

## 海鱸發光桿菌疫苗製備法評估

郭錦朱\* · 陳智賢 · 葉宗鑫 · 郭誌明 · 陳紫嫻

行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

### 摘 要

本研究旨在開發海鱸發光桿菌疫苗製劑，以不活化菌體、細菌胞外液及弗氏佐劑製備候選疫苗製劑，由其安全性及誘發魚體產生抗體，評估海鱸發光桿菌疫苗的最佳製備方法。結果發現，不活化菌體及其胞外產物對魚鰓細胞增殖不具毒性；在製備的候選疫苗製劑中，以不活化菌體及弗氏佐劑混合製劑所誘發之抗體力價最高，於接種後 29~35 天，海鱸的凝集抗體力價可達 416~960 倍，且其不活化菌體的組成菌量以  $8.4 \times 10^9 \sim 1.7 \times 10^{10}$  cells/fish 較佳 ( $p < 0.05$ )。

關鍵詞：疫苗、發光桿菌、抗體、海鱸

### 前 言

台灣四面環海，水產養殖產業興盛，唯，在疫病威脅下，常造成大量的死亡，業者損失慘重。水產動物常見的主要致病原有細菌、病毒及寄生蟲，在全球減少化學藥品的使用並重視農產品的衛生安全趨勢下，疫苗的開發及應用技術的建立，是水產養殖產業邁向量產及永續經營的關鍵契機之一。近年來，世界各國持續開發多種細菌及病毒疫苗且已商品化 (Bakopoulos *et al.*, 1997; Gudding *et al.*, 1999; Lorenzen, 1999; 陳, 2003; 楊, 2003; 蔡, 2005; Bricknell and Dalmo, 2005; 吳, 2006; 劉等, 2006; Agnew and Barnes, 2007; Aguilar and Rodriguez, 2007; Bravo and Midtlyng, 2007; Gravningen *et al.*, 2008; Mutoloki *et al.*, 2008; 郭, 2009; Jiao *et al.*, 2010; Pakingking Jr. *et al.*, 2010)，其中也包括日本 2008 年核准上市、用來防治青鮎及紅鮎之鏈球菌症及發光桿菌症的不活化鏈球菌及發光桿菌混合疫苗 (日本水產省動物醫藥品檢查所)。有鑒於各國養殖魚種及病原迥異，因此，擬針對我國高經濟養殖魚種及重大疫病進行疫苗的開發。

海鱸 (*Rachycentron canadum*) 是我國重要的高經濟養殖魚種之一，成長快速，相當適合外海箱網養殖，養殖一年可增重達 6~10 kg，肉質細緻、甘甜、富彈性，可作為生魚片之材料；此外，體型碩大又貪食，也是海洋休閒船釣的喜好魚種。唯，在養殖過程，常遭受發光桿菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 危害，造成大量死亡，且全年都會發生 (Liao *et al.*, 2004; 胡, 2005; 劉等, 2005; 鄭, 2007)，因此，擬開發海鱸發光桿菌疫苗預防疫情。

魚類的發光桿菌症，於 1980 年代已開始著手進行免疫防治分析研究，早期雖有開發一些有效的疫苗製劑，但防疫效力的再現性不佳 (Hanif *et al.*, 2005)；Magarinos 等以研發的發光桿菌疫苗處理鯛 (*Sparus aurata*) 的仔稚魚，發現其對鯛的發光桿菌症具保護力，在 0.5~2 g 稚魚的相對活存率 (relative percent survival, RPS) 高於 75% (Magarinos *et al.*, 1994)，而 60 天齡的仔魚之相對活存率則有 84~90% (Magarinos *et al.*, 1999)；Bakopoulos 等 (2003) 也製備發光桿菌疫苗製劑，對鱸魚 (*Dicentrarchus labrax*) 幼魚的相對活存率高達 90~100%。Hanif 等 (2004) 以發光桿菌不活化菌體  $10^8$  cells/fish 間隔 29 天連續接種鯛 (*S. aurata*) 種魚二次，種魚的抗體力價高達 1:918，將其產出 89 天齡的魚苗，再以發光桿菌不活化菌體浸浴 1 小時，並於接種後的 30 天以發光桿菌攻

\*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號; TEL: (08) 832-4121 ext. 270; FAX: (08) 832-0234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw

擊，魚苗的相對活存率為 62.5%、抗體力價 1:140 ± 14%。陳 (2002) 利用海鱸血清評估發光桿菌全菌蛋白及其胞外產物之免疫原性，發現 39 kDa、49.8 kDa 及 53 kDa 皆產生明顯的免疫反應。張 (2008) 以 YFP 及 YEP 培養製成的發光桿菌及溶藻弧菌之混合疫苗對養殖海鱸的保護效果可達 8 ~ 12 週。方 (2009) 也探討發光桿菌疫苗免疫策略中的一些因子，包括不活化藥劑、免疫劑量、佐劑、追加免疫及免疫激活劑等，對疫苗誘發海鱸專一性免疫力及抗發光桿菌感染力的影響。本研究旨將製備的各種發光桿菌候選疫苗製劑接種海鱸，由其安全性及誘發魚體產生抗體，評估海鱸發光桿菌疫苗的最佳製備方法。

## 材料與方法

### 一、製備發光桿菌之不活化菌體

將發光桿菌接種於外加 1.5% 氯化鈉及 1.5% 瓊脂的腦心培養基 (brain heart infusion, BHI)，培養 24 小時後，收集菌體，以磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) 清洗、離心，再加 3% 福馬林在 4 °C 作用 24 h，不活化菌體以 PBS 清洗三次後，再以 PBS 調整菌液濃度至波長 540 nm 的吸光值為 2，其菌量約為  $2.8 \times 10^{10}$  cells/ml，再依實驗需求製備各種候選死菌疫苗製劑。

### 二、製備發光桿菌之胞外液

將發光桿菌以外加 1.5% 氯化鈉的 BHI 大量培養 24 h 後，離心，收集上清菌液，並以分子篩 Amicon Ultra (Millipore, Ireland) 過濾，分別收集分子量 < 3 kDa 濾液 (molecular fraction of < 3 kDa)、3 ~ 10 kDa 濾液 (molecular fraction of 3~10 kDa) 及 30 ~ 50 kDa 濾液 (molecular fraction of 30~50 kDa) 等三部分的細菌胞外產物，並分別注入卡式透析膜中，以 PBS 置換培養基備用。

### 三、安全性評估

#### (一) 細胞毒性試驗

處理組分 4 組：(1) 發光桿菌不活化菌體；(2)

分子量 < 3 kDa 濾液；(3) 分子量 3 ~ 10 kDa 濾液；及 (4) 分子量 30 ~ 50 kDa 濾液。本試驗的供試細胞為魚鰓細胞 G1B (BCRC 60559)，購自食品工業發展研究所；魚鰓細胞在 Ham's F12 培養基 (內含 1 mM L-glutamine、1.5 g/L 碳酸氫鈉、24 mM HEPES、10% 胎牛血清)，25 °C 培養至八分滿，取出計數，在 96 孔盤的每個孔槽中植入 10,000 個細胞，觀察貼壁後，再加入前述處理組，對照組則加 PBS，作用 96 h 後移除，孔槽中的魚鰓細胞以 PBS 清洗三次後，添加 10 μl WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazol-5-yl]-1,3-benzene disulphonate, 購自羅氏公司) 檢測試劑，在 37 °C 反應 4 h，測定波長 450 nm 的吸光值，並計算增殖率 (viability)，計算法為處理組與對照組吸光值的百分比。

#### (二) 安全的注射劑量

實驗分 8 組：(1) 分子量 < 3 kDa 濾液；(2) 分子量 3 ~ 10 kDa 濾液；(3) 分子量 30 ~ 50 kDa 濾液；(4) 不活化菌體；(5) [不活化菌體 + 弗氏完全佐劑 (Freund's adjuvant complete; FAC)] 等體積混合液；(6) [不活化菌體 + 弗氏不完全佐劑 (Freund's adjuvant incomplete; FAI)] 等體積混合液；(7) [不活化菌體 + 分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 濾液 + 弗氏完全佐劑] 等體積混合液；及 (8) [不活化菌體 + 分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 濾液 + 弗氏不完全佐劑] 等體積混合液。海鱸均重  $15.6 \pm 2.2$  g，每組 5 尾，對海鱸進行腹腔注射，其中 4 ~ 6 組為不含細菌胞外產物者，注射體積為每尾魚 0.1、0.2、0.3 及 0.6 ml，其餘各組每尾魚注射 0.1、0.2 及 0.3 ml，以 PBS 做為空白對照組；注射後的海鱸，放入流水式養殖的半噸玻璃纖維桶的箱網中，養殖 2 週，海水鹽度  $30 \pm 1$  psu、溫度  $23 \pm 2$  °C，觀察並紀錄活存率，以評估安全注射劑量。

