

虱目魚苗對 *Vibrio anguillarum* Bacterin 疫苗的免疫反應

林 清 龍

Evaluation of HIVAX *Vibrio anguillarum* Bacterin in the Vaccination of Milkfish (*Chanos chanos*) Fingerlings

Lin Ching-Long

The HIVAX *Vibrio anguillarum* bacterin in the vaccination of milkfish (*Chanos chanos*) fingerlings was evaluated and the results are summarized as follows:

1. The bacterin was proven to be safe and effective in the vaccination of milkfish fingerlings.
2. The optimal concentration on the waterborne infection of milkfish fingerlings with *V. anguillarum* was about 10^7 cells/ml.
3. The infection rate of milkfish fingerlings with *V. anguillarum* increased if the temperature is lowered.
4. The immunity of milkfish against *V. anguillarum* developed as early as when the fish weighted 0.38 g and lasted for three months at room temperature.

前 言

虱目魚是本省重要養殖魚類之一。屬於廣塩性之溫水魚類，分佈於東經 40° 到西經 100° 之間的南北緯 $30\sim 40^\circ$ 之熱帶與亞熱帶海域，所以主要養殖區分佈在本省較溫暖的西南部沿海一帶—雲林、嘉義、臺南、高雄、屏東等縣市。其漁產量為單項養殖魚類的首位，其養殖面積為15,6113頃，年產量為28,907公噸⁽¹⁾，要增加生產量，其魚苗必需在防寒設備的越冬溝，這期間的死亡率，20年來平均15%以上，尤其在民國64年高達70%以上⁽²⁾，本分所在64~65年間經黃⁽³⁾研究，引起此紅斑病的病原菌為 *Vibrio anguillarum*。本研究為尋求對此病有效的預防方法，利用美國 Tavolek公司所出品的 HIVAX *Vibrio anguillarum* 疫苗來探討虱目魚苗免疫反應的效果。

材 料 與 方 法

一、試驗魚的準備：買回「三點花」的虱目魚苗，放在本分所 $3.9^m \times 1.9^m \times 0.3^m$ 的水泥池，先蓄養着（先用 10^{ppm} Nitrofurantoin p-7138 及 1 ppm methylene 加以先消毒池子，24小時後再放入魚苗）。死亡的魚隨機取樣，做解剖取其 Kidney 塗抹在 3% NaCl 的 TSA agar plate 上，以確信那些魚並非死於 *Vibrio anguillarum* 之後再抓取各種大小的試驗魚苗 0.4g, 1g, 4g, 分別飼養，以備做浸泡疫苗。

二、疫苗浸泡：以 HIVAX 疫苗液 1^1 加 9^1 過濾海水泡成浸液放在 130ℓ 的白色塑膠桶中內加打氣。將試驗魚分成三組，每組魚數為 100 尾，分別為試驗組、對照組、負對照組。將每組的魚放入浸泡專用的平底長方形網，浸泡 20 秒後再放回池中飼養觀察一個月，每天撈取並記錄三組的死亡尾數，以為計算 HIVAX 疫苗的浸泡安全性試驗所需記錄，用 Chi-square 分析之。對照組的浸泡液為同量的過濾海水浸泡 20 秒。負對照組則不經浸泡的過程。以探討比較浸泡過程的安全性。

三、病原性增強試驗：*V. anguillarum* 先在 3% NaCl 的 Broth medium 中於 28°C 下，經 18 小時培養，再轉移到 3% NaCl 的 agar medium（寒天平板培養基）相同的情況下培養。將 plate 上的 young culture 細菌以白金耳接 8mg/100g 魚體重的比率鉤入 0.85% 生理食塩水中泡成細菌懸浮液，

經腹腔注射入健康虱目魚。再從垂死的經過注射的魚體的腎臟分離 *V. anguillarum* 出來，如此經 5 次的重複。致於估計病原性的增強，以泥鰱為材料計其 LD_{50} 。

四、攻擊 (challenge) 最適的細菌濃度與溫度試驗：將經過增強毒力的 *Vibrio anguillarum* young culture，以 Gram stain，活菌觀察確信具運動性，以 plate count 計其細菌數後。以 0.85 NaCl 將菌液稀釋成各種不同的濃度。將 1~1.5g 的虱目魚苗，放在不同濃度的菌液浸泡 30min。完後移至塑膠桶中分別蕃養觀察。每天記錄其死亡尾數，並鑑定至少兩天以上並非死亡於 Vibriosis 才停止，相同的試驗分別在 15°C、25°C 下重複。適用殺死 60% 以上的試驗魚的細菌濃度為最佳攻擊適當濃度⁽³⁾。

