

综 述

鱼用疫苗的现状及其发展趋势

THE EXISTING SITUATION AND TENDENCY IN DEVELOPMENT OF FISH VACCINE

杨先乐

(长江水产研究所, 荆沙市 434000)

Yang Xianle

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Jinshashi 434000)

陈远新

(洪湖市水产技术推广站, 433200)

Chen Yuanxin

(Honghu Spread Station of Aquatic Technology, 433200)

关键词 鱼类, 疫苗, 现状, 趋势

KEYWORDS Fish, Vaccine, Existing situation, Tendency

1 发展过程

鱼用疫苗的发展经历了以下三个阶段:

(1) 试验探索期(1942~1975) Duff [1942]首次应用灭活的杀鲑产气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)口服免疫硬头鲈获得成功。虽然他的试验未能被后人重复证实,但毕竟开创了疫苗在鱼类应用上的新纪元。此后人们纷纷效仿,对那些暴发性和难以用药物防治的鱼病,探索性地制备疫苗进行免疫预防[Bauer, 1953、1959; Schaperclaus, 1954; Ross 和 Klontz, 1965]。其中,有些获得成功[如弧菌苗、肠道性红嘴病(ERM)菌苗],有些处于窘境之中(如病毒性出血败血症减毒疫苗出现返强现象),有些因大量生产困难而不能实施(如小瓜虫病疫苗),有些因效果不稳定而影响应用前景(如疔疮病疫苗)。这一时期的探索,使人们认识到了应用疫苗预防鱼类疾病的可能。

(2) 生产应用期(1975~1984) 1975年美国疫苗有限公司(AVL)获准生产商品性鱼用疫苗,第一种获准生产的是ERM菌苗。1981年英、法等国家也开始了鱼用疫苗商品生产与销售,以后加拿大、丹麦、日本以及我国的台湾也出现了类似的工厂与公司。生产上应用的商品疫苗有:ERM菌苗、香鱼、鳗鲡以及虹鳟弧菌苗、迟钝爱德华氏菌苗等。疫苗的商品化生产和应用,进一步促进了鱼用疫苗的研究,人们在增强疫苗的免疫效果,探

索最佳的免疫途径以及对病毒病疫苗的制备进行了广泛的研究,并获得了较大的进展。1984年2月在法国巴黎首次举行了鱼用疫苗接种研讨会,24个国家和地区的78名代表以及联合国粮农组织和国际动物流行病学办公室的官员参加了会议,研讨会检阅了鱼用疫苗的应用与研究状况,这次会议是鱼用疫苗发展史上的一个重要里程碑。

(3)攀登发展期(1984年以后) 用新技术、新方法研制病毒病疫苗、高效价菌苗是该时期的主要特点。Awad等[1989]从斑点叉尾鲷病毒(CCV)中提取了一种蛋白外壳的亚单位疫苗,获得了理想的免疫效果。Gilmore等[1988]从传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)中分离到一种糖蛋白基因G,他们将此糖蛋白的基因Sau 3AI片断组合到埃氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,得到了一种糖蛋白抗原。Mark和Leong[1989]证明这种糖蛋白具有较强的免疫原性,能有效地防治传染性败血症的感染。IHNV基因工程疫苗已获专利,最近已开始小批量生产。

2 种类

2.1 根据疫苗的获得方法

2.1.1 死疫苗

亦称灭活疫苗。它是将病原体的感染性蛋白用某种方法灭活后而获得。这种疫苗安全性好、制造容易,但存在免疫剂量较大、免疫持久性较差或者免疫效果不理想等问题。该类疫苗有VHS疫苗、CCV疫苗、草鱼出血病细胞培养灭活疫苗(CFRV疫苗)以及鳃弧菌苗等[Plumb, 1973; De Kinkelin和Bearzotti, 1981; Evelyn, 1984; 杨先乐等, 1989]。

2.1.2 活疫苗

目前鱼用疫苗有三种类型:(1)用致病性已大为减弱的减毒株制备的疫苗,常称为弱毒疫苗。该类疫苗都具有较好的免疫原性,且免疫剂量小,免疫持续期长,但安全性较差,易出现反强现象。该类疫苗有VHSV的F₂₅(21)抗热株疫苗[Vestergaard-Jorgensen, 1976]、CCV减毒疫苗[Walczak等, 1981]、疔疮病减毒菌苗[Cipriano和Starliper, 1982]、IHNV减毒疫苗[Fryer等, 1976]以及草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗[许淑英等, 1994]等。(2)将有致病力的病原菌作为疫苗,但需用异常的给予方式或与抗血清同时应用。如草鱼出血病低温隐性感染疫苗在生产应用上取得了较好的免疫效果(康惠等, 1989),但目前尚未在理论上得到完美的解释。(3)利用与病原体有交叉反应的异种抗原制成的疫苗,常称为异种疫苗。接种后它能使机体对该疫苗中不含有的病原体产生抵抗力。该疫苗的优点是安全性好,免疫持续期长,但获得比较困难。如防治小瓜虫病的梨形四膜虫疫苗[Goven等, 1980, 1981; Rukyari和Taukhid, 1990]。

