

養殖淡水長臂大蝦結病毒及附屬 超小病毒顆粒之研究

張瑞昕¹、蕭孟仁¹、王俊順¹、陳秀男²

¹國立高雄大學生命科學系

²國立台灣大學漁業科學研究所

一、前言

淡水長臂大蝦(*Macrobrachium rosenbergii*)為臺灣重要的養殖種類之一，根據政府的漁業年報顯示：2004年在臺灣的養殖面積約2528公頃；產量10039公噸，僅次於白蝦；產值約新台幣30億，高於白蝦產值新台幣10億以上，由於淡水長臂大蝦為一高經濟價值的水產物種，採取集約式的養殖，因此傳染性疾病的問題隨之而起，進而造成養殖業者的經濟損失，並影響此項產業的發展，目前已知臺灣養殖淡水長臂大蝦的疾病包括：(1)蝦苗階段-淡水長臂大蝦結病毒(*M. rosenbergii* nodavirus; MrNV)及附屬超小病毒顆粒(Extra small virus particle; XSV)的感染所造成的白尾病(White Tail Disease; WTD)及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、螢光弧菌(*Vibrio harveyi*)等所造成的弧菌病(Vibriosis)(Anas *et al.*, 2005)；(2)成蝦養殖階段-乳酸鏈球菌(*Lactococcus graviae*)所造成的肌肉白濁症(Cheng *et al.*, 1998)；酵母菌(Yeast)所引起的黃肝病(Chen *et al.*, 2003)及推測由細菌所造成的軟殼症。由於水產動物的病毒性疾病目前尚無適當的藥物可以防治，只能依賴檢驗的方式以防止病原散佈及疫情的擴大，因此本文僅就淡水長臂大蝦結病毒及附屬超小病毒顆粒做一介紹，期能對防治淡水長臂大蝦蝦苗的白尾病有所助益。

二、流行疫情

自1992年起，臺灣南部淡水長臂大蝦繁殖場的後期幼蟲蝦

苗常傳出大量死亡的疫情，病蝦呈現游泳緩慢，喜好攀附水中隱蔽物，如水草、水中之傘網，行動遲緩，成長停頓及腹部肌肉白濁的病徵，業者稱為白尾病(WTD) (照片一)，病蝦大多於發病後兩個星期內死亡，極少數存活超過一個月，發病的池子死亡率達50%-90%，造成嚴重的經濟損失。Tung等人以組織病理切片及電子顯微鏡的觀察，推測23-26 nm的二十面體病毒為其病原，並將之命名為淡水長臂大蝦肌肉壞死病毒(Macrobrachium muscle virus; MMV) (Tung *et al.*, 1999)。相對於台灣的疫情，在1995年，法屬哥德洛普島發現了第一個淡水長臂大蝦白尾病的案例，接著馬丁尼克島也發生白尾病的疫情。而在中國大陸、印度、泰國及法屬西印度群島等地的淡水長臂大蝦繁殖場也陸續傳出有白尾病的疫情(Arcier *et al.*, 1999; Shekhar *et al.*, 2006)，主要感染為後期幼蟲(Postlarvae)階段，在發病的2-3天內，其累積死亡率可高達100%，臨床症狀顯示為蝦體尾部肌肉區域同樣呈現白濁的現象。

三、病理特徵及電子顯微鏡的觀察

罹患白尾病的淡水長臂大蝦，在病理組織切片的觀察下可看見蝦體內的肌肉病變部位發生血球浸潤，肌肉細胞核不正常增生及聚集，並出現核腫大、染色質外移的現象，同時病變的肌肉組織可發現病毒的包含體(Inclusion body) (Tung *et al.*, 1999)。電子顯微鏡觀察方面，在病變肌肉部分上有腫大的粒腺體，消失的肌漿膜，多層膜之粒腺體，以及退化消失之肌纖維。此外病變細胞的細胞質中發現有兩種大小不同的病毒顆粒，其中較大的病毒顆粒，不含外套膜、二十面體、直徑大小約26-27 nm，命名為淡水長臂大蝦結病毒(*M. rosenbergii* nodavirus; MrNV)，另一種較小的病毒，直徑約14-16 nm，亦不含外套膜，二十面體，命名為超小病毒顆粒(Extra small virus particle; XSV) (Qian *et al.*, 2003)，此兩種病毒究竟何者造成淡水長臂大蝦蝦苗產生肌肉白濁的病癥尚不清楚，但目前研究顯示XSV可能為一種隨體病毒(Satellite virus)，必須依賴MrNV才能在細胞內複製(Sri Widada and Bonami., 2004a)。

