



魚類神經壞死病毒症研究近況

蔡佳錚 本所生物研究組

背景

魚類野田病毒 (Nodavirus) 又稱為神經壞死病毒 (nervous necrosis virus; NNV)，為感染硬骨魚之疾病，其他名稱包括：病毒性神經壞死 (viral nervous necrosis; VNN)、腦髓炎 (encephalomyelitis) 和病毒性腦病與視網膜病 (viral encephalopathy and retinopathy; VER)。1987 年由澳洲首先發現可能由 NNV 病毒感染金目鱸導致腦部病變，後續便出現更多確診的病例。在臺灣，首例出現於 1994 年發現 NNV 病毒感染孵化後棕點石斑與赤點石斑幼魚的病例[2]。NNV 病毒感染的種類傳播廣泛，現今已知超過 32 種魚種以上，橫跨冷水與溫水魚種。

魚類神經壞死病毒依病毒膜蛋白的差異可分成 4 個基因型別：TPNNV、SJNNV、BFNNV 與 RGNNV。另外有 3 個血清型，由 Nishizawa 等人於 2003 年建立血清型別與基因型別的關連性，血清型 A 對應基因型 SJNNV；血清型 B 對應 TPNNV；而血清型 C 對應基因型 BFNNV 與 RGNNV。野田病毒結構為無封套、二十面體球形病毒顆粒，病毒直徑 20-30 nm，含有兩條正向單股核糖核酸 (RNA)。屬於 *Nodaviridae* 病毒科，*Betanodavirus* 病毒屬。

傳播途徑

包含垂直傳播（介卵傳播）與水平傳播方式；水平傳播的途徑相當多種，包括與受感染的魚一起混合飼養、餵飼被 NNV 病毒污染的飼料（例如：豐年蝦、輪蟲、橈腳類）、已被病毒感染的養殖器具、汙染的水等。卵巢與受精卵中也可偵測到病毒的存在。

韓國與挪威利用反轉錄聚合酶鏈反應（RT-PCR）篩檢野生魚類感染 NNV 的情形，研究發現野生魚群中有 NNV 陽性個體的存在，且臨床症狀不明顯。這顯示野生帶原魚隻可能是箱網養殖或臨海養殖魚群感染 NNV 的水平傳播來源之一[1,7]。

診斷

一、臨床症狀

石斑魚感染後體色變黑、厭食，但主要臨床症狀的呈現和腦、視網膜處的病變位置相關，例如：可見異常的泳姿、不協調的游動（螺旋擺動、突然的猛衝）等神經症狀。NNV 病毒之發病與魚齡有相關性，多數發生在幼魚階段（表 1），發病時魚齡越小造成的死亡率越高。而近年來則有研究發現有些魚種例如：海鱸（歐洲鱸）、石斑與大西洋比目魚在長至收成大小時也有死亡案例發生，疫情發生常與高水溫環境及疾病的出現時機有關。

表 1、不同魚種之幼魚感染 NNV 病毒的特徵。

魚種	NNV 最早發生 臨床症狀的時間	一般 NNV 臨床 症狀發生時期	最晚發生臨床 症狀時間	通常 NNV 造 成的死亡率	NNV 最高可造 成的死亡率
金目鱸	孵化後第 9 天	孵化後 第 15-18 天	孵化後 第 24 天之後	50~100%	1 個月內 100%死亡
赤點石斑	孵化後第 14 天 (體長 7-8 mm)	體長 9-10 mm	體長小於 40 mm	80%	可達 100%
馬拉巴石斑	---	體長 20-50 mm	---	50-80%	---
縱帶鱖	孵化後第 1 天	孵化後第 1-4 天	孵化後 20 天內 (體長 8 mm 以內)	100%	---

