

魚類鏈球菌不活化疫苗研究初報

黃子鳴*、鄭劭蕙、吳介豪、涂堅

行政院農業委員會家畜衛試驗所

摘要 鏈球菌症為魚隻重要疾病，造成魚類死亡與經濟損失，防治魚鏈球菌症除投予抗菌劑治療外，亦可以疫苗預防其發生，本計畫之目的為以福馬林不活化方式研發魚鏈球菌疫苗。種菌株 99v2942 以腦心浸出液 (brain heart infusion broth, BHI) 液體震盪培養 24 小時後可達指數生長期 1×10^9 CFH/ml 的濃度，而福馬林不活化條件則為於 4°C 下 150 rpm 震盪作用 48 小時，福馬林最低濃度為 0.5% 即可達到完全不活化。以此條件試製不活化疫苗一批，以金目鱸與龍膽石斑進行疫苗安全與效力試驗，免疫後兩週無不良反應，以種菌株攻毒後比較免疫組與對照組之死亡率，其相對存活率 (Relative Percent Survival, RPS) 均大於 80%，顯示投與疫苗可產生良好的免疫保護力。

關鍵字：魚鏈球菌、不活化疫苗、效力。

緒言

魚類鏈球菌症對養殖漁業造成重大的經濟損失。常見感染魚的鏈球菌科細菌有海豚鏈球菌 *Streptococcus iniae*，無乳鏈球菌 *S. agalactiae* (或稱 B 型鏈球菌, group B *Streptococcus*)，格氏乳酸球菌 *Lactococcus garvieae* 與 *S. dysgalactiae* 等。魚鏈球菌症容易於夏日水溫升高、水質變差時爆發，感染鏈球菌的魚隻會出現單側或雙側的眼球突出 (exophthalmia)、角膜混濁 (corneal opacity)、體色變黑 (melanosis)、昏睡 (lethargy)、失去方向感、泳姿怪異、厭食、消瘦、猝死等，病變可見頭顱內水腫 (intracranial edema)、出血性全眼炎 (hemorrhagic panophthalmitis)、腹水、腹膜炎、肛門周圍體表出血、化膿性腦膜炎等[2]。臨床上診斷除發現疑似症狀外，可於發病魚隻臟器如肝、脾、腦等，製作組織抹片並以革蘭氏染色或劉氏染色法觀察有無排列成鏈狀之陽性球菌，確診則需自臟器組織進行細菌分離與鑑定[2]。海豚鏈球菌 *Streptococcus iniae* 最早於 1976 年自亞馬遜淡水海豚 (Amazon

freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*) 分離[8]，在台灣魚類鏈球菌症病例中有很高比例都是海豚鏈球菌感染造成，吳郭魚、金目鱸、石斑等海水或淡水養殖魚都曾分離到 (未發表資料)。

對魚鏈球菌症防治可由預防與治療著手，之前研究顯示台灣海豚鏈球菌對水產核准用抗生素的感受性良好[1]，但是臨床治療上有停藥後復發的問題，原因不明。在預防魚鏈球菌症發生上除改善水質之外，可以接種疫苗產生免疫保護方式預防。國外如美日等均有研發不活化或減毒活毒之魚類鏈球菌疫苗[6,9]，但是在台灣尚待官方檢驗核准，目前並無合法魚用細菌性疫苗可供使用。本研究之目的為以福馬林不活化方式研發魚類海豚鏈球菌不活化疫苗，並以金目鱸與龍膽石斑進行動物試驗評估疫苗安全性與保護效力。

材料與方法

鏈球菌種菌株培養條件

由先前試驗選擇出對魚隻具有病原性之海豚鏈球菌魚類分離 99v2942 株，該種菌株由趙嘉

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛試驗所

本博士所提供，自高雄之龍膽石斑所分離，並經 16s rDNA 基因序列增幅比對以確認種別。以腦心浸出液 (brain heart infusion broth, BHI) 培養，或添加 5% 的非働化胎牛血清，或添加 5% 破裂綿羊紅血球 (lyzed sheep RBC)，於 25°C 下以 150 rpm 震盪培養 24 或 48-52 小時，相隔 4 小時或更久後收集菌液，測量波長 600 nm 的吸光值，並將培養菌液連續稀釋後接種至血液培養基培養，計算菌落生長數以決定細菌濃度，找出合適的培養條件。

