

台灣沿海野生魚種帶原神經壞死症病毒之田野調查

邵冠榮¹、齊肖琪^{1,2,3}

¹ 國立臺灣大學動物學研究所

² 國立臺灣大學生命科學系

³ 國立臺灣大學漁業推廣委員會

一、文獻回顧

1. 魚類神經壞死症病毒

病毒性神經壞死症 (Viral nervous necrosis disease, VNN)，是一種全球性的魚類病毒性疾病，此症又被稱為 viral encephalopathy and retinopathy (VER)，病原體被命名為神經壞死症病毒 (nervous necrosis virus, NNV) (Bloch *et al.*, 1991; Munday *et al.*, 1992)。發病魚體色變黑、失去平衡、迴旋打轉或螺旋游泳、厭食、身體側彎，最後沉入池底死亡，病癥出現的一週內會發生大量死亡 (Munday *et al.*, 2002)。神經壞死症病毒主要引起吋苗以下的魚苗發病及死亡，但有些石斑魚至吋苗階段仍有高達 70~80% 的死亡率 (鄭, 2001)。

NNV 在分類上屬於 Nodaviridae 的 β -nodavirus (或稱 Piscine nodavirus)，核酸組成包括兩條單股正意核糖核苷酸，RNA1 轉譯 RNA-dependent RNA polymerase，RNA2 則轉譯病毒外鞘蛋白質。Nishizawa 等 (1994) 依據 NNV 的 RNA2 核酸序列，建立不同引子對的組合進行 RT-PCR 反應，擴增出五種目標片段 (T1~5)，將不同魚種病毒分離株的 T4 片段進行核酸序列比對，可將 NNV 分成四種基因型：Striped Jack NNV (SJNNV)、Tiger Puffer NNV (TPNNV)、Barfin Flounder NNV (BFNNV) 及 Redspotted Grouper (RGNNV) (Nishizawa *et al.*, 1997)。根據血清中和交叉

反應結果，四種基因型可分成三種血清型，包括：(a) SJNNV、(b) TPNNV、(c) RGNNV 和 BFNNV 則被歸在同一種血清型(Mori *et al.*, 2003)。雖然 BFNNV 及 RGNNV 在血清學上十分相近，但 BFNNV 的病例都發生在冷水魚，RGNNV 的病例都發生在溫水魚。

世界各地已有許多養殖魚種受到此病毒感染並發生大量死亡 (Munday & Nakai, 1997)。在亞洲，日本、台灣、中國大陸、韓國、泰國、馬來西亞、菲律賓、澳洲、大溪地、伊朗等區域的養殖魚都有因 VNN 而大量死亡的病例；在歐洲，法國箱網養殖的海鱸、英國蘇格蘭及挪威養殖的大西洋大比目魚也有相同疫情；在美洲，加拿大及美東的鱈魚繁殖場也有 VNN 疫情的報告 (Barke *et al.*, 2002)。

NNV 可經帶原種魚垂直傳染下一代，或共養帶原魚而水平傳染。此外，受到病毒污染之飼料及餌料生物，也能成為神經壞死症病毒水平傳播的媒介。海洋中部份無病癥的野生魚，曾驗出 NNV 的存在，這些帶原魚亦有可能經由海水為媒介，或是被捕撈後被當作下雜魚而感染養殖魚，但有關海洋中的野生魚在 NNV 傳染途徑中所扮演角色，相關報告至今仍十分有限。

2. 魚類虹彩病毒

1990 年，日本養殖的嘉鱾魚 (red sea bream, *Pagrus major*) 首先出現魚類虹彩病毒症報導，死亡率大約 20~60%，病魚活動力下降，鰓部有貧血及點狀出血的現象，另外在脾臟、腎臟、心臟、肝臟及鰓可觀察到嗜鹼性肥大細胞，在電顯下可觀察到規則排列的病毒顆粒，直徑大小約 200~240 nm，用過濾後的病魚脾臟組織研磨液去感染健康的嘉鱾魚，也會產生相同病癥，因此病原體則被命名為嘉鱾魚虹彩病毒 (Red Sea bream Iridovirus, RSIV) (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994)。自 1995 年起，台灣本島南部的養殖石斑魚也爆發虹彩病毒症，死亡率高達 60%，通常感染吋苗以上的石斑幼魚，病魚出現類似 RSIV 引起的病癥，病原體被命名

為台灣石斑魚虹彩病毒 (TGIV) (Chou *et al.*, 1994; Chao *et al.*, 2002)。1994 年到 1997 年間中國廣東省的養殖鰻魚 (mandarinfish, *Siniperca chuatsi*) 爆發虹彩病毒症的疫情，死亡率約為 50%，病魚有類似 RSIV 引起的病癥，病原體則被命名為傳染性脾腎壞死病毒 (Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV) (He *et al.*, 2000)。Wang 等 (2007) 利用 PCR 及 nested-PCR 檢測了自南中國海域所收集的 13 種養殖魚及 73 種野生魚，結果顯示 13 種養殖魚及 39 種野生魚都有 ISKNV-like 的感染，另外經過核酸序列分析顯示，可將病毒分成兩大群，一群和 ISKNV 有較大的相似性，一群則和點帶石斑虹彩病毒 (orange-spotted grouper iridovirus, OSGIV) 有較大的相似性。

