

養殖新知

3

魚病之防治 (2)

黃旭田

屏東縣家畜疾病防治所

B. 病毒性疾病採取病材之一般操作程序

一、組織與體液的收集及操作

(一) 含病毒的組織選擇性不同檢測分析，依據魚體的感染部位及生長時期，當懷疑有病毒性病原感染時，下列組織則為參考的分析對象。

大小/成熟魚體	分離病原組織
魚體長在 4cm 以下	全尾魚做成乳劑 (但需移除卵黃囊)
魚體長 4~6cm	全部魚體內臟 (包括腎臟，同一尾魚)
魚體長超過 6cm 性成熟魚體	取同尾魚之腎及脾臟 卵巢液、腎及脾臟

從魚體移除組織及體液後，這些臟器或體液可混合在一起，如檢測魚體沒有超過五尾發病魚體，應將組織或體液合併一起檢測分離病原。

(二) 病材的保存

1. 病材應保存或低於 10°C 以上，並依所懷疑的感染病毒種類調整保存溫度，不要將病材冷凍。

2. 病材的保存不要超過 48 小時。

3. 組織的保存應貯放於含有抗生素、抗菌劑或兩者均具有的緩衝溶液中；pH 值應保持於 7.0~7.8 間或是所懷疑的感染病毒其所適應的 pH 值範圍。

二、檢測病毒的病材製備

病材的製備則需使組織成均質樣化，但組織與體液必須確定無細菌及黴菌的污染。有數種方法可使組織均質樣，但需注意組織均質化不可使用超音波震盪處理；在組織均質樣後，需經由離心操作手續，將細胞碎片移除。為避免組織污染，或經離心的均質化組織之上清液，亦通過微膜過濾，故同時使用抗生素及黴菌劑處理均質樣的組織。

(一) 抗生素及抗黴劑所使用的單位範圍，並具有寬廣的效價或濃度，能有效的防止細菌或黴菌的污染，但不能過量應用於細胞培養。一般推薦劑量如下：

Gentamicin	50~2,000 μ g/ml
Penicillin	100~800 μ g/ml
Streptomycin	100~800 μ g/ml
Amphotericin	25~400 μ g/ml
Mycostain	25~400 μ g/ml

(二) 經過離心的均質樣組織之上清液，需經過 0.45 μ m 微膜的過濾，以價移除污染的細菌，而在組織培養中所添加的物質如 10% 血清亦需經過微膜過濾，以確保組織培養的安全。

三、病材之接種

(一) 細胞培養的選擇

每一種病毒的分離，必須選擇所欲分離病毒，最適切的細胞株，所以必須經常製備培養某些細胞株，以備分離病毒，而這些細胞株，需確定無黴漿菌 (Mycoplasma) 的污染。

(二) 接種

病材均質樣後，經添加抗菌及抗黴菌劑

感作後，接種於適應的細胞株內；而所製備的細胞其生長時間不能超過 48 小時，接種細胞量應在 80~90%；每一接種病材最少需含 50 μ l 而佈滿於 1cm² 的細胞板 (cell steet) 上，同時需含有對照接種組，原始病材的稀釋濃度，體液稀釋度不得超過 1:10，而組織濃度最高稀釋倍數為 1:100。

