

99年度建置水產動物生產醫學 石斑魚教育訓練課程

趙嘉本

高雄縣動物防疫所

我國水產養殖業以能養殖近120種
魚貝類著名國際，與日本，挪威
同列世界三大水產養殖王國

其中石斑魚產值產量世界第一
政府希望5年後熱帶魚出口超越新加坡
前途（錢途）

石斑魚產值倍增計畫

- 預計石斑魚產業在102年，產值將可由38億元，倍增至76億元。

- <http://aqua.nvri.gov.tw/> 水生動物疾病
診斷輔助系統(家畜衛生試驗所)
- [http://www.baphiq.gov.tw/welcome/
welcome.htm](http://www.baphiq.gov.tw/welcome/welcome.htm) 水產動物用藥品使用
規範(防檢局)

水產動物用藥品使用規範

- (一) 安默西林 Amoxicillin
- (二) 安比西林 Ampicillin
- (三) 脫氧羧四環黴素 Doxycycline
- (四) 紅黴素 Erythromycin
- (五) 氟甲氧黴素 Florfenicol
- (六) 氟滅菌 Flumequine

- 北里黴素Kitasamycin
- (八) 林可黴素Lincomycin
- (九) 歐索林酸Oxolinic acid
- (十) 羥四環黴素Oxytetracycline
- (十一) 史黴素Spiramycin
- (十二) 磺胺二甲氧嘧啶Sulfadimethoxine
- (十三) 磺胺一甲氧嘧啶Sulfamonomethoxine
- (十四) 甲磺氯黴素Thiamphenicol
- (十五) 三氯仿Trichlorofon

- 本規範指定之對象水產動物為吳郭魚、鯉魚、鯽魚、草魚、大頭鱧、鰻魚、淡水鯰、鱸魚、虹鱒、香魚、虱目魚、嘉鱘、赤鯨、黑鯛、黃鰭鯛、黃錫鯛、鱠、海鱺、紅甘鮨、青甘鮨、烏魚、草蝦、斑節蝦、長腳大蝦、蛙及鱉等二十六種。

石斑魚許可使用之藥物

- 口服藥物：安默西林(Amoxicillin)、安比西林(Ampicillin)、羥四環黴素(Oxytetracycline)、紅黴素、北理黴素、林可黴素、史黴素、磺胺一甲氧嘧啶
- 藥浴藥物：三氯仿

開業 aquavet

- 良好地點與人緣
- 良好學術與經驗
- 基本設備
- 善用公部門資源(如果已是公務獸醫更應善用)
- 勤勞肯做
- 健康身體

Basic diagnostic tools

- A high-quality microscopy having 4x 10x 40x and 100x (oil immersion) objectives giving final magnifications of 40x 100x 400x and 1000x with 10x ocular.
- Disposable latex gloves
- Scalpel fine and coarse forceps and fine and coarse scissors
- Microscope slides and coverslips
- 10% neutral buffered formalin

Basic diagnostic tools(2)

- In addition water testing kits
- Disinfectant/ antiseptic / anesthetic
- Several clean 20 and 40 liter plastic buckets
- Aquarium bags various sized nets, and several airstones connected to a small air pump
- Bacterial culture medium

- The undissociated ammonia molecule NH_3 is highly toxic for fish
- Even low levels of ammonia NH_3 can cause branchial hyperplasia
- $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ (pH 7.5 room Temperature)
- 1.3% 98.7%

Sadation /anesthesia

- The same drugs are used for both sedation and anesthesia in fish
- MS-222
- Similar to mammal the first stage is excitation such as eels, struggle violently during this stage and may attempt to escape.
- The container that holds such fish should be well covered.
- After excitation the fish becomes depressed(loss response to touch), loses equilibrium and reespiration slows(gilling, the opening and closing of the gill covers, becomes slower and weaker)

麻醉劑 (獸醫師處方用藥)

- **Tricaine methane sulphonate (ms-222)** , 其 50-200ppm不等 約2-5分鐘,如吳郭魚常用100-150ppm。
- 其他麻醉劑 **Benzocaine** , **Quinaldine**
- **2-phenoxyethanol (Ethylene Glycol Monophenyl Ether)** 使用量約250-300ppm 可完全麻醉。
- 保持魚體表濕潤, 需墊一層沾溼毛巾。

魚類血液標本及臟器抹片染色法

- 將血液或內臟抹片於乾淨玻片上推開，並自然風乾即可。使用Liu' s 染色

A液

Methylene blue 0.5g

Eosin yellow 1.70g

Methyl-alcohol (甲醇) 1000 ml

B液：

Azur I	1.30g
Methylene blue	1.40g
Na ₂ HPO ₄	10.06g
KH ₂ PO ₄	16.5g
蒸餾水	加至1000ml

步驟

- 一、 A液使用30秒
- 二、 B液再滴於A液上(滴加之量約為A液之兩倍) 輕吹使之混合均勻 染色約1 分鐘
- 三、水洗
- 四、以油鏡： 鏡檢。

- The owner should be asked to bring in one to several representative fish for examination.
- Water sample in separate clean containers.
- The best containers are a clean plastic bucket or transport bag (contain pure O²)
- One liter of water for every one centimeter of fish

Representative fish for examination.

- 倦躺於池邊
- 浮游於水面
- 剛死亡不久(眼、鰓仍新鮮)
- 樣本數最好2-3尾以上
- 如病毒性或細菌性疾病病材可冷藏隔天仍可診斷(半夜所得樣本)
- 或取得池中外形較差之魚(如體表具外傷、粘液分泌較多(於紅衣之卵圓))

問 診

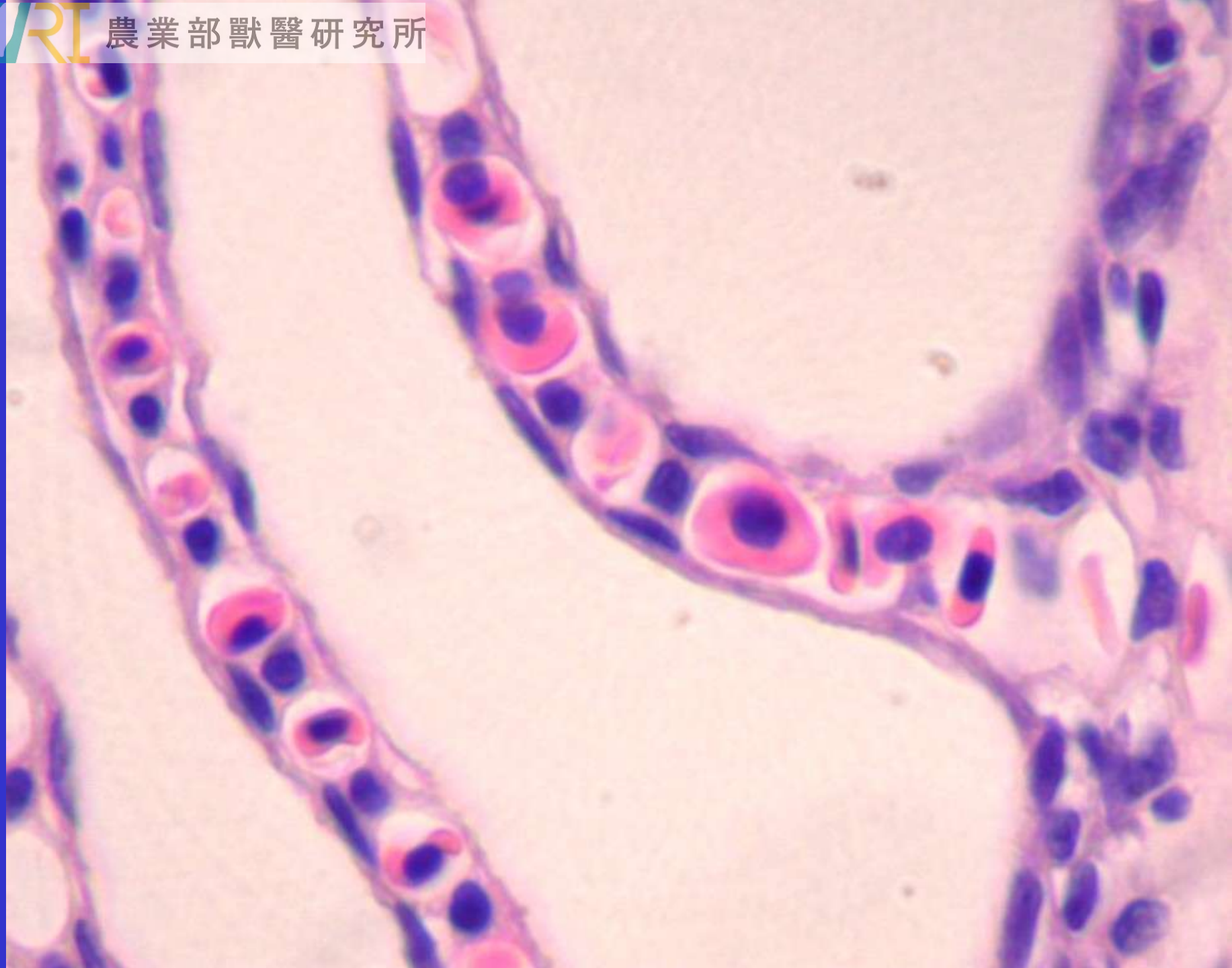
- 水質最近是否有變化(有否浮游性動物太多-缺氧)milk fish 藻色太濃—早上較不吃
- 魚隻最近情形(餌料、魚群不穩定-白點初期)
- 死亡數情況(一下子就死亡數很多、或漸漸增加—是否病毒感染或水質)
- 最近是否曾使用過藥物或使用過其它?使用量?
- 是否有混養蝦類且最近蝦有死亡?
- 其它(如 養殖密度 幾分地 水深 水車數)

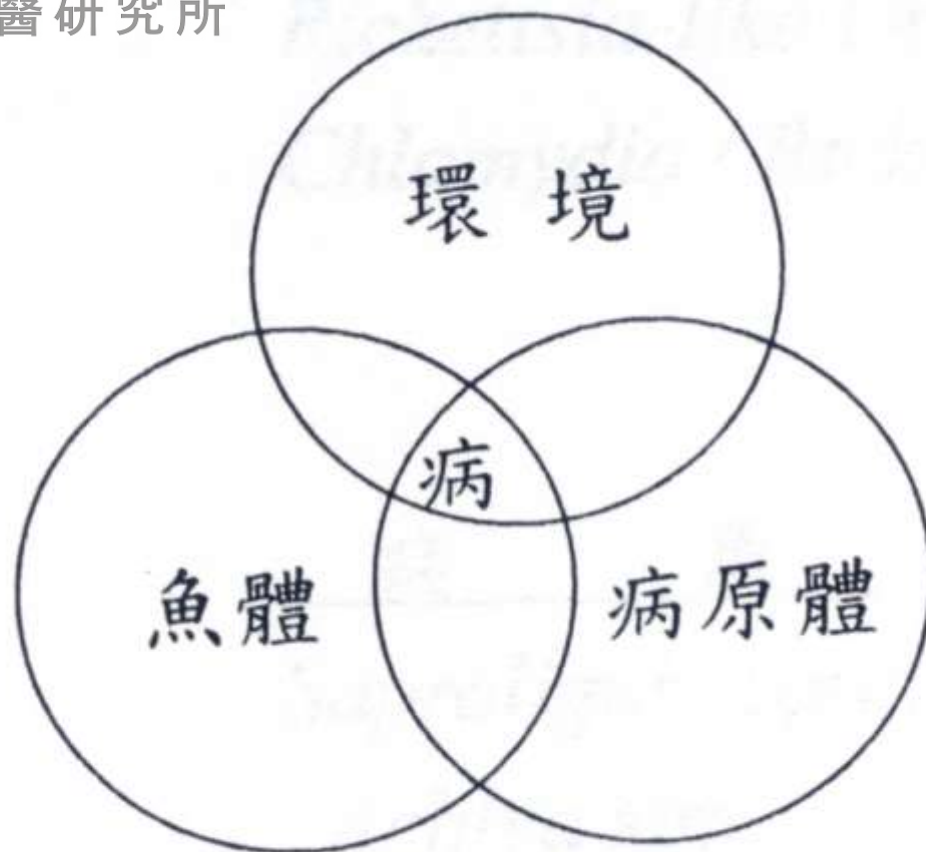
體表檢查

- 是否體表具有傷口(部位)
- 是否具有寄生蟲(gross and micro)
- 粘液是否增加
- 眼球是否明亮
- 體表是否有氣泡
- 是否畸型









環境因素

病原體感染因素

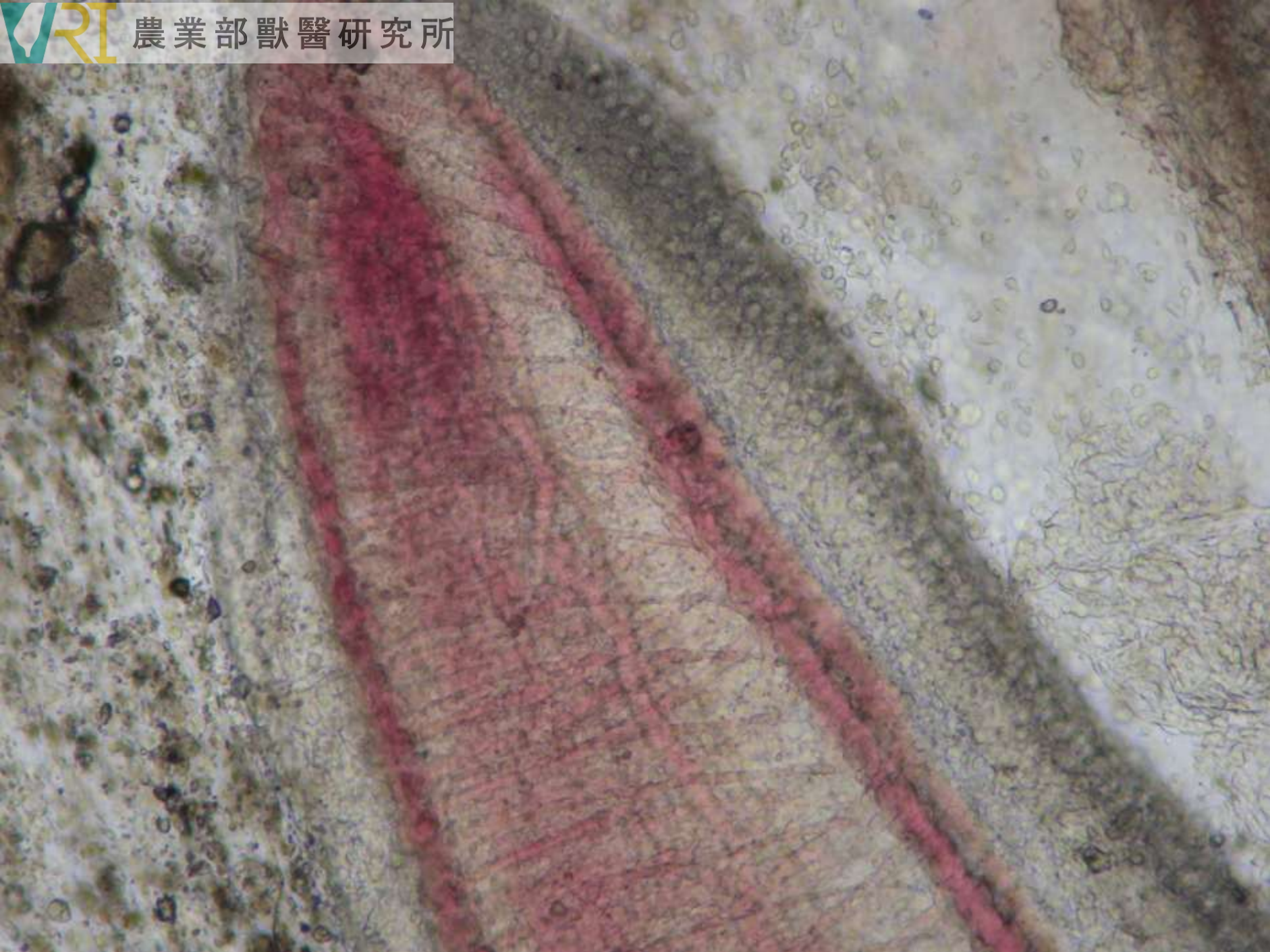
魚體狀況因素

病 例

- 某一週日上午4-5 點魚群大量浮游
- 2.5分地放養6500尾石斑 3台水車水深120-140 cm
- 事發前一天水色漸由綠轉成….
- 下風處水面具有不潔之泡沫
- 水車打出之泡沫增多
- 前一天食餌明顯減退







缺氧

- 水色轉變(尤其由綠轉成紅或土石流色):
倒藻
- 水車打出泡泡拖很長
- 前1-2天吃餌就不正常
- 天候不穩定(尤期春夏季)
- 老池

缺氧處理

- 3分地水車最少須5台
- 水深約4.5尺
- 適度使用海水(換水)
- 病魚淘汰
- 短期內停餌以免再復發
- 水質改善(沸石粉)

石斑魚海水白點蟲
(*Cryptocaryon irritans*) 感染症

- 海水白點蟲(*Cryptocaryon irritans*)屬於原生動物門(*Protozoa*)，纖毛綱(*Ciliata*)，全毛目(*Holotricha*)，
- 為海水魚類常見寄生原蟲
- 曾報告超過 45 種海水魚類有海水白點蟲感染症之記錄

- 民國77年以前本省養殖石斑魚 (*Epinephelus* spp.) 鮮有海水白點蟲感染之報告。
- 但自1988-1994年間之10月至次年3月於高雄縣永安鄉均暴發引起大流行。
- 造成石斑魚池100%之死亡率，本病之流行於水溫突降(30 °C 降到 25 °C 以下)時最容易發病。

- 同池中所寄養之吳郭魚 (*Orchromis niloticus*) 及虱目魚 (*Chano chano*) 在石斑魚 100% 感染及死亡率時完全不受影響, 形成一強烈之對比。
- 但自 1997 年以後全年皆有石斑魚感染白點蟲病例出現。
- 蟲會感染吳郭魚但似乎有抵抗力。

