

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：150201F101

行政院農業委員會漁業署九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**重要養殖種類無特定病原(SPF)水產種苗之生產技術之開發與應用(1)** (第1年/全程1年)

(英文名稱) **Development and application of production technologies in specific-pathogen-free fish seeds for important aquaculture species (1)**

計畫編號：**97農科-15.2.1-漁-F1(1)**

全程計畫期間：**97年7月1日至97年12月31日**

本年計畫期間：**97年7月1日至97年12月31日**

計畫主持人：**李國誥**

執行機關：**國立台灣海洋大學**



目 錄

目 錄	-----	<i>i</i>
中文摘要	-----	<i>ii</i>
英文摘要	-----	<i>iii</i>
前 言	-----	1
材料方法	-----	3
結果與討論	-----	5
結 論	-----	8
成果自評	-----	9
參考文獻	-----	9
附 錄	-----	14

摘要

針對不同來源與培育階段點帶石斑 (*Epinephelus coioides*)、馬拉巴石斑 (*E. malabaricus*)與金錢斑 (*E. tukula*)等人工培育石斑種類與個體，進行個體與養殖環境之流行病學調查。藉由外部觀察、組織學採樣與快速鑑定套組，初步結果除確認主要菌相組成以弧菌 (*Vibrio* spp.) 為主，且由溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、鮫弧菌 (*V. carchariae*)及嗜水性氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 為主的細菌性病原。

分別將造成石斑養成個體出現眼睛白濁、腸水及體表潰瘍之溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus* strain S4Y)與兩株鮫弧菌 (*V. carchariae* strain VCG與strain VCS)，分別以培養基生產大量菌體後以福馬林失活處理，調整為 10^{12} CFU/ml後對蛋雞進行免疫注射試驗，隨後測定卵黃中特定抗原Ig Y力價。採集之免疫雞蛋之蛋黃Ig Y力價平均可達 4.0×10^2 。

以疫苗注射進行主動免疫試驗部分，初步結果顯示全菌與ECP疫苗對於接種石斑魚苗於病原菌株攻擊後之保護效果，於攻擊試驗後之7及14日分別產生100, 100, 100及50%的保護效果，顯示全菌疫苗具有較佳之保護效果。將蛋雞經免疫注射生產之免疫卵黃球蛋白 (immunoglobulin)，以不同比例或混入1% glucan添加於飼料對石斑幼魚進行投餵，隨後分別以病原菌株進行浸泡或攻擊試驗，初步結果發現除於*Vibrio alginolyticus* strain S4Y組添加降低至25%外，其餘各組皆有提升現象，顯示飼料中添加特異性免疫卵黃粉末並以經口投餵方式給予，確實對於石斑魚苗再對抗病原攻擊時，具有明顯提升活存率之效果。以卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原腹腔注射攻擊試驗之保護效果評估發現在*Vibrio carchariae* strain VCS及VCG兩處理組，皆以同時添加2%免疫卵黃粉末及1% glucan具較佳保護效果，但在*Vibrio alginolyticus* strain S4Y組，不論單純添加2%免疫卵黃粉末或另行添加1% glucan，與商業飼料相較，則未能發揮保護效果。

Abstract

Epidemiological survey bacterial flora on individual grouper, *Epinephelus coioides*, *E. malabaricus* and *E.tukula*, and in respective environment at different raising stage was conducted. *Vibrio* species were confirmed to be the dominant bacteria by external observation histological examination and biochemical test (kits) with *Vibrio alginolyticus*, *V.carchariae* and *Aeromonas hydrophila* as the three major species.

Bacterial cells of *Vibrio alginolyticus* strain S4y (causing opaque eyes in groupers), *V.carchariae* strains VCG and VCS (causing gastroenteritis and ulcer in groupers) were obtained after grouping on TSA (+2% NaCl), separately, then formalized for further immunization in hens at a does of 10^{12} CFU/ml. The immunized eggs were collected and its antibody (yolk IgY) titers were determined to be 4.0×10^2 .

For active immunization, the results revealed that groupers injected with formalized bacterial cells exhibited better protection than injected with formalized extracellular products. The addition of immunized yolk IgY in diet for grouper was found to be protective after bacterial challenge. The intraperitoneal(i.p.) injection of 1% glucan combined with 2% IgY against *V. carchariae* strains VCG or VCS in separate group groupers exhibited protection after respective bacterial challenge. However, no apparent protection was found in groupers i.p. injected with 1% glucan combined with 2% IgY against *V.alginolyticus* strain S4y after bacterial challenge.

前 言

弧菌 (*Vibrio species*)廣泛存在於水域環境，且以海水與半淡鹹水環境為主，在許多流行病學調查與菌向組成分析中，除發現弧菌為沿岸環境之優勢組成種類，同時其所具有在種類、生理及生化代謝上之多樣性，也讓諸如 *Vibrio alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. carchariae*、*V. cholerae*、*V. harveyi*、*V. parahaemolyticus*、*V. salmonicida*及*V. vulnificu* 等菌株，造成養殖生物嚴重感染，並引發大規模傳播與死亡，造成產業嚴重損失 (Austin and Austin, 1993; Egidius, 1987; Liu *et al.*, 2000; Saulnier *et al.*, 2000)；具致病機制及毒力之菌株，除引發世界各地海洋軟硬骨魚類、甲殼類與軟體生物感染疾病，造成養殖產業嚴重損失外，部份具共通感染特性病原性弧菌菌株，甚至影響公眾衛生健康 (Lee *et al.*, 1996a, b; 2003)。受病原性弧菌染之弧菌症 (vibriosis)，儼然成為半淡鹹水與海水養殖生物之主要細菌性疾病。為有效杜絕相關菌株傳播與感染，並建立安全穩定之飼養環境，病原性弧菌之感染路徑、制病機制與相關防治管理，遂成為重要之研究方向。

