



RRPD89100097 (S.P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中成果報告

計畫名稱：傳染性胰臟壞死病毒致病機制與緊迫因子關係之研究
--傳染性胰臟壞死病毒與弧菌成分對石斑魚致病機制之交互作用 (2/3)

Interactions between infectious pancreatic necrosis virus and vibrio components on the pathogenesis of grouper (2/3)

計畫編號：NSC-89-2313-B-019-055

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：李國誥 教授

執行機構及單位名稱：國立臺灣海洋大學 水產養殖學系

一、中文摘要

本研究探討生物緊迫因子-弧菌-*Vibrio carchariae* Em182KL strain 之致病因子與傳染性胰臟壞死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 對石斑魚體致病機制之交互作用。本弧菌及同種分離自 summer flounder (from Rhode Island University, USA) 與紅鼓魚 (red drum, 本研究室) 之另外二株弧菌之細胞外產物 (extracellular products, ECP) 對石斑魚之致死性皆不強，其 LD₅₀ 約為 5.79-8.84 μ g/g fish 之間。經以各 ECP 致死性攻擊石斑魚後，可使魚重複出現如自然發病時所見之 (gastroenteritis)，但在12小時內死亡者未出現明顯症狀。此為首次發現本菌之細胞外產物對魚具致死性且可使魚再現腸水腫症。在使用 tryptic soya agar (TSA, +1.5% NaCl) 培養所產生之蛋白質分解酵素活性 (protease activity) 明顯低於同條件培養於培養於 modified seawater complete agar (MSWCA) plate 者。採用 MSWCA plate 培養分離自石斑魚菌株所獲取之細胞外產物再以疏水性層析管柱 (FPLC-hydrophobic interaction chromatography, FPLC-HIC; Pharmacia,

Sweden), RESOURCE Q 管柱及 Mono Q-column (Pharmacia) 進行純化，可得一 33 kDa 之蛋白質分解酵素。此蛋白分解酵素為 serine protease，因其活性可被 PMSF 所抑制。以 PMSF 可抑制 ECP (劑量為 15 μ g/g fish) 對石斑魚之致死性，因而確認本酵素為 *V. carchariae* 所分泌之主要毒素。將低於致死劑量之弧菌細胞外產物與 IPNV 混合後進行 IPNV 之感染試驗，由結果得知弧菌細胞外產物可增強 IPNV 對石斑魚之感染，先感染低劑量 IPNV 後可增強弧菌細胞外產物對石斑魚之致死性。

關鍵詞：傳染性胰臟壞死病毒、病原性、弧菌、致病機制、細胞外產物、石斑魚，serine 型蛋白分解酵素

Abstract

The present study investigated the interaction between virulence factors of biological stressor- *Vibrio carchariae* Em182KL strain and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on the pathogenesis of groupers (*Epinephelus* sp.). The lethality of

the extracellular products (ECP) obtained from grouper, summer flounder or red drum was low with LD₅₀ values of about 5.79-8.84 μ g/g fish. Gastroenteritis syndrome could be reproduced and observed in moribund groupers after lethal challenge of each ECP except those killed within first 12 h. This is a first report showing that intraperitoneal (i.p.) injection of the ECP is virulent and can reproduce gastroenteritis in the grouper. An apparently lower extracellular protease activity was obtained when the bacteria grew on tryptic soya agar (TSA, +1.5 % NaCl) plates compared to that grew on modified complete seawater agar (MSWCA) plates. A 33 kDa protease was purified from ECP of grouper strain by using various columns (hydrophobic interaction chromatography column, RESOURCE Q column and Mono-Q column) on Fast Protein Liquid Chromatography System (Pharmacia, Sweden). The protease was inhibited by PMSF and was then characterized as a serine protease. Since no mortality was observed in the grouper after i.p. injection with ECP (15 μ g protein/g fish) pre-incubated with PMSF, the protease was confirmed to be a major toxin secreted by *V. carchariae*. The combination of sub-lethal dose of the ECP with IPNV could enhance the infectivity of IPNV while the pre-infection with sublethal dose of IPNV could enhance the lethality of the ECP.

