

弧菌細胞外產物之研究—II.

弧菌細胞外產物對鰻魚之免疫原性研究

Studies on Extracellular Products of *Vibrio anguillarum*—II.

Studies on Immunogenicity of Extracellular Products of *Vibrio anguillarum* in Eel

陳石柱¹·劉正義²

Shih-Chu Chen and Cheng-I Liu

Abstract

Vibrio anguillarum, cultured in brain heart infusion broth containing 1.5% NaCl, was centrifugated and collected supernatant to extract its extracellular products as VA-0-70 by 70% ammonium sulfate. The other extracellular products labeled as VA-70-80 was also extracted by adding 80% of ammonium sulfate to the supernatant of VA-0-70.

The antibody titers of rabbits treated by VA-0-70, VA-70-80 and formalin-killed bacterin of *V. anguillarum* were titrated as 8192X, 4096X and 4096X, respectively, after immunization. VA-0-70, VA-70-80 and sonicated lysate of *V. anguillarum* provided a common antigen which was demonstrated by agar gel immunodiffusion method.

A comparison was made on the immunogenicity of VA-0-70 IP and hyperosmotic vaccination, and formalinkilled bacterin to eels. The survived rates after the challenge in 10 LD₅₀ dose were 100%, 73% and 73% respectively.

緒 言

由 *Vibrio anguillarum* 感染所引起之弧菌症 (Vibriosis) 是海水魚 (Haastein *et al.*, 1972; Levin *et al.*, 1972; Smith 1961) 及淡水魚類 (Hacking *et al.*, 1971; Muroga *et al.*, 1967) 的重要細菌性傳染病，以引致皮膚、鰓及內臟器官出血與壞死為特徵。在本省 *V. anguillarum* 主要感染虱目魚 (Chen and Liu 1972; Tung *et al.*, 1985)、鰻魚 (Liu 1981) 及香魚 (Kou *et al.*, 1976)。

本省虱目魚，每年在越冬期間易罹患弧菌症而遭受重大經濟損失，據統計，1957年至1972年間，越冬溝虱目魚年平均死亡率為15% (Chen *et al.*, 1972) 而1975年則死亡率高達70% (Huang 1977)。

1. 國立屏東農業專科學校獸醫科 (Department of Veterinary Medicine, National Pingtung Institute of Agriculture, Pingtung, Taiwan, R. O. C.)

2. 國立中興大學獸醫系 (Department of Veterinary Medicine, National Chung-Hsing University.)

1984年 Wu 等報告在越冬溝進行田間試驗證實噬菌體 AS10 可以抑制虱目魚紅斑病之發生。1976年 Antipa、Croy 及 Amed 1977、Itami 等 1978，以 *V. anguillarum* 來免疫鮭魚 (Salmonid)；Aoki 1982 以福馬林不活化菌苗免疫香魚 (ayu)；Lin 等 1983 以 *V. anguillarum* 菌苗來免疫虱目魚均能獲得良好效果。

由先前試驗得知高劑量 *V. anguillarum* 之細胞外產物可以引起虱目魚、鰻魚及小白鼠死亡且細胞外產物是虱目魚紅斑病之主要致病因子。但低劑量而耐過的虱目魚及鰻魚均能產生極高的抗體力價，且無明顯組織病理變化。

本試驗乃延緩致病性試驗，以細胞外產物免疫兔子以探討和弧菌完全細胞 (Whole cell) 之抗原性關係，並免疫鰻魚以瞭解保護能力，以供爾后防治本病之參考。

材料與方法

一、供試菌株

由臺南地區虱目魚罹患紅斑病病例所分離之 *Vibrio anguillarum* (編號為 AC716) 為供試菌株。本菌株由屏東農專南區魚病中心提供。

二、供試動物

鰻魚

鰻魚購自鹿港地區養鰻場，大小為每尾 35-40 g，體長為 30-34 cm 於 100 l 容積並附有打氣裝置之塑膠水槽中，水溫為 26°C。所購之鰻魚部分行逢機取樣做細菌分離及病理切片。證明健康之鰻魚放置一星期以適應水槽中環境，並用 formalin 20 ppm 每日浸浴 18 小時，連續 2 天後，做為本試驗之供試鰻魚。

