

愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之研製 及對鰻魚免疫之研究

陳清¹ 邱仕炎¹ 詹益波¹ 陳秀男²

呂清泉¹ 柯浩然¹ 賴俊雄¹

¹ 臺灣省家畜衛生試驗所

² 國立臺灣大學動物系

將 *Edwardsiella tarda* 及 *Aeromonas hydrophila* 分別培養於 Brain heart infusion agar 廣底燒瓶培養基，於 37°C 培養 18 小時後以 PBS 將菌苔洗下集菌。將其濃度調製成 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 菌液各含 4~5×10¹⁰ CFU/ml，添加 0.3% 福馬林不活化處理。二類不活化菌液等量混合後，再添加 1/10 量之 Aluminum hydroxide gel 為佐劑調製成混合菌苗。

研製之菌苗以小白鼠及成鰻各 10 隻(尾)之安全試驗均無不良反應。以小白鼠之免疫試驗結果，對 *E. tarda*, *A. hydrophila* 二者之單獨及混合菌液攻擊之結果，其防禦指數 (Protective index) 分別為 10^{1.94} (87.1) 10^{1.92} (83.10) 及 10^{2.06} (114.8) 顯示效果尚稱滿意。對成鰻一次免疫注射後其抗 *E. tarda* 之凝集抗體價陽性者達 48.6%，最高可達 1:1,280，但以 1:80~1:320 者居多。抗 *A. hydrophila* 抗體價陽性者達 51.4%，最高達 1:80，而以 1:20~1:40 者較多，顯示本菌苗對鰻魚愛德華氏病及赤鰭病之防治具有實用之價值。

前 言

水產動物和陸上家畜禽同樣會受到病原微生物之感染與為害，其主要病原微生物可分為細菌、病毒、寄生蟲與黴菌等。除病原微生物外，水質之良否對於水產動物之養殖影響很大亦不容忽視。細菌性病原之感染，在鰻魚及鯰魚等方面以愛德華氏菌及產氣單胞菌最為常見，為害亦較大，(郭等 1986, 黃及劉 1986, Kuge *et al*, 1992)。此等病原微生物雖可用化學藥品或抗生素等抗菌物價加以防治，(劉及馮 1983, 劉及王 1986, Aoki *et al*, 1989)，惟長期使用抗菌物質之結果，除使細菌產生抗藥性而降低防治效果外，對於藥物之殘留亦為消費者所關注，因此如何開發生物製劑來預防水產動物之疾病，也就如同陸上動物同等重要，為吾等努力工作探討之目標。(陳等 1988, 楠田等 1987, 楠田及平 1990, kawahara *et al*, 1990, Muroga 及 Egusa 1969, 陳及郭 1986)。

在鰻魚之愛德華氏病與產氣單胞菌引起赤鰭病之單獨或混合感染預防之研究，已有多位學者專家提出報告，據宋及郭 (1977), Song & Kou (1981) 之報告稱 *E. anguillimortiferum* 之加熱死菌與福馬林死菌抗原，腹腔三次免疫鰻魚後，第 2 至第 6 星期抗體產生效價最高，免疫性之維持以福馬林死菌苗較佳。且添加 *A. hydrophila* 抗原後對 *E. tarda* 之抗體產生有加強之作用 (Song & Kou 1981) 藥浴方式亦可使鰻魚產生良好免疫效果 (Song *et al*, 1982), Salati *et al*, (1983, 1984, 1987, 1991) 及 Salati & Kusuda (1985, 1986)，使用 *E. tarda* 抗原來免疫鰻魚在抗原分析，抗體反應及抗體力價測定等方面，獲有相當程度之進展。

陳等 (1991) 以愛德華氏菌苗肌肉注射及藥浴方式免疫鰻魚後，其抗體力價測定之結果，證實二者均可產生良好之免疫反應，但以肌肉注射者抗體價較高。然而在愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之研製與實用性方面，尚待吾人繼續努力。本研究乃在混合菌苗之研製，其對試驗動物之安全性，小白鼠模式測試防禦力價及成鰻一次免疫後，抗體之評估提出報告。

材料與方法

一、試驗材料

1. 使用菌株

Edwardsiella tarda ATCC 15469 及 F-1 株。

Aeromonas hydrophila ATCC-5 及臺北株。

2. 使用培養基

SS agar 與 BHI Broth 及 Agar 等。

3. 供試動物

健康小白鼠體重在 13~15 公克及成鰻每尾體重在 220~250 公克。

4. 菌苗之調製

將 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 分別培養於 Brain heart infusion agar (BHIA) 於 37°C 18 小時後集菌，經濃度調製使 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 二類各含 $4\sim5\times 10^{10}$ CFU/ml，然後等量混合後添加 1/10 量之 A1-gel 爲佐劑調製而成。