(三) 檢測病毒間期

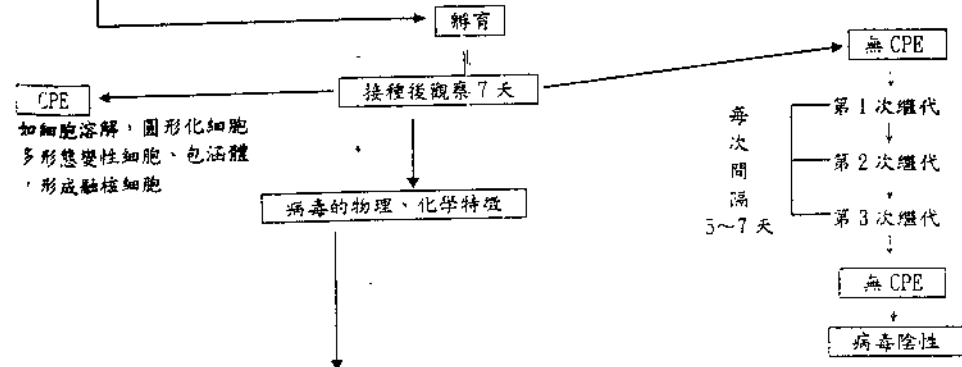
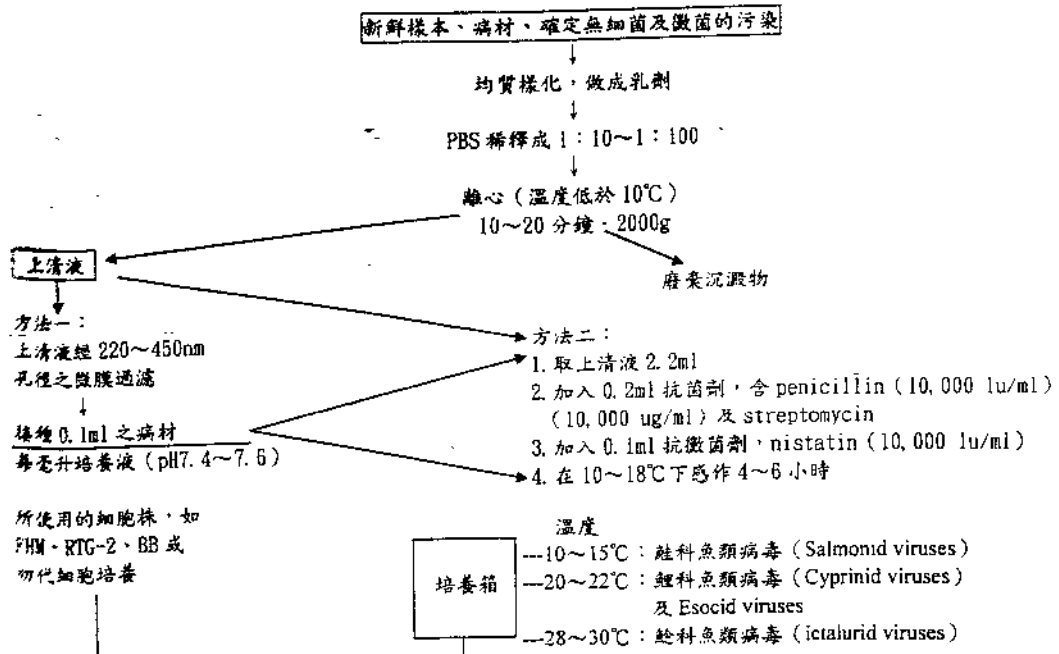
細胞培養分離病毒，所觀察的細胞病理變化 (CPE)，最少須經 14 天的觀察，但建議延長至 21 天；14 天的盲目繼代分離培養，是必須的步驟。在分離操作期間，需時常觀察或懷疑是否有病毒感染；當細胞病理變化發生時，應再次繼代培養分離，同時經血清中和試驗或其他實驗室診斷方法，以便確診。

四、病毒鑑定

假設鑑定病原乃基於魚場內魚體過往所記載的發病事實，發病魚體的臨床觀察及細胞培養所呈現的細胞病理變化，經過假設診斷後，還須通過各種實驗室操作，以確立真正的病原。

五、血清中和試驗

表 B.1 魚類病毒性疾病：鑑定及診斷流程



穩定	氣仿	不穩定	不穩定
不穩定	酸 (pH3)	不穩定	不穩定
穩定	熱 (56°C)	不穩定	不穩定
<100nm	病毒顆粒	>100nm	>100nm
立方形態	形態	桿狀形態	立方形態
無外套		有外套	有外套
RNA	核酸本質	RNA	DNA
92	次蛋白構造		162
	單位 (Capsomeric number)		
REO-Virus		Rhabdo-Virus	Herpes-virus
↓		鮭科魚類	↓
鮭科魚類	源自分離病材	Esocids	鯉科魚類
RTG-2	通切的細胞株	鯉科魚類	
		RTG-2	
		FHM	
20	適當的培養溫度	15	21
+	中和試驗陽性含有專一性抗體	10	21
		2.0~2.2	
IPM	診斷	VHS	CCV
		HN	
		PERV	
		S/C/SBE	

