBV (+) (28-33°C)		MBV (+)
MBV (+) + Clean sea water		MBV (+)

E: Egg stage N: Nauplius stage Z: Postzoa stage M: Mysis stage P: Postlarva stage

The infection of larvae were obtained from histopathological observation of hepatopancrease. Infection of MBV in broodstock was obtained by examination of excrement of shrimp.

表10-2 The Presence of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) Infection in Larval Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon*, under Indicated Conditions in Hatchery or Nursery.

Exp. No.	Titration stage	Water Temp. Variation (°C)	Source of Sample and Treatment	MBV Infection Rate* (Positive / No. Examined)																										
				Z1	Z2	Z3	W1	W2	W3	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P15	P20	P30						
1a	N	28-30	MBV	0/15	0/9	0/12	1/17	-	0/17	0/15	-	0/10	-	0/7	0/12	-	-	-	-	0/13	0/14	2/11	-							
1b	N	28-33	Non-Infected Broodstock	-	0/10	0/7	-	0/11	0/12	-	0/15	0/14	-	0/10	-	-	-	-	0/15	-	-	-	-							
2a	N	28-30	MBV infected	0/7	0/10	-	0/11	0/10	1/10	3/8	8/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
2b	N	28-33	Broodstock	-	0/8	0/12	-	0/11	0/12	0/10	3/12	8/10	8/11	-	12/15	-	-	-	-	-	-	-	-							
3a	N	28-30	MBV	-	-	-	-	-	0/15	0/17	-	-	0/12	-	-	-	-	-	0/11	-	3/10	4/12	-							
3b	N	28-30	Non-Infected Broodstock	-	-	-	-	-	-	0/12	-	-	0/10	-	-	-	-	-	0/13	-	3/14	5/10	-							
3c	N	28-33	+ Treatment	-	-	-	-	-	-	0/12	-	-	0/10	-	-	-	-	-	-	0/14	0/8	1/10	-							
3c	N	28-33		-	-	-	-	-	-	0/14	-	-	0/15	-	-	-	-	-	0/9	1/11	3/11	-	-							
3e	N	28-33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/17	-	0/23	-	-	0/32	-							
4a	N	28-30		-	-	-	-	-	-	-	-	0/9	-	-	-	0/10	-	-	-	0/12	1/10	3/17	-							
4b	N	28-30		-	-	-	-	-	-	-	-	0/17	-	-	-	1/13	-	-	-	2/12	3/15	5/13	-							
4c	N	28-30	MBV infection	-	-	-	-	-	-	-	-	0/11	-	-	-	0/14	-	-	-	0/9	0/12	2/9	-							
4d	N	28-33	Broodstock + Treatment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8	-	-	-	-	-	0/12	1/8	2/10	-							
4e	N	28-33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/11	-	-	-	-	-	3/15	2/10	7/12	-							
4f	N	28-33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/16	-	-	-	-	-	2/13	3/7	15/21	-							
4g	N	28-33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10	-	-	-	-	-	0/17	1/10	3/13	-							

8. MBV-FREE草蝦苗繁殖之可行性探討：

由實驗結果證明未感染MBV之母蝦，在室內繁殖場可生產出未感染MBV之草蝦苗，又即使是有病毒感染之母蝦只要經過適當的處理步驟，亦可去除MBV之感染。但這些無病毒蝦苗在進入大環境中如黑殼池及大蝦池中養殖時，仍很難避免發生MBV的感染，由結果指出只要蝦苗放養於黑殼池蓄養，則在三天後的採樣，即陸續可檢出有MBV的感染的蝦苗，Overstreet et al. (1988) 以對蝦桿狀病毒 (BP) 人工感染巴拿馬對蝦 postlarvae期，在感染一至二天就可檢出病毒包容體⁽¹²⁰⁾，由此更能證明實驗蝦苗在搬移至室外池後才自環境感染MBV。由第六組結果，全過程皆在室內養殖，則皆無檢出MBV病毒感染，因此證明Postlarvae後期感染的MBV源是來自室外的環境。根據昆蟲桿狀病毒包容體在環境中忍受力的研究指出，包容體可存在於土壤中一段很長的時間（數月至數年）^(111,147)，故推測MBV包容體是來自上一批蝦苗，而殘留於底泥中，沒被清洗或破壞，因而感染剛放養之蝦苗，筆者亦在收成以後的室外蝦苗池底發現有MBV包容體（見農委會魚病研究專輯）。

