



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 109 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(3/3)

(英文名稱) Disease Surveillance of Sea Turtles

計畫編號： 109 農科-10.10.1-務-e1(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 109 年 3 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

計畫主持人： 李宗賢

共同主持人： 蔡明安

執行機關： 國立海洋生物博物館

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。計 47 株的菌株從綠蠐龜分離出來，當中以 *Vibrio* spp. 的比例最高，89.3% 的菌株顯示至少對於 18 種抗生素當中的 1 種具有抗藥性。這些菌株當中對於 1 種抗生素、兩種抗生素以及 3 種以上的抗生素具有抗藥性的比例為 6.3%、8.5% 以及 74.4%。此外，ChHV5 的 DNA 可以成功的在海龜血液樣本中被偵測出來，而海龜纖維乳突瘤症則常見於亞成年綠蠐龜。

關鍵詞

海洋、綠蠐龜、流行病學、疾病、海龜皰疹病毒第五型、優勢菌、抗藥性

Abstract

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. A total of 47 bacteria strains were isolated from green turtles. Among them, the most common species identified were *Vibrio* spp., and 89.3% of the isolates showed resistance to at least one of 18 antimicrobial agents tested. The isolates resistant to only one (6.3%), two (8.5%), and multiple (74.4%) antimicrobials were observed. Additionally, ChHV5 was successfully detected by PCR in the blood sample of sea turtles. The FP was most frequently observed in subadults green turtles Taiwan.

Keywords

Marine, Green Turtle, Epidemiology, Disease, Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5), dominant isolates, Antibiotic Resistance

目錄

中文摘要	I
Abstract.....	II
目錄	III
一、前言.....	1
二、研究目的（含文獻回顧）	2
三、研究材料及方法	4
(一) 研究物種	4
(二) 研究方法	4
1. 細菌性病原分離、培養與鑑定.....	4
2. 海龜腫瘤疾病流行病學資料調查.....	5
四、結果與討論.....	7
五、參考文獻.....	19

一、前言

全球有七種海龜中，五種海龜曾在臺灣海域被發現，分別為綠蠐龜 (Green turtles; *Chelonia mydas*)、玳瑁 (Hawksbill turtles; *Eretmochelys imbricata*)、赤蠐龜 (Loggerhead turtles; *Caretta caretta*)、欖蠐龜 (Olive ridley turtles; *Lepidochelys olivacea*)以及革龜 (Leatherback turtles; *Dermochelys coriacea*)。

海龜族群在海洋生態系統中是重要且不可或缺的角色之一，如綠蠐龜 (Green turtles; *Chelonia mydas*)和玳瑁 (Hawksbill turtles; *Eretmochelys imbricata*) 就可以被觀察到其在珊瑚礁 (Coral reefs)區域扮演著和食藻性的魚類有著類似功能，可以啃食並且把珊瑚礁上的藻類移除，有助於珊瑚礁的健康。綠蠐龜和珊瑚礁魚類之間也被觀察到其存在著清除共生 (Cleaning symbiosis)的現象，因為綠蠐龜身上的附著性生物可以被珊瑚礁魚類當作食物來源。革龜 (Leatherback turtles; *Dermochelys coriacea*)是體型最大的海龜，本身具有長距離遷移的能力，在產卵地點和攝食場域間，其移動距離可達 16,000 公里，因其主食為水母，所以革龜在海洋生態系統中對於抑制水母數量過度增長有重要的意義，在氣候暖化以及漁業過度捕撈的當下，可能會導致生態系統的改變，進而使水母取代魚類成為海洋中的多數物種。

海龜在海洋生態系統中是重要且不可或缺的角色，然而海龜的族群數量與產卵棲地，在世界各地都是逐漸減少的。海龜族群面臨的常見威脅有人為獵捕、漁船混獲、船隻撞擊、海洋垃圾、產卵棲地開發、環境汙染和傳染病。

二、研究目的（含文獻回顧）

海龜的傳染性疾病中又以海龜纖維乳突瘤症 (Fibropapillomatosis;FP)更為研究者重視。海龜 FP 是會讓海龜虛弱的一種疾病，該疾病最早在 1938 年在美国佛羅里達綠蠵龜被發現。過去研究也顯示，FP 在世界上許多區域已經被發現。因為該疫病會對海龜生命造成威脅，FP 現在已經被認為在海龜的嚴重以及新興且廣泛的疫病。

FP 的主要特徵就是可以見到腫瘤的形成，其腫瘤型態可從單一到多個存在於皮膚的乳突瘤 (Papilloma)、纖維瘤 (Fibroma)、纖維乳突瘤(Fibropapilloma)及內臟型的纖維瘤。罹病的海龜其活動、攝食、視力及臟器的功能會受到影響，進一步造成動物衰弱及免疫抑制，嚴重者甚至死亡。

該疾病在世界各地雖然有被報導，但亞洲方面仍然非常罕見，本館過去研究(Li et al., 2017)也首次證實了 FP 病毒(Chelonid herpesvirus5;ChHV5)的感染與亞洲地區的海龜罹患 FP 之間的關連性。此外經由在臺灣發現的病毒序列分析也發現，這些序列和過去其他地區研究發現在海龜身上誘發腫瘤的病毒之間相關性。至於 ChHV5 是如何在海龜之間進行傳播，目前則並未有明確的定論。Work 等人的研究結果發現，在罹患 FP 海龜身上所收集的腫瘤當中，僅 7%的腫瘤可以觀察到包涵體 (Inclusion body)的存在，其中高達 65%的海龜之腫瘤沒有觀察到包涵體的存在;而海龜體表的腫瘤多寡，則與包涵體出現與否之間沒有顯著相關(Work et al., 2014)，作者因此推論，ChHV5 在海龜間的傳播方式，可能跟超級傳播者 (Super spreader)有關 (Kemper, 1980)：被 ChHV5 感染的海龜當中，僅極少數海龜個體帶有極具傳染性的 ChHV5。此外也有文獻 (Lu et al., 2000)指出，珊瑚礁常見的清潔魚隻當中可分離到 ChHV5 的 DNA，這些珊瑚礁魚類會幫定居在珊瑚礁區域的海龜清除身上的寄生蟲，這些魚隻也被觀察到會去咬海龜身體表的腫瘤 (Losey et al., 1994)，因此珊瑚礁的清潔魚隻被認為可能是在海龜間傳播 ChHV5 的媒介。

因為該疾病在臺灣被發現，應該對此疾病進行監測，以釐清該疾病在綠蠵龜發生情形是否有愈來愈多的趨勢，或是維持在一個穩定的狀態。此外研究結果也發現臺灣罹患 FP 的綠蠵龜，其腫瘤組織中的病毒具有活動性感染的角色，因此當這些罹患 FP 的海龜進入收容中心進行救治時，應注意避免造成其他海龜的感染。過去研究也顯示 ChHV5 可在幾乎所有罹患 FP 的海龜身上之腫瘤組織被偵測出，但卻罕見於海龜的血液被偵測出 (Lackovich et al., 1999; Quackenbush et al., 2001; Page-Karjian et al., 2015)，因此其病毒血症 (viremia)與腫瘤生成間的關聯性目前仍未被證實。此外過去研究也發現，罹患 FP

的海龜可見貧血及營養不良的狀態 (Jones, 2016)，而目前臺灣在腫瘤海龜的血液學、血漿生化與氣體分析的研究仍未被發表，未來可以從血液學和病毒學的研究來探究臺灣腫瘤海龜其腫瘤生成的相關因子。Page-Karjian 等人研究也發現，罹患 FP 的海龜而有較低的存活率，過去研究也指出，極度嚴重腫瘤綠蠵龜其本身都有緊迫和免疫抑制的現象存在 (Aguirre et al., 1995)。而當罹患 FP 的綠蠵龜其腫瘤程度愈嚴重時其呈現菌血症 (Bacteraemia) 的比例愈高，被認為與動物本身的免疫抑制有關 (Work et al., 2003)。而作者也發現過去他們也曾觀察到菌血症狀況嚴重的海龜，可以在其血液抹片當中觀察到異嗜球(Heterophils)之細胞質會出現嗜鹼性斑點的中毒變化現象，中毒變化的白血球在玳瑁和其他爬蟲類也有類似的現象被觀察到 (Campbell,2006;Caliendo et al., 2010)。前述的研究再次顯示罹患 FP 的海龜可能其本身因為免疫抑制的關係，因此更容易受到細菌感染(如弧菌)。

