

# 魚類病毒性神經壞死症的防疫策略

齊肖琪

國立臺灣大學生命科學系

國立臺灣大學漁業推廣委員會

## 一、前言

石斑魚是我國很重要的經濟魚種之一，目前面臨嚴重的產業困境，包含疾病問題，尤其是孵化後幼苗的死亡率因病毒性神經壞死症而居高不下。歐美對於養殖魚的魚病問題，多以疫苗方式預防。由於魚類的種間差異大，生活環境大不相同，在諸多變因下，解決石斑魚的疫病問題仍有許多防疫策略需要重新建立。

## 二、病毒性神經壞死症

病毒性神經壞死症 (Viral nervous necrosis disease, VNN disease) 是普遍發生在海水養殖魚類的病毒性疾病，首次發表於日本，後來包括東北亞、東南亞、地中海沿岸、西歐與北歐沿海國家、北美西岸與加拿大東岸，如今還漫延至中歐的以色列、伊朗等地區，已成為全球性很重要的海水養殖魚或半淡鹹水養殖魚類之病毒性疾病 (Munday *et al.*, 2002)。

VNN 發病期集中於仔魚 (larvae) 及稚魚 (juvenile) 階段，死亡率接近百分之百，近年來某些種類的成魚也有病癥及死亡率出現，例如歐洲鱸魚 (*Dicentrarchus labrax* L., European Sea bass)、

石斑魚 (grouper) 及大西洋比目魚 (Atlantic Halibut) 等 (Fukuda *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997)。VNN 的主要病理特徵是大腦以及視網膜組織出現空泡化現象，行為特徵包括迴旋游泳、失去平衡、浮躺水面、體色加深、食慾不振，甚至有些魚苗體側彎 (Bloch *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Breuil *et al.*, 1991; Glazebrook *et al.*, 1990; Grotmol *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1991; Yoshikoshi & Inoue, 1990)。

根據該病毒的型態以及核酸特性，在分類地位上被歸類於野田病毒科 (Nodaviridae) (Chi *et al.*, 2001; Comps *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1992; Frerichs *et al.*, 1996)。由魚類所分離出來的此科病毒株被稱為 Piscine nodavirus，或稱  $\beta$ -nodavirus，而由昆蟲分離出來的病毒株則被稱為  $\alpha$ -nodavirus (Nishizawa *et al.*, 1995)。魚類神經壞死病毒株可分為四種基因型：(1) Striped jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV)，(2) Tiger Puffer NNV (TPNNV)，(3) Barfin Flounder NNV (BFNNV)，以及 (4) Red-spotted Grouper NNV (RGNNV) (Nishizawa *et al.*, 1997)。根據四種基因型病毒抗血清交叉中和反應的結果，分成三種血清型：SJNNV 是一種血清型，TPNNV 為另一種血清型，RGNNV 和 BFNNV 則為同一種血清型 (Mori *et al.*, 2003)。RGNNV 基因型病毒寄主範圍與地域分佈最廣，所有分離出的 RGNNV 基因型病毒株皆源自溫水魚種，TPNNV 及 BFNNV 基因型則侷限於冷水魚種，而 SJNNV 基因型的分佈區域則橫跨冷、暖水域之間。

### 三、神經壞死症病毒傳播途徑

Glazebrook 等 (1990) 指出, NNV 會經由罹病金目鱸 (Barramundi) 水平傳播 (horizontal transmission) 其他健康魚。Arimoto 等 (1993) 利用已感染 SJNNV 的日本條紋鰻魚苗與健康魚苗進行共養 (cohabitation experiment), 結果健康魚苗在共養六天後全數死亡, 因此證明, 水平傳染是 NNV 傳播的重要方式。

Mushiake 等人 (1994) 檢測種魚的卵巢、血液及產卵, 發現種魚在頭幾次產卵時, 生殖腺、血液、魚卵都測不到病毒; 當產卵次數與環境壓力 (stress) 增大時, 可在種魚生殖腺測到病毒核酸, 在血液中測到 NNV 抗體, 所產的卵被檢測到病毒的機率也大幅增加, 這些卵孵化為魚苗後, 發病比例增高, 發病時間縮短, 因此說明 NNV 可經由垂直傳染給卵與孵化的幼苗。

Skiris 等 (1998) 發現病毒可被餌料生物攜帶, 如橈角類 (rotifer *Brachionus plicatilis*) 以及豐年蝦 (*Artemia salina*), 雖然 NNV 無法在其體內複製, 但至少可停留 24~48 小時, 因此餌料生物能成為 NNV 傳播的載體 (Skiris & Richards, 1998)。被 NNV 污染的魚塢所收集而來的餌料生物, 可檢測到 NNV 病毒核酸的存在 (Chi *et al.*, 2003); 因此, 受 NNV 污染之餌料生物, 能成為 NNV 水平傳播的媒介。