泛稱為石斑之鱸形目硬骨魚類為鮨科 (*Serranidae*)、石斑亞科 (*Epinephelinae*)、石斑屬 (*Epinephelus*)的暖水性種類，不但廣泛分布於世界暖水及熱帶海域，且具約莫400種之多樣性組成，由於成長快速與風味鮮美，因此除本地固定養殖種類外，近年亦多有新種類之繁養殖技術發展。由於國內繁養殖技術與相關產業的進步及發展，使得各種高經濟海水魚類的完全養殖付諸實現，其中分別由 *Cromileptes* 屬、*Epinephelus* 屬及 *Plectropomus* 屬所組成各種類之石斑，因外型搶眼與肉質鮮美，故成為臺灣海水魚類中最重要養殖對象之一；近年之年產量達一萬二千噸，約佔全世界養殖石斑魚年產量之泰半 (臺灣漁業年報，2002及2003)。

近年來石斑種苗培育與養成遭受病毒與細菌性病原之嚴重感染危害，除造成魚苗供應失衡外，大規模之死亡也影響產業發展。台灣每年6-8月均傳出石斑魚苗重大死亡疫情，且在近年有愈演愈烈趨勢 (Chi *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2001a, b)；

造成主要感染病原在病毒部份為神經壞死病毒 (NNV)、GIV (Lai *et al.*, 2000; Murali *et al.*, 2002)及虹彩病毒 (iridovirus) (Chou *et al.*, 1994, 1998)，而細菌性病原則為多種類之弧菌，其餘尚包括體內外之寄生性原生動物等。

近年來本研究室持續自國內之罹病養殖石斑魚、黑鯛、黃鰭鯛、海鱸、烏魚、虱目魚、七星鱸、紅鼓魚、草蝦、斑節蝦、白蝦及九孔鮑等多種養殖魚介類分離鑑定各種感染性弧菌- *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 等，其中以 *V. alginolyticus*, *V. carchariae* 及 *V. harveyi* 為較常被分離之病原弧菌，並在魚介類細菌性病原之致病性方面進行一定程度研究探討 (Lee, 1995; Lee *et al.*, 1997, 1999, 2001, 2002; Chen *et al.*, 2000; Liu and Lee, 1999; Liu *et al.*, 1997;2001; Yii *et al.*, 1997)，對本地養殖產業之流行病學現況與病原致病機制上累積豐富經驗。

受食品安全、環境保護與藥物管理限制，以往普遍施用於養殖環境中之各式化學添加劑與抗生素藥物，逐漸被以魚類免疫為基礎之主動與被動免疫替代。因此以失活菌體為抗原應用之死毒疫苗 (Ellis *et al.*, 1997; Midtlyng *et al.*, 1997)、減毒疫苗 (Benmansour *et al.*, 1997)或DNA 疫苗 (Lorenzen *et al.*, 1993)技術不但持續發展，且以廣泛應用於溫帶地區之鮭鱒類養殖，成為對抗養殖魚類疾病之成功商品 (Ellis, 1988; Austin and Austin, 1999; Gudding *et al.*, 1999)；且藉由使用不同種類佐劑與添加免疫激活物 (Immunostimulator)，也確實可有效增進生物免疫能力 (Kanellos *et al.*, 1999; Halassy *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2004)。

由過去在鳥類與哺乳類的研究文獻中，得知母體內的抗體可分別藉由卵黃及胎盤轉移至子代的體內，而使得子代具有抗體達到免疫保護效果 (Sooter *et al.*, 1950; Brambell *et al.*, 1951)。但是由於魚類的魚苗自孵化前後即活存於充斥著病原體之水體中，來自母體之免疫球蛋白之保護力價有限 (Manning *et al.*, 1982)，因此魚苗要達到保護的效果，則必須建立更具特別保護的機制，以加強魚苗對外在病原體之抗性。因此相關試驗擬針對建立以蛋雞 (hens)經免疫接種後，生產具特異免疫抗體球蛋白 (specific antibody immuneoglobulin, IgY)之卵黃粉末，並分

別以主動與被動免疫途徑，探討藉由投餵添加探討其做為提升石斑魚苗培育初期對於抵抗病原性弧菌感染之可行性，並供作日後發展相關技術之重要參考。

材料方法

一、石斑繫養殖環境之流行病學調查

分別於臺灣南部台南、高雄與屏東等地，於主要石斑繫養殖地區，針對之不同環境、飼養對象及不同培育階段之魚體、養殖水體與投餵用生餌，進行相關微生物相採樣、培養與分離鑑定；同時對爆發疫情案例，持續進行流行病學監測。

分別以TSA (tryptic soy agar, +2.5% NaCl, Difco), Marine agar (Zobell 2216E agar, Difco)及TCBS (thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, Difco)等固態培養基，對爆發大規模死亡之魚苗培養階段與出現明顯病灶之養成個體，進行均質厚定量塗布與採樣劃菌分離；除可作為菌量差異比較參考，同時可藉由後續之傳統生理生化與微生物商業快速套組API 20E及Biolog GN/GP等操作，對相關分離病原與微生物相組成進行鑑定。病毒篩檢與鑑定，則以臺灣大學齊肖其老師提供之快速鑑定套組，與經設計之特定引子對，並利用巢氏PCR技術加以重覆確認。

