

鰻魚愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌 混合菌苗之研製及田間應用試驗

柯浩然^{1*} 陳清¹ 呂清泉¹ 賴俊雄¹ 郭乃維¹
詹益波¹ 蕭澤民² 陳秀男³ 王進添⁴ 張鴻猷⁴

1. 台灣省家畜衛生試驗所 製劑研究系
2. 省水產試驗所 臺西分所
3. 國立臺灣大學 動物學系
4. 雲林縣家畜疾病防治所

摘要 研製之愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌不活化混合菌苗分別以肌肉注射免疫方式 (1.0 mL/尾) 與混於餌料口服免疫方式 (6.0 mL/尾; 連續 2 日) 免疫鰻魚, 免疫後分別在第 2 週 (肌肉注射免疫組) 及第 4 週 (口服免疫組) 以愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌及三者混合菌液之不同濃度攻擊結果。得知其免疫力價, 在本所試驗鰻魚池肌肉注射免疫組防禦指數分別 $\text{Log } 10^{1.7}$ 、 $\text{Log } 10^{1.3}$ 、 $\text{Log } 10^{1.0}$ 及 $\text{Log } 10^{1.4}$; 口服免疫組防禦指數為 $\text{Log } 10^{0.8}$ 、 $\text{Log } 10^{1.9}$ 、 $\text{Log } 10^{1.0}$ 及 $\text{Log } 10^{1.7}$ 。在台西水試分所試驗鰻魚防禦指數分別為 $\text{Log } 10^{0.8}$ 、 $\text{Log } 10^{0.5}$ 、 $\text{Log } 10^{1.7}$ 及 $\text{Log } 10^{0.9}$ 。

由以上試驗結果顯示所研製之不活化混合菌苗雖在防禦力價有高低差異, 但整體而言免疫後鰻魚均可產生良好防禦效果, 對愛德華氏病、赤鰭病與腐鰓病具有預防效益。

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

臺灣亞熱帶氣候適合鰻魚生長, 沿岸亦有鰻線的生產, 且臨近一日本是最主要鰻魚消費市場 (臺灣鰻魚 90% 以上是外銷到日本市場), 在 1990 年年產值為一百二十三億元為所有水產品中價值最高的一種, 也使臺灣贏得「鰻魚王國」的美譽。但近年來鰻魚產業逐漸面臨諸多內在和外外在的問題, 限制了臺灣鰻業進一步的發展。一般業者更於有限之養殖池面積中增加其放養密度, 對鰻魚僅求其快速生長而忽略了良好養殖環境之保持, 使鰻魚之生理健康受到影響。本省養殖鰻魚之存活率據林及蕭之報告⁽¹⁾, 自幼鰻養至成鰻

出售時死亡平均 52% (幼鰻 34%, 中鰻 16%, 成鰻 12%) 影響經濟上的效益頗大。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*)、赤鰭病 (*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⁽⁸⁾。據宋及郭⁽²⁾, Song & Kou⁽¹¹⁾ 指出 *E. anguillimortiferum* 之加熱死菌與福馬林死菌抗原, 腹腔免疫三次, 第 2 至第 6 週抗體產生效價較高, 免疫性之維持以福馬林死菌較佳, 且添加 *A. hydrophila* 抗原後對 *E. tarda* 之抗體產生有

*抽印本索取者
台灣省家畜衛生試驗所

加強作用。對於愛德華氏菌、產氣單胞菌生物製劑之菌苗研究開發與應用亦有很大之發展。Salati et. al⁽¹²⁾ 在愛德華氏菌苗開發方面報告以 Lipopolysaccharide (LPS)，培養濾液及福馬林不活化菌苗 (FKC) 為抗原肌肉注射，均可使免疫鱧魚產生抗體價，但抗體價的高低與攻擊保護力價並無正相關。Salati 及 Kusuda^(9, 10, 13, 14, 15, 16) 又報告以 LPS 最好；但在抗體產生則以不含 Lipid A 之全菌苗最高。菌苗對於水產動物疾病之防疫功效亦有很多進展^(3, 4, 5)。而在愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫試驗方面陳等⁽⁶⁾ 以愛德華氏菌菌苗肌肉注射及藥浴方式免疫鱧魚後，其抗體力價測定之結果證實兩者均可產生良好之免疫反應，但以肌肉注射者抗體價較高。陳等⁽⁷⁾ 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免疫抗體，而抗 *A. hydrophila* 之抗體價恆較抗 *E. tarda* 抗體價高。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免疫防禦力價試驗之報告如下。

材料與方法

(一)試驗材料：

1. 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

2. 製造菌苗用培養基：

Brain heart infusion broth (Difco)

Brain heart infusion agar (Difco)

S. S agar (Difco)

Cytophaga agar

Hsu-Shotts medium (H-S medium)