NNV 宿主範圍非常廣泛, 從海水魚到淡水魚, 至少有五目十六科的魚類是其宿主, 許多地區的疫情是從養殖場傳出 (Munday *et al.*, 2002)。在一些不具任何病癥的野生魚及觀賞魚的腦組織或視網膜中, 也能以 RT-PCR 結合 nested-PCR 測到 NNV 病毒核酸的存在, 因此, 無病癥之帶原魚也是散播 NNV 病毒的可能途徑 (Gagne *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2008b; Gomez *et al.*, 2008c; Nylund *et al.*, 2008)。

#### 四、神經壞死症病毒在宿主體內之散佈

Nguyen 等 (1996) 檢測病毒進入病魚體內各組織的順序，一開始出現病變的部位是泳鰓上方的脊髓，然後至腦部，最後是視網膜。檢測自然感染的魚苗，則在表皮細胞測到病毒訊號，推測病毒可由表皮的感覺與運動神經細胞進入體內。在帶有卵黃囊的大西洋比目魚苗的病理研究中，NNV 病毒首先在後腦以及小腸前段被發現，然後散佈至肝臟、鰓以及胸鰭 (Grotmol *et al.*, 1999)。

NNV 在病魚體內之分佈，依魚種不同而有些差異。在海鱸魚苗及日本條紋鱈魚苗中，只在神經組織中發現 NNV (Comps *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1996)。在嚴重感染 NNV 的石斑魚苗中，除了腦、視網膜外，其他全身各器官皆可偵測到 NNV 的存在，且可在病魚的血液樣本中檢測到 NNV 核酸的存在，因此推測，病毒血症 (viremia) 是造成全身系統性感染之因素 (Chi *et al.*, 2001)。

#### 五、診斷方法

已有的檢測方法包括：(1) 檢測病毒抗體或病毒蛋白為主的 Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) (Mushiake *et al.*, 1992; Shieh & Chi, 2005)；(2) 檢測病毒蛋白的快速檢測試劑 (one-step diagnosis kit) (Chi and Chiou, 2006)；(3) 檢測病毒核酸為主的 RT-PCR 及 nested PCR 方法 (Nishizawa *et al.*, 1994)；以及 (4) 用細胞株來檢測並分離具感染力之病毒顆粒 (Chi *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2001b)。

目前檢測方法中，仍以 RT-PCR 配合 nested PCR 的靈敏度最高，可在魚苗被感染的早期或是帶原魚體內，檢測出微量病毒的存在。若是考慮簡便與快速，則 One-step diagnosis kit 只要 15~30 分鐘就能完成檢驗，專一性夠但靈敏度約等於或略小於 RT-PCR 的標準。

## 六、病毒性神經壞死症之防疫策略

病毒性疾病尚無藥物可用來醫治病魚，所以要靠好的防疫策略。疫情爆發與否，受三方面因素影響：當環境緊迫（stress）變大，病原含量變多或病原性變強，加上宿主魚種的免疫力降低時，就很容易爆發疫情。因此，做好養殖場的環境管理，阻斷病原傳染的途徑，提高宿主魚種的免疫力，才能大幅降低疫情爆發的機率。病毒性神經壞死症最早案例是發生在日本及澳洲，現在世界各地的海水養殖區都有此疫病，臺灣也是年年發生。然而，此疫情在日本已受到很好的控制，其成功的主要原因是養殖環境的消毒與管理，推廣與執行的概念包括下面幾點：徹底執行養殖設備與工具的消毒及衛生管理；供水與排水皆嚴格消毒後才使用與排放；減少種魚催熟與產卵次數，以降低其緊迫度；用 PCR 的方式篩選從未受病毒感染的種魚及魚卵進行產卵與孵化，每一批孵化出的魚苗以及幼魚都使用消毒過的海水分開飼養；在幼苗期建立好的消化道腸菌叢，疫苗施打，培育抗病毒品系魚種，以及幼苗在飼養期間定期取樣做病毒的檢測與監控。

## 七、篩選種魚

Mushiake 等（1994）指出，降低條紋鰲種魚在生殖季節所承受的壓力，減少同一生殖季之產卵次數，並篩選無帶原種魚進行產卵，能降低魚苗罹患神經壞死症的機會。Breuil 等（2000）在海水鱸魚以及 Watanabe 等（2000）在比目魚（barfin flounder）防疫策略中，也都建議剔除魚群中生殖腺內有 NNV 抗原、或血液中有 NNV 抗體之種魚。然而筆者認為，此策略在一些大型種魚並不那麼適用。