二、病原性弧菌菌株活化、鑑定與保存

將本實驗室保存於-80°C，分別分離自本地養殖環境並造成石斑大規模感染與罹病之溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)與鮫弧菌 (*V. carchariae*)病原菌株，分別以TSA, TSB及BHIA (BHIA+2% NaCl) agar活化培養。菌株分別以傳統生理生化特性搭配商業快速鑑定套組進行鑑定，並以特定片段之Primer進行種類確認與親緣性分析。相關分離病原除供作建立本地石斑魚繫養殖環境之背景資料，同時亦可作為疫苗發展之抗原選擇參考。

三、病原性菌株之菌體與細胞外產物大量製備

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)與鮫弧菌 (*V. carchariae*)分別以TSA (+2.5% NaCl)及BHIA - Cellophane agar overlay方式，生產所需弧菌菌體及其細胞外產物 (extracellular products, ECP)，溶藻弧菌與鮫弧菌分別以26及28°C培養16及24小時後，以滅菌PBS收集於半透膜上生長之菌膜，隨後以離心方式分離菌體及細胞外產物。菌體經滅菌PBS重複清洗3次後充份除去細胞外產物，連續10倍稀釋菌懸液以特定波長測定其吸光值並換算濃度；細胞外產物則以Coomassie Brilliant Blue G-250 Method測定並換算濃度。分別取不同濃度之菌體與細胞外產物，添加3% (v/v)福馬林進行不活化處理，72小時後以DDW重複透析，將此不活化之菌體及細胞外產物供作後續疫苗施打之抗原及預備試驗使用。

四、不活化全菌疫苗之量產製備

經TSA (+2.5% NaCl)及BHIA- Cellophane agar overlay方式生產培養之菌體與細胞外產物，分別以1%及3% (v/v)福馬林處理，三日後於蒸餾水中透析備用，作為大量疫苗製備用途。試驗設計係將不活化全菌疫苗分別對石斑幼魚與蛋雞進行免疫接種；前者作為不活化菌體與全菌疫苗，施用於石斑魚苗養殖現場進行保護效果評估，後者則在對蛋雞 (hens)進行免疫注射後，收集其雞蛋並由蛋黃中初步純化免疫球蛋白 (immunoglobulin yolk, IgY)，供作後續由投餵路徑對石斑魚苗進行免疫保護效果評估。

五、特定抗原之雞蛋抗體製備與工廠化量產

(1) 特定抗原之雞蛋抗體製備：

將自養殖現場分離並對石斑具病原性之菌株，經滅毒或失活處理，處理步驟如先前說明。於配合雞場對蛋雞進行工廠化之定量注射，藉由接受注射後之雞隻產生特定抗體，大量生產具特定抗體卵黃IgY之雞蛋。

(2) 特異性卵黃免疫球蛋白力價測試

將試驗用之抗原 (*Vibrio alginolyticus* 及 *V. carchariae*) 蛋白量以 PBS 調整至 20 μ g/ml，取 100 μ l 添加於 96 well 盤，以 parafilm 密封後於 37 $^{\circ}$ C 下靜置 2 小時後，充分甩除多餘菌液，並加入 1% 脫脂奶粉 200 μ l 1%，靜置反應。30 分鐘後移除脫脂奶粉，PBST 清洗 3-6 次 (最後一次放 5 分鐘後再甩掉)。隨後加入一抗 100 μ l，進行 10 倍連續稀釋 (10^{-1} - 10^{-8}) (37 $^{\circ}$ C, 2hrs)，依序加入以 PBS 稀釋 0.5×10^4 之市售二抗 (anti-rabbit IgG AP conjugate)，(37 $^{\circ}$ C, 1hr)，重複以 PBST 清洗，並加入呈色劑 (enzyme substrate) OPD 100 μ l (需避光)，室溫下反應 15-30 分鐘，最後加入 100 μ l 終止劑 (HCl)，並以 ELISA reader 在 595nm 下測得吸光值

(3) 魚苗投餵試驗及成效追蹤：

分別於試驗單位及養殖現場，將取自雞蛋蛋黃，並具有特異性抗體 (specific antibody) 之卵黃免疫球蛋白 (Immunoglobulin yolk, IgY)，依不同比例混入飼料中，對不同培育階段之石斑魚苗進行連續投餵。實驗組別分別為投餵飼料添加 1%、2% 蛋粉、福馬林不活化 ECP 疫苗、福馬林不活化全菌疫苗及投餵普通配合飼料之 Control 組共五組。含 1% 及 2% 卵黃免疫球蛋白之配方飼料，係將蛋粉依比例秤重後溶於蒸餾水與大豆油 (飼料重 2%) 中，隨後平均噴灑至商業性顆粒狀石斑魚苗飼料表面，並於室溫下風乾 24hrs 後，置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存備用。試驗進行中每日投餵 4 次，總投餵量為試驗組魚隻體重之 5%。除估計現場操作之便利性、魚苗攝食狀態、活存與對成長之影響，並對實際應用於養殖現場之效果，與業者相互配合，並將免疫處理與未處理之魚苗進行成長、罹病率與育成率進行比較，探討以蛋粉混合投餵之成效評估。