魚類虹彩病毒屬於虹彩病毒科 (Iridoviridae)，具有封套膜，核酸組成為線性雙股去氧核糖核酸，基因體大小為 150~200 kb，病毒顆粒直徑約為 125~300 nm，外觀型態為二十面體。鞘蛋白分子量約 50 kDa，佔病毒蛋白質 40~45% 含量，保守性高，所以常被用來判斷虹彩病毒分離株的親源性 (Schnitzler & Darai, 1993)。國際病毒分類委員會將此科病毒分成五個屬：(1) 虹彩病毒屬 (Iridovirus)，寄主以昆蟲為主；(2) 氯虹彩病毒屬 (Chloriridovirus)，寄主以蚊子為主；(3) 赤蛙病毒屬 (Ranavirus)，寄主以蛙類為主；(4) 淋巴囊腫病毒屬 (Lymphocystivirus)，寄主以多種硬骨魚類為主；(5) 細胞肥大病毒屬 (Megalocytivirus)，代表病毒為 Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)，寄主為多種低等脊椎動物。

另一種分類方式，乃將虹彩病毒科分成兩個亞科，Invertiridovirinae 及 Chloriridovirinae；其中 Invertiridovirinae 再分 Iridovirus 及 Chloriridovirus 兩屬；而 Chloriridovirinae 再分 Ranavirus、Lymphocystivirus、Megalocytivirus 三屬 (Sudthongkong *et al.*, 2002a, b; Chao *et al.*, 2004)。在台灣，造成石斑苗大量死亡的虹彩病毒至少有 2 種，分屬於 Megalocytivirus (如 TGIV 及 RSIV) 及 Ranavirus (如 GIV) (Chao *et al.*, 2002; Chao *et al.*, 2004)。

虹彩病毒可經共養而引起水平感染，死亡率高達 100% (Ahne *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1990)。陳 (2000) 利用含有台灣石斑魚虹彩病毒 (TGIV) 的飼料餵食健康的石斑魚苗，結果死亡率高達 100%，顯示虹彩病毒可經餵食感染，因此推測，餌料生物來源如果污染了病毒，或石斑魚苗彼此間的殘食，都可能造成病毒的傳染，在環境不佳的情況爆發疫情。

3. 烏魚

烏魚中文學名為鰻，英文學名為 *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758)，英文俗名為 grey mullet。烏魚在台灣水域的分布非常廣泛，不但遍佈沿海，河川中游也可發現烏魚的存在 (劉，1991)。冬至前後十天左右，大批成熟的烏魚會由北方迴游至台灣西部及西南部沿海產卵 (李，1995)。現今養殖烏魚之種苗來源大多是天然捕撈。烏魚苗在低鹽度的沿岸及河口海域作滲透壓調節並進入河口一帶生長，此階段的魚苗游泳能力弱且高度群聚，所以容易被捕捉。烏魚種苗的蓄養主要是集中於台南、高雄及屏東沿海一帶。因為烏魚是廣鹽性，所以烏魚可在淡水、半鹹水及全海水的水域放養，台灣過去曾將烏魚馴化後，在淡水中與草魚、鯉魚混養 (李，1995)，或與海水養殖的虱目魚及草蝦混養 (葛，1993)，烏魚在台灣南部也有和石斑魚吋苗共養的情形。Zorriehzahra 等 (2005) 指出，伊朗裏海 (Caspian sea) 的野生鰻科魚類 (*Liza auratus*, Golden grey mullet) 連續幾年發生大量死亡，經鑑定死亡魚隻有感染 NNV，顯示鰻科魚類對 NNV 具有感受性。

二、前言

神經壞死症病毒 (NNV) 在世界各地造成多種海水養殖魚大量死亡 (Munday *et al.*, 2002), 台灣多種具有高經濟價值的海水養殖魚苗也深受其害, 然而 NNV 如何保存於自然界中? 在臺灣附近海域中有那些野生魚種會是 NNV 的寄主? 野生魚種帶原 NNV 的現象是否普遍? 是否包括迴游性魚類? 又迴游性魚類在不同地域之間對病毒的傳播可能扮演的角色? 帶原野生魚是否有途徑把 NNV 傳染給養殖區的魚苗? 不同基因型的 NNV 有無可能經由共感染在野生魚體中進行重組? 以上這些問題需要不同地區的研究團體, 針對各地區海域的野生魚種進行 NNV 篩檢, 統整與分析後才能釐清。本文針對台灣北、中、南及東部沿海收集各種野生魚, 包括具有迴游性的鰯科魚類 (*Liza auratus*, Golden grey mullet), 及經常被養殖業者收購當作餵食養殖魚之野生魚種在內, 然後進行 NNV 的檢測及初步分析, 以建立 NNV 在台灣沿海野生魚種帶原的基本資料, 作為與世界其它國家類似研究資料之統整與分析之參考。此外, 會引起脾臟細胞腫大之虹彩病毒的宿主魚種, 與 NNV 的宿主魚種有很多重疊, 因此本研究所採集的野生魚與養殖魚也同時做虹彩病毒檢測, 以確認這兩種病毒有無天然共感染之案例。