## 八、環境的消毒

在環境消毒與管理的層面，有些細節需要注意，例如：避免魚具在不同池之間共用，工具用畢後要洗淨消毒，注意不同種類消毒藥劑的有效消毒劑量及不影響養殖魚存活的安全劑量，並先測試不同藥劑在不同水溫或鹽度下有無不良變化；在養殖場的工作人員容易成為攜帶病原的媒介，因此要常洗手及清洗消毒所穿的工作靴子；建議所有的缸子或桶子在使用之前及之後，都要用稀釋過的漂白水消毒；撈網或刷子可用含 0.5 mg/l TROs 的臭氧水或電解水浸泡消毒，或用漂白水浸泡消毒 30 分鐘；在養殖不同批的魚或孵化不同批的魚卵之前，場所的再次清潔、乾燥及消毒，可提供有效保護 (Munday & Nakai, 1997; Yoshimizu 2009)。自外海灣抽進來的海水都帶有很多病原菌，先經過沙濾，再行 UV 或臭氧處理，且最好不要一再循環使用。根據日本學者測試結果，可抑制 BFNNV 的 UV 劑量要達  $10^5 \mu W \cdot sec/cm^2$  才有效，且要用高品質的 UV 燈管。此外，適當的消毒劑及劑量如：50 p.p.m. 的次氯酸鈉 (sodium hypochlorite)、苜烷銨 (benzalkonium) 或碘 (iodine)，於 20°C 下處理至少 10 分鐘 (Arimoto *et al.*, 1996)。Arimoto 等 (1996) 建議使用含有 0.2  $\mu g/ml$  殘存臭氧的海水來清洗 striped jack 魚卵，Grotmol 和 Totland (2000) 用 4  $\mu g/ml$  殘存臭氧的海水清洗比目魚魚卵，皆能有效地減少孵化之魚苗垂直感染神經壞死症病毒的機率。

## 九、消毒系統的建立

### 臭氧殺菌系統

日本栽培漁業協會鹽澤聰先生，於平成九年漁業栽培技術研修事業基礎理論課程中指出，臭氧殺菌系統建立的目的是在於防止病毒性疾病的發生及蔓延，阻斷病毒垂直感染及水平感染的路徑，建造一個無病毒的清淨環境。因此，臭氧殺菌系統是針對種苗生產時，使用的水槽、器具的消毒，確保飼育用及洗淨用的海水無菌，還有處理排水等功能所構築的系統。日本自 1994 年，正式在種苗養殖現場使用日本荏原實業株事會社製造的臭氧殺菌系統（OZF-010, OZD-005）。此系統由臭氧反應槽、曝氣槽（氧化溴離子滯留槽）、活性炭槽（殘留氧化溴離子分解槽）以及儲存槽四個部分所組成。海水和臭氧反應後，殘留氧化溴離子濃度大約是 0.5 mg/l 左右，會先停留約 30 秒，再往活性炭槽移動。機器每小時處理的水量可達到 10 m<sup>3</sup>。

在海水中，臭氧（O<sub>3</sub>）是和海水中的溴離子（Br<sup>-</sup>）反應生成溴的氧化物（BrO<sup>-</sup>, BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>）。這些溴的氧化物本身為強氧化劑，可以殺菌，但對飼育的魚苗有毒；因此在飼育用水方面，含溴的氧化物之海水還要先經活性炭處理去毒才能用來養魚。在開發海水的臭氧處理裝置過程中，必須進行一些基本試驗：

#### （1）毒性測試

以含氧化溴離子的海水，及經過脫溴處理過的海水，對受精卵孵化及孵化苗的存活進行試驗。

## (2) 對卵孵化的影響

原含溴的氧化物之海水經活性碳處理過後，以不含氧化溴離子之海水稱之，用不同濃度的含氧化溴離子海水來孵化卵，結果臭氣濃度為 0.5 mg/l 時，授精卵無法孵化，但 0.005~0.1 mg/l 時，卵孵化率在濾過海水中的孵化率無差別。

## (3) 對孵化幼苗存活的影響

氧化溴濃度在 0.005~0.05 mg/l 範圍內對剛孵化幼魚應不至造成影響。經臭氣處理過海水中的溶氧量可高達 12~14 mg/l，須經曝氣處理讓溶氧量降低至 7~8 mg/l 後再做飼育用水。

## (4) 卵消毒

在卵消毒的時候若不注意，很可能因為藥劑的關係導致孵化率低下或畸形魚的產生。為了使 NNV 病毒去活化，卵須在殘留氧化溴離子濃度 0.5 mg/l 的海水中浸泡至少 30 秒。

