

鰻魚愛德華氏菌、產氣單胞菌、 滑走細菌混合菌苗之研製

柯浩然¹ 陳清^{1*} 呂清泉¹ 賴俊雄¹
郭乃維¹ 詹益波¹ 陳秀男²

1. 台灣省家畜衛生試驗所 台北縣淡水鎮
2. 國立台灣大學動物學系 台北市

摘要 將愛德華氏菌 (*E. tarda*)、產氣單胞菌 (*A. hydrophila*) 及滑走細菌 (*F. columnaris*) 分別培養於 Brain heart infusion broth，於 30 °C 振盪培養 18~20 小時後，離心集菌。將其菌液濃度調製成各含 $4\sim 5 \times 10^{10}$ CFU/ml，依 1:1:1 比例混合後添加 0.3% Formalin 不活化處理及 0.01% Thimersal 為防腐劑並添加 1/10 量之 Aluminun hydroxide Gel-Bentonite 為佐劑，調製成不活化混合菌苗。

研製之不活化混合菌苗以成鰻及小白鼠作安全性試驗均無不良之接種反應。以小白鼠之免疫力價試驗結果，單元滑走細菌不活化菌苗以滑走細菌攻擊之結果其防禦指數 $\text{Log } 10^{1.0}$ 。混合不活化菌苗免疫小白鼠，分別以愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌及三者混合菌液攻擊之結果，其防禦指數，分別為 $\text{Log } 10^{1.9}$ 、 $\text{Log } 10^{1.7}$ 、 $\text{Log } 10^{1.0}$ 及 $\text{Log } 10^{2.47}$ 顯示免疫效果尚稱滿意。

成鰻口服及注射方式免疫後，以微量滴盤凝集反應法在免疫後第 2、4、6 週均可測得其特異抗體，初步成績單元滑走細菌不活化菌苗口服免疫組抗體價最高可達 1:2560；肌肉注射免疫組達 1:5120。不活化混合菌苗口服免疫組其抗滑走細菌之抗體價最高可達 1:5120；抗愛德華氏菌抗體價達 1:160；抗產氣單胞菌 1:640。肌肉注射免疫組抗滑走細菌抗體價最高達 1:1280，抗愛德華氏菌抗體價達 1:5120；抗產氣單胞菌抗體價達 1:5120。由本試驗結果得知本菌苗免疫之鰻魚可產生良好之免疫效果。

關鍵詞： 鰻魚，愛德華氏菌，產氣單胞菌，滑走細菌，混合菌苗

緒 言

本省養殖鰻魚之存活率，自幼鰻養至成鰻出售時死亡率平均 52% (幼鰻 34%，中鰻 16%，成鰻 12%) 影響經濟效益頗大 (林及蕭, 1977)。如再感染疾病則損失更是不貲，本省氣溫較高，在細菌性疾病中以愛德華氏病 (*E. tarda*)、赤

鱗病 (*A. hydrophila*)、腐鰓病 (*F. columnaris*) 等高水溫期較常見。雖可使用水產用藥及改善水質來預防，降低病原細菌之感染危害，但是負面影響如病原菌之抗藥性及藥物殘留等問題亦是一大隱憂。(Aoki et al., 1989; 劉及馮, 1983; 劉及王, 1986)。而在生物製劑之菌苗研究開發與應用亦有很大之發展陳及郭 (1986)、Salati et al. (

*抽印本索取作者

本文原載於生物技術在水產養殖上應用論文集 (二) 77~88 頁, 1996。
台灣省家畜衛生試驗所

1984) 在愛德華氏病菌苗開發方面，據報告最好有效預防物質為 Crude LPS 中之 Polysaccharide。Salati 及 Kusuda (1985, 1986) 又報告 LPS 最好。但在抗體產生則以不含 Lipid A 之全菌苗為最高。在愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫試驗研究方面，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報告。陳等 (1994) 以 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 混合菌苗混以餌料口服及肛投免疫試驗，均可產生良好之免疫抗體，而抗 *A. hydrophila* 之抗體價較抗 *E. tarda* 抗體價為高，有關此等病原之研究或其混合菌苗之開發國內亦有多位學者提出報告 (柳等 1982; 黃及劉 1986; 郭等 1986; 陳等 1988; 1989 及 1991)。至於愛德華氏菌及產氣單胞菌與滑走細菌三種混合免疫研究報告不多，茲謹將研製愛德華氏菌及產氣單胞菌與滑走細菌混合菌苗之安全性及免疫試驗之抗體產生報告如下。