表 B. 2 各種魚類病原性病毒所呈現的不同分離條件

病毒	所欲分離的組織	感受性細胞株	適當的孵育溫度 (°C)	接種後發生 CPE 的時間 (hr)	CPE 的變化形態	血清型	相關病毒
IHN	精液、複層卵是否需隔離	RTG-2 FHM	12~15 (4~18)	72	細胞溶解，圓形細胞變性，細胞核壁 hyperchromacia	3 (IHN, OSD, SRCD)	與 VHS, PFR, SVC/SBE 病毒不相關
VHS	肝、腎、脾腸	RTG-2 FHM	14 (12~14)	24~72	同上	2	至今未有相關的病毒
SVC	肝、腎、脾腸、腦	FHM, BF-2 BB, RTG-2	20~22 (15~31)	24~72	同上	未明	血清學上可能與 SBE 病毒相關
SBE	肝、腎、脾腸、腦、心泳鰓	FHM RTG-2	20~22 (4~28)	24~72	同上	未明	血清學上可能與 SVC 病毒相關
PPRV	腎、全部魚苗 (fry)	FHM, RTG-2 BB	21 (10~28)	24~40	顆粒細胞變性細胞形成球狀，溶解	未明	與 VHS, IHN, SVC/SBE 病毒無關
IPN	全部魚苗、肝、脾、腎 (糞便、卵巢或精液)	RTG-2 BF-2 (FHM), GF-1	20 (4~26)	24~72	纖維母細胞延續拉長，細胞溶解	3~5 (VR ₂₉₉ SP. Ab)	未明
CCV	血液、脾、腦、腎、肝腸管	BB	25~30 (10~33)	12~40	細胞核濃縮，核內包涵體 (typea)，融核細胞，細胞溶解		
Sto Pa	血液 (腫瘤組織，內部臟器)	FHM, RTG-2	15	~120	有 10~100 的融核大細胞，局部病灶形成	未明	未明
LCV	罹患組織	BF-2 GF-1	25	72~240	細胞肥大，細胞核及核仁延長，嗜鹼性細胞質包涵體	未明	

(一) 中和抗血清 (單源或多價抗體) 的稀釋應允許每毫升的均質性病毒其中和力價在 $10^2 \sim 10^6$ (Plaque-forming-units, PFU), 或 50% 組織培養感染劑量 (Tissue Culture Infective Dose, TCID₅₀)。

(二) 使用無菌平衡的鹽類溶液稀釋, 而所懷疑的病材稀釋倍數為 $10^2 \sim 10^6$ 。

(三) 經稀釋懷疑的病材 0.2ml 與 0.2ml 所稀釋的抗血清混合, 同時需具有陽性反應

及陰性反應對照組, 在 15°C, 1 小時孵育, 並予混合均勻操作。

(四) 每一雙重稀釋倍數孔內, 再加入 0.1ml 反應液, 於 15°C 下孵育, 觀察每一稀釋倍數孔內有無中和抗血清發生反應, 並將懷疑的病毒分離出來。

整個魚類病毒性病原之鑑定操作流程, 可參看表 B.1、B.2。◆ (待續)

1997

台灣漁業電話簿

全新出版

歡迎洽購

最新出版之 1997 年台灣漁業電話簿, 收錄台灣所有漁業相關單位及個人地址、電話共約 10,000 筆, 含蓋範圍包括:

- ❖ 中央政府相關單位
- ❖ 漁業相關社團組織
- ❖ 養殖漁業
- ❖ 海洋漁業
- ❖ 漁產加工運銷
- ❖ 漁會
- ❖ 海業金融
- ❖ 漁業工程
- ❖ 水產試驗、防治、教育
- ❖ 漁業傳播媒體
- ❖ 民意代表

售價: NT 1,000 元 購書請利用郵局劃撥 0101032-0 號「鄭煥生」帳戶