

漫談病毒性神經壞死症

張志堅、周賢鏘、謝明昌、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

本病最早出現在日本長崎縣，該縣養殖之條石鯛 (Japanese parrotfish) 魚苗發生體色變黑，不正常泳姿及大量死亡等情形。而後由 Bellance et al. (1988) 首先在海水養殖鱸魚病例中發現，並被正式命名為病毒性神經壞死症 (viral nervous necrosis; VNN)，不過也有人使用 striped jack nervous necrosis (SJNN) 及病毒性腦病和視網膜病 (viral encephalopathy and retinopathy; VER) 等名稱。本病由 *Betanodavirus* 所引發，又稱為 nervous necrosis virus (NNV)。目前雖然已經自至少 26 種魚種中鑑定出來 (Munday et al., 2002)，但僅自日本條紋鯧 (Striped jack) 中成功地以細胞培養方式分離出來。本病常見於海水養殖魚類魚苗及幼魚，常會導致大量死亡，造成養殖漁民重大損失，是目前國內外海水養殖業，尤其是石斑魚養殖的嚴重困擾之一。

病因學

本病毒之病毒顆粒直徑為 25–30 nm，無封套，呈二十面體，含二段正股 RNA，被歸類於 Nodaviridae 科、*Betanodavirus* 屬 (Mori et al., 1991)，目前 NNV 被劃分為四個基因型：SJNNV (striped jack nervous necrosis

virus)、TPNNV (tiger puffer nervous necrosis virus)、RGNNV (red-spotted grouper nervous necrosis virus) 及 BFNNV (barfin flounder nervous necrosis virus) (Nishizawa et al., 1997)。本病毒目前已被發現至少可感染 16 科 26 屬的海水魚種 (Munday et al., 2002)。因本病毒無封套故不會被乙醚及氯仿不活化，在 pH 值 3–7 之間呈穩定，而在 20°C、pH 值 12 的情況下可被完全不活化 (Misao et al., 1996)。

臨床症狀

感染本病的大部分海水魚類，發生明顯臨床症狀者及產生病變者大多為幼魚階段，有些成魚感染後也會呈現臨床症狀且產生病變 (Fukuda et al., 1996；Grotmol et al., 1997；Pirarat et al., 2009)，但有少數病例其外觀與食慾均正常，卻在魚體引發嚴重的病變 (Gjessing et al., 2009)。本病發生在幼魚時，死亡率可達 100%。罹病魚會呈現迴旋或螺旋狀游動、昏睡及魚肚向上翻出等不正常泳姿，並常見罹病魚成群接近水面 (圖 1)，其他非特異性特徵如飼料攝取量降低、體色呈不正常顏色 (視品系呈變黑或泛白不等)、魚體消瘦且有饜食現象等。本病病程進展快速，爆發本病之養殖場常見大量魚苗發生急性死亡 (Roberts et al., 2001)。



圖 1 感染 NNV 之幼魚。罹病魚呈不正常泳姿包括：迴旋游動、螺旋狀游動、昏睡及魚肚向上翻出等，同時常可見罹病魚貼近水面的情形（圖片由國立屏東科技大學獸醫學系謝嘉裕博士所提供）

致病機轉及傳播途徑

Betanodavirus 可在種魚之生殖腺及所產下之魚卵中以 RT-PCR 測得，此顯示 *Betanodavirus* 可由種魚母體垂直感染至魚卵 (Arimoto et al., 1992)；亦可藉由水平感染方式由罹病魚傳染給其他健康魚 (Arimoto et al., 1993)。本病毒可能由皮膚的感覺神經和運動神經入侵而沿神經上行感染至脊髓，進而感染腦部再到達眼睛 (蔡等, 2007; Nguyen et al., 1996)。從日本旗魚感染本病毒的病例中發現，魚體胃腸道上皮發生多發局部性壞死，經免疫化學染色法證實病毒存在於病灶區內，因而認為 NNV 也有可能經口腔進入並於胃腸道增殖，進而感染魚體神經系統及其他臟器 (Piarat et al., 2009)。

病變

罹病魚剖檢時，除魚鰾有腫大之情形外，並無明顯肉眼可視病變，但魚鰾腫大並非本病之特徵性病變 (Gjessing et al., 2009)。在組織病理學檢查發現，本病所引起之組織病灶，主要在神經系統含腦及脊髓及眼睛，

特徵性的病變為空泡性腦病 (vacuolating encephalopathy)（圖 2）及視網膜病 (retinopathy)（圖 3），眼睛及視神經病變以神經空泡化病變為主，若伴隨有單核細胞及淋巴細胞浸潤於病灶區之反應性炎症時，則稱之眼球炎 (ophthalmitis) 及視網膜炎 (retinitis)，上述病灶經免疫化學染色均證實在病變部位有本病抗原的存在 (Roberts et al., 2001)。以大比目魚為例，常見的病灶是在腦及脊髓形成空泡化病變，在 400 倍視野

