

養殖魚類疾病之檢診服務及監測

黃淑敏*、涂堅、程健智、郭舒亭、林上海、蕭終融
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

利用病毒分離、PCR技術、API生化鑑定套組與16S rRNA基因選殖定序等技術進行台灣重要養殖魚類之病毒及細菌性疾病診斷與監測，從2004年1月份至12月份共收集820個病例，自病例資料來源分析顯示民間自送病例共計673例（佔82%）；各縣市動物疾病防治所及機關學校病例共計51例（佔6.2%）；輸出及輸入國檢疫病例共計57例（佔6.9%）；其它試驗研究病例共計39例（佔4.7%）。水產動物病例種類分析結果顯示養殖淡水魚佔15.4%；養殖海水魚佔66%；觀賞魚佔6.2%；貝類佔0.3%；兩棲類佔4.3%；甲殼類佔6.5%；其他未知魚種隻病例佔1.3%。疾病診斷分析結果，在細菌性疾病共檢出252例（佔37.3%），其中以94株鏈球菌（*Streptococcus iniae*）為最多、23例（佔9.1%）奴卡氏菌（*Nocardia seriolae*）次之，以上兩種細菌為最常見且廣泛發生於海水及淡水魚種。而 *Vibrio Spp* 共計25例（佔9.9%）且好發於夏天；*Aeromonas hydrophila*計16例（佔6.3%），且好發於夏天；*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 計12例(佔4.7%) 並好發於冬天。病毒性疾病共計診出327例，其中虹彩病毒感染症（Iridovirus infection）160例(佔49%)、病毒神經壞死病毒感染症（Virus nervous necrosis virus）為114例（佔36.2%）、虹彩病毒及病毒神經壞死病毒合併感染共計42例（佔13%）、4例淋巴囊腫症、5例錦鯉疱疹病毒感染症、2例螃蟹之Birnavirus-like感染症；8例寄生蟲感染性疾病及1例水黴病及其他病因6例等共計7例。由以上結果顯示目前養殖魚類重要病毒性疾病主要以虹彩病毒感染症及病毒神經壞死感染症為主，細菌性疾病以鏈球菌、奴卡氏菌及弧菌為主，本結果可提供作為疫苗研發或防疫政策參考等所需，以解決養殖業者對水產疾病發生之困擾。

關鍵字:養殖魚類、診斷、魚類疾病

前言

國內既有之水產動物疾病，隨著飼養的環境及氣候溫度之劇烈變化，疾病之發生率亦隨之增加，我國水產養殖環境大多為密集式飼養，更亦因緊迫等因素造成疾病發生率增高，且我國加入WTO後，國際間水產品自由輸入我國，同時增加海外水產動物傳染病境外移入之機會，因此水產動物疾病之診斷、防治與監

測急需解決。本試驗利用本所已開發出部分魚類之細胞株與PCR技術，進行魚類病毒性疾病之分離與研究；而細菌性疾病則於培養分離後，進行API生化測定或16SrRNA基因選殖定序等技術來檢診。再依據疾病發生之概況進行分析探討，以瞭解我國水產動物疾病疫情發生情形並提供疫苗研發或防疫政策等參考所需，目的乃為預防水產動物疾病發生減少養殖戶損失並提昇養殖產業之國際競爭力。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

材料與方法

病例來源

本試驗之檢體來源為各縣市動物防疫機關、學術研究單位、機關學校、私人開業獸醫師、養殖業者及觀賞魚業者等，主動送至本所及本所定期主動前往養殖場採材。

病例魚種種類

本試驗共計有日本鰻、歐洲鰻(白鰻)、吳郭魚、七星鱸、加州鱸、金目鱸、條紋鱸、毛蟹、水晶蝦、白蝦、泰國蝦、淡水蝦、草蝦、石斑、虎斑石斑、龍膽石斑、金錢斑、東星石斑(紅條)、曳絲鑽嘴魚、花身雞魚、虱目魚、星雞魚(金鈴)、台拉燕魚(樹葉)、短棘(金僧)、四絲馬(午仔魚)、短鰭紅沙(黃臘鯪)、黃金鯪、黃金鮚、鮚魚、赤鰭笛鯛(紅魚)、銀紋笛鯛(紅槽)、苦身雞魚(金錢魚)、川紋笛鯛、白星笛鯛(白點)、條紋簾鯛(銅盤)、黃錫鯛(枋頭)、海鱸、筍殼魚、烏魚、鱧魚、鱒魚、丁桂魚、香魚、紅燕尾、非洲王子、七彩神仙、蓋斑鬥魚、錦鯉、珠鱗、粗首鱯、孔雀魚、金魚、福壽螺、蜆、九孔、甲魚、牛蛙、及虎皮蛙等 58 種水產動物。