此外根據一項在海龜收容中心追蹤細菌感染 (腸球菌) 的肯氏海龜其後續存活與否的研究發現，相較於細菌感染經治療而存活的海龜，細菌感染經治療後仍死亡的海龜，其血漿中 ALT 濃度可看到會有顯著的高值 (Innis et al.,2014)。海龜細菌性病原感染的海龜必須以抗生素進行治療，然而 Delli Paoli Carini 等人研究指出在海龜分離出的細菌有相當高比例的抗藥性存在，所列抗生素種類如如 (Enrofloxacin;77%)、(Ampicillin;69.2%)、(Amoxicillin/clavulanic acid;62.5%)、(Ceftiofur;53.8%)及(Erythromycin;53.3%)。過去曾在臺灣被報告會造成蠵龜的骨溶解與產生多重抗藥性有關(Tsai et al., 2019)，而由於畜牧、養殖業以及人類用藥會使用抗生素作為抗感染性治療藥物，隨著陸地上抗生素治療的使用，可能經由河流排放至大海，因此住在近岸覓食海龜體內菌叢是否也具有多重抗藥性之情形亦是本研究要探討的重點。

因此對於瀕危海龜的保育工作而言，海龜腫瘤疾病應被視為一個新興的且對臺灣綠蠵龜具有威脅性的病毒，未來需對於這個病毒有更多的流行病學研究，而傷病收容海龜必須建立其細菌性病原監測和抗生素敏感性測驗，藉此提供收容中心獸醫師對於收容海龜治療時的參考依據。

三、研究材料及方法

(一) 研究物種

綠蠔龜 (Greenturtles; *Chelonia mydas*)、玳瑁 (Hawksbill turtles; *Eretmochelys imbricate*)、欖蠔龜 (Olive ridley turtles; *Lepidochelys olivacea*)、赤蠔龜 (Loggerhead turtles; *Caretta caretta*) 以及革龜 (Leatherback turtles; *Dermochelys coriacea*)。

(二) 研究方法

(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。

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 (NO₃~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 200μL 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 (NO₃)，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。

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。

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 $^{\circ}$ 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。

DNA 萃取：將上述菌株分別培養在 2ml 的 TSB (tryptic soy broth, Difco) 中，置於 25 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱 24 小時，再分別接至 200ml TSB 中，置於 25 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 水浴 1 小時；加入 phenol/chloroform (1:1) 溶液 500 μ L，以 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C。

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。

海龜優勢菌藥物敏感性試驗：從海龜鼻腔與泄殖腔分離之優勢菌菌株以瓊膠紙錠擴散試驗進行藥物感受性分析其抗藥性情形。以無菌棉棒沾取適量菌落使之懸浮於 0.85 % 生理食鹽水中，並調整菌落懸浮液濃度為 McFarland 0.5，即約為 1.5×10^8 CFU/mL，接著以棉棒沾取菌液並均勻塗佈於含 1% NaCl 之 Mueller Hinton agar 上，並相隔適當距離貼上藥錠片。試驗抗生素藥錠計有 Amoxicillin、Azithromycin、Ceftiofur、Chloramphenicol、Doxycyclin、Enrofloxacin、Spiramycin、Sulfamethoxazole and trimethoprim、Oxytetracycline、Penicillin、Amikacin、Ciprofloxacin、Nitrofurantoin、Piperacillin、Cephalexin、Cefoperazone、Gentamicin、Augmentin 等 18 種。

- (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(直)線長)、身形體態指數(body condition index; 體重 / 背甲直線長³ $\times 10,000$; Bjorndal et al., 2000)、藤壺附生、海洋水蛭寄生、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：取腫瘤與血液樣本以進行病毒 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。取樣本以 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 Master Mix ; Life Technologies, Valencia, CA, USA)。所有樣本於以下條件操作：於 95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C、30 秒先使 DNA 變性 (Denaturation)，接著以 62 $^{\circ}$ C 的溫度、30 秒使 DNA 與引子煉合 (Annealing)，再以 72 $^{\circ}$ C 使 DNA 增幅 (Extension) 60 秒。循環結束後，以 72 $^{\circ}$ 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。

四、結果與討論

本研究收集臺灣擱淺海龜進行潛在性病原細菌調查，109 年度目前共完成 15 隻海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，計有 35 株分離株被分離鑑定。經分析 2018-2020 年間未進行抗生素投藥前即採樣之綠蠵龜(28 隻)樣本進行整理分析，結果顯示總計有 47 株分離株被分離與鑑定出，其中鼻腔來源者有 22 株，泄殖腔來源者有 25 株。當中以弧菌(*Vibrio* spp.) 與產氣單胞菌 (*Aeromonas* spp.) 為最常見之分離株，其他如 *Shewanella putrefaciens* group、*Citrobacter freundii*、*Photobacterium damsela*e、*Acinetobacter junii*、*Mannheimia haemolytica*、*Pseudomonas alcaligenes*、*Sphingomonas paucimobilis*、*Klebsiella oxytoca*、species from the *Proteus vulgaris* group 與 *Shigella* spp. 等也可被分離出(圖 3)。在 15 株弧菌中經鑑別後發現，以 *Vibrio alginolyticus* (溶藻弧菌) 為最常見之分離株，其他則為 *Vibrio harveyi*、*Vibrio vulnificus*、*Vibrio cholerae* 和 *Vibrio metschnikovii* (圖 4)。在分離株的抗藥性結果方面，89.4%(42/47)的分離株都至少對 18 種抗生素當中的 1 種具有抗藥性。其中對僅 1 種抗生素、2 種抗生素與 3 種(含)以上抗生素具有抗藥性之比例分別為 6.3%、8.5%與 74.4%。在抗生素種類方面，其中以 74.4%之菌株對 penicillin 有抗性為最常見，其後則以 spiramycin、amoxicillin 和 cephalexin 等為分離菌株最常見出現抗藥性的抗生素(圖 5)。此外，在所有分離菌株當中的 40.4% (19/47)，其同時對 6 種(含)以上的抗生素具有抗藥性，當中又以 *Vibrio* spp. (9/19)與 *Aeromonas* spp. (4/19)為最常見(表 1)。在海龜腫瘤疾病方面，在 48 個海龜(綠蠵龜=39、玳瑁=6、欖蠵龜=2、赤蠵龜=1)血液樣本當中，有 19 個樣本可偵測出 ChHV5 DNA (表 2)。此外有關腫瘤疾病對於臺灣活體海龜生理數值影響的資料，亦於今年(2020)發表在 Bulletin of Marine Science (SCI; IF=1.742)，除了發現腫瘤與非腫瘤的海龜，其在體重、體長、血紅素、血容比、白血球總數、淋巴球、pH、BEecf、 HCO_3^- 和 TCO_2 等臨床及血液學特徵有著顯著性的差異，可為海龜救治、疾病研究參考之外，我們也發現腫瘤海龜全部來自於臺東縣(圖 6)，但因該部分資料只有活體進入收容中心之海龜(且全部為綠蠵龜)的資料，因此今年我們更進一步收集了近三年全臺灣擱淺海龜資料，希望能就腫瘤疾病在臺灣海龜的種類、區域、體型大小等各方面資訊，來提供更巨觀的流行病學相關資料。初步總計收集近三年 639 筆海龜擱淺資料進型整理分析，其中 15 筆資料顯示，海龜體表有腫瘤的出現(2.3 %；15/639)(圖 7)。15 隻體表有腫瘤的海龜全部為綠蠵龜(圖 8)。腫瘤海龜的發現地點以基隆市的比例最高