2.1.3 亚单位疫苗

通过提取病毒的亚单位(如蛋白壳、血凝素等)而制成的疫苗。其优点是可除去核酸、减少致癌作用和一些异常反应,避免抗原间的竞争,提高免疫效果,但制造困难。CCV蛋白壳亚单位疫苗就是其中的一种[Awad等, 1989]。

2.1.4 化学疫苗

用化学方法提取细菌的有效成份(如类脂多糖)而制成。该疫苗具有接种量小、免疫原性强、反应小等优点,但制造技术复杂。这类疫苗有鳃弧菌、斑点叉尾鲷肠道败血症(ESC)、类结节症、鲤鱼嗜水气单胞菌以及草鱼烂鳃病LPS疫苗[川合研儿和楠田理一, 1983; Fulvio和Riichi, 1985; Baba等, 1988; 陈昌福和纪国良, 1989]。一般认为,LPS具有病原菌大多数或全部抗原,具有多个抗原决定簇,且对热稳定,是一种较好的化学疫苗[Johnsen, 1977]。此外也有提取细菌A抗原制备疫苗的尝试[Trust等, 1980; Hastings和Eilis, 1990; Thuvander等, 1993]。

(1) 康惠等, 1989。1990年草鱼出血病防治技术研究专题鉴定材料。

2.1.5 基因工程疫苗

该疫苗是将某一病原的主要免疫原性蛋白的密码基因 DNA 转移、重组后获得的[北尾忠利和青木 宙, 1988]。目前水产上在研究应用的基因工程疫苗有 IHNV、IPNV、鳗鱼病毒(EVA、EVEK)、草鱼呼肠弧病毒(FRV)、文蛤病毒以及鲑鱼疮痂虱等基因工程疫苗[吴金洲, 1987; Mark 和 Leong, 1989; Jenkins 等, 1992]。无疑这种疫苗成本低, 易于规模生产, 但是它也有一些问题尚待解决, 如研究周期较长, 难以解决燃眉之急; 免疫原成份单一, 若遇到病原体微小变异, 就有可能失去它的免疫保护作用; 有些病毒基因工程疫苗还不能象完整病毒那样在动物体内产生是足够量的抗体而起到免疫预防作用。

2.2 根据疫苗的性质与组成成份

2.2.1 单价疫苗

仅由一种微生物纯培养所获得, 这种疫苗只对一种血清型的病原微生物有保护作用, 如迟钝爱德华氏菌苗、疔疮病菌苗以及鳗弧菌单价苗等[Rosenkvist-Jensen, 1984]。

2.2.2 多价疫苗

由同一种病原微生物若干型或株混合制成, 或者由与其它型(或株)有交叉反应的某种病原微生物的某型(或株)纯培养获得。该疫苗能对同一病原体的若干血清型或不同种(或亚种)的病原体有交叉保护作用。有二价、三价及多价疫苗。如弧菌 *Vibrio anguillarum* 和 *V. ordalii* 有交叉保护作用, 以其任何一种所制成的疫苗均为双价疫苗[Evelyn, 1984]。

2.2.3 联苗(混合疫苗)

含有一种以上病原微生物或其产物制成的疫苗, 该疫苗的各抗原成份是不会相互竞争, 因此它能对一种以上的疾病起到免疫保护作用。含有二种成份的称为二联疫苗, 三种成份的为三联疫苗……。鲑鱼的疔疮病与弧菌二联疫苗是常用的联苗之一[Tebbit 和 Goodrich, 1983]; 在意大利, 已广泛应用 ERM 菌与弧菌二联苗免疫硬头鲑, 并取得了很好的效果[Brisinello 和 Fontebasso, 1991]。

2.3 根据病原的类别

一般分为病毒疫苗、菌苗及寄生虫疫苗三种。目前在研究的病毒疫苗主要有: IHNV 疫苗、IPNV 疫苗、SVCS(鲤鱼弹状病毒)疫苗、CCV 疫苗、CFRV 疫苗、Egtved(鳟鱼埃格替维德弹状病毒)疫苗、VHSV 疫苗、EVA 及 EVEK 疫苗、文蛤病毒疫苗等九种; 菌苗有 11 种: 迟钝爱德华氏菌苗(*Edwardsilla tarda*)、斑点叉尾鲷肠道败血症菌苗(*E. ictaluri*)、弧菌苗(*Vibrio anguillarum* 和 *V. ordalii*)、Hitra 病菌苗(*V. salmonicida*)、红嘴病菌苗(*Yersinia ruckeri*)、疔疮病菌苗(*Aeromonas salmonicida*)、嗜水气单胞菌苗(*A. hydrophila*)、柱状屈挠杆菌苗(*Flexibacter columnaris*)、类结节症菌苗(*Pasteurella piscicida*)、假单胞杆菌苗(*Pseudomonas sp.*)、细菌性肾脏病菌苗(*Renibacterium salmoninarum*)。所涉及的鱼类有鲑、鳟、鳗鲡、香鱼、遮目鱼、大西洋鲑、大麻哈鱼、鲱鱼、斑点叉尾鲷、鲤、草鱼、白鲢、兰鳃太阳鱼、大菱鲆、金头鲷等以及鳖和日本对虾、龙虾、龙螯虾等其它水产动物; 寄生虫疫苗目前仅有二种: 小瓜虫疫苗和鲺病疫苗。