5. 抗體測定用抗原之製備

(1) *E. tarda* 抗原：

使用加熱 121°C 一小時之洗滌菌體抗原 (O 抗原)，抗原濃度爲 5×10^{11} CFU/ml。

(2) *A. hydrophila* 抗原：

使用福馬林不活化，其濃度爲 5×10^{11} CFU/ml。即所謂 FKC 抗原。

二、試驗方法

1. 小白鼠免疫力價測定

將研製之混合菌苗以 PBS(-) 10 倍稀釋後，各免疫注射 0.5 ml 於小白鼠腹腔，二週後分別以 *E. tarda*、*A. hydrophila* 及二者之混合菌液作攻擊試驗，並以對照組作 5 天之觀察比較記錄，以求取各試驗組及對照組之防禦力價。

2. 成鰻之免疫試驗及抗體測定

(1) 將成鰻分爲三組，一組使用肌肉注射，各注射 1.0 ml 分三個部位注射，一組使用混合餌料口服免疫 (使用菌苗再添加 1/10 量之 1.5% Bentonite 作爲保護劑)，每週口服免疫二次，連續 3 週。另一組不免疫爲對照組。

(2) 採血並測定抗體價：

注射免疫組免疫後四週，自心臟動脈球採血，分離血清，並以試管凝集反應方法測定其血清中抗體價，惟使用抗原係以前述製備抗原再 50 倍稀釋者供試。口服菌苗免疫組及對照組亦以相同方法同時測定之。

結 果

安全試驗成績

小白鼠之皮下肌肉及成鰻之肌肉注射，供試之試驗動物均無不良之接種反應，耐過健存，詳如 Table 1。

Table 1. Results of Safety Test of *E. tarda* and *A. hydrophila* Combined Bacterin in Various Experimental Animals

Animal	No. of tested	Route & dose inoculated	Results
Mouse	10	0.5 ml SC.	Survived
Mouse	10	0.1 ml IM.	Survived
Eel	10	1.0 ml IM.	Survived

Remarks: SC.: Subcutaneous
IM: Intramuscular

小白鼠之力價試驗成績

免疫小白鼠以愛德華氏菌 (*E. tarda*)，產氣單胞菌 (*A. hydrophila*) 及二者之混合菌液攻擊之結果其防禦指數得知，本混合菌苗對前述菌株三種不同菌液攻擊之防禦指數 (Protective index) 分別為 $\text{Log } 10^{1.94}$ (87.1)， $\text{Log } 10^{1.92}$ (83.17) 及 $\text{Log } 10^{2.06}$ (114.8) 顯示免疫效果尚稱滿意。詳細如 Table 2、3、及 4 所示。

Table 2. Results of efficacy test of *E. tarda* and *A. hydrophila* combined bacterin challenge with *E. tarda* in mice

Group	Dose and route vaccination	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)					LD ₅₀	PI**
		4.5×10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP*	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	4/10 (40)	0/5 (0)	4.5×10 ^{8.83}	log 10 ^{1.94} (87.1)
Control	—	7/10 (70)	6/10 (60)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	4.5×10 ^{6.89}	

Remarks: Challenge with 0.2 ml IP each mouse were performed at 2 weeks after immunization.

IP:* Intraperitoneal inoculation

PI**: Protection index.

Table 3. Results of efficacy test of *E. tarda* and *A. hydrophila* combined bacterin challenge with *A. hydrophila* in mice

Group	Dose and route vaccination	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)					LD ₅₀	PI
		2×10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ¹¹		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	1/10 (10)	0/5 (0)	2×10 ^{9.55}	log 10 ^{1.92} (83.17)
Control	—	10/10 (100)	2/10 (20)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	2×10 ^{7.63}	

Table 4. Results of efficacy test of *E. tarda* and *A. hydrophila* combined bacterin challenge with both organisms mixed suspension in mice

Group	Dose and route vaccination	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)					LD ₅₀	PI
		1.3×10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ¹¹		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	0/10 (0)	0/5 (0)	1.3×10 ^{9.5}	log ₁₀ ^{2.06} (114.8)
Control	—	9/10 (90)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	1.3×10 ^{7.44}	

對免疫成鰻之抗體測定成績

免疫注射方式免疫之成鰻，採血分離血清後，以試管凝集反應試驗測定抗愛德華氏菌抗體陽性者達 48.6% (17/35 尾)，最高抗體價達 1:1,280，但以 1:80~320 者居多。