### 四、抗體力價評估

候選疫苗製劑有 11 種：(1) 不活化菌體  $2.8 \times 10^9$  cells/fish；(2) 不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish；(3) 不活化菌體  $1.7 \times 10^{10}$  cells/fish；(4) [不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish + 分子量 3 ~ 10 kDa 濾液] 等體積混合液；(5) [不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish + 分子量 30 ~ 50 kDa 濾液] 等體積混合液；(6) [不

活化菌體+分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 濾液] 等體積混合液；(7) [分子量 3 ~ 10 kDa 濾液+分子量 30 ~ 50 kDa 濾液] 等體積混合液；(8) [不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish+弗氏完全佐劑] 等體積混合液；(9) [不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish+分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 濾液+弗氏完全佐劑] 等體積混合液；(10) [不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish+弗氏不完全佐劑] 等體積混合液；及 (11) [不活化菌體+分子量 10 ~ 30 & 30 ~ 50 kDa 濾液+弗氏不完全佐劑] 等體積混合液。海鱺均重  $300 \pm 50$  g，每組 30 尾，以腹腔注射方式對海鱺進行接種，每尾魚的注射體積為 0.2 ml；並以 PBS 做為空白對照組。

海鱺經 12 種處理組接種後，以流水方式養在半噸玻璃纖維桶中，海水鹽度  $30 \pm 1$  psu、溫度  $23 \pm 2$  °C，定期採血，每次每組採 9 尾，採集的血液在 28 °C 靜置 1 h 後，以轉速 10,000 rpm 離心 15 min，取血清進行抗體分析 (antibody assay)；抗體力價 (antibody titer) 的檢測方法是利用抗原和抗體作用產生沉澱的凝集反應法 (agglutination reaction)；將血清注入 96 孔盤的孔槽中，以 PBS 順著孔槽依序進行二倍連續稀釋，然後加入發光桿菌死菌  $10^7$  cells，血清和菌液混合均勻後，於 37 °C 作用 1 天，觀察並紀錄凝集反應的結果。

## 五、低菌量不活化菌體對海鱺的保護力及抗體力價

為確定不活化菌體在低菌量時對海鱺的保護效力及抗體力價；將不活化菌體  $5.6 \times 10^9$  cells/fish 對均重  $54.0 \pm 9.9$  g 的海鱺進行腹腔注射，同時以 PBS 做為空白對照組，每重複 60 尾，每組三重複；在疫苗接種後的 29、36、43、52 及 58 天進行採樣，每次每重複各採 10 尾，以發光桿菌  $3.7 \times 10^4$  cells/fish 進行攻擊，由相對活存率評估候選疫苗製劑對海鱺的保護力，其計算方法為：相對活存率 =  $[1 - (\text{處理組死亡率} / \text{對照組死亡率})] \times 100$ 。此外，每重複也同時各採 2 尾海鱺 (即每組 6 尾)，抽血檢測抗體力價；並將攻擊試驗活存及剛死的海鱺抽血，檢測其抗體力價。

## 六、統計分析

所有數據皆應用微軟統計軟體的單因子變異

數分析法 (one-way ANOVA) 統計。

## 結果與討論

本研究應用來製備發光桿菌候選疫苗製劑的細菌組成，包括發光桿菌不活化菌體、分子量 < 3 kDa、分子量 3 ~ 10 kDa 及分子量 30 ~ 50 kDa 的細菌胞外產物等四種，以魚鰓細胞評估其對細胞的毒性，結果如 Fig. 1 所示，這些組成皆不會抑制魚鰓細胞增殖，且其中分子量 < 3 kDa 及 30 ~ 50 kDa 的細菌胞外產物，顯然對魚鰓細胞增殖具促進效果 ( $p < 0.05$ )。