材料與方法

試驗材料：

一、研製菌苗用菌株：

Edwardsiella tarda F-1 株

Aeromonas hydrophila 台北株

Flexibacter columnaris 台大動研所鍾虎雲教授分讓

二、研製菌苗培養基：

Brain heart infusion broth (Difco)

Brain heart infusion agar (Difco)

S. S agar (Difco)

Cytophaga agar

Hsu-Shotts medium (H-S medium)

三、試驗動物：

(一)購自魚商之鱘魚每尾體重約 220~250 公克，購入後以 15 ppm 福馬林液 (Formalin) 浸泡處理後供試。

(二)供試小白鼠為購自本所檢定分所，每隻體重約 13~15 公克。

四、菌苗之調製：

將 *E. tarda*、*A. hydrophila* 及 *F. columnaris* 分別培養在 Brain heart infusion broth，經

30 °C 18 ~ 24 小時振盪培養後，集菌遠心調整濃度將三種菌液調製各含 $4 \sim 5 \times 10^{10}$ CFU/ml，依比例混合後添加 0.3% Formalin 不活化處理及 0.01% Thimersal 為防腐劑，並再添加 1/10 量之 Aluminum hydroxide Gel - Bentonite 為佐劑後混合製成不活化菌苗。

五、供試用抗原製備：

(一)*E. tarda* 抗原：為使用加熱 121 °C 1 小時之洗滌菌體抗原即 O 抗原，其濃度為 5×10^{11} CFU/ml。

(二)*A. hydrophila* 抗原：為使用福馬林不活化抗原即 FK 抗原，其濃度為 5×10^{11} CFU/ml。

(三)*F. columnaris* 抗原：為使用福馬林不活化抗原即 FK 抗原，其濃度為 5×10^{11} CFU/ml。

以上抗原作抗體測定時均各以 1:49 稀釋後供試。

試驗方法：

一、不活化混合菌苗安全性試驗：

將研製之不活化混合菌苗及 *F. columnaris* 不活化菌苗分別以肌肉注射接種 (1.0 ml/尾) 及混合餌料口服接種 (6.0 ml/尾/日) 給予供試鱘魚，對小白鼠分別以肌肉注射 (0.1 ml/隻) 及皮下注射 (0.5 ml/隻)，觀察 10 天記錄接種後情形。

二、小白鼠免疫力價測定：

將研製之單元 *F. columnaris* 不活化菌苗及混合不活化菌苗以 PBS (一) 10 倍稀釋後，免疫注射 0.5 ml 於小白鼠腹腔，二週後分別以 *E. tarda*、*A. hydrophila*、*F. columnaris* 及三者之混合菌液作攻擊試驗，並做對照組觀察 7 天記錄比較，以求取各試驗組及對照組之防禦力價。

三、成鱘之菌苗免疫：

將鱘魚 300 尾分為五組每組 60 尾，第一組為 *F. columnaris* 不活化菌苗肌肉注射免疫 (1.0 ml/尾，分三個部位注射)；第二組為 *F. columnaris* 不活化菌苗混合適量餌料以導管導入方式口服免疫 (6.0 ml/尾/日)；第三組為不活化混合菌苗肌肉注射免疫 (方法如第一組)；第四組為不活化混合菌苗口服免疫 (方法如第二組)；第五組為對照組。

四、抗體力價消長測定：

各實驗組鰻魚在免疫後第 2、4、6 週隨機抽樣 10 尾鰻魚，自心臟動脈球採血分離血清，50 °C 非慟化。再以供試抗原用微量滴盤作凝集反應法，測定血清特異抗體價，惟供試抗原係以上述製備抗原再以 50 倍稀釋者供試。