抗產氣單胞菌抗體陽性者達 51.4% (18/35 尾)，高者可達 1:80 但以 1:20~40 者居多。而菌苗混合餌料口服者則均未能以此方法測出抗體價，詳如 Fig. 1 及 2 所示。

討 論

由本試驗成績得知，水產動物之免疫，雖可參考陸上動物使用生物製劑，以注射藥浴或噴霧等方式免疫使其產生抗體，並利用抗體檢出方法加以測定其血中力價之高低。

陳等 (1991) 使用 *Edwardsiella tarda* 菌苗肌肉注射免疫鰻魚，自免疫後第 2-16 週均可測出其免疫凝集抗體價，最高可達 1:1,280，而以第 5-12 週之抗體價為最高。藥浴組免疫者，抗體之產生則偏低，但仍以第 5-12 週之抗體價較高。惟以注射方法免疫鰻魚在大量養殖及實際應用推廣方面不易實行，僅能在人工試驗上做基礎研究。

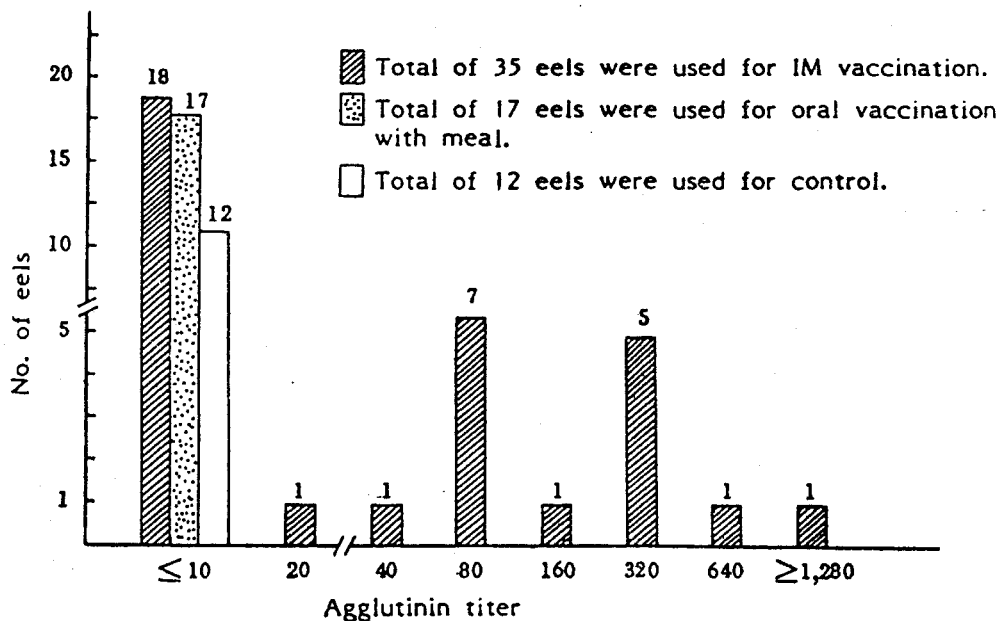


Fig. 1. Anti-*Edwardsiella tarda* agglutinin titer of eels immunized with combination bacterin of *E. tarda* and *A. hydrophila*.