3 制备方法

3.1 灭活的方法

常用热、化学灭活剂、声振荡以及紫外照射等方法灭活。化学灭活剂有福尔马林、氯仿、 β -丙酰内脂、乙二烯亚胺、乙酰基乙烯亚胺、二元乙烯亚胺、苯酚等。0.1% 的福尔马林 4℃ 灭活 17 天的 FRV, 感染性可完全丧失, 但又最大程度地保持了它的免疫原性[杨先乐等, 1990]。Ross 和 Klontz [1965] 最先用酚灭活耶尔森氏菌, 后来 Anderson 和 Ross [1972] 发现以 0.3% 的氯仿灭活者免疫效果最好。

3.2 减毒方法

(1) 从不敏感的其它鱼类分离出天然的减毒株[Hill等,1980];(2)利用对病毒敏感的细胞株(系)连续性代减毒[Fryer等,1976; Vestergaard-Jorgensen,1982];(3)用不敏感的细胞系连续传代减毒[De Kinkelin等,1980];(4)改变病毒复制的环境(如温度、pH等),使其发生变异而减毒[De Kinkelin,1984]。以上减毒的方法均有很大的盲目性,如果采用单克隆抗体技术进行无毒株筛选,获得成功的机率则会大幅度地增加[Coulon等,1982]。

3.3 化学疫苗和亚单位疫苗的制备方法

通过化学方法提取细菌或病毒的有效成份而制成的。选择合适的化学试剂和方法是制备该类疫苗的关键。如用三硝基甲苯裂解病毒后提取蛋白质外壳,用蛋白染料结合法提取细菌表面A抗原,用酚提取细菌的LPS等。目前也有人开始用生物技术的方法合成该类疫苗。

3.4 基因工程疫苗获得主要途径

对于鱼用基因工程疫苗,科学家们常从以下二个方面入手:一是分离具有免疫原性的多肽进行重组,二是改造致病基因,保持抗原性基因。一般认为鱼类病毒的糖蛋白具有抗原性基因,Gilmore等[1988]从IHNV中找到了一种抗原性强的糖蛋白基因G。我国鱼病研究者也力图从FRV中寻找类似基因,目前发现裂解的病毒11种多肽中有5种结构多肽含糖成份,下一步是确定具有免疫原性的多肽及遗传密码。

4 给予途径

鱼用疫苗的给予途径是开发利用鱼用疫苗的一个重要方面,目前疫苗的给予途径有注射、口服、浸浴和喷雾。

注射免疫能有效地利用抗原,使其均匀地分布在鱼体中,获得较强的免疫效果,并能利用佐剂,提高和延长免疫应答反应,对某些疫苗它是唯一有效的给予方式。但使用该给予方式易使鱼受伤,且费时费力,对较小的鱼则更不方便[Evelyn和Ketcheson,1980; Amend和Johnson,1981; Agius等,1983]。口服免疫尽管存在着免疫效果差、疫苗消耗量大等缺点,但因其实施方便,不受时间、地点和鱼体大小的限制,对鱼无损伤,引起了人们的高度重视。第一次鱼用疫苗的成功应用就是通过口服给予的。弧菌苗、疖疮病菌苗、类结节症菌苗均有口服免疫成功的报道。为了避免前消化道分泌物对抗原的破坏,Johnson和Amend[1983]用弧菌苗免疫红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)时,从肛门给予获得了非常满意的效果。进而,Havt等[1988]发现很多真骨鱼类后肠的巨噬细胞有胞饮作用。这一发现提示人们用某种胶囊包被疫苗可避免胃液和胆汁的破坏,而使其安全进入后肠吸收,获得较好的免疫效果。然而这一方案被Lillehaug[1989]的试验否定,他指出,包被的疫苗或与缓释剂结合的疫苗微粒会影响后肠对其吸收,而象LPS一类的抗原不易受到胃液的破坏,只有将疫苗浓缩处理成“疫苗颗粒”,才是提高口服免疫效果的最好途径。浸泡和喷雾均作用于鱼体外部,能导致相同的免疫应答,基本属于同一种类型。Amend和Freder[1976]将鱼高渗处理后用牛血清白蛋白浸浴,开创了浸泡免疫的先例;接着Croy和Amend[1977]用稀释的弧菌苗直接浸泡免疫红大麻哈鱼又获得成功。与此同时,喷雾免疫的方法也开始应用[Gould等,1978]。浸泡和喷雾免疫因处理时间短,所需疫苗量少,使用方便,效果较好而成为目前市售疫苗的主要给予途径。但至今对疫苗进入鱼体的机制还很不了解,免疫原是以可溶性还是颗粒性的方式进入鱼体还有很大的争议[陈秀男和郭光雄,1987]。Tatner和Horne[1983]曾对影响浸泡免疫的因素作过研究,他发现浸泡时间超过10秒,疫苗的吸收量并不增加;高渗对吸收效果不显著;疫苗的吸收量与温度和鱼体大小有关。