結 果

試驗結果：

一、不活化混合菌苗安全性試驗

研製之 *F. columnaris* 不活化菌苗及不活化混合菌苗各以肌肉注射及混合餌料口服方式對鰻魚接種，及對小白鼠肌肉注射與皮下注射，其結果均耐過健存且無不良接種反應。詳如表一、二所示成績。

二、小白鼠之免疫力價試驗成績：

(一)單元滑走細菌 (*F. columnaris*) 不活化菌苗免疫後以滑走細菌 (*F. columnaris*) 菌液攻擊之結果，其防禦指數為 $\text{Log } 10^{1.0}$ 。詳如表三所示成績。

(二)混合不活化菌苗免疫後以愛德華氏菌 (*E. tarda*)、產氣單胞菌 (*A. hydrophila*)、滑走細菌 (*F. columnaris*) 及三者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四種不同菌液攻擊之防禦指數 (Protective index)，分別為 $\text{Log } 10^{1.9}$ 、 $\text{Log } 10^{1.7}$ 、 $\text{Log } 10^{1.0}$ 及 $\text{Log } 10^{2.47}$ ，顯示免疫效果尚稱滿意。詳如表四、五、六及表七所示成績。

表一：滑走細菌不活化菌苗安全性試驗成績

Table 1 : Results of safety test of *Flexibacter columnaris bacterin*.

Animal	No. of tested	Route and dose inoculated	Results
Eel	10	1.0 ml / each IM	survived
Eel	10	6.0 ml / each in feed	survived
Mouse	10	0.5 ml / each SC	survived
Mouse	10	0.1 ml / each IM	survived

Remarks : IM : Intramuscular
SC : Subcutaneous

表二：愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌等不活化混合菌苗安全性試驗成績

Table 2 : Results of safety test of *E. tarda*、*A. hydrophila* and *Flexibacter columnaris* combined bacterin.

Animal	No. of tested	Route and dose inoculated	Results
Eel	10	1.0 ml / each IM	survived
Eel	10	6.0 ml / each in feed	survived
Mouse	10	0.5 ml / each SC	survived
Mouse	10	0.1 ml / each IM	survived

Remarks : IM : Intramuscular
SC : Subcutaneous

表三：滑走細菌單元不活化菌苗免疫小白鼠以滑走菌攻擊之力價成績
 Table 3 : Results of efficacy test of *F. columnaris* bacterin challenge with *F. columnaris* in mice.

Group	Dose and route vaccinated	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)				LD ₅₀	PI**
		3.5 × 10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP*	6 / 10 (60%)	4 / 10 (40%)	4 / 10 (40%)		10 ^{8.8}	10 ^{1.0}
Control	—	7 / 10 (70%)	4 / 10 (40%)	3 / 10 (30%)		10 ^{7.8}	

Remarks : challenge with 0.2 ml IP each mouse were performed at 2 weeks after immunization.
 IP : Intraperitoneal inoculation
 PI** : protection index

表四：不活化混合菌苗免疫小白鼠後以愛德華氏菌攻擊之力價成績
 Table 4 : Results of efficacy test of *E. tarda*、*A. hydrophila* and *F. columnaris* combined bacterin challenge with *E. tarda* in mice.

Group	Dose and route vaccinated	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)				LD ₅₀	PI**
		4 × 10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP*	6 / 10 (60%)	5 / 10 (50%)	3 / 10 (30%)		10 ^{8.9}	10 ^{1.9}
Control	—	5 / 10 (50%)	1 / 10 (10%)	0 / 10 (0%)		10 ^{7.0}	

Remarks : As same as footnote of table 3.

表五：不活化混合菌苗免疫小白鼠以產氣單胞菌攻擊之力價成績
 Table 5 : Results of efficacy test of *E. tarda*、*A. hydrophila* and *F. columnaris* combined bacterin challenge with *A. hydrophila* in mice.

Group	Dose and route vaccinated	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)				LD ₅₀	PI**
		2.5 × 10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP*	6 / 10 (60%)	5 / 10 (50%)	1 / 10 (10%)		10 ^{8.71}	10 ^{1.7}
Control	—	4 / 10 (40%)	1 / 10 (10%)	1 / 10 (10%)		10 ^{7.0}	

Remarks : As same as footnote of table 3.