3. 試驗用鱧魚：

為購自一般市場之鱧魚每尾體重約 220~250 公克，購入後以 15 ppm 福馬林液 (Formalin) 浸泡處理後供試。

台西水試分所之試驗鱧魚為體長 11.3~12 cm，體重 3.16~5.02 g 新進歐洲鱧 (*Anguilla anguilla*)。

4. 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 20~24 小時振盪培養後，集

菌遠心調整濃度將三種菌液調製各含 $3\sim5 \times 10^{10}$ CFU / mL，依比例混合後添加 0.3 % Formalin 不活化處理及 0.01 % Thimersol 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。

5. 感染菌液調製：

將 *E. tarda*、*A. hydrophila* 及 *F. columnaris* 分別培養在 Brain heart infusion broth，經 30 °C 20~24 小時振盪培養後，集菌遠心調整濃度將三種菌液調製各含 $3\sim5 \times 10^{10}$ CFU / mL，再濃縮或稀釋成不同濃度菌液供試。

(二)試驗方法：

1. 成鱧之菌苗免疫：

將鱧魚 400 尾分為三組，第一組 100 尾為不活化混合菌苗混以餌料口服免疫組 (6.0 mL / 尾 / 日；連續 2 日)；第二組 100 尾為不活化混合菌苗肌肉注射免疫 (1.0 mL / 尾 / 日)；第三組 200 尾為對照組。

2. 台西水試分所鱧魚免疫：

將鱧魚 400 尾分為二組每組 200 尾，免疫組以 (0.1 mL / 尾 / 日)，連續二星期將不活化混合菌苗混以餌料口服免疫鱧魚。

3. 攻擊感染方法：

將 *E. tarda*、*A. hydrophila*、*F. columnaris* 及三者混合菌液之濃度各調整為 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 等 4 種不同濃度，口服免疫組於免疫後第 4 週；肌肉注射免疫組於免疫後第 2 週，分別以斷尾浸泡 20 分鐘感染攻擊。

結 果

1. 研製之不活化混合菌苗在本所試驗魚池，混以餌料口服免疫連續 2 日後，在免疫後第 4 週以愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌及三者混合菌液之不同濃度感染攻擊，防禦指數分別為 $\text{Log } 10^{0.8}$ 、 $\text{Log } 10^{1.9}$ 、 $\text{Log } 10^{1.0}$ 及 $\text{Log } 10^{1.7}$ ，詳如表 1。

2. 研製之不活化混合菌苗在本所試驗魚池，肌肉注射免疫組，在免疫後第 2 週以愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌及三者混合菌液之不同濃度感染攻擊，防禦指數分別為 $\text{Log } 10^{1.7}$ 、

Log 10^{1.3}、Log 10^{1.0} 及 Log 10^{1.4}，詳如表 2。

3. 研製之不活化混合菌苗在台西試驗魚池，混以餌料口服免疫連續 14 日後，在免疫後第 4 週以愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌及三者

混合菌液之不同濃度感染攻擊，防禦指數分別為 Log 10^{0.8}、Log 10^{0.5}、Log 10^{1.7}、及 Log 10^{0.9}，詳如表 3。

表 1 愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌等不活化混合菌苗口服免疫鱖魚免疫力價試驗結果（實驗室）

攻 擊 菌 株	感 染 方 式		用不同濃度菌液攻擊後活存者 (%)				LD ₅₀	PI*	
			4~5 × 10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷			
E.	斷尾浸泡	免疫組	1 / 5 (20)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)	3 / 5 (60)	10 ^{1.8}	10 ^{0.8}	
		20 分鐘	對照組	0 / 5 (0)	0 / 5 (0)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)		10 ⁷
	20 分鐘	免疫組	4 / 5 (80)	3 / 5 (60)	3 / 5 (60)	5 / 5 (100)	10 ^{9.7}		10 ^{1.9}
		對照組	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)	2 / 5 (40)	1 / 5 (20)	10 ^{7.8}		
F.	斷尾浸泡	免疫組	2 / 5 (40)	2 / 5 (40)	3 / 5 (60)	4 / 5 (80)	10 ^{8.6}	10 ^{1.0}	
		20 分鐘	對照組	0 / 5 (0)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)	3 / 5 (60)		10 ^{7.6}
	20 分鐘	免疫組	2 / 5 (40)	3 / 5 (60)	4 / 5 (80)	5 / 5 (100)	10 ^{9.3}		10 ^{1.7}
		對照組	0 / 5 (0)	2 / 5 (40)	2 / 5 (40)	2 / 5 (40)	10 ^{7.6}		

E. : *E. tarda*

PI* : 防禦指數

A. : *A. hydrophila*

F. : *F. columnaris*

M. : Mixture suspension

表 2 愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌等不活化混合菌苗肌肉注射免疫鱧魚免疫力價試驗結果 (實驗室)