在MBV感染蝦苗方面，本實驗在繁殖過程中不定期採樣，檢驗方法以組織病理切片方式進行，在眼幼蟲期和糠蝦前期都沒有檢出MBV 包容體，而自糠蝦後期才陸續出現感染跡象，即細胞核腫大和嗜伊紅包容體出現於肝胰腺細胞核內，此與1987年於台灣蝦苗場調查結果相似⁽⁴⁵⁾，Overstreet et al. (1988) 以 *Baculovirus penaei* 感染白蝦 *Penaeus vannamei*，亦在感染後5-6天（即糠蝦三期以後）才發現病毒感染的病癥⁽¹²⁰⁾。但這並不表示MBV在早期不會感染草蝦苗，本文第三章以酵素連接免疫吸附法（ELISA）應用於蝦苗早期的MBV檢驗時，則在眼幼蟲二期就檢測有MBV的感染，也在垂死的蝦苗肝胰腺腔與細胞核內發現病毒包容體。所以本實驗中早期蝦苗死亡是因MBV感染所引起，所以組織病理切片不易自早期蝦苗體內檢出MBV；BMN之人工感染斑節蝦苗實驗，亦有同樣的結論⁽¹¹⁴⁾。

無病毒蝦苗的生產試驗，主要是以清洗的方式將來自蝦糞便的病毒包容體洗去，由於游離的桿狀病毒沒有多角體蛋白的保護，很容易因環境因子的變化而遭受破壞，失去感染能力^(32,41)，所以在徹底清洗後再以福馬林和碘仿消毒，可以除去附著於卵上和無節幼苗體上的病毒。

實驗中使用的福馬林及有機碘，是常用於蝦苗繁殖場的消毒劑，有很強的殺細菌及病毒的效果，使用的濃度及時間乃事先檢測其安全濃度而定出。BMV暴露於25ppm的有機碘（Povidon-iodine）10分鐘，即失去感染活性⁽

^{112,113})，而福馬林濃度則須0.5%。在未使用消毒劑而以清水沖洗受精卵，檢測發現仍會有蝦苗被MBV感染(第七組結果)，雖然其比例很低。所以單以清水沖洗可能造成病毒無法完全去除，欲做完備徹底的處理，仍須以福馬林及有機碘處理。更由於母蝦常可能帶有病原菌或有害的原生動物，高濃度之有機碘及福馬林可將之除去，確保育苗過程順利進行。由於實驗進行結果順利，因此實驗中並未對單獨使用之有機碘或福馬林進行去除病毒實驗。

福馬林早期被用於昆蟲桿狀病毒的消毒劑^(79,152)，0.04%低濃度福馬林摻於餌料中可以抑制病毒的傳染⁽⁷⁹⁾，且可減低病毒之感染活性⁽¹⁵²⁾。福馬林之對草蝦的安全濃度為17ppm，碘為0.4ppm⁽¹⁴⁾，而本實驗乃採短時間，高劑量的藥浴法，對於後來的育苗過程並不造成影響。實驗第七組證實若清洗蝦苗時，只使用乾淨海水而未使用消毒劑，則仍會感染MBV，所以證實本實驗使用之水浴消毒有效果的。

由MBV感染途徑實驗結果證明育苗池蝦苗之MBV由母蝦糞便傳染，非來自卵細胞(垂直感染)，筆者曾採嚴重感染MBV之母蝦的成熟卵巢進行超薄切片，以穿透式電子顯微鏡觀察，並未發現MBV(未發表資料)，Afzelius et al.(1989)在同尾節肢動物的Pyrrhocoris apterus精細胞內發現有rhabdovirus⁽¹⁷⁾，而草蝦精莢或精細胞內是否有病毒感染尚未見有任何報告。MBV感染的途徑吾等認為是藉由包容體被蝦苗以吞食的方式感染，眼幼蟲時期開始吃餌，將水中MBV包容體誤食而感染。Lightner(1983)推測MBV是經口感染⁽⁹⁹⁾；Momoyama & Sano(1989)與Overstreet et al.(1988)的BMN和BP感染報告也都以經口餵食感染^(114,120)。

MBV感染途徑實驗中，一至六組皆有28-30°C及28-33°C的育苗溫度，經實驗發現其對於MBV的感染與否並沒有明顯不同。草蝦苗繁殖一般溫度約在30-32°C，高溫會促進蝦苗的變態，是否對蝦苗品質導致不良影響，有待深入研究。本實驗一開始水溫在28°C，放苗後即加溫至30°C或33°C，三度的差異，在由無節幼苗到後幼生期的變態時間已差二天，即33°C的蝦苗已變為後幼生期，二天之後30°C的蝦苗才變後幼生期，雖有時間上的差異，但發現對於MBV的感染並無差異。