(12.0% ; 3/25)，其次為臺東縣(9.7% ; 10/103)及新北市(1.3% ; 2/145) (圖 9)。在年齡分佈方面，海龜年齡分佈與腫瘤型成之間有顯著的相關($p < 0.05$)，其中亞成年綠蠵龜(8.4%)比例最高(顯著高於青年綠蠵龜； $p < 0.05$)，其次為成年綠蠵龜(5.7%)及青少年綠蠵龜(1.8%) (圖 10)。其中青年龜、亞成年海龜及成年綠蠵龜以體長(CCL<67)、(CCL 67-84)及(CCL>84) 做為分界(Ng et al. 2018)。進一步以邏輯迴歸 (Logistic regression)分析就海龜 CCL 進行分析後發現，綠蠵龜體長(CCL)與其腫瘤形成之間有顯著的相關性(p 值< 0.05 ; OR=1.035)。通報的活體綠蠵龜有腫瘤的比例顯著高於通報的死亡綠蠵龜($p < 0.05$) (5.1% vs. 1.8%)。此外腫瘤海龜的發現與擱淺通報原因(漂流、誤捕及擱淺)或季節分佈上皆未有顯著的相關。

海洋污染被認為是全球海龜保育工作方面之重要研究領域 (Hamann et al., 2010; Rees et al., 2016)，而野外海龜身上的抗藥性細菌則被認為可能與海岸污染有關(Al-Bahry et al., 2009b; Delli Paoli Carini et al., 2017; Pace et al., 2019)。目前就我們所知，在東亞方面目前並未有綠蠵龜抗藥性細菌方面的研究發表。我們的資料顯示，在綠蠵龜分離出的細菌菌株以 *Vibrio* spp. (31.9%) 和 *Aeromonas* spp. (19.1%) 為最常見的分離株，然而其中 60.0% (9/15) 的 *Vibrio* spp. 分離株以及 44.4% (4/9) 的 *Aeromonas* spp. 分離株對於 6 種(含)以上的抗生素具有抗藥性，多重抗藥性的細菌可能會導致救傷收容海龜在需要抗生素治療時的困難。弧菌(*Vibrio* spp.) 已經在許多區域的海龜身上被分離出來(Work et al., 2003; Santoro et al., 2006; Fichi, et al., 2016; Pace et al., 2019; Alduina et al., 2020; Blasi et al., 2020)。Zavala-Norzagaray 等人在 2015 的資料也指出弧菌為海龜最常見的細菌。在我們所分離出的弧菌當中以 *V. alginolyticus* (溶藻弧菌)(46.66%) 為最常見，接下來為 *V. harveyi* (20.00%)、*V. vulnificus* (20.00%)、*V. cholerae* (6.66%) 以及 *V. metschnikovii* (6.66%)。其中分離比例最高的 *V. alginolyticus* 雖然曾於野外健康海龜的身上被分離出來 (Zavala-Norzagaray et al., 2015)，然而也有文獻(Orós et al., 2004; Orós et al., 2005)指出 *V. alginolyticus* 為海龜之伺機性之病原菌。也有報告指出 *V. alginolyticus* 為圈養之青少年海龜消化道病灶處常見分離的細菌(Chuen-Im et al., 2010)。此外，*V. alginolyticus* 也被發現於野外捕捉的菌血症海龜以及失溫的海龜身上(Work et al., 2003; Innis et al., 2014)。再者 *V. alginolyticus* 也曾經被報導與海龜的皮膚疾病有關(Wiles and Rand, 1987)。除了 *V. alginolyticus* 外，Work 等人也指出，*V. harveyi* 為菌血症海龜最常見的細菌(Work et al., 2003)。綜上所述，*V. alginolyticus* 及 *V. harveyi* 應被視為收容傷病海龜的重要致病原。*Aeromonas* spp. (19.15%) 是我們在海龜身上發現第二常見的分離株，其廣泛分佈於各區

域的水生環境當中(Igbinosa et al., 2012)。從生病的海龜培養出 *Aeromonas* spp. 也有被報導過，例如 *A. hydrophila* 曾經被報導與擱淺及圈養海龜的消化道與皮膚病灶有關(Orós et al., 2004; Chuen-Im et al., 2010; Orós et al., 2005)。以上顯示 *Aeromonas* spp. 對於海龜的致病性，然而我們也發現，88.9%的 *Aeromonas* spp. 分離株有著多重抗藥性的現象，此現象也見於近來的研究報告，如多重抗藥性的 *A. hydrophila* 從傷病海龜的骨髓炎病灶處被分離出來(Pace et al., 2018)。鑒於 *Aeromonas* spp. 對於海龜是有致病性的及其多重抗藥性的特點，獸醫師在面對 *Aeromonas* spp. 感染的海龜時，應更加謹慎處置。野外海龜身上的抗藥性細菌被認為是海洋污染的指標(Foti et al., 2009; Al-Bahry et al., 2011; Marinho et al., 2013)，而在我們的分離菌株當中，89.3%的菌株至少對於 18 種抗生素當中的 1 種具有抗藥性，然而目前分析的數據當中的海龜，在採樣之前皆沒有使用過抗生素治療，此外我們也發現高達 74.4%的菌株都具有多重抗藥性(對 3 種以上的抗生素具有抗藥性)。Al-Bahry 等人於 2011 發表的資料顯示，在綠蠓龜來源的分離株當中，60%以上的菌株有著多重抗藥性的結果，而類似的結果也在赤蠓龜身上(Pace et al., 2019)被發現，此外多重抗藥性細菌也在赤蠓龜的肺臟當中被分離出來(Ciccarelli et al., 2020)。海龜分離出的抗藥性細菌日趨受到重視(Al-Bahry et al., 2009; Foti et al., 2009; Al-Bahry et al., 2011; Al-Bahry et al., 2012; Ahasan et al., 2017; Pace et al., 2019)，因為這些絕大多數野外海龜並沒有接受抗生素治療的經驗，如同我們研究當中的海龜一樣，但是是什麼樣的原因讓我們看到分離的菌株有很高的比例有著多重抗藥性，目前我們仍無法得知，不過這些抗藥性菌株被認為可能與沿近海受到抗生素污染有關(Foti et al., 2009; Kummerer, 2009; Al-Bahry et al., 2009; Al-Bahry et al., 2012; Frazzon, 2016)。例如這些細菌可能是因為在海洋環境當中抗生素的篩選壓力(selection pressure)下而逐漸發展出抗藥性的特性，而海洋環境當中的抗生素來源則被認為與農業、水產養殖、人類醫學用藥以及獸醫動物用藥有關(Rice et al., 1995; Chee-Sanford et al., 2001; Cabello, 2006; Al-Bahry et al., 2009; Foti et al., 2009; Al-Bahry et al., 2011, 2012; Meena et al., 2015; Frazzon, 2016; Ahasan et al., 2017; Pace et al., 2019)，因此正確的使用抗生素，避免濫用，是相當重要的。因為海龜被認為是海洋生態的一個重要指標生物，因此臺灣野外海龜發現的抗藥性細菌，讓我們知道對於海洋污染的預防及管制措施是必要的(Foti et al., 2009; Al-Bahry et al., 2011; Ahasan et al., 2017; Pace et al., 2019)。欖蠓龜、玳瑁和赤蠓龜是過去文獻較少提及有腫瘤生成的物種(Jones et al., 2016)，而本研究中的欖蠓龜、玳瑁與赤蠓龜的血液樣本之病毒檢出率也有呈現陽性的反應(檢出率分別為 50.0 %、16.0 %與 100.0 %)，但動物外觀都沒有