四、病毒特性

將罹患白尾病的病蝦組織研磨，利用氯化銨濃度梯度離心法，可順利的純化此兩種病毒，淡水長臂大蝦結病毒的密度介於1.258-1.358 g/mL，病毒直徑約27 nm，核酸分析顯示MrNV病毒內含兩段的ssRNA (RNA-1及RNA-2)，大小分別約為2900 bp及1260 bp，其中RNA-1可轉譯病毒的RNA-dependent RNA polymerase，而RNA-2可轉譯一個43 kDa的病毒鞘蛋白；超小病毒顆粒(Extra small virus; XSV)的密度介於1.325 g/mL，病毒直徑約15 nm，病毒的核酸成分只有一段RNA，大小約796 bp，序列3'端有一短的poly(A)尾巴，可轉譯一個17 kDa以及一個16 kDa的病毒結構蛋白，至於其對蝦體的影響則需進一步的研究(Bonami *et al.*, 2005)。

五、病原性實驗

利用500-1000倍稀釋的白尾病病蝦組織研磨液感染健康的淡水長臂大蝦，在感染12-14天後，蝦苗的累積死亡率可達100%，相同的感染實驗並未對成蝦造成死亡，但利用反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)的方式分別檢測感染病蝦的各個部位，可發現在病蝦的血淋巴(Hemolymph)、鰓(Gill tissue)、心臟(Heart)、胃(Stomach)、頭肌(Head muscle)、腹肌(Abdominal muscle)、尾肌(Tail muscle)、卵巢(Ovary)、腸道組織(Intestine)、泳足(Pleopod)均可偵測到病毒的RNA (Sahul Hameed *et al.*, 2004)。Sudhakaran等人將白尾病病蝦組織研磨液以肌肉注射及餵食的方式分別感染印度對蝦、斑節蝦及草蝦，結果並未造成任何死亡的情形，但以RT-PCR的方法可檢驗到此三種對蝦的鰓、肌肉、胃、腸道及血淋巴有MrNV及XSV的感染，如將此三種對蝦的組織研磨液以水浴的方式感染健康的淡水長臂大蝦蝦苗，結果可造成100%的死亡率，顯示雖然MrNV及XSV不會對此三種對蝦造成影響，但可以對蝦做為儲存寄主，同時保存病毒的致病性(Sudhakaran *et al.*, 2006a)。同時有研究顯示以MrNV及XSV感染豐年蝦(*Artemia*)，有相同的實驗結果，因此，豐年蝦亦可能為此兩種病毒傳播的一種載體(Vector)

(Sudhakaran *et al.*, 2006b)。

六、檢驗方法

(A) 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)為一靈敏、快速檢測病毒的方法，其檢驗過程如下：將病蝦組織以TRIZol進行研磨，進而進行RNA的萃取，以萃取所得Total RNA (含組織RNA及病毒RNA)作為模板，以淡水長臂大蝦結病毒(*M. rosenbergii* nodavirus; *MrNV*)之專一性引子(Primer)先合成cDNA，再以PCR的方式複製病毒的核酸片段，反應產物以1.5%洋菜膠電泳分析檢驗。

目前已有多組檢驗*MrNV*及*XSV*的專一性引子，如Sri Widada等人發展一套專一性引子

*MrNV*2aF：5'-GCGTTATAGATGGCACAAGG-3'，

*MrNV*2aR：5'-AGCTGTGAAA CTTCAACTGG-3'，

可以成功檢測出*MrNV*病毒，其檢測靈敏度可以達到0.25 fg RNA (Sahul Hameed *et al.*, 2004) (圖一)；而檢測*XSV*病毒方面，其靈敏度可以達到5 fg RNA (Sri Widada *et al.*, 2004b)。

