

愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之研製及對鰻魚口服免疫試驗

陳清¹、柯浩然¹、盧泰志¹、呂清泉¹
賴俊雄¹、詹益波¹、蕭澤民²、陳秀男³

¹台灣省家畜衛生試驗所

²省水試所台西分所 ³國立台灣大學動物系

摘 要

Edwardsiella tarda (*E. tarda*)及*Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*)分別培養於Brain heart infusion agar 培養基，於30°C培養18-20小時後以Phosphate Buffered Saline (PBS)將菌苔洗下集菌，並將二種菌液調整其濃度成各含 $4-5 \times 10^{10}$ CFU/ml，等量混合後分為二組，一組以0.3%福馬林不活化處理及添加0.01% Thimerosal為防腐劑。另一組先以超音波擊碎處理後再添加0.3%福馬林及0.01% Thimerosal，然後各組菌液添加1/10量之Aluminum hydroxide gel-Bentonite混合佐劑，製成二元混合菌苗。

研製之二組菌苗，分別在實驗室以混合餌料強制口服方式，免疫鰻魚後採血，使用試管凝集反應法，均可測出抗*E. tarda*及*A. hydrophila*之抗體價，最高可達1: 1280。而抗*A. hydrophila*之抗體價顯較抗*E. tarda*高。

在田間免疫試驗，分為口服及肛投二種方式，免疫後採血，同法測定其抗體價，得知二種投與方式免疫者均可產生抗體，但以肛投者較口服者之抗體價為高，最高達1: 5120，而抗*A. hydrophila*之抗體價恆較抗*E. tarda*為高，與實驗室之成績頗相類似。由本試驗得知鰻魚以愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗口服免疫可產生特異性之免疫抗體。

一、前言

魚病之細菌性疾病中，愛德華氏病及赤鱗病之發生頻率頗多(Kuge et al. 1992, 郭等1986, 黃及劉1986)，雖可使用化學藥品來消毒殺菌，或降低病原菌之感染為害，但是負面之影響，如病原菌之抗藥性亦是一大隱憂。(Aoki et al. 1989, 劉及馮1983, 劉及王1986)。而在生物製劑方面，菌苗之研究開發與應用也有很大之發展(陳及郭1986)。在愛德華氏病菌苗開發方面，Salati et al. (1983、1984)報告最好有效預防用物質為Crude LPS中之Polysaccharide。Salati及Kusuda (1985-1986)又報告Crude LPS最好。但在抗體產生方面則以不含Lipid A之全菌苗為最高。惟在愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫試驗，報告不多，宋及郭(1977)曾報告*E. tarda*及*A. hydrophila*福馬林死菌苗等量混合之藥浴法及腹腔注射法之免疫試驗。茲僅將其混合菌苗混合餌料口服或單獨菌苗肛投免疫後抗體產生之情形報告如下。

二、試驗材料與方法

(一)、試驗材料：

1. 使用菌株：*Edwardsiella tarda*為F-1株。*Aeromonas hydrophila*為台北株。
2. 使用培養基：SS Agar, BHI Broth, BHI Agar等。
3. 供試鰻魚及小白鼠：鰻魚體重約200-250公克，小白鼠體重13-15公克。
4. 菌苗之調製：

將*E. tarda*及*A. hydrophila*分別培養於Brain heart infusion agar廣底平板培養基在30°C下培養18-20小時後，以PBS將菌苔洗下集菌，經濃度調製成*E. tarda*及*A. hydrophila*各含 $4-5 \times 10^{10}$ CFU/ml然後等量混合後分為二組。一組以0.3%福馬林不活化處理及添加0.01% Thimerosal為防腐劑。另一組先以超音波擊碎處理後再添加0.3%福馬林及0.01% Thimerosal，然後各組菌液再添加1/10量之Aluminum hydroxide gel-Bentonite混合佐劑，製成二元混合菌苗。

5. 抗體測定用抗原之製備：

(1)*E. tarda*抗原：

使用加熱121°C 1小時之經洗滌菌體抗原(0 抗原)，抗原濃度為 5×10^{11} CFU / ml。

(2)*A. hydrophila*抗原：

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

(二)、試驗方法

1. 實驗室菌苗混合餌料投與法：

即將菌液 8ml 加入少量餌料作成半糊狀濃厚懸液，以胃導管將上述懸液灌入，每天一次，連續五天，經一個月採血，分離血清，以試管凝集反應法測其血中抗體價。

2. 小型田間試驗法：

分為二種方式，一種混合餌料口服，另一種為肛投，直接插入體內。混合餌料口服之劑量為每尾以 1ml 計算，連續投與二週。至於肛投僅實施二次，每次每尾 1ml，間隔10天。

