

2009 年水生動物疾病調查報告

涂 堅*、蔡佳錚、黃淑敏、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 本研究收集1031件魚類病例進行細菌及病毒分離、鑑定與分子診斷。本篇著重於病毒結果。主要魚類病毒性疾病檢出率為49% (504/1031)。病毒性疾病病因包括淡水魚類：鰻魚兩段核糖病毒、鰻魚疱疹病毒及錦鯉疱疹病毒；海水魚類：虹彩病毒及野田病毒。

關鍵詞：海水魚、淡水魚、病毒

緒言

水產養殖環境比陸生動物飼養環境複雜，加上水體環境具蔓延性及高隱藏性等特點，不但使水產病原可於水體中短暫生存時間傳播，亦不易察覺已發病或潛在性帶原的水生動物，因此往往察覺時已是疾病末期，多數的族群已遭感染，感染地區亦已蔓延至大面積的水體環境。因此發展水產動物疾病的早期監控及爆發控制方法已成為疫情能否快速撲滅及防止蔓延的重要因素。

本計畫目的為透過主動採樣及疫情調查、以病理學、細菌、病毒分離配合分子生物學方式確診、最後進行流行病學分析，如此於檢疫方面可早期確定及撲滅入侵海外病原，進而降低養殖上的損失；於防疫方面可將流行病學結果供主管機關作為制定防疫政策參考；進而成為進行國際貿易檢疫條件談判時之有力監測證據，提高農民的輸出獲利。

材料與方法

一、疫情調查

透過官方防疫機關、私人開業獸醫師、養殖業者及自行至我國重要養殖區進行訪視及採樣1,031件魚類樣本。採樣方法為挑選3-5尾病魚以MS-222麻醉後，進行無菌方式病理解剖，採取重要器官（腦、心、肝、鰓、脾、腎），進行下列細菌分離。供病毒分離者，若現場無法立即進行，則冷凍在-20°C，擇期後送至本所實驗室。

二、細菌性疾病鑑定

無菌解剖檢體，由肝、腎、脾直接釣菌至血液培養基或含2% NaCl BHI培養基，挑選菌落直接以商用鑑定套組及特異性引子分別進行生化試驗及PCR分子鑑定。若仍無法鑑定，則進行 DNA萃取，以universal 16S rRNA基因引子對進行 PCR 增幅，進行核酸定序，結果與 GenBank中資料比對，依相似度百分比做鑑別。

三、病毒性疾病鑑定

採取病魚肝、腎及鰓，剪碎至1 mm 大小組織塊，加入10倍體積之MEM培養液，磨成乳劑並以3,000 rpm離心15分，取上清液經0.45 μm過濾膜過濾，取濾過液接種於具感受性細胞，包括Epithelioma of carp (EPC), Chinook salmon embryo-214 (SHSE-214), Fathead minnow (FHM), Rainbow trout gonad-2 (RTG-2), Bluegill fin-2 (BF-2), Snakehead embryo (SSN-1), Grouper kidney (GK), Tilapia ovary-2 (TO-2)等，細胞來自實驗室分讓或自行購入，依水產動物及病毒種類分別在 20°C 與 25°C培養7天，若無細胞病變，則再盲目繼代一次，觀察7天。上述病材在分離同時亦採用OIE建議及國際期刊發表之引子（詳如表一），進行聚合酶鏈反應（PCR）快速鑑定及定序確診。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

結果

由1031件魚類樣品中檢出504件病毒感染，近乎五成的病例為病毒感染（49%，504/1031）。504件病毒感染病例其中分離出29件虹彩病毒，13件野田病毒，其餘462件均為PCR檢測結果。進一步探討檢出病毒的發生比率發現，鰻魚兩段核醣核酸病毒佔全部檢出病毒的46%（234/504）；鰻魚疱疹病毒佔19%（96/504）；虹彩病毒佔17%（86/504）；野田病毒7%（35/504），錦鯉疱疹病毒為11%（53/504）。由於監測的樣品，是在不同時間由相同場採樣，或由不同場之採樣（因上次採樣場已經棄養，不再參加監測）；所以檢出率的總採樣次數是以每次採樣即當成一個新樣品來計算（並不把同一場的所有陽性樣品當成一個樣品來計算），會有同一場重複採樣出現，因此會高估實際陽性檢出率。