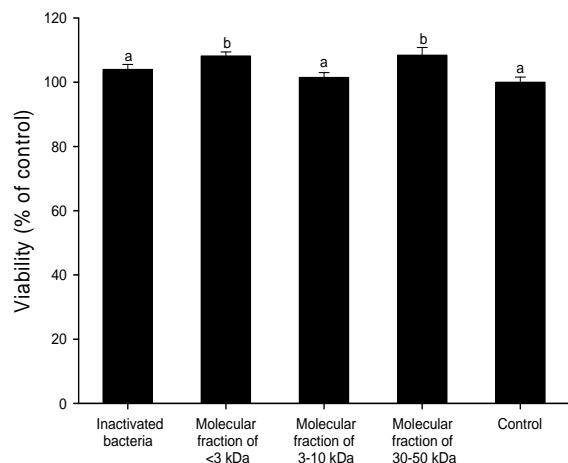
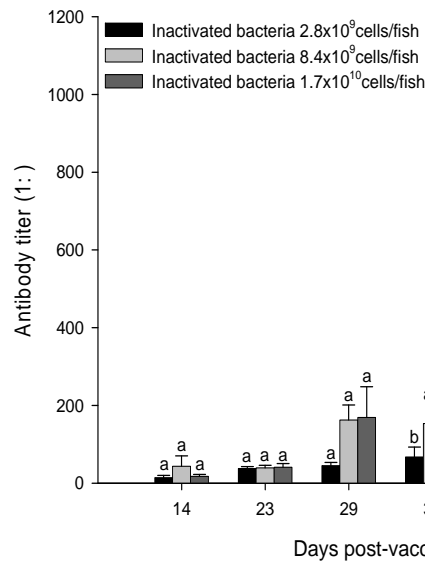


Fig. 1 Effect of inactivated bacteria and molecular mass fractionation admixtures of extracellular products of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* on the proliferation of gill cell. Mean ( $\pm$ S.E.) with different letters is significantly different ( $p < 0.05$ ).

將 8 種候選疫苗製劑之組成，分別以不同劑量對海鱺進行腹腔注射，結果列如 Table 1。供試的製劑組成為分子量 < 3 kDa、分子量 3 ~ 10 kDa 及分子量 30 ~ 50 kDa 等三種細菌胞外產物者，注射劑量在 0.3 ml 以下皆安全；若製劑組成為不活化菌體、[不活化菌體+弗氏完全佐劑]、[不活化菌體+弗氏不完全佐劑]等三種含死菌體者，安全的注射劑量達 0.6 ml；若製劑組成為 [不活化菌體+分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 胞外液+弗氏完全佐劑] 及 [不活化菌體+分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 胞外液+弗氏不完全佐劑] 二種，則最高的安全注射量為 0.1 ml。由安全試驗結果發現，單獨以不活化菌體與其胞外產物或與弗氏佐劑分別對海



**Fig. 2** Antibody titer of cobia (*Rachycentron canadum*) intraperitoneally vaccinated with inactivated *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* at 3 different cell density. Mean ( $\pm$ S.E.) with different letters is significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table 1** Survival rate of 8 candidate *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* vaccines intraperitoneally vaccinated cobia (*Rachycentron canadum*)

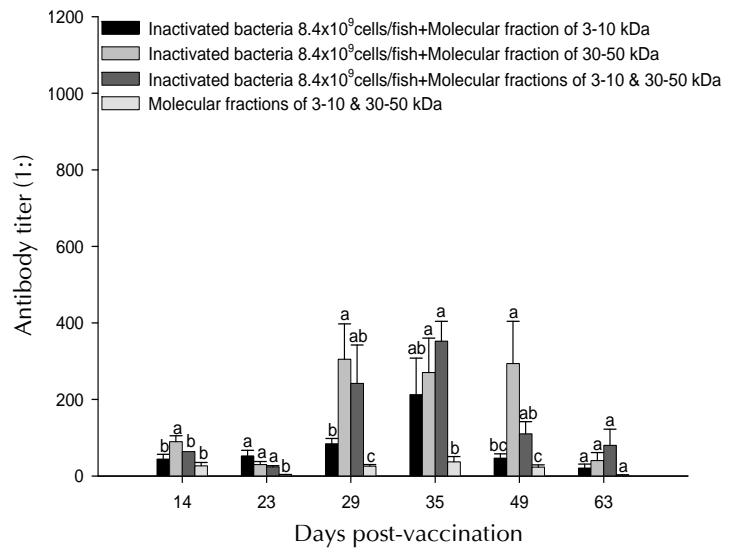
Candidate vaccines	Volume injected (ml)	Survival rate (%)			
		0.1	0.2	0.3	0.6
Molecular fraction of <3 kDa		100	100	100	ND*
Molecular fraction of 3-10 kDa		100	100	100	ND
Molecular fraction of 30-50 kDa		100	100	100	ND
Inactivated bacteria		100	100	100	100
Inactivated bacteria + Freund's adjuvant complete (FAC)		100	100	100	100
Inactivated bacteria + Freund's adjuvant incomplete (FAI)		100	100	100	100
Inactivated bacteria + Molecular fractions of 3-10 & 30-50 kDa +FAC		100	20	0	ND
Inactivated bacteria + Molecular fractions of 3-10 & 30-50 kDa + FAI		100	60	20	ND
Control		100	100	100	100