三、*V. anguillarum* 細胞外產物抗原之製備及其蛋白質濃度測定

(一)*V. anguillarum* 細胞外產物抗原之製備：

V. anguillarum (AC716) 培養於 5 ml 含有 1.5% NaCl 之 Brain Heart Infusion broth (BHI broth)。於 28°C，18 小時後再次培養於 1000 ml 之含 1.5% NaCl BHI broth。在 28°C，18 小時後，在 4°C 下，以 4500×g 離心 30 分鐘。收集上清液，以 0.45 μm 濾過膜過濾後加 70% 飽和硫酸銨，慢慢攪拌於 4°C 感作 1 小時，之後在 4°C，以 8000×g 離心 20 分鐘，取沉澱物並把此階段之沉澱物稱為 VA-0-70。另外上清液加飽和硫酸銨至 80%，於 4°C 感作 1 小時，然後在 4°C，以 8000×g 離心 20 分鐘，此階段所得之沉澱物稱為 VA-70-80。將兩階段沉澱物分別以 0.85% NaCl 收集，在 4°C，以 0.85% NaCl 透析 48 小時，以 0.45 μm 濾過膜過濾後，分裝貯存於零下 20°C 備用。

(二)蛋白質濃度測定 (Biorad Protein Assay)：

係以 Biorad 蛋白質標準定法來測定之 (Hanson etc 1984 及 Kessler 1975)，使用 Bovine Serum Albumin 為對照組做標準曲線以資對照。

四、*V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 VA-70-80 及全細胞之抗原性研究

(一)*V. anguillarum* 全細胞抗原之製備：

V. anguillarum 培養於含 1.5% NaCl 之 Trypticase Soy Agar，在 28°C 培養 18-24 小時，以 0.85% NaCl 將細菌洗下並收集洗滌離心二次。每 100 mg 細菌加 1 ml 2% 福馬林——生理食鹽水溶液 (Formalin Saline Solution) 和 1 ml 2% 鉻明礬 (Chrome alum)，放置於 37°C 定

溫箱振盪培養感作 3 天。離心除去上清液，以 0.85% NaCl 洗滌三次後，離心沉澱物以 0.85% NaCl 稀釋成每 ml 含有 50 mg 細菌貯存於 4°C 冰箱備用。

(二) *V. anguillarum* 全細胞免疫血清之製備：

紐西蘭白兔 (2.5 kg) 兩隻供為製備免疫血清所需。第一次免疫係皮內注射 0.5 ml (12.5 mg) 全細胞加 0.5 ml 完全弗氏佐劑 (Freund's Complete Adjuvant)；經過 10 天後做第二次免疫，以 12.5 mg 全細胞加不完全弗氏佐劑 (Freund's Incomplete Adjuvant) 皮下注射；間隔 7 天後再行第三次免疫，劑量為 25 mg 全細胞行靜脈注射。第三次免疫後 10 天採血測抗體力價。

(三) 細胞外產物抗血清之製備：

四隻 2.5 kg 紐西蘭白兔分為 A, B 兩組，每組兩隻。A 組以 VA-0-70 處理，B 組以 VA-70-80 處理。第一次免疫係 0.5 ml (含 250 μ g) 細胞外產物加 0.5 ml 完全弗氏佐劑行皮內注射。第二次免疫則在第一次免疫後 10 天，以相同劑量皮下注射，但佐劑改為不完全弗氏佐劑。間隔 7 天後以靜脈注射行第三次免疫，劑量為 500 μ g 細胞外產物。第三次免疫後 10 天採血測抗體力價。

(四) 凝集反應抗原之製備及凝集反應 (1983, Chang etc)：

(a) 超音波處理抗原之製備：

V. anguillarum 培養於含有 1.5% NaCl 之 Tryptcase Soy Agar 在 28°C 培養 18 小時，以 0.85% NaCl 將細菌洗下並收集。以 4500 \times g 離心 30 分，再以 0.85% NaCl 洗滌二次後以超音波粉碎器 17 Amplitude micros 作用 9 分鐘，然後以 4500 \times g 離心 30 分鐘後收集上清液作為免疫擴散法之抗原。