5 佐剂对疫苗的作用

佐剂是一种非特异性地增强或改变疫苗免疫应答的物质,一般与疫苗同时使用,或预先使用。与鱼用疫苗联用的佐剂主要有以油为基质和矿物质乳胶为基质的两种类型的佐剂,前者有弗氏不完全佐剂(FIA)、弗氏完全佐剂(FCA)、油包水型乳化佐剂和水包油包水乳化佐剂等,后者有氢氧化铝乳胶、皂土、硫酸铝、钾明矾等[Ward等,1985; Home等,1984; Gould等,1978]。此外,我国在用草鱼柱状曲绕杆菌等疫苗浸泡免疫草鱼时,还使用苣荬碱作佐剂,以增强疫苗的渗透性[赵建培等,1995]。

佐剂对鱼用疫苗的作用一般认为能增加疫苗抗原表面面积,延长其在机体内存留时间,让抗原在鱼体内持续缓慢的释放,使其与淋巴系统细胞充分的接触,从而增强巨噬细胞和浆细胞的活性[Borek,1977; Walke和Foster,1981],增强细胞介导的致敏反应能力[Dunier,1983,1984; 杨先乐和左文功,1993],加快抗体的生存,提高抗体水平[Maisse和Dorson,1976; Stepher和John,1985]。至于佐剂的其它作用,如把无抗原性的物质变为有效的抗原,改变所产生的循环抗体类型,产生实验性自身免疫病或其它类型的变应性疾病以及保护抗原不受体内酶的分解等,至今在鱼类等水生动物上还缺乏研究。

在鱼用疫苗使用时,一般结合注射免疫使用佐剂的较多。如杨先乐和左文功[1993]在应用草鱼出血病细胞培养灭活疫苗注射免疫草鱼时,使用FIA可使疫苗的免疫保护力由不使用佐剂的 $[76.5 \pm 10.9(2)]\%$ 提高到 $[100 \pm 0(2)]\%$;免疫后的草鱼血清中和抗体效价由 $163.5 \pm 43.5(2)$ 提高到 $319.2 \pm 62.7(2)$ 。Paterson和Fryer[1974]用杀鲑气单胞菌苗注射免疫银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)时,亦证明使用油乳佐剂和氢氧化铝佐剂能较大地提高循环抗体的水平。此外,浸浴和喷雾免疫时,也有使用佐剂增强免疫效果的报道。如Tanner和Home[1983]用 C^{14} 标记的弧菌苗免疫虹鳟,发现使用佐剂后疫苗的吸收速度加快,免疫效果提高;Gould[1978]在使用福尔马林灭活的弧菌苗喷雾免疫虹鳟时,测得免疫后的虹鳟血清凝集抗体加入佐剂皂土者可达1:388,而没有加入佐剂的仅为1:32。目前商品性使用佐剂的疫苗有弧菌病与疔疮病联苗,其佐剂的成份与配比尚未公开[Tebbit和Goodrich,1983]。

但是,也有的学者对佐剂使用持有怀疑的态度。有的认为,佐剂对有些鱼用疫苗的增效作用不大[Agius等,1983; Home等,1984],尤其是氢氧化铝等矿物质佐剂对鱼用疫苗的增效作用极不明显,远远低于FCA、FIA或某些油乳佐剂[Dunier,1983,1984; Home等,1984; 杨先乐和左文功,1993],还有更多的学者认为,使用佐剂,尤其是FIA和FCA会出现佐剂病,导致免疫鱼腹膜纤维的坏死,肝脏与胰脏慢性损伤[Home等,1984],鱼生长减慢[Ellis,1981; Ward等,1985]。因此,他们建议,除非能真正有效地提高鱼用疫苗的效能之外,一般不要使用佐剂[Ward等,1985]。

6 前景、存在的问题及发展趋势

鱼用疫苗的应用是可能的。鱼类虽是低等脊椎动物,但它仍有较完善的免疫系统,真骨鱼类的头肾、肾、脾、胸腺、消化道的淋巴组织、血液和淋巴是产生免疫应答的主要器官和组织[Neale和Chavin,1971; Ellis,1977; Rijkers等,1980; Secomers和Manning,1980; Dunier,1983; Chilmonczyk,1985],更大量的试验证明,鱼类具有类似哺乳动物的T淋巴细胞和B淋巴细胞[Stolen和Makela,1975; Yocum等,1975; Eilinger等,1976; Cuchens和Clem,1977; Ruben等,1977; Chilmonczyk,1978],这是应用鱼用疫苗的理论基础,特别是鱼类对疫苗抗原的免疫持续期较长,一般都达3~5个月,有的在1年以上[杨先乐和曾令兵,1993],这更为疫苗的应用创造了良好的条件。

