

公 開  
 密件、不公開

執行機構（計畫）識別碼：140202F104

## 行政院農業委員會 95 年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：952823

計畫名稱：箱網養殖海鱮巴斯德菌（*Photobacterium damsela* subsp *Piscicida*）疫苗研發（第 1 年/ 全程 3 年）

英文名稱：Development of bacterial vaccines for cage-cultured cobia

計畫編號：95 農科－14.2.2－漁－F1(4)

全程計畫期間：95 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

本年計畫期間：95 年 4 月 21 日至 95 年 12 月 31 日

計畫主持人：李國誥

執行機關：國立臺灣海洋大學水產養殖學系（所）

合作機關：無

# 目 錄

目 錄 .....	i
中文摘要 .....	ii
英文摘要 .....	iii
一、前言 .....	1
二、材料與方法 .....	2
三、結果 .....	6
四、結論 .....	8
五、討論與建議 .....	8
參考文獻 .....	10
附錄 (表) .....	13
附錄 (圖) .....	17

## 中文摘要

本研究以分離自罹病海鱸之病原菌巴斯德桿菌 *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (strain 9304) 及溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* (strain AL1) 對海鱸魚進行疫苗有效性之試驗研究。巴斯德桿菌調節鐵疫苗是分別以 FP、YEP 及 BHI 液態培養基添加 NaCl、O.salts、dipyridyl 及 glucose，混合以溶藻弧菌 BHIA 培養基添加 NaCl、O.salts、dipyridyl 及 glucose，以 Cellophane overlay Agar 方式生產調節鐵菌體及其細胞外產物，再以福馬林處理為不活化調節鐵菌苗及其細胞外產物。試驗分三種處理組，各種疫苗以腹腔注射處理海鱸魚苗 (10±1g)，每組注射 100 尾，追加接種於第四及八週各處理疫苗混合飼料以投餵方式追加一週。海鱸魚苗經疫苗處理後分別於四、八及十二週，進行活菌液攻擊試驗。第十二週結果顯示溶藻弧菌苗各組保護效果不錯，其活存率皆為 96% 以上。巴斯德桿菌苗在各組保護效果分別為 FP 組之活存率高達 96%，EP 組 84% 及 BHIA 組 64%。本年度試驗結果與往年比較，顯示試驗菌苗之保護效果已獲提昇。因此在疫苗研發過程中，經由不斷分離強致病力菌株及特殊培養基之研發對疫苗保護成效之提昇相當重要。

**關鍵詞：**細菌性疫苗、巴斯德桿菌、溶藻弧菌

## Abstract

Studies on the efficacy of vaccines were conducted in the cobia using pathogenic *Ph. damsela* ssp. *piscicida*... ( strain 9304 ) and *V. alginolyticus* ( strain AL1) originally isolated from moribund cage-cultured cobia. Bacterial cells and ECPs were obtained by growing the bacteria, Phdp 9304 and Val AL1 on YFP broth (adding NaCl, O.Salts, dipyrindyl and glucose) and BHIA-cellophane overlay agar (adding NaCl and dipyrindyl), respectively. Bacterial cells and ECPs were inactivated by 1 % and 3 % formalin, respectively. All the three vaccine preparations were intraperitoneally(i.p.) injected into cobia ( 10g ) with 250 fish in each treatment. After vaccination, the fish were boosted orally for one week at week 4 and 8. Fish of each treatment were lethally challenged with respective bacteria. The results of 12-week vaccination trials revealed that better efficacies were observed in treatments with bacterial cell of V.al AL1 ( 96% survival rate), bacterial cells of Phdp 9304: FP group ( 96% survival rate) ,EP group ( 84% survival rate). The present results showed better protection than those of previous year. Therefore, the continuous isolation of more virulent bacteria and manipulation of growth media are crucial to the development of better vaccines.