\*ND: not detected.

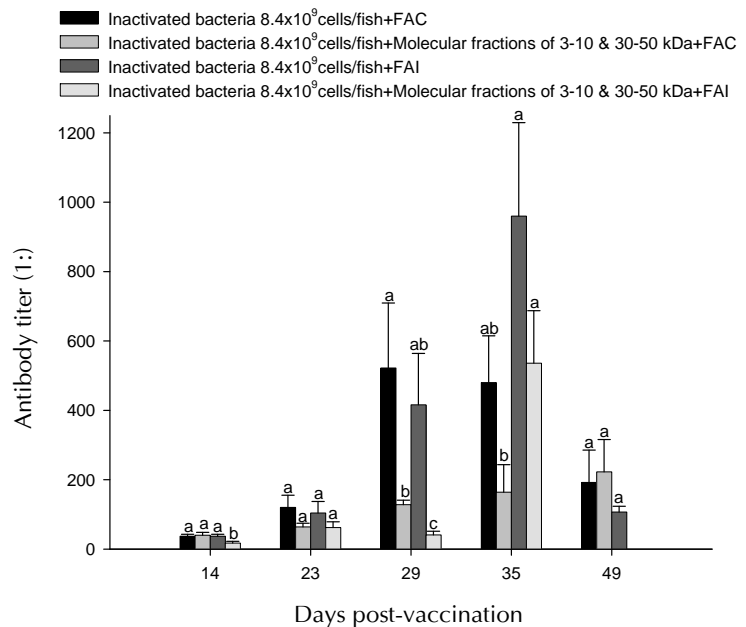
鱘腹腔注射，劑量在 0.3 ml 以下並不會造成海鱘死亡，但若合併細菌胞外產物、不活化菌體及弗氏佐劑的乳化製劑，則安全注射劑量會降至 0.1 ml，推估此結果可能因弗氏佐劑與該製劑中的胞外產物相互作用造成的毒力；且根據林 (2002) 探討海鱘發光桿菌致病性的結果發現，分子量為 34.3 kDa 的純化物質，對海鱘血球具溶血能力，也會造成海鱘死亡。因此，細菌胞外產物對魚鰓細胞（纖維細胞）增殖雖不具影響，但因其具溶血特性，若與油性佐劑並用，於腹腔高劑量注射時，對魚體的毒性可能會提高。

以抗體效價評估候選疫苗製劑的最佳組成，結果示如 Figs. 2 ~ 4。本研究的候選疫苗組成主要分為三部分，一是含不同菌量的不活化菌體製劑，二為含不活化菌體和細菌胞外產物的混合製劑，三為含不活化菌體、細菌胞外產物及弗氏佐劑的混合製劑。Fig. 2 所示為海鱘以不活化菌體  $2.8 \times 10^9$ 、 $8.4 \times 10^9$  及  $1.7 \times 10^{10}$  cells/fish 接種的抗體力價，結果發現三組海鱘的抗體力價在接種後的 29 ~ 49 天皆有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，且以  $8.4 \times 10^9$  及  $1.7 \times 10^{10}$  cells/fish 二種候選疫苗製劑較優，這二種疫苗間並無差異 ( $p > 0.05$ )，其抗體力

**Fig. 3** Antibody titer of cobia (*Rachycentron canadum*) intraperitoneally vaccinated with inactivated bacteria and molecular mass fractionation admixtures of extracellular products of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Mean ( $\pm$ S.E.) with different letters is significantly different ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4** Antibody titer of cobia (*Rachycentron canadum*) intraperitoneally vaccinated with inactivated bacteria, adjuvant, and molecular mass fractionation admixtures of extracellular products of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Mean ( $\pm$ S.E.) with different letters is significantly different ( $p < 0.05$ ).