(B) Multiplex RT-PCR

同時利用*MrNV*及*XSV*的專一性引子進行RT-PCR，可以同時檢測是否有*MrNV*和*XSV*共同感染的現象，利用此方式檢驗靈敏度可以達到25 fg (Yoganandhan *et al.*, 2005)。而Tripathy等人利用此兩種病毒的鞘蛋白基因序列設計專一性引子，以相同的技術檢驗*MrNV*及*XSV*，其靈敏度可以達到1 fg RNA，同時可在7-9小時完成檢測(Tripathy *et al.*, 2006)。

(C) 點墨雜交(Dot blot hybridization)

利用PCR的方法，將MrNV以及XSV此兩個病毒的片段基因以DIG標誌製成檢驗探針，將病蝦抽取出的核酸結合在NC membrane上，以標誌探針進行點墨雜交反應(Dot blot hybridization)，可確認病蝦中體內是否含有白尾病毒(MrNV)以及超小病毒顆粒(XSV)，利用此檢測方法其靈敏度可達2.5 pg病毒RNA (Sri Widada *et al.*, 2004b)。(圖二、圖三)

(D) 原位雜交(*In situ* hybridization)

將MrNV病毒的DIG標誌檢驗探針，對病蝦的病理組織切片進行原位雜交反應(*in situ* hybridization)，可得知病毒感染的部位，也可確認蝦體各器官對此兩種病毒的感受性。Sri Widada等人利用此方法偵測MrNV的感染器官，結果顯示橫紋肌為病毒感染的主要器官，病蝦的肝、胰臟、表皮組織及消化道上皮細胞皆沒有受到病毒感染的現象(Sri Widada *et al.*, 2003)。

(E) 酵素連結免疫吸附分析(Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA)

將MrNV病毒顆粒以蔗糖濃度梯度離心法進行純化，注射到老鼠體內製成抗MrNV之多株抗體(Polyclonal antibodies)，以此多株抗體之IgG作為1級抗體，再以連接peroxidase之抗老鼠IgG的抗體作為2級抗體，以Sandwich ELISA進行MrNV的偵測，結果可得其靈敏度為10 µg病蝦組織蛋白/mL (Romestand *et al.*, 2003)。

七、預防與控制

目前針對淡水長臂大蝦結病毒(*M. rosenbergii* nodavirus; MrNV)以及超小病毒顆粒(Extra small virus particle; XSV)並沒有疫苗或免疫方面的防治方法，同時亦無抗病毒藥物可供使用，只能夠採取預防感染的措施，包括養蝦池之池底及池壁定時清理、消毒及曝曬，母蝦產卵及蝦子幼苗養殖用的海水必須先經過消毒，加強養

殖的管理，水質的控制、及蝦子飼料營養的補充等。在引進母蝦進行繁殖時，可以利用隨機取樣進行反轉錄聚合酶連鎖反應來檢測母蝦是否有帶原的情形，以減少母蝦將病毒傳染至剛孵出的幼苗。此外，蝦體的免疫系統主要是非專一性的細胞免疫，可以利用浸泡，飼料添加多醣體的方式來增加蝦子抗病毒的能力，利用益生菌改善繁殖環境亦可獲得相當的效果。

參考文獻

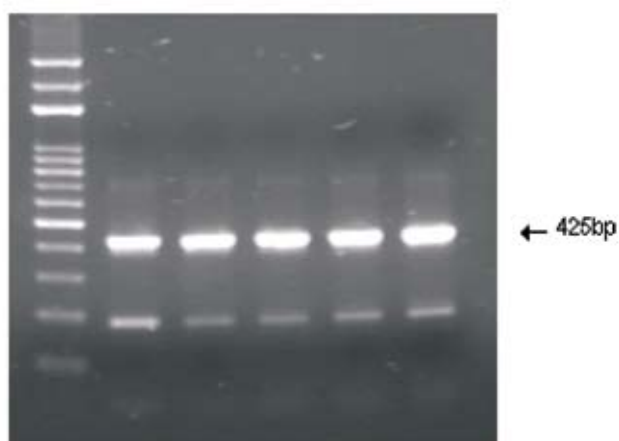
- Anas A., Paul S., Jayaprakash N. S., Philip R. and Bright Singh I. S. (2005) Antimicrobial activity of chitosan against vibrios from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* larval rearing systems. *Diseases of Aquatic Organisms* 67, 177-179.
- Arcier J. M., Herman F., Lighter D. V., Redman R. M., Mari J. & Bonami J. R. (1999) A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 177-181.
- Bonami J. R., Shi Z., Qian D. & Sri Widada J. (2005) White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *Journal of Fish Diseases* 28, 23-31.
- Chen S. C., Chen T. H., Wang P. C., Chen Y. C., Haung J. P., Lin Y. D., Chaug H. C. and Liaw L. L. (2003) Metschnikowia bicuspidate and Enterococcus faecium coinfection in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 55, 161-167.
- Cheng W. and Chen J. C. (1998) Isolation and characterization of an Enterococcus-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 34, 93-101.