(b) 瓊脂凝膠免疫擴散法：

以 1 g 的瓊脂 (Agarose) 溶於 0.05 M Tris Buffer Solution 100 ml，並加 0.025% Sodium azide 加熱溶解，然後以每 3-4 ml 量灌膠於 25 mm \times 75 mm 之載玻片上，冷卻後打洞 (按 Ouchterlony 氏之方法操作)，抗原置中央之洞內 (well)，周圍六個洞內放置血清或依設計而互換，置於密閉且有充分濕氣的容器內，放置於室溫，經 18-24 小時判定其沉澱反應，並經 Amidoblack 染色，7% 醋酸脫色後，作最後判讀。

(c) 瓊脂凝膠免疫電泳法：

係以 1% Agarose 灌注於載玻片上，冷卻後挖洞，採用 Barbital 緩衝液 (Biorad)，以 150 伏特，30 安培下，經 2 小時通電後，移載玻片將槽內之瓊脂去除，加入抗體或抗原經過 24 小時觀察結果。染色和脫色同免疫擴散法。

五、*V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 及全細胞之免疫原性之研究

(一) *V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 對鱈魚之免疫試驗：

以 *V. anguillarum* 之細胞外產物 (VA-0-70) 免疫 35-40 g 鱈魚。共 80 尾分為四組，每組 20 尾。第一組每尾以 VA-0-70 100 μ g 行腹腔注射；第二組以 50 μ g 行腹腔注射；第三組以 6% NaCl 先行浸泡後再以 VA-0-70 3 ppm 浸泡 30 分鐘；第四組以 0.85 NaCl 腹腔注射做為對照組。免疫後 3 週，以 *V. anguillarum* 1.6×10^7 及 1.6×10^8 CFU/ml 分別攻毒，並觀察 10 天測其保護能力 (本菌株 LD₅₀ 為 1.6×10^6 CFU/ml)。

(二) *V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 與福馬林不活化菌苗對鱈魚之免疫試驗：

鱈魚 35-40 g 共 105 尾分為 7 組，每組 15 尾。第 1 組至第 3 組以福馬林不活化菌苗腹腔注射，劑量分別為 3 mg、6 mg 及 12 mg；第 4 組以 VA-0-70 100 μ g 腹腔注射；第 5 組及第 6 組先經

6% NaCl 浸泡 5 分鐘後，分別以 2000 ml VA-0-70 (濃度分別為 6 ppm 及 12 ppm) 再浸泡 30 分鐘後直接加水至 40l。第 7 組以 0.85% NaCl % 腹腔注射當作對照。免疫後 3 週以 *V. anguillarum* 1.6×10^7 細菌數攻毒，觀察 10 天測定其保護能力。

結 果

一、*V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 及 VA-70-80 與全細胞之抗原性研究

(一) 凝集抗體力價測定：

以 VA-0-70、VA-70-80 及 *V. anguillarum* 全細胞對兔子行三次免疫以比較其凝集抗體力價之試驗。其中，VA-0-70 在第三次免疫後其抗體力價達 8192 倍為最高。先前試驗以 VA-0-70 對鰻魚、虱目魚及泥鰍行致病性試驗而存活魚測定其凝集抗體產生情形，鰻魚凝集反應力價平均可達 4096 倍，虱目魚為 416 倍，泥鰍為 194 倍。

(二) 瓊脂凝膠免疫擴散法：

以 *V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 與抗 VA-0-70 兔血清行免疫擴散試驗可以產生三條沉澱帶，而以 VA-70-80 和抗 VA-70-80 兔血清作用在瓊脂凝膠可見二條反應沉澱帶。又以 *V. anguillarum* 之超音波處理抗原和抗 VA-0-70 兔血清反應呈現二條沉澱帶 (圖 1)。以上三種不同抗原和抗 VA-0-70 兔血清反應結果顯示三者出現一條共同沉澱帶，且其中 VA-0-70 和超音波處理抗原兩條共同沉澱帶 (圖 2)。再以 VA-0-70 對抗 VA-0-70 兔血清及抗 *V. anguillarum* 之完全細胞兔血清試驗結果顯示有兩條共同沉澱帶 (圖 3)。又以 VA-0-70 通過 DEAE-cellulose 之 D-II fraction 抗原和抗 VA-0-70 兔血清作用呈現比原來 VA-0-70 抗原更明顯之沉澱帶 (圖 4)。