(4) 接種石斑之免疫力評估：

針對試驗場所與養殖現場，對接受不同比例之特定抗體免疫球蛋白Y (IgY) 投餵之石斑魚苗，分別於固定時間進行抽血及相關免疫器官與組織採樣，並進行免疫力分析。藉由特異性之抗原抗體反應，或非特異性之白血球吞噬作用、化學發光及SOD等測定，作為現場施用商業化疫苗之品管檢驗(QC)。

(4) 保護效果試驗與後續成效追蹤：

於不同養殖階段，隨機自現場對接受不同特定抗體免疫球蛋白Y (IgY) 投餵之石斑魚苗進行採樣，並依據體型大小差異，以溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 及鮫弧菌 (*V. carchariae*) 分別進行浸泡及注射攻擊試驗，藉由相對活存率 (RPS)，探討商業化單價與多價疫苗保護效果，並評估對產業之助益。

六、疫苗注射與口服IgY免疫蛋黃保護效果評估試驗

對不同培育階段之石斑魚苗與吋苗階段幼魚，分別進行疫苗浸泡與注射接種，或以口服方式使魚苗接受IgY免疫蛋黃。隨後以特定病原溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 及鮫弧菌 (*V. carchariae*) 進行攻擊試驗，探討菌苗接種與口服IgY免疫蛋黃之保護效果差異，作為日後生產無特定病原 (SPF) 及石斑種苗生產培養模式 (SOP) 參考。

結果與討論

一、石斑繁養殖環境之流行病學調查

近年來石斑種苗培育與養成遭受病毒與細菌性病原之嚴重感染危害，除造成魚苗供應失衡外，大規模之死亡也影響產業發展 (Chi *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2001a,b)；其中造成主要感染病原在病毒部份為神經壞死病毒 (NNV)、GIV (Lai *et al.*, 2000; Murali *et al.*, 2002) 及虹彩病毒 (iridovirus) (Chou *et al.*, 1994, 1998)，而細菌性病原則為多種類之弧菌 (Lee, 1995; Lee *et al.*, 2002)，其餘尚包括體內外之寄生性原生動物等。

分別針對不同飼養環境下各成長階段之石斑 (*Epinephelus* spp.) 魚苗與亞成魚，進行流行病學調查；同時自具明顯病灶、垂死或爆發大規模感染與死亡之石斑，進行病原分離培養與種類鑑定；相關結果如Table 1.所示。調查發現石斑吋苗階段極易因為遭受神經壞死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 感染而爆發大規模死亡，且藉由特定引子對之PCR快速鑑定技術，往往亦可在吋苗至2吋苗垂死魚體之相關組織中，檢測出虹彩病毒 (iridovirus) 陽性反應；此外分別對受精卵與魚苗培育初期投餵用橈角類餌料生物中，亦可檢測神經壞死病毒存在。相關結果顯示神經壞死病毒與虹彩病毒為石斑幼魚培育過程之主要限制因子。

石斑於培育過程環境水體中菌相以多種類之弧菌 (*Vibrio* spp.) 佔主要菌相中之優勢組成；其中尤以具滑走特性之溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 與鮫弧菌 (*V. carchariae*) 最常檢出，同時對石斑具致病性，並多分別造成魚體出現矇眼、腹水、

體表潰瘍及出血；而近來則能由背鰭與尾鰭末端出現糜爛，或體表出現明顯外傷之病灶處，分離具明顯溶血特性及蛋白分解酵素活性之嗜水性氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。另常見對養殖石斑造成寄生性感染之病原，則包括引發海水白點症之 *Cryptocaryon irritans*，以及大量寄生於體表黏膜與眼球周圍的 *Neobenedenia* sp. 為主 (Table 1)。

二、不活化全菌疫苗製備與保護效果測試

在水產養殖生物感染疾病時，一般多以投用藥物加以防治，但頻繁且持續之投藥，除造成養殖成本增加外，同時亦容易導致環境污染及生態衝擊，甚至易使細菌產生抗藥性等問題 (Aoki and Kitao, 1985; Austin and Austin, 1993; Hjeltnes and Roberts, 1993)。因此在藥物使用存在諸多成本支出與危害隱憂下，直接利用抗原抗體專一性之主動免疫與被動免疫，遂成為今日應用於飼養生物健康管理與疾病防治之新思維。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)，歐洲許多國家亦普遍使用商業化疫苗預防養殖海水魚相關感染症狀 (Magariños et al., 1992; 1994)。臺灣具有發展水產種苗之實力與潛力，然卻因為地處亞熱帶環境與養殖對象之多樣性組成，因此除以疫苗處理養殖魚類技術仍處啟蒙階段外，同時相關技術也尚待發展。

本試驗分別將分離自養殖石斑，並造成罹病魚體出現矇眼、低水溫期體表潰瘍與消化道積水之溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 及鮫弧菌 (*Vibrio carchariae*) 病原菌株，以 Cellophane agar overlay 方式生產所需弧菌菌體及其細胞外產物 (extracellular products, ECP)，隨後經福馬林失活處理製成抗原，除對石斑吋苗分別進行以注射及浸泡為主之疫苗接種，同時在追加處理後以病原菌進行攻擊試驗，以探討其保護效果。

