

愛德華氏菌苗對於鰻魚免疫途徑及抗體消長之研究

陳清 邱仕炎 詹益波 陳秀男* 呂清泉
柯浩然 賴俊雄 張天桂

台灣省家畜衛生試驗所
*國立台灣大學動物學系

研製之鰻魚愛德華氏病不活化菌苗，以小白鼠等作安全試驗之結果，均無不良之反應，力價測試成績，其防禦力價大於10倍。

以鰻魚為材料，實施注射及藥浴方式免疫試驗之結果，得知菌苗免疫注射組其試管凝集抗體價，自免疫後第2週~16週均可測出，最高者可達1,280倍，而以第5~12週之抗體價為最高，藥浴組抗體產生偏低，但仍以第5~12週之抗體價較高。

家畜禽及水產動物細菌性病原之感染，依劉及王 1986，Aoki *et al.*, 1989 之報告，雖可用抗菌物質加以防治。惟長期使用抗菌物質之結果，除使細菌產生抗藥性而降低防治力價外其所產生之肉、蛋、牛乳及水產品藥物殘留亦為消費者所關注，因此如何開發生物製劑來預防疾病為害，係吾等今後努力之目標，郭等 1986，陳及郭 1986，黃及劉 1986。

Song *et al.*, 1981, 1982 曾報告鰻魚浸泡免疫一次即有免疫效果，而以三次之效果最佳，陳等 1988, 1989 曾以不同菌株免疫家兔製成高度免疫血清並以同株及異株抗原作凝集反應試驗，且以肉羹培養不活化菌苗及PBS (-)菌苗免疫鰻魚及小白鼠獲得良好之試驗成績。本研究於實驗室探討免疫鰻魚之菌苗投與方式及其抗體消長作為菌苗開發田間應用試驗之參考。

材料與方法

一、試驗材料

1. 供試菌株、培養基及佐劑：

Edwardsiella tarda ATCC 15469, F-1 等菌株，所用培養基為 S.S. agar, Brain heart infusion broth 鋁膠及 Bentonite 等。

2. 供試動物：

健康小白鼠 13~15 公克，健康天竺鼠 350~400 公克及成鰻 125~150 公克。

二、試驗方法：

1. 菌苗之研製方法：

以供試 *Edwardsiella tarda* ATCC 15469 及 F-1 菌株分別培養於 Brain heart infusion broth 於 37°C 下振盪培養 18~20 小時，收集後添加 0.2% Formalin 使其不活化，等量混合後再濃縮使其成為 3×10^{10} CFU/ml 緩衝

生理食鹽水菌液，再以 Aluminum hydroxide gel 爲佐劑調製供爲試驗之用。

2. 試製菌苗之安全及力價試驗：

前述研製之菌苗注射 2 ml 於天竺鼠皮下及 0.5 ml 於小白鼠皮下，觀察 10 天以測定其安全性，力價試驗時依陳等 1988 方法，以 10 倍稀釋之菌苗接種於供試小白鼠腹腔內，經過二週後再以 ATCC 15469 及 F-1 菌株之培養混合菌液攻擊之，以測定其 LD₅₀ 之防禦指數。

3. 對鰻魚之免疫試驗：

研製不活化緩衝生理食鹽水菌苗，添加 1

/10 量鋁膠佐劑供爲注射免疫組之用，每尾 1 ml 分三個部位注射，連續三天。添加 1/10 量之 1.5% Bentonite suspension 菌苗供爲浸泡藥浴之用，每天一次，每次五分鐘連續三天。

結 果

一、試製菌苗安全性試驗成績

依試驗方法實施之結果，得知無論是接種於小白鼠、天竺鼠或成鰻，供試動物均無不良之接種反應，詳如表一所示。

Table 1. The result of safety test of *Edwardsiella tarda* bacterin in various experimental animals

Animal	No. of tested	Dose & route inoculated	Results
Mouse	10	0.5 ml SC	survived
Guinea pig	2	2.0 ml SC	survived
Eel	5	1.0 ml IM	survived

Remarks : SC : Subcutaneous

IM : Intramuscular

二、試製菌苗對小白鼠之免疫力價試驗成績

研製之菌苗以 PBS (-) 10 倍稀釋腹腔注射於小白鼠，免疫二週後再與對照組同時實施攻

擊試驗，觀察 10 天，所得成績如表二，由該表得知研製菌苗對小白鼠之免疫力價大於 10 倍。

Table 2. The result of efficacy test of *Edwardsiella tarda* bacterin in mice

Group	Dose & route vaccinated	Survival after challenge with*1 various concentration of organisms				LD ₅₀
		5 × 10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	
Experiment	0.5 ml IP	10/10*2 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	0/10 (0)	10 ^{8.5}
Control		10/10 (100)	8/10 (80)	0/10 (0)	0/10 (0)	10 ^{7.375}

Remarks : IP : Intraperitoneal inoculation.

*1 : Two weeks post vaccination, 0.2 ml of *E. tarda* bacterial suspension each was used for IP challenge.

*2 : No. survived/No. tested.

