

白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測

陳怡玟*、魯懿萍、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為避免新興疾病對我國白蝦養殖產業造成危害，本所收集9場田間白蝦場其生產過程之蝦隻檢體及環境檢體(如生餌、水及土壤等)，監測世界動物衛生組織表列疾病及2種新興蝦類病原，包含白點病、傳染性皮下及造血組織壞死症、陶拉症病毒、黃頭病毒基因1型、傳染性肌肉壞死症病毒、壞死性肝胰腺炎、急性肝胰臟壞死症、對蝦肝胰腺微孢子蟲病、偷死病病毒，確認是否有病原存在，並據以輔導白蝦場改善其生物安全環境與防治疾病。共完成白蝦檢體724件次及環境檢體948件次檢測工作，其中檢出率最高為對蝦肝胰腺微孢子蟲病12.9% (215/1672)，其次為急性肝胰臟壞死症1.8% (30/1672)。統整各場於輔導過程中所遇到的問題，建議白蝦場需引入未帶病原之蝦隻進行養殖，養殖前場內環境需徹底清潔消毒，且養殖過程會加入池水的物質(包含餌料生物、水源、益生菌等)，需確認其未帶病原及弧菌。最後需確保養殖池不會被人員或動物汙染病原。

關鍵詞：白蝦、生物安全、新興疾病。

緒言

自1970年起，全球水生動物產業每約10年左右會發生不同新興疾病造成相關養殖產業的損失。而每種新興疾病的發生，從確定病原、建立診斷標準到建立疫區處置措施，如治療方法、疫苗研發使用到重新成為非疫區之認定等，均需經歷數年時間，對養殖產業的危害控制往往緩不濟急。所以，國際間現行的水生動物產業健康管理策略，從原本對各別疾病進行診斷治療，轉為提高養殖產業本身對於疾病預防控制的能力 [8]。

我國自60年代發展草蝦養殖相關技術後，開啟草蝦養殖產業20年的蓬勃發展。然而，1988年蝦類病毒性疾病，如白點病(white spot disease, WSD)等的出現，使得草蝦的年產量急遽下降，重創相關產業。因此，我國於1996年自夏威夷引進白蝦代替草蝦，由於白蝦成長速度較快，對白點病的抗病力較高，養殖效率更佳，進而興起我國白蝦養殖產業的熱潮[1]，但自2009年起，蝦類急性肝胰腺壞死綜合症(acute

hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)、對蝦肝胰腺微孢子蟲病(*Enteroctyozoon hepatopanei*, EHP) [7]等新興蝦類細菌性及真菌性疾病的發生，造成全球養殖白蝦的產量大幅下降。且近年來，我國鄰近國家陸續傳出新型蝦類病毒性疾病疫情發生，如偷死病病毒(covert mortality disease virus, CMDV) [11]、十足目虹彩病毒(decapod iridescent virus 1, DIV1) [6]等，這些新興蝦類疾病對我國養蝦產業均產生極大威脅。

本所於105年至108年間各縣市蝦類送檢病例中，曾檢出白點病、傳染性皮下及造血組織壞死症(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHHN)、對蝦肝胰腺微孢子蟲病、急性肝胰臟壞死症、黃頭病(yellowhead disease, YHD)、陶拉症(taura syndrome, TS)、草蝦桿狀病毒病(Spherical baculovirus)及其他細菌性疾病。檢出率最高的疾病依序為傳染性皮下及造血組織壞死症(33%)、白點病(25%)及對蝦肝胰腺微孢子蟲病(19%)。自106年

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

起，已有三年不曾檢出陶拉症和草蝦桿狀病毒病，但也發現對蝦肝胰腺微孢子蟲病和急性肝胰臟壞死症等2種新型蝦類疾病。其中，對蝦肝胰腺微孢子蟲病可藉由蝦苗、生物餌料及水體等多種途徑感染蝦隻，需有能力維持高生物安全水準的養殖場才可避免本病發生。藉由監測對蝦肝胰腺微孢子蟲病於養殖場發生情形來輔導國內白蝦繁養業者提高養殖場生物安全能力，不僅可減少本病於我國發生率，亦可降低其他新興蝦類疾病入侵本國的機率。

材料與方法

檢體收集

自107年10月起至108年12月間，與2家白蝦繁殖場及7家白蝦養殖場配合，收集其生產過程蝦隻檢體及環境檢體(如生餌、水及土壤等)，繁殖場於種蝦繁殖期間，每兩個月對其生產的一批蝦苗及水體進行採樣，若繁殖場非一貫式飼養，則同批蝦苗於零日齡蝦苗、紅筋苗、黑殼苗出貨時各採樣一次；養殖場則於引入蝦苗時、養殖中期及上市前進行採樣。其餘環境檢體視現場情形進行採樣。