臨床及肉眼變化

- 業者警覺性高者可能會發現魚隻於排水管似乎魚較多且不安
- 晚間魚不安穩
- 少數魚隻夜間會浮游(此時餌料籃中之魚可觀察到粘液分泌增加)
- 少數魚會白天浮游到入夜更多
- 整天皆有魚隻浮游
- 魚隻開始死亡

- 感染之魚隻極度不安，常以體表去磨擦池壁，試圖拋開蟲體。
- 常見眼球混濁，體表及鰓絲可見小白點，重症病魚因蟲體之刺激導致粘液分泌增加。
- 如蟲體之感染量高常導致呼吸困難，並可見魚隻浮游，或倦躺於池邊。



78-80年間永安地區每年因海水白點蟲感染死亡石斑魚損失金額達10億以上







海水白點蟲生活史

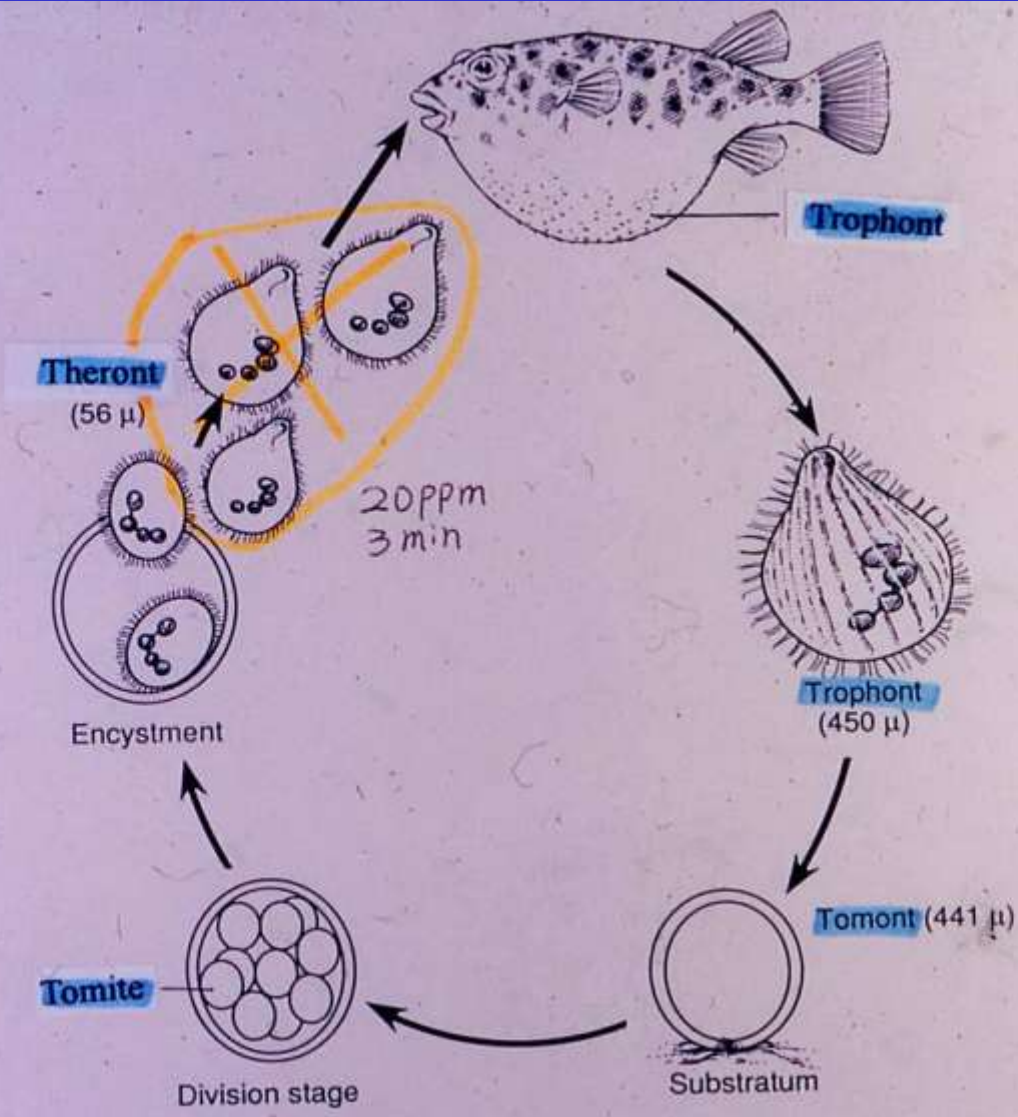


FIGURE 81-3. The life cycle of *Cryptocaryon irritans*.

營養生長期(Trophont stage)

- 寄生魚體攝食魚體之組織細胞及碎片。
本期蟲體具有四個約略大小相等之核。
- 當 trophont 直徑達到約 400-450 um (於常溫下約進入魚體第4天)或寄生之表皮剝落時、或魚隻死亡時會離開魚體。
- Trophont 離開魚體附著池壁池底、並迅速 encyst 形成 tomont stage 。

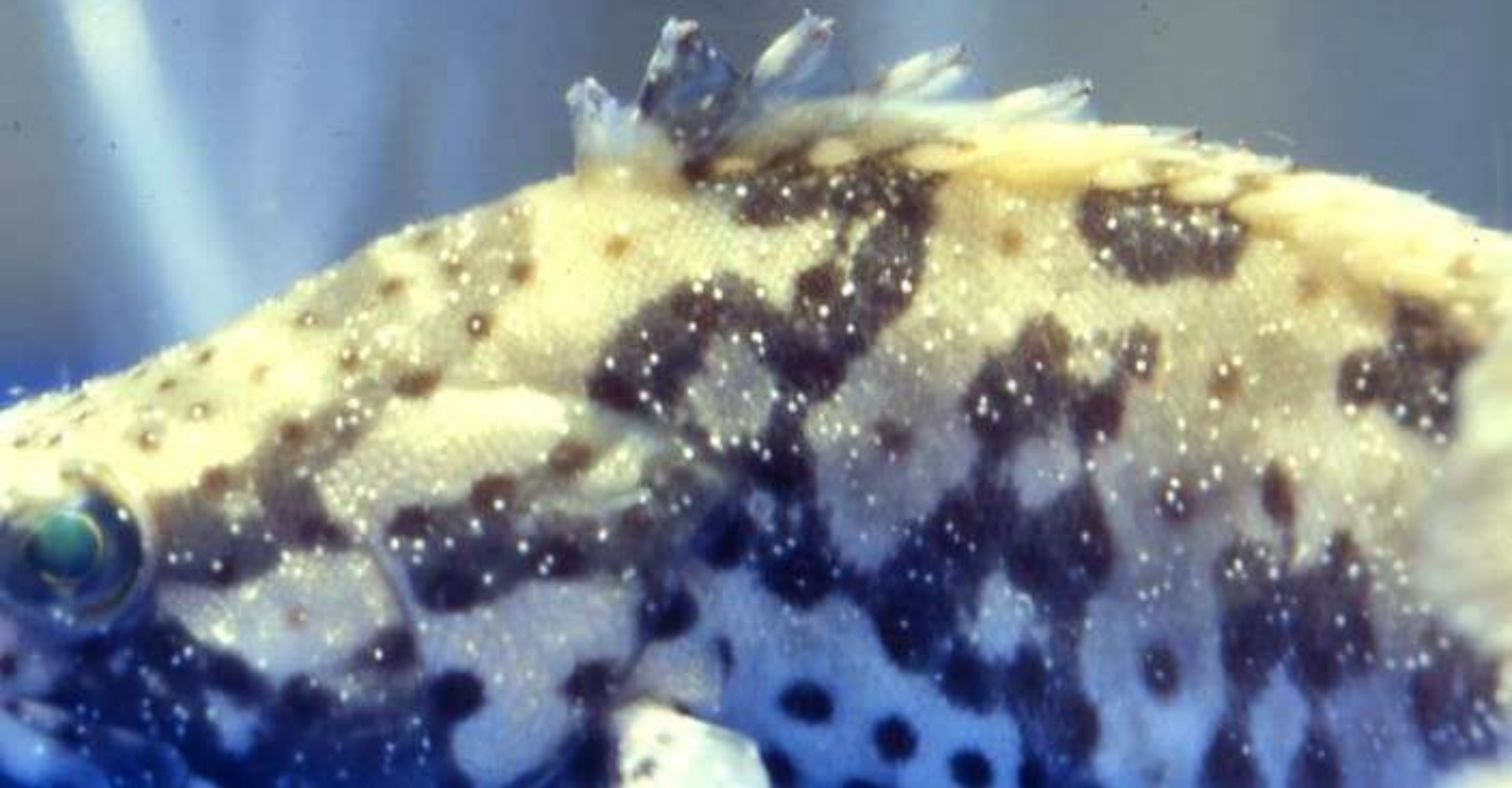
分裂繁殖期(tomont stage)

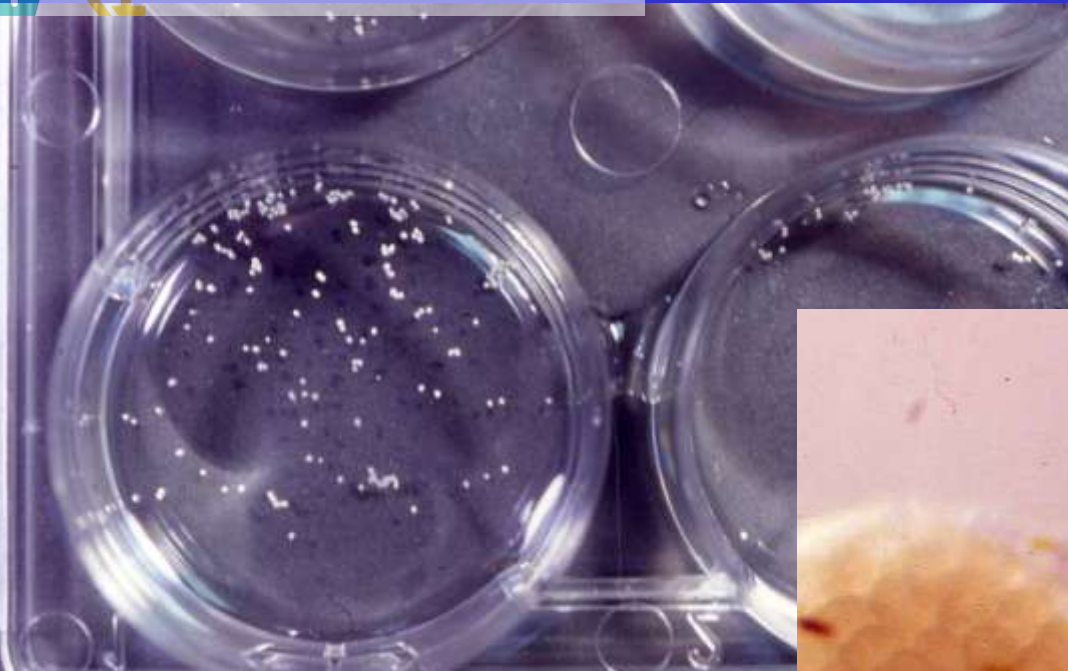
- 成熟 trophont 離開魚體後、蟲體在30-60分鐘內迅速粘於池底(大部份皆於30分鐘內)成白色且團塊狀、但亦有單獨存在者。
- Tomont 在分裂初期細胞核先增大，漸融成一團、再經多次不等二分裂或多分裂法形成無數仔蟲。

- 仔蟲初期僅有一核經二次分裂成具有四核之仔蟲，但偶見到具有超過四核之仔蟲。
- 一成熟之tomont 約可形成數約 200-300 個 tomite ，其大小約 25 X 75um 。
- 未成熟既脫離魚體之 trophont 若能 encyst 成功，則產生之tomite 數目往往較少，有時甚至不會超過 20 個。

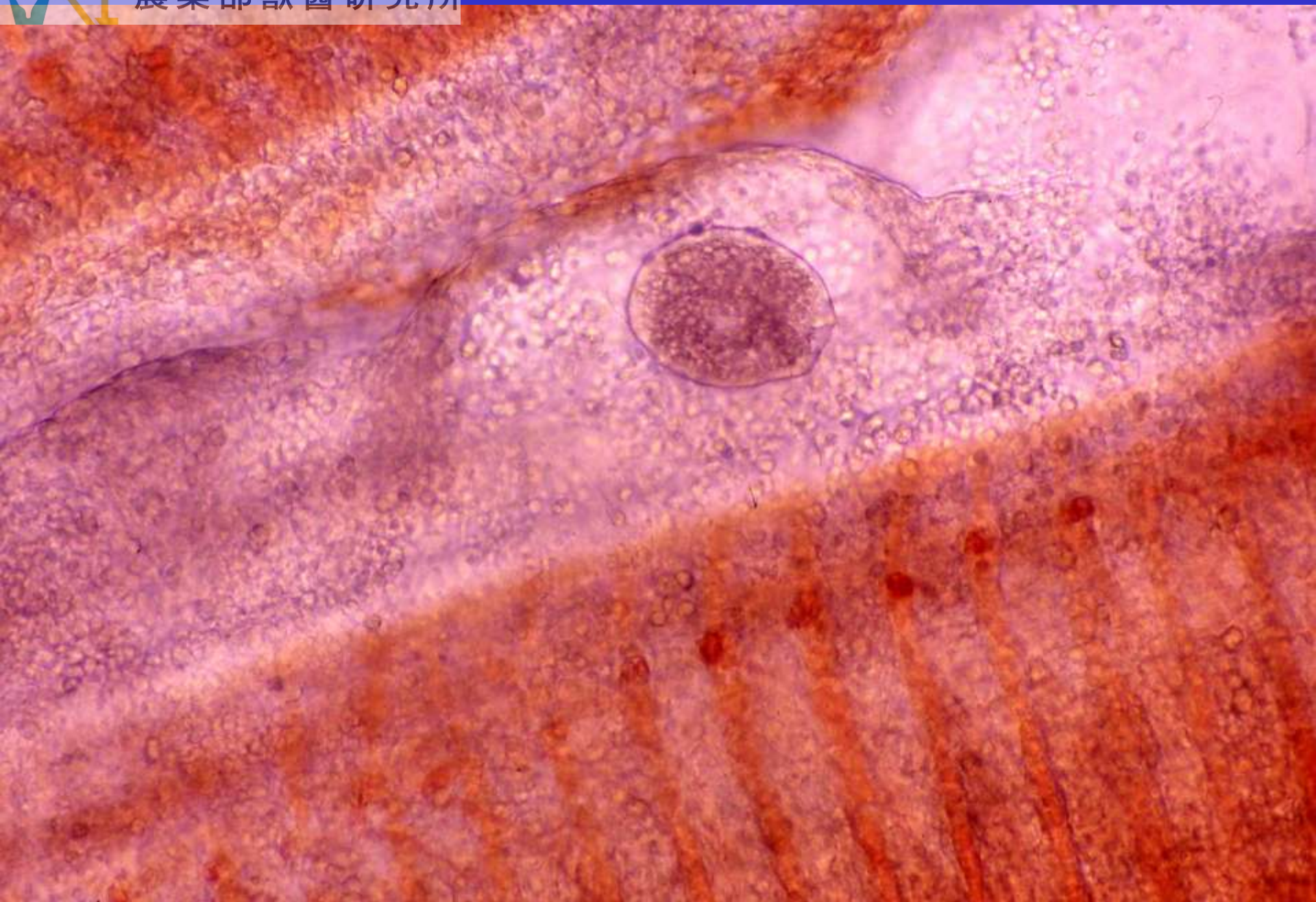
感染仔蟲期(theront)

- 一旦由tomont encyst 但仍未進入魚體前稱為theront，剛破囊而出之theront呈螺旋快速運動以尋找寄主。
- 若無即時找到寄主則運動速度漸減變成近於直線方式運動，一旦呈現如此運動方式則已無感染能力，30°C之溫度下螺旋運動之時間約6-8小時。