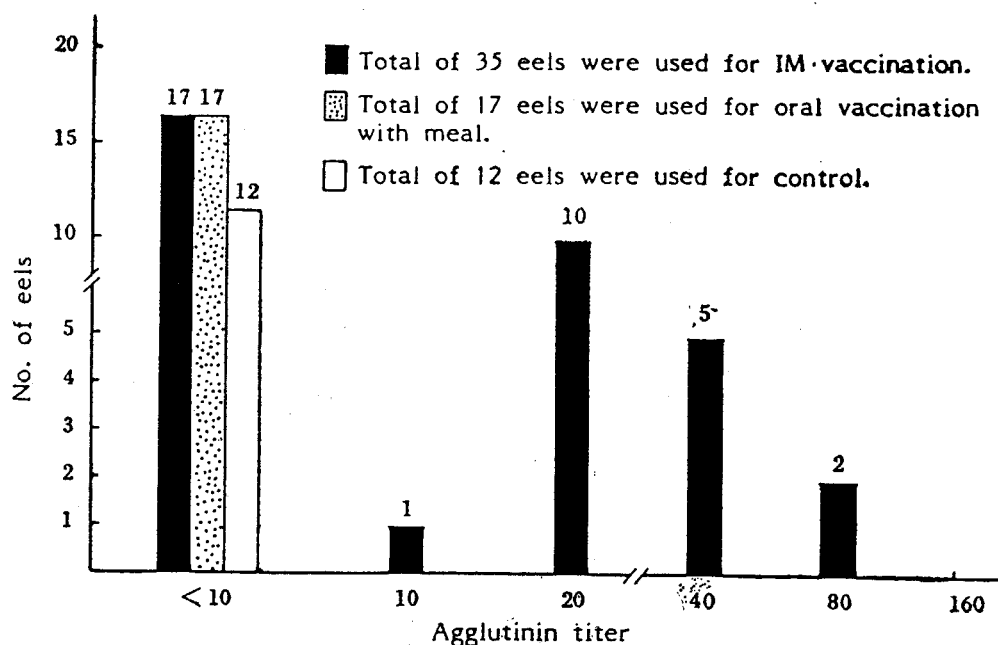


Fig. 2. Anti-*Aeromonas hydrophila* agglutinin titer of eels immunized with combination bacterin of *E. tarda* and *A. hydrophila*.

至於混合餌料口服免疫，雖可能是惟一比較可行之方法，但在本試驗中，未能測出其免疫抗體價。Song (1974) 用 *Aeromonas hydrophila* 抗原經口服免疫鰻魚，據報告雖具有低度的保護作用，但在口服兩個月內血液中都無法測出凝集抗體價。由筆者等之本次試驗及 Song 之報告，口服免疫組未能測出抗體價，推測其原因，可能是在水族箱中攝食餌料及所含抗原不足，或根本就不攝食，因此無法完成免疫反應。

筆者等在嗣後實驗室之研究探討中，曾使用胃管直接將 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 之混合菌苗，添加於餌料灌入胃內，並在省水產試驗所臺西分所，共同作混合菌苗添加餌料之小型免疫試驗中，於口服免疫後四週採血，分離血清，均可測出凝集抗體價，最高者抗 *E. tarda* 可達 1:640，抗 *A. hydrophila* 者可達 1:1,280 (尚未發表資料)。Fryer *et al.* (1976) 將不活化之 *Vibrio anguillarum* 菌苗，冷凍乾燥後添加百分之一於餌料中，餵飼 chinook Salmon 或 Coho Salmon，連續 15 天，結果證明菌苗對 Salmon 確有保護作用。由此可知抗原量達刺激誘發免疫反應者仍可產生抗體反應。可見菌苗混合餌料口服免疫深具實用價值，值得加以深入探討，研究與推廣應用。

誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會 80 農建-7.1-糧-121(68)及 81-農建-12.1-糧 67 (序 61) 生物技術之研究與開發利用計畫經費之補助。得能順利完成，謹併誌萬分之謝忱。

參 考 文 獻

- 宋延齡及郭光雄 (1977) 日本鰻魚 (*Anguilla japonica*) 對 *Edwardsiella anguillimortiferum* & *Aeromonas hydrophila* 抗原之免疫反應，臺灣水產學會刊。6-1, 65-72。
- 郭光雄、劉正義、劉朝鑫。1986。魚病專輯—鰻魚 P. 9。臺灣養豬科學研究所。
- 陳秀男、郭光雄。1986。疫苗在魚病預防上之應用，生物技術在農業上之應用研討會論文集。
- 劉朝鑫、馮安車 Iodophor 應用於鰻魚病原菌消毒試驗。1983。魚病研究專集(五)。41-50。