Munday *et al.*, 2002

二、組織病理學診斷

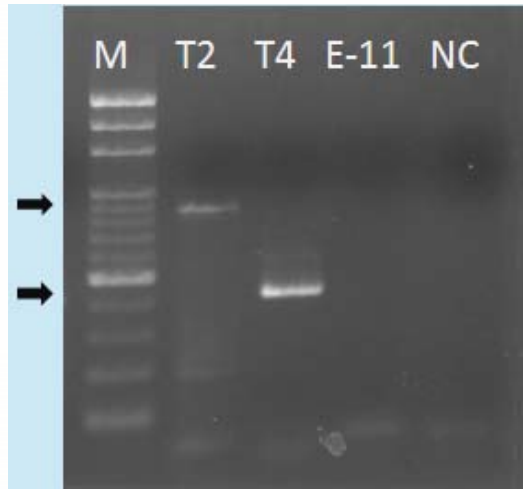
感染病魚的中央神經系統與視網膜可見明顯空泡化病灶，通常是前腦病變比後腦、脊髓還要嚴重，大腦灰質空泡化比白質嚴重。雖然神經組織是病毒感染的標的組織，但 NNV 病毒也會感染其他組織。NNV 病毒在其他組織的傳播分佈情形與魚齡和魚種有關，例如 NNV 病毒感染鱸魚幼魚時，病變明顯侷限在神經組織內，但在縱帶鱖幼魚急性感染下，體表增生表皮中也有病毒存在，另外在大西洋比目魚 (Atlantic halibut) 幼魚中則是很多臟器都可以檢測到病毒[8,11]。病毒感染石斑時，GNNV 病毒不僅在腦、視網膜出現，在鰓、骨骼肌、肝臟、胃腺體、腸道與心臟中的血球皆可以發現[2]。

三、實驗室檢測

- (一) 檢測病毒核酸：利用設計出具特異性的引子，經反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 增幅出產物來判讀 (圖 1 a)。其優點是敏感度高，但需技術性及花費較昂貴。
- (二) 檢測病毒蛋白質：快速檢測試劑套組適用於魚場臨床的檢測，現今已有商品化套組，優點是檢測時間短、操作便利，但缺點是敏感度較 RT-PCR 低。

(三) 檢測魚隻體內抗體：以酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 檢測病毒激起感染魚隻免疫系統所產生抗體，藉由偵測抗體判定魚隻曾否感染。

(a)



(b)

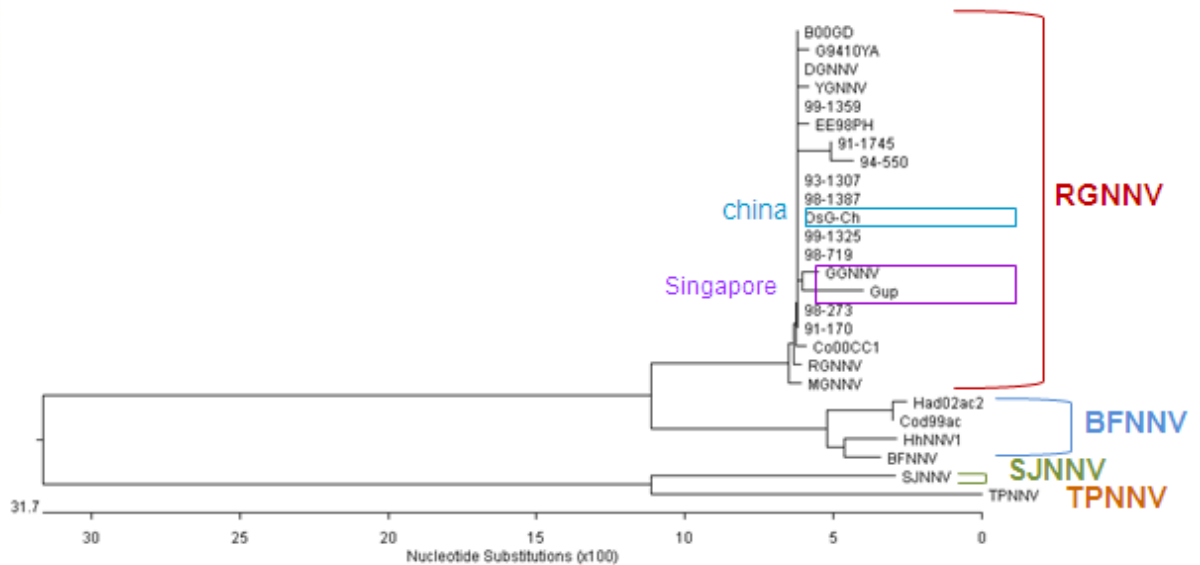


圖 1、(a) 電泳結果，利用引子 F-2、R-3 與 F-1、R-3 (Nishizawa *et al.*, 1994) 的 RT-PCR 產物。T2 片段產物為 875 bp，T4 片段產物 426 bp。(b) 分子演化樹狀圖，依 NNV 病毒膜蛋白設計出之 RT-PCR 產物 (T2 片段) 結果，包含臺灣、中國與新加坡分離之 NNV 病毒株。