病毒分離及鑑定

將檢診服務檢驗病材以研鉢研磨，並加入 Leibovitz's L-15 Medium 培養液 (Gibco™, Grand Island, N.Y.)，以 2000 x g，4°C 離心 10 分，取上清液以 0.45 μm 過濾膜過濾，濾過液經 10 倍及 100 倍稀釋後，海水魚病材接種 0.5 mL 過濾液於自行開發之石斑魚腎臟及胚胎細胞株，淡水魚則接種在 FHM、EPC、BF-2、RTG-2 細胞株，於 25°C 感作 1 小時，加入含 2% 胎牛血清之 L-15 培養液，每日觀察細胞病變之出現。若 10-15 日後無細胞病變出現，則再冷凍解凍細胞一次，重新盲目繼代後予以判定結果。若有細胞病變之形成則先以電子顯微鏡檢查，再以分子生物學方法做鑑定如進行 Random PCR 反應、基因選殖定序等方法確認。

細菌病原鑑定

檢體以無菌操作釣取細菌，塗抹於含 5% 之綿羊血血液培養基 (BBL™, Spark, M.D.) 並於 25°C 培養

48 小時，以 API 套組 (API® 20E、API® 20NE、API® 20Strep、API® Staph) 進行生化鑑定；若懷疑抗酸菌則塗抹在 Lowenstein-Jenson 培養基 (BBL™, Spark, M.D.)，25°C 培養 1 週後進行鑑定。若生化反應無法鑑別時則以 PCR 增幅細菌之 16S rRNA 基因產物，產物利用選殖套組 (TOPO-TA Cloning® Kit) 進行接合、轉化等作用，挑選菌落培養增菌，萃取質體經限制酵素切割，電泳分析確認後進行定序工作。

病毒RNA核酸萃取

將組織臟器乳劑或病毒培養液取 100 μL，並加入 1 mL 的 TRIzol® Reagent (Gibco BRL®, Grand Island, N.Y.) 萃取其 RNA，經劇烈震盪 30 秒後，靜置於室溫下 5 分鐘，再加入 200 μL 的 chloroform (Merck, Darmstadt, Germany)，劇烈震盪 15 秒後，置於室溫下 15 分鐘，於 4°C 下 13,000 xg 離心 15 分鐘，取上清液並移到另一個 1.5 mL 滅菌離心管中，加入 500 μL Isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)，靜置於室溫下 10 分鐘以沉澱 RNA 後，並於 4°C 下 13,000 xg 離心 20 分鐘。下層的 RNA 沉澱物以 1 mL 之 70% 酒精清洗，再靜置於無菌操作台內約 5 分鐘使 RNA 乾燥，最後以 20 μL diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma, St. Louis, MO) 處理過的無菌水溶解 RNA。

病毒DNA核酸萃取

萃取步驟應用 QIAamp® DNA Mini Kit 進行，取 100 μL 乳劑加入 1.5 mL 的微量離心管中，加入 100 μL ATL 試劑及 20 μL Proteinase K 振盪，並置於 56°C 加熱 30 分鐘，再加入 200 μL 之 AL 試劑震盪 15 秒，置入 70°C 加熱 10 分鐘。而後加入 200 μL 100% 的酒精，震盪 15 秒後以 8,000 rpm，25°C 離心 1 分鐘。取一個 spin column 將樣品加入其中，用 8,000 rpm，25°C 離心 2 分鐘，丟棄收集管及廢液。加入 500 μL AW1，以 8,000 rpm，25°C 離心 2 分鐘，丟棄收集管及廢液。再加入 500 μL AW2，以 1,4000 rpm，25°C 離心 5 分鐘，丟棄收集管及廢液。最後加入 200 μL 的 AE buffer 以 8000 rpm，25°C 離心 2 分鐘，收集濾過液。

聚合酶鏈鎖反應

於 0.2 mL 離心管中加入 5 μ L 之待測樣品、0.5 μ L *Taq* DNA polymerase (5 units/ μ L; GibcoBRL[®], Gauthersburg, MD)、5 μ L 之 10 x PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4、500 mM KCl 及 1% Triton x-100)、1.5 μ L 之 25 mM MgCl₂、1 μ L 之 10 mM dNTP mixture (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) 及 2.5 μ L 之 10 μ M primers，各組反應的引子序列如表一、表二。最後加入 37.5 μ L 之無菌去離子水，使總反應液達到 50 μ L。將上述所列之參與反應物置於管中振盪使混合均勻，經短暫快速離心，使所有反應試劑均位於微量離心管底部後，放入 PCR 反應器 (MJ Research, INC, USA) 中進行聚合-連鎖反應。每一循環之反應條件為：先以 94 $^{\circ}$ C 進行 10 分鐘，再依次為 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，57 $^{\circ}$ C 2 分鐘及 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，共進行 30 個循環增幅反應，最後以 72 $^{\circ}$ C 作用 7 分鐘將未完成的反應完成，並將 PCR 產物以 2% 洋菜膠 (FMC[®], Rockland, M.E) 進行電泳分析，確認增幅產物之長度。