- Qian D., Shi Z., Zhang S., Cao Z., Liu W., Li L., Xie Y., Cambournac I. & Bonami J. R. (2003) Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle diseases in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fish Diseases* 26, 521-527.
- Romestand B. & Bonami J.R. (2003) A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de man). *Journal of Fish Diseases* 26, 71-75.
- Sahul Hameed A. S., Yoganandhan K., Sri Widada J. & Bonami J. R. (2004) Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail diseases of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture* 238, 127-133.
- Shekhar M. S., Azad I. S. & Jithendran K. P. (2006) RT-PCR and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: Indian isolate. *Aquaculture* 252, 128-132.
- Sri Widada J., Durand S., Cambournac I., Qian D., Shi Z., Dejonghe E., Richard V. & Bonami J. R. (2003) Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases* 26, 583-590.
- Sri Widada J. & Bonami J. R. (2004a) Characteristics of the monocistronic genome of extra small virus, a virus-like particle associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: possible candidate for a new species of satellite virus. *Journal of General Virology* 85, 643-646.

- Sri Widada J., Richard V., Shi Z., Qian D. & Bonami J. R. (2004b) Dot-blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 58, 83-87.
- Sudhakaran R., Syed Musthaq S., Haribabu P., Mukerjee S. C., Gopal C and Sahul Hameed A.S. (2006a) Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra virus small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture* 257, 136-141.
- Sudhakaran R., Yoganandhan K., Ishaq Ahmed V. P. and Sahul Hameed A.S. (2006b) Artemia as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra virus small virus (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 70, 161-166.
- Tripathy S., Sahoo P. K., Kumari J., Mishra B. K., Sarangi N. and Ayyappan S.(2006) Multiplex RT-PCR detection and sequence comparison of viruses MrNv and XSV associated with white tail disease in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 258, 134-139.
- Tung C. W., Wang C. S. & Chen S. N. (1999) Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 22, 319-323.
- Yoganandhan K., Sri Widada J., Bonami J. R. & Sahul Hameed A. S. (2005) Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *Journal of Fish Diseases* 28, 65-69.



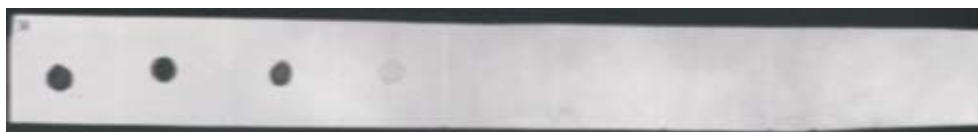
照片一、罹患白尾病的蝦苗與正常蝦體比較。上端為病蝦，可見到蝦體腹部肌肉呈現白濁情形，下端為健康的淡水長臂大蝦肌肉為清澈狀。



圖一、利用反轉錄聚合酶連鎖反應偵測罹患白尾病淡水長臂大蝦電泳圖。



圖二、淡水長臂大蝦結病毒的RNA1及RNA2點墨雜交靈敏度測試。上圖為病毒RNA1片段基因重組質體以連續十倍稀釋的方式，由30 ng到0.3 fg。以RNA1作為探針可觀察到其靈敏度可達30 pg。下圖為病毒RNA2完整基因重組質體以連續十倍稀釋方式，由50 ng到0.5 fg，而利用RNA2作為探針靈敏度可達到5 pg。



圖三、超小病毒顆粒點墨雜交靈敏度測試。利用超小病毒顆粒完整基因重組質體以連續十倍稀釋的方式，由80 ng到0.8 fg，利用XSV片段基因作為探針靈敏度可達8 pg。