蝦隻乳劑製備

以滅菌後的剪刀採取200 mg蝦體(含鰓、甲殼、泳足、步足、肌肉及肝胰腺)，置入含滅菌鋼珠小離心管中後，注入0.7 mL的L15(細胞培養液)。將小離心管置入組織均質機中均質四次，每次13秒。均質後小離心管放入離心機內，以4500 rpm離心10秒鐘。

生餌乳劑製備

以滅菌後的剪刀採取約1g檢體置入滅菌後的研鉢中，檢體以鉢棒及玻璃砂研碎均勻，放入離心管，注入L-15至離心管中並加至10 mL的刻度。離心管放入離心機離心，以2000 rpm離心15分鐘。

水體濃縮

採500 mL水體(水源及養殖池水)以12,000 rpm離心20分鐘，再將上清液經0.2 μm超濾膜濃縮至5 mL，取離心後沉澱物0.2g及濃縮上清液萃取核酸做病原核酸檢驗。

核酸萃取

本試驗除土壤樣本以外，所有核酸均使用台灣圓點自動核酸萃取儀及台灣圓點核酸萃取套組並依其操作步驟進行。土壤樣本以FastDNA® SPIN kit for feces進行萃取。

分子生物學

本試驗針對世界動物衛生組織(Office international des épizooties, OIE)及亞太區水產聯盟(Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, NACA)列管的9種對蝦類病原進行檢測，其中白點病毒(WSDV)、傳染性皮下及造血組織壞死病毒(IHHNV)、陶拉症病毒(TSV)、黃頭病毒基因1型(YHV1)、傳染性肌肉壞死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)、壞死性肝胰腺炎(necrotising hepatopancreatitis, NHP)、急性肝胰臟壞死症(AHPND)檢測方法依據OIE水生動物疾病檢測手冊(Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals)[9]。對蝦肝胰腺微孢子蟲病(EHP)[5]、偷死病毒(CMVN)[11]尚未列入OIE手冊，則以NACA公告之巢狀聚合酶鏈鎖反應[5][11]進行檢測。

結果

病例收集及病原核酸檢出結果

於107年10月起至108年12月期間，共收集9場田間白蝦場白蝦檢體724件次及環境檢體948件次，其中病原核酸檢出率最高為EHP 12.9% (215/1672)，其次為AHPND 1.8% (30/1672)，WSSV則有0.5% (8/1672)。此外，在沒有臨床症狀的檢體中亦有CMNV 0.8% (13/1672)、IMNV 0.3% (5/1672)及NHP 0.1% (1/1672)核酸檢出，其餘病原皆未檢測到，於種蝦繁殖場B場蝦苗加測十足目虹彩病毒結果均為陰性(檢驗結果未提供)。各場基本環境設施及生物安全條件如表1，包含養殖場類型、養殖池材質、空池消毒有無、原水消毒有無及人員管制有無等分類，各場檢驗次數及結果如圖1。

根據輔導養殖場改善生物安全條件前的各場原始狀況的檢驗數據中(表2)，可見9場白蝦場中有7場白

蝦檢體檢出EHP，1場在無臨床症狀蝦隻中檢出CMNV，3場於水體中檢出EHP，且此3場白蝦檢體也為EHP陽性。顯示白蝦養殖場最常見病原為EHP，且較可能因白蝦帶原而污染養殖場環境。

於輔導2場種蝦場過程中，A場為一貫式繁殖場，基本環境設施及生物安全條件佳，所有檢體檢驗結果均為陰性(檢驗結果未提供)。B場曾於零日齡蝦苗檢體檢出EHP，追蹤病原來自帶原豐年蝦生餌，輔導種蝦場將生餌以-40°C冷凍處理不活化病原後，重新飼養蝦苗檢驗結果為EHP陰性。另追蹤B場下游黑殼場蝦苗有不同病原核酸(WSSV、NHP、CMNV)檢出(檢驗結果未提供)，追蹤原因為黑殼苗飼養期程較短，故黑殼場會持續引進蝦苗，其來源多且品質不一，場內亦無明確分區規劃引入蝦苗順序，場內生物安全環境不易維持，建議黑殼場需慎選蝦苗來源，且每次引入蝦苗時場內需徹底消毒。