(三) 瓊脂凝膠免疫電泳法：

12 μ l *V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 置於 Upper 及 Lower well，在 150 伏特、30 安培下經過 2 小時通電後將 Trough 內之 agarose 去除，加入 180 μ l 抗 VA-0-70 兔血清，在 24 小時呈現三條沉澱帶。由 VA-0-70 對鰻魚 LD_{50} 測定存活之鰻魚血清 9 μ l 置於 Upper 及 Lower well 在 150 伏特、30 安培下通電 2 小時後將 Trough 之 agarose 去除後加入 VA-0-70 細胞外產物作用後出現明顯沉澱帶 (圖 5)。

二、*V. anguillarum* 細胞外產物 VA-0-70 及全細胞之免疫原性研究

(一) *V. anguillarum* 細胞外產物 VA-0-70 對鰻魚之免疫試驗：

鰻魚經過細胞外產物免疫後 3 週分別以 100 倍 LD_{50} 及 10 倍 LD_{50} 之菌量攻毒後觀察 10 天，測定其保護率結果 (表 1、2)。100 倍 LD_{50} 攻毒結果顯示高滲透浸泡組及對照組均在一天內鰻魚發病死亡，並且呈現典型弧菌症病灶。100 μ g 腹腔注射組有 30% 保護率，50 μ g 免疫組有 20% 保護力。以 10 倍 LD_{50} 細菌量攻毒，在高滲透免疫組和對照組亦均在一星期內死亡；而 100 μ g 及 50 μ g 腹腔注射組分別有 90% 及 30% 保護率。

(二) *V. anguillarum* 之細胞外產物 VA-0-70 與福馬林不活化菌苗對鰻魚之免疫試驗：

由細胞外產物和福馬林不活化菌苗分別免疫鰻魚及行保護試驗得知福馬林處理免疫組 (第 1-3 組) 及細胞外產物免疫組，存活率分別為 67%、73%、80%、100%、73% 及 73% (表 3)。免疫組和對照組 20% 存活率比較均有顯著差異。其中細胞外產物 VA-0-70 高滲透性免疫組和福馬林不活化菌苗在腹腔注射組保護率相近。而以 VA-0-70 細胞外產物腹腔注射組存活率最佳達 100%。