攻擊菌株	感染方式		用不同濃度菌液攻擊後活存數 (%)				LD ₅₀	PI*
			4~5 × 10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷		
E.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	3 / 5 (60)	2 / 5 (40)	3 / 5 (60)	4 / 5 (80)	10 ^{8.8}	10 ^{1.7}
		對照組	1 / 5 (20)	1 / 5 (20)	0 / 5 (0)	2 / 5 (40)		
A.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	3 / 5 (60)	3 / 5 (60)	2 / 5 (40)	2 / 5 (40)	10 ^{8.5}	10 ^{1.3}
		對照組	0 / 5 (0)	1 / 5 (20)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)		
F.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	3 / 5 (60)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)	2 / 5 (40)	10 ^{8.5}	10 ^{1.0}
		對照組	0 / 5 (0)	2 / 5 (40)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)		
M.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	4 / 5 (80)	2 / 5 (40)	3 / 5 (60)	3 / 5 (60)	10 ^{8.8}	10 ^{1.4}
		對照組	1 / 5 (20)	1 / 5 (20)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)		

E. A. F. M : 說明如表 1

表 3 愛德華氏菌、產氣單胞菌及滑走細菌等不活化混合菌苗口服免疫鱧魚免疫力價試驗結果 (台西水試分所)

攻擊菌株	感染方式		用不同濃度菌液攻擊後活存數 (%)				LD ₅₀	PI*
			5~6 × 10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷		
E.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	4 / 9 (44.4)	6 / 9 (66.6)	7 / 9 (77.7)	6 / 9 (66.6)	10 ^{9.2}	10 ^{0.8}
		對照組	1 / 9 (11.1)	4 / 9 (44.4)	5 / 9 (55.5)	7 / 9 (77.7)		
A.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	3 / 9 (33.3)	3 / 9 (33.3)	6 / 9 (66.6)	9 / 9 (100)	10 ^{8.8}	10 ^{0.5}
		對照組	0 / 9 (0)	4 / 9 (44.4)	6 / 9 (66.6)	6 / 9 (66.6)		
F.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	7 / 9 (77.7)	6 / 9 (66.6)	6 / 9 (66.6)	8 / 9 (88.8)	10 ^{9.7}	10 ^{1.7}
		對照組	1 / 9 (11.1)	2 / 9 (22.2)	5 / 9 (55.5)	6 / 9 (66.6)		
M.	斷尾浸泡 20 分鐘	免疫組	5 / 9 (55.5)	7 / 9 (77.7)	7 / 9 (77.7)	9 / 9 (100)	10 ^{9.5}	10 ^{0.9}
		對照組	3 / 9 (33.3)	4 / 9 (44.4)	5 / 9 (55.5)	8 / 9 (88.8)		

E. A. F. M : 說明如表 1

討 論

水產動物細菌性疾病常為二次性感染病原，即感染病原毒力偏低，通常健康魚類不易感染而發病，故需要各種緊迫誘因等作用才會引起魚類感染而致病。但縱使有良好的魚群管理可以減少疾病的侵犯，卻無法杜絕機緣性或絕對性病原，因而引起治療上的困惱。而且近代養殖技術以經營魚群達到全面性健康為標準，是以發展生物製劑以預防疾病之危害為必然趨勢。在鱧魚愛德華氏菌及產氣單胞菌引起赤鰓病之單獨或混合感染預防之研究，如前述已有多位學者專家提出報告，在愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之免疫試驗方面。陳等⁽⁶⁾以愛德華氏菌菌苗肌肉注射及藥浴方式免疫鱧魚後，其抗體力價測定之結果證實兩者均可產生良好之免疫反應，但以肌肉注射者抗體價較高。另陳等⁽⁷⁾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免疫抗體。雖研製之不活化混合菌苗口服免疫組與肌肉注射免疫均可產生良好之免疫防禦效果，惟在應用上應以混於餌料之口服免疫方式較符合實際需要。至於菌苗混於餌料後是否影響食餌性，進而降低預期免疫效果等問題，由試驗成績得知影響不大。本次台西水試分所實驗結果未如預期成果，推測原因可能是試驗鱧魚係採用新進歐洲鱧 (*Anguilla anguilla*)，對於本省高溫氣候、飼養管理上等均是影響因素，至於病死鱧及健康鱧剖檢病變中發現其鱧中有為數不少的鱧線蟲 (*Anguillicola grobices*) 寄生，因而可能對免疫效果有所影響，至於歐洲鱧是否適合本省養殖宜加以探討。