腫瘤的生成被觀察到，顯示外觀沒有呈現腫瘤徵候且過去文獻也較少記載的這些海龜也已經被 ChHV5 所感染，而有著潛伏感染的狀態(Alfaro- Nunez et al., 2014; Alfaro- Núñez and Gilbert, 2014; Page-Karjian et al., 2015; Alfaro-Núñez et al., 2016)。在其他海龜救傷中心的研究也發現，部分的收容海龜被送到救傷中心以後，才在收容的過程當中被發現開始長出腫瘤 (Page-Karjian et al., 2014)，而此現象也如同其他皰疹病毒的潛伏特性(Kramer et al., 1998)，外觀沒有腫瘤的海龜只是呈現一個潛伏感染的狀態，此外也有研究指出 ChHV5 DNA 可在海龜的尿液以及泄殖腔當中被偵測出(Page-Karjian et al., 2015)，因此當收容中心在收治這些海龜時，應該要注意相關隔離檢疫措施，此外當腫瘤海龜在收容中心完成腫瘤移除後，除了從臨床外觀檢視是否腫瘤有再復發外，以皮膚、血液與尿液樣本進行 ChHV5 的偵測，也可額外提供獸醫師進行野放的參考依據。本研就是首次以全臺擱淺海龜資料進行腫瘤疾病的流行病學資料分析，有別於過去就該疾病僅能以進入收容中心的海龜進行檢視，能夠以更巨觀的觀點來探究該疾病在臺灣的分佈。目前發現該疾病的盛行率為 2.3%，其他區域的盛行率如美國佛羅里達為 0-72.5%，夏威夷的 1-92%，在印尼則為 21.5%，非洲有 17% (Monezi et al., 2016)。在縣市別分佈方面來看，腫瘤海龜僅侷限於基隆市、臺東縣及新北市，而根據 2010 年發表以夏威夷綠蠟龜為研究的報告指出，綠蠟龜腫瘤的發生和海水當中有較高的營養鹽氮濃度有著強烈的流行病學上的相關性(Van Houtan et al., 2010)。而類似的研究觀點於 2014 年也被提出，該研究指出可能是因為海水優氧化的環境因子誘發，進而導致海龜食物受到影響而間接造成腫瘤的生成 (Van Houtan et al., 2014)。此外，我們也發現海龜年齡分佈與腫瘤型成之間有顯著的相關，腫瘤海龜以亞成年綠蠟龜比例最高($p < 0.05$)，其次為成年綠蠟龜，青少年綠蠟龜比例最低，而過去文獻(Jones et al., 2016)也指出，腫瘤海龜的發生僅侷限於已經靠近近岸定居的海龜，而腫瘤的生成也需要較多時間(Adnyana et al., 1997)，因此我們才會看到已經定居一段時間的亞成年綠蠟龜罹患腫瘤疾病的比例最高。

本研究當中的數據可提供給臨床獸醫師在救治海龜時做為抗生素選擇以及腫瘤海龜康復後野放前的觀察之重要參考依據，而海龜來源的多重抗藥性菌株也讓我們意識到，抗生素殘留造成的汙染是否已經出現在臺灣週遭的海龜攝食場域，未來可進一步探究海龜重要攝食場域進行調查。此外本計畫經費支持的相關期刊發表資料，後續都將列入 MTSG Annual Regional Report : Sea Turtles in the East Asia Region 當中(圖 11)，將有助於臺灣在海龜保育工作上的國際能見度。MTSG Annual Regional Report 在東亞部分，目前

有臺灣、日本、南韓、中國、香港等區域之 IUCN 的海龜專家小組成員進行編撰，內容會根據各地的發表期刊文獻，就海龜保育現況、相關威脅及生態學等資料進行收集，本計畫支持的相關成果很適合於此呈現臺灣在海龜保育工作上的成效。