五、攻擊試驗 (Challenge test)：疫苗浸泡後一個月，每組抓取 50 尾分成二罐，每罐 25 尾，放在廣底盆中浸泡一定菌溶液 30 分，內加打氣 (in incubator 中浸泡，15°C 溫度下)，之後放在 40L 玻璃罐中觀察。每天觀察死亡情形，從死亡魚的腎臟鑑定是否死於 Vibriosis，如此二天以上死亡並非由於感染 Vibriosis 的為止。

六、死亡於 Vibriosis 的百分率：
$$\frac{\text{No. Fish which died of Vibriosis during test}}{\text{Total number of fish-number of non-specific test loss}}$$

R. P. S (Relative percent survival) = $(1 - \frac{\% \text{ mortality in vaccinated group}}{\% \text{ mortality in control group}}) \times 100\%$

結 果

1. 虱目魚苗以 HIVAX *Vibrio anguillarum* 疫苗浸泡 20 秒的 safety test，結果可從表 1 看出，實驗組的死亡率 51.43%，對照組的死亡率 46.64%，負對照組 49.80%。其浸泡疫苗所造成的損失以統計學上的 "X²" (Chi-square) 來分析其結果是無意義。亦就是說其安全性是可靠的。

2. 病原性增強試驗結果，經過五次的接種分離，結果可從表 2 得知，其 LD_{50} 從 5.48×10^7 cells/ml 降至 5.04×10^6 cells/ml，菌量從第一次的 8mg 降至第五次的 4mg ，由此可證明出 *V. anguillarum* 經 5 次的增強試驗後其對泥鰱的致病力增強了近十倍。

3. 攻擊最適菌濃度的試驗，可從表 3 可知具攻擊最適細菌濃度在 10^7 cells/ml 以上，又在 15°C 下攻擊與室溫下 (25°C) 攻擊，魚苗感染 *V. anguillarum* 的比率從 64.4% 提升到 90.5%。

4. 虱目魚苗免疫性受魚體重的影響，由表 4 可看出所有的三種不同體型，每種其 R. P. S 質均在 60% 以上，這證明了 30 天的時間足夠讓虱目魚的免疫系統建立起來，更進一步的說從 0.38g 的魚體重已可感應抗元產生抗體，而且在室溫下持續 3 個月之久。

Table 1. Safety test HIVAX *vibrio* bacterin conducted on milkfish fingerlings (*Chanos chanos*)

	Vaccinates			X ²	Non-Vaccinated Controls			X ²	Negative Controls		
	N	Loss	%		N	Loss	%		N	Loss	%
Lot 1	1000	493	49.30		1000	363	36.30		1000	498	49.08
Lot 2	100	4	4.00		101	7	6.93		—	—	—
Lot 3	436	293	67.20		400	330	82.50		—	—	—
Total	1536	790	51.43	0.644*	1501	700	46.64	2.401*	1000	498	49.80

water temperature: 21-29°C

$$*X^2 < X^2 \left(\frac{n=1}{p=0.01} \right) = 6.635 \text{ or } X^2 \left(\frac{n=1}{p=0.05} \right) = 3.841$$

The differences in loss rates were not statistically significant.

Table 2. The effect of passage through milkfish (*Chanos chanos*) on the virulence of *vibrio anguillarum* (strain No. 760110-WB)

Passage	Normal loach LD ₅₀ Value (Cells / ML)
MP 1	5.48 × 10 ⁷
MP 2	6.13 × 10 ⁶
MP 3	1.26 × 10 ⁷
MP 4	2.02 × 10 ⁶
MP 5	5.04 × 10 ⁶

Table 3. Effect of concentration and temperature on the waterborne infection of milkfish fingerlings (*Chanos chanos*) with *vibrio anguillarum* (strain No. 760110-WB)

Infection level ¹ (Cells/ML)	No. of Test fish	Cumulative Mortality ² (%)	Mean
10 ⁸	19	66.7	83.4
	20	100.0	
10 ⁷	20	52.6	64.4
	21	76.2	
10 ⁷ at 25°C	22	59.1	59.1
10 ⁷ at 15°C	21	90.5	90.5
10 ⁶	20	27.8	16.4
	20	5.0	
10 ⁵	20	30.8	30.4
	20	30.0	
Control	20	0	0
	20	0	

¹Infection performed at room temperature.