誌謝 本研究承蒙行政院農業委員會 85 科技 - 1.1 (糧) 49 (21) 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。臺灣魚池生態環境與魚病關係之研究 (I)。鱧魚疾病之統計分析。魚病研究專集 (4) : 169 - 173。1997
2. 宋延齡及郭光雄。日本鱧 (*Anguilla japonica*) 對 *Edwardsiella anguill inguillimortiferum* & *Aeromonas hydrophila* 抗原之免疫反應。臺灣水產學會刊。6 - 1, 65 - 72。1977
3. 陳秀男、郭光雄。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。1986
4. 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。*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。1988
5. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、張天桂、詹益波、邱仕炎。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。1989
6. 陳清、邱仕炎、詹益波、陳秀男、呂清泉、柯浩然、賴俊雄、張天桂。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 (11) : 16 - 21。1991
7. 陳清、柯浩然、盧泰志、呂清泉、賴俊雄、詹益波、蕭澤民、陳秀男。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) : 1 - 11。1994
8. Aoki., Takashi, Kitao T. and Fukudome M. : Chemotherapy against infection with multile drug resistant stains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. Fish Pathology 24 (3) : 161 - 168。1989
9. Kawahara, E., Salati F., Nomura S. and Kusuda R. Location of *Edwardsiella tarda* Antigen in Tissues of Eel (*Anguilla japonica*) after Intramuscular Injection, Fish Pathology。25 (4) : 213 - 216。1990
10. Kuge, T., Takahashi K., Barces I. and Hagashi F. *Aeromonas hydrophila*. a causative Agent of Mass Mortality in cultured Japanese catfish Larvae (*Silurus asotus*) Gyobyo Kenkyu, 27 (2) : 57 - 62。1992
11. Song, Y. L., and Kou. G. H. : The Immunoresponse of eel (*Anguilla Japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studies by the immersion method. Fish Pathology, 15 : 249 - 255。1981
12. Salati, F., Kenji, Kawai and Kusuda R. : Immue response of eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. Fish Pathology 19 (3) : 187

- 192 ◦ 1984
13. Salati, F and Kusuda R., : Vaccine preparation used for immunization of eel *Anguilla Japonica* against *Edwardsiella tarda* infection. Bulletin of the Japanese society of Scientific Fishere., 51 (8) 1233~1237 ◦ 1985
 14. Salati, F., and Kusuda R. : Immune response of Eel to *Edwardsiella* lipid. Fish Pathology, 21 (3) : 201 – 205 ◦ 1986
 15. Salati, F., Hamaguchi M. and Kusuda R.: Immue response of Red Sea Bream to *Edwardsiella tarda* Antigens. Fish Pathology, 22 (2) : 93 – 98 ◦ 1987
 16. Salati, F., Ono K. and Kusuda R. Oral Vaccination of glass eel of *Anguilla Japonica* against *Edwardsiella tarda* infection, Fish & Shellfish Immunology ◦ 1 : 309 – 310 ◦ 1991

Development and field application of *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila* and *Flexibacter columnaris* combined bacterin in eels.

H. J. Ko,^{1*} Ching Chen,¹ C. C. Lu,¹ J. S. Lai,¹ Nae Wei Guo,¹
I. P. Chan,¹ C. M. Shau,² S. N. Chen,³ J. T. Wang⁴ and H. Y. Chang⁴

1. Taiwan Animal Health Research Institute.
2. Taishi Branch, Taiwan Fisheries Research Institute.
3. Department of zoology, National Taiwan University.
4. Yunlin Hsien Livestock Disease Control Center.

SUMMARY An inactivated bacterin consisting of *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila* and *Flexibacter columnaris* was developed. Immunization test using intramuscular injection (IM) and orally with fish meal were carried out in eels to evaluate the combined bacterins. Each eel in the IM group was injected with 1.0 mL of bacterin; the eels in the orally vaccination with meal group were given 6.0 mL per eel per day for two consecutive days. Two weeks and four weeks after immunization, respectively, for the IM group and the orally group, the eels were challenged with *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Flexibacter columnaris* and its combined suspension of pathogens, respectively. The protection indexes (PI) obtained in the laboratory were $\log 10^{1.7}$, $\log 10^{1.3}$, $\log 10^{1.0}$ and $\log 10^{1.4}$ for the IM group and $\log 10^{0.8}$, $\log 10^{1.9}$, $\log 10^{1.0}$ and $\log 10^{1.7}$ for the orally group, respectively. Using the same pathogens in the laboratory, the test were also conducted in Taishi branch of the TFRI, The PI of by using orally vaccination with meal were $\log 10^{0.8}$, $\log 10^{0.5}$, $\log 10^{1.7}$ and $\log 10^{0.9}$, respectively.

These experimental results showed that there are variation in the protection indexes after challenge. As a whole, however, the combined bacterin achieved good immunization results in eels against the Edwardsiellosis, red fin disease, and columnaris disease.

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

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.