## (5) 處理飼育用海水

為了實用化的量產規模 (50 m<sup>3</sup> 水槽規模)，以過濾海水、經紫外線處理海水及經臭氣處理海水等，分成三個實驗區。臭氣殺菌裝置可處理的水量為 5 m<sup>3</sup>；紫外線殺菌裝置 (Hanovia UV System, UV-500) 是中電壓的紫外線燈泡，為了達到 10<sup>5</sup> μw.sec/cm<sup>2</sup> 以上的照射量以達到殺菌的效果，所以採 5 m<sup>3</sup>/h 的速度來處理。

除了上述的臭氣消毒法，日本目前又開發電解海水消毒法來取代臭氣消毒法，電解海水消毒法更適合處理大量水體。



## 十、隔離

歐洲地中海海域有許多國家從事海鱸箱網養殖，當出現 VNN 病癥時，立刻將箱網拖離其他沒有發病的箱網群，且拖到較遠的海域，如此可以保住大多數未發病的箱網魚。

在臺灣，則建議每一批孵化的魚苗能分池續養，以避免孵化場各池間互相感染。若孵化場已經出現 VNN 疫情，則在出現病癥的早期，立即撈出有問題的魚，並增加流量，降低水溫，各池所使用的工具務必要一池一套或消毒後使用，才能緩和疫情。若疫情控制不住，魚苗發生大量死亡情形，須將死亡魚隻及魚池、魚具做適當消毒。若將死亡魚苗及池水任意排放於環境中，則會造成附近養殖區域被病毒污染，而形成大規模的病毒感染，這是臺灣每年疫情重複爆發的重要原因之一 (Chi *et al.*, 2003)。

## 十一、魚類免疫系統

硬骨魚的免疫系統由免疫器官、免疫細胞以及體液免疫因子所組成。免疫器官主要包括：胸腺、腎臟、脾臟以及黏膜相關淋巴組織 (Scapigliati *et al.*, 2002)。免疫細胞分：淋巴細胞 (lymphocyte) 及吞噬細胞 (phagocyte)。體液免疫因子包括：免疫球蛋白 Ig M、以及非特異性免疫因子，如補體、凝集素、干擾素等。硬骨魚在胚胎中期或孵化成幼苗時，雖已有淋巴器官之形成，但尚未具有免疫能力，須待週邊的表皮細胞、樹突狀細胞以及纖維母細胞發育完全後，才有成熟的後天免疫反應 (Lam *et al.*, 2004)。馬拉巴石斑魚的淋巴細胞直到孵化後 19 天才出現 (Lin *et al.*, 2008)。

## 十二、疫苗的研發與效益

有關 NNV 疫苗的研究, Tanaka 等(2001)使用大腸桿菌(*E.coli*)原核系統, 表現出完整的 SJNNV 的鞘蛋白質, 經由肌肉注射免疫後, 魚體的中和抗體增高, 攻毒試驗後的死亡率明顯降低。Húsgarð 等(2001)利用 SJNNV T2 片段的重組鞘蛋白質, 以腹腔注射免疫大西洋比目魚 (Atlantic halibut), 結果引起專一性的抗體反應, 並有效降低 NNV 攻毒後之死亡率。Sommerset 等(2001)以大西洋比目魚病毒株 AHNNV 及條紋鱈病毒株 SJNNV, 用 *E.coli* 系統, 分別建構了兩種重組蛋白質疫苗。Lin 等(2001)用石斑魚病毒株 NNV 製備重組疫苗, 以注射方式免疫石斑魚, 中和抗體於第一次免疫後的第 4 週開始上升, 追加注射後的中和抗體力價 (ND<sub>50</sub>) 為 1600。Liu 等(2006)以 *E.coli* 原核系統, Thiery 等(2006)以 baculovirus 真核系統, 分別發現, 重組 NNV 鞘蛋白可以自我組裝成類病毒顆粒 (Virus like particle, VLP), 分別將 VLP 免疫石斑魚及金目鱸, 皆可誘發很高的中和抗體力價, Thiery 等(2006)並以金目鱸幼魚進行免疫與活體攻毒測試, 結果相對存活率 (RPS) 高達 89%。以上這些試驗皆以幼魚 (juvenile) 進行, 並沒有在早期魚苗階段進行。

一般常用的疫苗免疫方式包括注射、口服及浸泡。幼魚及成魚可用注射方式免疫, 但 NNV 在幼苗期引起的感染率與死亡率最高, 而這時期魚苗無法進行注射, 只能以浸泡及口服方式來免疫。口服方式疫苗首先需要測試疫苗在飼料製作過程中的穩定度及日後保存期限等問題, 以及投餵時每隻魚是否攝入足夠的疫苗量, 還要能抵抗消化道內的分解酵素。另外, 早期魚苗仍需仰賴天然活餌, 所以疫苗需和餌料生物混合後再行餵食, 步驟較複雜。