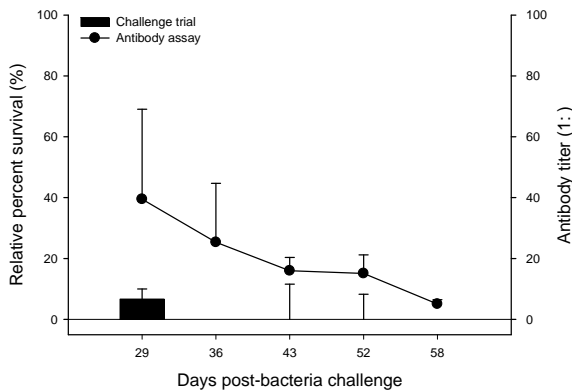


價依序各為 1:163 ~ 1:187 及 1:110 ~ 1:393；此結果與方 (2009) 以 0.5% 福馬林去活化的發光桿菌疫苗為候選疫苗製劑，其免疫劑量 0.333 mg/g fish 組對海鱺所誘發的專一性抗體力價明顯高於 0.006 mg/g fish 組結果類似。Fig. 3 所示為海鱺接種不活化菌體和細菌胞外液的混合製劑的抗體力價，於接種後的 14 ~ 49 天，不同處理組間皆顯現差異 ( $p < 0.05$ )，且以 [不活化菌體  $8.4 \times 10^9$  cells/fish + 分子量 30 ~ 50 kDa 胞外液] 及 [不活化菌體 + 分子量 3 ~ 10 & 30 ~ 50 kDa 胞外液] 二種製劑的抗體力價最佳，接種後的 29 ~ 49 天的抗體力價，分別各為 1:270 ~ 1:305 及 1:110 ~ 1:352，這二種候選疫苗間並無差異；若與前述僅具不活化菌體  $8.4 \times$

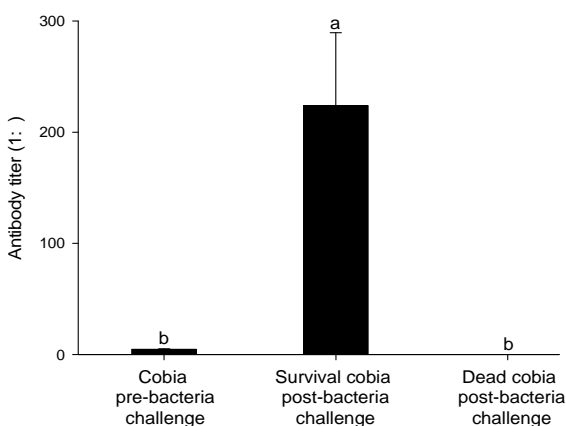
$10^9$  cells/fish 的候選疫苗製劑之抗體力價 1:163 ~ 1:187 比較，則其間亦無差異；方 (2009) 也獲得相同的結果。Fig. 4 所示為海鱺接種不活化菌體、細菌胞外液及弗氏佐劑的混合製劑的抗體力價；於接種後的 29 ~ 35 天，含 [不活化菌體 + 弗氏佐劑 (包括完全及不完全佐劑)] 的抗體力價顯然遠高於疫苗組成為 [不活化菌體 + 胞外產物 + 弗氏佐劑] 者 ( $p < 0.05$ )；含 [不活化菌體 + 弗氏完全佐劑] 的抗體力價為 1:480 ~ 1:523，而含 [不活化菌體 + 弗氏不完全佐劑] 者則為 1:416 ~ 1:960，且這二種候選疫苗間並無差異；顯然油性佐劑對疫苗製劑的抗體力價有非常明顯的提升效果。