基因選殖定序

將萃取的 DNA 以 TOPO-TA Cloning[®] Kit Dual Promoter 及 PCR[®] II 載體 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 進行基因選殖，其選殖之過程包括：(1) 接合作用 (2) 轉形作用 (3) 篩選 (4) 質體之純化 (5) 限制酶切割 (6) 基因定序分析 (7) 基因比對分析。(1) 接合作用-將 4 μ L 之 PCR 產物、1 μ L 之 Salt solution、1 μ L 之 TOPO[®] 載體置入 1.5 mL 離心管中混合，於室溫下作用 5 分鐘進行接合反應，將作用後的產物置於 4 $^{\circ}$ C，以供進行轉形作用。(2) 轉形作用-以 heat shock (42 $^{\circ}$ C, 30 秒) 方式進行轉形作用，將 50 μ L 之 One Shot[®] Chemically Competent *E. coli* 自 -70 $^{\circ}$ C 冰箱取出，置於冰上解凍，再加入 2 μ L 上述接合作用後之產物，經混合後置於冰上作用 30 分鐘，然後進行 heat shock 反應，即於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中反應 40 秒，將此溶液立即置於冰上 2 分鐘，再加入 250 μ L S.O.C 培養基，並於 37 $^{\circ}$ C 水平式搖動培養 1 小時，培養後的菌液即可進行篩選的步驟。(3) 篩選-分別將 50 μ L 及 200 μ L 轉形作用後之菌液，均勻塗抹

在兩個含有 LB/Ampicillin/X-gal/IPTG 之培養基 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Bactoagar, Ampicillin 50 μ g/ml) 上，置入含 5% CO₂ 之恆溫箱於 37 $^{\circ}$ C 培養 18 小時；選擇數個白色單獨菌落，分別置入於 5 mL 之 LB/Ampicillin broth 中 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, Ampicillin 50 μ g/mL)，於 37 $^{\circ}$ C 水平式搖動下進行增菌 18 小時，培養後之菌液保留 2 mL 並與 1 mL 之 100% 甘油混合均勻後立刻置於 -70 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存，其餘之 3 mL 進行質體之純化，並進一步確定基因的載入是否成功。(4) 質體之純化-應用 QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 及其所附之步驟進行。將篩選及培養後之菌液 3 mL 於 4 $^{\circ}$ C 下以 5,000 $\times g$ 離心 10 分鐘，倒棄上清液後加入 250 μ L 之 P1 溶液，並將菌塊完全懸浮，再加入 250 μ L 之 P2 溶液，於室溫下靜置 5 分鐘，再將菌液與 250 μ L 之溶液 P3 混合均勻後冰浴 30 分鐘，以 13,000 $\times g$ 離心 10 分鐘並抽取其上清液加入 QIA prep column 中進行過濾，以 750 μ L 清洗緩衝液沖洗管柱 2 次，最後以 50 μ L 之 buffer EB 沖洗出管柱中的質體，加入等量之 Isopropanol，並於 4 $^{\circ}$ C 13,000 $\times g$ 下離心 20 分鐘沉澱質體，加入 0.5 mL 70% 酒精清洗質體，以 13,000 $\times g$ 離心 5 分鐘，倒掉上清液並將離心管置於室溫下風乾 10 分鐘，加入 20 μ L 之滅菌的蒸餾水溶解純化的質體後進行限制酶之切割及電泳分析。(5) 限制酶切割-以限制酶 *EcoR*I (Promega, Madison, WI) 進行質體切割反應，以確定 PCR 產物是否成功載入質體中。取 10 μ L 質體、1 μ L 限制酶 *EcoR*I (12 unit/ μ L)、2 μ L 10 x buffer H 及 7 μ L 滅菌之二次蒸餾水使反應總體積為 20 μ L，於 37 $^{\circ}$ C 下作用 2 小時，作用完成後，取 10 μ L 反應後之溶液，以 1 x TAE buffer 泡製的 2% 洋菜膠進行電泳分析，選擇載入核酸片段正確的質體進行定序。(6) 選殖基因之定序-核酸序列分析以 PE *Taq* DiDeoxy terminator cycle sequencer (Applied Biosystems Inc., CA, USA) 進行。(7) 利用 BLAST 系統進行基因序列比對。

結果

病例來源分析

執行九十三年度「養殖魚類疾病之檢診及監測」計畫，利用病毒分離、PCR 技術、API 生化鑑定套組與 16S rRNA 基因選殖定序等技術進行病毒性及細菌性疾病之診斷與監測，全年共收集 820 個病例，自病例資料來源分析顯示民間自送病例計 673 例（佔 82%）；各縣市動物疾病防治所及機關學校病例計 51 例（6.2%）；輸出及輸入國檢疫病例計 57 例（佔 6.9%）；其它試驗研究病例計 39 例（佔 4.7%），結果詳見圖三。