- 劉朝鑫、王建雄。1986。魚類病原菌抗藥性之研究—II分佈於養殖環境中之 *Edwardsiella tarda* 的抗藥性，魚病研究專輯 8: 56-67。
- 黃旭田、劉正義。1986。鰻魚 (*Anguilla japonica*) 在 *Edwardsiella tarda* 與 *Aeromonas hydrophila* 混合感染下之致病性研究。魚病專集, 8:40-55。
- 陳清、呂清泉、楊喜吟、李淑慧、賴俊雄、張天桂、詹益波、邱仕炎、陳秀男。1988。 *Edwardsiella tarda* 對於試驗動物之致病性與試製菌苗以小白鼠效力測定模式之研究。中華民國獸醫學會雜誌 14 卷1期 71-78。
- 陳清、邱仕炎、詹益波、陳秀男、呂清泉、柯浩然、賴俊雄、張天桂。1991。愛德華氏菌苗對於鰻魚免疫途徑及抗體消長之研究，魚病研究專集 (11): 16-21。
- 楠田理一、陳昌福、川合研兒。1987。 *Aeromonas hydrophila* で免疫したニシキゴイの凝集抗體價と血清タバクの變化，魚病研究 22(3): 141-146。
- 楠田理一、平啓史。1990。 *Edwardsiella tarda* で免疫したウナギの腎臟細胞の生物學的活性の變化，魚病研究 25(2): 53-58。
- Aoki Takashi, T. Kitao and M. Fukudome (1989) Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. Fish Pathology, 24(3): 161-168.
- Fryer, J. L., J. S. Rohovec, G. L. Tebbit, J. S. McMichael and K. S. Pilcher (1976) Vaccination for control of infections diseases in Pacific salmon. Fish Path., 10(2): 155-164.
- Kuge, T., K. Takahashi, I. Barcs and F. Hagashi (1992) *Aeromonas hydrophila*. a causative Agent of Mass Mortality in cultured Japanese catfish Larvae (*silurus asotus*) Gyobyu kenkyu, 27(2): 57-62.
- Kawahara, E., F. Salati, S. Nomura and R. Kusuda (1990) Location of *Edwardsiella tarda* Antigen in Tissues of Eel (*Anguilla japonica*) after Intramuscular Injection, Fish pathology, 25(4): 213-216.
- Muroga Kiyokuni and Syuzo Egusa (1969) Immune Response of the Japanese Eel to *Vibrio anguillarum*-1 Effects of Temperature on Agglutinating Antibody Production in Starved Eels, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 35(2): 868-874.
- Salati, F., Kenji, Kawai and R. Kusuda (1983) Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Patholog, 28(3): 135-141.
- Salati, F., Kenji, Kawai and R. Kusuda (1984) Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. Fish Pathology, 19(3): 187-192.
- Salati, F. and R. Kusuda (1985) Vaccine preparations used for Immunization of Eel *Anguilla Japonica* against *Edwardsiella tarda* infection. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries., 51(8): 1233-1237.
- Salati, F. and R. Kusuda (1986) Immune response of Eel to *Edwardsiella* lipid. Fish Pathology, 21(3): 201-205.
- Salati, F., M. Hamaguchi and R. Kusuda (1987): Immune response of Red Sea Bream to *Edwardsiella tarda* Antigens. Fish Pathology, 22(2): 93-98.
- Salati, F., K. Ono and R. Kusuda (1991) Oral Vaccination of glass eel of *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* infection, Fish & Shellfish Immunology, 1: 309-310.

- Song, Y.L., and G.H. Kou (1981) The Immunoresponse of eel (*Anguilla Japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studies by the Immersion method. *Fish Pathology*, 15: 249-255.
- Song, Y.L., G.H. Kou and K.Y. Chen (1982) Vaccination conditions for the eels (*Anguilla japonica*) with *Edwardsiella anguillimortifera* bacterin. CAPD Fisheries Series 8: 18-25.
- Song, Y.L. (1975) *Aeromonas hydrophila* (*A. liquefaciens*) 的免疫反應及抗原之初步分析, Masters Thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R. O. C. 32 pp.

Development of *Edwardsiella tarda* with *Aeromonas hydrophila* Combination Bacterin and Its Immunity in Eels

C. Chen¹, S. Y. Chiu¹, I. P. Chan¹, S. N. Chen², C. C. Lu¹,
H. J. Ko¹ and J. S. Lai¹

¹ Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

² Department of Zoology, National Taiwan University

Edwardsiella trada (*E. tarda*) and *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) were cultured in brain heart infusion agar plate at 37°C for 18 hrs. respectively. The bacterial cells were harvested and washed with phosphate buffered saline (PBS-). Then the concentration was adjusted to $4-5 \times 10^{10}$ CFU/ml. after bacterial suspension was inactivated with 0.3% Formalin. An equal volume of the suspensions of *E. tarda* and *A. hydrophila* were combined. Finally, 10% volume of the Aluminum hydroxide gel (33 mg/ml) was added as adjuvant.

As for the safety test of the combined bacterin, the administrations of 0.5 ml each to 10 mice subcutaneously and 1.0 ml each to 10 eels intramuscularly were made. No side reaction was observed. In the potency test the mice were challenged with *E. tarda*, *A. hydrophila* and its combination the protection indexes of $10^{1.94}$ (87.1), $10^{1.92}$ (83.1) and $10^{2.06}$ (114.8), respectively were obtained.

Forty eight percent (17/35) of the eels showed positive agglutination titer against *E. tarda* when 1.0 ml each was inoculated IM. The titer ranged from 1:80 to 1:320, with a maximum of 1:1,280. The figure for *A. hydrophila* 51.4% (18/35). But the titer ranged rather low, in between 1:20 and 1:40, with a maximum of 1:80. It indicated that the combination bacterin has practical values for the control of both Edwardsiellosis and Red fin disease of eel.