表六：不活化混合菌苗免疫小白鼠後以滑走菌攻擊之力價成績

Table 6 : Results of efficacy test of *E. tarda*、*A. hydrophila* and *F. columnaris* combined bacterin challenge with *F. columnaris* in mice.

Group	Dose and route vaccinated	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)				LD ₅₀	PI**
		3.5×10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP*	7 / 10 (70%)	5 / 10 (50%)	2 / 10 (20%)	10 ^{8.9}	10 ^{1.0}	
Control	—	5 / 10 (50%)	1 / 10 (10%)	0 / 10 (0%)	10 ^{7.9}		

Remarks : As same as footnote of table 3.

表七：混合不活化菌苗免疫小白鼠以混合菌液攻擊之力價成績

Table 7 : Results of efficacy test of *E. tarda*、*A. hydrophila* and *F. columnaris* combined bacterin challenge with mixed suspension in mice.

Group	Dose and route vaccinated	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)				LD ₅₀	PI**
		3×10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰		
Experiment	10 ⁻¹ dilution 0.5 ml IP*	7 / 10 (70%)	8 / 10 (80%)	5 / 10 (50%)	10 ^{9.57}	10 ^{2.47}	
Control	—	4 / 10 (40%)	1 / 10 (10%)	2 / 10 (20%)	10 ^{7.10}		

Remarks : As same as footnote of table 3.

三、免疫鱧魚之抗體測定成績：

單元 *F. columnaris* 不活化菌苗，在肌肉注射免疫與混合餌料口服免疫其在第 2、4、6 週都可測得特異抗體，在第 6 週抗體價為肌肉注射最高者 1 : 1280；口服免疫最高者為 1 : 2560。詳如表八所示成績。

不活化混合菌苗，在第 6 週抗體價之幾何平

均值口服免疫者抗 *F. columnaris* 抗體價為 1 : 320；抗 *E. tarda* 抗體價為 1 : 17.4；抗 *A. hydrophila* 抗體價 1 : 34.8。肌肉注射者抗 *F. columnaris* 抗體價為 1 : 557.2；抗 *E. tarda* 抗體價為 1 : 139.3；抗 *A. hydrophila* 抗體價為 1 : 640。詳如表九及表十所示成績。

表八：滑走細菌不活化菌苗免疫鰻魚抗體消長成績

Table 8 : Vicissitudes of agglutination antibody titer of eels inoculated with inactivated *Flexibacter columnaris* bacterin.

	2 weeks		4 weeks		6 weeks	
	Oral	Intramuscular	Oral	Intramuscular	Oral	Intramuscular
1	640	640	160	320	640	640
2	640	640	320	640	2560	640
3	320	160	320	2560	640	640
4	160	5120	320	320	640	1280
5	160	160	320	640	2560	1280
6	160	160	640	640		
7	640	160	1280	640		
8	160	160	320	1280		
9	640	640	640	320		
10	160	160	640	320		
G.M.T.	298.6	342.97	422.2	597.1	1114.3	844.5

Remark : G.M.T. : Geometric Mean Titer

表九：愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌不活化混合菌苗口服免疫鰻魚抗體消長成績

Table 9 : Vicissitudes of agglutination antibody titer of eels inoculated by oral of inactivated *E. tarda* A, *hydrophila* and *F. columnaris* combined bacterin.

	2 weeks			4 weeks			6 weeks		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	640	10	< 10	640	160	10	1280	< 10	80
2	320	< 10	20	160	160	< 10	320	< 10	80
3	5120	20	10	640	160	80	320	10	40
4	2560	40	40	640	< 10	640	160	20	20
5	160	10	10	320	< 10	40	160	80	< 10
6	160	10	10	160	< 10	40			
7	2560	< 10	10	160	< 10	20			
8	320	20	40	160	< 10	20			
9	640	20	< 10	160	80	20			
10	640	10	< 10	320	< 10	20			
G.M.T.	685.9	14.1	41.1	278.6	28.3	32.5	320	17.4	34.8

Remarks : A : *F. columnaris* FKC 抗原 B : *E. tarda* O 抗原C : *A. hydrophila* FKC 抗原

G.M.T. : Geometric Mean Titer

表十：愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌等不活化混合菌苗注射免疫鰻魚抗體消長成績
 Table 10 : Vicissitudes of agglutination antibody titer of eels inoculated by intramuscular of inactivated *E. tarda* *A. hydrophila* and *F. columnaris* combined bacterin.