**Keywords:** Bacterial Vaccine , *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* ,  
*Vibrio alginolyticus*

## 一、前言

細菌性疾病廣泛發生於世界各地，是海水、半鹹水或淡水養殖魚蝦貝類最嚴重的疾病之一 (Egidius, E., 1987; Lightner, 1988; Austin and Austin, 1993; Hjeltnes and Roberts, 1993)。最近國內因海水魚蝦貝類養殖興起而致頻繁發生弧菌症 (Liu, 1990; Chen et al., 1992; Lee, 1995; Liu et al., 1996; Lee et al., 1996; Yii et al., 1997)，對產業發生嚴重影響。而巴斯德菌症 (Pasteurellosis) 最早出現於美國 Calveston Bay 野生的白鱸 (*Morone americana*) 和條紋鱸 (*Morone saxatilis*) (Snieszko et al., 1964)，此病症也在日本造成養殖青鮎鱈大量死亡 (Egusa, 1983)，其他養殖魚種如嘉鱻魚 (Yasunaga et al., 1983) 和黑鯛 (Ohnishi et al., 1982)。從此之後巴斯德菌症開始蔓延於地中海域的養殖及野生魚類，特別是在法國、義大利和西班牙等國尤其為嚴重 (Magarinos et al., 1992)。一般以使用藥物加以防治，但易發生細菌之抗藥性問題 (Aoki and Kitao, 1985; Austin and Austin, 1993; Hjeltnes and Roberts, 1993)。直至目前巴斯德菌症長期使用 ampicillin、tetracycline、oxytetracycline 等多種藥物治療該症，但已產生質體或抗藥性染色體密碼產生，以致許多藥物在治療巴斯德菌症無效 (Magarino et al., 1992; Nicolas et al., 1994)。挪威近年因成功地使用鮭魚疫苗，使藥物用量大幅降低 (Makestad and Grave, 1997)。歐洲許多國家已使用商業化的巴斯德菌疫苗預防海水魚感染此症 (Magarino et al., 1994, 1997)，但歐洲巴斯德菌株與本地菌株是否特性雷同，尚待進一步了解。海鱸為國內近年來之重要海水養殖魚種，目前受巴斯德菌感染而死亡相當嚴重，因此本研究針對養殖海鱸發生巴斯德菌症之疫苗開發進行試驗，俾供作未來疾病防治之參考。

## 二、材料與方法

### 菌株來源

本實驗所使用菌株分別為 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (strain 9304) 及 *Vibrio alginolyticus* (strain AL1)，為本實驗室於本校臨海生物教學實習場及本系溫室養殖海鱸，出現瀕死異狀，經採樣分離純化而得 (Liu *et al.*, 2004a; Liu *et al.*, 2003; 林, 2002)；而 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* strain 9304，為分離自東港外海小琉球箱網養殖海鱸，發生大量死亡狀況之瀕死海鱸，經採樣分離純化，並以 API 20 E、Biolog system 及 Bionor System 確認而得；標準菌株則採用 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* (BCRC 17065)。

### 菌株強化

將 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 及 *V. alginolyticus* 分別培養於 BHIA (+1.5% NaCl) 和 TSA (+1.5% NaCl) 培養基中，經 30 °C、24 小時培養連續活化 2 次後，以  $10^7$  cfu/g fish body weight 對海鱸進行腹腔注射，攻擊期間停止餵食，並在魚體瀕臨死亡之際由頭腎採菌，以 API 20 E、Biolog system 及 Bionor System 進行菌種的鑑定。

### 實驗魚苗

購自屏東佳冬養殖場的海鱸體重約 8 公克，蓄養於溫室 1 噸的循環過濾海水中，溫度控制在 25-27°C 間，蓄養及實驗期間以鱸魚配合飼料投餵。在實驗進行的前一天禁食，並於操作前先以 ethylene glycol monophenyl ether (Yakuri, Japan) 麻醉，以減少對魚體的緊迫。

### 菌株之毒性試驗 LD<sub>50</sub>

將 *Ph. subsp. piscicida* (strain 9304) 及 *V. alginolyticus* (strain C3) 菌體於不同培養基中經 28°C 培養 24 小時後，菌體收集以 PBS 在 3000 rpm 下連續離心清洗 3 次，分別配製不同濃度的菌體懸浮液分別為  $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、cfu/ml。每組濃度菌