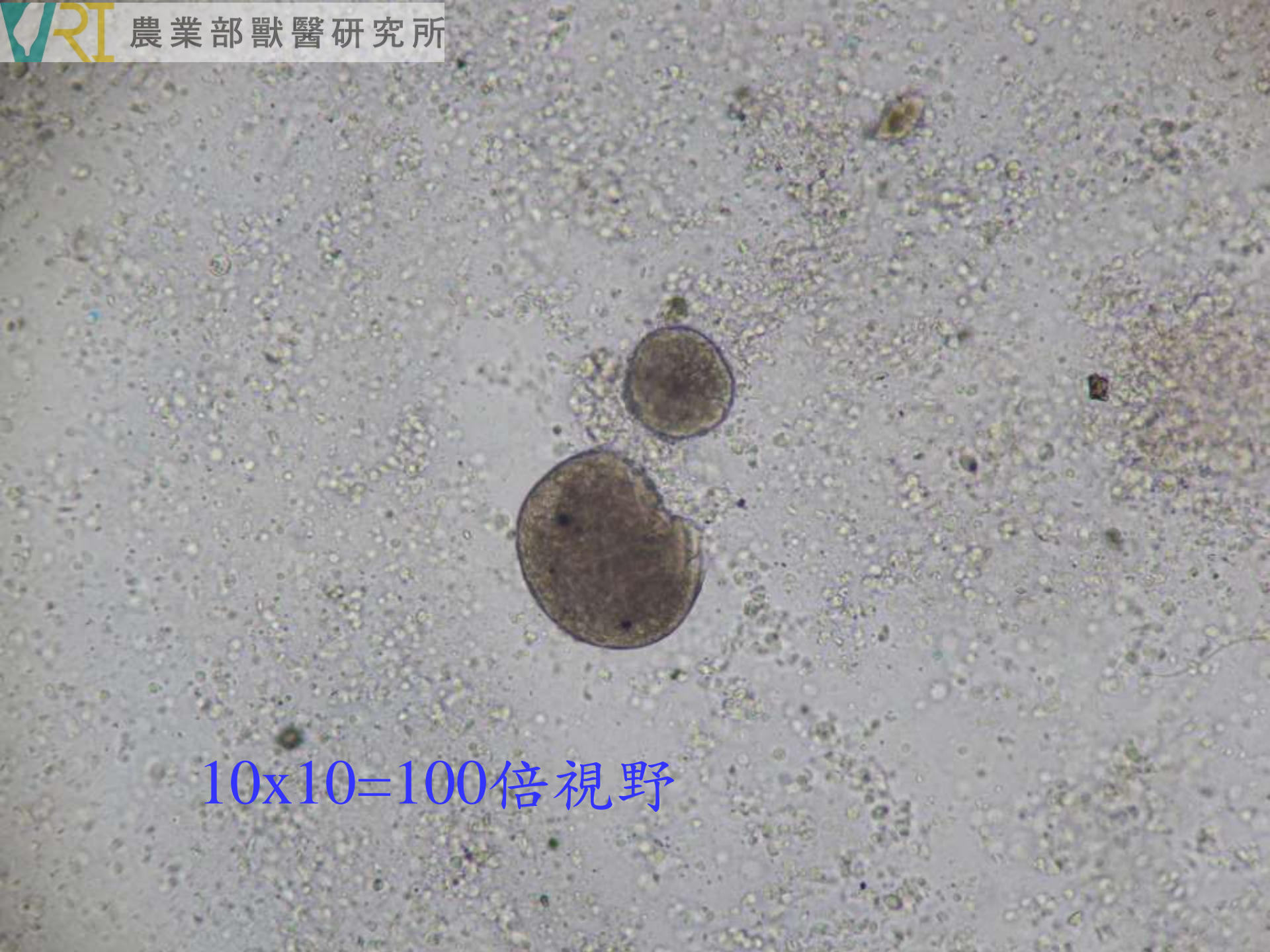




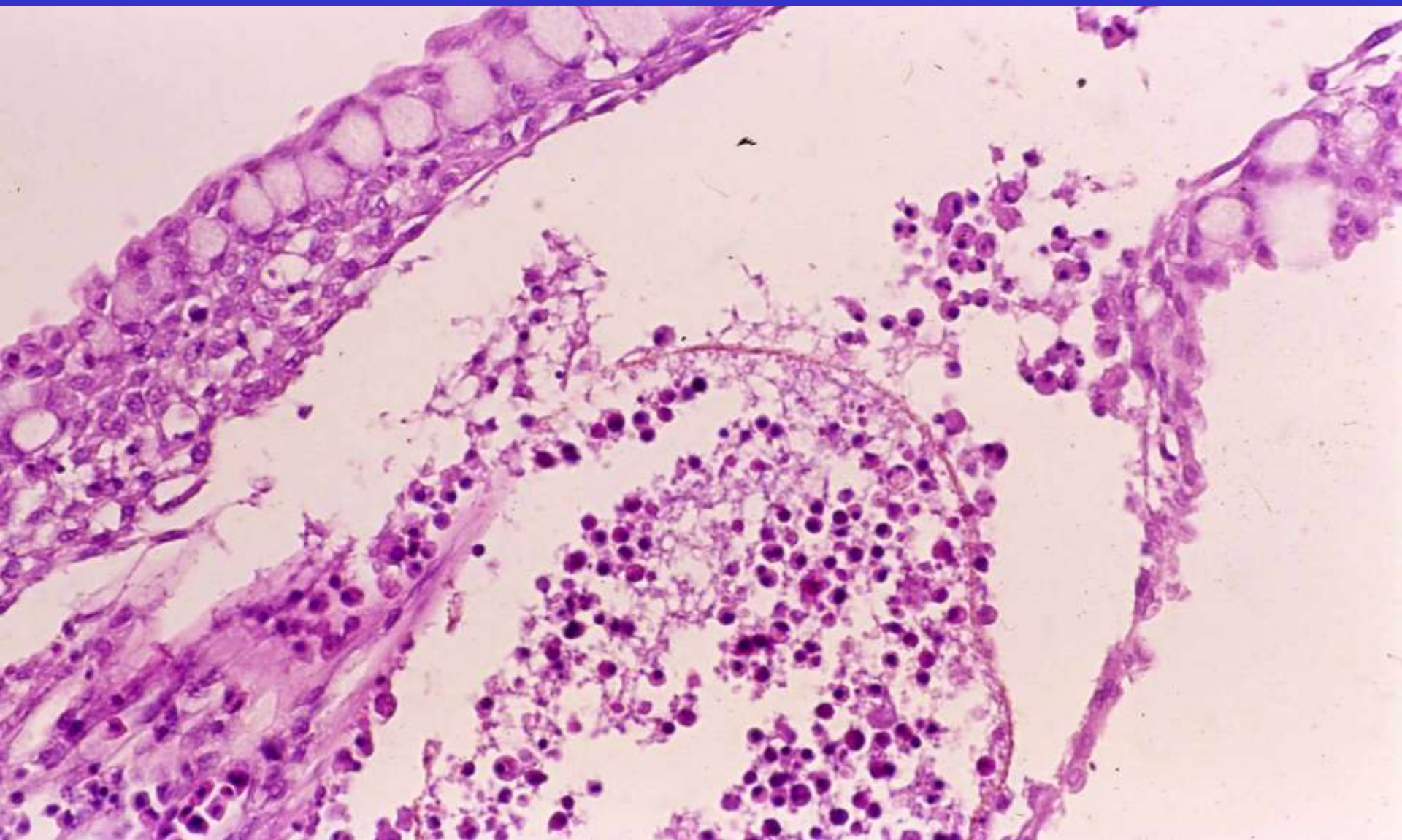








10x10=100倍視野



海水白點蟲之治療

繁殖場





繁殖場海水白點蟲防治

- 破壞其生活史
- 母蟲(tomont)會黏於池底
- 由魚體離開之成蟲(trophont)於池底形成tomont後須72-120小時(夏季溫度)才會成熟並放出具感染性之theront
- 剛移開之魚池池底會粘許多蟲卵，經刷洗後開池即可再使用
- 每60-72小時換池一次

成魚養殖場



奴卡氏菌感染症 (Nocardiosis)

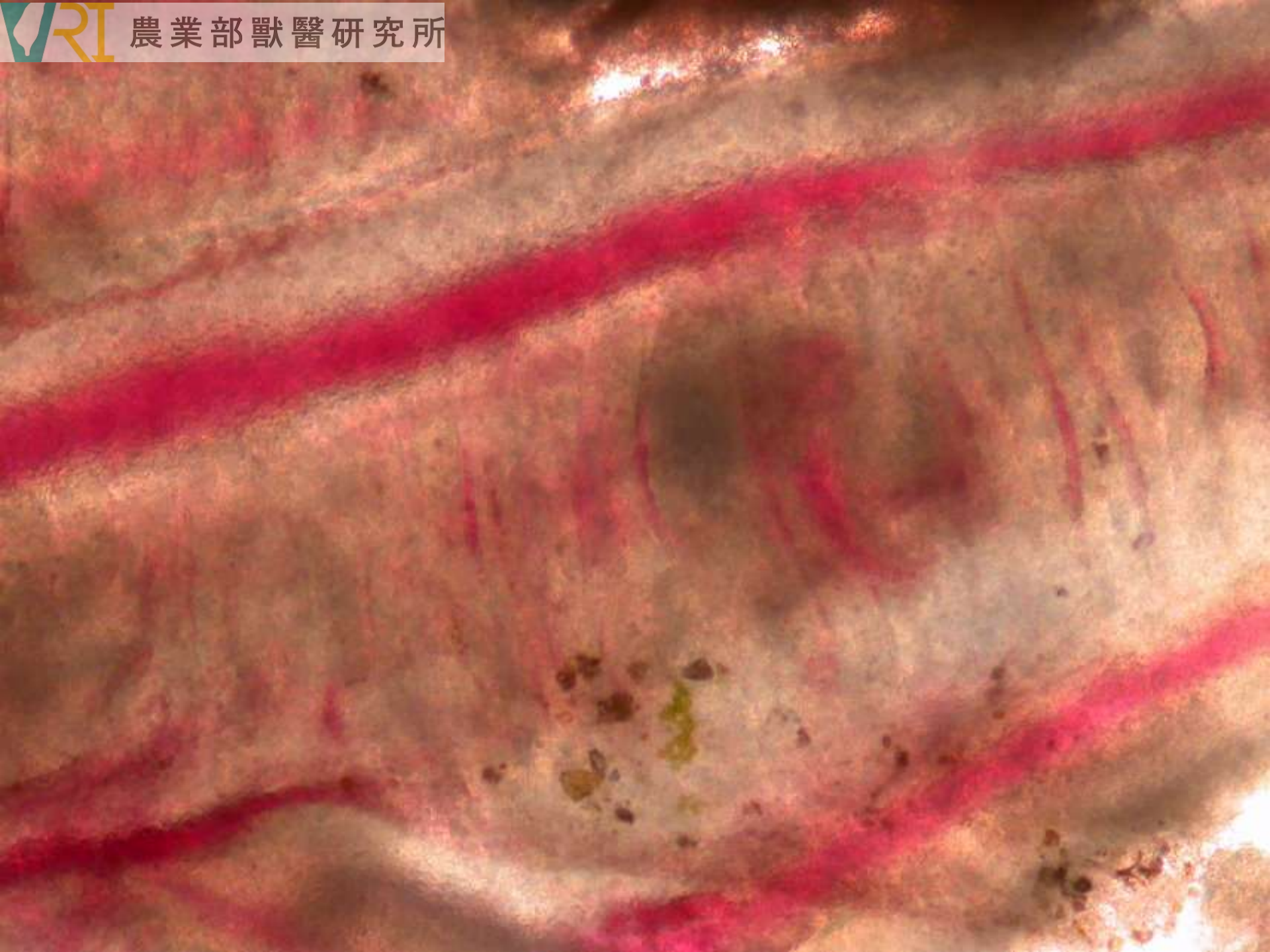
- *Noardia* spp. 是需氧性放線菌目 (*Actinomycetes*) 一員，為革蘭氏陽性、長而細菌絲，因細胞壁含有分枝酸 (mycolic acid)，所以染色具部份抗酸性
- 它幾乎是無所不在，存在於含有豐富有機物的土壤中

- 病因：於本區主要由 *Nocardia serioles* 所引起極少為 *nocardia asteroides*，本菌為 Gram-positive 細菌。弱抗酸性成長絲狀之桿菌。
- 病徵：本病為慢性病，病魚體表常有潰瘍病灶，嚴重者於鰓部就可見白色小結節。
- 解剖上可見到脾腎具有明顯大小不一之結節病灶之外，其它臟器亦可見(如心、消化道)。

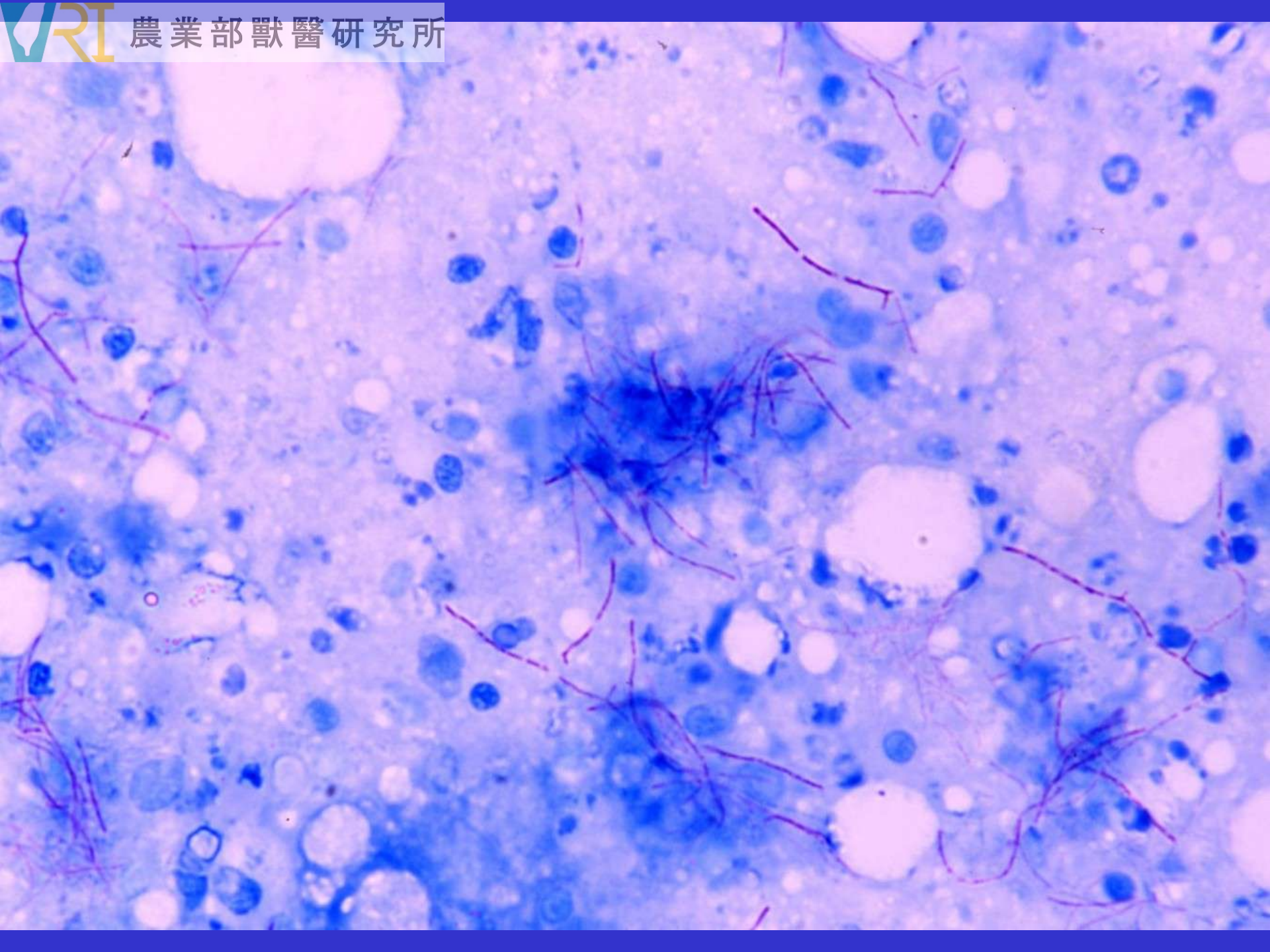
奴卡氏菌 於本區好發魚種

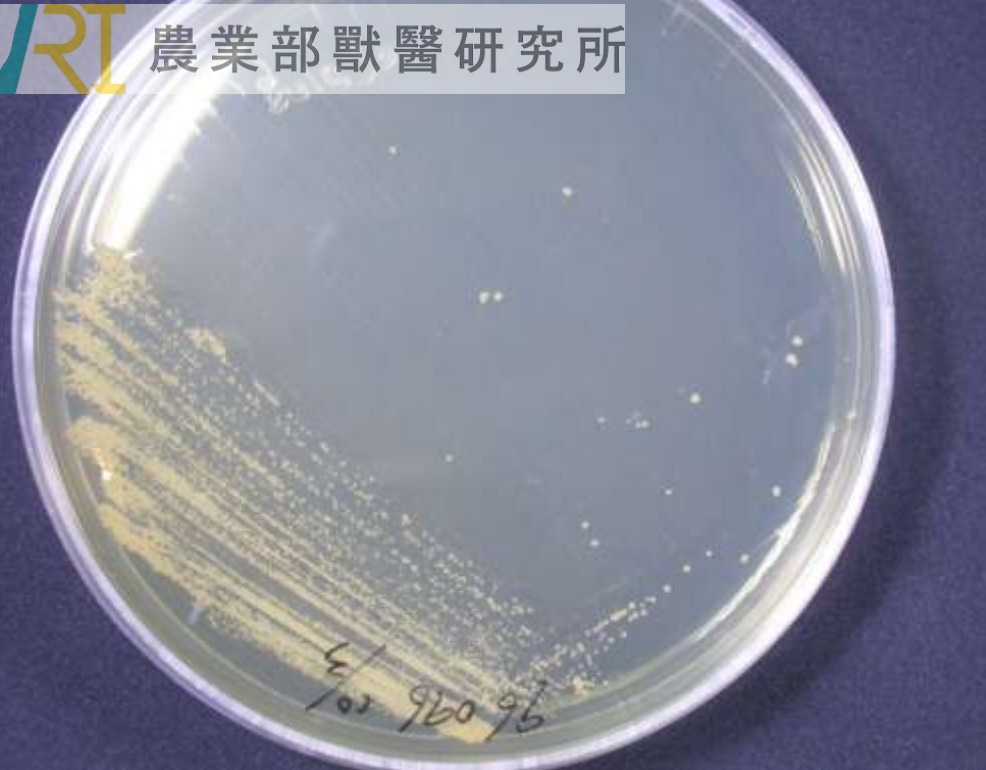
- 加州鱸
- 金目鱸(淡水環境)
- 鱧魚
- 紅衣
- 石斑魚(海水)
- 金龍魚
- 金錢魚(半淡鹹)