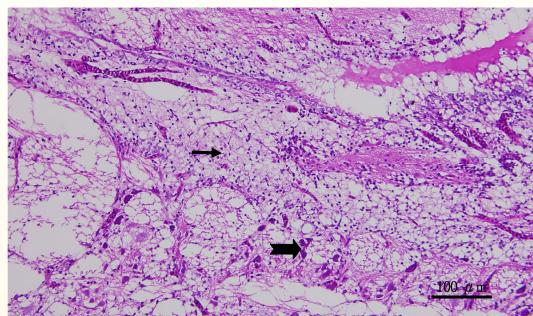


圖 2 感染 NNV 之幼魚之空泡化腦病。光學顯微鏡下可見大腦呈現局部廣泛性空泡化之病灶，黑色細箭頭指出大量泡沫狀細胞聚集部位，燕尾粗箭頭指出發生變性至壞死的神經元細胞。H & E stain。(圖片由國立屏東科技大學獸醫學系謝嘉裕博士所提供)

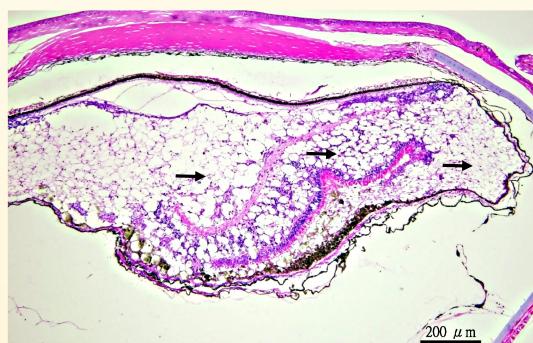


圖 3 感染 NNV 之幼魚之視網膜病。光學顯微鏡下可見眼睛之視網膜呈現局部廣泛性空泡化病灶，病變部位涉及桿狀及錐狀細胞層、內核層、外核層及神經節細胞層，如黑色箭頭所指處。H & E stain。(圖片由國立屏東科技大學獸醫學系謝嘉裕博士所提供)

下，可見神經元空泡化直徑大小常達 50 μm (Grotmol et al., 1997)，鰓絲的柱細胞 (pillar cells) 發生壞死，而在心臟可見心內膜炎，其炎症細胞以淋巴球樣細胞為主，而在電子顯微鏡下可見 noda-like 顆粒出現於心內膜內皮細胞、心肌細胞及心外膜的間皮細胞之細胞質內，同時以免疫化學染色也證實本病抗原存在 (Grotmol et al., 1997)。另有報告指出，罹病魚之魚鱗上皮細胞呈現腫大，且細胞質中出現嗜鹼性包含體，但經免疫化學染色證實其非本病抗原存在位置，其可能為類似一些代謝產物的存在，並非病毒感染所造成之特異性病變 (Nopadon et al., 2009)。

診斷方法

罹病魚檢體，經病理檢查及配合臨床資料綜合判斷後，將疑似病例之臟器 (眼、腦和脊髓) 一部分固定於 10% 中性福馬林，一部分磨製成 10 倍乳劑，經低速離心 (3000 rpm) 後，取上清液進行實驗室診斷如下：

一、病理學

固定組織經例行病理切片製成後，行組織病理學檢查，若發現有上述特徵性形態學病理變化時，可初步懷疑罹患本病。將可疑病例利用免疫化學染色或原位雜交法，進行病毒抗原或病毒核酸之檢查，若呈現陽性，就可確診。

二、病毒分離

特定細胞株如 striped snakehead (SNN-1) (Frerichs et al., 1996) 或 SBL (sea bass larva)、RTG-2 (rainbow trout gonad) 等 (Delser et al., 1997) 可進行病毒分離。進行乳劑上清液細

胞接種，若有 NNV 感染情形，細胞將有圓形化及融合等細胞病變效應 (cell pathogenic effect; CPE)，該細胞可由 FA test、電子顯微鏡或 RT-PCR 證實有 NNV 感染。

三、電子顯微鏡檢查

由組織樣本、石蠟切片或就上述提及感染之細胞株製成超薄切片予以檢查，若發現有 NNV 之特異性型態，則可確診。

四、分子生物學

針對 NNV 的 conserve sequence 設計特異性引子，並取上述之組織乳劑 100 μL 進行 RNA 萃取，並進行 RT-PCR 後，其產物進行膠片電泳分析及定序，以確定為 NNV 感染。