本研究採集魚標本分四大區進行, 北部主要是基隆及東北角海岸, 中部主要是苗栗地區, 南部地區主要是嘉義、台南、高雄、屏東地區, 東部則是宜蘭、花蓮地區, 採集地點與數量列於表一。魚的採樣時間是 2006 年 4 月至 2007 年 4 月, 野生魚標本源自台灣各地區漁港收集捕撈的野生魚, 魚種不限; 養殖魚標本則源自屏東、高雄、台南、嘉義地區養殖戶收集樣本, 以石斑魚苗為主, 少部份為石斑成魚; 烏魚樣本由台灣大學漁業科學研究所曾萬年教授提供, 自 2006 年 1 至 12 月期間基隆地區漁民捕撈的烏魚樣本, 皆為成魚。無論野生魚、養殖魚或烏魚, 每批每種魚的樣本數約 5 到 10 尾。每尾魚解剖後取腦組織與視網膜組織, 以 NNV 專一性引子進行 RT-PCR 及 nested-PCR 篩檢; 又取脾及腎, 以 RSIV 及 GIV 專一性的引子對進行虹彩病毒的篩檢。本研究所用的核酸引子序列如表二。

三、結果與討論

1. 台灣各地區野生魚種帶原 NNV 之情形

在本研究中，檢測野生魚數量為 288 隻，分別屬於 75 種，其中 25 種有 NNV 帶原。至 2007 年，這些野生魚種（表三）皆是首次發現的 NNV 新宿主，且常被用來當作下雜魚。由台灣各地區所採集到的野生魚種，普遍有 NNV 低量帶原，需經由 nested-PCR 才檢測得到。南部地區有 0.6% 的採樣標本 NNV 帶原量較高，以 RT-PCR 就能測到。NNV 的檢出率在南部為 23.9%、北部為 22.2%、中部為 23.5%、東部為 31.6%，沒有地域分佈上的差異（圖一）。台灣南部野生魚整年幾乎都有 NNV 低量帶原的情形，NNV 的檢測率，2005 年 12 月為 40.0%，2006 年 4~6 月為 0%，2006 年 7~9 月為 18.3%，2006 年 10~12 月為 61.5%，2007 年 1~3 月為 36.0%。採樣野生魚較高病毒量只出現在 2005 年 12 月的採樣魚中（圖二）。

臺灣所有養殖魚分離到的 NNV 皆屬於 RGNNV 基因型 (Chi *et al.*, 2003)，此基因型的寄主範圍非常廣，至少 16 科的魚有 NNV 感染的記錄 (Munday *et al.*, 2002)。Gomez 等 (2004) 檢測日本野生魚及養殖魚共 18 科魚樣本，其中 17 科魚有 NNV 帶原。本研究共檢測 75 種魚樣本，其中 30 種魚有 NNV 低量帶原，顯示台灣附近海域至少有 30 種野生魚可以成為 NNV 在自然環境中的儲存槽。因為以魚腦為檢測組織，所以能確定這些魚不是表面帶原，或是消化道中的食物帶原，而是能在腦中複製與存留的寄主。NNV 主要致病魚齡是幼苗，而本實驗的採樣魚都是亞成魚或成魚，死於 NNV 感染的魚都已自然被淘汰，被捕撈到的帶原魚應該是受 NNV 感染後的殘活魚，所以病毒含量低。台灣南部養殖區自 1994 年起就有 VNN 爆發的紀錄 (Chi *et al.*, 1997)，迄今 NNV 仍然是石斑魚苗的重要病原，當疾病爆發，將死或已死的養殖魚苗都未經消毒就被排放，周圍海域的野生魚因此有很大的機會被 NNV 感染，也因此南部養殖地區沿海所收集到的野生魚種帶原率及帶原量都較高。

2. 南部陸地養殖魚苗在各季節感染 NNV 之情形

台灣南部採集到的養殖魚苗，整年期間都有 NNV 帶原，不同季節 NNV 及虹彩病毒的檢測率如圖三所示。由該圖可知，NNV 在養殖石斑魚苗的帶原率極普遍，且在春夏兩季有嚴重 VNN 疫情爆發，冬季雖無 VNN 疫情，但仍有 NNV 帶原。本研究中，只在 2007 年 4 月採集到的養殖藍身大石斑 (*Epinephelus tukula*) 有測到 RSIV-like 的虹彩病毒存在，無 NNV 共感染。養殖魚整年間都有 NNV 感染的紀錄，春夏兩季更是疾病爆發的高峰。然而，NNV 在南部海域所收集到的野生魚中，帶原率或帶原量並沒有因此集中在春末至夏季這段期間。