液分別取 10 隻魚利用腹腔注射的方式將菌液注射至魚體內並蓄養於 2 呎的水族缸中，水溫 25~28°C，海水鹽度為 3.4%；對照組則注射相同劑量的 PBS，連續觀察 2 週並記錄死亡率以求得 LD<sub>50</sub>。死亡魚隻由頭腎採菌，經由 API 20 E 初步鑑定菌種，並剪下鰓絲鏡檢，進一步確認魚體死亡的原因。

### 培養基之製備

培養巴斯德桿菌以 BHIA、YFP 及 YEP 作為基礎培養基分測再添加 2% NaCl、0. salts、100 μM dipyrindyl 及 2% Glucose 等組合成培養基製備 (Garrote et al., 1992; Bakopoulos et al., 2002)。溶藻弧菌則以 BHIA 添加 2% NaCl 及 100 μM dipyrindyl 培養基製備。

### 菌苗之製備

將保存的菌株培養於 BHIA 添加 2,2-dipyrindyl (Sigma) 培養基中，並將其培養於 28°C 下 24 小時。將活化的巴斯德桿菌分別以 BHIB、YFP 及 YEP 作為基礎培養基再添加 2% NaCl、0. salts、100 μM dipyrindyl 及 2% Glucose 等組合成液態培養基培養，於 28°C 下培養 48 小時後收取菌液，以 15000 rpm、4°C 離心 1 小時後去除上清液，下層菌體細胞再以 PBS 析洗，再以 15000 rpm、4°C 離心 30 分鐘重複 3 次，即完成菌體的收集。溶藻弧菌以 BHIA 添加 1.5% NaCl 及 100 μM dipyrindyl 培養基以 cellophane-overlay 方式製備 (Liu, 1957; Lee and Ellis, 1990)，於 28°C 下培養 48 小時後收集得菌液於 15000 rpm、4°C 下離心 30 分鐘重複 3 次，即完成菌體的收集。製備菌苗以添加福馬林 1%，於室溫下靜置 72 小時使細胞不活化後，利用透析膜於 4°C 蒸餾水中透析 24 小時，期間換蒸餾水 3 次去除福馬林，即完成菌苗的製備。

### 細胞外產物的製備

事先將培養菌種的器具、鐵盤、玻璃紙 (cellophane) 及培養基利用高溫高壓滅菌，將培養基倒入鐵盤內，待培養基冷卻凝固後，再以 L 型玻璃棒沾少許的 PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.2, NaCl 8g/L, HPO<sub>4</sub> 1.15g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/L, KCl 0.2g/L) 將已滅菌的玻璃紙均勻鋪於培養基上 cellophane overlay technique (Liu, 1957; Lee and Ellis, 1990)。同時以吸取 5 ml 菌液到於鋪有已滅菌玻璃紙的培養基上，以 L 型玻璃棒均勻塗抹，用錫箔紙將鐵盤包

覆，於 30°C 下培養 48 小時後，再吸取 10 ml PBS 於培養基上，以 L 玻璃棒刮取菌體，將收集得菌液於 15000 rpm、4°C 下離心 1 小時，將上清液以 0.22  $\mu$ m 過濾膜過濾除菌，所得濾液即為細胞外產物 (extracellular products, ECP)。如需製備成抗原，則加入福馬林使其最終濃度為 3%，於室溫下靜置 24 小時使細胞不活化後，利用透析膜於 4°C 蒸餾水中透析 72 小時，期間可以換水 2~3 次，加速去除福馬林，即完成 ECP 抗原的製備。

### 蛋白質含量測定：

採用 Bradford method 作為測定蛋白量的方法。以牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 為標準蛋白量做標準曲線。取 25  $\mu$ l 的細胞外產物與 Bio-Rad Protein Assay Kit 1250  $\mu$ l 混合後靜置反應約 15 分鐘，用分光光度儀於 595 nm 波長下測量吸光值並與標準蛋白量做比較，以直線回歸的方法算出細胞外產物蛋白質的含量。