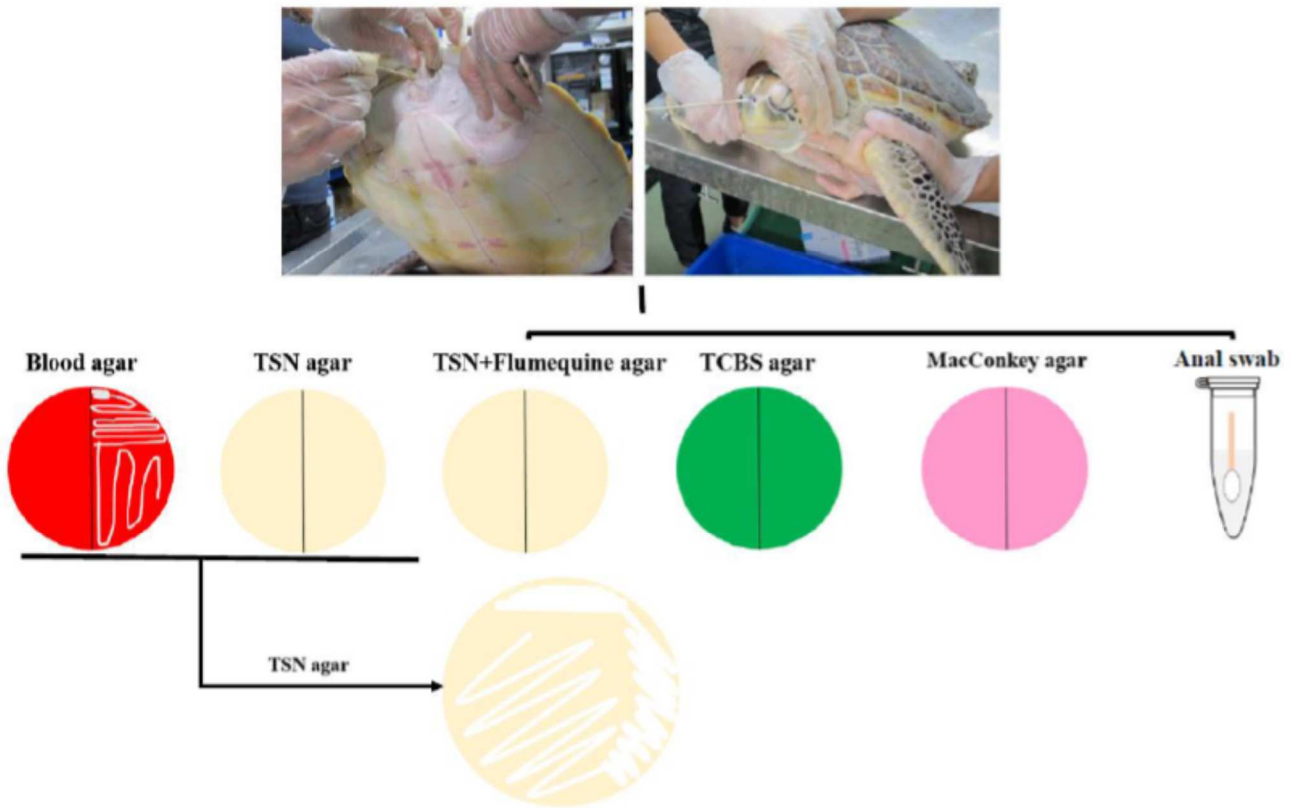


圖 1.海龜採樣與細菌分離流程圖

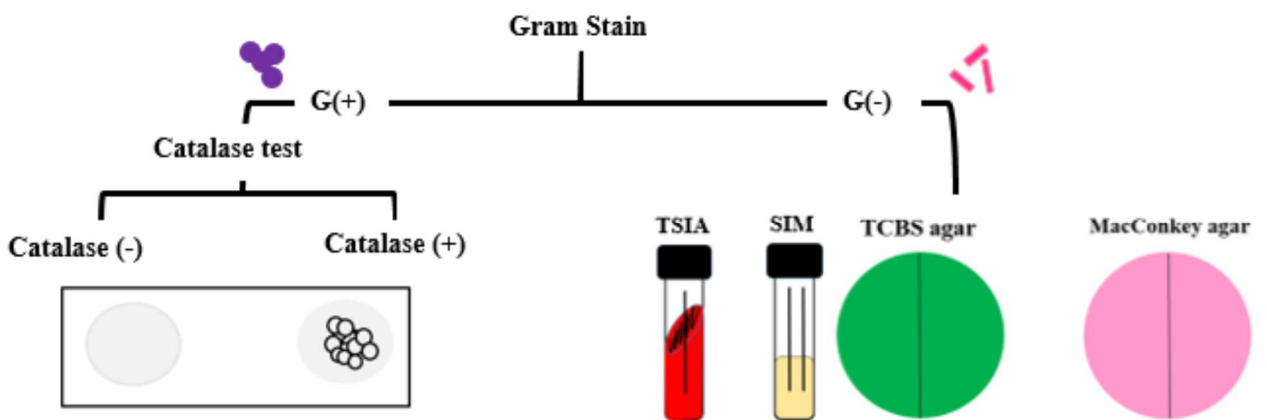


圖 2.細菌格蘭氏染色與生化鑑定流程圖

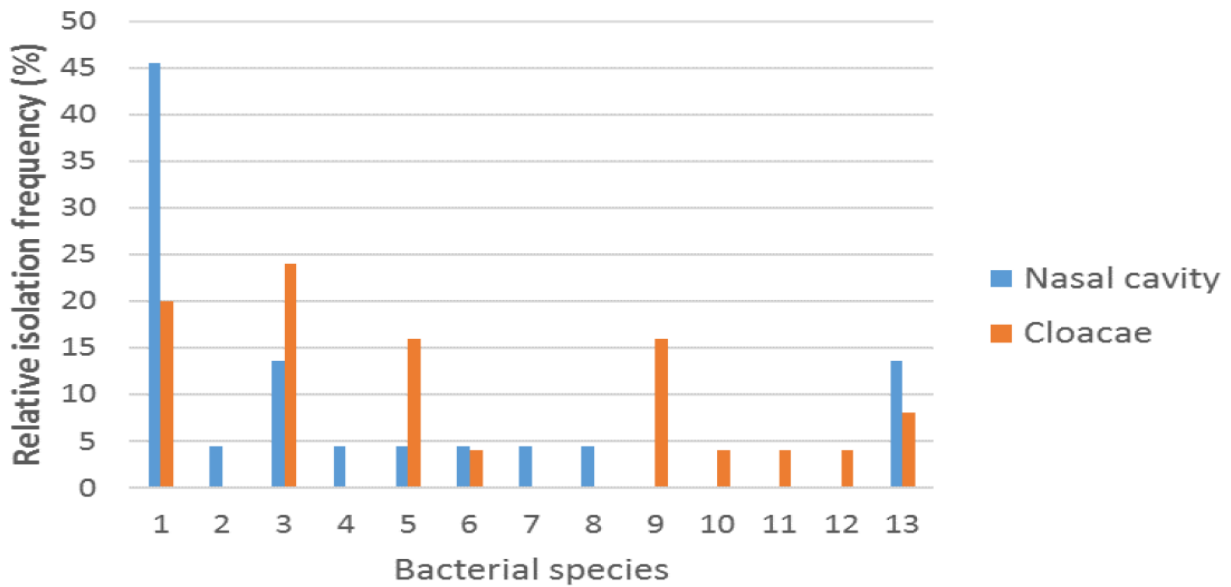


圖 3.綠蠓龜鼻腔與泄殖腔分離之菌株。X 軸數字為菌株的種類: 1. *Vibrio* spp.、2. *Acinetobacter junii*、3. *Aeromonas* spp.、4. *Mannheimia haemolytica*、5. *Shewanella putrefaciens* group、6. *Photobacterium damsela*、7. *Pseudomonas alcaligenes*、8. *Sphingomonas paucimobilis*、9. *Citrobacter freundii*、10. *Klebsiella oxytoca*、11. *Proteus vulgaris* group、12. *Shigella* spp.及 13. unidentified Gram negative bacteria。