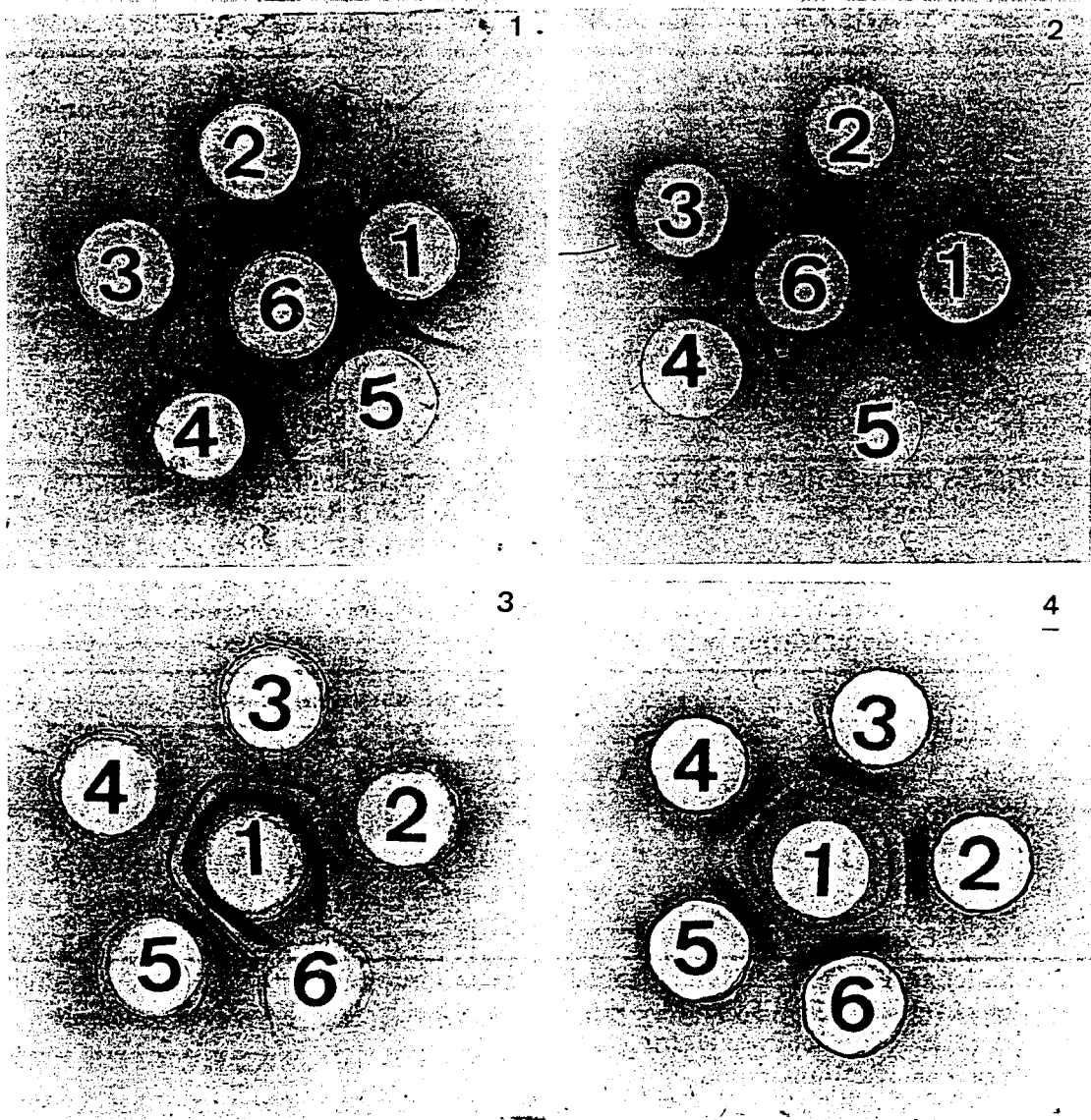


Fig. 1. Ouchterlony immunodiffusion analysis of lysate from *V. anguillarum*. Central well (6), anti-VA-0-70 rabbit serum. 1, 2, 3 and 4 well, lysate (Ag). 5 well (BHI Broth)

Fig. 2. Ouchterlony immunodiffusion analysis of lysate, VA-0-70 and VA-70-80 from *V. anguillarum*. Central well (6), anti-VA-0-70 rabbit serum. 1 well, lysate. 2 and 3 well VA-0-70. 4 well, VA-70-80. 5 well (BHI Broth)

Fig. 3. Ouchterlony immunodiffusion analysis of VA-0-70 from *V. anguillarum*. Central well (1), VA-0-70, 2 and 3 well, anti-whole cell rabbit serum. 4 and 5 well, anti-VA-0-70 rabbit serum. 6 well, control (BHI Broth)

Fig. 4. Ouchterlony immunodiffusion analysis of D-II fraction of VA-0-70 from *V. anguillarum*. Central well (1), anti-VA-0-70 rabbit serum. 2, 3, 4, 5 and 6 well, VA-0-70

