

# 本省虱目魚弧菌之分離及其血清學研究

涂 堅<sup>1</sup> 鄭錦德<sup>2</sup> 楊揚輝<sup>1</sup>

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 台南市家畜疾病防治所

從1989年7月至1990年6月，共檢查12件病材，4件未檢出，4件為Vibrio alginolyticus，3件為Vibrio vulnificus，1件為Vibrio sp.。Vibrio anguillarum未分離出。

傳統抗血清以Vibrio anguillarum標準血清型A、B、C、D、E、F 6株熱穩定體抗原製備。經凝集反應試驗，發現A及C，D及E間存在交叉反應。以吸附作用處理後，可消除此反應。

1988年消費市場調查顯示，虱目魚廣受大眾喜愛，其消費量僅次於吳郭魚<sup>(2)</sup>，因此可見其養殖在台灣水產扮演角色之重要。近年由於工業、畜牧場、家庭廢水排放增加及養殖場本身濫用藥物，大量使用地下水源引起之污染，使得整個養殖型態、方式及環境都引起改變，因此極需了解虱目魚弧菌感染病原菌及其血清型變化之情形。

董等<sup>(3)</sup>研究指出，本省虱目魚弧菌症主要由Vibrio anguillarum引起。因此本計畫除分離調查外，並研製Vibrio anguillarum標準血清，俾便對由本省虱目魚中分離到之Vibrio anguillarum作一調查，以供流行病學及防疫之參考。

## 材料與方法

### 1. 病 材：

由台南市家畜疾病防治所鄭錦德技佐協助收集。

### 2. 病材鑑定：

依生化反應鑑定<sup>(4)</sup>。若分離到Vibrio anguillarum，再以下列產製之血清定型。

### 3. 標準菌株 (Vibrio anguillarum)：

共有A、B、C、D、E、F六株血清型，由廣島大學生物生產學部、室賀清邦教授贈。

### 4. 抗血清製備及抗原分析：

- (1) 以1.5% NaCl 的腦心抽出液肉汁 (DIFCO)，25℃，振盪培養24小時。4000 xg，4℃，20分鐘離心。以生理食鹽水洗三次，濃縮細菌以121℃，20分鐘處理，濃度調至Mc Farland 氏濁度No

1. 臺灣省家畜衛生試驗所

2. 台南市家畜疾病防治所

- 4。
- (2) 12 隻紐西蘭白兔以 2 ml 菌液及等量佛氏完全佐劑之混合乳劑皮下免疫 (每型 2 隻)。14 日後以 2 ml 菌液加不全佐劑免疫，7 日後以 4 ml 菌液免疫，3 日後以 4 ml 靜脈注射，3 日後以 8 ml 靜脈免疫，3 日後放血、離心、血清存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。
- (3) 96 孔微量盤交叉反應凝集試驗：  
各型血清作二倍稀釋 ( $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$ )，再加入各型菌液 ( $10^8\ \text{CFU}/\text{ml}$ )， $37^{\circ}\text{C}$ ，2 hr<sup>(4)</sup>。
- (4) 平板交叉凝集反應：  
各型血清 ( $1:10$ )  $50\ \mu\text{l}$ ，與各型抗原 ( $10^8\ \text{CFU}/\text{ml}$ )  $50\ \mu\text{l}$  混合，2 分鐘內判定。
- (5) 吸附作用：  
以濃縮細菌與抗血清依 1:10 比例混合， $37^{\circ}\text{C}$ ，攪拌 18 小時，再以  $4500 \times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ，離心 20 分，取其上清液血清。

## 結 果

經由台南市携回之冷凍病材，經解凍分離、鑑定。其中有 4 件未有檢出，原因不明，而 Vibrio alginolyticus 4 件，Vibrio vulnificus 3 件，未定種名者 1 件。如表一

表一 虱目魚病材分離鑑定結果

原 因	件 數
不 明	4
<u>Vibrio anguillarum</u>	4
<u>Vibrio vulnificus</u>	3
<u>Vibrio sp.</u>	1

將所產製的各型血清以微量盤凝集反應測其力價高低，A 型為 128 倍，B 型為 64 倍，C 型為 128 倍，D 型為 64 倍，E 型為 64 倍，F 型為 128 倍，可知以此種抗原經皮下加靜脈方式免疫，最高力價為 128 倍。

以二分鐘為標準來判定平板交叉凝集反應

結果，可發現 A 與 C 二型間；E 與 D 二型間，分別有交叉反應。如表二。但以吸附作用處理，將抗異源性抗體吸附，留下抗同源抗體，即可解決此問題。

表二 V. anguillarum 平板交叉凝集反應

O-抗原	血 清 型					
	A	B	C	D	E	F
A	+	-	+	-	-	-
B	-	+	-	-	-	-
C	+	-	+	-	-	-
D	-	-	-	+	+	-
E	-	-	-	-	+	-
F	-	-	-	-	-	+

## 討 論

本年度病例中有 4 例為原因不明，未分離出弧菌。究其原因可能是水溫過低、亞硝酸、氨濃度過高或係感染傳染性胰臟壞死病毒 (徐亞莉，未發表之資料) 所致。由於人手及時間配合問題，並未加以檢驗，值得進一步研究。