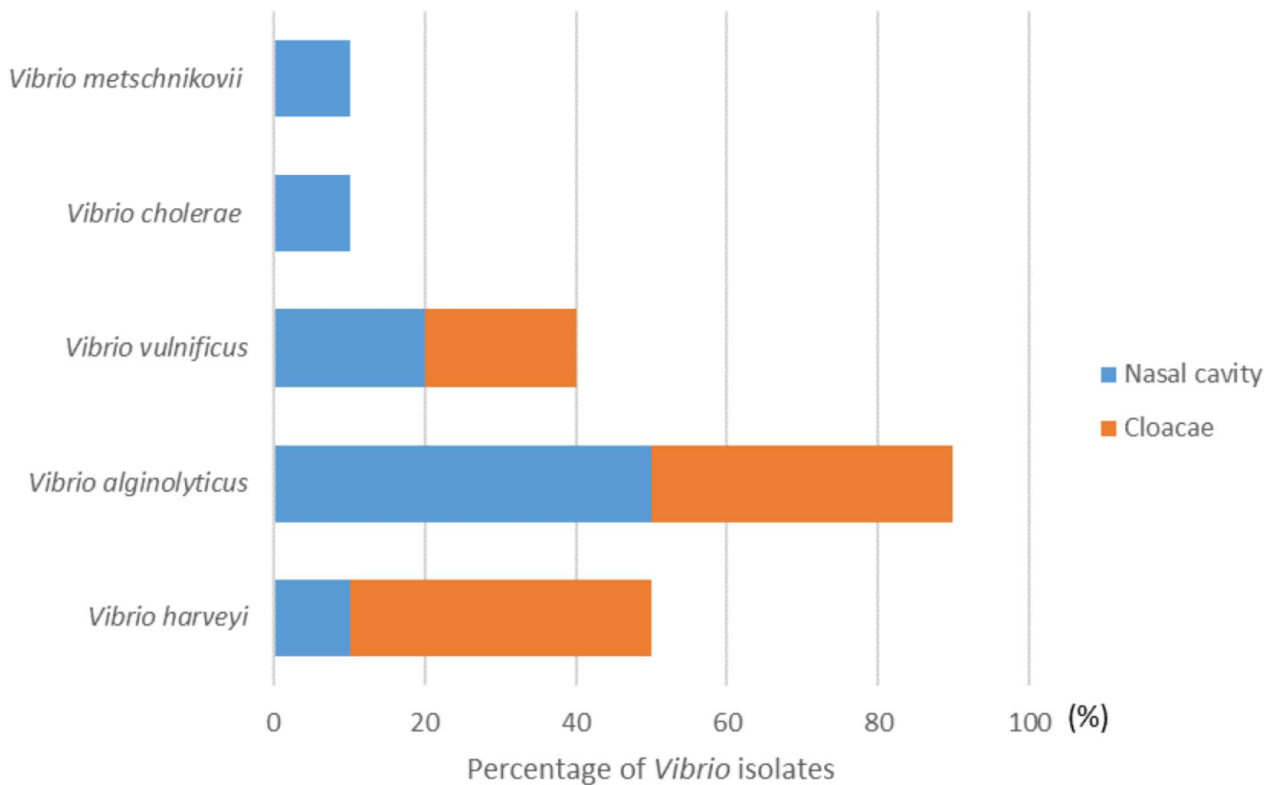


圖 4.綠蠓龜鼻腔與泄殖腔分離之弧菌。

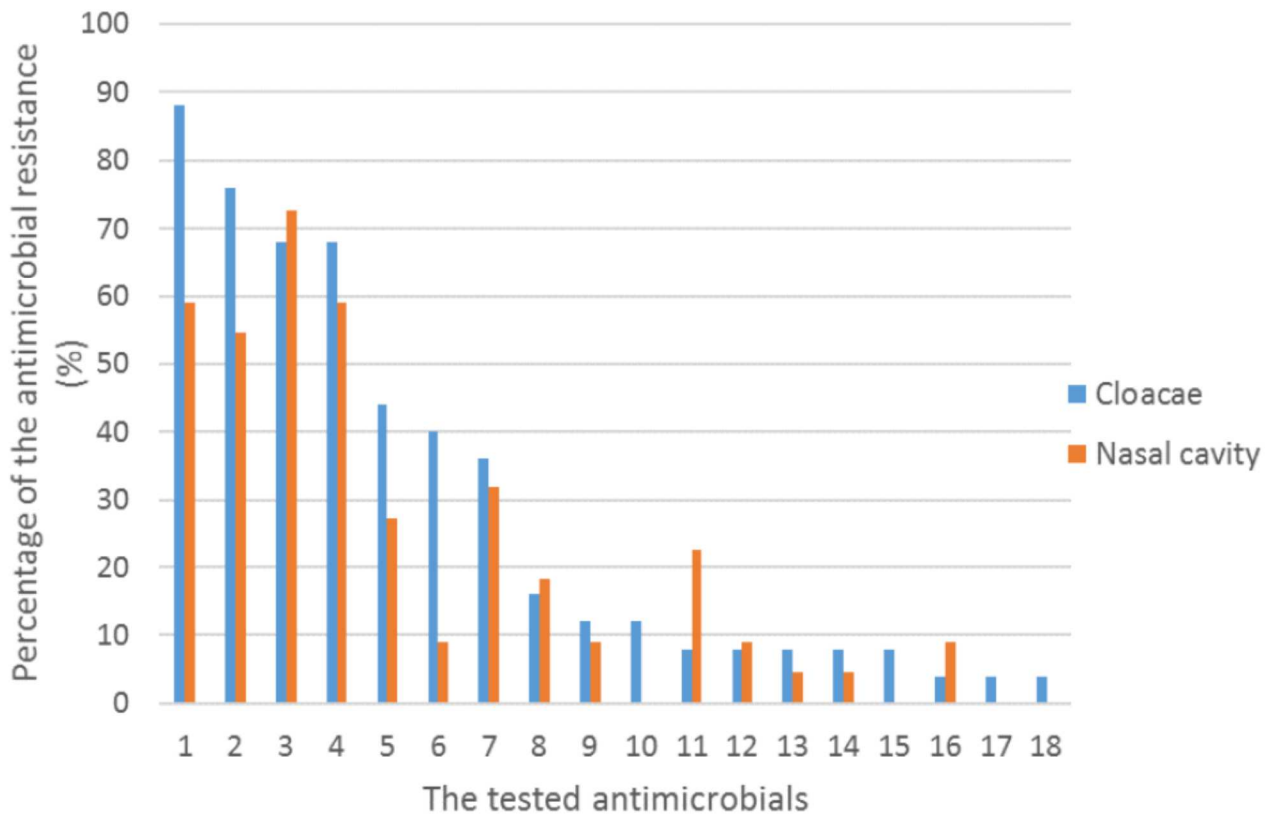


圖 5.綠蠟龜鼻腔與泄殖腔分離株之抗藥性分佈。X 軸數字為抗生素的種類: 1. penicillin、2. amoxicillin、3. spiramycin、4. cephalexin、5. cefoperazone、6. amoxicillin-clavulanic acid、7. piperacillin、8. ceftiofur、9. enrofloxacin、10. sulfamethoxazole/trimethoprim、11. amikacin、12. gentamicin、13. azithromycin、14. ciprofloxacin、15. oxytetracycline、16. nitrofurantoin、17 chloramphenicol 及 18. doxycycline。



Figure 1. Map showing the sites where turtles were stranded and collected for the analysis in this study. Turtles without FP = black circles, turtles with FP = asterisks.

圖 6. 腫瘤及非腫瘤綠蠵龜分布圖 (摘錄自 Li and Chang, 2020)