鱼用疫苗的开发是有前途的,因为它在防病效果上具有不可替代性的优点:(1)能有效地保护环境和食用鱼的品质,安全的鱼用疫苗使用后没有污染,在鱼体内没有残留,不会对鱼体产生耐药性;(2)对有些难以用药物防治的鱼病,使用鱼用疫苗是有效的方法之一;(3)随着养殖的强化,大水面鱼病的暴发呈上升趋势,从经济的角度考虑,应用鱼用疫苗免疫预防是一个有效的措施;(4)随着研究的深入,联苗、多价疫苗以及基因工程疫苗的应用,它们的防病效果将会大大超过化学药品等其它防治措施,提高经济效益。

但是鱼用疫苗在发展过程中仍然面临着很多困难,疫苗商品化生产状况与养殖规模还很不适应:(1)有些鱼用疫苗的免疫效果还很不稳定。造成这种现象的原因有:①疫苗本身的免疫原性较差而导致免疫保护力较低[Walczak等,1981];②由于致病体频繁的突变,而使疫苗不能对鱼体产生保护,如IPNV疫苗;③水温、水质、光照、季节等环境不宜而不能发挥疫苗的最佳免疫效果[Dorson,1984; Syriyade,1985];④鱼体自身状况不良,如年龄、体重、营养状况、生理状态、群体效应而影响了其免疫应答[Perlmutter等,1973; Dorson,1974,1977; Corbel,1975; Loon Van等,1981]。(2)某些减毒疫苗还缺乏安全性保障,有返强现象[De Kinkelin,1984]。(3)部分疫苗生产成本太高,影响了应用,如杀鲑产气单胞菌,因繁殖、生长慢,不能在低消耗的发酵罐中大量生产[Miche等,1984]。(4)缺乏简易、高效、经济的给予途径。以上原因,一定程度上制约了疫苗的应用和发展,至使有的学者对鱼用疫苗的前景忧虑重重[Munro,1984; Plumb,1984]。

尽管鱼用疫苗面临着一些困难,但它会以茁壮的生命力不断完善和发展,其发展方向为:

(1)灭活疫苗、弱毒疫苗以及基因工程疫苗同时发展,发挥各自的作用。灭活疫苗以安全可靠、制造容易的优势会在应用中先露头角,弱毒疫苗在减毒方法和检测手段完善之后会出现后来居上的局面,基因工程疫苗会给鱼用疫苗领域带来一个全新的面貌。我们认为,如果今后鱼类生物工程技术高度发展,也不会出现基因工程疫苗一统天下的局面,因为通过生物技术获得的单一抗原,很难应付某些病原体在自然条件下的微小突变。

(2)降低鱼用疫苗成本,是注入其活力的一个重要方面。其途径有:①筛选免疫原性强的毒株、菌种或其它免疫原,提高疫苗的抗原性;②简化培养工艺和改进培养条件;③驯化培养物,使其适宜大规模生产。

(3)探讨有效的免疫途径。研究各种免疫途径及其机制,研究抗原进入和与靶器官相结合的方式,将会促进免疫途径的革新与创造;另一方面采用多种途径给予将是生产应用上的一个重要方面。Sanders[1992]在应用ESC菌苗免疫斑点叉尾鲷时,就是通过浸泡与口服两种方法给予的。

(4)建立有效、简便的鱼类免疫保护的体外评估系统,以克服现有的体内评估方法的繁琐、费时、不经济以及存在着各种干扰的弊病。该系统的建立,将有助于高效疫苗的研究和开发。

(5)疫苗的免疫效果应是相对的而不是绝对的。因此研究影响鱼类免疫应答的因素是合理、有效地应用鱼用疫苗,提高免疫效果的一个重要方面。对于这个问题,主要是研究疫苗、机体与环境三者间的关系。

Dorson[1984]曾指出,判断疫苗的标准主要有二项:输入和输出,前者指的是抗原的质和质量、给予方式及免疫功能细胞对抗原的传递,后者主要是免疫功能细胞的应答。只有从这两个方面对鱼用疫苗进行深入研究,鱼用疫苗才会展现出更加辉煌的局面。

参 考 文 献

- [1] 许淑英等,1994.草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果.水产学报,18(2):110~117.
- [2] 吴金渊,1987.生物技术在水产养殖上之应用.中国水产(台湾),(411):40~42.
- [3] 杨先乐等,1989.草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究——疫苗株的免疫原性及其有效免疫剂量的比较.水产学报,13(2):138~144.
- [4] 杨先乐等,1990.草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究——最佳灭活方法的探讨.中国水产科学,3(1):29~34.
- [5] 杨先乐、左文功,1993.草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究:疫苗的稳定性及佐剂和加强免疫对草鱼免疫应答的影响.水生生物学报,17(1):46~51.
- [6] 杨先乐、曾令兵,1993.草鱼对CFRV疫苗免疫应答的研究.水产学报,17(4):312~318.
- [7] 陈秀男、郭光雄,1987.疫苗在鱼病防治上的应用.中国水产(台湾),(411):32~39.
- [8] 陈昌福、纪国良,1989.草鱼对鱼害粘球菌类脂多糖的免疫反应.淡水渔业,19(4):3~5.
- [9] 赵建培等,1995.在草鱼免疫反应中萜类佐剂性的初步观察.淡水渔业,25(1):3~5.
- [10] 川合研儿、楠田理一,1983.アユのヒブリオ病に対する *Vibrio anguillarum* の抽出りポ多糖経ロワクチンの効果.日本志,49(4):511~514.
- [11] 北尾忠利、青木苗,1988.水产病原微生物の遗传子工学.遗传,42(7):41~45.

- [12] Agius, C., *et al.*, 1963. Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against Vibriosis; Comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *J. Fish Dis.*, **6**:129 ~ 134.
- [13] Amend, D. F. & D. C. Fender, 1976. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions; a model for vaccinating fish. *Science*, **192**: 792 ~ 794.
- [14] Amend, D. F. & K. A. Johnson, 1981. Current status and future needs of *Vibrio anguillarum* bacterins. *Dep. Bio. Standard.*, **49**:403 ~ 417.
- [15] Anderson, D. P. & A. J. Ross, 1972. Comparative study of hagerman redmouth disease oral bacterins. *Prog. Fish-Cult.*, **34**(4): 226 ~ 228.
- [16] Awad, M. A. *et al.*, 1989. Preliminary studies of a newly developed subunit vaccine for channel catfish virus disease. *J. Aquac. Anim. Health.*, (1): 233 ~ 237.
- [17] Baba, T. *et al.*, 1968. Immune protection in carp, *Cyprinus carpio* L., after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. *J. Fish. Dis.*, **11**: 237 ~ 244.
- [18] Bauer, O. N., 1953. Immunity of fish occurring in infections with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dokl. Akad. Nauk Ussr.*, **93**: 377 ~ 379.
- [19] Bauer, O. N., 1959. Parasites of freshwater fish and the biological basis for their control. *Bull. State Sci. Inst. Lake and River Fisheries*, **49**: 236.
- [20] Borek, F., 1977. Adjuvants. In: *The Antigens*, Vol. IV (Ed. by Sela, M.), pp. 370 ~ 420. Academic Press (London).
- [21] Brisincklo, W. & S. Fontebasso, 1991. Primo resoconto sulla vaccinazione contro le batteriosi negli impianti ititici italiani. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica.*, **5**: 56 ~ 61.
- [22] Chilmonczyk, S., 1978. In vitro stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Annales d'immunologie*, **129**(1): 3 ~ 12.
- [23] Chilmonczyk, S., 1985. Evolution of the thymus in rainbow trout. In: *Immunology* (Eds: by Manning, M. J. & M. Tatner) pp. 285 ~ 292. Academic Press (London).
- [24] Cipriano, R. & C. E. Starliper, 1982. Immersion and injection vaccination of salmonids against furunculosis with an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. *Prog. Fish-cult.*, **44**: 167 ~ 169.
- [25] Corbel, M. J., 1975. The immune response in fish; a review. *J. Fish Bio.*, **7**: 539 ~ 563.
- [26] Coulon, P. *et al.*, 1982. Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti-G monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **61**: 97 ~ 100.
- [27] Croy, T. R. & D. F. Amend, 1977. Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquac.*, **12**: 317 ~ 325.
- [28] Cuchens, M. A. & L. W. Clem, 1977. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature of fish T-like and B-like cells. *Cell. Immun.*, **34**: 219.
- [29] De Kinkelin, P. & M. Bearzotti, 1981. Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. *Develop. Bio. Standard.*, **49**: 431 ~ 439.
- [30] De Kinkelin, P., 1984. Immunization against virus diseases occurring in cold water. In: *Symposium of Fish vaccination* (Ed by P. De Kinkelin), 167 ~ 198. O. I. E. Paris.
- [31] Dorson, M., 1974. Production d'anticorps precipitants anti-dinitrophenol chez les alevins de truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri*) immunises a l'age d'un mois. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **278**: 3151 ~ 3152.
- [32] Dorson, M., 1977. Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis. *Bulletin de L' office International des Epizooties*, **87**(5 ~ 6): 405 ~ 406.
- [33] Dorson, M., 1984. Applied immunology of fish. In: *Symposium on Fish vaccination* (Ed: by De Kinkelin, P.), 39 ~ 74. O. I. E. Paris, 20 ~ 20 Feb. 1984.
- [34] Duff, D. C. P., 1942. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immun.*, **44**: 37 ~ 94.
- [35] Dunier, M., 1983. La production d'anticorps seriques chez la truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri* Richardson); influence du rappel et des adjuvants. 73 ~ 78. These Presentee a l'Institut National Agromique, Paris-Grignon.
- [36] Dunier, M., 1984. Absence of anamnestic to DNP-Haemocyanin and DNP-Ficoll in rainbow trout. In: *Fish Immunology* (Eds: by

Manning, M. J. & M. F. Tatner, pp. 171 ~ 184. Academic Press(London).

- [37] Ellis, A. E., 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reaction. In: Dev. Immunobiol. (Eds by Solomo, J. B. & J. D. Horton), 225. Elsevier/North Holland.
- [38] Ellis, A. E., 1981. A field trial of a method to induce auto-immune castration in *salmo salar*. *International Council for the Exploitation of the sea, Mariculture Committee*, F(37):1 ~ 6.
- [39] Edinger, H., et al., 1976. Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.*, 116(6):1547 ~ 1553.
- [40] Evelyn, T. P. T., 1984. Immunization against pathogenic Vibrios. Summary of the questions and discussion. In: Symposium on Fish Vaccination (Ed. by P. De Kinkelin). 121 ~ 150, 238. O. I. E., Paris.
- [41] Evelyn, T. P. T. & J. E. Ketchum, 1980. Laboratory and field observations of antivibriosis vaccines. In: Fish Dis., Third COPRAQ-Session (Ed. by W. Ahne). 45 ~ 54. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [42] Fryer, J. L., et al., 1976. Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathol.*, 10(2):155 ~ 164.
- [43] Fulvio, S. & K. Riichi, 1985. Chemical composition of the lipopolysaccharide from *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 20(2/3):187 ~ 191.
- [44] Gilmore, R. D. et al., 1988. Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protects against viral challenge. *Bio. Tech.*, 6(3):295 ~ 300.
- [45] Gould, R. W., et al., 1978. Spray vaccination: A method for the immunization of fish. *Fish Pathol.*, 13:63 ~ 68.
- [46] Goven, B. A., et al., 1980. Protection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, by immunization. *J. Fish Bio.*, 17:311 ~ 316.
- [47] Goven, B. A., 1981. Protection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) by immunization with varying doses of *Tetrahymena pyriformis* (Lwoff) cilia. *Aquac.*, 23:269 ~ 273.
- [48] Hart, S., et al., 1988. Gut immunology in fish: a review. *Dev. Comp. Immunol.*, 12:453 ~ 480.
- [49] Hastings, T. S. & A. E. Ellis, 1990. Detection of antibodies induced in rainbow trout by different *Aeromonas salmonicida* vaccine preparations. *J. Aquac. Anim. Health.*, 2:135 ~ 140.
- [50] Hill, B. J., et al., 1980. Studies on immunization of trout against IPN. In: Fish Diseases (ED: by Ahne, W.) Proceeding in Life Sciences, pp. 29 ~ 36. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [51] Home, M. T., et al., 1984. The effects of the use of potassium alum adjuvant in vaccines against vibriosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 7(2):91 ~ 99.
- [52] Jenkins, P. G., et al., 1992. Aspects of the molecular biology of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in relation to vaccine design. In: First European crustacean conference, Paris, Aug. 31 ~ Sep. 5, 1992. pp. 76 ~ 77. MNHM. Paris.
- [53] Johnsen, G. S., 1977. Immunological studies of *Vibrio anguillarum*. *Aquac.*, 10:221 ~ 230.
- [54] Johnson, K. A., & D. F. Amend, 1983. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *J. Fish Dis.*, 6(5):473 ~ 476.
- [55] Lillehaug, A., 1989. Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. *J. Fish Dis.*, 12:579 ~ 584.
- [56] Loon Van, J. J. A., et al., 1981. Development of the immune system in carp (*Cyprinus carpio*). Aspects of development and comparative immunology 1 solomon, 469. Pergamon Press.
- [57] Maise, G. & Dorson, M., 1976. Production d'agglutinines anti-*Aeromonas salmonicida* par La Truite Arc-en-Ciel, Influence de la temperature, d'un adjuvant et d'un immunodepresseur. *Annales de Recherches Veterinaire*, 7(4):307 ~ 313.
- [58] Mark, E. H. & C. L. Leong, 1989. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Res.*, 13(3):213 ~ 230.
- [59] Michel, C., et al., 1984. Evaluation of the protective activity and economic efficacy of vaccines for fish. In: Symposium on Fish vaccination (Ed. by P. De Kinkelin), 75 ~ 96, O. I. E., Paris.
- [60] Munro, A. I. S. 1984. A furunculosis vaccine illusion or achievable objective, In: Symposium of Fish vaccination (Ed. by P. De Kinkelin), 97 ~ 120, O. I. E., Paris.

- [61] Neale, N. L. & W. Chavin, 1971. Lymphocyte tissue, alterations during the primary immune response of goldfish. *Mich., Acad.*, **3**: 23 ~ 30.
- [62] Paterson, W. D. & Fryer, J. L., 1974. Immune response of juvenile coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. *J. of Fish. Res. Board. of Canada*, **31**: 1751 ~ 1755.
- [63] Perlmutter, A., et al., 1973. The effect of crowding on the immune response of the blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, to infectious pancreatic necrosis (IPN) virus. *Life Sci.*, **13**: 363 ~ 375.
- [64] Plumb, A., 1973. Neutralization of channel catfish virus by serum of channel catfish. *J. Wildl. Dis.*, **9**: 324 ~ 330.
- [65] Plumb, J. A., 1984. Immunization of warm water fish against five important pathogens. In: Symposium of Fish Vaccination (Ed. by P. De Kindlin), 199 ~ 222. O. I. E. Paris.
- [66] Rijkers, G. T., et al., 1980. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac.*, **19**: 177 ~ 189.
- [67] Rosenkvist-Jensen, L., 1984. Practical experience with vaccination of rainbow trout against vibriosis. *Fish Health News*, **13**(1 ~ 2): 18.
- [68] Ross, A. J. & G. W. Klontz, 1965. Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against the etiologic agent of "redmouth disease". *J. Fish. Res. Board Can.*, **22**(3): 713 ~ 719.
- [69] Ruben, L. N., et al., 1977. Phylogenetic origins of immune recognition; Lymphoid heterogeneity and the hyphen carrier effect in goldfish, *Carassius auratus*, *Cell. Immun.*, **31**: 266 ~ 283.
- [70] Rukyani, R. & Tauhid, 1990. The survival rate of dumbo catfish (*Clarias gariepinus*) vaccinated against *Ichthyophthirius multifiliis* with *Tetrahymena pyriformis* at various immersion time exposures. In: Asian Fish Health Bibliography and Abstracts I; Southeast Asia (Ed. by Arthur, J. R.), 22, Fish Health Section, AFS, Manila.
- [71] Sanders, K. M., 1992. In-feed vaccines; New wave in fish feeds. *Feed Manage*, **43**(7): 14 ~ 16.
- [72] Secombes, C. J. & M. J. Manning, 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians; antigen localization in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish. Dis.*, **3**(5): 399 ~ 412.
- [73] Schaperclaus, W., 1954. Fischkrankheiten. pp. 708, Akademie verlag, Berlin.
- [74] Stephen, G. N. & J. M. John, 1985. Immunization of Salmonids against furunculosis. *Fish Path.*, **20**(2/3): 403 ~ 411.
- [75] Stolen, J. S. & O. Makela, 1975. Carrier preimmunization in the anti-hapten response of a marine fish, *Nature*, **254**: 718.
- [76] Sypryadi, H., 1985. Vaksinasi untuk mencegah penyakit bakterial pada ikan, *Bul. Warta Mina*, **9**: 34 ~ 39.
- [77] Tatner, M. F. & M. T. Horne, 1983. Factors influencing the uptake of ¹⁴C-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. fish. Bio.*, **22**: 585 ~ 591.
- [78] Tebbit, G. L. & T. D. Goodrich, 1983. Vibriosis and the development of effective bacterins for its control. In: Antigenes of Fish Pathogens, 225. Collection Fondation Marcel Merieux.
- [79] Trust, T. J., et al., 1980. Additional surface protein in agglutinating strains of a typical *Aeromonas salmonicida*, *FEMS Microbiol., Letters*, **9**: 35 ~ 38.
- [80] Thuvander, A., et al., 1993. Humoral antibody response of brown trout *Salmo trutta* vaccinated against furunculosis. *Dis. Aquat. Org.*, **17**(1): 17 ~ 23.
- [81] Vestergaard-Jorgensen, P. E., 1976. Partial resistance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to viral haemorrhagic (VHS) following exposure to non-virulent Egtved virus. *Nord. Vet. Med.*, **28**: 570 ~ 571.
- [82] Vestergaard-Jorgensen, P. E., 1982. Egtved Virus; temperature-dependant immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.*, **5**: 47 ~ 56.
- [83] Walczak, E. M., et al., 1981. Properties of a vaccine for channel catfish virus disease and a method of administration. *Dev. Biol. Standard.*, **49**: 419 ~ 429.
- [84] Walker, P. D. & M. H. Foster, 1981. Bacterial vaccine production. In: Essays in applied microbiology (Eds. by Norris, J. R. & M. H. Richmond), 2 ~ 31. Wiley and Sons.
- [85] Ward, P. D., et al., 1985. Factors influencing the efficacy of vaccines against vibriosis caused by *Vibrio anguillarum*. In: Fish Immunology (Ed. by Manning, M. J. & M. F. Tatner), 221 ~ 229. Academic Press (London).
- [86] Yocum, D., et al., 1975. Hapten-carrier effect in teleost fish. *J. Immunol.*, **114**(3): 925 ~ 927.