Lin 等 (2007) 發展出以餌料生物包埋口服疫苗的平台系統，將表現病毒抗原的大腸桿菌，以福馬林殺菌後餵食豐年蝦，藉由豐年蝦的攝食來提高體內病毒抗原濃度，同時減少病毒抗原被魚苗腸胃道酵素破壞。體長 2.5 cm 的石斑魚苗經過兩天餵食，每天兩次，每次間隔 12 小時，免疫後一週進行攻毒，結果疫苗組存活率為 80%，對照組存活率為 45%，有顯著差異，故證明此種口服免疫法有效。

雖然魚苗自孵化後 19 天開始可以免疫，但免疫系統成熟度以及免疫效果，要到孵化後 40~45 天的七至八分苗階段才會更好，及此階段免疫所引起保護效果可以維持的時間更長。Kai 等 (Kai & Chi, 2008) 針對石斑體長六至八分之幼苗，研發了浸泡式免疫策略，以 BEI 藥劑將 NNV 病毒去活化，再以  $10^6$  TICD<sub>50</sub>/ml 濃度浸泡魚苗 20 分鐘，30 天後以  $10^5$  TICD<sub>50</sub>/ml 病毒劑量浸泡攻毒，結果相對存活率高達 83%，且至少可維持保護效果 3 個月，3 個月後的石斑已長成幼魚，對多種石斑苗而言，已過了 NNV 最易感染或致死的階段，且魚苗已長大到可以用注射法追加免疫的階段。因為有效浸泡時間只要 20 分鐘，因此可以利用魚苗自孵化場售至下游育成場的運輸過程中，於水車上完成浸泡免疫，不必增加養殖戶的額外人力負擔，也因水體小，可節省疫苗的用量。

病毒性神經壞死症主要發生在魚苗期，少數種類的養殖魚曾發生在成魚期，並引起高達 60% 的死亡率，例如地中海區域養殖的海鱸 (sea bass)、龍膽、以及日本的七帶石斑 (seven-banded grouper)。因此，這些種類的養殖魚最好在下箱網養殖之前，要完成幼魚的疫苗的追加注射。Yamashita 等 (2005) 利用去活化的 RGNNV，腹腔注射免疫七帶石斑 (*Epinephelus septemfasciatus*)，免疫後 10 天出現中和抗體，免疫魚攻毒後的相對存活率 (RPS) 為 67%，箱網養殖的實驗免疫魚相對存活率 (RPS) 則高達 85%。

### 十三、阻斷 NNV 垂直感染的新策略

石斑魚要經過很多年培育才能成為種魚，有些種類的石斑種魚，體型重達五、六十公斤，所以養在戶外大池，且必須達到一定的養殖密度才有交配行為發生，因此要篩選一定數量之無病毒帶原種魚進行繁殖，對養殖戶而言，是不大可能採用的防疫策略，且對碩大體型之種魚做定期病毒篩檢，過程非常耗人力也增加種魚緊迫，因此很難說服種魚養殖戶遵循，更難要求養殖戶犧牲帶原種魚。絕大多數種魚是群養在戶外，水源、下雜魚飼料、鳥糞等等都可能將病毒帶入，因此很難預料所飼養的種魚何時會感染到 NNV。另外，雖然用某些化學藥劑或是臭氧處理過的養殖水可以有效消毒某些種類的魚卵，但每一魚種的魚卵對化學消毒劑的耐受度是不同的，要兼顧有效消毒及魚卵的孵化率，需要經過很長的測試過程。

有鑑於此，本實驗室建立了另一種防疫策略，可以有效阻斷 NNV 藉種魚垂直傳染病毒給魚卵及孵化後魚苗的機率。利用種魚接種 NNV 病毒疫苗，使之產生專一性抗體，以中和魚體內可能潛藏以及因生殖壓力而造成增殖的 NNV 病毒，使生殖液中病毒量大幅降低，甚至不再有病毒，而生產無帶原之魚卵，阻斷 NNV 垂直傳染的路徑。本實驗室先進行石斑成魚的疫苗接種，並定期採血，測 NNV 抗體的中和力價，石斑成魚因免疫系統已成熟，接種疫苗後可以產生很高力價的抗體，追加免疫後，高抗體力價至少可以維持三至六個月，足夠涵蓋石斑種魚的產卵季。之後與種魚養殖戶進行合作，於繁殖季節前一個月進行疫苗接種，然後追蹤整季實驗組與對照組之魚卵，用 RT-PCR 及 Nested PCR 檢測魚卵 NNV 的帶原比例，結果未接種疫苗的負對照組種魚，在生殖季後期所產的卵有測到 NNV 帶原，但接種疫苗組的種魚，整個生殖季所產的卵皆無病毒帶原，顯示藉免疫種魚來阻斷 NNV 垂直傳染是有效的。這項