Table 2. 顯示全菌與 ECP 疫苗對於接種石斑魚苗於病原菌株攻擊後之保護效果差異。結果顯示分別以經福馬林不活化處理之病原性弧菌菌株全菌及其細胞外產物作為抗原，對石斑吋苗進行疫苗接種與主動免疫，於攻擊試驗後之 7 及 14 日分別產生 100, 100, 100 及 50% 的保護效果，顯示全菌疫苗具有較佳之保護效果。

三、特定抗原之雞蛋抗體製備與被動免疫反應之可行性評估

過去報告曾指出，利用經免疫接種之蛋雞其產生之卵黃中具有遺傳自母體且具特异性之卵黃免疫球蛋白 (immunoglobulin yolk, IgY)，且因性質穩定並可對抗生物消化道內因子，故可藉由投餵路徑給予，促使生物產生被動免疫 (Gutierrez et al., 1993)；此外藉由抗原-抗體反應之敏感性與專一性，以蛋雞經免疫接種並收集卵黃純化具抗原特异性 IgY 之生產技術及其應用，也在對生物進行被動免疫試驗外，同時發展成為對特定病原之診斷與偵測技術 (Young et al., 2007)。

本試驗係將分離自養殖石斑並造成罹病魚體出現矇眼、低水溫期體表潰瘍與消化道積水之溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 及鮫弧菌 (*Vibrio carchariae*) 病原菌

株，其菌體與細胞外產物 (extracellular products, ECP)於福馬林失活處理後對蛋雞 (hens)進行免疫接種，隨後收集卵黃並初步純化IgY，收集過程持續對特異性卵黃免疫球蛋白進行以ELISA技術為基礎之力價分析，直至力價達到 10^2 後開始大量收集卵黃，並作為以投餵為接種路徑之被動免疫試驗。

相對於必須以發酵槽生產大量菌體並以福馬林進行失活處理之全菌菌苗或細胞外產物疫苗，接種於蛋雞並收集卵黃分離IgY的技術，不但能獲得具特異性之抗體球蛋白，同時具穩定特性之IgY，在保存、運輸與操作上皆十分方便，因此在確立生產技術後，隨即以不同比例添加於飼料中進行保護效果評估測試。

四、IgY免疫蛋黃保護效果評估試驗

4-1. 以卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原浸泡攻擊試驗之保護效果評估

試驗組別分別為 (1) *Vibrio carchariae* strain VCG蛋粉 4% (2) *V.cachariae* strain VCG蛋粉 2% (3) *V.cachariae* strain VCS蛋粉 4% (4) *V.cachariae* strain VCS蛋粉 2% (5) *V.alginolyticus* strain S4Y蛋粉 4% (6) *V.alginolyticus* strain S4Y蛋粉 2% (7)投餵免疫前蛋粉 4%；連續投餵石斑魚苗14天後進行浸泡全菌體攻擊試驗，觀察14天並紀錄其活存率，結果如Table 3.所示。

4-2. 以卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原腹腔注射攻擊試驗之保護效果評估

將實驗組別分為七組，分別為 (1) *Vibrio carchariae* strain VCG蛋粉4% (2) *V.cachariae* strain VCG蛋粉2% (3) *V.cachariae* strain VCS蛋粉4% (4) *V.cachariae* strain VCS蛋粉2% (5) *V.alginolyticus* strain S4Y蛋粉4% (6) *V. alginolyticus* strain S4Y蛋粉2% (7) 投餵免疫前蛋粉 4%，連續投餵石斑魚苗14天後以全菌體腹腔注射攻擊試驗，觀察14天並紀錄活存率，結果如Table 4.所示。

以未經不活化菌體注射雞之所收集之卵黃粉末分別以4%添加於石斑飼料中，連續投餵14天後進行浸泡攻擊試驗，結果發現在VCG、VCS及S4Y組之相對活存率分別為0%，40%及60%，以2%及4%免疫卵黃粉添加則相對活存率分別為60%，60%，75%及10%，50%，25%，除於*Vibrio alginolyticus* strain S4Y組添加降低至25%外，其餘各組皆有提升現象，顯示飼料中添加特異性免疫卵黃粉末並以經口投餵方式給予，確實對於石斑魚苗再對抗病原攻擊時，具有明顯提升活存率之效果。

4-3. 以卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原腹腔注射攻擊試驗之保護效果評估

試驗組別分別為 (1) *Vibrio carchariae* strain VCG蛋粉2% (2) *V.cachariae* strain VCG蛋粉2%+Glucan1% (3) *V.cachariae* strain VCS蛋粉2% (4) *V.cachariae* strain VCS蛋粉2%+Glucan 1% (5) *V.alginolyticus* strain S4Y蛋粉2% (6) *V.alginolyticus* strain S4Y蛋粉 2% strain Glucan1% (7) 投餵商業飼料；連續投餵石斑魚苗14天後進行浸泡全菌體攻擊試驗，並在投餵後第7天及第14天各組分別取10尾以全菌體

腹腔注射攻擊試驗，並觀察14天並紀錄活存，結果如Table 5.所示。以不同病原菌株之特異性卵黃免疫球蛋白，以不同比例添加於飼料投餵石斑魚苗進行疫苗接種，並於病原腹腔注射攻擊試驗測試保護效果差異，結果發現在*Vibrio carchariae* strain VCS及VCG兩處理組，皆以同時添加2%免疫卵黃粉末及1% glucan具較佳保護效果，但在*Vibrio alginolyticus* strain S4Y組，則不論單純添加2%免疫卵黃粉末或另行添加1% glucan，與商業飼料相較，皆未能發揮保護效果。