Gomez 等 (2004) 研究日本兩個地區養殖魚及外海野生魚的 NNV 感染情形，結果顯示，大部分野生魚體內都帶有少量 NNV，無臨床病癥，推測這些帶原野生魚種可能成為養殖魚受 NNV 感染的來源。本研究針對不同季節南部養殖魚及野生魚進行 NNV 的檢測，發現野生魚在整年間幾乎都有 NNV 的帶原，且這些帶原的野生魚中，有十幾種常被養殖業者低價收購作為餵食養殖石斑苗的下雜魚，因此不能排除 NNV 有機會經由此路徑傳染給養殖魚苗，仍待日後求證。Skloris 等 (1998) 指出，NNV 可污染餌料生物，如橈腳類 (*Brachionus plicatilis*, rotifer) 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。在台灣，NNV 亦曾在橈腳類及作為生餌的蝦類 (*Acetesinte medius*) 身上測到 (Chi *et al.*, 2003)，這些下雜魚或小蝦都來自沿海的捕撈，也是養殖魚苗的重要餌料，因此可能成為傳染 NNV 的媒介。

3. 鯔科魚類感染 NNV 之情形

由圖四得知，烏魚帶原 NNV 的檢出率集中在 10 月至 1 月，且只有 nested-PCR 才能檢測到，顯示 NNV 在魚體內的含量低。本研究採集的鯔科魚類，只在野生烏魚及養殖烏魚有檢測到 NNV，在野生大鱗鯪 (*Liza macrolepis*) 則沒測到 (圖五)。

Zorriehzahra 等 (2005) 在大量死亡的鯔科魚類 (*Liza auratus*, Golden grey mullet) 測到 NNV，經過核酸序列比對，發現此病毒株和 RGNNV 有極高的相似度。此外，Gibson-Kueh 等 (2004) 也曾提出養殖烏魚受到 RSIV 的感染。在台灣，烏魚 (*Mugil cephalus*) 的分布非常廣泛，是一種常見的迴游魚種。本研究中，烏魚只有在冬季 (10 月~1 月) 才測得到 NNV，原因可能和其繁殖季節有關，烏魚的繁殖季節是在冬至前後，繁殖會消耗魚大量精力，使免疫能力下降，因此病毒較易入侵魚體。本研究中所採集的烏魚都是成魚，對 NNV 的感受性低，因此在烏魚體內的病毒量低。迴游性魚類會在不同海域之間遷移，加上 RGNNV 的寄主範圍很廣，因此帶原之烏魚也可能會將 NNV 大範圍地散播，造成海域中其他對 NNV 有感受性魚種被感染。

本研究中所檢測的野生烏魚，雖然以性成熟的成魚居多，但在天然環境中，並沒有人工繁殖所造成的緊迫，所以病毒帶原量不會在生殖季升高，而魚苗生活在廣大的海域中，也沒有類似高密度養殖對魚苗所造成的緊迫，因此在天然環境下，野生烏魚的垂直感染的機率應該不高，沿海烏魚的帶原有可能被陸上石斑養殖區在 VNN 疫情後排放的死魚及養殖水所感染。本研究中，養殖烏魚有 NNV 帶原，但台灣烏魚苗大多是野生捕撈，之後和其他海水養殖魚苗共養，本研究採集的烏魚就曾和石斑魚成魚共養，因此推測，養殖池中採集到的帶原烏魚，也可能是受到共養的其他 NNV 帶原魚苗或水體中 NNV 的水平感染所致。

4. NNV 與 RSIV 在野生魚中的共感染

本研究所採集的野生魚中，只在一尾粗紋鯿 (*Leiognathus lineolatus*) 同時測到有 NNV 及虹彩病毒共感染的情形。日本外海野生魚體中曾發現帶原 NNV 的 RNA 1 與 RNA 2 來自兩種基因型，顯示不同基因型之 NNV，可能在天然海域魚種的交互感染下，發生基因重組。Iwamoto 等 (2004) 建立不同基因型 (RGNNV 及 SJNNV) RNA 1 及 RNA 2 之重組 NNV，發現 NNV 對寄主的感受性主要取決於 RNA 2。廖 (2004) 以活體攻毒試驗證明，源自冷水魚的 AHNNV 可經浸泡攻毒感染石斑魚，並在石斑魚腦中測到低量 AHNNV，但魚不會死亡；AHNNV 感染之 GF-1 細胞，在 28°C 培養複製率很低，改至 15°C 培養複製率就明顯升高，顯示 NNV 的核酸複製酶活性受溫度影響很大。若兩種基因型的 NNV (如 RGNNV, SJNNV) 同時感染上一野生魚，就有可能在宿主細胞內發生兩種基因型的 RNA1 與 RNA2 重組，重組後的 NNV 將有潛力擴大 NNV 的宿主範圍。

四、結語

本研究為首篇台灣沿海野生魚感染神經壞死症病毒 (NNV) 的調查報告，發現至少有 30 種野生魚有 NNV 帶原，並發現其中許多種野生魚經常被漁民當作養殖魚的下雜魚餌料。已知 NNV 可經由餵食途徑感染石斑魚，故對帶原下雜魚的使用須謹慎。本研究又發現具迴游性烏魚有 NNV 帶原，烏魚也經常和養殖石斑成魚混養，是否會造成水平傳染，日後將繼續追蹤。