於輔導7場白蝦養殖場的過程中，共檢驗了13次蝦苗，其中7次蝦苗來源為A場及B場，檢驗結果均為陰性，6次為國外苗，2次檢出EHP(均為F場引入蝦苗)，1次檢出IMNV(H場引入蝦苗，蝦隻無臨床症狀)。各場輔導情形如下：

1.C場(表3)：第一批蝦子出清後，空場約半年再引入第二批蝦隻飼養，養殖過程中均無病原檢出。

2.D場(表4)：養殖過程中白蝦檢出EHP、AHPND，追蹤病原可能來自同場其他池引進未經檢驗的蝦苗(EHP、AHPND 陽性)。發病池清池消毒後，後續引入蝦苗仍於養殖一至兩個月後檢出EHP、AHPND，故畜主決定提前收成。追蹤該場池底材質消毒後仍可檢出EHP，檢視其消毒方式，發現該場消毒前未徹底清潔池底汙泥及浮游生物，建議改善其消毒流程。

3.E場(表5)：養殖過程中白蝦檢出EHP，畜主決定放棄此批蝦苗。追蹤病原可能來自其工作人員，本場工作人員於多飼養場區工作，其室外飼養場區曾檢出EHP，輔導該場加強工作人員操作時清潔消毒管理流程，之後養殖過程均無病原檢出。

4.F場(表6)：蝦苗引入時已檢出EHP，輔導該場於飼養過程中加強池底排汙，控制場內EHP病原量，養

殖過程EHP持續有檢出，但無其他病原檢出，最終順利收成。

5.G場(表7)：養殖過程中白蝦陸續檢出EHP、WSSV，並因感染WSSV而造成短期內大量死亡，其每批送檢養殖池水亦同時檢出EHP、WSSV，推測本場乃受病原汙染水源造成感染，建議該場於養成過程中新引入之水源仍需重視消毒處理。

6.H場(表8)：引入蝦苗時檢出IMNV(蝦隻無臨床症狀)，後續因養殖狀況不佳而停養。

7.I場(表9)：為魚蝦混養場，養殖過程均無病原檢出，惟放苗3池僅有1池有收成。

另外D、E、H場在培養益生菌過程均遭受弧菌汙染而引起因白蝦死亡，建議須慎選益生菌原料及培養容器之清潔消毒。

討論

綜觀本研究之檢驗數據可見EHP為我國現行養殖白蝦主要病原，並可藉由蝦苗、生物餌料及水體等多種途徑感染感染蝦隻，其防治建議如下：引入未帶病原之種蝦/蝦苗、引入水源須經沉澱、過濾、消毒等處理流程、養殖場需管制人員進出、養殖場於空場期間場內須徹底消毒[3,4]。定期監測本病原可檢視白蝦場生物安全漏洞，並據以輔導業者改善其飼養環境之生物安全條件。

白蝦繁殖場多為室內養殖，較易達成上述基本生物安全條件，但因為出貨頻率較高，故需做好飼養區域規劃，避免新引入之蝦隻攜帶病原或出貨時蝦販機械性攜帶病原而汙染清境場區[2]。另，因種蝦需較高能量以生產蝦苗，故繁殖場可能會餵飼餌料生物，而不同於商用飼料之生產製程可破壞病原之傳染性，餌料生物需經檢測未帶特定病原或透過冷凍處理破壞其病原傳染性[7]，才可確保繁殖場持續生產出無特定病原之蝦苗。

白蝦養殖場雖然硬體設施較難改善，但可透過改善生產管理環節來達到近似的生物安全效果，如延長空場時間達成空池消毒(C場)或添購機械設備過濾水源達成原水消毒(F場)等。生物安全也不只在於硬體設施的建立，更在於養殖場實際執行情形，如D、E場雖

有門禁可限制外來人員進出，但工作人員於其他場地工作後，未經清潔消毒又進入管制區域，故仍可能機械性攜帶其他場地病原進入該場。反之，F場雖無門禁可限制外來人員進出，但因地處偏遠鮮有外人出現，工作人員也僅在該場工作，故由人員機械性攜帶病原而造成感染的風險極低。從G場的資料也可知引入乾淨蝦苗只是養成無特定病原白蝦的第一步驟，養殖過程中引入未經消毒的池水，往往是現場疾病感染的主要原因，追溯該場發生白點病之前，其周邊地區已有白點病病例發生，該場極可能因此引入受病原污染的水源而感染白點病毒。我國目前大部分水生動物養殖場在有疫病發生需清場時，往往未做消毒處理就直接放流其養殖場水生動物，進而造成區域性的疾病爆發，故改變水生動物養殖農戶對病弱動物的處置觀念，是提升我國水生動物養殖產業的生物安全條件相當重要的一環。另外，在未做任何生物安全設施的魚蝦混養場，雖於養殖過程中無病原檢出，但實際僅收成三分之一，可能是因其選擇的混養魚種(石斑)捕食性較強，故蝦隻養殖效率不彰，或因病蝦易被魚隻捕食故池中病原易被清除。有關魚蝦混養場的養殖環境條件尚待進一步研究。