由生產無病毒蝦苗方法的探討，總結出有二種可行的方法，一是篩選無病毒母蝦，其篩選方法必須藉由母蝦糞便檢驗法，惟此方法之操作較繁雜，且並不實際，又這種診斷須有經驗之工作者才能勝任，故可能不會為繁殖業者接受。再則若要經由篩選母蝦來達到生產無病毒蝦苗之效果，則已感染之母蝦應不能使用，此舉當然既浪費亦不可能為繁殖業者所接受。所以，第二

種生產無病毒蝦苗的方法—以海水、福馬林及碘仿沖洗無節幼苗—是較適當的，且經此處理步驟後，蝦苗體外之其他病原，如細菌及鐘形蟲亦會隨之而去除，對往後之培育工作可能更為有利。所以，我們認為此種方法最適用於一般繁殖場，但操作中之清洗步驟須踏實，而把人為之疏忽減至最低，方能保證蝦苗確未受MBV感染。

以上述兩種方法進行時應留意，盡可能去除母蝦糞便，因母蝦糞便中可能含有MBV病毒或其包容體，若因糞便量多而厚，則恐會有所誤失。因此在收集無節幼體或受精卵時應盡可能的不攪動底部，以免使沉於底部的蝦糞便漂浮，而與所收集的蝦卵或無節幼苗混雜。根據實驗操作過程，無節幼苗之收集較受精卵容易，因無節幼苗是的浮游性，且有趨光性，非常容易以弱光聚集然後收集之，但受精卵則有時會出現於較底層，收集時會發生些許困難。並且無節幼體對所應用的兩種消毒溶液，福馬林及碘仿有較強的抵抗力，操作時危險性較低，因此我們認為在繁殖場欲生產無MBV 感染之蝦苗，應以處理無節幼苗較為方便可行。

參 考 文 獻

1. 邱品文 1988 草蝦血球正常型態及其在炎症組織中之變化。國立台灣大學獸醫研究所碩士論文。
2. 莊榮輝 1985 水稻蔗糖合成酶之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。
3. 張朴性 1988 台灣養殖蝦類之桿狀病毒感染研究。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
4. 張錦宜 1991 草蝦、大正蝦養殖池及蝦肝胰臟內細菌之數值分析研究。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
5. 黃本 1979。草蝦池之生態研究。私立中國文化學院。海洋研究所。碩士論文。
6. 黃本與陳弘成 1979。硫化氫對蝦類之急性毒性。私立中國文化學院海洋研究所。海洋彙刊。21:85-90。
7. 黃世鈴 1989 養殖草蝦細菌感染疾病之研究。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
8. 陳弘成 1981。繁殖場草蝦苗大量死亡之研究。中國水產。348:15-24。
9. 陳弘成、黃木 1979。蘭陽地區養殖草蝦疾病之調查。中國水產。317:3-8。
10. 陳弘成、謝明慧 1979。重金屬對於蝦類急速毒性之研究。中國水產。316:3-10。
11. 陳惠彬 1978 台灣養殖草蝦大量死亡之病因調查及其藥物控制試驗。中國水產。309：p.3-11。
12. 鄭文騰 1989 台灣養殖蝦類病原菌 *Vibrio damsela* 之分離與鑑定。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
13. 劉正義、簡茂盛 1988 1988年台灣養殖草蝦疾病之疫情、病性與對策之研討。養蝦全集。pp.82-86。
14. 養殖環境衛生及管理 1990 行政院農業委員會、台灣漁業局、台灣省水試所編印。水產檢驗服務中心講義。pp.25-35。
15. Ackermann, H.W., Smirnoff, W.A., 1983. A morphological investigation of 23 baculaviruses. J. Invertebr. Pathol. 41, 269-280.
16. Adams, J.R., Goodwin, R.H., and Wilcox, T.A. 1977. Electron

- microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. Biol. Cell. 28, 261-268.
17. Afzelius, B. A., Alberti, G., Dallai, R., Godula, J., and Witalinski, W. 1989. Virus-and rickettsia-infected sperm cells in Arthropods. J. of Invertebr. Pathol. 53, 365-377.
 18. Aizawa, k. 1967. Mode of multiplication of the nuclear polyhedrosis virus of silkworm. J. Sericult. Sci. Japan 36, 327-331.
 19. Al-Mohanna, S.Y. and Nott, J.A. 1986. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 66, 403-414.
 20. Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., and Lane, D. J. W. 1985. Mitotic E - and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. of Mar. Biol. Ass. U. K. 65, 901-910.
 21. Al-Mohanna, S. Y., and Nott, J. A. 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea : Decapoda). Marine Biology 95, 129-137.
 22. Al-Mohanna, S. Y., and Nott, J. A. 1989. Functional cytology of the hepatopancrease of *Penaeus semisulcatus* (crustacea: Decapoda) during the moult cycle. Marine Biology 101, 535-544.
 23. Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A. and Lane, D.J.W. 1985b. M-midget cells in the hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus semisulcatus* de Haan, 1844 (Decapoda, Natantia). Crustaceana 48, 260-268.
 24. Anderson, R. S., and Good, R. A. 1976. Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. J. of Invertbr. Pathol. 27, 57-64.
 25. Asayama, T. 1977. Studies on the pathology and morphogenesis of the baculoviruses of Lepidopterous insects. 九州大學學位論文 (農博乙第747號)
 26. Beaton, C. D., and Filshie, B. K. 1976. Comparative ultrastructural studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses. J. Gen. Virol. 31, 151-161.
 27. Bell, C.D. and Orlob, G.B. 1977. Serological studies on virions and

- polyhedron protein of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Virology 78, 162-172.
28. Belloncik, C., Lavalley, C., Hamelin, C. 1986. Relative pathogenicity of nuclear polyhedrosis virus from *Mamestra brassicae*, *Euxoa messoria*, *Agrotis segetum*, *Autographa californica*, and *Heliothis* spp. for larvae of *Euxoa scandens* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 47, 8-11.
 29. Benz, G., Wager, R., 1971. Autoradiographic studies on nucleic acid metabolism in granulosis-infected fat body of larvae of *Carpocapsasp*. J. Invertebr. Pathol. 18, 70-80.
 30. Bergoin, M., and Guelpa, B. 1977. Dissolution des inclusions du virus de la poly`dros nucl`eaire du diptere *Tipula paludosa* Meig. Etude ultrastructurale du virion. Arch. Virol. 53, 243-254.
 31. Bergold, G. N. 1963. The nature of nuclear polyhedrosis viruses. In "Insect Pathology" (ed. by Steinhaus, E. A.), Academic press, New York. pp. 413-456.
 32. Broome, J. R., Sikorowski, P. P., and Neel, W. W. 1974. Effect of sunlight on the activity of nuclear polyhedrosis virus from *Malacosoma disstria*. J. Econ. Entomol. 67, 135-136.
 33. Brock, J.A. 1983. Diseases (infectious and non-infectious), metazoan parasites, predators and public health considerations in *Macrobrachium* culture and Fisheries, pp 329-370. In: J. Mcvey. Mariculture: Crustacean Culture. CRC press, Boca Raton, FL.
 34. Brock, J.A. In press. Baculovirus penaei (BP) variety marginatus found in feral *Penaeus marginatus* from Oahu, Hawaii. J. Invertebr. Pathol.
 35. Brown, M., Crawford, A.M., and Faulkner, P. 1979. Genetic analysis of a baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus I. Isolation of temperature-sensitive mutants and assortment into complementation groups. J. Virol. 31, 190-198.
 36. Brown, M., Faulkner, P., Cochran, M.A., and Chung, K.L. 1980. Characterization of two morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with large

- cuboidal inclusion bodies. J. Gen. Virol. 50, 309-316.
37. Bruce, L. D., Trnmpfer, B. B., and Lightner, D. V. 1991. Methods for viral isolation and DNA extraction for a penaeid shrimp baculovirus. J. of Virological Methods. (In press).
 38. Bud, H. H., and Kelly, D. C. 1977. The DNA contained by nuclear polyhedrosis viruses isolated from four *Spodoptera spp* . (Lepidoptera, Noctuidae): genome size and configuration assessed by electron microscopy. J. Gen. Virol. 37, 135-143.
 39. Bud, H. M., and Kelly, D. C. 1980. An electron microscope study of partially lysed baculovirus nucleocapsids: The intranucleocapsid packaging of viral DNA. J. Ultrast. Res. 73, 361-368.
 40. Burley, K., Miller, A., Harrap, K. A., and Kelly, D. C. 1982. Structure of the baculovirus nucleocapsid. Virology 120, 433-440.
 41. Cantwell, G. E. 1967. Inactivation of biological insecticides by irradiation. J. Invertebr. Pathol. 9. 138-140.
 42. Cartin, E. N., Lange, W., and Openshaw, H. 1991. Application of polymerase chain reaction assay to studies of herpes simplex virus latency. Intervirology 32, 93-100.
 43. Carstens, E.B., Tjia, S.T., and Doerfler, W. 1979. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. Virology 99, 386-398.
 44. Carstens, E.B., Tjia, S.T., and Doerfler, W. (1980). Infectious DNA from *Autographa californicu* nuclear polyhedrosis virus. Virology 101, 311-314.
 45. Chen, S. N., Chang, P. S., and Kou, G. H. 1989a. Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in cultured shrimp in Taiwan, Fish Pathology 24, 189-195.
 46. Chen, S. N., Chang, P. S., and Kou, G. H. 1989b. Studies on virogenesis and pathology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and the red tail prawn (*Penaeus penicillatus*). Fish Pathology 24, 89-10
 47. Chen, S. N., and Kou, G. H. 1989. Infection of cultured cells from

