

海水蝦的微孢子蟲感染症及其防治

楊明樺、鄭金華、陳紫嫻

水產試驗所東港生技研究中心

前言

根據 FAO 的統計資料顯示，全球對蝦養殖產量於 2011 年達 420 萬公噸，但在 2009 年中國爆發早死症之後，產量在 2011—2013 年之間下跌了 6%，至今年為止，雖然主要的養蝦大國已逐漸從早死症的泥淖中站穩，往後數年全球產量也將以 4.2% 速率成長 (GOAL, 2016 預測)，然而蝦類疾病仍是全球最重視的議題與挑戰，除了過去已流行的各種細菌與病毒性疾病外，近幾年也陸續傳出幾種新型疾病，其中以海水蝦的微孢子蟲 (*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 感染症最受關注。

病原概述

EHP 在分類上接近真菌類，為一種專性細胞內寄生蟲，2004 年在泰國首度出現不知名微孢子蟲抑制草蝦 (*Penaeus monodon*) 成長之相關報導；Tourtip 等人在 2009 年從成長緩慢的草蝦中分離此病原，為其作詳細描述並命名，之後，養殖白蝦 (*Litopenaeus vannamei*)、藍蝦 (*Penaeus stylirostris*) 也陸續出現 EHP 感染 (Tang et al., 2015)。EHP 與其它微孢子蟲的區別在於其會危害蝦肝胰臟

組織小管上皮細胞，進而干擾其正常的營養吸收。將受感染的肝胰臟組織切片並以 H&E 染色，可見細胞質中嗜鹼性包涵體，並聚集 $1.1 \pm 0.2 \sim 0.6 - 0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 的卵形或橢圓形孢子，有時可見孢子從已裂解的細胞游離到管腔中。以穿透式電顯可觀察到孢內有單核，後極泡 (posterior vacuole) 固根盤連接極絲，有 5—6 個極絲盤繞，以及厚的電子緻密屏障 (electron-dense wall) (Tourtip et al., 2009)。

在 EHP 盛行之前，較廣為人知感染蝦類的微孢子蟲為 *Agmasoma penaei*，感染對象與部位為墨吉對蝦 (*Penaeus merguensis*)、白蝦與草蝦的肌肉與結締組織，造成蝦腹部肌肉多灶性病變，外觀呈現乳白色，俗稱“棉花蝦” (Tourtip et al., 2009)，少數病例中 *A. penaei* 也曾出現在肝胰臟的結締組織，但從未出現在小管上皮細胞 (Tangprasittipap et al., 2013)。 *A. penaei* 的傳播宿主為魚類，移除宿主即可阻斷病原，而 EHP 是否有宿主存在仍然未知。

EHP 傳播途徑

目前 EHP 疫區包括中國、越南、泰國、馬來西亞、印尼、印度、汶萊，也可能出現

在菲律賓與墨西哥，其中泰國的盛行率為 49% (Flegel et al., 2014)。整體而言，目前疫區大多侷限在亞洲，可能是疫病的性質，或者是其它地區的生物安全防疫措施較嚴謹。EHP 主要藉由從疫區進口活餌（如沙蠶）與活蝦而傳播，生產沙蠶的地區經常與蝦類養殖重疊，蝦類的疾病容易藉由沙蠶的流通而交互感染。在泰國，不論境外引進之 SPF 白蝦苗，或進口 SPF 種蝦後在當地孵化場繁殖的蝦苗，放養前並未檢測到 EHP，進到養殖池一段時間後卻證實感染，顯示病原早已存在當地環境且容易發生水平傳染，學者也懷疑 EHP 可能是在地種並已伴隨當地草蝦養殖若干年了 (Rajendran et al., 2016; Tangprasittipap et al., 2013)。目前已經證實 EHP 可經由攝食病蝦或共棲造成水平感染 (Han, 2016; Tang et al., 2016; Tangprasittipap et al., 2013)。

EHP 檢測方法

可使用光學顯微鏡取肝胰臟組織抹片或切片觀察，物鏡至少 40 倍，孢子量少時不易觀察到，要確診須使用 100 倍物鏡。Tangprasittipap 等人 (2013) 取肝胰臟小管上皮組織以 H&E 染色並未發現孢子，然而以巢式 PCR 及原位雜交法檢測結果卻是重度感染，顯示組織學方法並不可靠。目前已報導較佳的檢測方法包括：PCR 與原位雜交法 (Tourtip et al., 2009; Tangprasittipap et al., 2013; Tang et al., 2015)、即時定量 PCR (Liu et al., 2015) 以及 LAMP 結合金奈米顆粒比色法 (Suebsing, et al., 2013)。2016 年

Itsathitphaisarn 等人改良 Tourtip 等 (2009) 提出的 SSU-PCR，以更具專一性的 EHP 孢壁蛋白 (spore wall protein, SWP) 基因作為引子，排除了 SSU-PCR 可能因飼料原料帶有已經死亡的 EHP，以及誤認親緣上接近 EHP 的兩種感染螃蟹的微孢子蟲 *Hepatospora eriocheir* 與 *Enterospora canceri* 所造成的偽陽性。使用 PCR 方法檢測的樣品可以是整隻蝦苗或大蝦的部分肝胰臟組織，若種蝦較珍貴則可採其糞便，蝦場周遭的活體包括豐年蝦、沙蠶、海蟑螂等，也都應列為檢測項目。