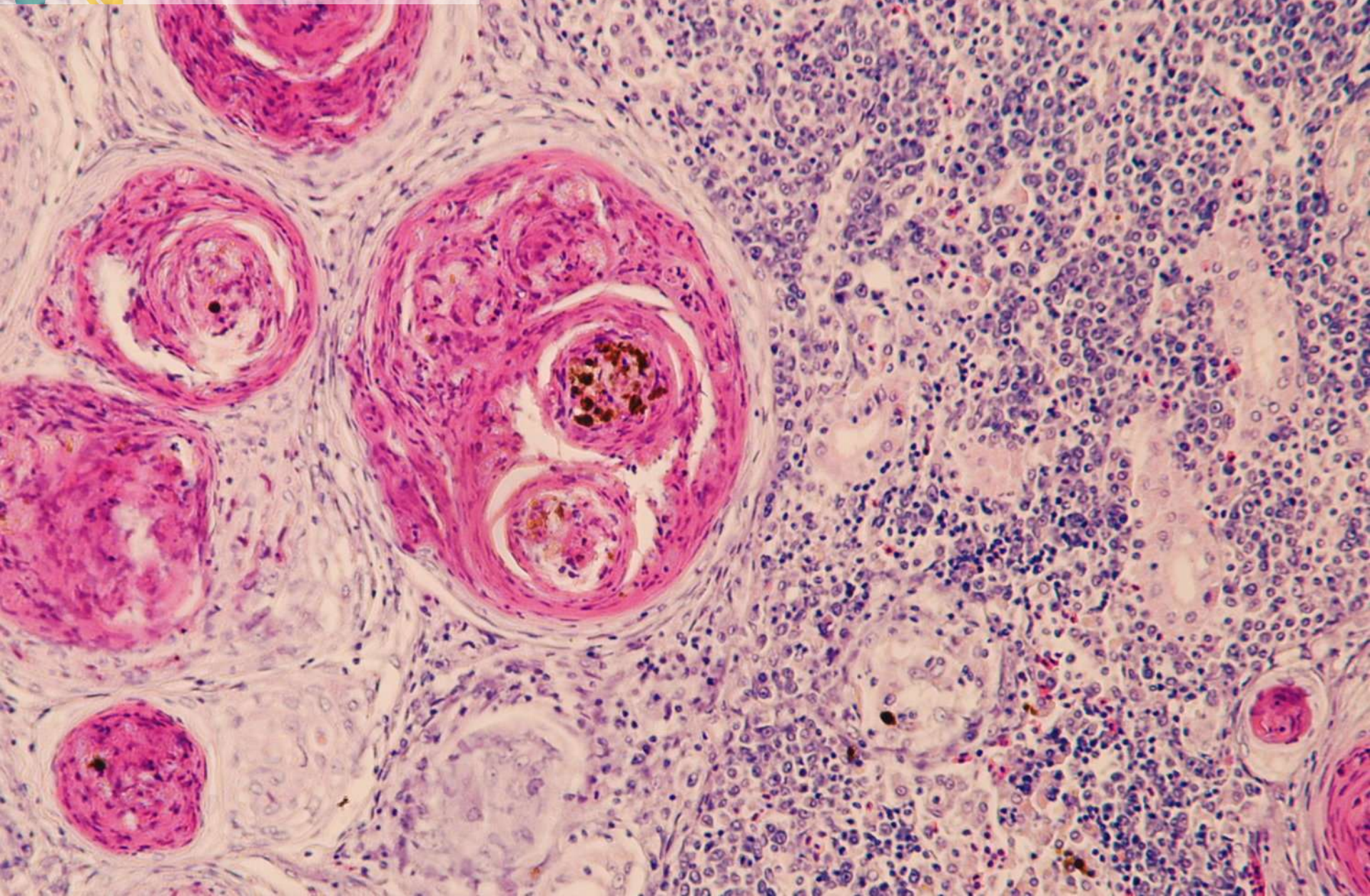


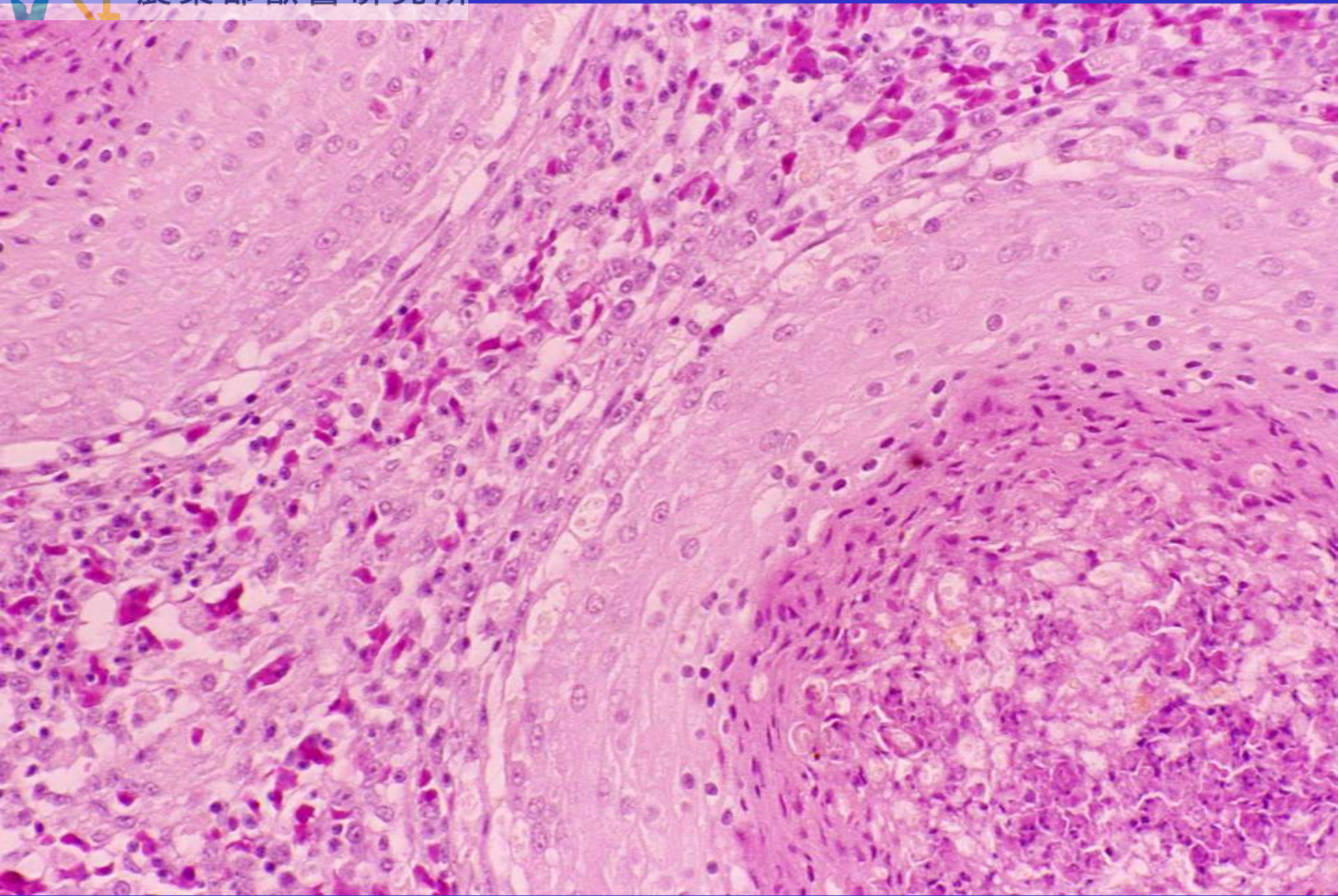
- 抗酸染色：抗酸染色可見弱陽性反應念珠樣或分枝狀長桿菌細菌
- 診斷：可使用 BHI or lowenstein Jensen medium 經4-7天可見菌落。
- 確診：PCR 產物定序





BHI 通常需4-7天，
LJ 約3-5天





診 斷

- Aquaculture research 2002 33 p1195-1197
- Sequencing of 16s-23s RNA internal transcribed spacer and its application in the identification of *Nocardia seriolae* by polymerase chain reaction
- Product 390bp



奴卡氏菌感染症

治療

弧菌感染症

- 養殖石斑魚病原弧菌 *Vibrio alginolyticus*、*V. carchariae*、*V. harveyi* 及 *V. parahaemolyticus* *Vibrio vulnificus* 等
- 皮膚及內臟感染為主
- 感染後常出現食餌能力變差 體表造成出血嚴重時造成潰瘍

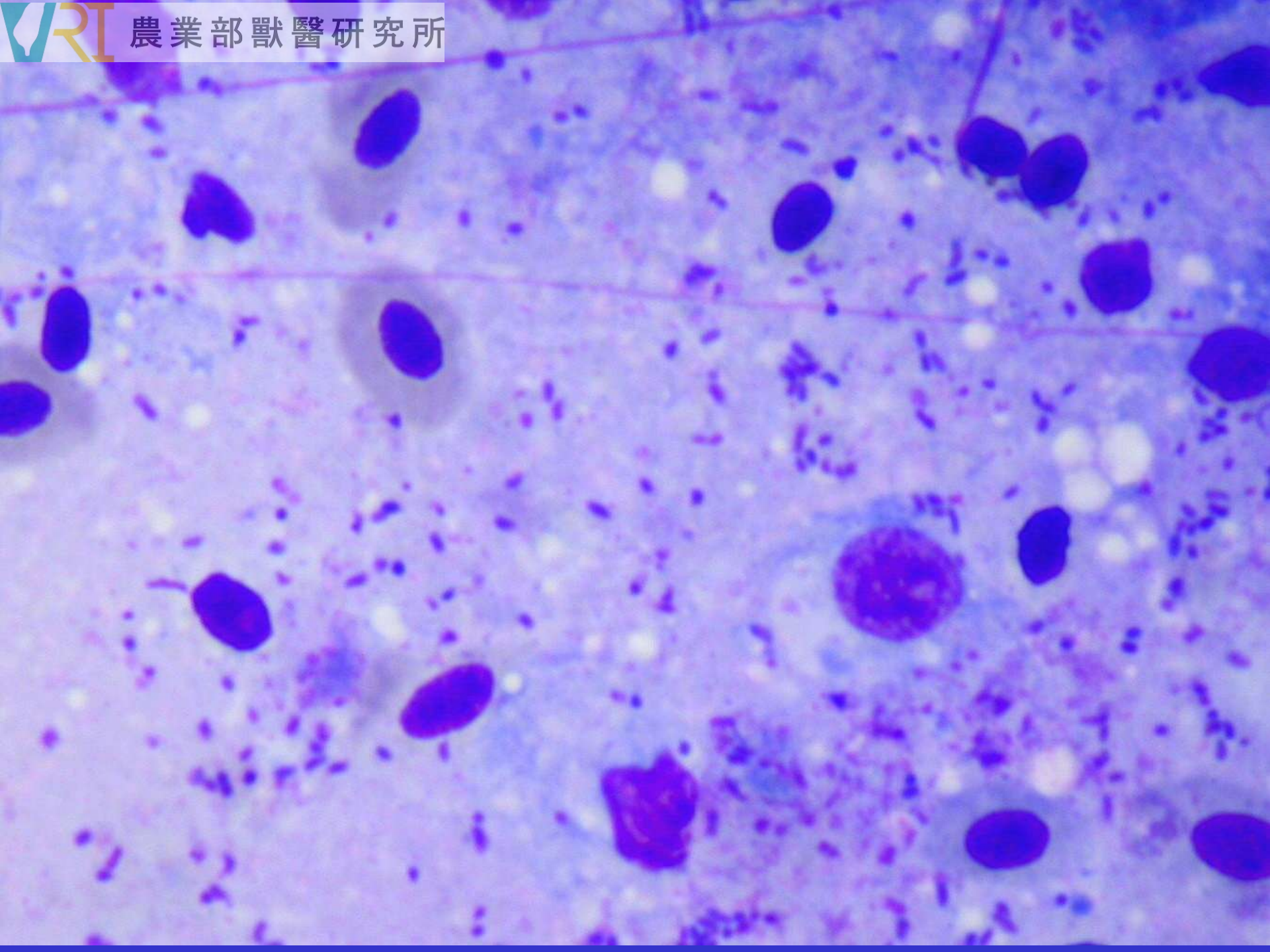






診 斷

- 常好發於水溫變化季節
- 水質良好
- 無病毒性疾病或寄生蟲感染
- 體內抹片染色或病灶區可見大量細菌
- 魚隻體表具有相當之病變區



- 本區之中最常分離為 *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* 及 *Vibrio vulnificus* 等
- 可將培養之細菌作成菌液經100°C 煮約5-10分鐘當做 DNA (或以核酸抽取 Kit進行)
- 以特有之引子對進行檢測
- API

- Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle(*Anadara granosa*) by PCR FEMS Microbiology Letters 252 (2005) 85–88
- Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* Journal of Microbiological Methods 36 (1999) 215–225

- Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 602–611
- Vh_*toxR*-F (forward) 5-TTC TGA AGC AGC ACT CAC -3
- Vh_*toxR*-R (reverse) 5-TCG ACT GGT GAA GAC TCA -3
- Product 390bp

- Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysterst
APPLIED AND ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY, Mar. 1991, p. 707-711 product
about 519bp
- Direct Identification of *Vibrio vulnificus* in
- Clinical Specimens by Nested PCR JOURNAL OF
CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 1998, p. 2887–
2892

弧菌病之防治

- 正確池塘管理
- 選養抗病力較強之魚種(石斑大於龍膽)
- 品質良好與營養均衡之餌料
- 使用疫苗
- 使用抗生素
- 減少病魚之散佈
- 水質管理與生物防治

抗生素使用

- 以下資料參考
- Oxytetracycline 50mg/kg
- 抗生素混合於飼料之中連續治療5天
- 使用抗生素需遵循「水產動物用藥品使用規範」

抗生素對於弧菌症有較佳治療效果

但

- 菌株產生抗藥性
- 公共衛生問題-可能殘留或對人醫療
- 食慾降低或不攝食



創傷弧菌的英文學名是 *Vibrio vulnificus* ， 又稱海洋弧菌

- 陳先生是一位四十一歲男性，身強力壯的慢性肝炎患者。日前北上探視父母，順道去海水魚塭抓魚，不慎被吳郭魚刺到，又被螃蟹夾到，真是禍不單行！當天患者就冒冷汗、視力模糊。
- 勉強開車返回自己家中，出現雙手腫脹、全身酸痛、發燒、畏寒！病人馬上來急診，身體上還出現許多大小不一，深紅色的硬塊。因敗血症的情形，立刻安排加護病房治療，強力抗生素伺候

石斑 龍膽 鏈球菌感染症

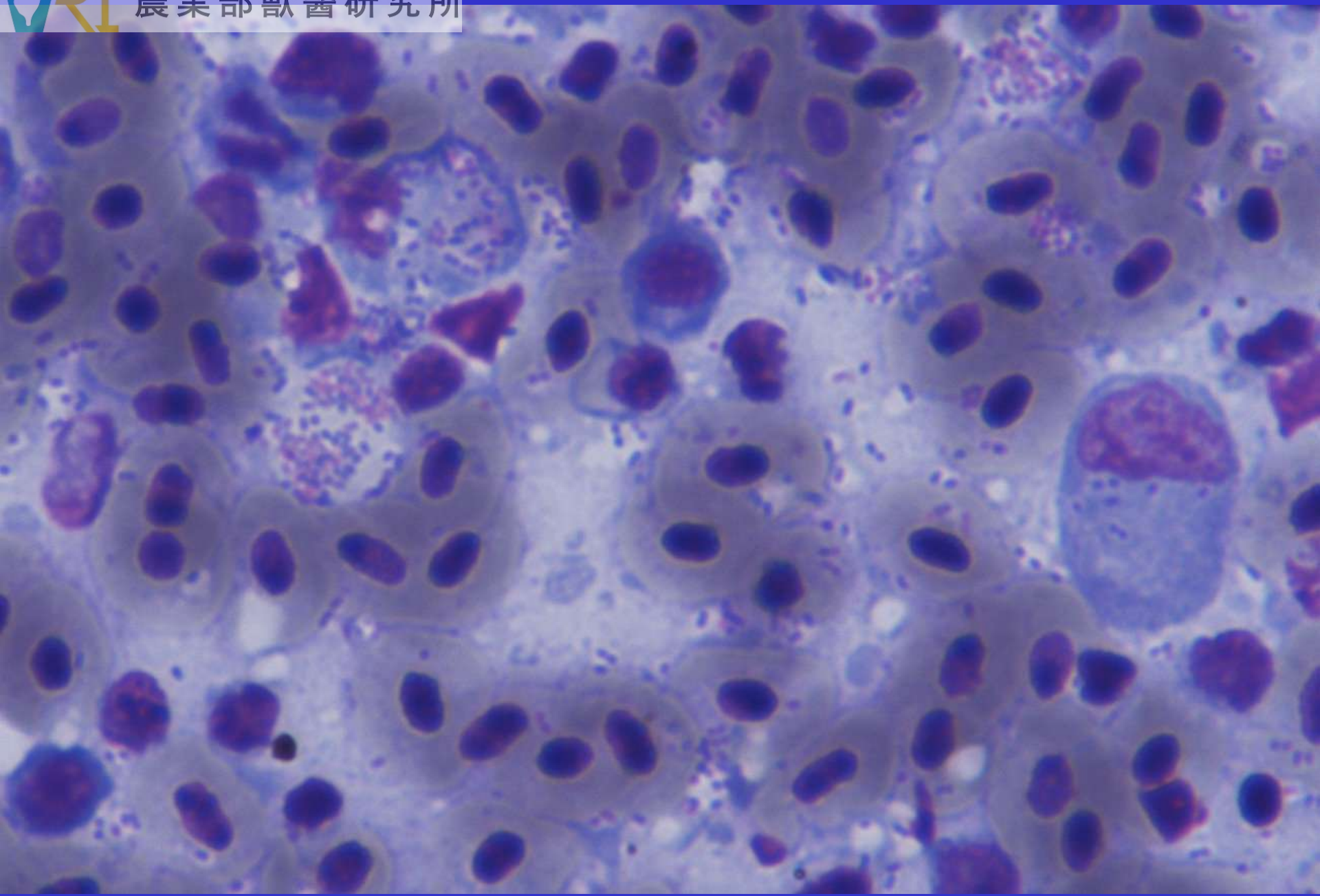
- 病例一：購入約1-2斤龍膽放養於鹽度1.0%之養殖池中，但其四週皆放養鱸魚(鏈球菌發病區):*Streptococcus iniae*
- 病例二：購入1-2斤之龍膽養於海水養殖池但池中有吳郭魚或使用可能感染鏈球菌之下雜魚
- 病例三：自行發病











龍膽以純海水養殖 池中不要混養可能帶鏈球菌之魚種如金目鱸 吳郭魚或其它之淡水養殖魚等



防 治

- 維持良好水質環境
- 選擇有效之抗生素 amoxicillin or erythromycin等
- 常會復發
- 注意停藥期

石斑魚虹彩病毒感染症

- 虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 的病毒最早在 1954 年由 Xeros 等人在蚊姥幼蟲 (*Tipula paludosa*) 體內發現 (Tidona *et al.*,) ,
- 被虹彩病毒重度感染的昆蟲幼蟲及離心後的病毒塊，會呈現因病毒顆粒結晶重的構造而折射出藍、綠色光澤因此命名之，其字首 *Irido-* 來自希臘文的 *Iris*，即為 “Greek goddess of the rainbow” 彩虹女神之意。

- 虹彩病毒科的病毒為直徑大小約120-350 nm的大型病毒 (Jeong *et al.*, 2006)，其型態為二十面體的結構。
- 大部分虹彩病毒科的病毒均具有三個主要的，包括二十面體的蛋白質外鞘 (capsid)、中間的脂質膜 (inner membrane) 及最內層的核蛋白 (nucleoprotein)。主要構成蛋白質外鞘的主要鞘蛋白 (major capsid protein, MCP) 約占病毒總蛋白質量的40%，其分子量約48~55 kDa左右

虹彩病毒分類(2005年以前)

- 4個屬 (genera) (Mao et al 1997)
 - *Iridovirus* (主要寄生於昆蟲如 invertebrate iridescent virus 6 ; IV6 或 chilo iridescent virus ; CIV).
 - *Chloriridovirus* (主要寄生於蚊子如 mosquito iridescent virus ; MIV).
 - *Ranavirus* (主要寄生於蛙類及魚類，如 frog virus 3 ; FV3).
 - *Lymphocystivirus* (為魚類之淋巴囊腫病如 flounder lymphocystis disease virus LCDV-1) .