### 蛋白質分解酵素 (protease) 活性測定：

採用 hide powder azure digestibility assay 做測定。取 25 mg hide powder azure (HPA, Sigma) 於試管內，加入 100  $\mu$ l 之 ECP 及 2.4 ml PBS 並充分混合；空白組則以 PBS 取代 ECP。於 37°C 水浴下反應 15 分鐘，之後於每管中加入 2.5 ml 10% trichloroacetic acid (TCA) 終止反應，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液，利用分光光度儀於波長 600 nm 下測量吸光值，以吸光值 0.01 為 1 個單位。

### 磷脂質分解酵素 C 活性測定

酵素活性測定採用 Amplex Red Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Assay Kit，在 96 well 中，將 50  $\mu$ l 的樣本液加入 50  $\mu$ l (2 倍 Reaction Buffer)，混合均勻。負 control 則直接加入 100  $\mu$ l Reaction Buffer。正 control 則加入 100  $\mu$ l Phosphatidylcholine-specific phospholipase C 0.1U/ml (from *Bacillus cereus*)。在各組中加入 100  $\mu$ l 反應液，置於 37°C、30 分鐘後於 530-560 nm 波長下測吸光值，以吸光值 0.01 為 1 單位 (unit)。



## 磷脂質分解酵素 A<sub>2</sub> 活性測定

酵素活性測定採用 Phospholipase A<sub>2</sub> (secretory) Colorimetric Assay Kit (cayman), 在 96 well 中進行, 空白組中加入 10  $\mu$ l 的 DTNB(10mM)及 15  $\mu$ l 的 Assay Buffer(1 倍), control 組加入 10  $\mu$ l 的 DTNB (10mM)、5  $\mu$ l 的 Assay Buffer 及 10  $\mu$ l 的 Bee venom PLA<sub>2</sub>, sample 加入 10  $\mu$ l 的 DTNB (10mM)、5  $\mu$ l 的 Assay Buffer 及 10  $\mu$ l 的 sample, 各組再加入 200  $\mu$ l 的反應基質 (1.66mM) 於 414 (或 405) nm 波長下測吸光值, 以吸光值 0.01 為 1 單位 (unit)。

## 實驗處理組設計

本實驗共分為 3 組進行, 各組處理方式如下:

- A 組: BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YFP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油
- B 組: BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YEP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油
- C 組: BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 BHIA 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油
- D 組: 對照組 PBS: 與實驗組處理方式相同, 僅以 PBS 取代疫苗。

以上各處理組取 250 尾海鱸, 以腹腔注射的方式注入魚體 (每 10 公克魚隻注入 0.1 ml), 使最終進入魚體內的不活化菌體劑量為  $1 \times 10^8$  cfu/g fish body weight, 而細胞外產物則調成 500  $\mu$ g/ml。實驗期間分別蓄養在 1 噸 FRP 圓桶, 以循環方式養殖, 水溫控制在  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 每日投餵二次一般海鱸魚配合飼料, 於第三週起以相同處理組菌苗以魚油先乳化後在用飼料吸收後再吹風晾乾, 作為口服補強飼料來投餵, 以隔週餵食方式; 持續 12 週。

## 處理菌苗魚體攻擊試驗

各處理組分別在四、八、十二週任取 25 尾海鱸，分別以 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* strain 9304 或 *V. alginolyticus* strain C3 進行腹腔注射 2 倍 LD<sub>50</sub> 活菌量的攻擊實驗，觀察七天內發生的死亡情形並紀錄死亡率，並分離菌確認死亡原因。

## 三、結果

本研究以 2004 年 4 月分離自小琉球罹病大量死亡養殖海鱸魚 *Rachycentron cancadum* 具感染性之病原巴斯德桿菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (strain 9304) 及溶藻弧菌 *Vibrio. alginolyticus* (strain AL1) 對海鱸魚進行疫苗有效性之試驗。首先自 -70°C 冷凍庫活化菌株，於 BHIA(+1.5% NaCl) 培養 48 小時後，以 PBS 配成  $1 \times 10^5$  CFU/ml 懸浮液，以 0.1 ml 腹腔注射海鱸魚(魚體重 10 g)，經 7 日後將垂死之魚體，分離出強化的菌株，重複兩次強化後，再經 API 20E、Biolog GN、傳統方法及生化特性再度確認菌種為 *P. damsela* subsp. *Piscicida* 及 *V. alginolyticus* 後進行以下各項疫苗之製備。