三、研製之菌苗對鰻魚之免疫抗體消長試驗成績

本試驗係以成鰻供試，分為肌肉注射組及浸泡藥浴組，免疫後第二週及第三週抽樣採血預測凝集抗體價，第 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16 週，每組每尾採血，分離血清 50°C 非慳化處理後 - 20 °C 保存，供抗體測定之用。血清稀

釋依二倍稀釋法，仿照博德氏菌試管凝集抗體測定法實施抗體檢查之結果，詳如圖 1.2 所示由該等圖顯示肌肉注射組抗體顯較浸泡藥浴組為高（第 5 週時抗體價最高，幾何平均值達 452.55），迄第 16 週時其幾何平均值仍達 44.90，而對照組（圖 3）則自始至終均低於 10 倍。

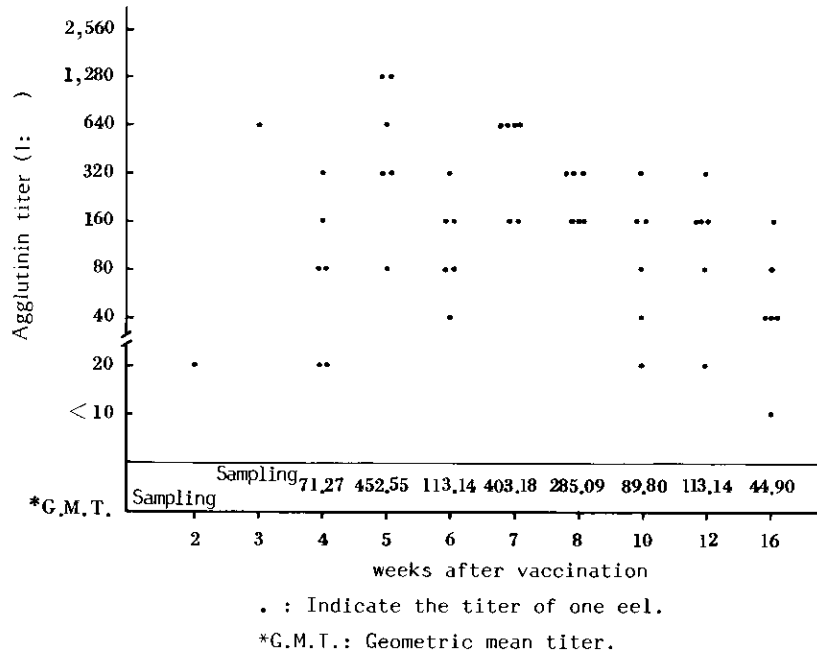


Fig 1. Vicissitude of antibody titer of eels IM vaccinated by agglutination test.

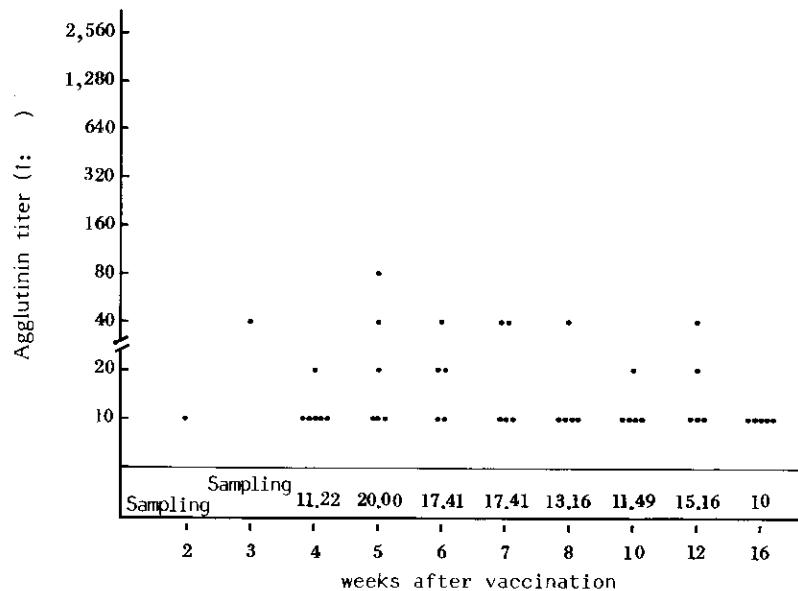


Fig 2. Vicissitude of antibody titer of eels with bacterin immersion vaccinated by agglutination test.

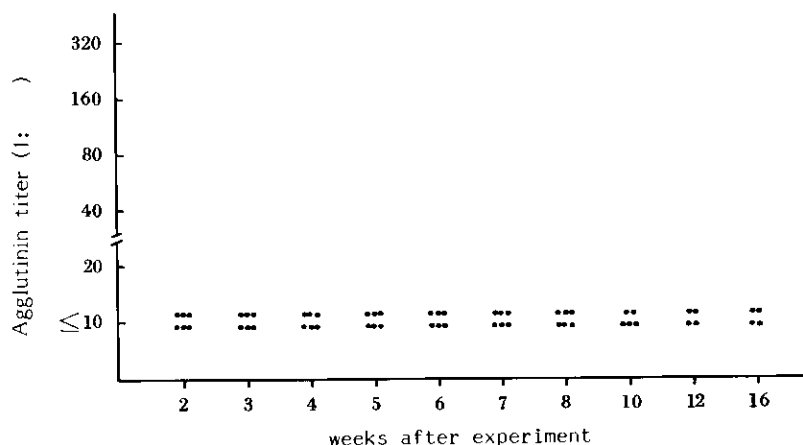


Fig 3. Results of antibody titer detected in eels during experimental period of control group by agglutination test.

