



公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：100801e203

行政院農業委員會林務局107年度科技計畫研究報告

計畫名稱： 國立海洋生物博物館海龜疾病監測(1/3) (第
1年/全程3年)
(英文名稱) Disease Surveillance of Sea Turtles

計畫編號： 107農科-10.8.1-務-e2(3)

全程計畫期間：自 107年3月1日 至 109年12月31日

本年計畫期間：自 107年3月1日 至 107年12月31日

計畫主持人： 李宗賢
研究人員： 吳柏諭、蔡明安
執行機關： 海洋生物博物館



1072448



一、執行成果中文摘要：

全球有七種海龜，其中五種海龜都曾在臺灣海域被發現，其分別為綠蠐龜 (Green turtles; *Chelonia mydas*)、玳瑁 (Hawksbill turtles; *Eretmochelys imbricate*)、欖蠐龜 (Olive ridley turtles; *Lepidochelys olivacea*)、赤蠐龜 (Loggerhead turtles; *Caretta caretta*) 以及革龜 (Leatherback turtles; *Dermochelys coriacea*)。這些瀕危海龜面對著各式各樣的人類威脅，例如捕捉、棲地破壞與汙染、海洋垃圾和新興疾病。在海龜多種疾病當中，海龜纖維乳突瘤症是一種會讓動物在外觀出現腫瘤並讓動物虛弱的疾病。該病被認為和ChHV5感染有關。因該病會對海龜族群造成威脅並在全世界許多地方被認為是一種海龜的新興疾病。但該疾病在亞洲報告仍相當的少。且過去有研究指出罹患FP的綠蠐龜其腫瘤程度愈嚴重其血液培養呈現菌血症的比例也愈高。細菌感染治療的首選主要是以抗生素為主，但抗藥性細菌的出現在獸醫學領域當中卻是個日漸嚴重的問題。再者也有研究指出具抗藥性的細菌被從海龜身上分離出來。綜上所述，在這個研究當中研究主軸主要有二部分，分述如下：第一部分為臺灣綠蠐龜纖維乳突瘤症的ChHV5流行病學研究；第二部分為由海龜分離之細菌的抗藥性研究。海龜疱疹病毒第五型的病毒序列在6隻腫瘤海龜的腫瘤樣本被偵測出。此外哈維氏弧菌為綠蠐龜鼻腔與洩殖腔最常分離到的細菌，糞腸球菌則可在欖蠐龜和綠蠐龜洩殖腔分離到。

二、執行成果英文摘要：

Of the seven marine turtles species in the world, five species are found in Taiwan: the green turtle (*Chelonia mydas*), hawksbill (*Eretmochelys imbricata*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), loggerhead (*Caretta caretta*), and leatherback (*Dermochelys coriacea*) turtles. The globally endangered sea turtle faces various anthropogenic threats, such as bycatch, habitat degradation and pollution, marine debris and emerging diseases manifestations. Among many diseases, the debilitating tumor disease (fibropapillomatosis; FP) of sea turtles, in which tumors develop in external soft tissues in association with Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) infections. FP is threatening the survival of many sea turtle populations. FP has been observed globally and is an emerging disease in marine turtles. However, few reports of FP in Asia exist. Previous reports showed that sea turtles with severe FP were more sensitive to bacteremia. The mainstay of drug therapy for bacterial infections is antibiotic treatment. However, antibiotic resistance in bacteria is a growing problem in veterinary medicine worldwide. Furthermore, previous reports showed that antibiotic resistance of bacteria have been isolated from sea turtles. Therefore, the aims of this study were as follows: 1) to characterize epidemiology of the ChHV5 from sea turtles with





fibropapillomatosis; 2) to determine the resistance to antibiotics of bacteria isolated from sea turtles. Six turtles were found to have ChHV5 sequences after amplification of tumor samples. Additionally, *V. harveyi* was the most bacteria isolated from cloaca and nasal cavity of green turtle. *Enterococcus faecalis* were isolated from cloaca of olive ridley turtle and green turtle.