若以低於前述最佳菌量的候選疫苗製劑，即

發光桿菌不活化菌體  $5.6 \times 10^9$  cells/fish 接種海鱺，定期檢測其抗體力價及經攻擊試驗後的活存率，發現僅在疫苗接種後的 29 天，海鱺有  $7 \pm 3\%$  的相對活存率，此時的抗體力價也僅  $1:40 \pm 30$ ，且在 35 天以後，相對活存率皆為 0，抗體力價在 25 倍以下，顯然候選疫苗製劑之不活化菌體的菌量若低於  $5.6 \times 10^9$  cells/fish，將對海鱺不具保護作用 (Fig. 5)。Fig. 6 所示為海鱺在發光桿菌攻擊前、攻擊後活存及死亡的抗體力價，其中顯然以攻擊後活存的海鱺之抗體力價最高 ( $p < 0.01$ )，其為  $1:224 \pm 66$ ；若將此值設定為具保護力的基準，則前述的不活化菌體及合併其細菌胞外產物的最佳候選疫苗製劑的保護期約有 20 天，而含不活化菌體及弗氏佐劑的候選疫苗製劑，則在 20 天以上。



**Fig. 5** Protection and antibody titer of cobia (*Rachycentron canadum*) intraperitoneally vaccinated with inactivated *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



**Fig. 6** Antibody titer of cobia (*Rachycentron canadum*) pre-bacteria challenge, survival cobia and dead cobia post-bacteria challenge with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Mean ( $\pm$ S.E.) with different letters is significantly different ( $p < 0.01$ ).

綜上結果可知，上述的海鱺發光桿菌候選疫苗，其組成以不活化菌體 ( $8.4 \times 10^9$  cells/fish) 及弗氏佐劑的等量混合製劑最優。死菌體的劑量宜為  $8.4 \times 10^9 \sim 1.7 \times 10^{10}$  cells/fish，安全注射劑量在 0.6 ml 以下。Jiao *et al.* (2010) 曾比較弗氏不完全佐劑及鋁鹽佐劑 (氫氧化鋁、磷酸鋁) 對愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 抗原在比目魚之免疫反應的影響，結果發現以弗氏不完全佐劑的保護力最佳，磷酸鋁次之；方 (2009) 也比較魚油、沙拉油或氫氧化鋁佐劑對發光桿菌疫苗誘發專一性抗體力價之影響，結果以氫氧化鋁佐劑效果最好，但抗體力價持續時間相對短。總之，為提高疫苗製劑的保護力及效期，充分發揮佐劑的功能，並考慮疫苗產品的安全性及商品化的可能性，未來研發發光桿菌疫苗，將以不活化菌體及核可在水產動物使用的多成分及多路徑刺激免疫系統的佐劑為研發主軸，期為海鱺開發高效能之發光桿菌疫苗。

## 謝辭

本研究承蒙行政院農業委員會「98 農科-1.1.7-水-A2」及「99 農科-1.1.2-水-A5」之計畫經費補助，謹此誌之。

## 參考文獻

- 日本水產省動物醫藥品檢查所  
[http://www.nval.go.jp/asp/asp\\_dbDR\\_idx.asp](http://www.nval.go.jp/asp/asp_dbDR_idx.asp).
- 方宜鈞 (2009) 巴斯德桿菌去活化疫苗不同免疫策略對海鱺專一性免疫反應之影響。國立台灣大學動物學研究所 碩士論文, 68 pp.
- 吳佳瑞 (2006) 養殖海鱺感染巴斯德桿菌之病理學與細胞凋亡研究。國立台灣海洋大學水產養殖學系 碩士論文, 108 pp.
- 林積陽 (2002) 養殖海鱺細菌性病原之分離及巴斯德桿菌之致病性研究。國立台灣海洋大學水產養殖學系 碩士論文, 100 pp.
- 胡志全 (2005) 巴斯德桿菌對養殖海鱺致病性研究。國立台灣海洋大學水產養殖學系 碩士論文, 110 pp.
- 楊惠郎 (2003) 第二十七章 動物疫苗。醫藥基因生物技術教學資源中心主編，後基因體時代之生物技術。教育部顧問室編印，臺北，台灣，411-430。
- 張家榮 (2008) 巴斯德桿菌及溶藻弧菌混合疫苗應用於養殖海鱺之研究。國立台灣海洋大學水產養殖學系 碩士論文, 96 pp.