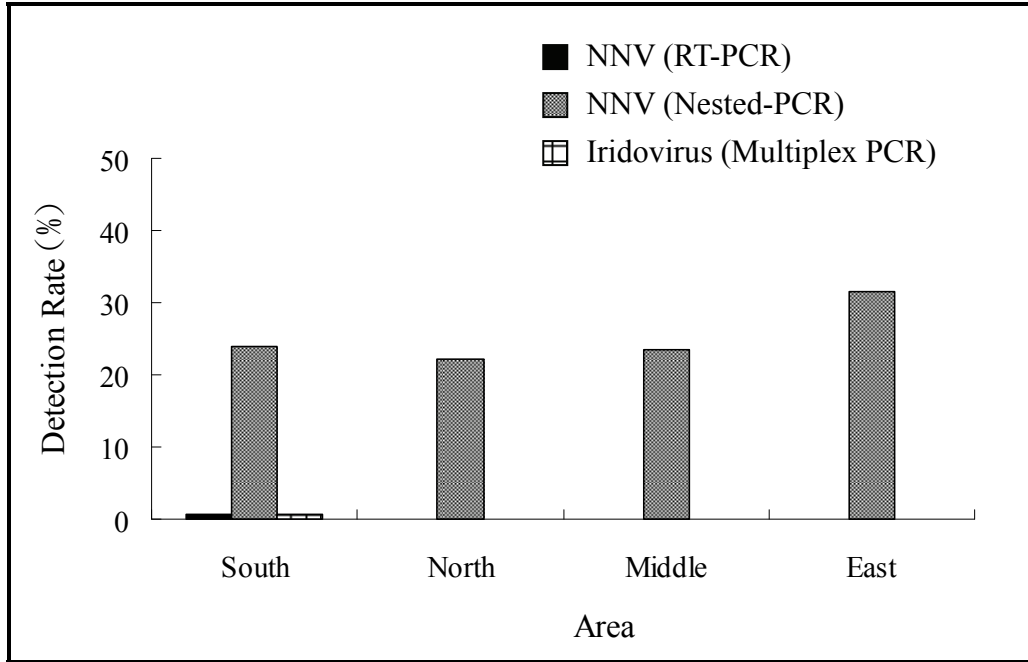
參考資料

- 劉振鄉(1991) 鯔科魚類的生物學研究。國立台灣大學動物學研究所博士論文。
- 葛國昌(1993) 海水魚類增養殖學。水產出版社。260-273 頁。
- 李榮涼(1995) 台灣農家要覽-漁業篇，養殖漁業-烏魚。財團法人豐年社。205-209 頁。
- 陳莉菁(2000) 石斑虹彩病毒之病原性與疫苗開發之研究。國立台灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文。
- 鄭存明(2001) 魚類結病毒持續性感染之研究。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- 廖睿雯(2004) 自不同魚種分離之神經壞死症病毒株病原性的比較。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- 紹冠榮(2007) 台灣沿海野生魚種帶原結病毒的田野調查與分析。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- Ahne, W., Ogawa, M. & Schlotfeldt, H. J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish (*Silurus glanis*). *Journal of Veterinary Medicine B* 37, 187-190.
- Barke, D. E., MacKinnon, A. M., Boston, L., Burt, M. D., Cone, D. K., Speare, D. J., Griffiths, S., Cook, M., Ritchie, R. & Olivier, G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, 99-105.
- Bloch, B., Gravningen, K. & Larsen, J. L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms* 10, 65-70.
- Chao, C. B., Chen, C. Y., Lai, Y. Y., Lin, C. S. & Huang, H. T. (2004). Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Diseases of aquatic organisms* 58, 127-142.

- Chao, C. B., Yang, S. C., Tsai, H. Y., Chen, C. Y., Lin, C. S. & Huang, H. T. (2002). 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.
- Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E. & Chen, S. N. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 20, 185-193.
- Chi, S. C., Shieh, J. R. & Lin, S. J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 55, 221-228.
- 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. *Journal of Fish Diseases* 27, 603-608.
- He, J. G., Wang, S. P., Zeng, K., Huang, Z. J. & Chan, S.-M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of Fish Diseases* 23, 219-222.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wadas, Y. & Sorimachi, M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology* 27, 19-21
- Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, A. & Nakai, T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 57, 19-26.
- Munday, B. L., Langdon, J. S., Hyatt, A. & Humphrey, J. D. (1992). Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture* 103, 197-211.