Keywords: Grouper, immunization, IPNV, Extracellular products, Pathogenicity, serine protease *Vibrio*, Virulence factors

二、緣由與目的

弧菌(*Vibrio species*)為廣泛存在於海水或半鹹水域的環境常在菌,但其中某些種類被認為是感染人類或水產動物的病原菌。因弧菌感染所引起的症狀皆稱弧菌症(vibriosis),此類病症曾發生於各種養殖魚蝦貝類如鮭鱒類、海水鯛類、黃鰭鮪、烏魚、河魨、海水鱸魚、鰻魚、香魚、鯊、虱目魚、石斑魚、海水養殖蝦類、文蛤、牡蠣及鮑魚等(1-9),造成重大損失。在國內養殖海水魚類常出現弧菌症(8),本病症亦為日本海水養殖魚類之重要疾病之一(7)。近年來,本研究室陸續自罹病養殖海水魚蝦貝類分離純培養出各種病原性弧菌,曾以分離自罹患腸水腫症狀石斑魚之弧菌 *Vibrio carchariae* 進行試驗,結果顯示其為造成腸水腫症狀之原因菌,且在較高的細菌劑量下才會造成石斑魚發病死亡(10)。本菌亦曾被分離自罹患腸水腫症狀海水養殖鯛類或紅鼓魚(red drum)之腎臟及腸水腫液且亦具病原性(李等,1999,2000及2001,未發表)。

傳染性胰臟壞死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)是養殖魚類重要病原體之一(11-16),被IPNV感染之魚體主要病徵為胰臟潰爛壞死、泄殖孔腫大及背鰭尾鰭潰爛。受感染存活者常會轉變為帶原者,本身雖未發病但卻會持續散佈病毒(11,12)。在國內及日本也常出現此種病毒對養殖魚類之感染(13-15),尤其在日本此類病毒曾出現於海水養殖魚類如鯽魚(yellow tail)、比目魚類及鯛類等(13,15),造成嚴重危害。

近年來,國內養殖海水魚類的產量及規模皆大為擴增,因此有必要針對弧菌及IPNV之防治進行基礎研究。由於在自然界中病毒與細菌等混合感染是很常見的例子,一般認為病毒可能為一次感染病原

體，而細菌為二次感染者。本研究室過去之研究成果已證明將 IPNV T42G strain 與弧菌 *V. carchariae* EmIKL82 分別以浸泡方式混合感染幼石斑苗或以注射方式混合感染幼石斑，皆能造成試驗魚罹病及死亡 (17)。另外，本弧菌在動物來源蛋白質性培養基中成長比在植物性來源者產生較高量的 serine protease，此可能與石斑魚為肉食性有關，而且可能是本菌感染後造成魚腸道水腫的重要原因 (18)。本計畫繼續探討此弧菌成分 (致病因子) 與 IPNV 對石斑魚體致病機制之交互作用。

三、結果與討論

弧菌 *Vibrio carchariae* EmI82KL、summer flounder 及 red drum strains 細胞外產物對石斑魚之半致死劑量約為 5.79-8.84 $\mu\text{g protein/g fish}$ ，經與另一石斑魚病原菌 *V. alginolyticus* 細胞外產物相比較則比較弱 (6)。在 tryptic soya agar (TSA, +1.5% NaCl) 於 28°C 經 48 小時培養所產生之蛋白質分解酵素活性 (protease activity) 明顯低於同條件培養於培養於 MSWCA agar plate 者，與過去的研究相似 (18)。另以自美國羅德島大學索取之造成 summer flounder 腸水腫症 (19) 及分離自紅鼓魚腸水腫症 (20) 之病原菌 *Vibrio carchariae* 所生產之細胞外產物亦有類似結果。此結果可能係與石斑魚、紅鼓魚及 summer flounder (比目魚類) 均為肉食性有關，而且可能是此類弧菌感染後造成魚腸道水腫的重要原因。

由本研究之結果，首次獲知各造成魚類腸水腫症菌株之細胞外產物在以致死劑量濃度攻擊後，可使石斑魚重複出現腸水腫症。

弧菌 - *Vibrio carchariae* EmI82KL strain 細胞外產物經以硫酸銨分割濃縮後，

以疏水性層析管柱 (Fast Protein Liquid Chromatography-hydrophobic interaction chromatography, FPLC-HIC; Pharmacia, Sweden) 進行部分純化可得以 67 及 33 kDa (SDS-PAGE 測定) 為主的蛋白分解酵素。再將此部份純化之酵素收集液經 RESOURCE Q 管柱及 Mono Q-column (Pharmacia) 進行純化，可得一 33 kDa 之蛋白質分解酵素。此蛋白分解酵素活性可被 PMSF 所抑制，應屬於 serine 型蛋白分解酵素 (serine protease)。由於高劑量 ECP (15 $\mu\text{g protein/g fish}$) 對石斑魚之致死性可被添加 PMSF 所抑制，本酵素應為 *V. carchariae* 所分泌之主要毒素。此蛋白分解酵素在海水魚類腸水腫症扮演的角色仍待進一步研究。