	2 weeks			4 weeks			6 weeks		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1280	40	20	640	80	320	1280	160	80
2	1280	40	160	160	40	640	640	160	1280
3	640	< 10	20	640	80	1280	640	320	5120
4	640	< 10	80	640	80	1280	320	40	640
5	640	20	20	320	40	160	320	160	320
6	640	80	320	320	640	640			
7	640	160	80	320	5120	320			
8	320	< 10	20	320	1280	80			
9	320	80	80	320	640	320			
10	640	< 10	20	640	2560	320			
G.M.T.	640	28.3	49.2	394	298.6	394	557.2	139.3	640

Remarks : A : *F. columnaris* FK 抗原 B : *E. tarda* O 抗原

C : *A. hydrophila* FK 抗原

G..M.T. : Geometric Mean Titer

討 論

據陳等 (1993) 報告研製之 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 混合菌苗對成鰻肌肉一次免疫注射後，抗 *E. tarda* 抗體價可達 1:1280，但以 1:80~320 者居多，抗 *A. hydrophila* 抗體價可達 1:80 而以 1:20~40 者居多。陳等 (1994) 又報告混合餌料口服免疫者，均可測出抗 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 之抗體價，最高可達 1:1280，而抗 *A. hydrophila* 之抗體價較抗 *E. tarda* 高。

本次研製之單元 *F. columnaris* 不活化菌苗與 *E. tarda*、*A. hydrophila* 及 *F. columnaris* 不活化混合菌苗以肌肉注射免疫及混以餌料口服免疫以微量滴盤做凝集反應法均可測得其血清中抗 *F. columnaris*、抗 *E. tarda* 及抗 *A. hydrophila* 特異抗體，其抗體價雖略有差異，抗 *E. tarda* 抗體偏低。推測其可能原因為調製混合菌苗時各單元菌苗中所含菌數量不同故混合比例不足，或以導管導入混合菌苗口服免疫操作係一大緊迫等因

素導致抗體價偏低尚待探討。

愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌均為條件性細菌其致病常因環境等因素而異，此次實驗中對照組鰻魚在第 2 週採血測試時可測得抗 *F. columnaris* 特異抗體價偏高，推測其可能在原養殖池中因常在菌之感染，或其他不良誘因等為導因，此類問題亦尚待探討。