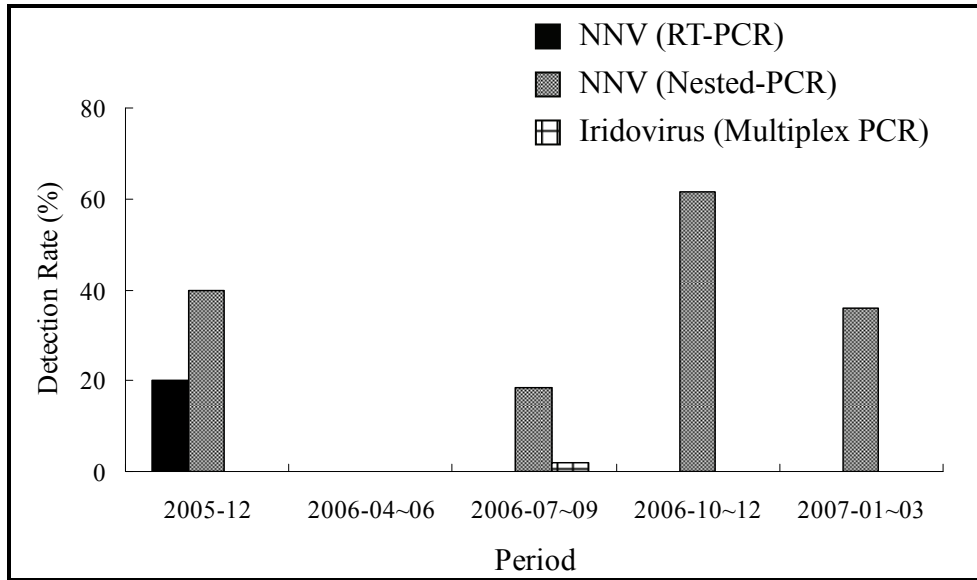
- Munday, B. L. & Nakai, T. (1997). Special topic review : nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World journal of microbiology & biotechnology* 13, 375-381.
- Munday, B. L., Kwang, J. & Moody, N. (2002). Betanodavirus infection of teleost fish : a review. *Journal of Fish Diseases* 25, 127-142.
- Nakajima, K. & Sorimachi, M. (1994). Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology* 29, 29-33.
- Nishizawa, T., Mori, K. & Nakai, T. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) . *Diseases of Aquatic Organisms* 18, 103-107.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T. & Muroga, K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. . *Applied and environmental microbiology* 63, 1633-1636.
- Ogawa, M., Ahne, W., Fischer-Scherl, T., Hoffmann, R. W. & Schlotfeldt, H. J. (1990). Pathomorphological alterations in sheatfish fry *Silurus glanis* experimentally infected with an iridovirus-like agent *Diseases of aquatic organisms* 9, 187-191
- Skirris, G. P. & Richards, R. H. (1998). Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infection. *Aquaculture* 169, 133-141.
- Wang, Y. Q., Lü, L., Weng, S. P., Huang, J. N., Chan, S. M. & He, J. G. (2007). 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.
- Zorriehzahra, M. J. (2005). Mortality of wild Golden Grey Mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea, associated with viral nervous necrosis-like agent. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 4, 43-58.

附錄 (圖、表)

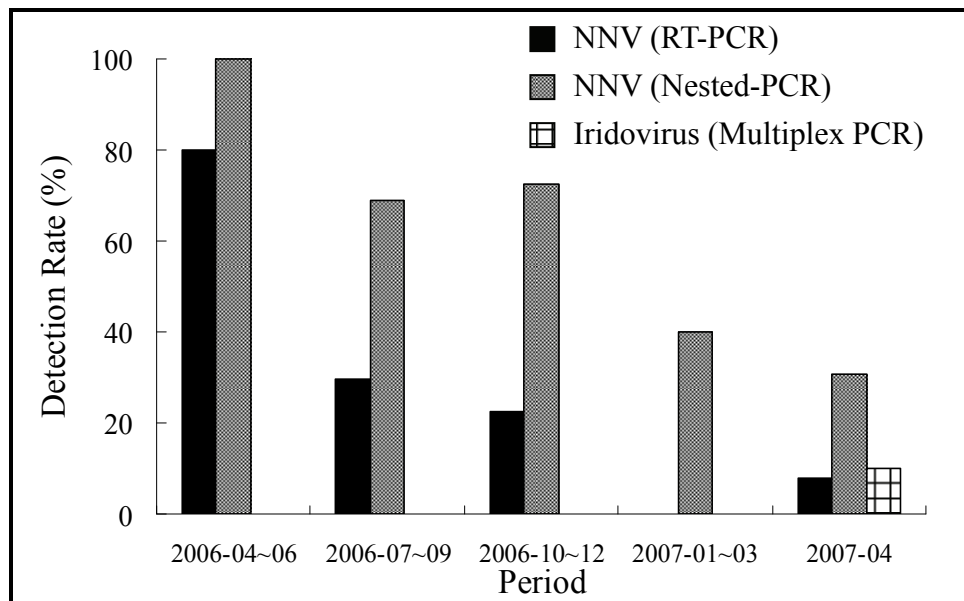


圖一、台灣各地區野生魚 NNV 及 GIV/RSIV 的檢出率。南部地區包括屏東、高雄、台南、嘉義縣市；北部地區包括台北市、新北市、基隆市；中部地區包括苗栗縣市；東部地區包括宜蘭、花蓮縣市。