3. 以小白鼠模式免疫後作攻擊試驗測定其保護力價：

將二組菌苗各以PBS 10倍稀釋後，腹腔注射健康小白鼠每隻 0.5ml，二週後各組各分別以*E. tarda*, *A. hydrophila*，及二者之混合菌液作攻擊試驗，觀察一週，記錄其斃死情形，並求取各組之保護力價。

三、試驗結果

(一)、實驗室免疫鰻之抗體測定成績：

二組混合菌苗均含有氫氧化鋁膠及Bentonite為佐劑，簡稱福馬林不活化菌苗及超音波處理菌苗，分別混合餌料後，以胃導管之方式，投入胃內，每尾 8ml，連續五天，最後投藥後經三週，採血分離血清，以試管凝集反應法測試抗*E. tarda*及*A. hydrophila*之抗體價，福馬林不活化菌苗免疫組之幾何平均值分別為179.6及226.3。超音波處理組為93.3及592.6。而對照組分別為<14.5及<17.3。由本試驗成績得知，口服者亦可獲得良好之免疫抗體價，惟抗*A. hydrophila*之抗體產生較*E. tarda*為高。(表一)

(二)、田間免疫鰻之抗體測定成績：

在田間免疫試驗中，福馬林不活化菌苗及超音波處理菌苗各再分為二種方式免疫，一種為混合餌料口服，另一種為肛投方式給藥，前者以每尾 1ml 之劑量計算，混合餌料給藥，連續二週。後者則以每尾 1ml 之劑量自肛門插入投藥二次，每次間隔10天，最終免疫後三週及六週採血，同法以試管凝集反應測試其抗體產生之結果，得知抗*E. tarda*及*A. hydrophila*之抗體價，無論是福馬林不活化菌苗或超音波處理菌苗，肛投方式給藥者之幾何平均值均較口服方式給藥者之幾何平均值為高。(詳細成績如表二-A及二-B所示)。

(三)、研製菌苗以小白鼠模式評估其免疫力價成績：

依小白鼠模式菌苗免疫後二週，分別以 *E. tarda*, *A. hydrophila* 及其二者之混合菌液攻擊之結果，得知福馬林不活化菌苗組對前述三種菌液之攻擊保護指數，依序分別為 $\text{Log } 10^{3.41}$ (2.570), $10^{2.34}$ (219) 及 $10^{2.27}$ (186)。而超音波處理組為 $\text{Log } 10^{2.96}$ (912), $10^{2.06}$ (115) 及 $10^{2.71}$ (513)。效果尚稱滿意。詳如表三及四所示成績。

表一 在實驗室內鰻魚口服愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫抗體力價測定成績。

Table 1. Results of antibody titers detection of eels vaccinated with *E. tarda* and *A. hydrophila* combination bacterin by orally in laboratory.

Group	Formalin killed cell		Sonicated cell		Control	
	Antibody titer against		Antibody titer against		Antibody titer against	
Eel No.	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>
1	40	160	160	640	< 10	< 10
2	320	160	160	320	< 10	< 10
3	80	160	40	320	20	40
4	640	320	80	1280	10	20
5	320	320	40	1280	10	< 10
6	160	320	320	1280	< 10	10
7			80	1280	< 10	< 10
8			40	320	< 10	< 10
9			160	160		
G.M.T.	179.6	226.3	93.3	592.6	< 14.5	< 17.3

Remarks:

1. Bacterin with meal 8 ml/fish by oral vaccinated daily continuous for 5 days.
2. Tube agglutination test were used for antibody titer detection.
The titers of agglutination test represent the reciprocal of the highest serum dilution showing positive responses.
3. G.M.T. = Geometric mean titer.

表二-A 在田間鰻魚口服及肛投愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫抗體力價測定成績。

Table 2-A: Results of antibody titers detection of eels vaccinated with *E. trada* and *A. hydrophila* combination bacterin by orally and anal intubation in field.