- 根據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 的第八屆報告，將虹彩病毒科下分類成5個屬
- 虹彩病毒屬 (*Iridovirus*)
- 淋巴囊腫病毒屬 (*Lymphocystivirus*)
- 綠虹彩病毒屬 (*Chloriridovirus*)、
- 蛙病毒屬 (*Ranavirus*)
- 2005年才新成立的巨大細胞病毒屬 (*Megalocytivirus*)

- 其中虹彩病毒屬及綠虹彩病毒屬宿主以昆蟲為主，
- 淋巴囊病毒屬則主要感染低等的脊椎動物，如爬蟲類、兩棲類、魚類等。
- 但到近20年來因為發現其為多種商業上或生態上的重要兩棲類或魚類的病源，造成經濟及生態上的損失，才因此受到魚類病理學家、野生生物學家及生態學家的重視

淋巴囊腫病 (lymphocystis disease)

- 於1980's 之前，淋巴囊腫病 (lymphocystis disease) 是唯一被報導的魚類虹彩病毒感染症，主要引起魚類之皮膚病變。此感染造成被感染之皮膚之fibroblasts肥大(hypertrophy)而形成淋巴囊腫細胞 (lymphocystic cell)
- 例外: 金目鱸之LD 常造成大量死亡



魚類各臟器系統性感染 (systemic infections) 之虹彩病毒

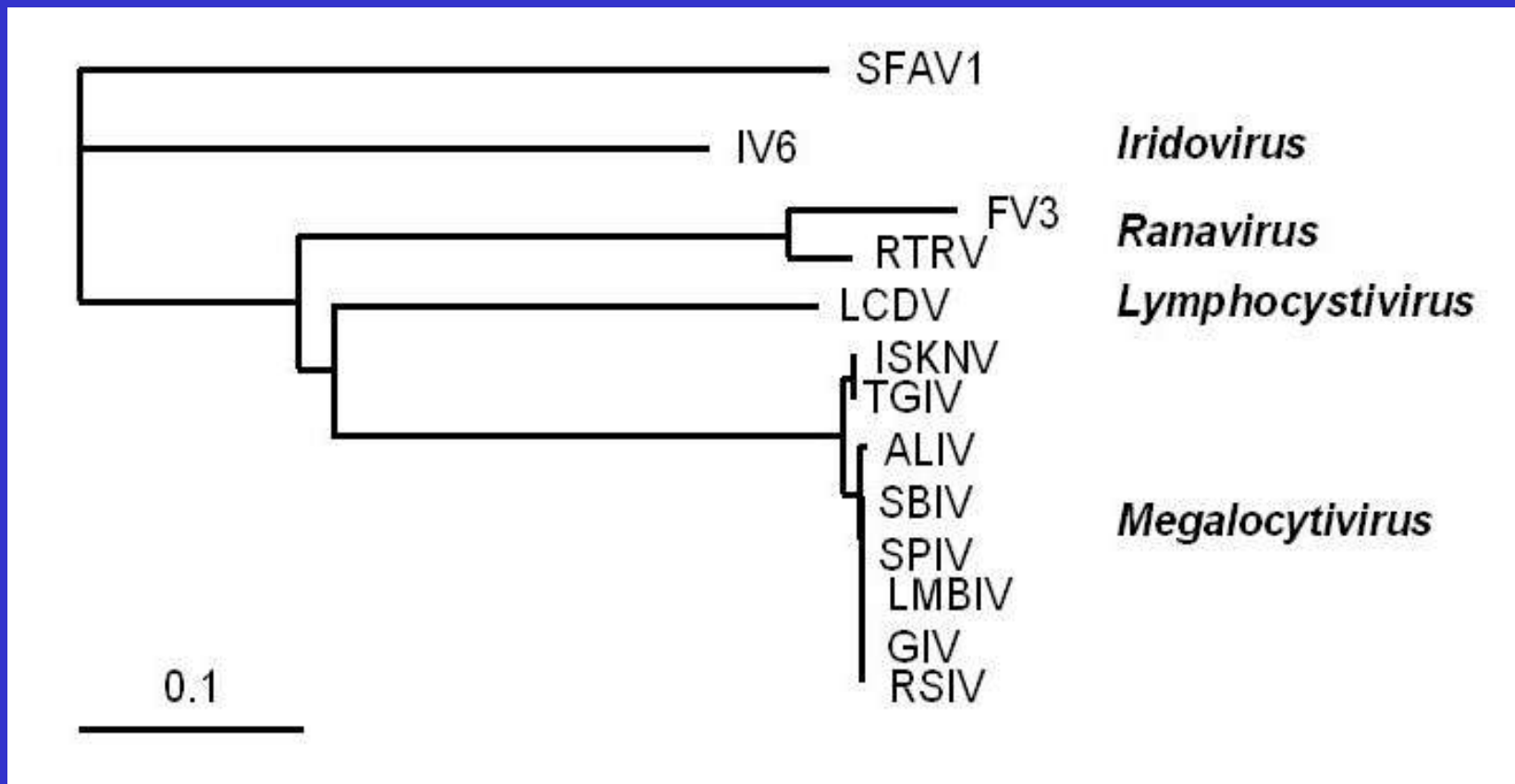
Ranavirus

- 1980's 中期
- 主要引起魚類造血組織之壞死 (haematopoietic necrosis)。這一類的病毒包括 catfish iridovirus (ECV), sheatfish iridovirus (ESV) 以及 epizootic haematopoietic necrosis virus (**EHNV**) (Langdon et al. 1986, 1988, Langdon and Humphrey 1987, Ahne et al. 1989, Pozet et al. 1992)。
- Herdrick et al. 1992 等人之研究顯示這些魚種所感染之虹彩病毒之間很相似，並與 frog virus 3 之間相似性也相當高，屬於 *Ranavirus*

Megalocyttivirus

- 1990年代起，另一型魚類虹彩病毒感染症開始在亞洲地區出現 (Inouye et al. 1992)
- 這一類型中最早出現者為red sea bream iridovirus(RSIV)
- 脾臟明顯腫大，各組織中除造成組織壞死外,同時出現巨大細胞 (Enlarged cells)
- RSIV, ISKNV, TGIV

Phylogenetic tree of iridoviruses, using amino acid sequences deduced from the 1208-bp ATPase gene DNA sequences. TGIV was clustered with all known cell hypertrophy iridoviruses, including the ISKNV, ALIV, SBIV, and RSIV. The TGIV and ISKNV form a separate group from ALIV, GIV, RSIV, and SBIV, which also form a separate group.



本省養殖確認感染虹彩病毒之魚種

- 石斑魚(grouper ; *Epinephelus* sp) 損失慘重
- 金目鱸(giant seaperch ; *Lates calcarifer*)損失慘重
- 加州鱸 (largemouth bass ; *Micropterus salmoides*)
- 龍膽石斑(king grouper ; *Epinephelus lanceolatus*)損失慘重
- 金錢魚(spotted butter fish ; *Scatophagus argus*)
- 紅衫(yellow-wax pomfrat; *Trachinotus blochii*)、
黃錫鯛(goldlined seabream *Sparus sarba*)
- 老鼠斑 (humpback grouper; *Chromileptes altivelis*)
- 銀紋笛鯛(Mangrove red snapper; *Lutjanus argentimaculatus*)

Megalocytivirus 疫情

- 29種魚種海水養殖魚類有感染虹彩病毒其中包括紅海鯛、多種石斑魚、鱸魚、海鱺、鸚歌魚、虎河魨等。顯示魚種間相交互傳播，已對養殖業造成嚴重之危害(Kawkami and Nakajima 2002)
- 桂花鱸Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) 於3-11月間發生大量死亡，其死亡甚至可達 100% (He et al 2000).
- 1993起於本省養殖之金目鱸及石斑魚,其幼魚常造成60-100%之死亡率. (Chao and Pang 1997)

- 以石斑魚為例，虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 中會造成魚類大量死亡有兩屬
- 蛙病毒屬 (*Ranavirus*)
- 巨大細胞病毒屬 (*Megalocytivirus*)
- 台灣爆發疫情 皆有

- 2000年於小琉球的養殖石斑中分離到被歸於蛙病毒屬的石斑虹彩病毒 (grouper iridovirus, GIV) (Lia *et al.*, 2000)。
- 巨大細胞病毒屬病毒則更早，1992年於澎湖的嘉鱸魚發現疑似病毒的存在 (周等, 1994)。之後，1997年Chao等人由高雄、台南及屏東縣等地區養殖的石斑魚

石斑魚虹彩病毒感染症

Taiwan grouper iridovirus(TGIV) infection disease

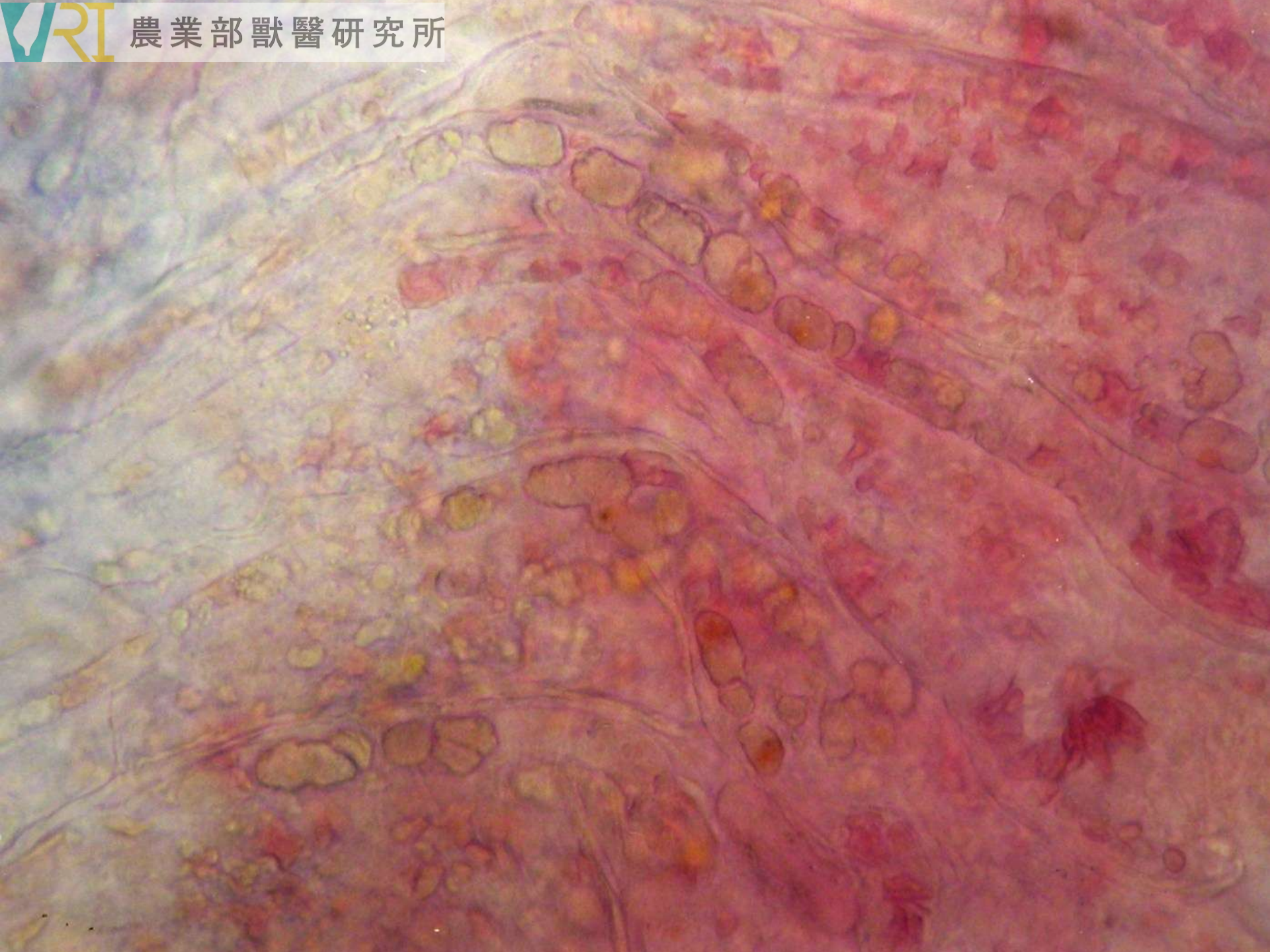
- 2-4吋大小的魚之感染率常達100 %，而致死率則在60 %以上
- 體表完好、體色變黑，鰓部於急性、亞急性期時常可見充、出血，於慢性期則可見鰓絲漸呈淡紅或甚至蒼白。脾臟明顯腫大約為正常魚的2-10倍
- 病魚鰓部壓片中，可發現鰓絲二級微血管內充滿巨大細胞(Enlarged cells)
- 脾、前腎、後腎、心、肝及鰓(gill)等臟器內出現大小不一的巨大細胞(Enlarged cells),但以脾,腎及鰓最多。這些細胞在H&E染色後有些為嗜酸性，有些為嗜鹼性