- the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by Monodon-type baculovirus (MBV). J. of Fish Disease 12, 73-76.
48. Chen, S. N., Lo, C. F., Liu, S. M., and Kou, G. H. 1989. The first identification of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in cultures sand shrimp, *Metapenaeus ensis*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 9, 62-64.
 49. Cheng. T. J., Liu, C. I. 1986. Pathological study on major disease of cultured grass shrimps (*Penaeus monodon* Fabricius). COA Fisheries Series No. 8. Fish Disease Research (VIII), 75-86.
 50. Couch, J. A., and Martin, S. M. 1984. A simple system for the preliminary evaluation of infectivity and pathogenesis of insect virus in a nontarget estuarine shrimp. J. of Invertebr. Pathol. 43, 351-357.
 51. Couch, J. A. 1974. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: Ultrastructure, prevalence, and enhancement. J. Invertebr. Pathol. 24. 311-331.
 52. Couch, J.A. 1977. Characterization of shrimp baculovirus. Environmental Protection Agency, U.S. Ecological Research Series. EPA-600/3-77-130. Nov. 1977.
 53. Couch, J. A. 1978. Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic Coasts of North America. Fishery Bull. 76(1) : 1-44.
 54. Couch, J. A. 1981. Viral disease of invertebrates other than insects. pp. 127-160. In: E. W. Davidson (ed.) Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Allanheld, Osmun Publ., Totowa, N. J.
 55. Crook, N. E. and Payne, C. C. 1980. Comparison of three methods of ELISA for baculovirus. J. gen. Virol., 46, 29-37.
 56. Doubrovsky, A., Paynter, J.L., Sambhi, S. K., Atherton, J. G., and Lester, R. J. G. 1988. Observations on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 39, 743-749.
 57. Egusa, S., Takahashi, Y., Itami, T., and Momoyama, K. 1988. Histopathology of vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus*

- japonicus* Bate. Fish Pathol. 23, 59-65.
58. Eppstein, D. A., and Thoma, J. A. 1975. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 478-484.
 59. Federici, B.A. 1980. Mosquito baculovirus: Sequence of morphogenesis and ultrastructure of the virion. Virology 109, 1-9.
 60. Fegan, D. F., Flegel, T. W., Sriuiratan, S. and Waiyakruttha M. 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand. Aquaculture 96, 205-217.
 61. Fenner, F. 1976. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 7,1-116.
 62. Fontaine, C. T. and Lightner D.V. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of white shrimp. *Penaeus setiferus*. J. Invertebr. Pathol. 24. 141-148.
 63. Fraser, M. J., and Hink, W. F. 1982. The isolation and characterization of the MP and FP plaque variant of *Galleria mellonella* polyhedrosis virus. Virology 117, 366-378.
 64. Fukuda, H., Momoyama, K., and Sano, T. 1987. First detection of Monodon Baculovirus in Japan, Nippon Saisan Gakkaiishi 54, 45-48.
 65. Gibson, R. and Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. Oceanogr Mar. Biol. A.Rev. 17, 285-346.
 66. Granados, R.R. 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. Virology 90, 170-174.
 67. Granados, R.R., and Lawler, K.A. 1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. Virology 108, 297-308.
 68. Harrap, K. A. 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body. Virology 50, 114-123.
 69. Harrap, K.A. and Longworth, J. F. 1974. An evaluation of purification methods for baculoviruses. J.Invertebr. Pathol. 24, 55-62.