誌謝 本研究承蒙行政院農業委員會 (84-科技-1.1 糧 62 (27))，計劃之補助，得能順利進行，謹併誌萬分之謝忱。

參考文獻

1. 林曜松、蕭世民 (1977)。臺灣魚池生態環境與魚病關係之研究 (I)。臺灣鰻魚疾病之統計分析。魚病研究專集，(4): 169-173。
2. 宋廷齡、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。
3. 柳家瑞、鍾虎雲、郭光雄（1982）。*Flexibacter columnaris* 病原性-I。魚病研究專集，(4)：57-62。
 4. 劉朝鑫、馮安東（1983）。Iodophor 應用於鱧魚病原菌消毒試驗。魚病研究專集，(5)：41-50。
 5. 劉朝鑫、王建雄（1986）。魚類病原菌抗藥性之研究 II，分布於養殖環境中之 *Edwardsiella tarda* 的抗藥性，魚病研究專集，(8)：56-67。
 6. 黃旭田、劉正義（1986）。鱧魚 (*Anguilla japonica*) 在 *Edwardsiella tarda* 與 *Aeromonas hydrophila* 混合感染下之致病性研究。魚病研究專集，(8)：40-55。
 7. 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。
 8. 郭光雄、劉正義、劉朝鑫（1986）。魚病專集鱧魚 P. 9，臺灣養豬科學研究所，80-85。
 9. 陳清、呂清泉、楊壹吟、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(1)：71-78。
 10. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、張天桂、詹益波、邱仕炎（1989）。愛德華氏菌苗對於鱧魚及小白鼠免疫之比較試驗。七十九年度臺灣省農林廳畜產試驗評議會，p. 181-190。
 11. 陳清、邱仕炎、詹益波、陳秀男、呂清泉、柯浩然、賴俊雄、張天桂（1991）。愛德華氏菌苗對於鱧魚免疫途徑及抗體消長之研究。魚病研究專集(13)：25-31。
 12. 陳清、邱仕炎、詹益波、陳秀男、呂清泉、柯浩然、賴俊雄（1993）。愛德華氏菌苗與產氣單胞菌混合菌苗之研製及對鱧魚免疫之研究。魚病研究專集 13：25-31。
 13. 陳清、柯浩然、盧泰志、呂清泉、賴俊雄、詹益波、蕭澤民、陳秀男（1994）。愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之研製及鱧魚口服免疫之試驗。魚病研究專集，(14)：10-11。
 14. Aoki Takashi, T. Kitao and M. Fukudome (1989). Chemotherapy against infection with multi drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. *Fish Pathology*, 24 (3) : 161 - 168。
 15. Salati, F., Kenji, Kawai and R. Kusuda (1984). Immue response of eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. *Fish Pathology*, 19 (3) : 187-192。
 16. 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。
 17. Salati, F. and R. Kusuda (1986). Immune response of Eel to *Edwardsiella* lipid. *Fish Pathology*, 21 (3) : 201-205。

Development of *Edwardsiella tarda* \ *Aeromonas hydrophila* and *Flexibacter columnaris* Combined Bacterin for Eels

H. J. Ko,¹ Ching Chen,^{1*} C. C. Lu,¹ J. S. Lai¹
Nae Wei Guo,¹ I. P. Chan¹ and S. N. Chen²

1. Taiwan Animal Health Research Institute, Tansui, Taipei, Taiwan.

2. Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

SUMMARY *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) \ *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) and *Flexibacter columnaris* (*F. columnaris*) were cultured individually in brain heart infusion broth at 30 °C for 18 ~ 20 hours respectively. After centrifugation and resuspension in medium, each cultured bacterial suspension was adjusted to $4 \sim 5 \times 10^{10}$ CFU / ml. Subsequently, the three suspensions were mixed together with equal volume. Then, 0.3 % formalin and 0.01 % thimersal were added for inactivation and preservation respectively. Finally, 10 % volume of the Aluminum hydroxide Gel — Bentonite was added to form the combined bacterin.

No side reaction was observed from the safety test conducted by administration the combined bacterin to 40 adult eels and 40 mice. The monovalent bacterin of *F. columnaris* tested in mice, potency index of $10^{1.0}$ was observed after challenge with strain as same as bacterin strain. To test the potency of the combined bacterin, the mice were challenged with *E. tarda*, *A. hydrophila*, *F. columnaris* and their combinations. The results potency indices were $10^{1.9}$ 、 $10^{1.7}$ 、 $10^{1.0}$ and $10^{2.47}$, respectively. Which showed satisfactory immunization effect on mice.

On eels, the tests were either by intramuscular injection and or by oral administration with feed to each group. The antibody titers can all be detected by using microplate agglutination test at 2、4 and 6 weeks after immunization. The antibody titers for *F. columnaris*, bacterin alone administered orally and intramuscularly were highest up to 1 : 2560 and 1 : 5120, respectively. For the combined bacterin, the antibody titers against *F. columnaris* \ *E. tarda* and *A. hydrophila* by oral immunization were highest up to 1 : 5120、1 : 160 and 1 : 640, respectively. Whereas those obtained by intramuscular injection were 1 : 1280、1 : 5120 and 1 : 5120, respectively.

Based on these experimental results, we concluded that the combined bacterin was developed a good immune responses in immunized eels.

Key words: *Eels*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Flexibacter columnaris*, *Combination bacterin*.

*Corresponding author

Reprinted from the Development and Application of Biotechnology in Aquatic Animal Culture (2) 77—88, 1996.
Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.