EHP 與白便綜合症的關聯性

從目前資料顯示，感染 EHP 的蝦子通常伴隨白便現象。Ha 等 (2010) 曾報導越南草蝦感染 EHP 並導致白便綜合症 (White Feces Syndrome, WFS)。Tang 等 (2016) 觀察蝦子白便中含大量孢子，認為此種“白便”並不是真正的糞便，主要是由孢子、腸道黏膜與肝胰臟管腔脫落的組織所構成，較正常糞便容易破碎。Tangprasittipap 等 (2013) 在實驗室以攻毒試驗證實感染 EHP 並不會導致白便現象，反之，出現白便綜合症或白斑症的蝦經常可檢驗出 EHP。在泰國的田間調查也發現，EHP 高盛行率的蝦池不一定有白便現象，且有一例患有白便綜合症池蝦回復正常，顯示感染 EHP 與白便綜合症之間並無因果關係，EHP 可能只是加劇白蝦的白便現象。雖然 Rajendran 等 (2016) 的調查結果顯示，印度患有白便綜合症的蝦相較於無此症的蝦有較高的 EHP 盛行率 (96.4% vs. 39.7%)，但仍認為以目前的資料無法判定

EHP 與白便綜合症的關聯性。

EHP 與成長緩慢的關聯性

由於 EHP 寄生在蝦的肝胰臟上皮細胞管腔，影響肝胰臟正常吸收與儲存營養功能，雖然不會造成蝦子死亡，但普遍被認定是導致蝦成長緩慢的主因。學者認為 EHP 早已在亞洲盛行多年，一直未受重視是因為全球都把焦點放在造成大量死亡的早死症身上，等到近幾年因應早死症的策略奏效，蝦存活下來了卻發現長不大或嚴重參差，在不知病因情況下收成與否陷入兩難，最終造成嚴重損失，也間接導致近幾年亞洲出口的白蝦體型較小。Liu 等 (2015) 將採集自中國江蘇、海南和山東的 3 批白蝦樣品肝胰臟組織 DNA 中的 EHP SSU rDNA 進行即時定量 PCR 檢測，結果顯示 EHP 的濃度 (copies/ng Hp DNA) 與白蝦成長速度呈負相關。不過根據 Rajendran 等 (2016) 的調查結果，成長緩慢的蝦相較於正常成長的蝦，其 EHP 盛行率反而較低 (58.5% vs. 80.8%)，認為以目前的資料仍無法判定 EHP 與成長緩慢的關聯性。

EHP 的防治策略

蝦子感染 EHP 之後沒有任何外觀症狀，可能因而延誤處置而讓疫情蔓延。目前無治療 EHP 的有效方法，而且一旦感染很難根除，只能加強控制疫情，並在繁養殖各環節落實生物安全防疫。

一、種蝦場

因 EHP 未在 OIE 表列名單，即使標榜

SPF 種蝦仍有可能帶有 EHP，進口種蝦前應額外要求檢疫。許多業者考量進口種蝦成本較高，傾向在當地池塘培育 F1 子代作為種蝦，由於業界普遍缺乏防疫概念，這類種蝦可能早已受到感染成為帶原者。種蝦生餌如沙蠶、二枚貝、暖水域魷魚，以及當地生產的豐年蝦都很有可能感染 EHP 或成為其載體，應儘量避免使用，如要使用則建議先冰凍過，或以巴氏消毒法 (70°C，10 分鐘)，gamma 射線照射來去除病原。由於 EHP 孢子具有厚的蛋白質外層，對傳統養殖場用來殺滅細菌或病毒的氯具有抵抗力，建議種蝦場所有設備與器具改以 2.5% 氫氧化鈉浸泡 3 小時後再以清水洗淨，晾乾 1 週以上，使用前再以酸性次氯酸 (pH < 4.5) 潤洗過。蝦卵及無節幼體可以參照 OIE 的方法 (OIE Chapter 1.1.3.)，使用優碘及福馬林進行消毒，此方法證實可以有效阻隔 EHP 的垂直傳播，也同時可以去除其它病原如弧菌等。

二、蝦池的準備

目前對於 EHP 是否利用中間宿主傳播仍不清楚，不過池中堆積過多有機物有利於 EHP 孢子及其載體藏匿，清池時須將底泥移除並將底土曬至龜裂，每公頃施用生石灰 6 噸以上，將生石灰犁至底土 10—12 cm 深處使其充分作用，底土 pH 將在數日內逐漸提升至 12 再緩慢下降，此過程可殺死多數的孢子。

三、養殖管理

養殖期間避免堆積過多有機物並儘可能移除底泥，可降低水平傳播發生的機率 (Newman, 2015; Sritunyalucksana et al., 2015; Thitamadee et al., 2016)。