討論

本研究收集1031件魚類病例進行細菌及病毒之分離鑑定。今年魚類病毒性疾病檢出率49%高於去年(14%)，檢出種類包括鰻魚兩段核醣病毒、鰻魚疱疹病毒、虹彩病毒及野田病毒與錦鯉疱疹病毒，全年共檢出504件，多發生在七至九月間。有關檢出病毒與魚場的關係可發現，鰻魚兩段核醣病毒及鰻魚疱疹病毒只發生在淡水鰻魚養殖場；錦鯉疱疹病毒僅從錦鯉養殖場檢出；虹彩病毒及野田病毒則全由海水養殖場檢出；以上資料暗示魚類病毒對於特定族群有特定親合性，因此針對我國不同的水生動物應該有不同的防疫對策，才能有效提高其養成率。以下就重要魚類疾病加以探討，本次調查發現今年鰻魚兩段核醣核酸病毒感染率為最高46%（234/504），其次為鰻魚疱疹病毒（19%）；由於兩段核醣病毒為水中常在病毒[5]，另外也有報告指出兩段核醣病毒會引起鰻魚鰓柱狀上皮壞死症；因此由鰻魚發現之病毒在鰻魚死亡之扮演角色需進一步人工接種證實。臨床症狀上，我國罹病鰻魚主要包括爛鰓、鰓出血、胃積水、皮膚充血、脾腫大；病程呈慢性消耗性，累計死亡率可達三至四成。上野等1992年即在臺灣發現日本鰻感染疱疹病毒[14]，最近根據國外Basav等研究，單純以鰻魚疱疹病毒浸泡感染歐洲鰻就可造成鰻魚死

亡[1]，今年常見鰻魚疱疹病毒與鰻魚兩段核醣病毒共同感染，因此共同感染是否會加劇鰻魚的死亡率值得進一步研究。另外虹彩病毒檢出率為17%（86/504），其中檢出嘉納虹彩病毒[7]24件、傳染性脾腎壞死虹彩病毒[6]亦檢出23件（二者均屬於虹彩病毒科 Iridoviridae中之Megalocyttivirus屬，目前感染率佔石斑魚中第一位）；另外台灣石斑虹彩病毒[13]39件（Rana-like virus屬）。由此可知目前我國田間共有三種虹彩病毒分佈。此種情形提醒我們研發疫苗時需注意到同科不同屬的病毒間是否有共同抗原及交叉保護效果。因我國病毒基因型與國外東南亞國家相類似[2,3]，推測本病毒應是早期我國從東南亞輸入魚苗時傳入。2008年Jeong等[8]報告指出外表無異樣的進口觀賞魚也可檢出傳染性脾腎壞死虹彩病毒，表示觀賞魚輸入亦可能成為病毒導入的一個途徑。此外另有報告指出，由南中國海中捕捉包括25科86種的野生魚類中有13種魚類均可發現傳染性脾腎壞死虹彩樣病毒（ISKNV-like viruses），經親緣分析發現該病毒可細分為兩型，一型與ISKNV密切相關；另一型則與韓國分離的OSGIV (orange-spotted grouper iridovirus) 及 RBIV (rock bream iridovirus) 類似[15]。此發現表示同一個海域可能出現不同的病毒株，這兩種病毒可能是由沿海魚塢或海上箱網中之病魚散佈病原汙染所造成。由此推論野生魚類也可能是不顯性感染的帶原者，可將病毒傳到不同的國家。綜合以上，建議有關魚類虹彩病毒的檢疫重點應針對進口魚苗及進口觀賞魚，至於野生捕捉魚類應避免將其與養殖魚類混養以杜絕本病之傳播。

海水魚的另一重要疾病：野田病毒症，佔35例（7%，35/504），此項檢出率有被低估之嫌。因為幾乎所有海水魚類均會感染的本病毒，雖然檢出比例並非最高，但是主要發生在我國石斑繁殖場孵化一個月內的魚苗及幼魚[4]，死亡率達九成以上，造成重大損失的種苗場往往將死亡魚苗放流，並未主動送檢因此造成檢出率低估，因此實際田間盛行率應高於檢出率，故本病仍應視為我國極重要的魚病。雖然本病經由相關重要水產輸出國家協商，目前已由OIE水生動物法典移除，列為不需通報的疾病，目前我國積極

2009 年水生動物疾病調查報告

推動石斑魚倍增計畫，想成為世界主要輸出國家之際，應該從繁殖SPF石斑仔魚（防止垂直感染）及供應公共無污染養殖用水（防止水平感染）生產醫學方面著手[12]，建立良好石斑魚生產規範，才有機會成為石斑魚王國。