討 論

鰻魚愛德華氏病菌苗，由於菌株之差異，其抗原性及彼此間之交叉反應，亦略有所不同，但以 F-1 菌株免疫家兔之血清，則對彼此不同抗原之凝集抗體價並無顯明之差異，在本次免疫試驗中試製之不同菌株混合菌苗免疫鰻魚而抗體測定時以 F-1 菌株為抗原所測定之成績。Salati *et al.*, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987 在菌苗開發及抗體測試頗多建樹。Salati 1983 等曾以脂多醣類 (Lipopolysaccharide LPS)，培養濾過液 (Culture filtrate) 及福馬林不活化全菌體 (Formalin-killed whole cells) 抗原作為免疫之用，得知均可使鰻魚之抗體價上升，彼等以免疫擴散試驗之結果認為係共通抗原關係。嗣後之報告中認為 LPS 中之多醣體 (Polysaccharide) 才是保護之物質。並由試驗中得知粗製 LPS 及不含 Lipid 之全菌體菌苗獲得良好之免疫效果 Salati and Kusuda, 1985。並證明 Lipid 會抑制免疫之效果。Salati *et al.*, 1987 並曾以 *E. tarda* 製成之 LPS 及福馬林不活化菌苗免疫紅海鯛 (Red sea bream) 獲得良好之免疫效果，而認為吞噬作用可能是紅海鯛抵抗保護 *E. tarda* 感染之重要機序。可見福馬林不活化菌苗在實際上有其應用價值，並由私人晤談

討論中向著者表示福馬林不活化菌苗在鰻魚免疫應用上之價值。由於水產動物之防疫與陸地動物在實施上及管制上略有不同且較難，尤其投藥方式受到環境、水質及其他因素之影響頗大，因此在大批防疫措施，尤以菌苗之免疫，雖可考慮浸泡 (幼苗時) 但實際上俟幼苗漸漸長大後浸泡或噴霧實施上均有相當困難，而混合餌料投與，雖有因鰻魚之大小、強弱，食量不同，無法獲得齊一的免疫效果，但究是否為唯一較為可行的方式，則尚待研究。

參 考 文 獻

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、張天桂、詹益波、邱仕炎 (1989) 愛德華

- 氏病菌苗對於鰻魚及小白鼠免疫之比較試驗。七十九年度台灣省農林廳畜產試驗評議會 P.181~190。
5. 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。
 6. 黃旭田、劉正義 (1986) 鰻魚 (*Anguilla japonica*) 在 *Edwardsiella tarda* 與 *Aeromonas hydrophila* 混合感染下之致病性研究。魚病專集 8: 40~55。
 7. Aoki Takashi, T. Kitao and M. Fukudome (1989) Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. Fish Pathology 24(3): 161-168.
 8. Salati, F., Kenji, Kawai and R. Kusuda (1983) Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathology 18(3):135-141.
 9. Salati, F., Kenji, Kawai and R. Kusuda (1984) Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. Fish Pathology 19(3): 187-192.
 10. 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.
 11. Salati, F. and R. Kusuda (1986) Immune response of Eel to *Edwardsiella tarda* lipid. Fish pathology 21(3): 201-205.
 12. Salati, F., M. Hamaguchi and R. Kusuda (1987) Immune response of Red Sea Bream to *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathology 22(2): 93-98.
 13. Song, Y.L. and G.H. Kou (1981) The immunoresponse of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studies by the immersion method. Fish pathology, 15: 249-255.
 14. Song, Y.L., G.H. Kou and K.Y. Chen (1982) Vaccination conditions for the eels (*Anguilla japonica*) with *Edwardsiella anguillimortifera* bacterin. CAPD Fisheries Series (8): 18-25.

**Studies on the Bacterin Immunity Methods and Vicissitude of
Antibody Titers Against *Edwardsiella tarda* in Eels**

Ching Chen, S.Y. Chiu, I.P. Chan, S.N. Chen,* C.C. Lu,
H.J. K'io, J.S. Lai and T.G. Chang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
*Department of Zoology, National Taiwan University

SUMMARY

No side reaction was observed on the safety test of *Edwardsiella tarda* bacterin in mice. The protection index on efficacy test was greater than 10 times.

The immunization tests by intramuscular (IM) injection and/or immersion were carried out in eels. The results indicated the tube agglutination titer was detected from the second week till 16th week after IM vaccination in eels.

But the antibody titer in between the 5th to 12th week post Im injection was higher than in the rest of period, with the highest titer of 1:1,280 observed. The immersion inoculations produced some what lower antibody titer than in IM inoculations, but a persistent high titer was maintained in between the 5th to 12th week post immersion.