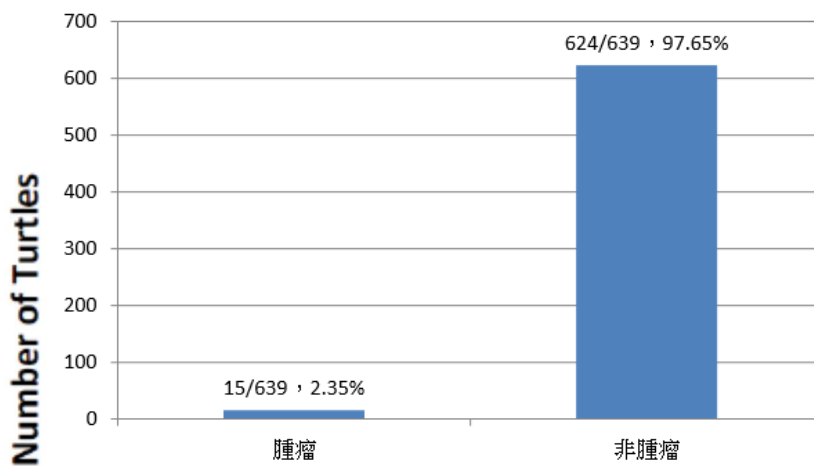


圖 7. 腫瘤及非腫瘤海龜的比較

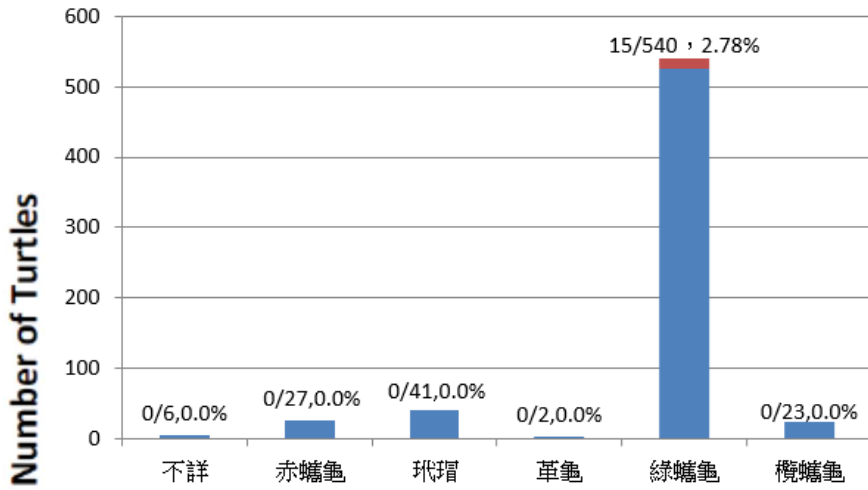


圖 8. 不同海龜呈現腫瘤的比較; ■:non-tumored; ■:tumored

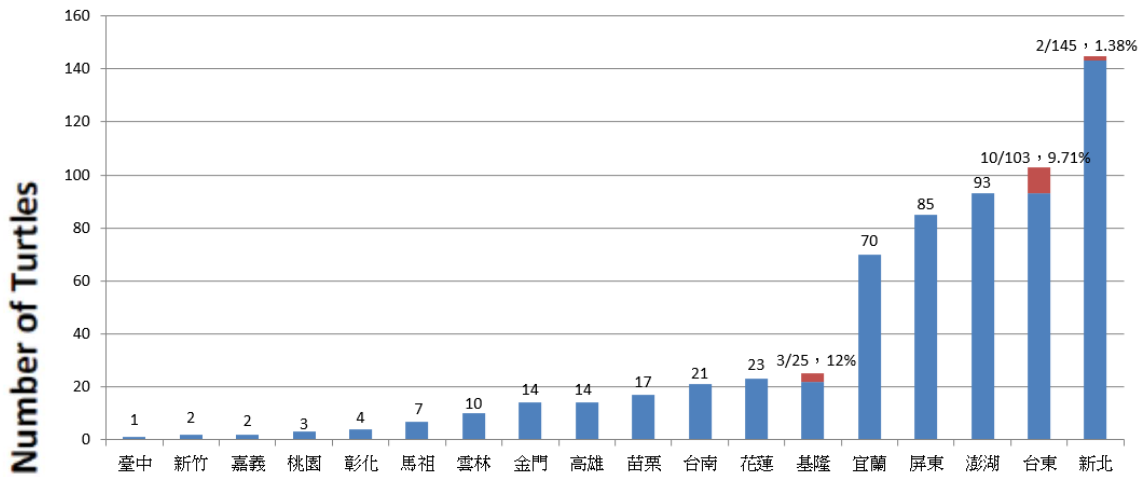


圖 9. 腫瘤海龜的地理分布; ■:non-tumored; ■:tumored

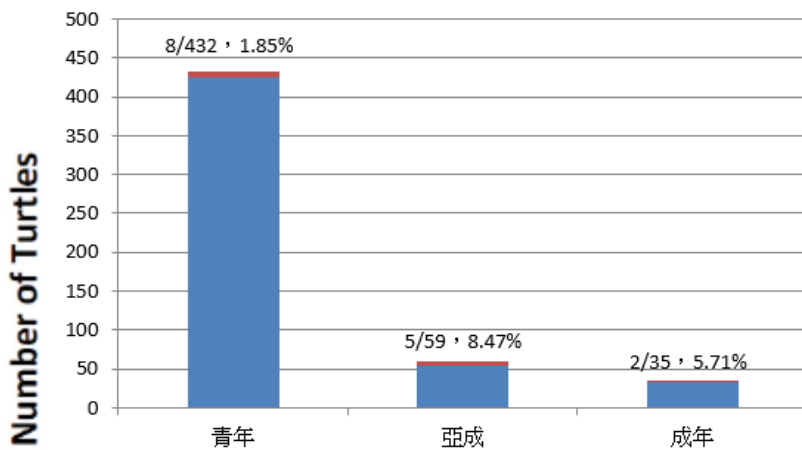


圖 10. 腫瘤海龜(綠蠵龜)的年齡分布; ■:non-tumored; ■:tumored

Sea Turtles in the East Asia Region

MTSG Annual Regional Report 2020



Green turtles foraging in the coastal waters of Luichiu Island, Taiwan
© Connie Ka Yan NG

Editors:

Connie Ka Yan NG^{1,3} and Yoshimasa MATSUZAWA^{2,3}

¹Department of Chemistry and State Key Laboratory in Marine Pollution,
City University of Hong Kong, Hong Kong Special Administrative Region,
People's Republic of China

²Sea Turtle Association of Japan, Japan

³Regional Co-Vice Chairs for the East Asia Region, MTSO

圖 11. MTSO Annual Regional Report : Sea Turtles in the East Asia Region

表 1. 對 6 種(含)以上抗生素具抗藥性的菌株分佈

Bacteria	Antimicrobial agents ^a																		No. of antimicrobial resistance
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
<i>Proteus vulgaris</i> group	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	11
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	10
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	9
<i>Vibrio harveyi</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	8
<i>Acinetobacter junii</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	8
<i>V. harveyi</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	8
<i>V. vulnificus</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	8
<i>A. hydrophila/caviae</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	7
<i>C. freundii</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	7
<i>V. harveyi</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	7
<i>V. alginolyticus</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	7
<i>V. vulnificus</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	7
<i>V. alginolyticus</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	7
<i>V. alginolyticus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	7
<i>Shewanella putrefaciens</i> group	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	6
<i>A. sobria</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	6
<i>A. salmonicida</i> ssp <i>salmonicida</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	6
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	6
<i>V. cholerae</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	6

^a 抗生素種類: 1. amoxicillin、2. azithromycin、3. ceftiofur、4. chloramphenicol、5. doxycycline、6. enrofloxacin、7. spiramycin、8. sulfamethoxazole/trimethoprim、9. oxytetracycline、10. penicillin、11. amikacin、12. ciprofloxacin、13. nitrofurantoin、14. piperacillin、15. cephalexin、16. cefoperazone、17. Gentamicin 與 18. amoxicillin-clavulanic acid。

+ 代表對抗生素有抗藥性。

- 代表對抗生素有敏感性。

表 2. ChHV5 在不同種類海龜檢出率

海龜種類	數量	基因片段/檢出率			
		UL18 ^a	UL22 ^b	UL27 ^c	總檢出率
綠蠐龜	39	0.0 % (0/39)	10.2 % (4/39)	41.0 % (16/39)	41.0 % (16/39)
欖蠐龜	2	0.0 % (0/2)	0.0 % (0/2)	50.0 % (1/2)	50.0 % (1/2)
玳瑁	6	0.0 % (0/6)	0.0 % (0/6)	16.6 % (1/6)	16.6 % (1/6)
赤蠐龜	1	0.0 % (0/1)	0.0 % (0/1)	100.0 % (1/1)	100.0 % (1/1)

^a capsid protein gene(UL18)

^b glycoprotein H gene(UL22)

^c glycoprotein B gene(UL27)

五、参考文献

1. Adnyana W, Ladds PW, Blair D. 1997. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Aust Vet J.* 75:737–742.
2. Ahasan, M.S., Picard, J., Elliott, L., Kinobe, R., Owens, L., Ariel, E., 2017. Evidence of antibiotic resistance in enterobacteriales isolated from green sea turtles, *Chelonia mydas* on the Great Barrier Reef. *Mar. Pollut. Bull.* 120, 18-27.
3. Al-Bahry, S.N., Al-Zadjali, M.A., Mahmoud, I.Y., Elshafie, A.E., 2012. Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Chemosphere* 87, 1308-1315.
4. Al-Bahry, S.N., Mahmoud, I.Y., Al-Zadjali, M., Elshafie, A., Al-Harthy, A., Al-Alawi, W., 2011. Antibiotic resistant bacteria as bio-indicator of polluted effluent in the green turtles, *Chelonia mydas* in Oman. *Mar. Environ. Res.* 71, 139-144.
5. Al-Bahry, S.N., Mahmoud, I.Y., Elshafie, A.E., Al-Harthy, A., Al-Ghafri, S., Al-Amri, I., and Alkindi, A.Y., 2009. Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: an indication of polluted effluents. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 720-725.
6. Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., Filippello, S., Visconti, G., Caracappa, G., Vicari, D., Arculeo, M., 2020. Is *Caretta caretta* a carrier of antibiotic resistance in the Mediterranean Sea? *Antibiot* 9, 116.
7. 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.
8. Alfaro-Núñez A, Bojesen AM, Bertelsen MF, Wales N, Balazs GH, Gilbert MTP. 2016. Further evidence of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) latency: high levels of ChHV5 DNA detected in clinically healthy marine turtles. *PeerJ* 4: e2274.
9. Alfaro-Núñez A, Gilbert MTP. 2014. Validation of a sensitive PCR assay for the detection of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in latent turtle infections. *J Virol Methods.* 206C: 38-41.
10. Aguirre AA, Balazs GH, Spraker TR, Gross TS. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol Zool.* 65: 831-854.
11. Bjorndal KA, Bolton AB, Chaloupkan MY. 2000. Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecol Appl.* 10:269–282.
12. Blasi, M. F., Migliore, L., Mattei, D., Rotini, A., Thaller, M. C., Alduina R., 2020. Antibiotic

- Resistance of Gram-Negative Bacteria from Wild Captured Loggerhead Sea Turtles. *Antibiotics* 9, 162.
13. Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137-1144.
 14. Caliendo V, McKinney P, Robinson D, Baverstock W, Hyland K .2010. Plasma biochemistry and hematology values in juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) undergoing rehabilitation. *J Herp Med Surg.* 20: 117-121.
 15. Campbell TW. 2006. Clinical pathology of reptiles. In: *Reptile medicine and surgery*, 2nd ed. Mader DR editors. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp. 453-470.
 16. Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Jeanjean, N.G., Mackie, R.I., 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1494-1502.
 17. Chuen-Im, T., Areekijseree, M., Chongthammakun, S., Graham, S.V., 2010. Aerobic bacterial infections in captive juvenile green (*Chelonia mydas*) and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) sea turtles from Thailand. *Chelonian Conserv. Biol.* 9, 135-142.
 18. Delli Paoli Carini A; Ariel E; Picard J; Elliott L. Antibiotic resistant bacterial isolates from captive green turtles and in vitro sensitivity to bacteriophages. *Int. J. Microbiol.* 2017, 2017, 5798161.
 19. Fichi, G., Cardeti, G., Cersini, A., Mancusi, C., Guarducci, M., Di Guardo, G., Terracciano, G., 2016. Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. *Vet. Microbiol.* 185, 56-61.
 20. Foti, M., Giacobello, C., Bottari, T., Fisichella, V., Rinaldo, D., Mamminac, C., 2009. Antibiotic Resistance of Gram Negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1363-1366.
 21. Frazzon, A.P.J., 2016. Antibiotic resistant bacteria in free-living marine species. *Vet. Rec.* 179, 648-649.
 22. Hamann, M., Godfrey, M.H., Seminoff, J.A., Arthur, K., Barata, P.C.R., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Broderick, A.C., Campbell, L.M., Carreras, C., Casale, P., Chaloupka, M., Chan, S.K.F., Coyne, M.S., Crowder, L.B., Diez, C.E., Dutton, P.H., Epperly, S.P., FitzSimmons, N.N., Formia, A., Girondot, M., Hays, G.C., Cheng, I.J., Kaska, Y., Lewison, R., Mortimer, J.A., Nichols, W.J., Reina, R.D., Shanker, K., Spotila, J.R., Tomás, J., Wallace, B.P., Work, T.M., Zbinden, J., Godley, B.J., 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endang. Species Res.* 11, 245-269.