有關錦鯉疱疹病毒自從2002年入侵臺灣後，由於檢出陽性魚隻後，養殖場無法做到污染場整場撲

殺，因此造成少數感染殘存魚隻長期存在魚場，成為保毒魚隻，當魚隻免疫能力下降即會造成排毒，引起零星病例發生。本年度本病檢出地域包括臺北、宜蘭、桃園、南投等縣。本病在無疫苗可用情形下，若能確實遵守生產管理的規定亦可達到清除本病的目標。

表1、本研究使用之特異引子對

疾病種類	引子對	產物 大小	參考文獻
嘉納虹彩病毒症	4-F (5'-CGG-GGG-CAATGA-CGA-CTA-CA-3') 4-R (5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3')	568 bp	[17]
傳染性脾臟腎臟 壞死症	1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTATC-3')	570 bp	[17]
錦鯉疱疹病毒症	TKF (5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3') TKR (5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3')	409 bp	[17]
野田病毒症	F2 (5'-CGTGTTCAGTCATGTGTCGCT-3') R3 (5'-CGAGTCAACACGGGTGAAG.4-3')	426 bp	[10]
鰻魚疱疹病毒症	5'-GTGTCCGGCCTTTGTGGTGA-3' 5'-CATGCCGGGAGTCTTTTTGAT-3'	463 bp	[11]
鰻魚兩段核糖核 酸病毒	WB1, 5'-CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3' WB2, 5'-CGTCTGGTTCAGATTCACCTGTAGTG-3'	206 bp	[16]

參考文獻

1. Basav NH, Zwart R, Engelsma MY, Haenen O LM. Pathogenesis of Herpesvirus anguillae (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion. *Diseases of Aquatic Animals*, 78: 13-22, 2007.
2. Bondad-Reantaso. Diseases and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132: 249-171, 2005.
3. Choi SK, Kwon SR, Nam YK, Kim SK, Kim KH. Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transition of RSIV into acute phase. *Aquaculture*, 256:23-26, 2006.
4. Chi SC, Lin SC, Su HM, Hu WW. Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus Research*, 63: 107-114, 1999.
5. Christie KE. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Development in Biological Standard*, 90: 191-199, 1997.
6. He JG, Deng M, Weng SP, Li Z, Zhou SY, Long QX, Wang XZ and Chan SM. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291: 126-139, 2001.
7. Inouye K, Yamano K, Maeno Y, Nakajima K and Sorimachi M. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 27: 19-27, 1992.
8. Jeong JB, Kim HY, Jun LJ, Lyu JH, Park NG, Kim JK, Jeong HD. Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 78: 209-15, 2008.
9. Lee NS, Nomura Y, Miyazaki T. Gill lamellar pillar cell necrosis, a new birnavirus disease in Japanese eels. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37: 13-21, 1999.
10. Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Furusawa I and Muroga K. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18: 103-107, 1994.
11. Rijsewijk F, Pritz-Verschuren S, Kerkhoff S, Botter A, Willemsen M, Nieuwstadt T, Haenen O. Development of a polymerase chain reaction for the detection of Anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene. *Journal of Virological Methods*, 124: 87-94, 2005.
12. Subasinghe RP. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine*, 67: 117-124, 2005.
13. Tsai CT, Ting JW, Wu MH, Wu MF, Guo IC and Chang CY. Complete Genome Sequence of the Grouper Iridovirus and Comparison of Genomic Organization with Other Iridoviruses. *Journal of Virology*, 79: 2010-2023, 2005.
14. Ueno Y, Kitao T, Chen SN, Aoki T, Kou G. Characterization of a herpes-like virus isolated from cultured Japanese eels in Taiwan. *Fish Pathology*, 27:7-17, 1992.
15. Wang YQ, Lü L, Weng SP, Huang JN, Chan SM, He JG. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. *Archives of Virology*, 152: 763-773, 2007.
16. Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT and Nicholson BL. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 4139-4141, 1999.
17. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2010. http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summary.htm

Diseases of fish in Taiwan aquaculture 2009

C Tu*, JC Tsai, SM Haung, CC Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract A total of 1031 cases from domestic fish farms were submitted and examined by laboratory tests, including bacterial and virus isolations as well as identifications, determined by using molecular diagnostic tests. In this report, we focus on results of the virus detection survey. Forty-nine percent (504/1,031) out of the examined fish specimens were diagnosed as viral infections, caused by eel birnavirus, eel herpesvirus and koi herpesvirus in freshwater fish, and iridovirus and nodavirus in marine water fish.

Keywords: *Marine water fish, Freshwater fish, Virus*