水產動物種類及病例數

檢送的病例中依其水產動物種類分析，本年度共計有日本鰻、歐洲鰻（白鰻）、吳郭魚、七星鱸、加州鱸、金目鱸、條紋鱸、毛蟹、水晶蝦、白蝦、泰國蝦、淡水蝦、草蝦、石斑、虎斑石斑、龍膽石斑、金錢斑、東星石斑（紅條）、曳絲鑽嘴魚、花身雞魚、虱目魚、星雞魚（金鈴）、台拉燕魚（樹葉）、短棘鰻（金僧）、四絲馬鮫（午仔魚）、短鰭紅沙（黃臘鰻）、黃金鰻、黃金鮫、鮫魚、赤鰭笛鯛（紅魚）、銀紋笛鯛（紅槽）、苦身雞魚（金錢魚）、川紋笛鯛、白星笛鯛（白點）、條紋簾鯛（銅盤）、黃錫鯛（枋頭）、海鱸、筍殼魚、烏魚、鱧魚、鱒魚、丁桂魚、香魚、紅燕尾、非洲王子、七彩神仙、蓋斑鬥魚、錦鯉、珠鱗、粗首鱗、孔雀魚、金魚、福壽螺、蜆、九孔、甲魚、牛蛙、及虎皮蛙等 58 種水產動物，依其分類科別統計病例數如下：鰻魚科（24 例）、吳郭魚（10 例）、鱸魚科（75 例；其中以金目鱸佔 71 例）、其他重要淡水魚（17 例）、石斑科（242 例）、鮫魚（3 例）、鰻科（3 例）、笛鯛科（93 例）、鯛科（2 例）、海鱸（106 例）、其他重要海水魚類（92 例，其中短棘鰻佔 43 例；午仔魚佔 24 例）、觀賞魚（51 例，其中錦鯉魚為 39 例）、貝類（3 例）、兩棲類（35 例，其中虎皮蛙為 27 例）、蟹類（2 例）、蝦類（51 例，其中泰國蝦為 22 例；白蝦為 18 例）、其他走私魚、無名魚（11 例）。統計分類水產動物結果顯示養殖淡水魚佔 15.4%（其中鱸魚為 75 例為

最高）；養殖海水魚佔 66%（其中石斑為 242 例、海鱸為 106 例、笛鯛科海水魚為 93 例等為較多之魚種、短棘 為 43 例、四絲馬鮫為 24 例）；觀賞魚佔 6.2%（其中錦鯉魚為 39 例）；貝類佔 0.3%；兩棲類佔 4.3%；甲殼類佔 6.5%；其他未知魚種病例佔 1.3%，統計結果如圖四。

水產動物病例檢測結果分析

疾病診斷分析結果，細菌性疾病共檢出 252 例，其中以 94 株鏈球菌（*Streptococcus iniae*）為最多，佔 37.3%、23 株諾卡氏菌（*Nocardia seriolae*）次之，佔 9.1%，以上兩種細菌為最常見且廣泛發生於海水及淡水魚種。而 *Vibrio SPP* 共計 25 例，佔 9.9%，其中 *Vibrio alginolyticus* 為 13 例，*Vibrio parahaemolyticus* 為 3 例，*Vibrio vulnificus* 為 9 例，本菌好發於夏天；*Aeromonas hydrophila* 計 16 例，佔 6.3% 本病好發於夏天；*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 共計 12 例，其中 10 例發生於海鱸，佔 4.7%，本病好發於冬天；*Streptococcus agalactiae* 感染症共計 6 例大都發生於吳郭魚及海鱸，此外，鱒魚病例分離出海洋型分枝桿菌（*Mycobacteria marinum*），為新出現之疾病，統計結果如圖五。病毒性疾病共計診斷出 327 例，其中虹彩病毒感染症為 160 例（佔 49%），以石斑佔 77 例、笛鯛科 19 例、其他重要海水魚 18 例、鱸科魚類 14 例、鰻魚 8 例、兩棲類 12 例、海鱸 6 例等為較多；而野田病毒感染症 114 例（佔 36.2%），以石斑 56 例及赤鰭笛鯛 36 例為較多、其中虹彩病毒及野田病毒合併感染共計 42 例（佔 13%）、4 例淋巴囊腫症、5 例錦鯉 疹病毒感染症、2 例螃蟹類 birnavirus 感染症，統計結果如圖六。本年度統計之寄生蟲感染性疾病共有 8 例，主要以車輪蟲、指環蟲、鐘型蟲及白點蟲感染為主，其他疾病為 1 例水黴病及其他病因 6 例等共計 7 例。