Group	Formalin killed cell				Sonicated cell				Control	
	Oral		Anus		Oral		Anus			
Route of vaccination										
Eel No.	Antibody titer against									
	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>
1	10	40	20	1280	160	80	320	640	10	20
2	320	160	80	5120	320	160	160	320	10	40
3	320	320	80	5120	80	20	320	640	10	20
4	20	640	320	1280	80	320	640	640	10	10
5	320	160	160	1280	320	80	320	640	10	20
6	40	320	40	160	320	320	640	5120	10	10
7	160	640	320	2560	80	160	1280	5120	10	20
8	10	20	160	5120	40	160	320	5120	10	10
9	160	160	80	5120	160	40	320	320	10	20
10							320	640		
G.M.T.	73.4	172.8	100.8	2031.9	137.2	108.9	765.3	2249.6	10	17.1

Remarks:

1. Bacterin with meal 1 ml/fish by orally for 2 weeks, anal intubating vaccination twice, on 10 days interval.
2. The antibody titers were performed at 3 weeks after finally vaccination.

表二-B 在田間鰻魚口服及肛投愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫抗體力價測定成績。

Table 2-B: Results of antibody titers detection of eels vaccinated with *E. trada* and *A. hydrophila* combination bacterin by orally and anal intubation in field.

Group	Formalin killed cell				Sonicated cell				Control	
	Oral		Anus		Oral		Anus			
Route of vaccination	Oral		Anus		Oral		Anus			
Eel No.	Antibody titer against									
	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>	<i>E.t</i>	<i>A.h</i>
1	< 10	320	160	1280	< 10	80	20	640	20	40
2	< 10	320	160	1280	< 10	160	10	1280	10	40
3	< 10	1280	10	2560	< 10	160	10	640	10	20
4	< 10	160	10	80	< 10	1280	10	160	10	10
5	< 10	160	320	5120	20	640	320	5120	< 10	40
6	< 10	80	10	640	10	160	40	640	< 10	40
7	< 10	320	40	2560	10	160	10	640	< 10	40
8	< 10	160	10	2560	10	640	10	640	< 10	40
9	< 10	40	160	1280	40	1280	10	640	< 10	40
10	< 10	40	640	640	< 10	160	10	80	< 10	10
G.M.T.	< 10	171.5	56.6	1194.3	< 12.3	298.6	17.4	597.1	< 10.7	28.3

Remarks:

1. Bacterin with meal 1 ml/fish by orally for 2 weeks, anal intubating vaccination twice, on 10 days interval.
2. The antibody titers were performed at 6 weeks after finally vaccination.

表三 愛德華氏菌與產氣單胞菌福馬林不活化全菌混合菌苗，對小白鼠之免疫力價測定成績。

Table 3: Results of efficacy test of *E. tarda* and *A. hydrophila* Formalin killed whole cells combination bacterin in mice.

Group	LD ₅₀ obtained after challenge with different pathogenic organisms		
	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i> + <i>A. hydrophila</i>
Experiment	$1 \times 10^{9.72}$	$1 \times 10^{8.93}$	$1 \times 10^{8.88}$
Control	$1 \times 10^{6.31}$	$1 \times 10^{6.59}$	$1 \times 10^{6.61}$
Exp.	$10^{3.41}$	$10^{2.34}$	$10^{2.27}$
Cont.	(2.570)	(219)	(186)

Remark:

Challenge with 0.2 ml of bacterial suspension IP each mouse were performed at 2 weeks after immunization.

表四 愛德華氏菌與產氣單胞菌超音波擊碎處理混合菌苗，對小白鼠之免疫力價測定成績。

Table 4: Results of efficacy test of *E. tarda* and *A. hydrophila* sonicated combination bacterin in mice.

Group	LD ₅₀ obtained after challenge with different pathogenic organisms		
	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i> + <i>A. hydrophila</i>
Experiment	$1 \times 10^{9.01}$	$1 \times 10^{8.86}$	$1 \times 10^{9.01}$
Control	$1 \times 10^{6.05}$	$1 \times 10^{6.8}$	$1 \times 10^{6.3}$
Exp.	$10^{2.96}$	$10^{2.06}$	$10^{2.71}$
Cont.	(912)	(115)	(513)

四、討 論

水產動物與家畜禽疾病之防治，除注意飼養管理與環境衛生外，以抗菌物質及生物製劑之使用最為普通。而抗菌物質可能誘發藥劑耐性菌株之增加，對於嗣後疾病之防治增添不少困擾。因此生物製劑之研究開發與應用乃未來發展之重要課題(陳秀男及郭光雄1986，陳等1988 1991，楠田等1987 1990)。