23. Igbinosa, I.H., Igumbor, E.U., Aghdasi, F., Tom, M., Okoh, A.I., 2012. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci. World J.* 2012, 625023.
24. 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.
25. Jones K, Ariel E, Burgess G, Read, M. 2016. A review of fibropapillomatosis in Green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet J.* 212: 48-57.
26. Kemper JT. 1980. On the identification of superspreaders for infectious disease. *Math Biosci.* 48: 111-127.
27. Kramer MF, Chen S-H, Knipe DM, Coen DM. 1998. Accumulation of viral transcripts and DNA during establishment of latency by herpes simplex virus. *Journal of Virology* 72:1177-1185.
28. Kummerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – a review – Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
29. Lackovich JK, Brown DR, Homer BL, Garber RL, Mader DR, Moretti RH, Patterson AD, Herbst LH, Oros J, Jacobson ER, Curry SS, Klein PA. 1999. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. *Dis Aquat Org.* 37: 89-97.
30. Li TH and Chang CC. 2020. The impact of fibropapillomatosis on clinical characteristics, blood gas, plasma biochemistry, and hematological profiles in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*). *Bull Mar Sci.* 96(4):723-734.
31. Li TH, Hsu WL, Lan YC, Balazs GH, Work TM, Tseng CT, Chang CC. 2017. Identification of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) in endangered green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis in Asia. *Bulletin of Marine Science*, 93(4):1011–1022.
32. Losey GS, GH Balazs, LA Privitera. 1994. Cleaning symbiosis between the wrasse, *Thalassoma duperrey*, and the green turtle, *Chelonia mydas*. *Copeia*: 684-690.
33. Lu Y, Yu Q, Zamzow JP, Wang Y, Losey GS, Balazs GH, Nerurkar VR, Yanagihara R. 2000. Detection of green turtle herpesviral sequence in saddleback wrasse *Thalassoma duperrey*: a possible mode of transmission of green turtle fibropapilloma. *J Aquat Anim Health.* 12: 58-63.
34. Marinho, C., Silva, N., Pombo, S., Santos, T., Monteiro, R., Goncalves, A., Micael, J., Rodrigues, P., Costa, A.C., Igrejas, G., Poeta, P., 2013. Echinoderms from Azores islands: An unexpected source of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. *Mar.*

Pollut. Bull. 69, 122-127.

35. Meena, B., Anburajan, L., Sathish, T., Raghavan, R.V., Jha, D.K., Venkateshwaran, P., Das, A.K., Dheenana, P.S., Vinithkumar, N.V., Dharani, G., Kirubakaran, R., 2015. *Enterococcus* species diversity and molecular characterization of biomarker genes in *Enterococcus faecalis* in Port Blair Bay, Andaman and Nicobar Islands, India. Mar. Pollut. Bull. 94, 217-227.
36. Monezi TA, Mehnert DU, de Moura EM, Müller NM, Garrafa P, Matushima ER, Werneck MR, Borella MI. 2016. Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study. Vet Microbiol. 186: 150-156.
37. Ng CKY, Lam JCW, Zhang XH, Gu HX, Li TH, Ye MB, Xia ZR, Zhang FY, Duan JX, Wang WX. 2018b. Levels of trace elements, methylmercury and polybrominated diphenyl ethers in foraging green turtles in the South China region and their conservation implications. Environ Pollut. 234:735–742.
38. Orós, J., Calabuig, P., Déniz, S., 2004. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. Vet. Rec.155, 169-174.
39. 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. Org. 63, 13-24.
40. Pace, A., Meomartino, L., Affuso, A., Mennonna, G., Hochscheid, S., Dipineto, L., 2018. *Aeromonas* 382 induced polyostotic osteomyelitis in a juvenile loggerhead sea turtle *Caretta caretta*. Dis. Aquat. Org. 132, 79-84.
41. Pace, A., Dipineto, L., Fioretti, A., Hochscheid, S., 2019. Loggerhead sea turtles as sentinels in the western Mediterranean: antibiotic resistance and environment-related modifications of Gram-negative bacteria. Mar. Pollut. Bull. 149, 110575.
42. 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.
43. Page-Karjian A, Norton TM, Ritchie B, Brown CC, Mancina C, Jackwood M, Gottdenker, NL. 2015. Quantifying chelonid herpesvirus 5 in symptomatic and asymptomatic rehabilitating green sea turtles. Endang Species Res. 28: 135-146.
44. Quackenbush SL, Casey RN, Murcek RJ, Paul TA, Work TM, Limpus CJ, Chaves A, duToit L, Perez JV, Aguirre AA, Spraker TR, Horrocks JA, Vermeer LA, Balazs GH, Casey JW. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real-time PCR. Virol. 287(1): 105- 111.
45. Rees, A.F., Alfaro-Shigueto, J., Barata, P.C.R., Bjørndal, K.A., Bolten, A.B., Bourjea, J.,

- Broderick, A.C., Campbell, L.M., Cardona, L., Carreras, C., Casale, P., Ceriani, S.A., Dutton, P.H., Eguchi T., Formia, A., Fuentes, M.M.P.B., Fuller, W.J., Girondot, M., Godfrey, M.H., Hamann, M., Hart, K.M., Hays, G.C., Hochscheid, S., Kaska, Y., Jensen, M.P., Mangel, J.C., Mortimer, J.A., Naro-Maciel, E., Ng, C.K.Y., Nichols, W.J., Phillott, A.D., Reina, R.D., Revuelta, O., Schofield, G., Seminoff, J.A., Shanker, K., Tomás, J., van de Merwe, J.P., Van Houtan, K.S., Vander Zanden, H.B., Wallace, B.P., Wedemeyer-Strombel, K.R., Work, T.M., Godley, B.J., 2016. Are we working towards global research priorities for management and conservation of sea turtles? *Endanger. Species Res.* 31, 337-382.
46. Rice, E.W., Messer, J.W., Johnson, C.H., Reasoner, D.J., 1995. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 374-376.
47. Santoro, M., Hernández, G., Caballero, M., 2006. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles 407 (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *J. Zoo Wildl. Med.* 37, 549-552.
48. Tsai MA, Chang CC and Li TH (2019). Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* in an endangered olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*): A case report. *Indian J. Anim. Res.* DOI: 10.18805/ijar.B-1064.
49. Van Houtan KS, Hargrove SK, Balazs GH. 2010. Land use, macroalgae, and a tumor-forming disease in marine turtles. *PLoS ONE* 5(9): e12900.
50. 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>.
51. Wiles, M., Rand, T.G., 1987. Integumental ulcerative disease in a loggerhead turtle, *Caretta caretta*, at the Bermuda Aquarium: microbiology and histopathology. *Dis. Aquat. Org.* 3, 85-90.
52. 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.
53. Work TM, Dagenais J, Balazs GH, Schettle N, Ackermann M. 2014. Dynamics of Virus Shedding and In Situ Confirmation of Chelonid Herpesvirus 5 in Hawaiian Green Turtles with Fibropapillomatosis. *Vet Pathol.* 52: 1-8.
54. Zavala-Norzagaray, A.A., Aguirre, A.A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., Ley-Quíñonez, C.P., Hernández-Díaz, L.D.J., Canizalez-Roman, A., 2015. Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. *Front. Microbiol.* 6, 635.