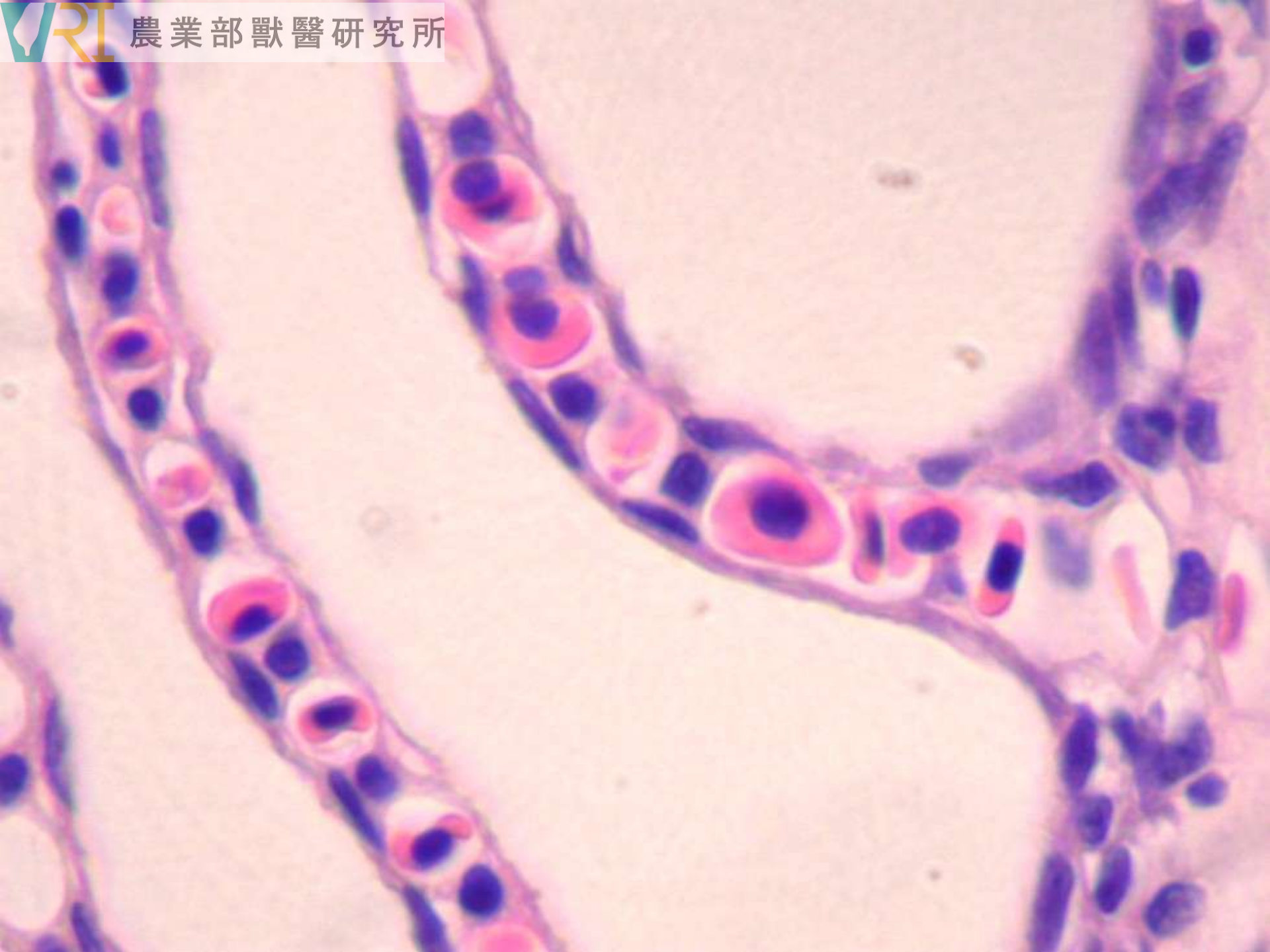




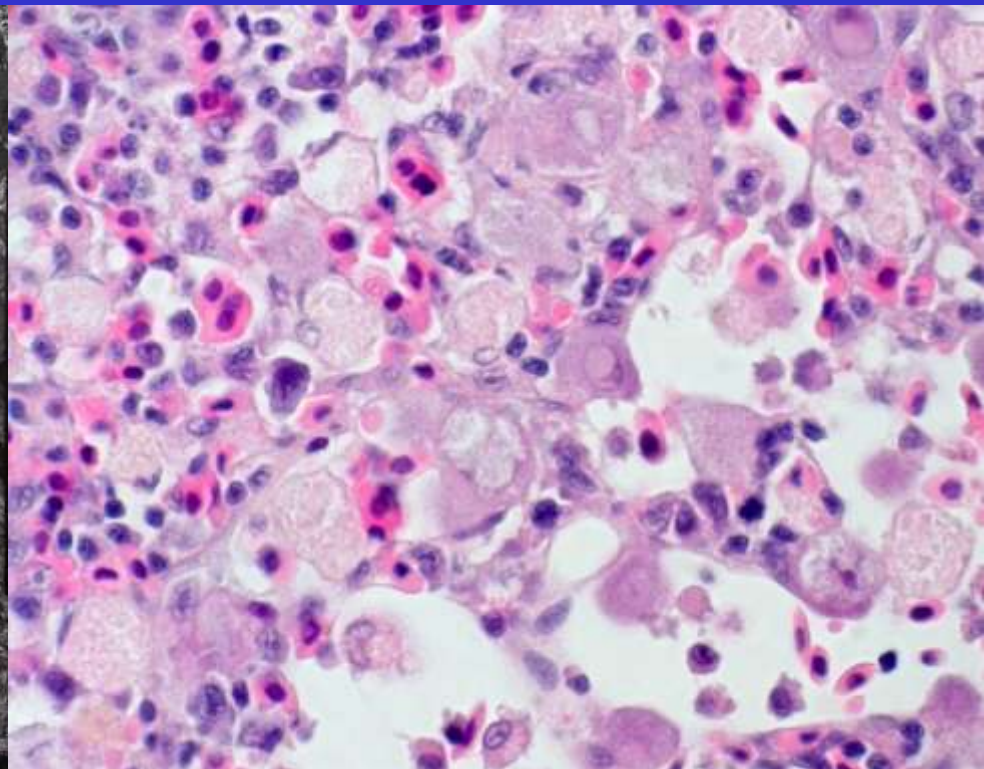
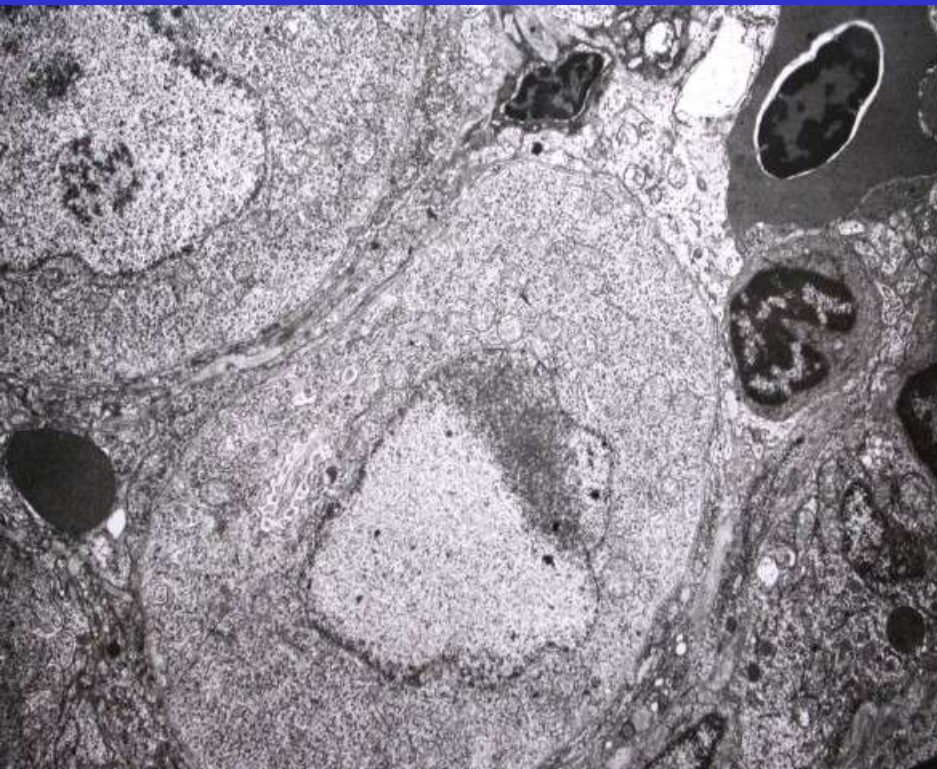




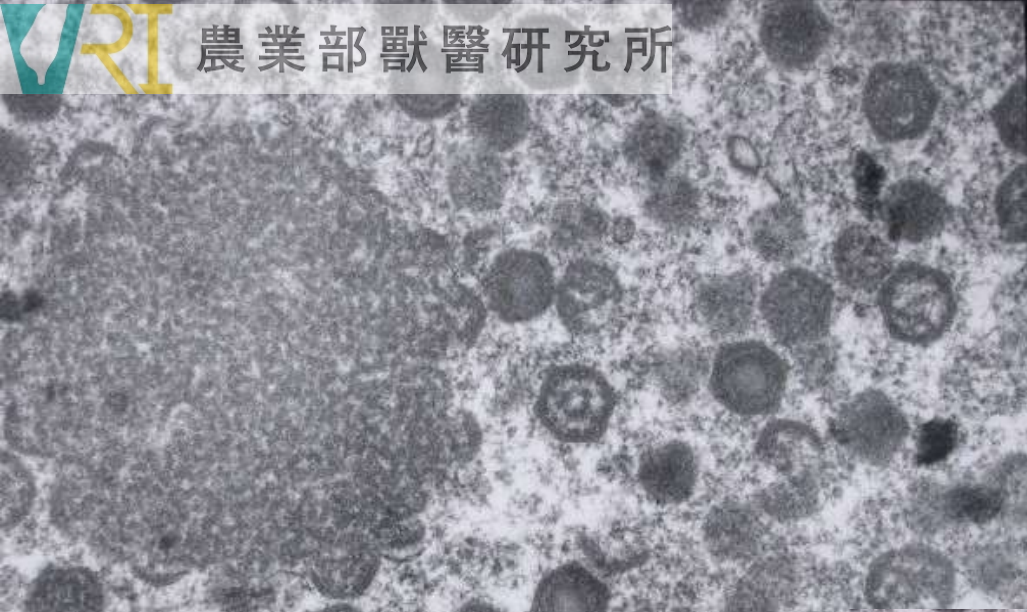




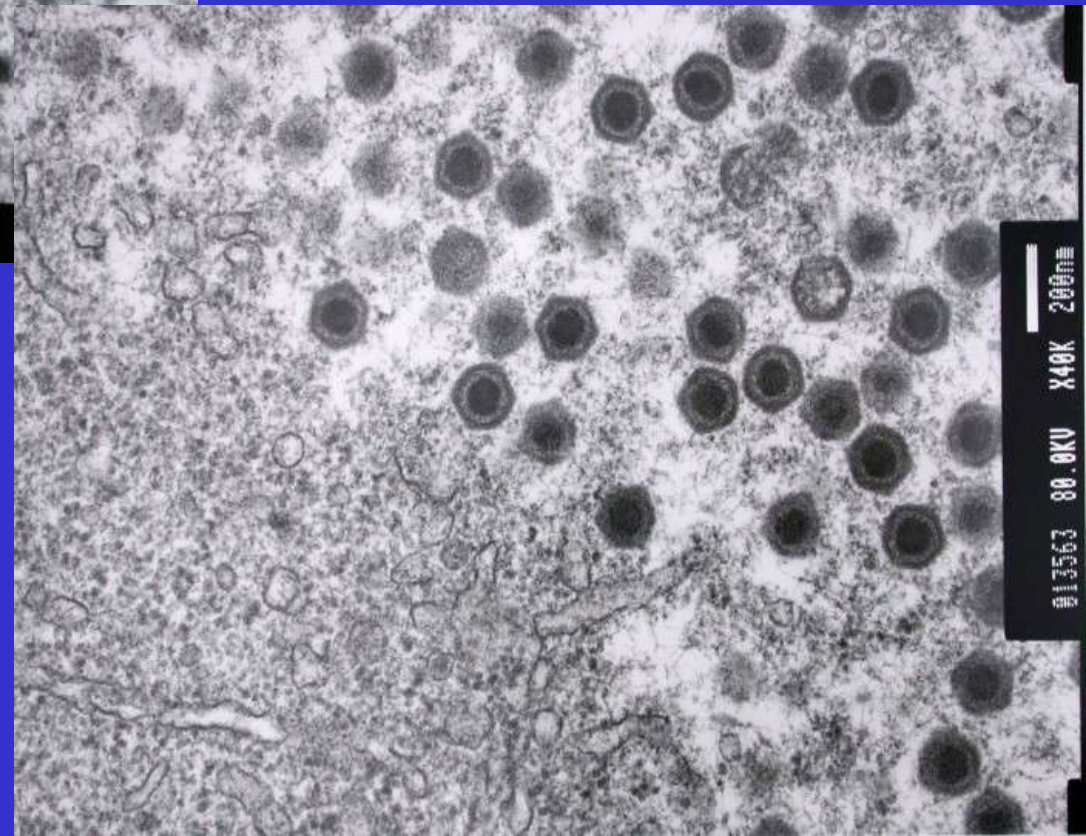




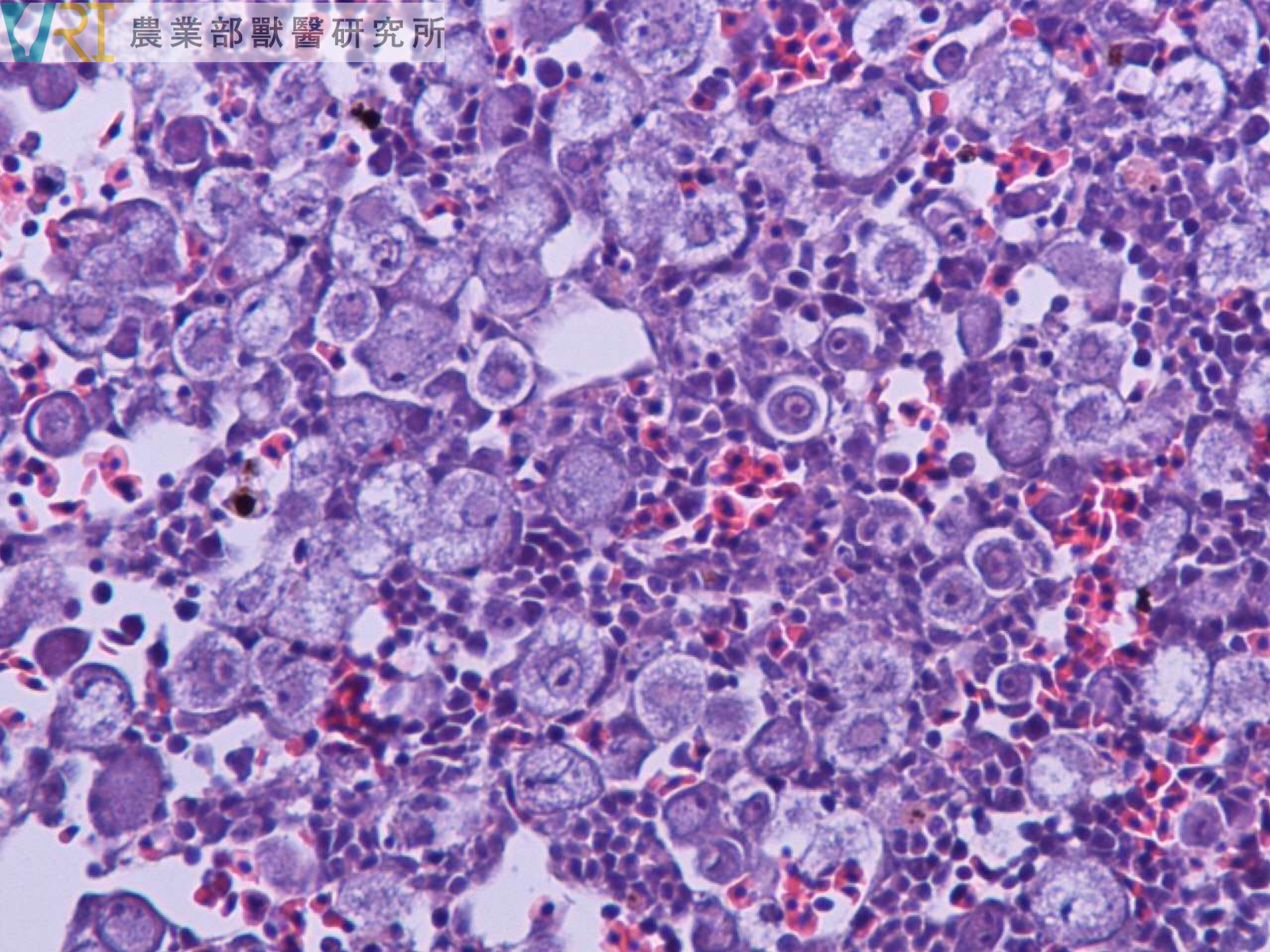
Basophilic enlarged cells



40kxZOOM 75kV16952
3/9, 1996 250nm

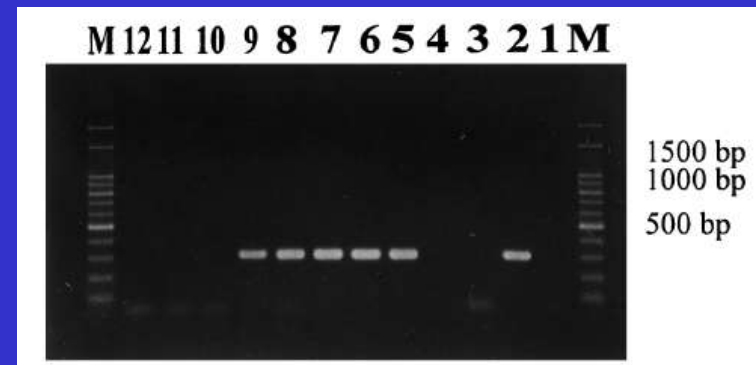
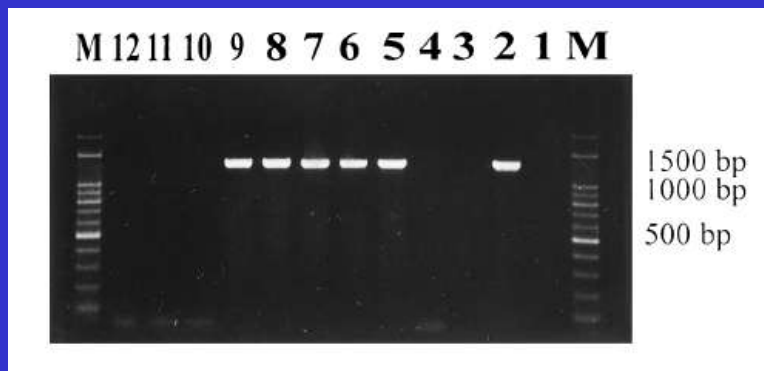


013553 80.0KV X40K 200nm



PCR

- A Nested PCR for the Detection of Grouper Iridovirus in Taiwan (TGIV) in Cultured Hybrid Grouper, Giant Seaperch, and Largemouth Bass *Journal of Aquatic Animal Health* 14:104–113, 2002




- CY15n-F, 5-gCC gCA AAT gAg CgA CCT AC-3
- CY15n-R, 5-gCg TgA gCg TCT TCT CgT CC-3
- RY16-F, 5-ggT ATA TgA gCA AgC gAT ggA C-3
- RY16-R, 5-Tgg gAg TgC CAT ACA ggA Tg-3
- **the condition of pcr**
- **94°C for 3 minutes And then for 30 cycles**
- **94°C 1 minutes 60°C 1 minutes 72°C 1 minutes**
- **And finally extension 72°C for 7 minutes**
- **Product 1339 The nest pcr 305bp**

腦神經壞死病毒

VER (viral encephalopathy and
retinopathy) or VNN
(viral nervous necrosis).