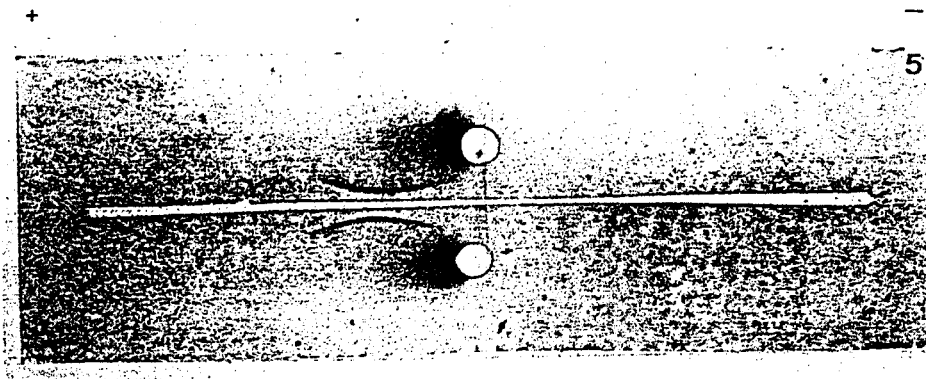


Fig. 5. Immunoelectrophoresis of VA-0-70 from *V. anguillarum*. Upper and lower well, VA-0-70. trough, anti-VA-0-70 eel serum

Table 1. Protection of eels challenged by 10 LD₅₀* of *V. anguillarum* after immunization with VA-0-70

| Immunization group | No. of surviving eels | | | | | | | | | | | (%) |
|---------------------|-----------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|
| | Day 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| VA-0-70 100 μg (IP) | 10** | 10 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 90 |
| VA-0-70 50 μg (IP) | 10 | 10 | 9 | 8 | 8 | 7 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 30 |
| VA-0-70 3 ppm (***) | 10 | 6 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control 0.85% NaCl | 10 | 4 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Challenge by intraperitoneal inoculation at the end of 21 days post immunization. LD₅₀=1.6×10⁶ CFU/ml.
 ** Eel of 35-40 gm body weight.
 *** Hyperosmotic immersion.

Table 2. Protection of eels challenged by 10 LD₅₀* of *V. anguillarum* after immunization with VA-0-70

| Immunization group | No. of surviving eels | | | | | | | | | | | (%) |
|---------------------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|
| | Day 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| VA-0-70 100 μg (IP) | 10** | 9 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 30 |
| VA-0-70 50 μg (IP) | 10 | 7 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 20 |
| VA-0-70 3 ppm (***) | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control 0.85% NaCl | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Challenge by intraperitoneal inoculation at the end of 21 days post immunization. LD₅₀=1.6×10⁶ CFU/ml.
 ** Eel of 35-40 gm body weight.
 *** Hyperosmotic immersion.

Table 3. Protection of eels challenged by 10 LD₅₀* of *V. anguillarum* after immunization with VA-0-70 or formalin killed bacterin

| Immunization group | No. of surviving eels (%) | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | Day 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| FK** 3 mg (IP) | 15*** | 15 | 14 | 14 | 13 | 13 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 | 67 |
| FK 6 mg (IP) | 15 | 15 | 14 | 14 | 14 | 14 | 12 | 12 | 11 | 11 | 11 | 73 |
| FK 12 mg (IP) | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 80 |
| VA-0-70 100 µg (IP) | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 100 |
| VA-0-70 6 ppm (****) | 15 | 15 | 14 | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 | 11 | 11 | 11 | 73 |
| VA-0-70 12 ppm (****) | 15 | 15 | 13 | 13 | 13 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 73 |
| Control 0.85% NaCl (IP) | 15 | 10 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 20 |

* Challenged by intraperitoneal inoculation at the end of 21 days post immunization, LD₅₀=1.6×10⁶ CFU/ml.

** FK is formalin killed bacterin.

*** Eel of 35-40 gm body weight.

**** Hyperosmotic immersion.

討 論

本細胞外產物 (VA-0-70 及 VA-70-80) 與 *V. anguillarum* 之完全細胞, 經過對兔子行三次免疫後均能獲得良好抗體力價; 比較其免疫效率則以 VA-0-70 之效果最佳, 其凝集抗體力價達 8192 倍, VA-70-80 及全細胞免疫組之力價相同皆為 4096 倍。以 VA-70-80 對鰻魚、虱目魚及泥鰍行毒力試驗而耐過魚, 在接種後 2 週亦可產生良好抗體, 其力價依鰻魚、虱目魚及泥鰍分別為 4096 倍、416 倍及 194 倍。此外, 以免疫擴散試驗及免疫電泳試驗測試 VA-0-70 發現至少有三種蛋白質可以刺激兔子產生抗體, 且這三種蛋白質其中兩種和超音波處理抗原共同抗原性存在。再以 VA-0-70 對抗 VA-0-70 之兔血清及抗 *V. anguillarum* 之完全細胞兔血清試驗亦顯示有兩條共同沉澱帶。