控制方法

本病為病毒性疾病，抗生素無直接治療效果，僅可用於防止病魚二次性細菌感染。由於本病毒可經種魚之生殖腺垂直感染魚卵 (Arimoto et al., 1992)，這些受本病毒感染的種魚會成為種苗場的帶毒者，不斷地產出病毒，污染養殖場，因此篩檢帶毒種魚是預防本病發生的第一步。一般最常用的方法是針對種魚產下的魚卵直接執行分子生物學的檢查，若檢出有病毒核酸，則立即將帶毒種魚淘汰。第二步是建立種魚對 NNV 的免疫力，直接方法便是注射疫苗。研究報告指出，在石斑魚種魚平均體重為 1.35 kg 時，實施死毒疫苗肌肉注射 (劑量為 $10^9 \text{ TCID}_{50}/\text{kg}$)，可誘發魚體產生對抗 NNV 特異性的中和抗體，且在產出之魚卵中亦可測得抗體，亦即該疫苗可降低重複產卵的母種魚垂直感染的危險 (Kai et al., 2010)。另一報告指出，使用福馬

林製成不活化之 VNN 疫苗，僅需一次性肌肉注射魚體，即可產生具保護力的免疫力，同時在免疫後 15、30、75 天後，實施 NNV 攻毒，經免疫後之石斑魚均能存活，亦即此福馬林不活化 VNN 疫苗可誘發石斑魚產生長期性的免疫效果 (Rolando et al., 2010)。第三步則是執行洗卵，常用方法為使用臭氧或有機碘，其作用在於瞬間殺死附著於魚卵上的病毒，以避免病毒感染魚卵 (蔡等，2007)。研究指出，過量臭氧用於洗卵，會造成魚卵孵化率下降 (Buchan et al., 2006)，而實驗數據指出，臭氧最佳使用濃度為 $3 (\pm 0.3)$ $\mu\text{g/mL}$ ，持續 3.3–6.7 分鐘，既可達到殺病毒的作用，亦可維持另一滿意的孵化率 (Buchan et al., 2006)。第四步則是水中環境的控制，這裏主要是指控制水環境中的病毒量，以阻斷病毒的水平傳染。研究指出，在 20°C 添加 50 ppm 劑量的次氯酸鈉 (sodium hypochlorite)、次氯酸鈣 (calcium hypochlorite)、羥基氯苯胺 (benzalkonium chloride, BKC) 或碘處理含病毒的海水 10 分鐘後，海水中 NNV 均被不活化 (Arimoto et al., 1996)，而使用臭氧處理含病毒的海水，其 TRO (total residual oxidant) 要在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，處理至少 2.5 分鐘，方可以將 NNV 不活化 (Arimoto et al., 1996)。臭氧可溶於水中形成臭氧水，具有瞬間殺菌的能力，強度比紫外線強，其尚可降解水中有機物質 (包括大分子有機物及小分子如氨及氮)、去除鐵及錳，此外臭氧可與水中氯、溴結合，形成氧化物，具漂白功能，臭氧尚可增加海水中溶氧，對水環境有所助益 (謝等，1990)。第五步則是要降低魚群的緊迫，研究指出，在

緊迫情形下，罹病魚及帶毒魚體內的病毒會加速增殖並且增加其排毒量，進而提高病毒在魚群中的水平傳染 (Nguyen et al., 1997)，所以不論是發病的養殖場或是懷疑有帶毒的種魚場，場內及不同場之間魚群的異動均須避免，以免造成緊迫。除此之外，噪音、強光、水溫及水質改變及放養密度高等，均是引起緊迫的原因，需要加以避免 (徐等，1997)。第六步就是環境及器具的處理，平日所用的魚網、桶具等，用畢後均需採用 pH 值 12 的鹼水處理，再用清水洗淨，以避免再次使用時帶病毒污染養殖池水。第七步便是儘量採用完全飼料餵魚，避免使用冷凍或未加熱處理的下雜魚 (蔡等，2007)。

結語

疾病的控制是預防勝於治療，尤其是病毒性疾病，除了少數病毒國外已研發出病毒阻斷劑外 (如 SARS)，大部分仍建議採用疫苗注射來提昇免疫力，病毒疫苗比細菌疫苗的效果要來的好。本病是為親神經性的病毒性疾病，由周邊神經感染後採逆行性 (retrograde) 方向感染中樞神經並造成病害，因而造成罹病魚產生運動障礙、生理障礙，最後死亡。由於有血腦障壁的關係，抗體及藥物無法作用於腦部，因此 NNV 一旦入侵魚體內且感染神經系統，基本上，該罹病魚不是死亡便是終身帶毒。是故要控制本病的發生，必須處處注意防止病毒有感染養殖魚的機會，除了使用疫苗外，在飼養管理、餌料病毒控制、種魚篩選及洗卵等工作均要確實執行，才能落實本病的預防與控制。