福馬林不活化試驗

在 4°C 下以 150 rpm 震盪，加入 0.5%、1.0%、1.5% 或 2.0% 濃度的福馬林對培養 24 小時之海豚鏈球菌菌液 (細菌濃度約 1×10^9 CFU/ml) 進行不活化，作用 48 小時後抽取 100 μ l 菌液塗抹於血液培養基上培養以檢測細菌存活。

不活化疫苗安全與效力試驗

將試製之福馬林不活化海豚鏈球菌疫苗，以 3 月齡，約 2 到 3 吋長之金目鱸 (平均體重約 5-10 公克) 或龍膽石斑 (平均體重約 10-15 公克) 進行兩劑量 (0.2 ml) 腹腔接種，觀察 3 周有無死亡、接種部位腫脹潰爛、或缺乏食欲等不良反應。若無不良反應，以同年齡大小之金目鱸或龍膽石斑進行 1 劑量 (0.1 ml) 不活化疫苗腹腔接種，接種 2 周後以三種不同劑量的海豚鏈球菌 99v2942 種菌株 (10^8 、 10^7 、 10^6 CFU) 攻毒，觀察 2 周紀錄死亡率變化，計算相對存活率 (Relative Percent Survival, RPS) 以了解疫苗的保護效力。RPS 計算方式為 $(1 - (\text{免疫組死亡率} \% / \text{對照組死亡率} \%))$ 。

結果

鏈球菌種菌株培養條件

以 BHI 液體震盪培養，發現培養 24 小時菌液濃度最高，可達 1×10^9 CFU/ml，之後至 48 小時或更久則活菌數緩慢下降 (4 小時： 1.76×10^4 CFU/ml，9 小時： 4.41×10^4 CFU/ml，24 小時： 1.82×10^9 CFU/ml，28 小時： 1.32×10^9

CFU/ml，33 小時： 1.61×10^9 CFU/ml，48 小時： 1.65×10^7 CFU/ml，52 小時： 1.75×10^7 CFU/ml)。比較以 BHI、BHI+5% 胎牛血清、與 BHI+5% 破裂綿羊紅血球，150 rpm 震盪培養 24 小時，發現加入胎牛血清或破裂綿羊紅血球會增加培養早期的細菌量，但至 24 小時的細菌數較 BHI 培養少 (BHI： 1.85×10^9 CFU/ml，BHI+5% 胎牛血清： 8.9×10^8 CFU/ml，BHI+5% 破裂綿羊紅血球： 3.35×10^8 CFU/ml)，故後續疫苗製作培養以 BHI 培養 24 小時即可。

福馬林不活化試驗

以 0.5% 至 2.0% 濃度之福馬林 150 rpm 震盪不活化 48 小時均可以完全殺死細菌。故以 BHI 培養種菌株，於 25°C 下 150 rpm 震盪培養 24 小時後，加入 0.5% 濃度之福馬林，於 4°C 下 150 rpm 震盪不活化 48 小時做為不活化疫苗進行動物試驗。