巴斯德桿菌 *P. damsela* subsp. *piscicida* (strain 9304) 對海鱸魚苗進行菌體及細胞外產物攻擊試驗求取 LD<sub>50</sub>。菌體或細胞外產物以 PBS 配成不同濃度，以 0.1 ml 腹腔注射海鱸魚苗(10 g)，經 7 日觀察之後求取 LD<sub>50</sub> 分別為  $1.4 \times 10^5$  cfu/g fish、 $1.5 \mu\text{g protein/g fish}$ 。溶藻弧菌 *V. alginolyticus* (strain AL1) LD<sub>50</sub> 分別為  $2.1 \times 10^5$  cfu/g fish、 $6.32 \mu\text{g protein/g fish}$ 。

*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* 在各種不同培養基生產之 Protease、Phospholipase C、Phospholipase A<sub>2</sub> 及對海鱸魚苗(10g)腹腔注射攻擊試驗之 LD<sub>50</sub>，其結果如表一。九種配方中以 FP+2%NaCl+O.salts+100  $\mu\text{M}$  dipyrindyl+2%Glucose 所生產各項毒力有及對攻擊試驗之 LD<sub>50</sub> 致死性皆較強，其次為 FEP+2%NaCl+O.salts+100  $\mu\text{M}$  dipyrindyl+2%Glucose，BHIA+2%NaCl+O.salts+100  $\mu\text{M}$  dipyrindyl+2%Glucose 毒力及 LD<sub>50</sub> 均較前二種培養基配方弱。九種培養基配方中選擇此三種進疫苗保護效果試驗如表二。

海鱸魚苗經疫苗實驗處理後分別於四、八及十二週，先行測視活菌液致死劑量攻擊試驗。隨著實驗處理時間增加，魚體明顯增重數倍，以魚苗

( $11\pm 1g$ ) 致死菌量不足以使第八及十二週海鱸魚死亡，所以注射攻擊試驗之前，必需先用對照組海鱸魚先行注射了解致死劑量之後，再進行腹腔注射攻擊試驗，故隨魚體之成長致死菌量也隨著調整如表三。

第四週攻擊試驗結果：注射  $4\times 10^5$ cfu/g 魚體重溶藻弧菌菌懸液攻擊試驗結果：對照組在 7 日之內幾乎全死；各處理組活存率皆 100% (RPS 100) (如表四及六)。注射  $2\times 10^5$ cfu/g 魚體重巴斯德桿菌菌懸液攻擊試驗結果：對照組在 5 日之內幾乎全死；除 C 組：(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 BHIA 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)活存率為 92% (RPS 92)，其他各處理組皆為 100% (RPS 100) (如表五及七)。

第八週攻擊試驗結果：注射  $8\times 10^5$ cfu/g 魚體重溶藻弧菌菌懸液攻擊試驗結果：對照組在 7 日之內幾乎全死；各組活存率皆為 96% (RPS 96)，(如表四及六)。注射  $4\times 10^5$ cfu/g 魚體重巴斯德桿菌菌懸液攻擊試驗結果：對照組在 7 日之內幾乎全死；A 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YFP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 96% (RPS 96)；B 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YEP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 92% (RPS 92)；C 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 BHIA 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 72% (RPS 72) (如表五及七)。

第十二週攻擊試驗結果：注射  $1\times 10^6$ cfu/g 魚體重溶藻弧菌菌懸液攻擊試驗結果：對照組在 7 日之內幾乎全死；各組活存率皆為 96% (RPS 96)，(如表四及六)。注射  $8\times 10^5$ cfu/g 魚體重巴斯德桿菌菌懸液攻擊試驗結果：對照組在 7 日之內幾乎全死；A 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YFP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 96% (RPS 96)；B 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YEP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 84% (RPS 84)；C 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 BHIA 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 64% (RPS 64) (如表五及七)。

#### 四、結論

1. 溶藻弧菌苗經 12 週試驗結果，各組以不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物組對溶藻弧菌之保護效果最好活存率高達 96%(RPS 96)。
2. 巴斯德桿菌苗經 12 週試驗結果，A 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YFP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 96% (RPS 96) 保護效果最好；其次為 B 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YEP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 84% (RPS 84)；而 C 組(BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 BHIA 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油)其活存率為 64% (RPS 64) 保護效果較差些。