1吋至2.5吋石斑魚繁殖場(病原引入
可能由苗、餌料、海水、動物等)

- 台灣自1997開始多種海水養殖魚苗(尤其石斑魚)都有相似的疫情發生，造成種苗業者嚴重的經濟損失。如發生於孵化後十幾天到吋苗期間，損失尤其嚴重，其死亡率常60-100%間。
- 罹病魚苗會體色變深，食慾不振，迴旋打轉等病癥，數日後開始大量死亡。發病魚腦部及視網膜有嚴重空泡化現象，在病變的腦組織及視網膜細胞內會觀察到非常多的病毒顆粒。

Vnn

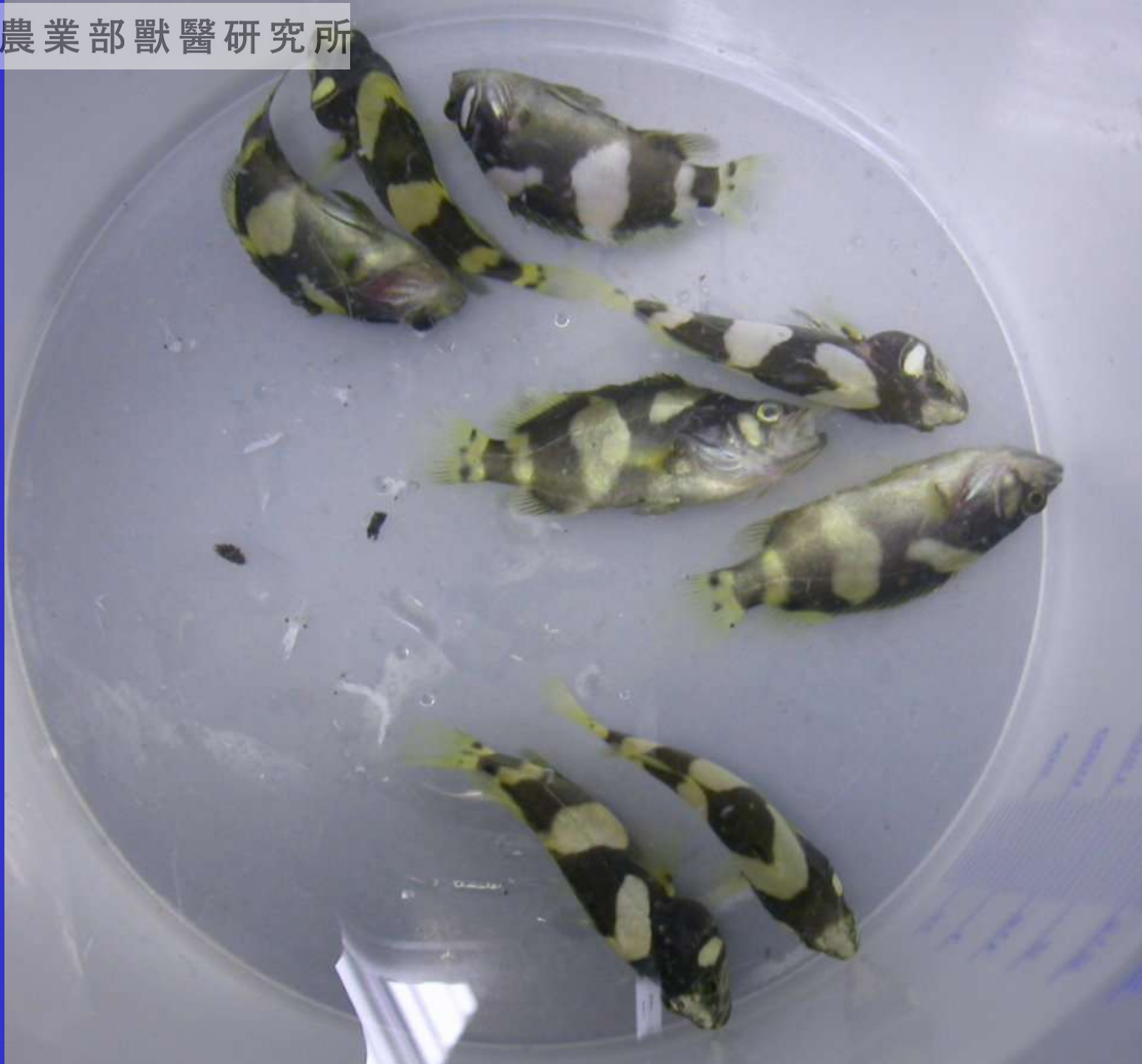
- 神經壞死症病毒(Nervous Necrosis Virus, NNV)在分類上屬於結病毒科 (*Nodaviridae*)，魚類結病毒屬(fish nodavirus 或稱 betanodavirus)。
- 基因序列(T4)，可分成striped jack (SJ) NNV、tiger puffer (TP) NNV、barfin flounder (BF) NNV，以及redspotted grouper (RG) NNV 四種基因所有台灣分離株皆屬於RGNNV基因型。

- 病毒性神經壞死感染症(Viral nervous necrosis) 是近年來在世界各地海水養殖魚類中新發現之病毒性疾病，造成許多魚苗及幼魚極高的死亡率於國外如Japanese parrotfish ; *Oplegnathus fasciatus*(Yoshikoshi et al.1990) barramundi ; *Lates calcarifer* Bloch (Glazebrook et al.1990) 、Striped jack ; *Pseudocaranx dentex* (Mori et al. 1992 ; Arimoto et al.1993), Japanese flounder ; *Paralichthys olivaceus* (Ngnyen et al. 1994) 。
- 另有研究至少已有超過32種以上之魚種受其感染並引發大量之死亡(Munday et al 2002) 。

- 於國內最早感染報告是1994年石斑魚 (*Epinephelus akaaya*)所發生。之後陸續於其它魚種如Chinese catfish ; *Parasilurus asotus* 、Humpback group ; *Cromileptes altivelis* 、海鱺、金目鱸、鰻魚及黃臘參等魚種(Chi et al 1997 2003)。
- 而在本區中則以石斑魚、海鱺、金目鱸、龍膽為害最深尤其幼苗階段。