防疫策略，並不需要篩檢種魚及淘汰帶原種魚，也不需要建很大的室內種魚養殖場來保護種魚免於病毒感染，因此對養殖戶來說，可行性相當高 (Kai *et al.*, 2009)。

#### 十四、被動免疫

近年來有研究利用抗 NNV 的多源抗體或雞蛋抗體 (Ig Y) 來中和魚卵表面的 NNV。Lai 等 (2001a, 2003) 發展出抗 YGNNV 的老鼠單源抗體，並構築攜帶單源抗體基因的載體，轉殖入魚細胞株，結果該細胞株可產生抗 NNV 病毒的單源抗體，因此大幅降低單源抗體的生產成本，至於單源抗體能如何有效地應用在石斑苗 NNV 防疫，則仍在測試中。另外，利用抗 NNV 的雞蛋抗體混在飼料中餵食魚苗，可以達到石斑苗被動免疫的效果。Ig Y 成本低廉，可以大量生產，若 Ig Y 沒進一步純化後使用，仍有影響水質的疑慮。

#### 十五、益生菌的應用

養殖魚的體表與消化道，若有正常的細菌相，則有助於提高魚體對病原的免疫反應或抗病原菌的能力，已有報告指出，很多自環境水體或魚消化道分離到的細菌具有抗病毒能力 (Yoshimizu *et al.*, 1986; Yoshimizu and Ezura, 1999)。但魚苗養在消毒過的水體，所建立的體表或消化道的細菌相是異常的，因此在孵化苗的階段，添加具有抗病毒能力的益生細菌於餌料生物中，再餵食魚苗，能在魚苗消化道中建立有益菌叢，而提高魚苗抗病毒能力，但這些餌料生物，包括豐年蝦及輪蟲，必須養在消毒過的海水中，然後才能使用 (Yoshimizu, 2009)。

Chi (2007) 自石斑魚消化道中分離到具有抗 NNV 複製效果之細菌，已完成體外定性測試及活體餵食試驗，證實經由四週餵食可大幅降低攻毒試驗中石斑苗的死亡率。可否讓這類細菌在開口魚苗消化道中形成長駐型的主要菌叢，仍在測試中。

有些益生菌雖然沒有直接抗 NNV 的效果，但對於改善水質有很好的效果，施用在密集蓄養的池水中，間接有助於魚苗的健康成長，因此提高魚苗的免疫力，故也是防疫策略中重要的一環。

## 十六、生態平衡法

自然界中的生物環環相扣，當一養殖池水達到生態平衡時，就能讓所有其中的動、植物、藻類或微生物都得到最大生存利益。現今我們對每一區海域，不同深度海水所存在的藻類、浮游生物、微生物的組成、以及各種生物的特性，所知仍然有限，只能應用幾種已知有益的藻類或微生物，來增進養殖魚苗的存活率。

亦有利用養好的藻水來取代殺菌海水來孵化石斑苗，在養殖區設立幾個池先養海水，放入合宜的藻類及微生物，經一段時間放置，等其中生態達到平衡後再用。同時，NNV 在無宿主可感染的海水中，病毒顆粒的穩定度不佳，經過幾天就會自然崩解，因而降低水中病毒濃度，所以用貯放數天後的海水來孵苗或養魚都會更安全。

## 十七、防疫的缺口

石斑魚是肉食性魚種，孵化後即開始投餵大量之輪蟲（rotifer）、橈角類（copepod）及下雜魚，故魚苗易於此階段攝入帶有病毒之餌料生物及下雜魚；且石斑魚殘食性高，易吞食虛弱的帶病魚隻；再加上養殖戶之間進水排水位置緊鄰等種種原因，造成近年來疫情重覆發生。雖然疫苗研究已有成果，但無法全然杜絕NNV的疫情，主要是因為石斑孵化後14天即可感染上NNV，但石斑魚免疫器官發育是在孵化後17~19日才成熟，此階段的苗正開始收翅、變態、進入稚魚期，不宜驚動或搬動，只能採用口服方式免疫，免疫後專一性抗體需至免疫後2週以上才達力價高峰，所以從孵化後三天起到孵化後一個月，是防疫的空窗期，如何防止孵化後至免疫力成熟前這段空窗期魚苗的感染，將是未來防疫的重點。