將低於致死劑量 (2 $\mu\text{g protein/g fish}$) 之弧菌細胞外產物與 IPNV 混合後進行 IPNV 之感染試驗，由結果得知弧菌細胞外產物可增強 IPNV 對石斑魚之致死性，而先感染 IPNV 後再給予較低劑量細胞外產物仍能造成魚之死亡，顯示 IPNV 的感染似乎弱化了魚體對細胞外產物毒性的中和能力，其機制則仍待進一步探討。

四、計畫成果自評

本研究已得知弧菌 *Vibrio carchariae* 各菌株細胞外產物對石斑魚之致死性不強，但似乎可增強 IPNV 之感染力，而 IPNV 的感染似乎弱化了魚體對細胞外產物毒性的中和能力。經與美國 summer flounder (19) 及本研究室新近分離自紅鼓魚腸水腫病原菌 *Vibrio carchariae* (20) 所生產之細胞外產物比較亦有低致死性之類似結果。本研究已純化出一 33 kDa 之 serine 型蛋白分解酵素物質，並證實其為 *V. carchariae* 之主要細胞外毒素。而且首次證實具病原性之各 *V. carchariae* 菌株細胞外產物在致死濃度下，可使石斑魚重複出現原先之腸水腫症。

四、參考文獻

1. Egidius, E., 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture*, 67: 15-28.
2. Ezura, Y., K. Tajima, M. Yoshimizu and T. Kimura, 1980. Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis. *Fish Pathol.*, 14: 167-179.
3. Brisinello, W., M. Doimi, G. Giorgetti and Sarti, 1985. Vaccination trials against vibriosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5: 55-56.
4. Rasheed, V.M., 1989. Diseases of cultured brown-spotted grouper *Epinephelus tauvina* and silvery black porgy *Acanthopagrus cuvieri* in Kuwait. *J. Aquat. Anim. Heal.*, 1:102-107.
5. Lightner, D.V., 1988. *Vibrio* disease of penaeid shrimp. In: *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, pp. 42-47. Edited by C.J. Sindermann and D.V. Lightner. Amsterdam: Elsevier.
6. Lee, K.K., 1995. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microb. Pathog.*, 19:39-48.
7. Kusuda, R. and F. Salati, 1993. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3:69-85.
8. Liao, I.C., K.K. Lee and Y.H. Chien, 1996. Practical approaches to marine fish health problems in Taiwan. In: Main, K.L. and C. Rosenfeld (eds). *Aquaculture health management strategies for marine fish in Asia and the United States*, pp. 57-67. Hawaii: The Oceanic Institute.
9. Anguiano-Beltran, C., R. Searcy-Bernal, and M.L. Lizarraga-Partida, 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Dis. Aquat. Org.*, 33: 119-122.
10. Yii, K.C., T. I. Yang, and K. K. Lee. 1997. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.*, 35: 109-115.
11. Mcknight, I.J. and R.J. Roberts, 1976. The pathology of IPNV. I. The sequential histopathology of naturally occurring conditions. *Br. Vet. F.*, 132: 76-86.
12. Wolf, K.(eds.), 1988. *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca.
13. Kimura, T. and M. Yoshimizu, 1991. Viral diseases of fish in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 67-82.
14. Chen, S.N., S.C. Chi, J.J. Guu, J.C. Chen and G.H. Kou, 1984. Pathogenicity of birnavirus isolated from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *COA Fish. Ser. No. 10, Fish Dis. Res.*, 6: 6-11.
15. Sorimachi, M. and T. Hara, 1985. Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.*, 19: 231-238.
16. Johansen, L.H. and A.I. Sommer, 1997. The interference of an IPN virus

infection with other viral and bacterial infections in Atlantic salmon post-smolts. Abstract P- 083, in VIII EAFP International Conference held in Edinburgh, Scotland, U.K., 14-19, September, 1997.

17. Lee, K.K., T.I. Yang, P.C. Liu, J.L. Wu and Y.L. Hsu, 1999. Dual challenge of infectious pancreatic necrosis virus and *Vibrio carchariae* in the grouper, *Epinephelus* spp. *Virus Res.*, 63: 131-134.
18. Lee, K.K., K.C. Yii, T.I. Yang, H.I. Hong and P.C. Liu, 1999. Protease and virulence of the extracellular products produced by *Vibrio carchariae* after growth on various media. *Z. Naturforsch.*, 54C: 383-386.
19. Soffientino, B., T. Gwaltney, D.R. Nelson, J.L. Specker, M. Mauel and M. Gomez-Chiarri, 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 201-210.
20. Lee, K.K., P.C. Liu and W.H. Chuang, 2001. Pathogenesis of gastroenteritis in cultured marine fish. Abstract S13, in International Marine Biotechnology Symposium held in Taipei, Taiwan, 12-13, April, 2001.