三、計畫目的：

臺灣傷病擱淺海龜腫瘤疾病的流行現況調查與細菌性病原的流行現況調查。
出席2018年歐洲動物園水族館年會發表研究報告

四、重要工作項目及實施方法：

1. 細菌性病原分離、培養與鑑定：由擱淺海龜之鼻腔、洩殖腔或病灶區以無菌棉棒進行微生物採集並培養於選擇與非選擇性培養基(blood agar、MacConkey agar、Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar或1.5% NaCl之 tryptic soy agar)(圖1)，並置於25°C恆溫培養箱培養24-48小時，取生長優勢的單一菌落進行革蘭氏染色及純化與傳統生化性狀鑑定(圖2)。繼之依結果將標的菌株分別以市售之商品套組API 20NE、API 20E system (Bio Merieux sa, France)或其他生化鑑定套組等進行細菌鑑定與各表現型紀錄分析。(1). API 20NE細菌鑑定系統：將培養18-24小時之菌株，以無菌牙籤取一菌落，塗抹在潮濕之濾紙上，加oxidase試劑一滴，反應1-2分鐘，呈藍色為陽性反應並紀錄之。之後將以無菌棉棒刮取菌落，繼之以0.85% NaCl調成McFarland NO. 0.5的濃度。將調整好濃度之菌液滴入API 20NE strip的1-8孔(NO 3 ~PNG)之凹槽內，其中3、4、5圓孔(GLU、ADH、URE)加滿礦物油。打開一瓶AUX medium，加入200 μ L菌液，混合均勻，加入9-20孔(GLU、ARA~PAC)之凹槽。25°C培養24小時及48小時。加一滴NIT 1與NIT 2試劑於1孔(NO 3)，反應5分鐘，紅色為陽性。若無色，加2mg 鋅粉，反應5分鐘，無色為陽性，粉紅色為陰性。加一滴JAMES試劑於2孔(TRE)，粉紅色為陽性。記錄觀察呈色變化並比對API 20NE的資料庫。(2). API 20E細菌鑑定系統：將培養18-24小時之菌株，以無菌牙籤取一菌落，塗抹在潮濕之濾紙上，加oxidase試劑一滴，反應1-2分鐘，呈藍色為陽性反應並紀錄之。之後將以無菌棉棒刮取菌落，繼之以0.85% NaCl調成McFarland NO. 0.5的濃度，依序將菌落懸浮液分注於反應孔，並根據英文字母下方是否有標示或標示型態來決定菌落懸浮液加入的位置是否涵蓋cupule部分或是在cupule部分加入礦物油。於25°C環境下培養18-24小時後，根據說明書上的讀表來判讀試劑條結果。(3). Rapid ID32細菌鑑定系統：挑選觸酶試驗結果陰性之革蘭氏陽性球菌菌株純化於TSN 18-24小時後，以無菌棉棒刮取菌落至2 mL無菌蒸餾水中，並將菌落懸浮液調成McFarland No. 4的濃度，再於每孔反應孔中加入55 μ L的菌落懸浮液，培養於25°C 4-5小時即可判讀結果，在判讀結果之前