70. Hess, R.T., and Falcon, L.A. 1977. Observations on the interaction of baculoviruses with the plasma membrane. *J. Gen. Virol.* 36, 525-530.
71. Hess, R.T., and Falcon, L.A. 1981. Electron microscope observation of *Autographa californica* (Nactuidae) nuclear polyhedrosis virus replication in the midgut of the saltmarsh caterpillar, *Estigmene acrea* (Acetiidae). *J. Invertebr. Pathol.* 37, 86-90.
72. Hirumi, H., Hirumi, K., and McIntosh, A. H. 1975. Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in a continuous cabbage looper cell line. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 302-326.
73. Hitoshi, W. 1972. An electron microscope radioautography of DNA synthesis in the fat cell of silkworm, *Bombyx mori*, infected with a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 20, 223-225.
74. Hood, M. A., and Meyers, S. P. 1973. Microbial aspects of penaeid shrimp-digestion. *Proc. Ann. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 26, 81-92.
75. Hooft van Iddekinge, B. J. L., Smith, G. E., and Summers, M. D. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedron gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131, 561-565.
76. Howland, K. H., and Cheng, T. C. 1982. Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginia*) hemocytes. *J. of Invertebr. Pathol.* 39, 123-132.
77. Hukuhara, T., Akami, K. 1987. Demonstration of polyhedral inclusion bodies of a nuclear polyhedrosis virus in field soil by immunofluorence microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* 49, 130-132.
78. Humason, G., 1972. "Animal Tissue Techniques" ed. by Freeman W. H. and Company. pp. 1-63.
79. Ignoffo, C. M., and Garcia, C. 1968. Formalin inactivation of nuclearpolyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 10, 430-432.
80. Kawamoto, F., and Awayama, T. 1975. Studies on the arrangement patterns of nucleaocapsid with envelopes of nuclear polyhedrosis virus in fat body cells of the Brown tail moth *Euproctis similis*. *J. Invertebr. Pathol.* 26, 47-55.
81. Kawarabata, T., Funakoshi, M., and Aratake, Y. 1980. Purification

- and properties of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus liberated from polyhedra by dissolution with silkworm gut juice. J. Invertebr. Pathol. 35, 34-42.
82. Kelly, D. C., Brown, D. A., Ayres, M. D., Allen, C. J., and Walter, I. O. 1983. Properties of the major nucleocapsid protein of *Heliothis zea* singly enveloped nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 104, 399-408.
83. Kelly, D. C., and Lescott, T. 1983. Baculovirus replication: Glycosylation of polypeptides synthesised in *Tricoplusid ni* nuclear polyhedrosis virus infected cells and the effect of Tunicamycin. J. Gen. Virol. in press.
84. Knudson, D. L., and Harrap, K. A. 1976. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda* : Microscopy study of the sequence of events of the virus infection. J. Virol. 17, 254-268.
85. Knudson, D.L., and Tinsley, T.W. 1974. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of a *Spodoptera frugiperda* : Partial characterization of the viral DNA, comparative DNA-DNA hybridization, and patterns of DNA synthesis.
86. Knudson, D.L., and Tinsley, T.W. 1978. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line of *Spodoptera frugiperda*: Partial characterization of the viral DNA, comparative DNA-DNA hybridization, and patterns of DNA synthesis. Virology 87, 42-57.
87. Kompier, R., Tramper, J., and Vlat, J. M. 1988. A continuous process for the production of baculovirus using insect-cell. Biotechnol. Lett. 10, 849-854.
88. Kool, M., Voncken, J. W., Vanlier, F. L. J., Tramper, J. and Vlak, J. M. 1991. Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. Virology 183, 739-746.
89. Korber, B., Okayama, A., Donnelly, R., Tachibana, N., and Essex,

- M. 1991. Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. *J. of Virol.*, 65(10), 5471-5476.
90. Kothary, M. H. and Kreger, A. S. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* 59, 25-31.
91. Kreger, A. S. 1984. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* 44, 326-331.
92. Liao, I.C., Guo, J.J. 1985. Studies on the tolerance of postlarvae of *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. penicillatus*, *Metapenaeus ensis* and *Macrobrachium rosenbergii* to tetracycline and chloramphenicol. COA Fisheries Series No.4 Fish Disease Research, 22-26.
93. Liao, I.C., Guo, J.J. 1986. Studies on the tolerance of postlarvae of *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. penicillatus*, *Metapenaeus ensis* and *Macrobrachium rosenbergii* to neomycin, streptomycin, oxytetracycline and chlortetracycline. COA Fisheries Series No.8, Fish Disease Research (VIII), 34-39.
94. Liao, I. C., Kou, G. H., Chen, S. N., and Lai, J. Y. 1985. Preliminary investigation on the disease of cultured prawn in the Pingtung area. COA Fisheries Series No. 4, Fish Disease Research (VII), 86-94.
95. Liao, I. C., Yang, F. R., Lou, S. W. 1976. Preliminary report on some diseases of cultured prawn and their control methods. *Fish Disease Research (I)*. JCRR Fisheries Series 29, 28-33.
96. Lightner, D. V., and Redman, R. M. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, *J. Invertebr. Pathol.* 38, 299-302.
97. Lightner, D.V., and Redman, R.M. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 45: (In press).
98. Lightner, D.V., Redman, R.M., and Bell, T.A. 1983a. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 42, 62-70.