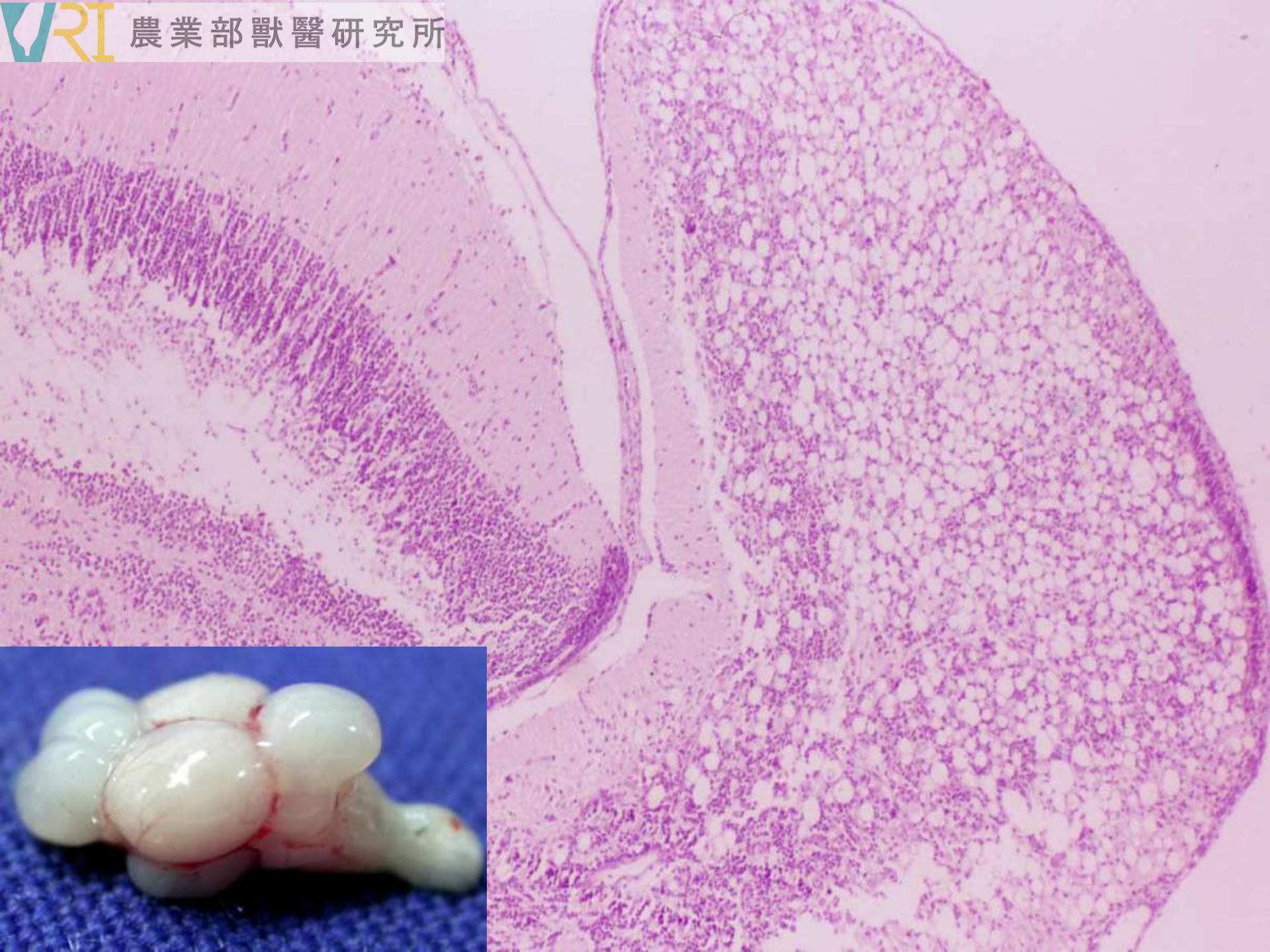


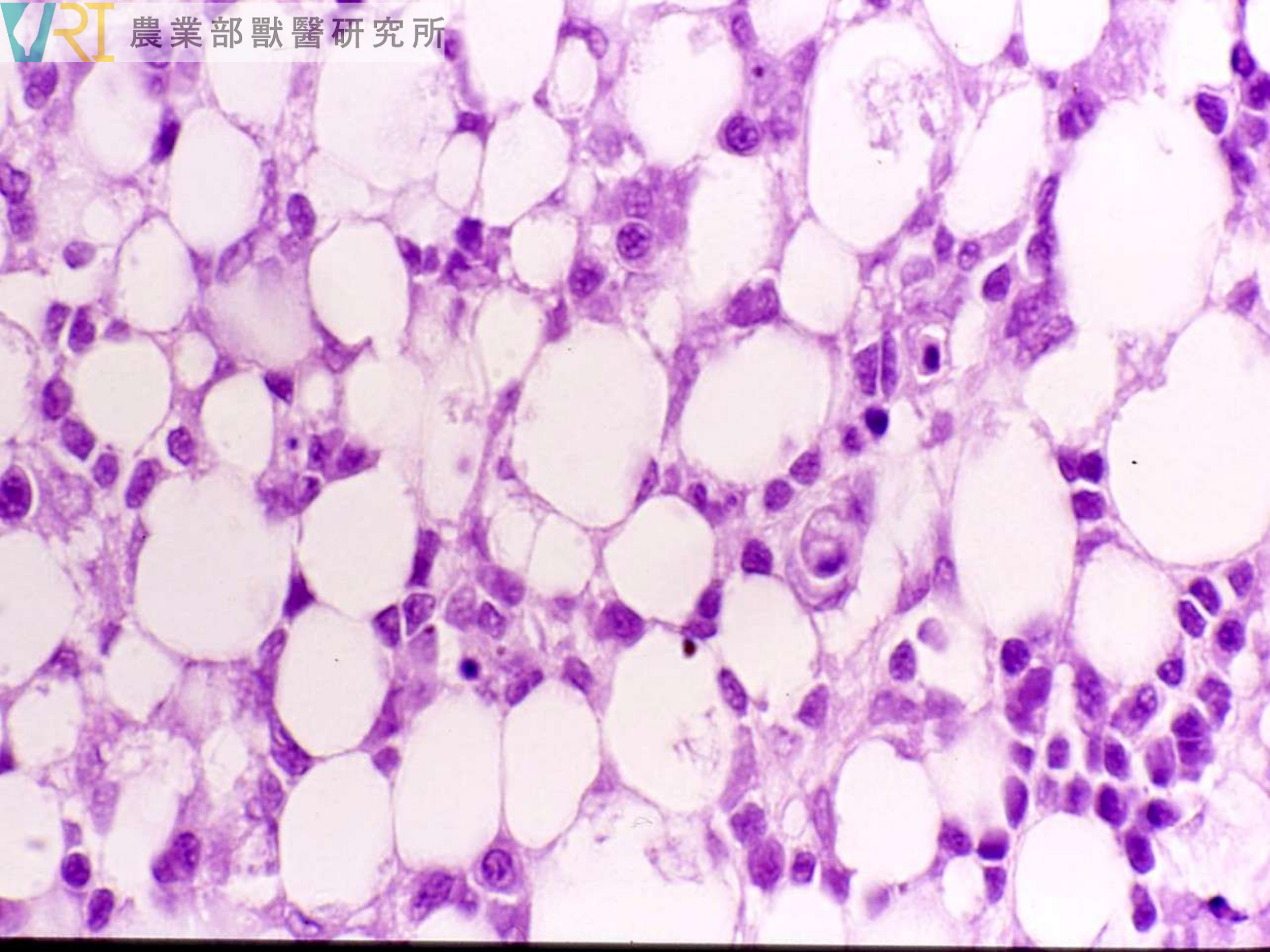


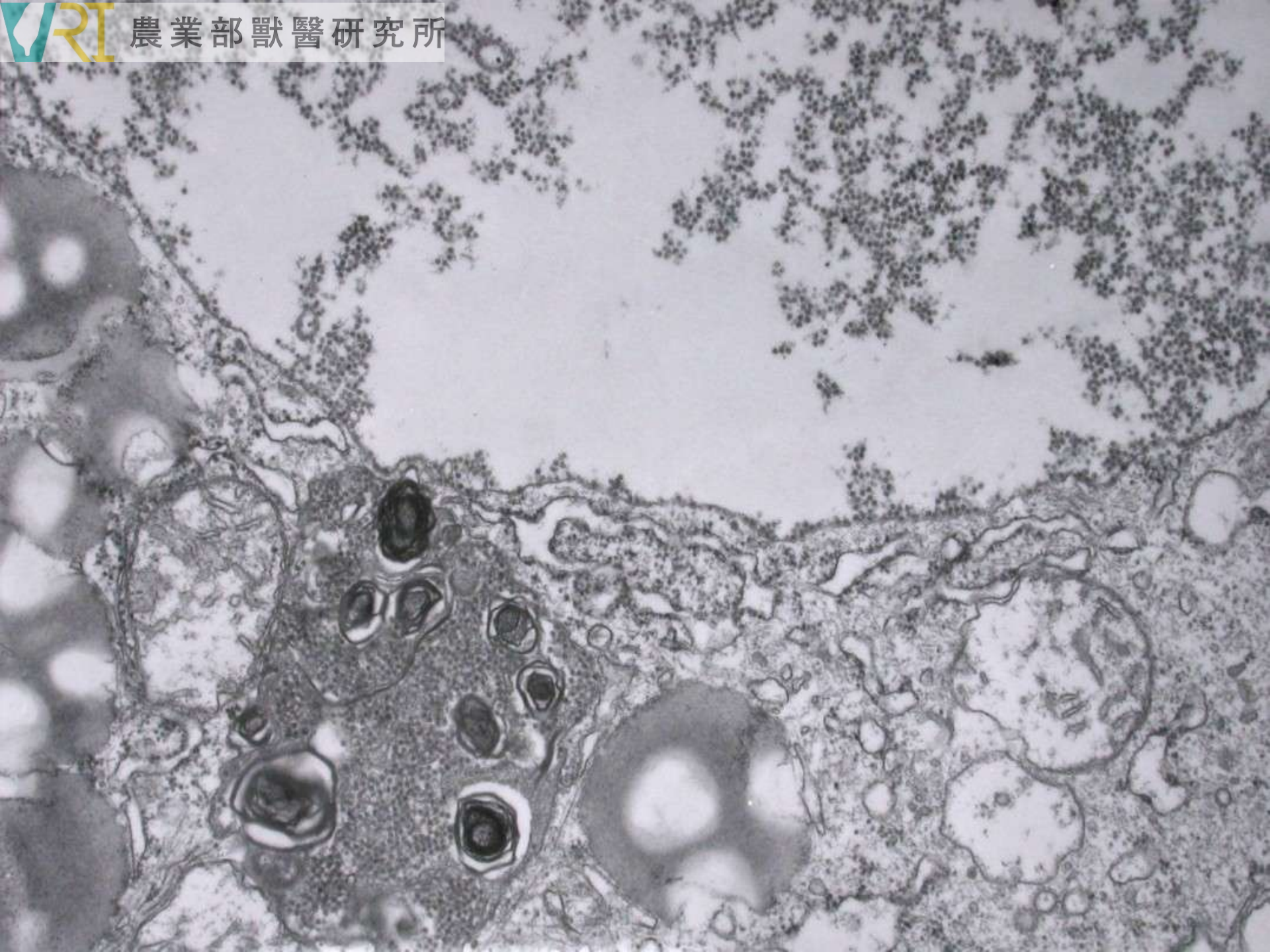


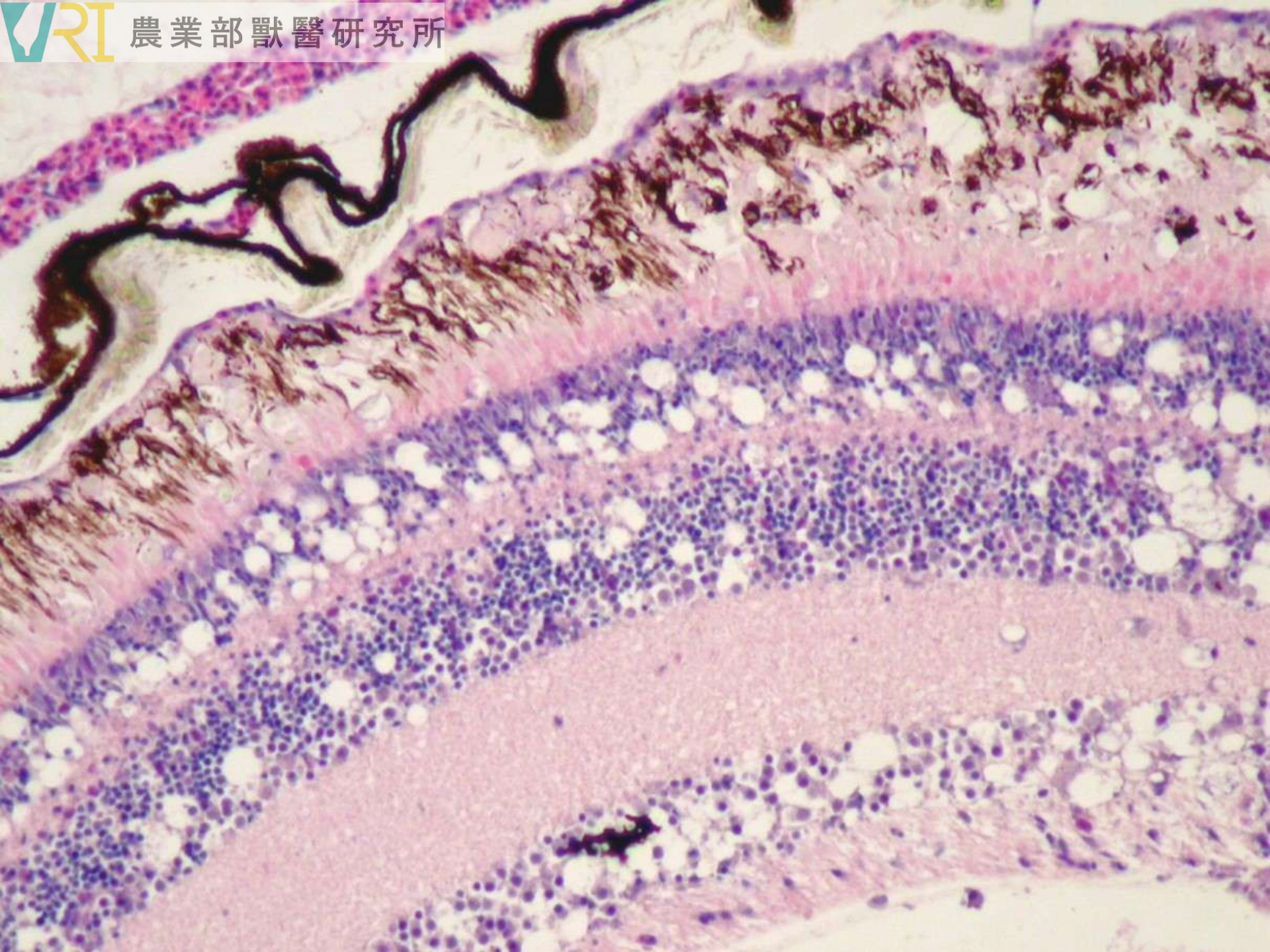


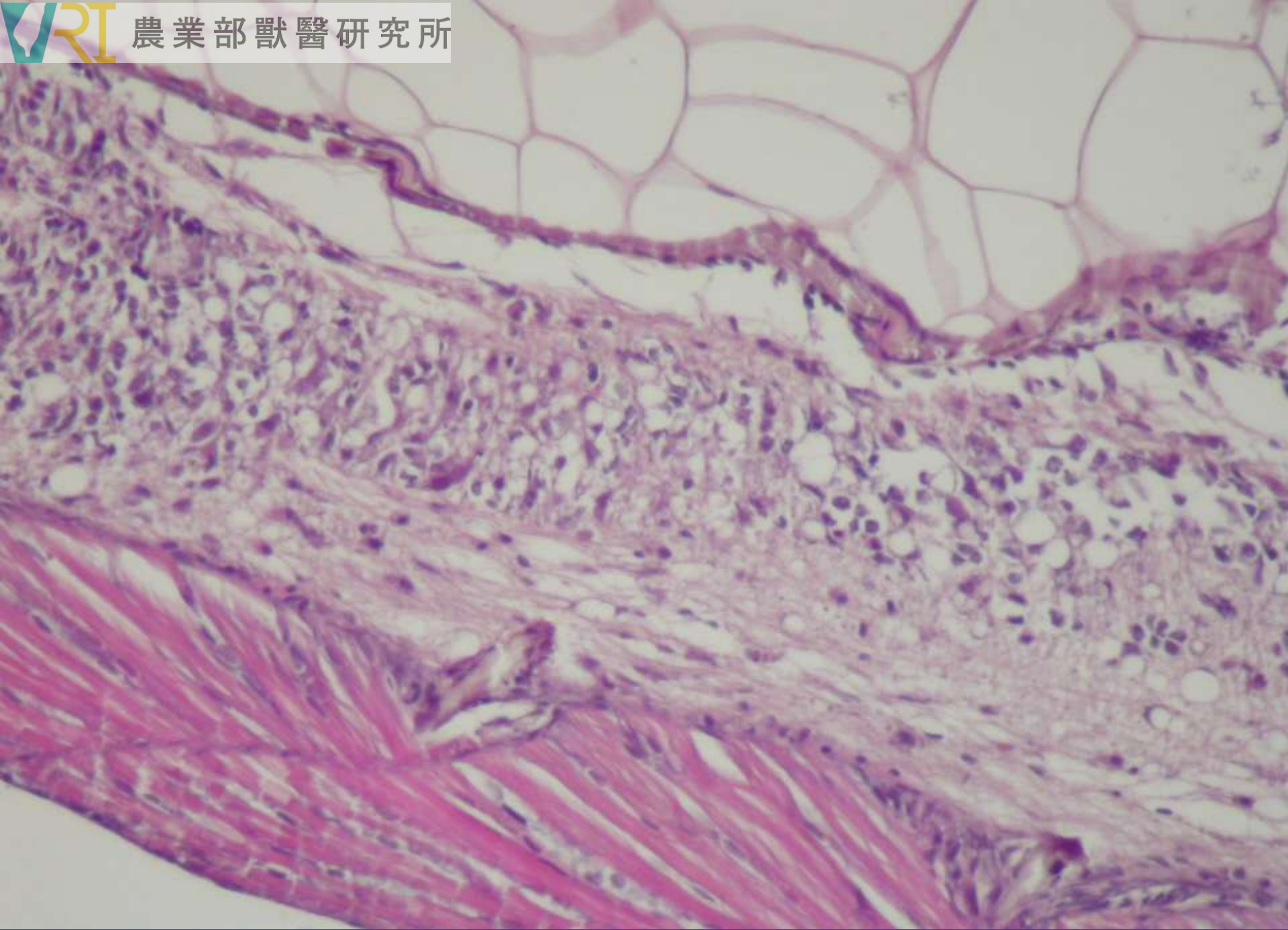












穿透式電子顯微鏡檢查

病毒顆粒為二十面體結構

不具有外套膜(envelope)

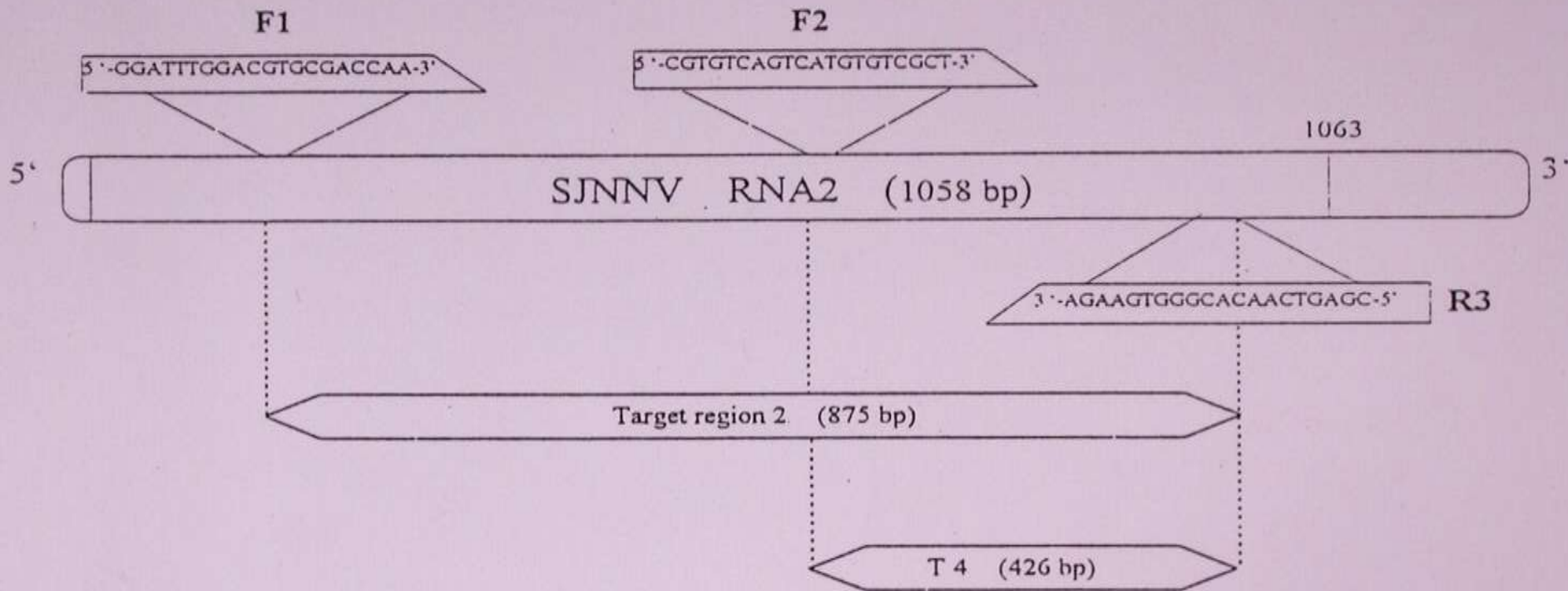
直徑約20-25nm

包涵體(inclusion body)結構

病毒顆粒常聚集在膜系胞器間

RT-PCR診斷

Nishizawa (1994) striped jack nervous necrosis (SJNNV) 診斷用引子



如使用日本SJNNV (Nishizawa et al.1994) 使用之引子對增幅RNA2 中之片段。F1、R3 為out primer sets 可自NNV 中增幅一875bp 之產物，如使用F2、R3為 inner primer set 可增幅一段426bp 大小之產物。

F1 : 5' GGA TTT GGA CGT GCG ACC AA 3'

F2 : 5' CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT 3'

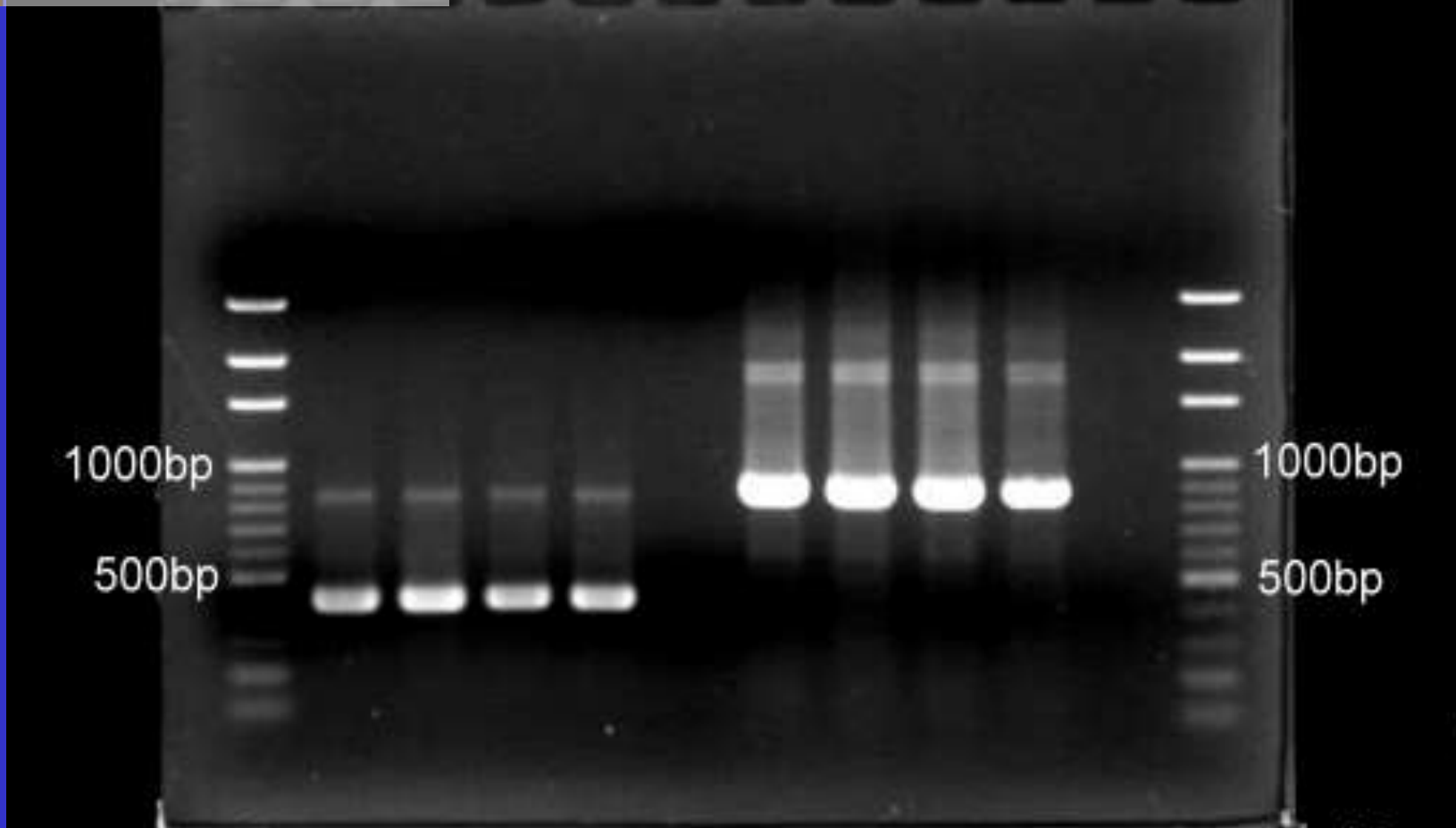
R3 : 5' AGA AGT GGG CAC AAC TGA GC 3'

如引用常發生於本區之AF245004 (GenBank accession number)Dragon nervous necrosis virus coat protein gene, complete cds則建議適度修改如下以增加靈敏度。

F1 : 5' GGA TTT GGA CGT GGG ACC AA 3'

gF2 : 5' CGT GTC AGT GCT GTG TCG CT 3'

gR3 : 5' CGA GTC AAC CCT GGT GCA GA 3'



M : 100bp ladder

lane 1、6 negative control

lane(2、7) 93037(鱸魚)

lane(3、8)93u362(石斑魚)

lane(4、9)93u626(石斑魚)

lane(5、10)龍膽石斑。

魚病研究 *Fish Pathology*, 42 (3), 163–165, 2007. 9

Distribution of Nervous Necrosis Virus in Orange-Spotted Grouper *Epinephelus coioides* with Asymptomatic Infection

Ikunari Kiryu^{1,2*}, Leobert D. de la Peña³
and Yukio Maeno⁴

¹*Fisheries Division, Japan International Research Center
for Agricultural Sciences, Tsukuba,
Ibaraki 305-8686, Japan*

²*National Research Institute of Aquaculture,
Fisheries Research Agency, Minami-Ise,
Mie 516-0193, Japan*

³*Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries
Development, Center Tigbauan 5021,*

affected fish
(VNN)¹⁾. S
quently and
tated.

This cri
parrot fish
quently, it h
fish in a nu
nervous ne
family Noda
acids and st
sion is the r
the vertical
fish to the
route^{3,5)}. H
regarding fi
study, syst
asymptoma

- Distribution of nervous necrosis virus in asymptotically infected orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* was determined by PCR assay in this study.
- Fourteen different tissues and organs were collected from apparently healthy groupershowever,
- all the broodstock and juveniles were positive by nested pcr test except for one juvenile.

Journal of Fish Diseases 2004, 27, 603–608
PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and
wild marine fish with no clinical signs

- Primer Nucleotide sequence
- Nucleotide position in SGNNV RNA2
- BNV-RTa 5-GTG CCM RCH GGC AGC ARR ATY TG-3 990–1012
- BNV-UR1 5-CGD GGY TGC KSR TCR GAR TAR TA-3 968–988
- BNV-UF1 5-CAA CTG ACA RCG AYC ACA CCT TCG-3 418–441
- BNV-UR2 5-TGC CAR TAV ACR GCM CGK TCV ACR TC-3 843–868
- BNV-UF2 5-THC AAG CRA CTC GYG GTG C-3 448–466

處理控制及預防

- 發病魚池減少緊迫如減少換池，水質維持穩定並適度供餌。
- 病死魚應妥善處理以減少疾病之傳播。
- 選購無帶病毒之魚卵、魚苗放養。
- 選擇無帶病毒之餌料(如橈腳類)或使用人工飼料。
- 繁養殖場之自身防疫。
- 野鳥及海蟑螂等機械傳播之媒介。

- 羅(1997)中研究曾使用碘消毒帶病毒之魚卵結果消毒過之魚卵進行PCR檢測時仍可測到NNV。但於Gindre (2002) 研究中使用ozonated 消毒Atlantic halibut ; *Hippoglossus hippoglossus* 之魚卵可不活化病毒。防止本病之發生最有效之方法為不要接觸到病毒，因此購卵及苗前之健康檢察將可降低NNV對於養殖業者資源浪費及損失。

- 台灣大學陳秀男教授，用NNV 死毒疫苗免疫雞，製造含抗NNV 抗體的雞蛋，然後將雞蛋加入餌料中，餵食魚苗，結果能提升魚苗抗病毒的能力。
- 多醣體可以激發非專一性的免疫力，所以將多醣體混入人工餌料中，餵食石斑苗，結果對提升石斑苗抗病毒能力也很有幫助。
- 中研院張繼堯博士則選殖了NNV 單源抗體的基因，利用基因工程的方式來大量生產此抗體，可降低抗體的生產成本；當NNV 單源抗體的基因轉殖魚細胞，魚細胞會表現NNV 抗體來抵抗NNV 感染