討論

台灣的養殖場現今主要的細菌性疾病，以鏈球菌（*Streptococcus iniae*）、奴卡氏菌（*Nocardia seriolae*）及弧菌（*Vibrio spp.*）為主，其中

Streptococcus iniae 及 *Nocardia seriolae* 在全年度都會高的發生率且無好發季節的特異性；而日本的 *Nocardia* 感染則好發於秋天(6)，*Nocardia seriolae* 可感染的魚種宿主非常廣泛，可侵犯淡水魚及海水魚，被感染魚體會造成全身之肉牙腫病變，將細菌包裹於肉牙腫內，以躲避免疫細胞的攻擊，若不幸感染本病則必須長期投藥才能控制，且一旦感染本病後要自養殖場內清除是非常困難的。台灣的 *Streptococcus* infection 主要有兩種病源 *Streptococcus agalactiae* 及 *Streptococcus iniae*，其中 *Streptococcus agalactiae* 好發於吳郭魚但亦在海水魚(海鱸)上發現。*Streptococcus iniae* 在台灣之感染率非常高且全年都會發生感染，可感染於淡水魚及海水魚；日本的 *Streptococcus iniae* 則好發於高水溫期，且於 1997 年即以福馬林不活化疫苗控制本病，因此，本病亦為現今養殖魚類必須加以重視的重要疾病。弧菌感染症 (*Vibrio* spp. infection)，在分析病例中以 *Vibrio alginolyticus* 為主，此結果與地中海國家的弧菌感染症相似(7)，此病會對幼苗、幼魚及成魚造成感染。*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 在分析病例中主要好發冬天，此結果與中東地區、日本相似。本年度新分離之海洋型分支桿菌 (*Mycobacterium marinum*)，在台灣首先被發現，相對的本病在地中海地區亦為其主要的流行的疾病。目前養殖魚類重要病毒性疾病主要以虹彩病毒感染症 (Iridovirus infection) 及病毒神經壞死病毒感染症 (viral nervous necrosis infection) 為主，虹彩病毒感染症在台灣主要有兩種，一種為淋巴囊腫型；另依為內臟型虹彩病毒感染，目前這兩種疾病都普遍存在台灣淡水、海水之養殖場及箱網養殖，也廣泛發生於新加坡、日本、中東地區及中國大陸(2)。目前日本已研發內臟型虹彩病毒的不活化疫苗來控制本病(3,4)。日本的病毒神經壞死病毒，好發於夏天，此病毒可從種魚的生殖腺、受精卵、魚苗以至二吋幼苗階段等皆可被偵測出，以上兩種病毒已散佈世界各地，造成全球養殖業相當大的損失。臺灣養殖的生產模式，基本上分為種魚、仔魚、稚魚、成魚、銷售等階段之分工制，與歐美、日本從種魚到養成的一貫作業生產方式不同，因此當有垂

直感染的疾病發生時，其防治的方法是非常困難的，所以必須發展一個敏感性高之檢測工具以期早期偵測本病毒，以減少養殖戶之損失。

參考文獻

1. Gilad, O., S.Yun, K.B. Andree, M. A. Adkison, A. Zlotkin, H.Bercoier, A.Eldar, R. P.Hedrick. 2002. Initial characteristics of kol herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. Dis. Aquat. Org. 48: 101-108.
2. Kazuhiro Nakajima, Kiyoshi Inouye, Minoru Sorimachi. 1998. Viral disease in cultured marine fish in Japan. Fish Pathol 33(4): 181-188.
3. Kazuhiro Nakajima, Yukio Maeno, Atsushi Honda, Kenichi Yokoyama, Tetsuro Tooriyama, Sadao Manabe.,1999. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. Dis Aquat. Org 36: 73-75.
4. Kazuhiro Nakajima, Takafumi Ito, Jun Kurita, Hidemasa Kawakami, Tomokazu Itano, Yutaka Fukuda, Yumkio Aoi, Tetsuro Tooriyama, Sadao Manabe, Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in various cultured marine fish under laboratory conditions, 2002, Fish Pathol, 37(2): 90-91.
5. Nishizawa T, Mori K, Furuhashi M, Nakai T, Furusawa I, Muroga K., 1995, Comparison of the coat protein gene of fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis(VNN) in marine fish. J Gen Virol 76: 1563-1569.
6. Riichi Kusuda, Kenji Kawai, 1998. Bacterial Diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathol 33(4): 221-227.
7. Rodgers, C.J., Furones, M.D., 1998. Disease Problems in cultured marine fish in the Mediterranean, Fish Pathol, 33(4): 157-164