在本研究中愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗，添加於餌料口服方式免疫鰻魚，在實驗室之研究中，無論是福馬林不活化菌苗或超音波處理菌苗均可產生良好特異性抗体價，詳如試驗成績。而筆者(陳等1993)以往在水族箱中之試驗，以口服方式未能查出抗體，應與鰻魚在該環境中根本就不攝食餌料或抗原量不足，無法誘起良好免疫有關，由本次試驗成績可以獲得證實。

在田間免疫試驗方面，二組菌苗免疫之鰻魚，以肛投方式及混合餌料口服免疫者，亦均可測出特異性之免疫抗体。免疫保護效力與抗體價之高低，Salati et al. (1983)報告以Lipopolysaccharide (LPS)，培養濾液及福馬林不活化菌苗(FKC)為抗原肌肉注射，均可使免疫鰻產生抗體價，但抗體價的高低與攻擊保護力價並無正相關。

據宋(1975)之報告，*Aeromonas hydrophila*抗原經口免疫鰻魚，雖然在口服後兩個月之內，血液中都無法測出凝集抗體，但免疫過之鰻魚具有某程度的保護作用，宋等(1981 1982)在*E. tarda*菌苗之浸泡免疫與條件亦有所報告。

Salati et al. (1991)報告超音波處理菌苗口服免疫者具有75%之攻擊保護效果，而福馬林不活化菌苗，雖較對照組為優，但效果並不滿意，由於其使用小魚為材料，因此並未對抗体之產生情形加以探討。在本研究中，愛德華氏菌與產氣單胞菌之混合菌苗，可從混合餌料口服免疫方式中測出其特異性免疫抗体，誠實一大突破。惟抗*A. hydrophila*之抗體價恆較抗*E. tarda*為高，除供試鰻魚個體差外，是否有其他因素及其攻擊保護力價等則尚待探討。

謝 辭

本研究並蒙行政院農業委員會82科技1.1-糧-56序(70)，計畫經費之補助，田間試驗承蒙雲林縣家畜疾病防治所同仁之協助，得能順利完成。謹併誌萬分之謝忱。

參考文獻

- 郭光雄、劉正義、劉朝鑫。1986。魚病專輯—鰻魚P.9。台灣養豬科學研究所。
- 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，195-207。
- 宋延齡、郭光雄。1977。日本鰻魚(*Anguilla japonica*)對*Edwardsiella anguillimortiferum* and *Aeromonas hydrophila*抗原之免疫反應。台灣水產學會刊6-1, 55-72。
- 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。
- 陳清、邱仕炎、詹益波、陳秀男、呂清泉、柯浩然、賴俊雄。1993。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。農委會漁業特刊第34號，魚病研究專集13: 25-31。
- 劉朝鑫、馮安車。1993。Iodophor應用於鰻魚病原菌消毒試驗：魚病研究專集(5) 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 tadar*與*Aeromonas hydrophila*混合感染下之致病性研究。魚病專集8: 40-55。
- 楠田理一、陳昌福、川合研兒。1987。*Aeromonas hydrophila*で免疫したニミキゴイの凝集抗體價と血清タンパクの變化，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, M Fukudome. 1989. Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. Fish Pathology 24(3): 161-168.
- Kuge T, K Takahashi, I Barcs, F Hagashi. 1992. *Aeromonas hydrophila* a causative agent of mass mortality in cultured Japanese catfish larvae (*Silurus asotus*) Gyobyu kenkyu, 27(2) 57-62.
- Salati F, Kenji Kawai, R Kusuda. 1983. Immune response of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathology 28(3): 135-141.
- Salati F, Kenji Kawai, R Kusuda. 1984. Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. Fish Pathology 19(3): 187-192.

- Salati F, 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, R Kusuda. 1986. Immune response of Eel to *Edwardsiella tarda* lipid. Fish pathology 21(3): 201-205.
- Salati F, M Hamaguchi, R Kusuda. 1987. Immune response of Red Sea Bream to *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathology 22(2): 93-98.
- Salati F, K Ono, R Kusuda. 1991. Oral vaccination of glass eel of *Anguilla Japonica* against *Edwardsiella tarda* infection Fish & shellfish Immunology 1. 309-310.
- Song YL, GH Kou. 1981. The immune response of eel (*Anguilla Japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studies by the immersion method. Fish Pathology, 15: 249-255.
- Song YL, GH Kou, KY Chen. 1982. Vaccination conditions for the eels (*Anguilla Japonica*) with *Edwardsiella anguillimortifera* bacterin. CAPO Fisheries Series (8): 18-25.