除此之外，政府、業界與民間還有很多可以努力的事項，包括：

- ◇ 如何整頓臨海地區雜亂無章的海水抽放管？
- ◇ 如何建立養殖戶共識，讓大家都遵守排放養殖水前，一定先經過合格消毒後再排放？
- ◇ 如何要求運魚車及其用具每一趟使用前都先消毒？
- ◇ 如何開發培養乾淨輪蟲與橈角類活餌的系統？
- ◇ 如何開發臺灣以外產銷的管道，讓大家不再為了防止魚產量過剩所造成的售價大跌而私藏養殖的成功經驗？
- ◇ 相關單位如何更有效率地讓本地已研發完畢之疫苗通過審查而上市？

……這一切的一切都還有待大家一起努力！

## 參考資料

- Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Muroga, K. & Furusawa, I. (1993) Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *J Fish Dis* 16, 461-469.
- Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G. & Furusawa, I. (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* 143, 15-22.
- Bloch, B., Gravningen, K. & Larsen, J. L. (1991) Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis Aquat Organ* 10, 65-70.
- Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J. & Hoffman, R. W. (1996) Picorna-like virus associated with mortality and a spongiosis encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis Aquat Organ* 26, 75-80.
- Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F. & Pichot, Y. (1991) Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 97, 109-116.
- Breuil, G., Pepin, J. F., Castric, J., Fauvel, C. & Thiery, R. (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: Application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 20, 95-100.
- Chi, S. C. (2007) Screening and characterization of Bacteria with anti-betanodavirus activity from grouper (*Epinephelus sp.*) intestine. 13<sup>th</sup> International Conference of the EAFP, September 17-22, Grado, Italy.



- Chi, S. C., Hu, W. W. & Lo, B. J. (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J Fish Dis* 22, 173-182.
- Chi, S. C., Lo, B. J. & Lin, S. C. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J Fish Dis* 24, 3-13.
- Chi, S. C., Shieh, J. R. & Lin, S. J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis Aquat Organ* 55, 221-228.
- Chi S. C. & Chiou, (2006) Development of one-step diagnosis kit for fish nodavirus. 4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference. 2006/6/25-29, Oslo, Norway.
- Comps, M., Trindade, M. & Delsert, C. (1996) Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture* 143, 113-121.
- Frerichs, G.N., Rodger, H.D., Peric, Z. (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass , *Dicentrchus labrax*. *J. Virol.* 77, 2067-2071
- Fukuda, Y., Nguyen, H. D., Furuhashi, M. & Nakai, T. (1996) Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol* 31, 165-170.
- Gagne, N., Johnson, S. C., Cook-Versloot, M., MacKinnon, A. M. & Olivier, G. (2004) Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Dis Aquat Organ* 62, 181-189.
- Glazebrook, J. S., Heasman, M. P. & de Beer, S. W. (1990) Picornalike viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *J Fish Dis* 13, 245-249.

- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H. & Park, S. C. (2008a) Genetic analysis of betanodaviruses in subclinically infected aquarium fish and invertebrates. *Current Microbiology* 56, 499-504.
- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H. & Park, S. C. (2008b). Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *J Invertebr Pathol* 97, 197-202.
- Gomez, D. K., Lim, D. J., Baeck, G. W., Youn, H. J., Shin, N. S., Youn, H. Y., Hwang, C. Y., Park, J. H. & Park, S. C. (2006) Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J Vet Sci* 7, 369-374.
- Gomez, D. K., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y. & Nakai, T. (2004) PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J Fish Dis* 27, 603-608.
- Grotmol, S., Bergh, O. & Totland, G. K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis Aquat Organ* 36, 95-106.
- Grotmol, S. & Totland, G. K. (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis Aquat Organ* 39, 89-96.
- Grotmol, S., Totland, G. K., Torud, K. & Hjeltne, B. K. (1997) Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis Aquat Organ* 29, 85-97.

- Husgaro, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B. K., Rodseth, O. M. & Biering, E. (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis Aquat Organ* 45, 33-44.
- Kai, Y. H. & Chi, S. C. (2008) Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine* 26, 1450-1457.
- Kai Y.H., Su H. M., Tai K. T., &Chi S. C. (2009) Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccin]*
- Lai, Y. S., Chiu, H. C., Murali, S., Guo, I. C., Chen, S. C., Fang, K. & Chang, C. Y. (2001a) In vitro neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* 24, 237-244.
- Lai, Y. S., John, J. A. C., Lin, C. H., Guo, I. C., Chen, S. C., Fang, K. & Chang, C. Y. (2003) Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *J Fish Dis* 26, 31-42.
- Lai, Y. S., Murali, S., Chiu, H. C., Ju, H. Y., Lin, Y. S., Chen, S. C., Guo, I. C., Fang, K. & Chang, C. Y. (2001b) Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J Fish Dis* 24, 299-309.