，先於VP反應孔加入VPA及VPB試劑各一滴，APPA、 β GAL、Pyra、 β NAG及GTA反應孔中加入FB試劑一滴，以及在HIP反應孔中加入NIN試劑一滴，並且在5-10分鐘內進行判讀。(4). DNA萃取：將上述菌株分別培養在2ml的TSB (tryptic soy broth, Difco) 中，置於25°C恆溫培養箱24小時，再分別接至200ml TSB中，置於25°C恆溫培養箱24小時後，以7000xg離心30分鐘，棄上清液，加入滅菌的磷酸緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.2) 洗菌後離心，重覆三次。將離心下來之菌體加入適當的PBS混合均勻，取500 μ L的菌液加入10 μ L (30mg/mL) 的溶菌酵素 (lysozyme)，於37°C水浴1小時；之後再加入2.5 μ L (20mg/ml) 蛋白消化酶 (proteinase K)，56°C水浴1小時；加入phenol/chloroform (1:1) 溶液500 μ l，以4°C 12000rpm離心15分鐘，取上層液加入phenol/chloroform離心 (二次)；取上層液加入等量的chloroform溶液離心；取上層液再加入等量的isopropanal溶液離心；棄上清液，加入500 μ L的70%酒精離心；棄上清液，乾燥便可得到細菌染色體DNA，加入20 μ L的滅菌去離子水，並將濃度調成50ng/ μ L，保存於-20°C。(5). 弧菌單管多引子聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 條件與程序：利用針對台灣常見之病原性弧菌之單管多引子聚合酶鏈鎖反應，可快速鑑定 *V. alginolyticus* (溶藻弧菌)、*V. cholera* (霍亂弧菌)、*V. harveyi* (哈維氏弧菌)與 *V. vulnificus* (創傷弧菌)，總反應體積為15 μ L，包含1.5~2 mM MgCl₂、10 mM Tris-HCl、40 mM KCl、200~250 μ M dNTP、0.5~1 U Taq polymerase及100~200 ng 細菌DNA，然後每對引子各取0.5~1 μ M相互混合加入反應溶液中。反應時間為96°C、5分之前處理步驟，再進行35次增幅，循環設定為96°C、40秒鐘；煉合溫度範圍為46°C、48°C、50°C、52°C、55°C與58°C、40秒鐘；72°C、1分鐘，最後進行72°C、10分鐘的延長。反應結束之後以2% agarose gel分析PCR產物，其產物大小分別為201bp (*V. alginolyticus*)、313bp (*V. vulnificus*)、587bp (*V. cholera*)與635bp (*V. harveyi*)。(6). 16S定序與分析：以PCR增幅標地細菌16S rRNA序，經電泳分析產物大小後，寄至定序中心純化與定序。之後將DNA序列結果送入GenBank比對。

2. 海龜腫瘤疾病流行病學資料調查：收集臺灣海龜腫瘤疾病的海龜種類、年齡(背甲曲線長)、地理分布等基礎流行病學資料。海龜腫瘤疾病病毒基因檢測：取腫瘤樣本以進行病毒DNA萃取，針對腫瘤病毒的capsid protein gene(UL18)、glycoprotein H gene(UL22)以及glycoprotein B gene(UL27)等基因進行增幅(表1)。取10-25mg的腫瘤樣本以DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)進行病毒DNA萃取。病毒DNA的增幅則以特異性的引子對進行病毒不同特定片段DNA的增幅 (Alfaro-Núñez and Gilbert, 2014)，主要針對ChHV5的Capsid protein gene (UL18)、Glycoprotein H gene (UL22)以及Glycoprotein B gene (UL27)。PCR的反應在50 μ l的總體積中完成，其中包含3 μ l的DNA、1 μ l (10 μ M) 的引子對、20 μ l蒸餾水 (Distilled ddH₂O)以及25 μ l的酵素 (AmpliTaq Gold®360 MasterMix; Life Technologies, Valencia, CA, USA)。所有樣本於以下條件操作：於95°C操作10分鐘，使雙股DNA變成單股。接著以40個循環數增幅DNA，每個循環分別是95°C、30秒先使DNA變性 (Denaturation)，接著以62°C的溫度、30秒使DNA與引子煉合 (Annealing)，再以72°C使DNA增幅 (Extension)





60秒。循環結束後，以72°C使 DNA 繼續增幅7分鐘。PCR產物取5 μ l以2%電泳膠體，包含SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)進行結果的確認。