另外D、E、H場在養殖中期均有蝦隻大量死亡的情形，檢測其死亡蝦隻並無病原檢出，但蝦隻臟器可分離到弧菌，至現場追蹤發生原因時，D場提供之無標示之益生菌原料未長出市面上一般常見之益生菌種，其擴培容器盛裝之清水則養出大量弧菌。H場提供之

室外擴培(未加蓋)之益生菌液於實驗室培養後，可見弧菌為其優勢菌種。E場提供之益生菌液及原料培養狀況均正常，現場管理人員後續檢查其養殖池壁破損情形，推測未消毒之水源流入養殖池，添加益生菌液後反而造成水源的弧菌過量繁殖。綜合上述經驗，養殖過程如需使用益生菌，需做好原料之品質管理，並避免擴培液造成弧菌增長，反而使弧菌成為養殖池的優勢菌種。

養蝦成功的關鍵在於白蝦場整體對於生物安全觀念的建立與執行。引入帶病原蝦苗入場後，病原無法因養殖技術消失，更可能污染原本清淨的環境，部分病原如EHP雖可透過加強池底排污等措施維持蝦群健康，但養殖過程需耗費較大心力去維持蝦池中病原濃度，故養殖前需慎選蝦苗來源，確認飼養蝦隻未帶病原。其次需確保每批蝦苗飼養前池底無病原殘留，建議使用可確實清潔消毒之池底材質，若無法改變池底材質則要落實翻土及曬池流程[1,10]，並維持較長的養殖池的飼養空窗期。在養殖過程中，需控管養殖過程進入池水的物質未帶病原或含過量弧菌，這些物質包含餌料生物、水源、益生菌等。建議養殖過程中新引入之池水均需經過濾消毒之程序，避免周邊養殖場的病原透過水源污染環境。最後，養殖場需做好人員管制，避免工作人員、外來訪客或動物等機械性攜帶病原造成清淨場域被污染。綜合上述資料，彙整白蝦繁養殖場所需注意生物安全條件如圖2。

白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測



圖 1、9 場白蝦場各別檢驗次數及結果。

SPF蝦

- 入場前檢驗引入種蝦、蝦苗未帶病原
- 防止場內交叉汙染-統進統出、養殖場分區規劃

環境消毒及添加物管理

- 空場徹底清潔後再行消毒
- 原水經沉澱、過濾、消毒等處理後再引入池內
- 餌料生物、益生菌管理

出入管制

- 人員進出管制及清潔消毒
- 預防動物機械性傳染

圖 2、白蝦場生物安全建議。

白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測

表 3、C 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	—	—	泰國
第一批進苗	—	—	B 場
第一批養成中期	—	—	

表 4、D 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體, 底泥檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	EHP,CMNV	多來源
第一批進苗	—	—	A 場
第一批養成中期	蝦子有死亡情形, 送檢為弧菌		
第二批進苗	—	—	A 場
第二批養成中期	EHP	AHPND,IMNV,CMNV	
第二批收成	EHP,AHPND	AHPND,CMNV	
第三批進苗	—	EHP*,CMNV	A 場
第三批養成中期	EHP	AHPND,CMNV	

*為底泥檢驗

表 5、E 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	—	國內 SIS 二代苗
第一批進苗	—	—	A 場
第一批養成中期	蝦子有死亡情形, 送檢為弧菌		
第二批進苗	—	—	B 場
第二批養成中期	EHP	EHP	
第三批進苗	—	—	B 場
第三批養成中期	—	—	

表 6、F 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	EHP	泰國
第一批進苗	EHP	—	泰國
第一批養成中期	EHP	—	
第一批收成	EHP	—	
第二批進苗	EHP	—	泰國
第二批養成中期	EHP	EHP	
第二批收成	EHP	—	

表 7、G 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	EHP	泰國
第一批進苗	—	—	泰國
第一批養成中期	EHP,WSDV	EHP,WSDV	
第一批收成	EHP	EHP,IMNV,CMNV*	
第二批進苗	EHP	—	泰國
第二批養成中期	EHP,AHPND,CMNV*	EHP	
第二批收成	EHP	—	