- Lam, S. H., Chua, H. L., Gong, Z., Lam, T. J., and Sin, Y. M. (2004) Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental and Comparative Immunology* 28(1), 9-28.
- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J. & Ollevier, F. (1997) Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in caged-reared sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J Fish Dis* 20, 145-151.
- Lin, C. C., Lin, J. H. Y., Chen, M. S. & Yang, H. L. (2007) An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* 268, 265-273.
- Lin, C. S., Lu, M. W., Tang, L., Liu, W. T., Chao, C. B., Lin, C. J., Krishna, N. K., Johnson, J. E. & Schneemann, A. (2001) Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus. *Virology* 290, 50-58.
- Lin, J. H. Y., Lin, H. T., Lopez, C., Chen, T. Y., Chen, M. S. & Yang, H. L. (2008) A comparison of the expression of immunity-related rag 1 and ikaros genes with histogenesis of the thymus in *Epinephelus malabaricus* (Bloch & Schneider). *Aquaculture Research* 39, 252-262.
- Liu, W. T., Hsu, C. H., Chang, C. Y., Chen, H. H. & Lin, C. S. (2006) Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine* 24, 6282-6287.
- Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S. & Nakai, T. (2003) Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis Aquat Organ* 57, 19-26.

- Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. & Furusawa, I. (1992) Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* 187, 368-371.
- Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T. & Kanno, T. (1991) A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol* 26, 209-210.
- Munday, B. L., Kwang, J. & Moody, N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J Fish Dis* 25, 127-142.
- Munday, B. L. & Nakai, T. (1997) Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13, 375-381.
- Mushiake, K., Arimoto, M., Furusawa, T., Furusawa, I., Nakai, T. & Muroga, K. (1992) Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 2351-2235.
- Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I. & Muroga, K. (1994) Control of VNN in striped jack – selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain-reaction (PCR). *Fish Pathol* 29, 177-182.
- Nakai, T., Mori, K., Nishizawa, T. and Muroga, K. (1995) Viral nervous necrosis of larval and juvenile marine fish. *Asian Fisheries Society Special Publication* 10, 147-152
- Nguyen, H. D., Nakai, T. & Muroga, K. (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis Aquat Organ* 24, 99-105.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. & Muroga, K. (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl Environ Microbiol* 63, 1633-1636.

- Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I. & Muroga, K. (1994) Polymerase chain reaction amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis Aquat Organ* 18, 103-107.
- Nishizawa, T., Mori, K. I., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. & Muroga, K. (1995) Comparison of the coat protein gene of 5 fish nodaviruses, The causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J Gen Virology* 76, 1563-1569.
- Nylund, A., Karlsbakk, E., Nylund, S., Isaksen, T. E., Karlsen, M., Korsnes, K., Handeland, S., Martinsen, R., Mork Pedersen, T. & Ottem, K. F. (2008) New clade of betanodaviruses detected in wild and farmed cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Arch Virol* 153, 541-547.
- Scapigliati, G., Romano, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M. R., Prugnoli, D., Galice, A., Meloni, S., Secombes, C. J., Mazzini, M. & Abelli, L. (2002) The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental and Comparative Immunology* 26(2), 151-160.
- Shieh, J. R. & Chi, S. C. (2005) Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA. *Dis Aquat Organ* 63, 53-60.
- Skliris, G. P. & Richards, R. H. (1998) Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture* 169, 133-141.
- Sommerset, I., Husgaard, S. & Nerland, A. H. (2001) Development of vaccines against nodavirus affecting Atlantic Halbut (*Hippoglossus hippoglossus*). Tenth International Conference of European Association of Fish Pathologists, 9-14 September, Dublin.

- Tanaka, S., Mori, K., Arimoto, M., Iwamoto, T. & Nakai, T. (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J Fish Dis* 24, 15-22.
- Thiery, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M. & Schneemann, A. (2006) Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J Virol* 80, 10201-10207.
- Watanabe, K., Nishizawa, T. & Yoshimizu, M. (2000) Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis Aquat Organ* 41, 219-223.
- Yamashita, H., Fujita, Y., Kawakami, H. & Nakai, T. (2005) The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathol* 40, 15-21.
- Yoshikoshi, K. & Inoue, K. (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* 13, 69-77.
- Yoshimizu M. & Ezura Y. (1999) Biological control of fish viral diseases by anti-viral substance producing bacteria. *Microb Environ* 14, 269-275.
- Yoshimizu M., Takizawa H., Kamei Y. & Kimura T. (1986) Interaction between fish pathogenic viruses and microorganisms in fish rearing water: survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus and *Onchhrhynchus masou* virus in rearing water. *Fish Pathol*, 21, 223-231.
- Yoshimizu, M. (2009) Control strategy for viral disease of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seed production facility in Japan. *Fish Pathol* 44(1), 9-13.