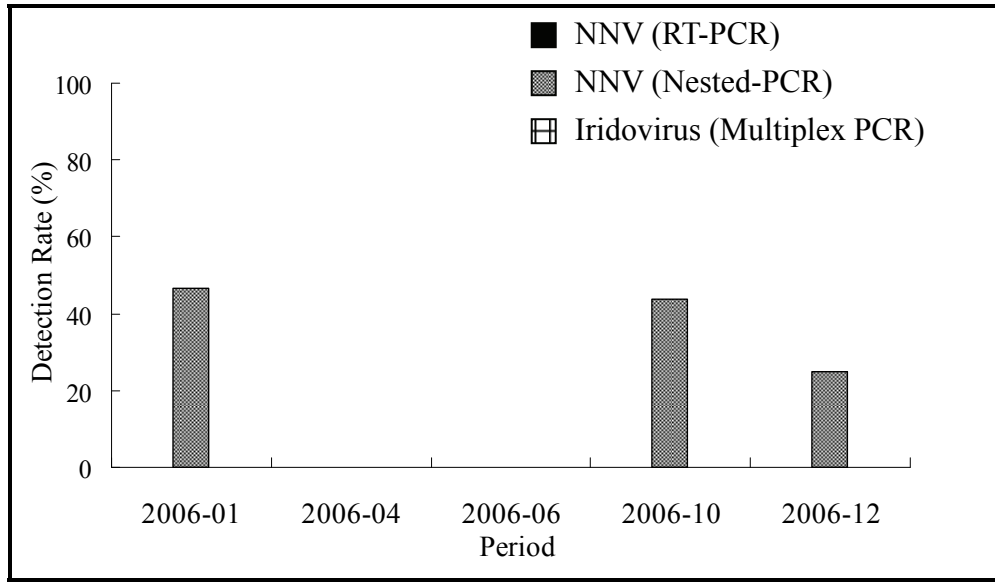
台灣沿海野生魚種帶原神經壞死症病毒之田野調查



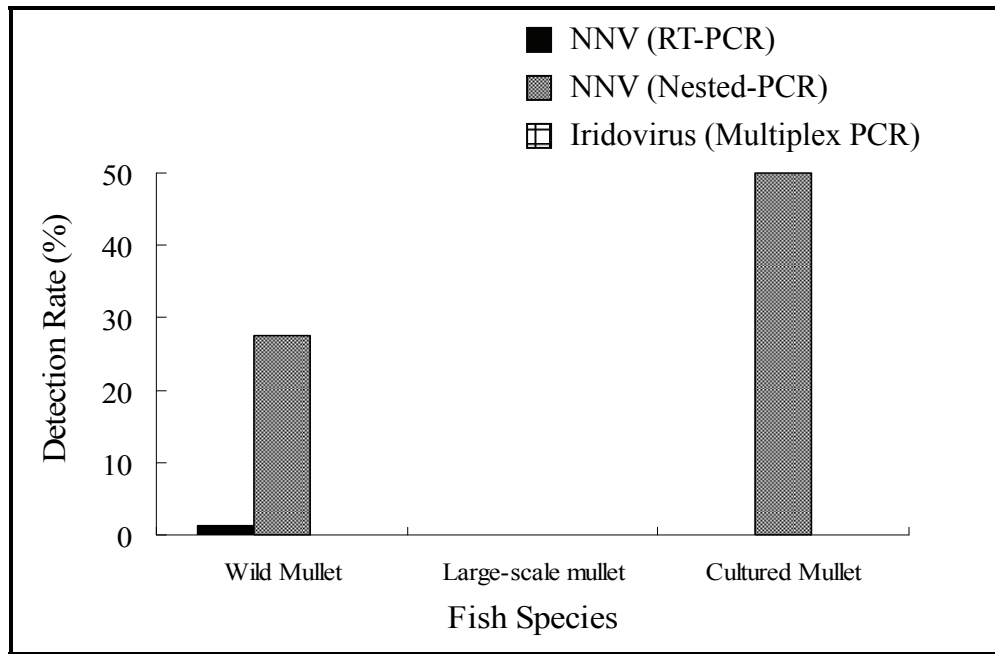
圖二、台灣南部沿海野生魚於不同季節中 NNV 及 GIV/RSIV 的檢出率。
共有 50 種採樣魚，採集地點包括屏東、高雄、台南、嘉義縣市的漁港。



圖三、台灣南部陸上養殖魚在不同季節中 NNV 及 GIV/RSIV 的檢出率。採集魚種主要有點帶石斑、龍膽石斑、藍身大石斑、金目鱸、黃蠟鰲等。魚齡大小主要為八分苗，少數為成魚。採集地點主要包括屏東、高雄、台南、嘉義。



圖四、鰻科魚類在不同季節中 NNV 及 GIV/RSIV 的檢出率。鰻科魚類主要來自基隆外海，少數是來自高雄縣。



圖五、兩種鰻科魚類 NNV 及 GIV/RSIV 的檢出率。野生烏魚 (Mullet) 及大鱗鰻 (Large-scale mullet) 主要來自基隆外海，養殖烏魚則是來自台南縣北門鄉。