以免疫注射對蛋雞進行疫苗接種，隨後收集具有特異性卵黃免疫球蛋白之技術，再分別以投餵、浸泡或是注射方式給予，目前已經實際應用於對於溫水性魚種之疾病防治 (Gutierrez et al., 1993; Aminirissehei, 2002; Arasteh et al., 2004)，同時具特異性之卵黃免疫球蛋白，更因為性質穩定、能有效移除組織內之特定抗原 (Miyazaki et al., 1992)，並可抵抗生物腸道之消化因子 (Gutierrez et al., 1993)，而近年迅速發展的被動免疫技術。Wang等(2006)以經由蛋雞生產之對*Edwardsiella tarda*之IgY特異免疫抗體，對頻繁發生皮膚出血、內臟與腹部積水之大比目魚 (*Scophthalmus maximus*)進行免疫接種，隨後分別在注射及傷口浸泡攻擊試驗中，證實IgY處理組具有相對活存率高達 83.3% 及100%的保護效果。近年來更將相關技術發展至將卵黃抗體 (Egg yolk antibodies)應用於魚介類之健康管理 (health management) (Nayak, 2006)，以及利用抗原與抗體之專一性，進行相關疾病檢測與鑑定；例如利用蛋雞所生產之IgY (Chicken-derived IgY)應用於太平洋鮭 (Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp.)感染成長與成熟階段寄生蟲 (*Loma salmonae*)之辨識技術便為一例 (Young et al., 2007)。

相對於充滿成本支出與風險的藥物治療，應用卵黃抗體技術 (egg yolk antibody technology)對魚介類進行被動免疫 (passive immunization)，已成為對藥物或化學療法進行相關管理的替代方式 (Nayak, 2006)，並在針對養殖魚介類之應用上，為極具發展潛力的實際管理措施 (Kim et al., 2004; Nayak, 2006; Lu et al., 2008)。不過由於以不同濃度及給予路徑，或與不同佐劑進行免疫接種，皆會對相關效果產生明顯影響 (Arasteh et al., 2004)，因此針對本地多種類的養殖魚介類，如何建立主動與被動免疫之強化添加，成為後續發展相關研究之重要方向與目標。

結 論

藉由對本地石斑繫養殖環境之養殖對象、水域環境與餌料進行流行病學監測，可建立相關背景資料，對好發與石斑繫養殖不同階段之病原進行充分了解，進而尋求防制之道。同時藉由細菌多價疫苗開發、接種技術探討、對不同培育階段之石斑親種及幼魚進行主動與被動免疫接種，除對相關養殖對象與環境進行健康管理，亦可建立本地主要水產養殖種類無特定病原種苗(SPF)生產技術。

本試驗使用福馬林失活之全菌或菌株細胞外產物製成菌苗 (bacterin)，並分

別對石斑幼魚與蛋雞進行免疫接種反應；收集免疫雞蛋由蛋黃中獲得具特異性免疫抗體之卵黃免疫球蛋白，隨後以經口投餵方式對石斑吋苗進行免疫接種。由試驗初步成果得知不論由直接以腹腔注射或浸泡接種全菌疫苗，或經口投餵具特異免疫抗體之卵黃免疫球蛋白，皆可在攻擊試驗後獲得一定程度之保護效果；顯示不論以主動或被動免疫方式給予接種處理，皆可提升活存率。相對於疫情發生後開始投用之化學治療劑或抗生素，因其具有對環境生態之嚴重衝擊，且可能因為藥殘問題影響消費者健康，卻更加凸顯以提升個體免疫能力或針對特定抗原產生免疫保護之發展潛力。本試驗分別以主動與被動免疫，對石斑吋苗進行特定病原之免疫接種與相關病原感染時的保護效果評估，除確認免疫接種之可行性外，亦對建立本地主要水產養殖種類無特定病原種苗 (SPF) 生產技術，提供重要參考價值。

計劃成果自評

本計畫執行狀況正常且於計劃期限前已達成進度目標，除獲致初步成果，相關結果正整理投稿中。

參考文獻

- Acosta, F., Lockhart, K., Gahlawat, S.K., Real, F., and Ellis, A.E., 2004. Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish Shellfish Immunol.* 17:255-263.
- Aminirissehei, A., 2002. Passive immunization of salmonids against furunculosis and vibriosis with chicken egg yolk immunoglobulins (IGY) (*Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*). *Masters Abst. Int.* 40: 382.
- Arasteh, N., Aminirissehei, A. H., Yousif, A. N., Albright, L. J., Durance, T. D., 2004. Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). *Aquaculture.* 231: 23-36.
- Austin, B. and Austin, D. A., 1993. *Bacterial Fish Pathogens : Disease in Farmed and Wild Fish*, 2nd end. Eill Horwood Limited, Chichester, pp. 265-307.