不活化疫苗安全與效力試驗

以兩劑量疫苗腹腔接種後觀察兩周，免疫金目鱸與龍膽石斑魚隻均無出現不良反應，顯示不活化海豚鏈球菌疫苗安全性無虞。以不同劑量 (10^8 、 10^7 、 10^6 CFU) 海豚鏈球菌 99v2942 種菌株腹腔接種攻毒，金目鱸動物試驗顯示，兩周後 10^8 CFU 攻毒組死亡率為 90%， 10^7 CFU 攻毒組為 70%， 10^6 CFU 攻毒組為 60%；而免疫組 10^8 CFU 攻毒死亡率為 10%，免疫組 10^7 CFU 攻毒死亡率為 0%，免疫組 10^6 CFU 攻毒死亡率為 10%。金目鱸試驗的相對存活率 RPS， 10^8 CFU 組為 89%， 10^7 CFU 組為 100%， 10^6 CFU 組為 83% (表 1)。龍膽石斑動物試驗顯示，兩周後 10^8 CFU、 10^7 CFU 與 10^6 CFU 攻毒組死亡率均為 100%；而免疫組 10^8 CFU 攻毒死亡率為 0%，免疫組 10^7 CFU 攻毒死亡率為 0%，免疫組 10^6 CFU 攻毒死亡率為 20%。龍膽石斑試驗的相對存活率 RPS， 10^8 CFU 與 10^7 CFU 組均為 100%，而 10^6 CFU 組為 80% (表 2)。由金目鱸與龍膽石斑的效力試驗結果，可知試製之不活化

疫苗可達到相對存活率 80%-100%，具有良好的保護效力。

討論

在台灣夏天炎熱時常見魚類鏈球菌感染症，其中主要為海豚鏈球菌與無乳鏈球菌。雖然魚類海豚鏈球菌分離株對水產常用抗生素的感受性良好[1]，但實際治療上有停藥後復發的問題，可能原因是鏈球菌可以躲藏在細胞內以躲過抗菌物質[11]，故以疫苗預防於鏈球菌症是另一個控制疾病發生的方法。國外除傳統不活化疫苗之外，對海豚鏈球菌也研發出許多新型疫苗，例如次單位疫苗[3,5,14]、DNA 疫苗[12,13]或是減毒活菌疫苗[9,10]等。然而目前國內並無核准水產用鏈球菌疫苗，故研發魚用海豚鏈球菌疫苗仍以傳統福馬林不活化方式進行，以期能盡早研發成功上市，解決漁民問題。福馬林不活化的濃度與時間是影響不活化

的主要因素，濃度越高則所需時間越少，但高濃度福馬林可能造成魚隻不適或藥物殘留問題，且若未來考量現場使用情形要改變投與方式，福馬林濃度過高可能不適合以浸泡方式投與。

國外早有商品化之不活化魚用鏈球菌疫苗，包括海豚鏈球菌與無乳鏈球菌。以色列的文獻指出 1995 年起該國便以投與疫苗控制魚鏈球菌症，使魚隻死亡率由每年 50% 下降到少於 5%，但 1997 年起便又發生臨床症狀不同的鏈球菌症爆發，分析爆發菌株與原流行株發現其生化性狀與血清型不同[4]。國外研究也顯示使用疫苗防治鏈球菌症會促使帶有不同莢膜的新血清型菌株出現[7]，而台灣由於養殖漁業發達，養殖魚種眾多，不同魚種所分離的海豚鏈球菌有無差異，菌株間血清型是否相同，有無交叉保護皆無相關資料，仍需要投入資源深入研究才能研發出適合台灣漁業使用之疫苗與預估使用疫苗後可能繼發流行菌株。

表 1、金目鱸的不活化疫苗免疫效力。

組別	攻毒劑量 (CFU)	死亡率	相對存活百分率 (RPS)
免疫組	10^8	1/10	89%
對照組	10^8	9/10	
免疫組	10^7	0/9	100%
對照組	10^7	7/10	
免疫組	10^6	1/10	83%
對照組	10^6	6/10	

表 2、龍膽石斑的不活化疫苗免疫效力。

組別	攻毒劑量 (CFU)	死亡率	相對存活百分率 (RPS)
免疫組	10^8	0/10	100%
對照組	10^8	10/10	
免疫組	10^7	0/10	100%
對照組	10^7	10/10	
免疫組	10^6	2/10	80%
對照組	10^6	10/10	