Kawano 等 1983 及 1984 以冷凍乾燥方法等處理之 *V. anguillarum* 菌苗行高滲透浸泡免疫香魚, 發現免疫保護能力至少可以維持 113 天, 而口服免疫僅能維持 56 天; 但兩組供試香魚其血清中均測不到凝集抗體。Lannan 1978 亦以高滲透浸泡法免疫鮭魚 (Chun Salmon), 第 10 天後行攻毒試驗, 免疫組死亡率為 6%, 對照組為 96%。Agius 等 1983 與 Tatner 等 1983 及 1984 行鱒魚免疫試驗結果, 亦可得到相當好的保護效果。在本省, Chen 等 1985 以福馬林處理之 *V. anguillarum* 菌苗行浸泡法免疫虱目魚苗, 免疫後放養於養殖池經四個月之越冬期, 顯示免疫組存活率為 70%, 而對照組僅有 30% 存活率。本試驗以低劑量之細胞外產物腹腔注射以免疫鰻魚, 可以獲得良好的保護能力; 100 µg 組有 90% 保護率, 50 µg 組有 30% 保護率。100 µg 之細胞外產物腹腔注射以比較與福馬林不活化菌苗腹腔注射對鰻魚之免疫效果, 亦顯示細胞外產物比福馬林不活化菌苗有更好的免疫保護能力。鰻魚經 6% 食鹽水處理後再行 VA-0-70 細胞外產物浸泡免疫, 發現有 73% 之存活率, 對照組僅 20%。因此, 以本試驗方法所萃取之細胞外產物來免疫虱目魚以預防紅斑病之危害, 似乎是可行之方法之一。

摘 要

以含有 1.5% NaCl 之 Brain Heart Infusion Broth 所培養之 *Vibrio anguillarum*, 經 70% 飽和硫酸銨加入上清液中萃取之細胞外產物為 VA-0-70; 然後再加入飽和硫酸銨於上清液至 80%

，其萃取之細胞外產物為 VA-70-80。

VA-0-70、VA-70-80 及 *V. anguillarum* 之福馬林不活化抗原分別免疫兔子後其抗體力價達 8192 倍、4096 倍及 4096 倍。並以 VA-0-70、VA-70-80 及 *V. anguillarum* 之超音波處理抗原經免疫擴散試驗證實三者具有共同抗原性。

VA-0-70 以高滲透浸泡法與腹腔注射法及 *V. anguillarum* 之福馬林不活化菌苗行腹腔注射法比較其對鰻魚之免疫能力。經過免疫後三週以 10 倍 LD₅₀ 細菌數攻毒，顯示高滲透泡組及福馬林不活化菌苗腹腔注射組皆具接近 73% 存活率，VA-0-70 腹腔注射組之免疫力最高，可達 100% 存活率。