#### 五、討論與建議

本年度試驗結果與往年比較活存率較高且保護效果好，這可能與試驗巴斯德桿菌株致病力之間差異性，以及菌株用不同培養基製備出之疫苗所產生保護效果不同有關，過去也有類似的研究報告 (Bakopoulos et al.2003；Do Vale et al.2002；Magarinos et al.1996；Garrote et al.1992)。因此，在疫苗研發過程中，應不斷分離強致病力菌株以及進行之特殊培養之研發。

過去執行海鱸魚試驗疫苗結果顯示以不活化之細胞外產物組及不活化之菌體混合細胞外產物組保護效果最佳，本年度初步結果也是以不活化之菌體混合細胞外產物組保護效果最佳。近來地中海域的養殖及野生鱸魚，特別是在法國、義大利和西班牙等國感染巴斯德菌尤其為嚴重 (Magarinos et al.,1992)。目前歐洲所開發巴斯德菌症之疫苗也以不活化之菌體混合細胞外產物組保護效果最佳 (Bakopoulos et al.2003)，與本試驗結果相雷同。

一般認為浸泡方式較方便且不會對魚體造成緊迫 (stress) (Egidius and Andersen, 1979; Ellis, 1989)，但並非所有魚類疫苗及魚種皆適合用浸泡方式接種(Austin and Austin, 1993)。腹腔注射被認為是最有效的疫苗接種方法 (Ellis, 1988; Mitdlyng et al., 1996; Vinitnantharat et al., 1999)，且廣泛被應用於鮭鱒類，因此本研究亦包含注射方式。

在弧菌疫苗方面，以目前被研究最多的為 *V. anguillarum* 為例，依其 O-antigen (LPS 之 polysaccharide 部份) 可分成 10 種 sero-type (Toranzo et al., 1997)，本研究所使用之 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 試驗疫苗是否有類似之血清型問題，目前仍不清楚。Hjeltnes et al. (1989) 在以 *Vibrio salmonicida* 疫苗作有關給予路徑及追加免疫接種的研究中，認為劑量不足夠及單一劑可能使魚體之免疫反應低，保護效果維持時間短。由本研究結果得知，無論先前使用浸泡或注射方式給予疫苗，於第四週後作疫苗之口服補強應可加強及延長免疫保護效果。此一應用口服補強魚體免疫力之初步結果，應可增加使用疫苗的有效性，相當值得參考。

- 建議：(1) 由本年度執行初步成果得知以 BHIA 不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YFP 培養基製作不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油，其保護效果最好，可作為日後開發海鱸魚巴斯德桿菌和溶藻弧菌混合菌苗之參考配方。
- (2) 現場病源的篩選分離仍是重要工作，新的致病株除可提供作為疫苗製劑有效性之驗證外，並可用以配合製備更新的疫苗。

## 參考文獻

- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 49: 447-454.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1993. *Vibrionaceae* representatives. In : L.M. Laird (editors). *Bacterial Fish Pathogen*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 265-307.
- Against *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases* 26 : 77-90
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bakopoulos V., Volpatti D., Gusmani L., Galeotti M., Adams A. and Dimitriadis G.J., 2003. Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) ,
- Chen, S.N., Huang, S.L. and Kuo, G.H., 1992. Studies on the epizootiology and Pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan. In: *Diseases of cultured penaeids in Asia and the United States*. Oceanic Institute, Hawaii. pp.195-205.
- Do Vale A., A.E. Ellis and M.T. Silva, 2001. Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Dis. Aquat. Org.*, 44:237-240
- Do Vale A., B. Magarinos , J.L. Romalde, M.L. Lemos, A.E. Ellis and A.E. Toranzo, 2002 Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 48:109-115
- Garrote A., Bonet R., Merino S., Simon-Pujol M. D. and Congregado F., 1992 Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *MS. Micro. Lett.*, 95:127-132
- Egidius, E., 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67: 15-28.
- Egidius, E. C. and Andersen, K., 1979. Bath-Immunization- a practical and non-stressing method of vaccinating sea farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against vibriosis. *J. Fish Dis.* 2: 405-410.