並未分離到引起虱目魚紅斑病的主要病原 Vibrio anguillarum<sup>(3)</sup>，此點顯示最近感染虱目魚之弧菌種類有所變動，不再以 Vibrio anguillarum 為主，此點同于 Callinan et al.<sup>(5)</sup> (1988) 之調查。

根據 1986 年新加坡海水魚蝦之細菌感染調查指出，主要以 Vibrio alginolyticus 及 Vibrio parahaemolyticus 為主<sup>(6)</sup>。1990 年調查指出台灣斑節蝦感染弧菌主要以 Vibrio metschnikovii 及 Vibrio alginolyticus 為主<sup>(7)</sup>；此外陳秀男等 (1988，尚未發表之資料) 調查泰國地區草蝦養殖場之疾病，發現主要弧菌依次為 V. anguillarum，V. parahemolyticus，V. alginolyticus，V. vulnificus，V. damsela，V. harveyi。而歷經長期水質污染、惡變，1976 年草蝦桿狀病毒症爆發，草蝦養殖事業一蹶不

振，草蝦養殖業者改養虱目魚，以維生計，量產過剩，導致1987～1989年虱目魚市價低迷。業者又紛紛於養殖區內試養草蝦（市售較高）及放養斑節蝦（不受草蝦桿狀病毒症影響），造成虱目魚養殖區內多樣化養殖。由此推定，養殖蝦池及廢養蝦池（草蝦養殖依然失敗）排放之池水可能污染虱目魚池入水渠道，間接污染虱目魚魚池，導致以上結果。

在研製 *V. anguillarum* 標準血清型抗血清方面，發現在做平板交叉凝集反應時，各血清型間彼此間有共同抗原存在，在大於2分鐘時，亦會引起凝集，因此凝集時間內判定，才能得到正確結果<sup>(7)</sup>。而各血清型之抗血清最高者為128 X，不似KITAO et. al<sup>(7)</sup>所述，最高者可達2048 X以上。究其原因，免疫血清之產生與抗原、免疫時間、免疫的方法、免疫的動物均有關連，本實驗僅最後兩次以靜脈注射免疫，而其完全以靜脈注射免疫為主，或許此為二者差異。由此可知，*V. anguillarum* 傳統血清製備仍以靜脈注射免疫為佳，但需慎防過敏性休克的發生。

虱目魚之疾病可能隨著養殖環境、混養種類、方式之不同而改變，但是有關紅斑病血清型之調查仍需長期監控。新種弧菌之感染亦應投入人力研究流行疫學之變化。而傳統血清於相近種類的細菌時常出現交叉反應，雖可以吸附法改善，增加血清之特異性，但同時會降低抗體之力價。而且傳統血清製造之再現性亦會因動物體不同而有差異。所以未來仍應以開發單源抗體作為診斷、研究工具為宜。

### 參 考 文 獻

1. 李武忠。1990。斑節蝦之弧菌症。國立台灣大學研究所。碩士論文。PP. 98。
2. 黃聲威。1988。水產品消費需求之探究。中國水產。424(4): 25-34。
3. 董明澄。1985。台灣虱目魚 *Vidrio anguillarum* 感染之研究。COA Fisheries Series No. 4, Fish Disease Research (VII), 27-370.
4. Austin, B., D.A. Austin. (1987). Identification of bacterial isolates In B Austin (ed), Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Great Britain, Ellis Horwood Limited, P. 317-322.
5. Callinan, R.B., Keep. J.A. (1989). Bacteriology and parasitology of red spot disease in sea mullet, *Mugil cephalus* L. Journal of Fish Disease. 12(4): 349-356.
6. Chew-Lin M, R. Shingh, T.M. Chao, and L. Cheong. (1986). Bacteria and viruses of marine fish and prawns farmed in Singapore. Sing. Vet. J. (10): 25-35.
7. Kitao, T., T. Aoki, M. Fukudome, et. al, (1983). Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. Jour. of Fish Dis. (6): 175-181.

**Isolation and Serotyping on Vibriosis in Cultured Milkfish,  
Chanos chanos in Taiwan**

Tu, Chien<sup>‡</sup>; C.D. Cheng<sup>‡</sup>, Y.H. Yang<sup>‡</sup>

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
2. Livestock Disease Control Center, Tainan City

SUMMARY

During the period from Jul. 1989 to Jun. 1990, 12 cases from cultured milkfish (Chanos chanos) were collected in Tainan city. 4 cases were due to poor-water-quality, 4 due to Vibrio alginolyticus, 3 due to Vibrio vulnificus, 1 due to Vibrio sp. Vibrio anguillarum was not isolated.

Conventional antisera against heat-stable somatic antigens of 6 typical serotypes (A,B,C,D,E and F) of Vibrio anguillarum were produced. On the basis of microplate cross—agglutination and slide cross-agglutination tests, there existed cross-agglutination reactions between type A and C, D and E. Monospecific antisera against homologous antigen were established by using the absorption method.

---

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Tamsui, Taiwan, R.O.C.  
2. Livestock Disease Control Center, Tainan City.