臺灣分離的病毒株和基因序列比對結果

針對 1994 ~2001 年臺灣 NNV 分離株進行核苷酸 159~988 序列 (T2 片段) 比對，屬於 RGNNV 基因型別，相似度達 98.7% 以上[3]，本所也陸續從 2002、2004、2005、2009、2010 年所獲得之分離株進行比對，也屬於 RGNNV 基因型別，相似度達 97.8% 以上。由此可知，自 1994 年至今 NNV 病毒序列並無太大改變，且 RGNNV 一直是台灣占優勢之基因型別。另外新加坡從孔雀魚與鱸滑石斑分離到之 NNV 病毒和中國從點帶石斑分離的病毒，兩者也是屬於 RGNNV 的基因型別 (圖 b)。Iwamoto 等人 (1999) 利用 SSN-1 細胞株分離病毒，研究發現不同型別的病毒株對溫度有偏好。NNV 基因型別與地區性有很高的相關性，日本(南端)、南韓、中國、臺灣、新加坡與泰國的亞洲國家屬於 RGNNV，甚至南至澳洲也有 RGNNV 的病例出現[4,6,7,12]。而 BFNNV 病毒株則多感染冷水魚種，分布國家包括加拿大、北美沿岸[4] (圖 2)。

另外，在臺灣也發現 NNV 感染歐洲鰻、黃臘鯪、橫笛鯛、海鱸及淡水鯰魚的首次感染報告[2]，本所也首次發現 NNV 感染日本鰻 Japanese eel (*Anguilla japonica*)、蓋斑鬥魚 Paradise Fish (*Macropodus opercularis*)、烏魚 Sea mullet (*Mugil cephalus*)、台拉燕魚 Orbicular batfish (*Platax orbicularis*)、川紋笛鯛 Red emperor (*Lutjanus sebae*)、四絲馬鮫 East Asian fourfinger threadfin (*Eleutheronema rhadinum*) 的病例。菲律賓也有 NNV 感染籃子魚 Rabbitfish、銀紋笛鯛 Red snapper、虱目魚 Milkfish、吳郭魚 Tilapia 的報告 [5]，可見 NNV 病毒感染魚種之廣泛。

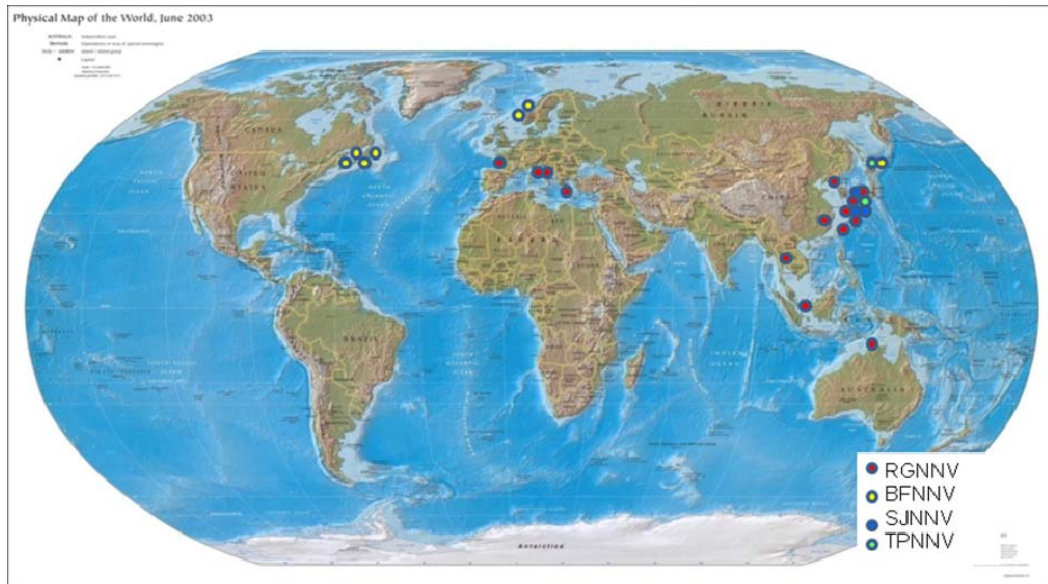


圖 2、NNV 不同基因型別的分佈區域示意圖。

疫苗研發

目前尚未有商品化疫苗出現，但在實驗階段已有不少發表的疫苗研究。在不同魚齡需選用不同的免疫形式，例如免疫時機要考慮魚隻免疫系統發育完全與否、吋苗以下體長的魚苗無法使用注射的方式、種魚的免疫等。目前研發中的疫苗種類與劑型如表 2 所示。