參考文獻

1. 黃子鳴、鄭劭蕙、涂堅。101年度魚類鏈球菌藥物感受性調查。家畜衛試所研報 48 : 83-88, 2013。
2. Agnew, W, and AC Barnes. Streptococcus iniae: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Vet Microbiol 122: 1-15, 2007.
3. Aviles, F, MM Zhang, J Chan, J Delamare-Deboutteville, TJ Green, C Dang, and AC Barnes. The conserved surface M-protein SiMA of Streptococcus iniae is not effective as a cross-protective vaccine against differing capsular serotypes in farmed fish. Vet Microbiol 162: 151-159, 2013.
4. Bachrach, G, A Zlotkin, A Hurvitz, DL Evans, and A Eldar. Recovery of Streptococcus iniae from diseased fish previously vaccinated with a streptococcus vaccine. Appl Environ Microbiol 67: 3756-3758, 2001.
5. Cheng, S, YH Hu, XD Jiao, and L Sun. Identification and immunoprotective analysis of a Streptococcus iniae subunit vaccine candidate. Vaccine 28: 2636-2641, 2010.
6. LaFrentz, BR, CA Shoemaker, and PH Klesius. Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in Nile tilapia following vaccination with a Streptococcus iniae vaccine. Vet Microbiol 152: 346-352, 2011.
7. Millard, CM, JC Baiano, C Chan, B Yuen, F Aviles, M Landos, RS Chong, S Benedict, and Barnes AC. Evolution of the capsular operon of Streptococcus iniae in response to vaccination. Appl Environ Microbiol 78: 8219-8226, 2012.
8. Pier, GB, SH Madin, and S. Al-Nakeeb. Isolation and characterization of a second isolate of Streptococcus iniae. Int J Syst Bacteriol 28: 311-314, 1978.
9. Pridgeon, JW, and PH Klesius. Development and efficacy of a novobiocin-resistant Streptococcus iniae as a novel vaccine in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Vaccine 29: 5986-5993, 2011.
10. Pridgeon, JW, PH Klesius, and M Yildirim-Aksoy. Attempt to develop live attenuated bacterial vaccines by selecting resistance to gossypol, proflavine hemisulfate, novobiocin, or ciprofloxacin. Vaccine 31: 2222-2230, 2013.
11. Quach, D, NM van Sorge, SA Kristian, JD Bryan, DW Shelver, and KS Doran. The CiaR response regulator in group B Streptococcus promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. J Bacteriol 191: 2023-2032, 2009.
12. Sun, Y, L Sun, MQ Xing, CS Liu, and YH Hu. SagE induces highly effective protective immunity against Streptococcus iniae mainly through an immunogenic domain in the extracellular region. Acta Vet Scand 55:78-86, 2013.
13. Sun, Y, YH Hu, CS Liu, and L Sun. A Streptococcus iniae DNA vaccine delivered by a live attenuated Edwardsiella tarda via natural infection induces cross-genus protection. Lett Appl Microbiol 55: 420-426, 2012.
14. Zou, L, J Wang, B Huang, M Xie, and A Li. MtsB, a hydrophobic membrane protein of Streptococcus iniae, is an effective subunit vaccine candidate. Vaccine 29: 391-394, 2011.

Preliminary Report: Development of Fish Formalin-inactivated *Streptococcus iniae* Vaccine

TM Huang*, SH Cheng, CH Wu, and C Tu

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Streptococcosis is an important fish disease causing mortality and economic losses in the fishing industry. Prevention and control of fish streptococcosis includes administration of antimicrobials or vaccines. The objective of the present study was to develop a formalin-inactivated *Streptococcus iniae* vaccine. The seed strain 99v2942 was cultured with brain heart infusion (BHI) broth at 25°C, shaken at 150 rpm for 24 hours to achieve log phase growth with a concentration of 1×10^9 CFU/ml. Incubation with 0.5% formalin at 4°C and 150 rpm-shaking for 48 hours inactivated the *S. iniae* culture. A batch of formalin-inactivated vaccine was produced according to previously described conditions. Safety and efficacy of the inactivated vaccine was tested with sea bass and giant grouper. No adverse effects were observed in vaccinated groups during two-week postimmunization. Relative percent survival (RPS) of challenge by seed strain was equal or higher than 80%. The results of this study indicated that immunization with the formalin-inactivated *S. iniae* vaccine could produce a high level of immune protection against *S. iniae*.

Keyword: fish streptococcosis, inactivated vaccine, efficacy.