五、結果與討論：

本研究收集台灣擱淺海龜進行潛在性病原細菌調查，共計採樣14隻綠蠐龜、4隻欖蠐龜與2隻玳瑁共19隻活體海龜與1隻死亡綠蠐龜，進行鼻腔與洩殖腔細菌採樣，選擇優勢或潛在病原性細菌進行菌種鑑定，其中洩殖腔樣本經含抗生素培養基分離培養可增加腸球菌之分離率，而葡萄球菌的鑑別依據革蘭氏染色的菌體形態與觸媒反應結果即可進行判斷，相較之下革蘭氏陰性菌的鑑定較顯困難，因此利用商品化生化鑑定系統可作為這些菌種鑑定的參考。此外報告指出弧菌亦是海龜的重要病原之一，不僅在擱淺海龜中發現與創傷性潰瘍性皮炎和潰瘍性口炎 - 阻塞性鼻炎 - 肺炎綜合症有關(Gazebrook and Campbell, 1990; Orós et al., 2005)，在罹患FP而免疫受到抑制的綠蠐龜也易因 *V. harveyi*與*V. alginolyticus* 感染造成菌血症(Work et al., 2003)，因此本研究亦利用弧菌單管多引子聚合酶鏈鎖反應作為 *V. alginolyticus*、*V. cholera*、*V. harveyi* 與 *V. vulnificus* (創傷弧菌)之菌種鑑定，可快速準確的鑑定這四種常見病原性弧菌(圖3)。由擱淺海龜所分離之標的菌株之鑑定結果如表1，在綠蠐龜中，無論是鼻腔或洩殖腔之結果弧菌的分離次數皆為最高，主要以 *V. harveyi* 為主，是否可能因此造成如Work等人報告所述引起FP綠蠐龜菌血症的細菌亦以 *V. harveyi* 為最多之原因，仍待收集更多數據加以分析。除了弧菌之外，另由一隻死亡綠蠐龜漿膜分離出*E. coli* 亦顯示此菌可能再擱淺不健康的海龜造成疾病。此外分別在2隻綠蠐龜與欖蠐龜之洩殖腔皆有分離到糞腸球菌，由於腸球菌不僅可能引起海龜疾病(如骨髓炎)，在其他動物亦已發現此菌有多重抗藥性的現象，因此對與海龜腸球菌的抗藥性情形也將是未來將進一步研究之方向。海龜腫瘤結果方面，總計收集7隻(其中1隻海龜腫瘤樣本待測)外觀具有腫瘤的海龜之腫瘤樣本(圖4)。所有體表有腫瘤的海龜皆為綠蠐龜，其中6隻綠蠐龜背甲曲線長度皆< 69公分(圖5)，皆為青少年綠蠐龜(Zarateet al., 2013)；1隻綠蠐龜為亞成年綠蠐龜(背甲曲線長73公分)。所有綠蠐龜發現地點皆為臺東縣。樣本取樣後進行病毒DNA萃取，針對海龜疱疹病毒第五型的capsid protein gene、glycoprotein H gene以及glycoprotein B gene等基因進行增幅，結果可見呈現陽性結果。顯示在臺灣，外觀具有腫瘤的海龜，其腫瘤組織也存在著與國外腫瘤海龜身上所發現的病毒。纖維乳突瘤感染症雖然在全球各地許多區域有被報導，但過去資料也顯示，該疾病在亞洲是非常罕見的。首先是於1958年由Hendrickson在馬來西亞的產卵綠蠐龜有觀察到此疾病。在1997年印尼的紀錄顯示該區域綠蠐龜罹患該疾病的情形 (Adnyana et al., 1997)。2017年臺灣綠蠐龜罹患該疾病的紀錄也被發表 (Li et al., 2017)，但該資料僅記錄3隻綠蠐龜罹患該疾病。海龜腫瘤疾病會發生在所有種類的海龜身上，但文獻指出以綠蠐龜最常見 (Duarte et al.,





2012; Alfaro-Nunez et al., 2014; Page-Karjian et al., 2014), 我們收集到的腫瘤海龜樣本也全部來自綠蠟龜。在年齡分布資料方面, 文獻指出海龜腫瘤疾病最常發生在青少年海龜, 而罕見於成年海龜 (Jones et al., 2016), 我們收集到的腫瘤海龜樣本也大部分為青少年海龜 (85.71%)。綠蠟龜從陸地卵窩孵化後會經過在外海的遠洋性生活週期, 歷時約3-5年 (Reich et al., 2007), 其後會靠近近岸尋找合適的攝食場域, 並且有很高的地域偏好性。遠洋性生活週期的小海龜, 則從未被發現有海龜腫瘤疾病的出現 (Herbst, 1994), 這也顯示, 海龜可能在靠近近岸定居後, 才開始出現該疾病的發生。而根據Van等人的研究指出, 綠蠟龜身上腫瘤的發生和海水中有較高營養鹽氮濃度以及大型藻類攝食有關 (Van Houtan et al., 2010; Van Houtan et al., 2014), 我們也發現所有腫瘤綠蠟龜發現地點皆為臺東縣, 因該疾病病因目前被認為可能是動物本身、病原和環境 (例如藻毒和營養鹽) 等多重因子所致 (Jones et al., 2016), 因此環境因子是否與臺灣海龜腫瘤疾病有關, 未來需要更進一步地去進行探究。