疾病防治

不同魚種的免疫能力也不同，曾經發病耐過的魚隻也有可能因環境緊迫增加（密飼、水質變差）及生殖壓力而再次發病或排毒。病毒感染發病的魚隻沒有藥物可以治療，減少感染機會、預防病毒入侵才是上策。為清除或預防 NNV 病毒感染的手段，即是阻斷病毒傳播的途徑與減少病毒含量為主。當我們了解病毒的傳播方式後，便能夠利用有效的方法預防與清除 NNV 的傳播。清除病毒的方式包含：以 RT-PCR 篩檢帶原魚隻並淘汰之、受精卵臭氧消毒、降低種魚生產次數（減少產卵壓力）、良好的自衛防疫（用具、水、餌料生物的消毒、引進乾淨的魚隻與人員的自身清潔、養殖環境的提升等）。

表 2、目前研發中的疫苗劑型

疫苗劑型		魚隻免疫方式	使用魚隻品種	攻毒方式	發表疫苗研究來源	
不活化方式	使用 NNV 基因型別					
不活化疫苗 Inactivated vaccine	BEI 不活化	RGNNV	浸泡	0.22 克重， 2.4 公分體長 石斑	浸泡與肌肉 注射	Chi SC et al., 2008
	0.5 % 福馬林不活化	RGNNV	腹腔注射	12.3 克重 石斑	肌肉注射	Yamashita H et al., 2005
				25.4 克重 石斑		Yamashita H et al., 2009
	0.5 % 福馬林不活化	RGNNV	腹腔注射	5.5 克重 金目鱸	肌肉注射	Parkingkin g Jr R et al., 2009
				5 克重石斑		Parkingkin g Jr R et al., 2010
佐劑處理	RGNNV	肌肉注射	1.35 公斤重 石斑種魚	—	Chi SC et al., 2010	
類病毒顆粒 Virus-like particle (VLPs)	純化的類病毒顆粒	RGNNV	肌肉注射	歐洲鱸	肌肉注射	Thiéry R et al., 2006
	純化的類病毒顆粒	RGNNV	肌肉注射	20 克重 石斑	—	Liu W et al., 2006
重組次單位疫苗 Recombinant subunit vaccine	病毒膜蛋白	SJNNV	肌肉注射	28 克重 石斑	肌肉注射	Tanaka S et al., 2001
	病毒膜蛋白	SJNNV	腹腔注射	570 克重 鮭鱒魚	—	Húsgard S et al., 2001
			Oil-emulgated	695 克重 大西洋比目魚	—	Sommerset et al., 2001
生物包埋口服疫苗 Bioencapsulated oral vaccine	重組抗原蛋白(由大腸桿菌表現)餵飼給豐年蝦	—	口服	2.5 公分體長 石斑	腹腔注射	Lin et al., 2004

備註：浸泡 (bath)、口服 (oral)、腹腔注射 (IP)、肌肉注射 (IM)

參考文獻

1. Barker DE, MacKinnon AM, Boston L, Burt MD, Cone DK, Speare DJ, Griffiths S, Cook M, Ritchie R, Olivier G. First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 99-105, 2002.
2. Chi SC, Lo BJ, Lin SC. Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases* 24, 3-13, 2001.
3. Chi SC, Shieh JR, Lin SJ. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Disease of Aquatic Organism*. 55, 221-228, 2003.
4. Gagné N, Johnson SC, Cook-Versloot M, Mackinnon AM, Olivier G. Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 181-189, 2004.
5. Gilda D LP, Ma. Michelle DP. Detection and Identification of viral pathogens in marine finfish cultured in the Philippines. *Recent Advances in Diagnosis and Prevention of Fish and Shrimp Diseases in Southeast Asia*. 2005. ISBN 971-8511-73-3.
6. Gomez DK, Sato J, Mushiake K, ISShiki T, Okinaka Y, Nakai T. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases* 27: 603-608, 2004.
7. Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca CH. Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *Journal of Vet Diagnosis Investiment* 20:38-44, 2008.
8. Grotmol S, Bergh O, Totland GK. Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of Atlantic halibut *hippoglossus hippoglossus*. occurrence of nodavirus in various organs and possible route of infection. *Disease of Aquatic Organism*, 36,95-106, 1999.
9. Munday BL, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: A review. *Journal of Fish Diseases* 25, 127-142, 2002.
10. Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T, Muroga K. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and*

Environment Microbiology (Apr) 1633-1636, 1997.

11. Nguyen HD, Nakai T, Muroga K. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. Diseases of Aquatic Organism 24, 99-105, 1996.
12. Nishizawa T, Mori KI, Nakai T, Furusawa I, Muroga K. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) . Diseases of Aquatic Organism 18: 103-107, 1994.