- Austin, B. and Austin, D.A., 1999. Bacterial fish pathogens: Diseases in farmed and wild fish. Springer/Praxis Publishing, Chichester.
- Benmansour, A. and de Kinkelin, P., 1997. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. (Eds.), Fish Vaccinology, Dev. Biol. Stand., Karger, Basel, p. 279.
- Brambell, F.W.R., Hemmings, W.A., and Henderson, M., 1951. Antibodies and Embryos. London: Athlone Press.
- Chi, S.C., Lo, C.F., Kou, G.H., Chang, P.S., Peng, S.E. and Chen S.N., 1997. Mass mortalities associate with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis. 20: 185-193.
- Chou, H.Y., Chang, S.J., Chen, L.M., 1994. Investigation on the viral diseases of cultured grouper (*Epinephelus* sp.) and red sea bream (*Pagrus major*). Reports on Fish Disease Research (XIV), COA Fisheries Series 46: 41-49.
- Chou, H.Y., Hsu, C.C. and Peng, T.Y., 1998. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. Fish Pathol. 33: 201-206.
- Egidius, E., 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. Aquaculture 67: 15-28.
- Ellis, A.E., 1988. Current aspects of fish vaccination. Dis. Aquat. Org. 4: 159-164.
- Ellis, A.E., 1997. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. (Eds.), Fish vaccinology, Dev. Biol. Stand., Karger, Basel, p. 107.
- Gudding, R., Lillehaug A. and Evensen O., 1999. Recent developments in fish vaccinology. Vet. Immunol. Immunopathol. 72: 203-212.
- Gutierrez, M. A., Miyazaki, T., Hatta, H., Kim, M., 1993. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. J. Fish Dis. 16: 113-122.
- Halassy, B., Krstanovic, M., Frkanec, R., and Tomasic, J., 2003. Adjuvant activity of peptidoglycan monomer and its metabolic products. Vaccine 21:971-976.

- 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.
- Kanellos, T.S., Sylvester, I.D., Butler, V.L., Ambali, A.G., Partidos, C.D., Hamblin, A.S., and Russell, P.H., 1999. Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish. *Immunology* 96:507-510.
- Kim, D. K., Jang, I. K., Seo, H. C., Shin, S. O., Yang, S. Y., Kim, J. W., 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture* 237: 21-30.
- Lai, Yu-Shen, S. Murali, H.-C. Chiu, H.-Y. Ju, Y.-S. Lin, S.-C. Chen, I.-C. Guo, K. Fang and C.-Y. Chang, 2001b. Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus in a new nodavirus-susceptible cell lines from yellow grouper, *Epinephelus awoara* brain tissue. *J. Fish Dis.* 24:299-309.
- Lai, Yu-Shen.,H-C, Chiu, S, Murali, I.-C. Guo, S.-C. Chen, K. Fang and C.-Y. Chang, 2001a. In vitro neutralization by monoclonal antibodies against YGNNV and immunolocalization of virus infection in yellow grouper *Epinephelus awoara*. *J. Fish Dis.* 24:237-244.
- Lai, Yu-Shen, S. Murali, H.Y. Ju.,M.F., Wu.,I-C Guo,S-C Chen, K Fang and C.-Y., Chang, 2000. Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck&Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus. *J. Fish Dis.* 23:379-388.
- Lee, K.K., 1995. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microb. Pathog.* 19:39-48.
- Lee, K.K., P.C. Liu and W.H. Chuang, 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar. Biotechnol.* 4: 267-277.
- Lee, K.K., P.C. Liu, Y.C. Chen and C.Y. Huang, 2001. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *J. Therm. Biol.* 26: 585-587.
- Lee, K.K., S.R. Yu and P.C. Liu, 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 34: 110-117.

- Lee, K.K., Y.L. Chen and P.C. Liu, 1999. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. *Blood Cell Mol. Dis.* 25: 180-192.
- Lee, S. B., Mine, Y., Stevenson, R. M. W., 2002. Effects of Hen Egg Yolk Immunoglobulin in Passive Protection of Rainbow Trout against *Yersinia ruckeri*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 110-115.
- Liu, P. C., and K. K. Lee, 1999. Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 428-430.
- Liu, P.C., K.K. Lee, C.C. Tu and S.N. Chen, 1997. Purification and characterization of a cysteine proteases produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* 35: 32-39.
- Liu, P.C., Y.C. Chen and K.K. Lee, 2001. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104:71-77.
- Lorenzen, N., Olesen, N.J., Jorgensen, P.E., Etzerodt, M., Holtet, T.L., and Thogersen, H.C., 1993. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *J. Gen. Virol.* 74:623-630.
- Lu, Y. N., Liu, J. J., Jin, L. J., Li, X. Y., Zhen, Y. H., Xue, H. Y., You, J. S., Xu, Y. P., 2008. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. *Fish and shellfish immunology.* 25 :604-610.
- 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.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Bandin, I., Fouz, B. and Toranzo, A. E., 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3316-3322.
- Manning, M.J., Grace, M.F., and Secombes, C.J., 1982. Developmental aspects of immunity and tolerance in fish, in *Microbial Diseases of Fish* (Roberts, R.J. ed.), pp. 31-46. London: Academic Press.

- 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., 1997. In: Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G., Smith, P. (Eds.), *Furunculosis in Fish*, Academic Press, New York, p. 382.
- Miyazaki, T., Gutierrez, M., Hatta, H., Kim, M., 1992. Effects of anti-*Edwardsiella tarda*-IgY (egg yolk immunoglobulin) on prevention of *E. tarda* infection in the Japanese eel. FISH HEALTH SECTION, ASIAN FISHERIES SOCIETY, MANILA (PHILIPPINES). pp. 399-405.
- Murali, S., Wu M.F., Guo, I.C., Chen, S.C., Yang, H.W. and Chang, C.Y., 2002. Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* 25:91-100.
- Nayak, S. K., 2006. Egg yolk antibodies for fin and shell fish health management. *Fishing Chimes.* 25: 16-18. Saulnier *et al.*, 2000
- Sooter, C.H., Schaeffer, M., Gorrie, R., and Cockburn, T.D., 1954. Transovarian passage of antibodies following naturally acquired encephalitis infection in birds. *J. Infect. Dis.* 95:165-167.
- Wang, B., Liu, Y. B., Liu, S. F., Ding, J. F., Sun, C., Fan, W., 2006. Application of the highly immunized yolk antibodies of *Edwardsiella tarda* from hen. *J. Dalian Fish. Univ./Dalian Shuichan Xueyuan Xuebao.* 21: 203-206.
- 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.
- Young, C. A., Silversides, F. G., Jones, S. R. M., 2007. Chicken-derived IgY recognizes developing and mature stages of *Loma salmonae* (Microsporidia) in Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. *Aquaculture.* 273: 398-404.