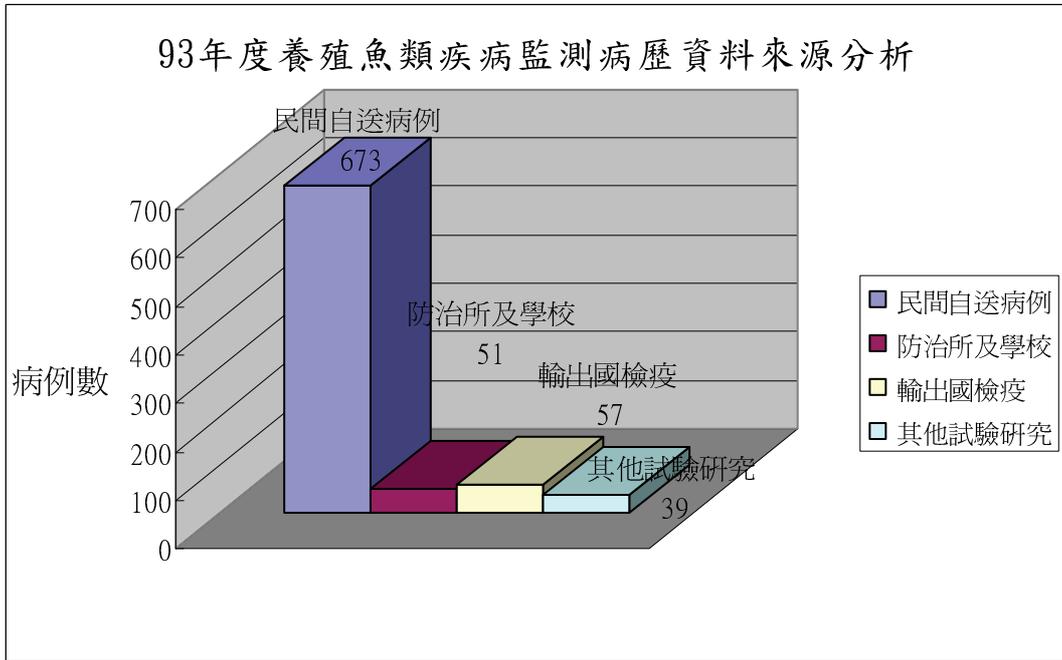
表一、水產動物病毒性疾病 RT-PCR、PCR 使用引子序列及參考文獻

Primer sources	Primer sequence	References
Viral diseases		
IHN	IHNF 5'-TCA AGG GGG GAG TCC TCG A -3'	Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003
	IHNR 5'-CAC CGT ACT TTG CTG CTA C -3'	
VHS	First step VHSF 5'-GGG GAC CCC AGA CTG T -3'	Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003
	Second step VHSF 5'-GGG GAC CCC AGA CTG T -3'	
	VHSR 5'-TCT CTG TCA CCA TGA TCC -3'	Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003
SVC	First step SVCR2 5'-AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH ACN CAY -3'	Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003
	Second step SVCF1 5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR RTC -3'	
	SVCR4 5'-CTG GGG TTT CCN CCT CAA AGY TGY -3'	
KHV	KHV 9/5F 5'-GAC GAC GCC GGA GAC CTT GTG -3'	Gilad et al., 2002(1)
	KHV 9/5R 5'-CAC AAG TTC AGT CTG TTC CTC AAC -3'	
Iridovirus	F91 5'-GAC GAC GAC GAC GCC ACT ACG TAC TTT ATC -3'	Unpublished paper
	R475 5'-GCC AGC ACC CGC TGG TGT TTC CGA TCA TG -3'	
Virus nervous necrosis virus	Noda F2 5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT -3'	Nishizawa et al., 1995(5)
	Noda R3 5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA -3'	