99. Lightner, D. V., Redman, R. M., and Bell, T. A. 1983. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 32, 209-233.
100. Lightner, D.V. 1978. Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Invertebr. Pathol.*, 32, 139-150.
101. Lightner, D.V. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. pp. 289-320. In: J.P. McVey (editor) *Mariculture*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
102. Lightner, D. V. 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. pp. 79-103. In : *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Pen*
103. Lightner, D. V., Hedrick, R. P., Fryer, J. L., Chen, S. N., Liao, I. C. and Kou, G. H. 1987. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathology* 22, 123-140.
104. Liu, K. C. 1989. Histopathological study of the bacterial induced hepatopancreatitis of cultured shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *COA Fisheries Series No. 15, Fish Disease Research (IX)*, 34-41.
105. Longworth, J. F., and Carey, G. P. 1980. The use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to detect baculovirus in larvae and adults of *Oryctes rhinoceros* from longa. *J. Gen. Virol.* 47, 431-438.
106. Mack, D. H., and Sninsky, J. J. 1988. A sensitive method for the identification of uncharacterized viruses related to known virus groups: hepadnavirus model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6977-6981.
107. Mackinnon, E.A., Henderson, G.F., Stoltz, D.B., and Faulkner, P. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. *J. Ultrastr. Res.* 49,

- 419-435.
108. Maniatis, T. Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. "Molecular Cloning, A laboratory manual" Published by Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 458-459.
 109. Matsumoto, C., Mitsunage, S., Oguchi, T., Mitomi, Y., Shimada, T., Ichikawa, A., Watanabe, J., and Nishioka, K. 1990. Detection of human T-cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method: comparison with HTLV-1 antibody test. J. of Virol., 64(11), 5290-5294.
 110. Miller, L. K., Lingg, A. J. and Bulla, L. A., Jr. 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. Science 219, 715-721.
 111. Mohamed, M. A., Coppel, H. C., and Podgwaite, J. C. 1982. Persistence in soil and on foliage of nucleopolyhedrosis virus of European pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (Hymenopteral Diprionidae). Environ. Entomol. 11, 1116-1118.
 112. Momoyama, K. 1989a. Virucidal effect of some disinfectants of baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. Fish Pathology. 24, 47-49.
 113. Momoyama, K. 1989b. Survival of Baculoviral mid-gut gland necrosis virus (BMNV) in infected tissue and in sea water. Fish Pathology 24, 179-181.
 114. Momoyama, K., and Sano, T. 1989. Developmental stages of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, highly susceptible to baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. J. Fish Disease 12, 585-589.
 115. Mosarrat, P., Revet, B., and Gourevitch, I. 1975. Mise en evidence stabilization et purification d'une structure nucleoproteique intracapsidaire chez le baculovirus d'Oryctes rhinoceros L. C. R. Acad. Sci. 281, 1439-1442.
 116. Mullis, K., Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase - catalyzed chain reaction. In "Method in Enzymology" 155. 335-350.

117. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *J. Invertebr. Pathol.* 38, 299-302.
118. Nash, G. 1988. Pathological changes in the tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, associated with culture in brackishwater ponds developed from potentially acid sulphate soils. *J. of Fish Diseases* 11, 113-123.
119. Overstreet, R.M. 1973. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. *Aquaculture* 2, 105-140.
120. Overstreet, R. M., Stuck, K. C., Krol, R. A., and Hawkins, W. E. 1988. Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a Bioassay. *J. of the World Aquaculture Society.* 19, 175-187.
121. Paterson, W. D. and Stewar, J. E. 1974. In vitro phagocytosis by hemocytes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish Res. Board Can.* 31, 1051-1056.
122. Pauley, G. B. 1975. Introductory Remarks on Diseases of Crustaceans. *Marine Fisheries Review.* 37,(5-6), 2-3.
123. Payne, C. C., Compson, D., and De Looze, S. M. 1977. Properties of the nucleocapsids of a virus isolated from *Oryctes rhinoceros*. *Virology* 77, 269-280.
124. Payne, C. C., and Kalmakoff, J. 1978. Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay, purification and properties. *J. Virol.* 26, 84-92.
125. Raghoebar, R., and Grace, T.D.C. 1974. Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* cells 2in vitro I. Multiplication kinetics and ultrastructural studies. *J. Ultrastr. Res.* 47, 384-399.
126. Roberts, R.J. 1978. *Fishpathology.* pp.62. Bailliere Tindall. London.
127. Robert, R. G., and Kathleen, A. L. 1981. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108, 297-308.
128. Robertson, J.S., Harrap, K.A., and Longworth, J.F. 1974.