Table 1. 分別對不同養殖環境與培養階段之海水魚苗進行病原分離、培養與鑑定結果

Date (month/year)	location	host species	total body length (cm)	clinical signs	pathogens
04 / 2008	NTOU	<i>Epinephelus malabaricus</i>	15.0 ± 2.0	cloudy / grey areas on the skin	<i>V. carchariae</i>
04 / 2008	NTOU	<i>Epinephelus</i> sp.	3.0 ± 1.0	outbreak	nervous necrosis virus, NNV
04 / 2008	NTOU	<i>Mugil cephalus</i>	6.0 ± 2.0	skin lesions / ulcers	<i>V. carchariae</i>
04 / 2008	NTOU	<i>Mugil cephalus</i>	7.0 ± 1.5	white spot disease	<i>Cryptocaryon irritans</i>
05 / 2008	NTOU	<i>E. malabaricus</i>	45.0 ± 10.0	skin lesions / ulcers	<i>Neobenedenia</i> sp.
06 / 2008	NTOU	<i>Epinephelus</i> sp.	6.0 ± 2.0	ulcre	<i>V. alginolyticus</i>
06 / 2008	NTOU	<i>Epinephelus</i> sp.	3.0 ± 1.0		Virus-like
06 / 2008	NTOU	<i>E. malabaricus</i>	45.0 ± 10.0	cloudy / grey areas on the skin	<i>V. carchariae</i>
06 / 2008	NTOU	<i>E. malabaricus</i>	45.0 ± 10.0	skin lesions / ulcers	<i>Neobenedenia</i> sp.
09 / 2008	NTOU	<i>Epinephelus</i> sp.	8.0 ± 2.0	skin lesions / ulcers	<i>V. carchariae</i>
09 / 2008	NTOU	<i>E. malabaricus</i>	12.0 ± 4.0	skin lesions / ulcers	<i>Aeromonas hydrophila</i>
09 / 2008	NTOU	<i>Epinephelus</i> sp.	32.0 ± 20.0	skin lesions / ulcers	<i>V. alginolyticus</i>

Table 2. 分別以不同方式進行主動與被動免疫接種後石斑吋苗於病原菌株攻擊後之相對活存率差異

	免疫處理			
	control 對照組	主動免疫 (active immunity) ECP 疫苗	被動免疫 (passive immunity) 1% 蛋粉	被動免疫 (passive immunity) 2% 蛋粉
接種後 7 日 攻擊	0%	100%	20%	80%
接種後 14 日 攻擊	0%	50%	100%	100%

Table 3. 以不同濃度卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原浸泡攻擊試驗之保護效果差異

免疫卵黃 粉末添加 量	<i>V. carchariae</i> -VCG 蛋粉組	<i>V. carchariae</i> - VCS 蛋粉組	<i>V. alginolyticus</i> -S4Y 蛋粉組	免疫前蛋粉組 以 VCS 攻擊	免疫前蛋粉組 以 VCG 攻擊	免疫前蛋粉組 以 S4Y 攻擊
相對存活率 (%)						
4%蛋粉	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2%蛋粉	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Table 4. 以不同濃度卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原浸泡攻擊試驗之保護效果差異

免疫卵黃粉 未添加量	V.cachariae -VCG 蛋粉組	V.cachariae -VCS 蛋粉組	V.alginolyticus -S4Y 蛋粉組	免疫前蛋粉組 以 VCG 攻擊	免疫前蛋粉組 以 VCS 攻擊	免疫前蛋粉組 以 S4Y 攻擊
	相對存活率 (%)					
4%蛋粉	10%	50%	25%	0%	40%	60%
2%蛋粉	60%	60%	75%			

Table 5. 以不同病原菌株之特異性卵黃免疫球蛋白進行疫苗接種於病原腹腔注射攻擊試驗之保護效果差異

飼料添加比例	投餵後 7 天	投餵後 14 天
	攻擊濃度: 10^8 CFU/fish body weight(g)	攻擊濃度: 10^9 CFU/ fish body weight(g)
相對活存率(%)		
<i>Vibrio alginolyticus</i> strain S4Y		
S4Y 蛋粉 2%	0%	10%
S4Y 蛋粉 2%+Glucan1%	0%	20%
商業飼料	0%	80%
<i>Vibrio carchariae</i> strain VCS		
VCS 蛋粉 2%	10%	0%
VCS 蛋粉 2%+Glucan1%	0%	10%
商業飼料	0%	0%
<i>Vibrio carchariae</i> strain VCG		
VCG 蛋粉 2%	10%	0%
VCG 蛋粉 2%+Glucan1%	0%	30%
商業飼料	0%	0%