- 劉秉忠, 黃之暘, 李國誥 (2006) 優質海鱸種苗之養殖管理. 優質種苗與水產養殖專刊 XII, 中華民國水產種苗協會編印, 15-30.
- 劉秉忠、蔡俊男、李國誥 (2005) 箱網養殖海鱸細菌性疫苗開發及有效性研究. 漁業署養殖特刊 9, 魚病研究專輯 22: 41-50.
- 郭錦朱 (2009) 簡介日本核准上市的水產疫苗. 水試專訊, 25: 48.
- 陳炳傑 (2003) 養殖海鱸巴斯德桿菌疫苗之應用研究. 國立台灣海洋大學水產養殖學系 碩士論文.
- 陳惠恩 (2002) 利用海鱸血清分析巴斯德桿菌抗原. 國立成功大學生物科技研究所 碩士論文, 67 pp.
- 蔡俊男 (2005) 細菌性疫苗應用於養殖海鱸之研究. 國立台灣海洋大學水產養殖學系 碩士論文.
- 鄭明忠 (2007) 發光菌株 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 對養殖海鱸致病性及親緣關係之研究. 屏東科技大學水產養殖學系 碩士論文, 70 pp.
- Agnew, W. and A. C. Barnes (2007) *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.*, 122: 1-15.
- Aguilar, J. C., and E. G. Rodriguez (2007) Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25: 3752-3762.
- Bakopoulos, V., D. Volpatti, A. Adams, M. Galeotti and R. Richards (1997) Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 161-174.
- Bakopoulos, V., D. Volpatti, L. gusmani, M. Galeotti, A. Adams and G. J. Dimitriadis (2003) Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *J. Fish Dis.*, 26(2): 77-90.
- Bravo, S. and P. J. Midtlyng (2007) The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999–2003. *Aquaculture*, 270: 36-42.
- Bricknell, I. and R. A. Dalmo (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 457-472.
- Gravningen, K., M. Sakai, T. Mishiba and T. Fujimoto (2008) The efficacy and safety of an oil-based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): A field study. *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 523-529.
- Gudding, R., A. Lillehaug and Ø. Evensen (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 72: 203-212.
- Hanif, A., V. Bakopoulos and G. J. Dimitriadis (2004) Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 411-435.
- Hanif, A., V. Bakopoulos, I. Leonardos and G. J. Dimitriadis (2005) The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 345-361.
- Jiao, X. D., S. Cheng, Y. H. Hua and L. Sun (2010) Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an Edwardsiella tarda major antigen. *Vaccine*, 28: 1832-1837.
- Liao, I. C., T. S. Huang, W. S. Tsai, C. M. Hsueh, S. L. Chang and E. M. Leaña (2004) Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*, 237: 155-165.
- Lorenzen, N. (1999) Recombinant vaccines: experimental and applied aspects. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 361-365.
- Magarinos, B., J. L. Romalde, J. L. Barja, S. Nunez and A. E. Toranzo (1999) Protection of gilthead seabream against Pasteurellosis at the larval stages. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19: 159-161.
- Magarinos, B., J. L. Romalde, Y. Santos, J. F. Casal, J. L. Barja and A. E. Toranzo (1994) Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, 120: 201-208.
- Mutoloki, S., S. Alexandersen, K. Gravningen and O. Evensen (2008) Time-course study of injection site inflammatory reactions following intraperitoneal injection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with oil-adjuvanted vaccines. *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 386-393.
- Pakingking Jr., R., N. B. Bautista, E. G. de Jesus-Ayson and O. Reyes (2010) Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 28: 525-533.

## Preparation Method of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Vaccine for Cobia (*Rachycentron canadum*)

Jiin-Ju Guo<sup>\*</sup>, Chih-Hsien Chen, Chung-Hsin Yeh, Chih-Ming Kuo and Tzyy-Ing Chen

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

The aim of this study was to find an optimal preparation method of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* vaccine for cobia (*Rachycentron canadum*). Various candidate vaccines combined with inactivated bacteria, extracellular products and Freund's adjuvant were used to assay their efficiency against photobacteriosis by the safety trials and antibody response. The results showed that both inactivated bacteria and all extracellular products did not decrease the proliferation of gill cell. The best candidate vaccine was an admixture of inactivated bacteria of  $8.4 \times 10^9 \sim 1.7 \times 10^{10}$  cells/fish ( $p < 0.05$ ) and Freund's adjuvant which produced high antibody titer from 1:416 to 1:960 during 29 ~ 35 days post-vaccination.

**Key words:** vaccine, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, antibody, cobia (*Rachycentron canadum*)

---

\*Correspondence: Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute, Pingtung 928, Taiwan. TEL: (08)832-4121; FAX: (08)832-0234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw