

鰻魚愛德華氏菌「快易檢」套組之研發

朱惠真¹、劉旭展¹、黃美瑩¹、陳力豪¹、張錦宜²

¹水產試驗所水產養殖組、²水產試驗所

前言

愛德華氏菌為水中常見的細菌，也是水產上常見的條件性致病菌。愛德華氏菌隸屬腸桿菌科 (Enterobacteriaceae)，總共分為 3 種，分別為 *Edwardsiella tarda*、*Edwardsiella ictaluri* 和 *Edwardsiella hoshinae*，為革蘭氏陰性菌，兼性厭氧無夾膜，不形成芽孢，以鞭毛作為運動器官，除了 *E. ictaluri* 適合生長的溫度為 25—30℃，其餘 2 種細菌最適生長溫度為 37—42℃，其中又以 *E. tarda* 及 *E. ictaluri* 為魚類主要的致病菌。*E. tarda* 的毒性較強，廣泛的感染淡水及海水養殖種類，如鰻、牙鯢、虹鱒及吳郭魚等；在兩棲類會感染牛蛙，爬蟲類則會感染中華鱉。在臺灣 *E. tarda* 主要的感染對象為鰻魚，鰻魚養殖年產值約 80 億元，為國內高產值的重要養殖魚種，但每年因病害造成的損失約有 5%。在常見鰻魚疾病中，又以潰瘍症（俗稱愛德華氏症）發生頻率最高（約 85%），每年因此病直接造成的損失即達 3 億元以上。

近年來，由於生物技術的日新月異，世界各國紛紛投入眾多研究人力，開發水產動物疾病檢驗試劑。本所近年來已陸續開發出多種臺灣常見魚病細菌之快速檢測套組，其中在鰻魚疾病檢測方面已開發：(1)「鰻魚潰瘍症病原菌檢測套組」：利用一滴水或一根

牙籤即可在 24—36 小時內檢出樣本內 *E. tarda* 的數量；(2)「鰻魚潰瘍症病原菌藥物敏感性檢測套組」：可協助獸醫師在 12 小時內，快速、準確地篩選出合法可用的藥物，不需使用額外的儀器。上述兩種檢測套組均已技術轉移給民間業者，本套組則是利用膠體金免疫呈色的方式，在 15 分鐘內精確的檢測養殖池水有無受到 *E. tarda* 的感染，適用於池邊出診快篩，更有利於及早掌握疫情。

鰻魚愛德華氏菌「快易檢」套組之原型開發

一、抗原及多株抗體製備

總共取得 13 株 *E. tarda* 菌株，此 13 株細菌分別為 1 株人類糞便標準菌株、5 株來自於日本鰻檢體純化、3 株來自於歐洲鰻檢體純化、2 株來自於鱸鰻及非洲鰻檢體純化和另 2 株來自於紅蟲檢體純化；將此 13 株細菌經由數次繼代及純化後進行抗原備製。將培養 24 小時後取得之 500 ml 菌液，濃縮離心後將菌塊加入細胞破碎液，於冰上以超音波震盪器將之破碎，離心取上層液均勻混合作為抗原溶液，以免血清製作多株抗體。利用 ELISA 的檢測方式驗證抗體和抗原之間的結合度，免疫過程中將施打抗原 0 天、47 天及 62 天的兔血清抽出，分別稀釋 10^3 、 10^4

及 10^5 後與抗原結合，經 ELISA 分析，兔血清純化後所得的抗體力價平均數值可達 2.680，血清和抗原的結合度最高可以達到 2.834 (圖 1)。

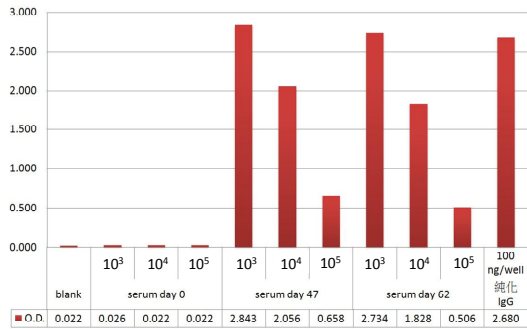


圖 1 抗體力價 ELISA 分析結果

二、免疫試片之組裝

以愛德華氏菌樣品進行檢測，求得最佳濃度，分別為一次抗體的濃度範圍為 0.25—1.0 mg/ml，二次抗體為 0.2—0.5 mg/ml。本研究設立之免疫試片原型如圖 2 所示，此免疫試片的測定方式是將免液層析試片浸泡於緩衝液中，利用毛細作用將樣品帶至 T-line (檢測線) 與薄膜上兔血清純化出的愛德華氏菌抗體反應，含膠體金的 IgG 會在 C-line (控制線) 和 IgG 抗體反應呈色，最後將免液層析試片陰乾後 15 分鐘內就可以判讀結果。若為陽性，試紙上會有 2 條清晰的顯色條帶 (C-line 和 T-line 皆呈色)，陰性則只有一條色帶 (僅 C-line 呈色)。

三、免疫試片之專一性測試

利用愛德華氏菌檢測試片進行專一性測試，觀察對其他的細菌是否有偽陽性之情形發生，分別調製 10^8 CFU/ml 濃度的菌液，取 50 μ l 再加入 450 μ l 的緩衝液後，將試片泡入菌溶液中 15 分鐘後判讀呈色結果。結果發現

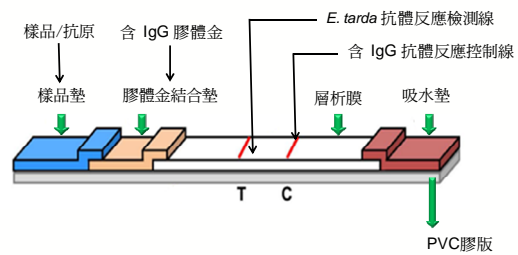


圖 2 鰻魚愛德華氏菌免疫膠體金試紙原型

在檢測的 57 個菌株中，有 11 株細菌呈陽性，2 株細菌株呈弱陽性，而有 44 株細菌呈陰性，其中呈陽性反應的 11 個細菌株皆是 *E. tarda*，2 株呈弱陽性的菌株是 *Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio harveyi* (表 1)。

四、免疫試片之靈敏度測試

將專一性測試結果顯色呈析較強的五株 *E. tarda* 挑出檢測其靈敏度，發現愛德華氏菌檢測試片之靈敏度只達 10^7 CFU/ml (圖 3)，

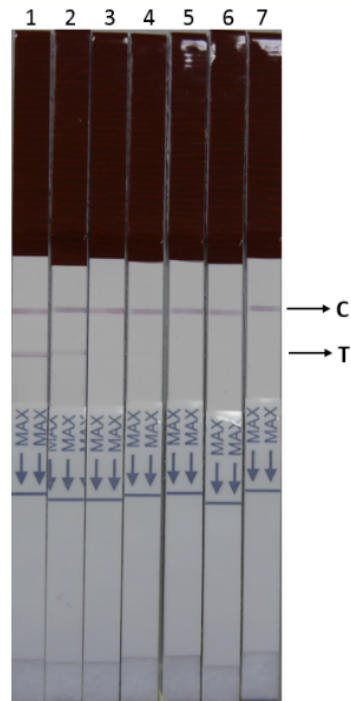


圖 3 不同濃度的愛德華氏菌液 (Lane1-7 分別為 10^2 - 10^8 CFU/ml) 之免疫試片靈敏度測試

表 1 免疫試片之專一性測試。共測定 57 株細菌，其中 11 株細菌測定結果為正反應（出現 2 條色帶），2 株細菌為微弱正反應，其餘 44 株為負反應（僅出現 1 條色帶）

編號	菌 種 名 稱	檢 測 結 果	判 讀
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>		+/-
2	<i>Edwardsiella tarda</i>		+
3	<i>Escherichia coli</i>		-
4	<i>Vibrio alginolyticus</i>		-
5	<i>Vibrio salmonicida</i>		-
6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		-
7	<i>Vibrio harveyi</i>		+/-
8	<i>Photobacterium damsela sub. damsela</i>		-
9	<i>Vibrio anguillarum</i>		-
10	<i>Aeromonas punctata</i>		-
11	<i>Edwardsiella tarda</i>		+
12	<i>Streptococcus iniae</i>		-
13	<i>Photobacterium damsela sub. piscicida</i>		-
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-
15	<i>Enterococcus faecalis</i>		-
16	<i>Lactococcus garvieae</i>		-
17	<i>Aeromonas salmonicida</i>		-
18	<i>Enterococcus faecium</i>		-
19	<i>Bacillus subtilis</i>		-
20	<i>Edwardsiella ictaluri</i>		-
21	<i>Edwardsiella ictaluri</i>		-
22	<i>Edwardsiella tarda</i>		-
23	<i>Edwardsiella tarda</i>		+
24	<i>Bacillus subtilis</i>		-
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-
26	<i>Listeria monocytogenes</i>		-
27	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>		-
28	<i>Edwardsiella tarda</i>		+
29	<i>Photobacterium leiognathi</i>		-
30	<i>Edwardsiella tarda</i>		+
31	<i>Vibrio furnissii</i>		-
32	<i>Vibrio fluvialis</i>		-
33	<i>Vibrio campbellii</i>		-
34	<i>Vibrio diazotrophicus</i>		-
35	<i>Edwardsiella tarda</i>		+
36	<i>Vibrio marinus</i>		-

37	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			-
38	<i>Vibrio proteolyticus</i>			-
39	<i>Vibrio splendidus</i>			-
40	<i>Vibrio natriegens</i>			-
41	<i>Vibrio nereis</i>			-
42	<i>Vibrio mimicus</i>			-
43	<i>Edwardsiella tarda</i>			+
44	<i>Edwardsiella tarda</i>			+
45	<i>Edwardsiella tarda</i>			+
46	<i>Edwardsiella tarda</i>			+
47	<i>Vibrio ichthyenteri</i>			-
48	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>			-
49	<i>Edwardsiella tarda</i>			+
50	<i>Enterobacter ludwigii</i>			-
51	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>			-
52	<i>Pseudomonas putida</i>			-
53	<i>Escherichia coli</i>			-
54	<i>Vibrio crassostreae</i>			-
55	<i>Aeromonas schubertii</i>			-
56	<i>Lactococcus lactis</i>			-
57	<i>Lactococcus garvieae</i>			-

稍嫌偏低。因此本研究再開發採樣套組（圖4），利用手動濃縮的方式，將樣本濃縮 50 倍後檢測，最終使靈敏度提高至 10^5 CFU/ml。

五、田間試驗

在南部 4 個主要縣市的養殖現場，進行測試，結果如表 2。回收的 75 個樣本中，水體樣本為陽性的共檢出 3 場，組織樣本為陽性的亦檢出 3 場，除嘉義及臺南完全沒有病例之外，2015 年鰻魚愛德華氏症在各縣市也只有零星的病例，因此間接影響到本檢套組的疾病檢出率。不過，以「快易檢」套組篩

選為陽性的樣本，經傳統微生物方法確認，均可分離到 *E. tarda*。

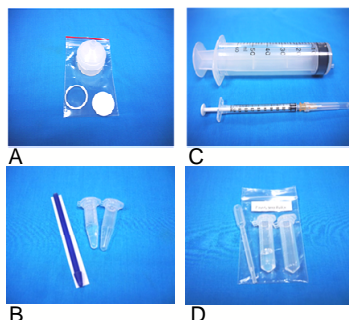
六、結語

田間試驗結果顯示，樣本的敏感度普遍不高，由於 *E. tarda* 較容易躲藏於後腎組織，容易有潛伏感染期，而且養殖鰻魚業者看到有疑似感染愛德華氏症的症狀或出現死亡時，習慣先下藥，因此壓低了水中病原數量。但由結果顯示，陽性的檢出率達 100%，因此本套組可以準確的檢驗出 *E. tarda*，因為套組中有濃縮的設備，感染初期即可及時檢測出

E. tarda 的存在，其操作方法簡單，且不需要繁雜的設備及專業研究人員，因此對於平日之養殖管理具有一定的成效，水產獸醫師也可用來作為現場檢病的工具，若能輔導業者

使用，應可減少藥物濫用造成的環境污染以及藥物殘留，進而達到預防勝於治療的目的。

套組內容



套組內容包含有：(A)轉接頭，濾膜1張；(B)滅菌研磨棒1支、900 μ l buffer以及含200 μ l 生理食鹽水之1.5 ml 滅菌試管各1管；(C) 50 ml及1 ml 滅菌針筒各1支；(D) *E. tarda* strip buffer，滅菌滴管1支，1 ml buffer 以及 2 ml 滅菌試管各1管

使用步驟



圖 4 鰻魚愛德華氏症「快易檢」採樣套組使用說明

表 2 鰻魚愛德華氏症快檢套組田間試驗結果

雲林縣 (水體樣本)		疾病狀況		雲林縣 (組織樣本)		疾病狀況	
		有	無			有	無
檢出結果	陽性	2	0	檢出結果	陽性	0	0
	陰性	13	2		陰性	18	1
高雄市 (水體樣本)		疾病狀況		高雄市 (組織樣本)		疾病狀況	
		有	無			有	無
檢查結果	陽性	1	0	檢查結果	陽性	0	0
	陰性	6	0		陰性	7	3
屏東縣 (水體樣本)		疾病狀況		屏東縣 (組織樣本)		疾病狀況	
		有	無			有	無
檢查結果	陽性	0	0	檢查結果	陽性	2	0
	陰性	3	0		陰性	1	0
臺東縣 (水體樣本)		疾病狀況		臺東縣 (組織樣本)		疾病狀況	
		有	無			有	無
檢查結果	陽性	0	0	檢查結果	陽性	1	0
	陰性	1	13		陰性	0	0