參 考 文 獻

- Agius, C., M. T. Horne and P. D. Ward. (1983) Immunization of rainbow trout, *Salmon gairdneri* Richardson, against vibriosis: Comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *J. Fish Dis.* Vol. 6, No. 2: 129-134.
- Antipa, P. (1976) Field testing of injected *Vibrio anguillarum* bacterins in pen-reared pacific salmon *J. Fish Res. Board. Can.* 33: 1291-1296.
- Aoki, T., T. Kitao, M. Fukahashi and E. Eugsa. (1982) Immunization and Challenge of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) against vibriosis by the hyperosmotic infiltration method. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University* 29: 77-85.
- Chang, C. Y. and G. H. Kou (1983) Study on Serotypes of *Vibrio anguillarum* Isolated from Cultured fishes in taiwan. CAPD Fisheries Series No. 9: 22-30.
- Chen, H. C. and C. Y. Liu. (1972) Ecological study of milk fish wintering pond. JCRR Fisheries Series No. 12: 35-39.
- Chen, S. N. and G. H. Kou. (1985) Results of field test on vaccination trails against vibriosis of milk fish (*chanos chanos*) and Edwardsiellosis of eel (*Anguilla Japonica*). COA Fisheries Series No. 4. Fish Disease Research (VII), 52-56.
- Croy, T. R. and D. F. Amend (1977) Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, 12: 317-325.
- Haastein T. and Gholt (1972) The occurrence of vibrio diseases in wild Norwegian fish. *J Fish Boil* 4: 33-37.
- Hacking MA. and J. Eudd, (1971) *Vibrio* infection in tropical fish in a freshwater aguarinm. *J Wildl Dis* 7: 273-280.
- Hanson, D. C. and V. N. Schumarker. (1984) A model for the formation and inter-conversion of protein A-illunoglobulin G soluble complexes. *J. Immunol.* 132(3): 1379-1409.
- Huang, Y. H. (1977) Preliminary report of the studies on bacterial disease of milkfish, *Chanos chanos* winter water. JCRR. Fish Ser., No. 29: 59-54.
- Itami, T. and Kusuda, R. (1978) Efficacy of a vaccination by spray administration against vibriosis in cultured ayu. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44(12): 1413.
- Kawano, K., T. Aoki and T. Kitao. (1983) Immersion vaccination and water-brone challenge of ayu (*Plecoglossus altivelis*) against vibriosis. *Fish Path.* 18, 3: 143-149.
- Kawano, K., T. Aoki and T. Kitao. (1984) Efficacy of direct immersion vaccination

- of ayu *Plecoglossus altivelis* with *Vibrio anguillarum* bacterin. Fish Pathol. 18, 4: 185-190.
- Kawano, K., T. Aoki and T. Kitao. (1984) Duration of protection against vibriosis in ayu *Plecoglossus altivelis* vaccinated by immersion and oral administration with *Vibrio anguillarum*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish Nissuishi., Vol. 50, No. 5: 771-774.
- Kessler, S. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115(6): 1617-1699.
- Kou S. C., H. Y. Chung and G. H. Kou., (1976) *Vibrio anguillarum* isolated from a *Vibrio* disease of fresh-water cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*. Journal of the Fisheries society of Taiwan Vol. 4, No. 2. June. 21-24.
- Lannan, J. E. (1978) Vibriosis vaccination of chum salmon by hyperosmotic infiltration. Prog. Fish-cult. 40, 2: 43-45.
- Levin MA., RE Wolke and VJ. Cabelli, (1972) *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Can J Microbiol 18: 1585-1592.
- Lin, C. L., Y. L., Ting, S. N. Chen and G. H. Kou, (1983) Evaluation of HIVAX *Vibrio anguillarum* bacterin in the vaccination of milkfish (*Chanos chanos*) fingerlings. *Proceeding of ROC-Japan Cooperative Science Seminar on Fish Diseases. NSC Symposium Series.* pp. 22-27.
- Liu, C. I. (1981) The pathology of the major diseases of eel in Taiwan proceedings of Republic of China-United states cooperative science seminar. on fish diseases. (NSC symposium series No. 3) National science council republic of china. 89-99.
- Muroga K. and S. Eguse (1967) *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu in Lake Hamana. Bull Jpn Soc Sci Fish 33: 636-640.
- Smith, I. W. (1961) A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum*. J. Gen. Microbiol. 24: 247-252.
- Tung, M. C., S. S. Tasi and S. C. Chen. (1985) Study on *Vibrio anguillarum* infection in milkfish. COA Fisheries Series No. 4. Fish Disease Research (VII), 12: 27-37.
- Wu, J. L. and W. J. Chao. (1984) The Epizootic of milkfish vibriosis and its biological control by bacteriophage ASIO. COA Fisheries Series No. 10, Fish Disease Research (VI), 2: 34-46.