*後續追蹤採樣無病原檢出，無法追蹤來源

表 8、H 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	—	越南
第一批進苗	IMNV	—,弧菌量高	越南
第一批養成中期	蝦子養殖狀況不佳,清池		
第二批進苗	—	—	泰國

表 9、I 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	—	多來源
第一批進苗	—	—	B 場
第一批養成中期	—	—	
第一批收成	—	—	

參考文獻

1. 陳弘成。白蝦養殖要點。養殖漁業經營管理手冊技術篇。陳秀男(編)。漁業署養殖特刊第 5 號 39-41 頁。行政院農業委員會漁業署。2001。
2. 財團法人台灣養殖發展基金會。外銷觀賞水生動物養殖場及中轉場登錄管理作業要點宣導手冊。財團法人台灣養殖發展基金會。台北市。2017。
3. Aldama-Cano DJ, Sanguanrut P, Munkongwongsiri N, Ibarra-Gómez JC, Itsathitphaisarn O, Vanichviriyakit R, Flegel TW, Sritunyalucksana K, and Thitamadee S. Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). 2018. *Aquaculture*, 490, 156-61. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.02.039
4. de la Peña LD, Somga J and Baliao D. Biosecurity in aquaculture: Philippines. 2018. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/static/news/MultistakeholderConsultation/Item7.pdf>
5. Itsathitphaisarn O, Jaroenlak P, Sanguanrut P, Salachan PV, Wiredu-Boakye D, Williams BAP, Stantiford GD, Flegel TW and Sritunyalucksana K. A new and improved PCR detection method for *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) based on a gene encoding a spore wall protein. 2016. Retrieved from <https://enaca.org/?id=115&title=new-pcr-detection-method-for-enterocytozoon-hepatopenaei>
6. NACA, Disease advisory: decapod iridescent virus 1 (DIV1): an emerging threat to the shrimp industry. Retrieved from <https://enaca.org/?id=1098&title=decapod-iridescent-virus-1-an-emerging-threat-to-the-shrimp-industry>
7. NACA, Fact sheet on *Enterocytozoon hepatopenaei*, a microsporidian parasite of shrimp. Retrieved from <https://enaca.org/?id=1064&title=fact-sheet-on-enterocytozoon-hepatopenaei-a-microsporidian-parasite-of-shrimp>
8. NACA, Report of the eighteenth meeting of the ASIA regional advisory group on aquatic animal health. Retrieved from <https://enaca.org/?id=1094&title=report-of-the-18th-regional-advisory-group-on-aquatic-animal-health>
9. OIE, Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2019. Retrieved from <https://www.oie.int/en/standard-setting/aquatic-manual/accessonline/>
10. OIE, Methods for disinfection of aquaculture establishments 2009. Retrieved from https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2009/1.1.3_DISINFECTION.pdf
11. Zhang Q, Liu Q, Liu S, Yang H, Liu S, Zhu L, Yang B, Jin J, Ding L, Wang X, Liang Y, Wang Q and Huang J. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *J. Gen. Virol.* 95: 2700-9. 2014.

The surveillance of important pathogens in shrimp and environmental samples from hatchery and grow-out farm

IW Chen^{*}, YP Lu, C Tu

Animal Health Research institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract To prevent new emerging diseases cause damage in the white shrimp aquaculture industry, the surveillance of OIE list diseases and 2 new emerging diseases, including white spot disease virus (WSD), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), taura syndrome virus (TSV), yellowhead disease virus (YHDV), infectious myonecrosis virus (IMNV), necrotising hepatopancreatitis (NHP), acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), *Enteroctyozoon hepatopanei* (EHP) and covert mortality disease virus (CMDV), of shrimp in hatcheries and grow-out farms, and associated environmental factors(larvae, raw feed, pond water and soil) were executed. After having analyzing the results of the investigation, we next aimed to assist shrimp farmers to improve the biosecurity management and diseases prevention of their farms. Totally, we had tested 724 shrimp and 948 environmental samples. The highest detection rate of above samples was 12.9% (215/1672) for EHP, followed by 1.8% (30/1672) for AHPND. According to the problems of farms encountered in this project, we suggest that the most important of building biosecurity for shrimp farms is the introduction of specific pathogen free (SPE) shrimp larvae to farms. Next, the shrimp pond should be cleaned and disinfected thoroughly before stocking seed; then, the material (food organisms, water and probiotics) should be free from the vibriosis contamination. Finally, biosecurity should be enforced to prevent irrelative people and animals from entering farms.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, biosecurity, emerging disease.