- Ellis, A.E., 1988. General principle of fish vaccination. In: A.E. Ellis (editor). *Fish Vaccination*, Academic Press, London, pp. 539-550.
- Ellis, A.E., 1989. The immunology of teleosts. In: R.J. Roberts (editor). *Fish Pathology*, 2<sup>nd</sup> edition, Bailliere Tindall, London, pp. 135-152.
- Hirst, I.D. and Ellis, A.E., 1994. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol.* 4: 29-45.
- Hjeltnes, B. and Roberts, R.J., 1993. Vibriosis. In: V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage (editors). *Bacterial Diseases of Fish*, Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 109-121.
- Hjeltnes, B., Andersen, K. and Ellingsen, H.-M., 1989. Vaccination against *Vibrio salmonicida*. The effect of different routes of administration and revaccination. *Aquaculture* 83: 1-6.
- Lee, K.K., 1995. Pathogenesis studies of *Vibrio alginolyticus* in the groupers *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microb. Pathog.* 19: 39-48.
- Lee, K.K. and Ellis, A.E., 1990. Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172: 5382-5393.
- Lee, K.K., Yu, S.R., Chen, F.R., Yang, T.I. and Liu, P.C., 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tigerprawn, *Penaeus monodon*. *Curr. Microbiol.* 32: 229-231.
- Lightner, D.V., 1988. Vibrio disease of penaeid shrimp. In: C.J. Sinderman and D.V. Lightner (editors). *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture and Fisheries Science*, Vol 6, Elsevier, Amsterdam, pp. 42-47.
- Liu, C.-I., 1990. The diseases of cultured *Penaeus monodon* with emphasis on recent discoveries in Taiwan. *Proceedings of ROC-Japan Symposium on Fish Diseases*, Taipei, Taiwan, 1989, pp. 180-201.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H. and Chen, S.N., 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 33: 129-132.

- Magariños, B., Noya M., Romalde, J. L., Perez G., Toranzo, A. E., 1994. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Annu. Rev. Fish Pathol.* 14 : 120-122
- Magarinos B., Bonet R., Martinez M. J., Congregado F. and Toranzo A. E., 1996. Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella Piscida* for fish. *Micro. Pathol.*, 21: 289-297.
- Markestad, A. and Grave, K., 1997. Reduction of antibacterial drug use in Norwegian fish farming due to vaccination. *Dev. Biol. Stand.* 90: 365-369.
- Midtlyng, P.J., Reitan, L.J., Lillehaug, A. and Ramstad, A., 1996. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 599-613.
- Ohnishi, K., Watanabe, K. and Jo, Y., 1982. *Pasteurella* infection in young black seabream. *Fish Pathol.*, 16: 207-210.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E. and Boone, J. G., 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, 88: 1814-1815.
- Toranzo, A.E., Santos, Y. and Barja, J.L., 1997. Immunization with bacterial antigens: Vibrinfections. *Dev. Biol. Stand.* 90: 93-105.
- Vinitnantharat, S., Gravningen, K. and Greger, E., 1993. Fish vaccines. *Adv. Vet. Med.* 41: 539-550
- Westphal, O. and Jann, K., 1965. Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further application of the procedure. *Meth. Carb. Chem.* 5: 83-91.
- Yasunaga, N., Hatai, K. and Tsukahara, J., 1983. *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red seabream. *Fish Pathol.*, 3: 43-45.
- Yii, K.C., Yang, T.I. and Lee, K.K., 1997. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.* 35: 109-115.