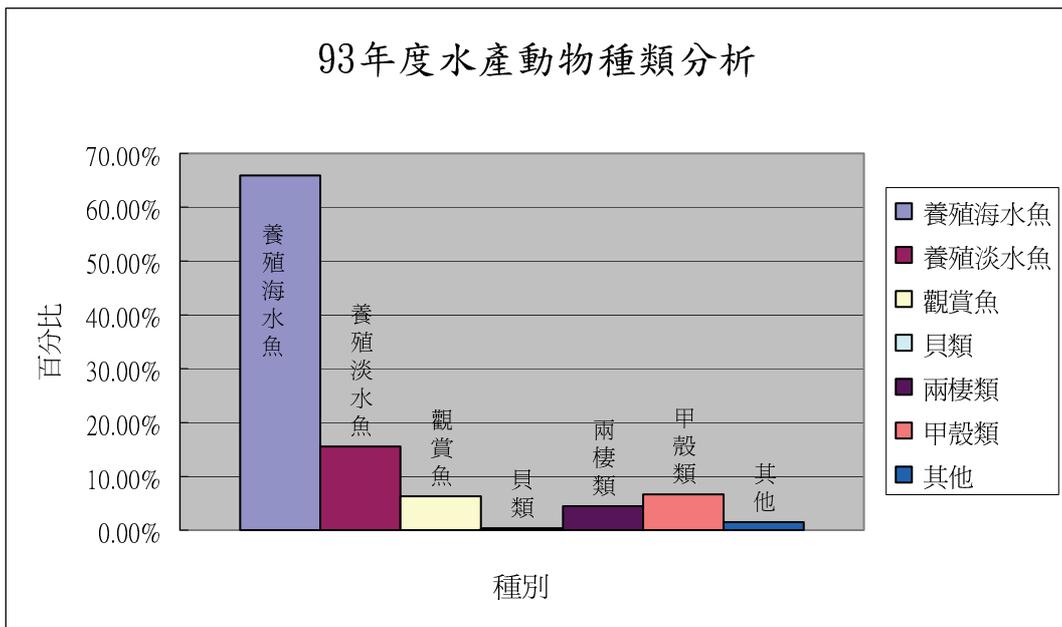
表二、水產動物細菌性疾病 PCR 使用引子序列

Primer sources	Primer sequences
Bacterial disease	
<i>Streptococcus iniae</i>	SHep 144N 5'-GGA AAG AGA CGC AGT GTC AAA AGA C-3'
	SHep 516N 5'-CTT ACC TTA GCC CCA GTC TAA CGA C-3'
<i>Nocardia seriolae</i>	NS1 5'-ACT CAC AGC TCA ACT GTG G -3'
	NG1 5'-ACC GAC CAC AAG GGG G-3'
16S rRNA gene	16SDNA20F 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG -3'
	16 SDNA1500R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SAGAF 5'-CCA CGA TCT AGA AAT AGA TTG -3'
	SAGAR 5'-TGC CAA GGC ATC CAC C -3'