²% Of fish dead due to vibriosis; confirmed by reisolation of *V. anguillarum* from dead fish.

Table 4. effect of body weight on onset of immunity of milkfish (*Chanos chanos*) immunized with HIVAX vibrio bacterin

Challenged at ²	0.38 g	R. P. S. ¹ 1-1.5 g	4.0 g
----------------------------	--------	----------------------------------	-------

30 days	100	61.11	84.44
60 days	—	71.11	93.93
70 days	—	—	100
90 days	70.83	—	—

$$^1R.P.S. (\text{relative percent' survival}) = (1 - \frac{\% \text{mortality in vaccinated group}}{\% \text{mortality in control group}}) \times 100\%$$

²Challenge dose in organisms per ML *V. anguillarum* (strain No. 76110-WB): $6.7 \times 10^7 - 3.2 \times 10^8$ at 15°C .

討 論

在虱目魚養殖，從4月初~10月底這7個月期間為生長收穫期。從11月至翌年3月底是越冬期間，為休止期。不過表面是休止期，其實是最重要的一環，因為魚苗要集中在具越冬設備的越冬溝中蓄養，以為來年放養成主要的大型魚苗來源。所以追根究底的說來虱目魚養殖的盈虧，全看在越冬苗的蓄養成果如何。據估計，每公頃越冬魚的收穫量佔840~1500公斤，而平均每公頃的產量約2000公斤，由此可見保障越冬虱目魚的重要⁽⁴⁾，而在越冬溝由於高密度的蓄養，水質及種種環境的不佳，加上最主要的寒流來襲連續4~5天，使水溫降至 15°C 以下，造成魚體凍傷，因不攝食引致魚體虛弱，造成*V. anguillarum*種的有利條件，暴發Vibriosis所引起的大量死亡，致使每年平均有15%的死亡率。故本試驗在攻擊試驗中 15°C ， 25°C 下的攻擊死亡率明顯差異，可證明低溫為造成*V. anguillarum*菌引致Vibriosis發生的主因。然由於在寒流來襲時，各種提高溝內水溫的方法，在經濟上、實用上的困難，唯有從預防上着手，而由免疫上着手，當是最佳之想法。

雖然具疫苗浸泡安全性(safety)及造成對*Vibrio anguillarum*的免疫成效有令人滿意的結果，但對於大量的高密度浸泡所導致的損失，即使是使用了浸漬用特別網具，仍無法使其降至很低，此問題有待將來再進一步的研究。除此，將對於浸泡疫苗的一次魚苗最高量的臨界點之探討，亦為將來尋求的問題之一。

在表4，可知所有的R. P. S 值均超過60%以上，所以以免疫方法來防預Vibriosis發生的有效的，又由表4，可知0.38g的魚體重就可被動免疫建立起免疫系統，並持續有三個月之久，看來在實際大量應用上，實最具有期待性的預防方法。

從表3，可知*V. anguillarum*致Vibriosis的最低濃度在 10^7 cells/ml以上，由此可推斷出HIVAX Bacterin引致產生抗體的功效濃度。

摘 要

以HIVAX *Vibrio anguillarum*疫苗對虱目魚做其免疫試驗其結果有如下：

1. 美國詹森父子公司所出產的HIVAX *V. anguillarum* Bacterin來浸泡虱目魚苗，具安全性及效果均具有確切的可靠性。
2. 以*V. anguillarum*活菌來對虱目魚苗做感染浸泡最適細菌濃度約為 10^7 cells/ml左右。
3. 降低溫度，可增高虱目魚苗感染*V. anguillarum*的頻率。
4. 虱目魚苗從0.38g大時就可產生免疫性，且在室溫下持續3個月之久。

謝 辭

本試驗在69農建—5—1—產—020計劃下完成。美國詹森父子公司的贈送疫苗，台大講師宋延齡對資料的整理與對本試驗的設計。本分所長丁雲源的鼓勵支持，林國彥先生協助購置魚苗，倪國士先生製造、設計網具、許世人先生的多方協助，特誌由衷謝忱於此。

參 考 文 獻

1. 張明輝：虱目魚養殖，水產養殖淺說No. 63.
2. 黃銀河：虱目魚越冬期間細菌疾病研究—初步報告JCRR, Fisheries series No. 29. p. 50~54.
3. Croy, T. R. and D. F. Aend (1977) immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture* 12, 317~325.
4. 黃丁郎：虱目魚越冬預防措施，水產養殖淺說No. 59.
5. Van Duijn, C. (1967) : Fungus infection. In disease of fishes P.81.