附錄 (表)

表一、*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* 在各種不同培養基生產之 Protease、Phospholipase C(PLC)、PLA<sub>2</sub>: Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)及對海鱸魚苗(10g)腹腔注射攻擊試驗之 LD<sub>50</sub>

Media	蛋白量 (mg/ml)	Protease (Unit/mg)	PLC (Unit/mg)	PLA <sub>2</sub> (Unit/mg)	LD <sub>50</sub> (ug/g BW)	LD <sub>50</sub> (10 <sup>4</sup> CFU/g BW)
<b>BHIA + 2%NaCl+O.salts</b>	<b>1626</b>	<b>75</b>	<b>383</b>	<b>58</b>	<b>1.5</b>	<b>14</b>
BHIA + 2%NaCl + O.salts + 100 μ M dipyrityl	1251	25	169	36	1.36	8.3
<b>BHIA + 2%NaCl + O.salts + 100 μ M dipyrityl + 2% Glucose</b>	<b>980</b>	<b>180</b>	<b>160</b>	<b>33</b>	<b>1.22</b>	<b>6.2</b>
YEP + 2%NaCl + O.salts	344	93	409	66	1.38	7.6
YEP + 2%NaCl + O.salts + 100 μ M dipyrityl	431	344	339	56	1.04	3.5
<b>YEP + 2%NaCl + O.salts + 100 μ M dipyrityl + 2 % Glucose</b>	<b>228</b>	<b>335</b>	<b>719</b>	<b>90</b>	<b>0.84</b>	<b>2.4</b>
FP + 2%NaCl + O.salts	423	347	349	52	1.15	6.7
FP + 2%NaCl + O.salts + 100 μ M dipyrityl	480	202	300	55	0.92	3.3
<b>FP + 2%NaCl + O.salts + 100 μ M dipyrityl + 2% Glucose</b>	<b>263</b>	<b>405</b>	<b>745</b>	<b>83</b>	<b>0.72</b>	<b>1.4</b>

表二、各疫苗處理組及對照組

組別	處理組
A	不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YFP 培養基製作 不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油
B	不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 YEP 培養基製作 不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油
C	不活化溶藻弧菌調解鐵菌苗及其細胞外產物混合以 BHIA 培養基製作 不活化巴斯德桿菌調解鐵菌苗及其細胞外產物添加佐劑沙拉油
D	對照組 PBS

表三、各階段（週）進行攻擊之菌量

(cfu/g fish body weight)

週別	Pdsp	Val
4	$2 \times 10^5$	$4 \times 10^5$
8	$4 \times 10^5$	$8 \times 10^5$
12	$8 \times 10^5$	$1 \times 10^6$

Pdsp : *Photobacterium damsela* subsp.

*piscicida* (strain 9304)

Val : *Vibrio alginolytic* (strain AL1)

表四、各處理組攻擊溶藻弧菌實驗

存活率 (%) 結果

週別	A	B	C	D
4	100	100	100	0
8	96	96	96	0
12	96	96	96	0

表五、各處理組攻擊巴斯德桿菌實驗

存活率 (%) 結果

週別	A	B	C	D
4	100	100	92	0
8	96	92	72	0
12	96	84	64	0

表六、各處理組攻擊溶藻弧菌實驗

之相對活存率 RPS

週別	A	B	C	D
4	100	100	100	0
8	96	96	96	0
12	96	96-	96	0

表七、各處理組之攻擊巴斯德桿菌

實驗相對活存率 RPS

週別	A	B	C	D
4	100	100	92	0
8	96	92	72	0
12	96	84	64	0

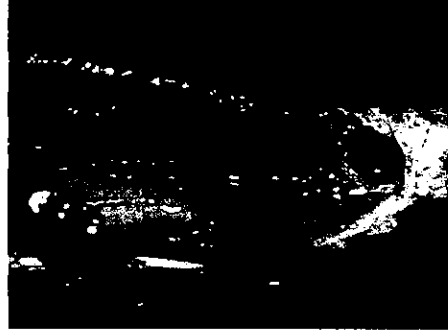
RPS : Relative percentage of survival

$$RPS = 1 - \left( \frac{\% \text{ mortality in vaccinated group}}{\% \text{ mortality in control group}} \right)$$

## 附錄 (圖)



圖一a. 健康之海鱷



圖一b. 經由巴斯德桿菌(*Photobacterium damsela* sudsp. *piscicida*)攻擊注射之瀕死海鱷



圖二a. 健康之海鱷



圖二b. 經注射疫苗後, 利用巴斯德桿菌(*Photobacterium damsela* sudsp. *piscicida*)攻擊注射之瀕死海鱷