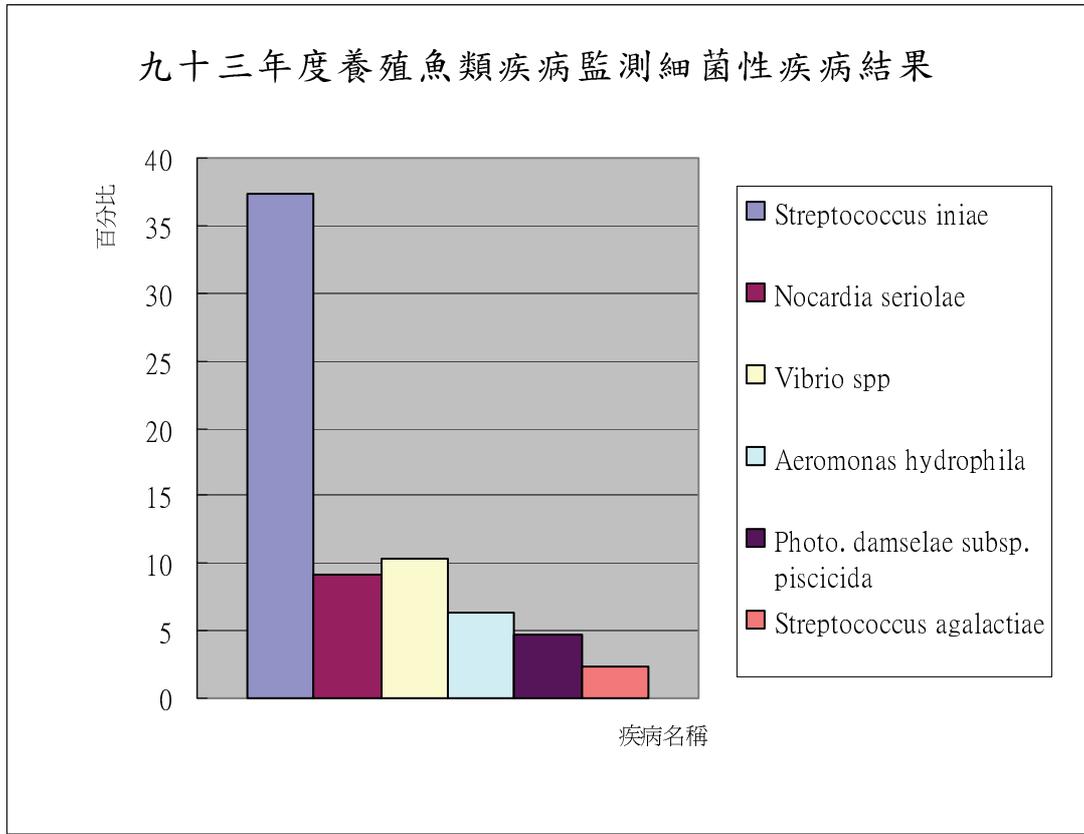
圖三、九十三年度養殖魚類疾病監測病例資料來源分析



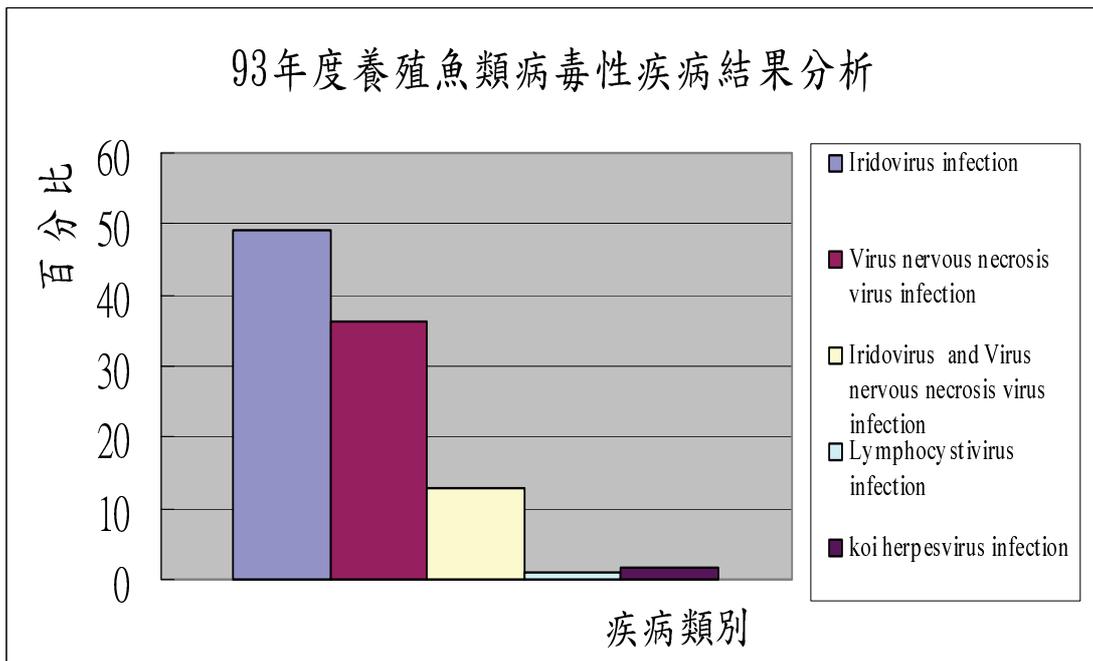
圖四、九十三年度養殖魚類疾病檢測之水產動物種類分析



圖五、九十三年度養殖魚類疾病監測細菌性疾病結果分析



圖六、九十三年度養殖魚類疾病監測病毒性疾病結果分析



Practice service and surveillance of cultured fish diseases

Sue-Min Haung, Chien Tu, Chien-Chin Cheng, Shu-Ting Kuo, Shang-Hai Lin,
Jong-Rong Shiau

Animal Health Research Institute, Counci of Agriculture

Eight hundred twenty cases of aquatic animal specimens were collected for diagnosis and monitoring program from January to December 2004 in Taiwan. Diagnosis of bacterial and viral diseases were carried out utilizing the techniques of viral isolation, PCR methods, API kits and analysis of 16S rRNA gene. Analysis of case sources revealed that 82% were from private fish farms, 6.2% from local Livestock Diseases Control Centers and university, 6.9% from quarantine bureaus and 4.7% from research programs. The percentage distribution of species in collected specimens include 15.4% of freshwater fish (mainly *Percidae spp*), 66% of seawater fish (mainly *Epinephlus spp*, *Cobia*, *Lutjanidae spp*), 6.2% of pet fish (mainly koi), 6.5% of crustacean, 4.3% of amphibians, 0.3% of shellfish and others 1.3% from the total cases. Out of 252 cases of bacterial infections, both *Streptococcus iniae* (37.3%) and *Nocardia seriolae* (9.1%) infection were commonly found in freshwater and seawater fish. *Vibrio spp* infection (9.9%) usually occurred in summer, whereas *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (4.7%) did in winter. A total of 327 cases of viral infection were diagnosed, which is composed of *Iridovirus* infection (49%), *Virus nervous necrosis virus* infection (36.2%), mixed infection of above both virus (13%), *Lymphocystivirus* infection (4 cases), *Koi herpesvirus* infection (5 cases), birnavirus-like virus infection in crab (2 cases). Besides, 8 cases of parasitic infection, 1 case of fungal infection and 6 cases of other disease contributed to the total cases. The above results showed the major viral diseases in cultured fish are caused by *Iridovirus* and *Virus nervous necrosis virus* and the major bacterial diseases are caused by *Streptococcus iniae*, *Nocardis seriolae*, *Vibrio spp* infection. The above data of disease prevalence can provide reference for vaccine development and prevention policy, also resolving diseases problem for fish farmers.

Keyword : cultured fish, diagnosis, diseases