六、結論：

在綠蠟龜中, 無論是鼻腔或洩殖腔之結果弧菌的分離次數皆為最高, 因為有報告指出弧菌亦是海龜的重要病原之一, 而且在罹患FP而免疫受到抑制的綠蠟龜也易因 *V. harveyi*與*V. alginolyticus* 感染造成菌血症, 因此本研究的單管多引子聚合酶鏈鎖反應作為 *V. alginolyticus*、*V. cholera*、*V. harveyi* 與 *V. vulnificus* 之菌種快速鑑定, 可更快速準確的鑑定這四種常見病原性弧菌, 可做為救治海龜投藥的重要參考。海龜腫瘤病病因目前被認為可能是宿主本身、病原(病毒)和環境等多重因子, 誘發動物體表長出腫塊, 腫瘤海龜在腫瘤發展初期時, 因腫塊不明顯, 可能會被忽略, 未來可應用動物健康檢查的血液樣本, 進行海龜腫瘤病毒的偵測。

七、參考文獻：

1. Work TM, Balazs GH, Wolcott M, Morris R. 2003. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Dis Aquat Org.* 53: 41-46.
2. Delli Paoli Carini, Alessandro & Ariel, Ellen & Picard, Jacqueline & Elliott, Lisa. (2017). Antibiotic Resistant Bacterial Isolates from Captive Green Turtles and In Vitro Sensitivity to Bacteriophages. *International Journal of Microbiology.* 2017. 1-8. 10.1155/2017/5798161.
3. Innis CJ, Braverman H, Cavin JM, Ceresia ML, Baden LR, Kuhn DM, Frasca





- S, McGowan JP, Hirokawa K, Weber ES, Stacy B, Merigo C. 2014. Diagnosis and management of *Enterococcus* spp infections during rehabilitation of cold-stunned Kemp's ridley turtles (*Lepidochelys kempii*): 50 cases (2006 – 2012). *J Am Vet Med Assoc.* 245(3):315 – 323.
4. Zárate, P., K. Bjorndal, M. Parra, P. Dutton, J. Seminoff & A. Bolten. 2013. Hatching and emergence success in green turtle *Chelonia mydas* nests in the Galápagos Islands. *Aquat. Biol.*, 19: 217-229.
5. Duarte A, Faísca P, Loureiro NS, Rosado R, Gil S, Pereira N, Tavares L. 2012. First histological and virological report of fibropapilloma associated with herpesvirus in *Chelonia mydas* at Príncipe Island, West Africa. *Arch Virol.* 157(6): 1155-9.
6. Alfaro-Nunez A, Bertelsen MF, Bojesen AM, Rasmussen I, Zepeda-Mendoza L, Olsen MT, Gilbert MTP. 2014. Global distribution of Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. *BMC Evol Biol.* 14: 206-211.
7. Page-Karjian A, Norton TM, Krimer P, Groner M, Nelson SE, Gottdenker NL. 2014. Factors influencing survivorship in rehabilitating green sea turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *J Zoo Wildl Med.* 45: 507-519.
8. Jones K, Ariel E, Burgess G, Read, M. 2016. A review of fibropapillomatosis in Green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet J.* 212: 48-57.
9. Van Houtan KS, Hargrove SK, Balazs GH. 2010. Land use, macroalgae, and a tumor-forming disease in marine turtles. *PLoS ONE* 5(9): e12900.
10. Van Houtan KS, Smith CM, Dailer ML, Kawachi M. 2014. Eutrophication and the dietary promotion of sea turtle tumors. *PeerJ* 2: e602
<https://doi.org/10.7717/peerj.602>.
11. Gazebrook JS and Campbell RSF (1990). A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild





turtles. *Dis Aquat Organ.* 9:97-104.

12. Orós J, Torrent A, Calabuig P, Déniz S (2005). Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Dis Aquat Organ.* 3(1):13-24.