- Baculovirus morphogenesis: The acquisition of the virus envelope. *J. Invertebr. Pathol.* 23, 248-251.
129. Rohrmann, G. F. 1977. Characterisation of N-polyhedrin of two baculovirus strains pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Biochemistry* 16, 1631-1634.
 130. Rohrmann, G. F. 1986. Polyhedrin structure *J. Gen. Virol.* 67, 1499-1513.
 131. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H, A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239
 132. Sano, T. 1983. A fluorescent antibody method for BMN. *Proceedings of the Helgoland Symposium on Marine Invertebrate Pathology.* Sept. In press.
 133. Sano, T., Nishimura, T., Oguma, K., Momoyama, K., and Takeno, N. 1981. Baculovirus infection of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathology* 15, 185-191.
 134. Shapiro, M., and Ignoffo, C.M. 1970. Hemagglutination by a nucleopolyhedrosis virus of the cotton bollworm, *Heliothis zea* . *Virology* 41, 577-579.
 135. Skuratovskaya, I. N., Fodor, I., and strokovskaya, L. J. 1982. Properties of nuclear polyhedrosis virus of the Great War moth: oligomeric circular DNA and the characteristics of the genome. *Virology* 120, 465-471.
 136. Smith, K.M. 1977. "Virus-Insect Relationships." pp. 291. Longman Green, New York.
 137. Smith, K.M., and Brown, R.M., Jr. (1965). A study of the long virus rods associated with insect granuloses. *Virology* 27, 512-519.
 138. Stagner, J.I., Redmond, J.R., 1975. The immunological mechanisms of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* . MFR paper 1141. *Marine Fisheries Review.* Vol.37. pp. 11-19.
 139. Stairs, G. R.1963. The nature of nuclear polyhedrosis virus in *Golloria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 17, 350-353.

140. Stairs, G., and Ellis, B. J. 1971. Electron microscopy and microfilter studies on infectious nucleopolyhedrosis virus in *Galleria mellonella* larvae. J. Invertebr. Pathol. 17, 350-353.
141. Stoltz, D.B., Pavan, C., and DaCunha, A.B. 1973. Nuclear polyhedrosis virus: A possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis. J. Gen. Virol. 19, 145-150.
142. Summers, M. D. 1977. Characterization on shrimp baculovirus, U.S. EPA-600/3-77-130, Nov.
143. Summers, M.D. 1971. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. J. Ultrastr. Res. 35, 606-625.
144. Summers, M.D., and Arnott, H.J. 1969. Ultrastructural studies on inclusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis virus-infected cells of *Trichoplusia ni* (Hubner). J. Ultrastr. Res. 28, 462-480.
145. Summers, M.D. and Smith, G.E. 1978. Baculovirus structural polypeptides. Virology 84, 390-402.
146. Tanada, Y., and Hess, R.T. 1976. Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. J. Invertebr. Pathol. 28, 67-76.
147. Teakle, R. E. 1969. A nuclear polyhedrosis virus of *Anthela varia* (Lepidoptera: Anthelidae). J. Invertebr. Pathol. 14, 18-27.
148. Thompson, C. G., and Scott, D. W. 1979. Production and persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the *Douglasfir tussock* moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera : Lymantriidae), in the forest ecosystem. J. Invertebr. Pathol.
149. Tjia, S.T., Carstens, E.B., and Doerfler, W. 1979. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus II. The viral DNA and the kinetics of replication. Virology 99, 399-409.
150. Tsing, A. and Bonami, J.R. 1984. A new virus disease in the

- shrimp *Penaeus japonicus*. Premier Colloque International de Pathologie en Aquaculture Marine, Laboratoire de Pathologie Comparee, Montpellier Cedex, France, 11-14 Sept., 1984.
151. Tweeten, K. A., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. 1980. Restriction enzyme analysis of the genomes of *Plodia interpunctella* and *Pieris brassicae* granulosis viruses. *Virology*. 104, 514-519.
 152. Vail, P. V., Henneberry, T. J., Kishaba, A. N., and Arakawa, K. V. 1968. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclearpolyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.* 10, 84-93.
 153. Volkman, L.E., Summers, M.D., and Hsieh, C.-H. 1976. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: Comparative neutralization, comparative infectivity, and in vitro growth studies. *J. Virol.* 19, 820-832.
 154. William D., and David, J. W. M. 1983. *The Biology of Crustacea.* (copyright by Academic Press. Inc.). Vol. 5, PP. 215-261.
 155. Wood, H.A. 1980. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced proteins in tissue culture. *Virology* 102, 21-27.