台灣沿海野生魚種帶原神經壞死症病毒之田野調查

表一、樣本魚採集地點與數目

地區	包括縣市	鄉鎮市	野生魚樣本數	養殖魚樣本數
南部地區	屏東	枋寮	7	42
		東港	17	6
		佳冬	4	0
	高雄	林園	18	16
		小港	0	11
		旗津	4	0
		梓官	78	10
		彌陀	14	10
		茄萣	7	17
	台南	安平	5	0
		北門	3	37
		七股	0	11
嘉義	布袋	30	0	
中部地區	苗栗	通霄	17	0
北部地區	台北	三芝	0	1
	基隆	基隆	51	0
東部地區	宜蘭	蘇澳	15	0
	花蓮	花蓮	18	0
總 計			288	161

表二、RT-PCR、nested-PCR 及 multiplex PCR 所使用之核酸引子序列

	Target gene	Name	Sequence 5'-3'	Size of product (bp)
RT-PCR	NNV RNA2 T2	NNV-F1	5'-GGATTTGGACGTGCGACCAA-3'	870
		NNV-R3	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'	
Nested-PCR	NNV RNA2 T4	NNV-F2	5'-CGTGTCAGTGCTGTGTCGCT-3'	427
		NNV-R3	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'	
Multiplex PCR	PNP gene	PNP-F1	5'-CGCGGATCCACCATGACGGATTACG ATTTG-3'	858
		PNP-R1	5'-TTTACAAGCTTTCGCGGAAGCTCG-3'	
	RSIV <i>Pst</i> I fragment	IRD-F2	5'-TACAACATGCTCCGCCAAGA-3'	286
		IRD-R1	5'-GATAGGAGATGTGTTGGTGC-3'	

表三 野生魚檢測出有 NNV 帶原的魚種資料

魚種科別	魚種
天竺鯛科 <i>Apogonidae</i>	棘眼天竺鯛 <i>Apogon fraenatus</i>
	黃天竺鯛 <i>Apogon aureus</i>
	擬雙帶天竺鯛 <i>Apogon pseudotaeniatus</i>
石首魚科 <i>Sciaenidae</i>	丁氏叫姑魚 <i>Johnius distinctus</i>
	大頭白姑魚 <i>Pennahia macrocephalus</i>
	皮氏叫姑魚 <i>Johnius belangerii</i>
海鯰科 <i>Ariidae</i>	斑海鯰 <i>Arius maculatus</i>
鱚科 <i>Carangidae</i>	浪人鱚 <i>Caranx ignobilis</i>
	紅尾圓鱚 <i>Decapterus kurroides</i>
	黃蠟鱚 <i>Trachinotus blochii</i>
	竹莢魚 <i>Trachurus japonicus</i>

台灣沿海野生魚種帶原神經壞死症病毒之田野調查

魚種科別	魚種
長鰨科 <i>Centrolophidae</i>	刺鰨 <i>Psenopsis anomala</i>
虱目魚科 <i>Chanidae</i>	虱目魚 <i>Chanos chanos</i>
慈鯛科 <i>Cichlidae</i>	吳郭魚 <i>Oreochromis mossambicus</i>
鯡科 <i>Clupeidae</i>	日本海鰾 <i>Nematalosa japonica</i>
	花蓮小砂丁 <i>Sardinella hualiensis</i>
舌鰨科 <i>Cynoglossidae</i>	布氏鬚鰨 <i>Paraplagusia blochii</i>
鑽嘴魚科 <i>Gerreidae</i>	短鑽嘴魚 <i>Gerres erythrouros</i>
尖嘴鱸科 <i>Latidae</i>	金目鱸 <i>Lates calcarifer</i>
鰻科 <i>Leiognathidae</i>	粗紋鰻 <i>Leiognathus lineolatus</i>
單棘魷科 <i>Monacanthidae</i>	冠鱗單棘魷 <i>Stephanolepis cirrhifer</i>
鰻科 <i>Mugilidae</i>	烏魚 <i>Mugil cephalus</i>
鬚鰨科 <i>Mullidae</i>	日本緋鯉 <i>Upeneus japonicus</i>
金線魚科 <i>Nemipteridae</i>	裴氏金線魚 <i>Nemipterus peronii</i>
	白頸赤尾冬 <i>Scolopsis vosmeri</i>
馬鮫科 <i>Polynemidae</i>	六指馬鮫 <i>Polydactylus sextarius</i>
金梭魚科 <i>Sphyraenidae</i>	尖鰭金梭魚 <i>Sphyraena acutipinnis</i>
四齒魷科 <i>Tetraodontidae</i>	懷氏兔頭魷 <i>Lagocephalus wheeleri</i>
白鰨科 <i>Ephippidae</i>	圓白鰨 <i>Ephippus orbis</i>
石鱸科 <i>Haemulidae</i>	花石鱸 <i>Plectorhinchus pictus</i>
鮨科 <i>Serranidae</i>	雙帶鱸 <i>Diploprion bifasciatum</i>
	點帶石斑 <i>Epinephelus coioides</i>
	龍膽石斑 <i>Epinephelus lanceolatus</i>
	藍身大石斑 <i>Epinephelus tukula</i>
	花斑刺鰨鮨 <i>Plectropomus leopardus</i>