13. Adnyana W, Ladds PW, Blair D. 1997. Observations of fibropapillomatosis in Green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Aust Vet J.* 75: 737-742.

14. Li TH, Hsu WI, Lan YC, Balazs GH, Work TM, Tseng CT and Chang CC. 2017. Identification of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) in endangered green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis in Asia. *Bull Mar Sci.* 93(4):1011-1022.

15. Reich, K.J., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., 2007. The 'lost years' of Green turtles: Using stable isotopes to study cryptic lifestages. *Biology Letters* 3, 712 – 714.

16. Herbst, L.H., 1994. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 389 – 425.



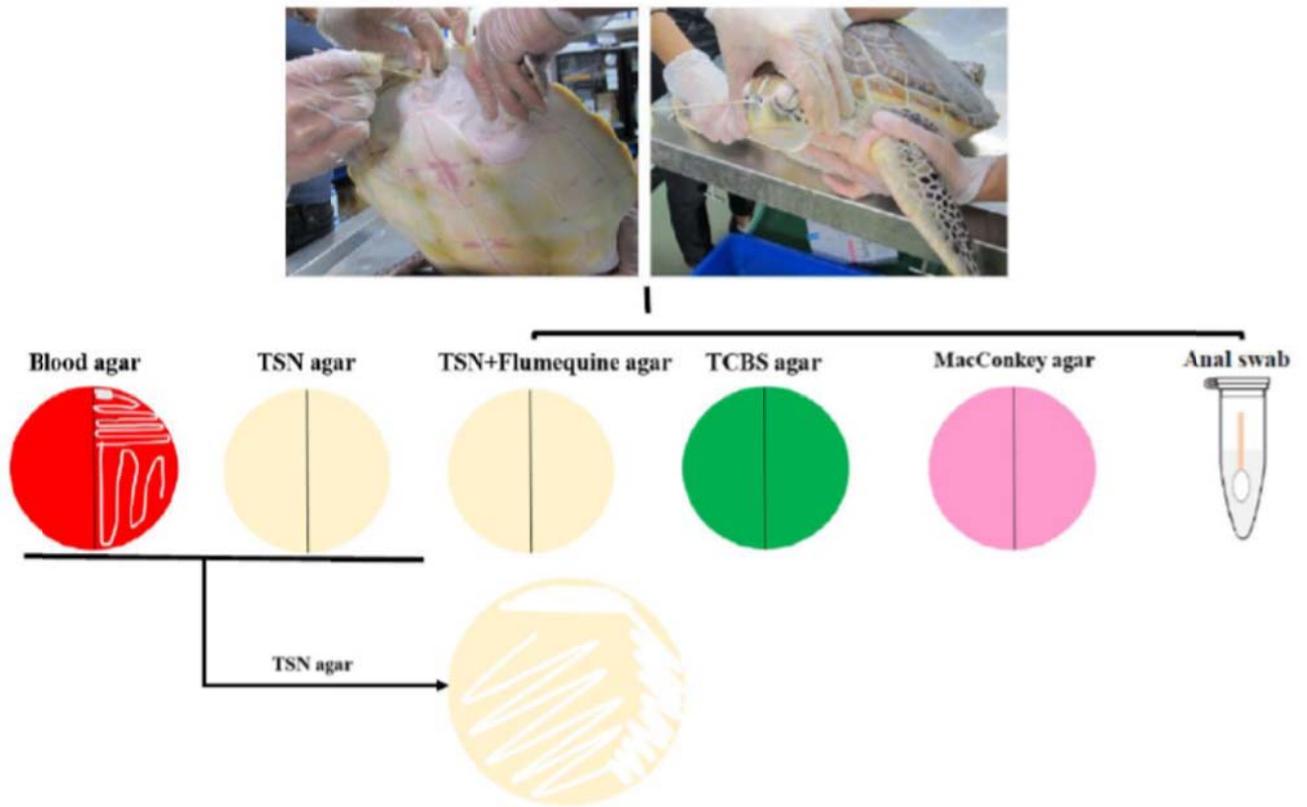


圖1.海龜採樣與細菌分離流程圖

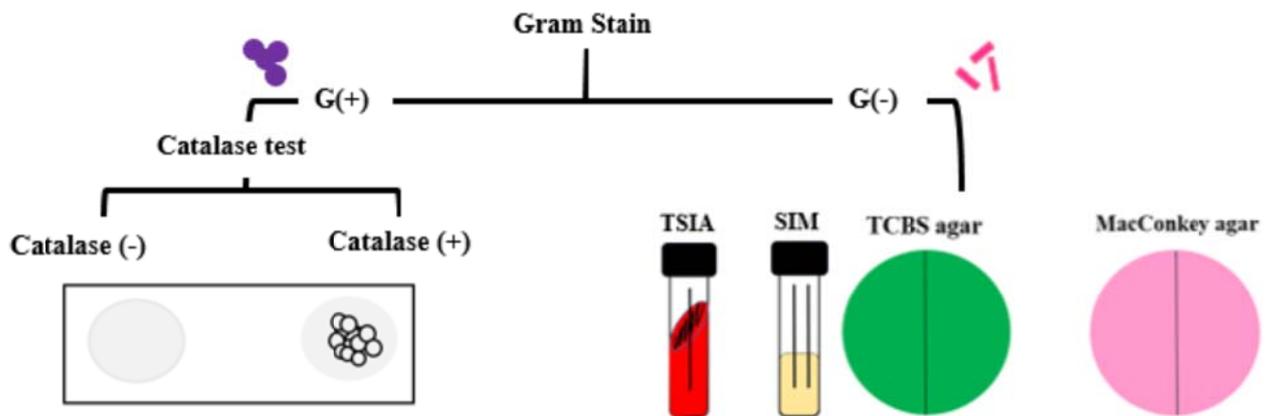


圖2.細菌格蘭氏染色與生化鑑定流程圖



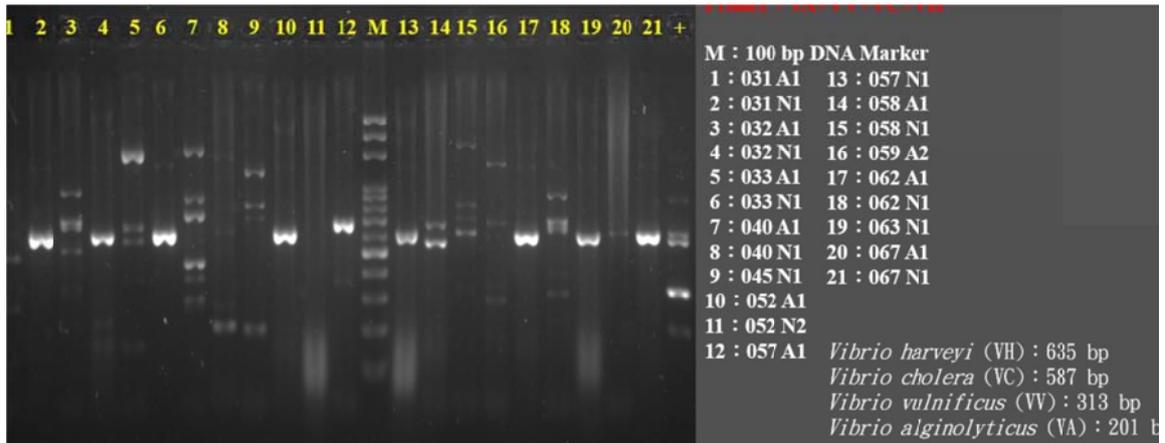


圖3.海龜弧菌之單管多引子聚合酶鏈鎖反應檢測



圖4.腫瘤海龜外觀





圖5. 海龜背甲曲線測量

表1. ChHV5 DNA增幅用的特異性引子對.

Targeted gene	Primer sequence (5'-3')
<i>UL18</i>	F: CACCACGAGGGGGAAAATGA R: TCAAATCCCCCGTTCCTCG
<i>UL22</i>	F: ACGGCGTTGGCTAGTGAATC R: GCAGTTCGGTACACACCTCT
<i>UL27</i>	F: TAACAAGAAAGAACCGCGCG R: ATTTTCCCGGTCAGTGCCAA

