

综 述

鱼类免疫学研究的进展*

ADVANCE ON FISH IMMUNOLOGY RESEARCH

杨先乐

(中国水产科学研究院长江水产研究所)

Yang Xianle

(Changjiang Fisheries Research Institute)

鱼类免疫学是从脊椎动物免疫学、鱼类微生物学以及鱼类组织学等学科中分划出来的。最近二十多年来,它发展很快,已形成一门新的学科。本文力图对该领域的发展现状和趋势作一概要的综述。

一. 鱼类免疫学发展简史

鱼类免疫学的研究开始于本世纪初,六十年代以后,才有了较大的发展。它大约经历了以下四个阶段:

1. 萌芽期(本世纪四十年代以前) 1903年 Babes 和 Riegler 首先发现普通丁鲷(*Tinca vulgaris*)等能产生凝集抗体,由此众多的关于真骨鱼类凝集抗体的报告(Bergman, 1911; Aaser, 1925; Snieszko, 1938; Pliszka, 1939),揭开了鱼类免疫学研究的序幕。在这一时期,人们还对真骨鱼类的胸腺进行了探讨(Lele, 1934),发现粘液中存在着某种抗体,温度能影响抗体的产生,并预计鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)存在多种血清型(Nybelin, 1935)。四十年代初,疖疮病疫苗口服成功(Duff, 1942)又掀起了一时的鱼用疫苗研究热潮。

2. 缓慢期(四十年代末至五十年代) 由于研究基金的不足和一些磺胺药物、抗菌素在鱼病防治上使用成功,使刚刚形成的鱼类免疫防治热潮在这期间又冷落下来,鱼类免疫学发展缓慢。

3. 形成期(六十年代至七十年代) 这是鱼类免疫学发展的黄金时期。1971年俄国学者 Lukyanenko 出版了第一本鱼类免疫学,尔后 Anderson(1974)又编著了一本以论述应用免疫学为主,介绍理论和分子免疫学为辅的《鱼类免疫学》新书。这时期,研究内容涉及该学科各个方面,鱼类免疫学雏形形成。1975年疖疮病疫苗首次在美国获准进行商品化生产,为鱼类免疫学的发展树立了一个重要的里程碑。

4. 发展期(八十年代以后) 1981年在美国西维几尼亚州里塘(Leetown)首次召开了鱼用疫苗和血清制品学会,检阅了鱼类生物制品诊断和防治鱼病的伟大成就;1983年美国 and 欧洲大陆又成立了数家鱼类生物制品公司,鱼用疫苗开始了大规模的商品化生产(Smith, 1986);1984年在巴黎又举行了一次国际性鱼类疫苗接种研讨会,对鱼类免疫学的基础理论和应用进行了较全面的总结;鱼类免疫学因此迅速发展。

*本文承湖北卫生职工医学院姚念句副教授,上海水产大学黄琪琰副教授、金丽华先生,长江水产研究所左文功副研究员审阅,谨此致谢。

收稿年月:1988年12月;1989年4月修改。

展。这一时期的特点是,借用先进的技术和手段,丰富和发展鱼类免疫学理论,并使其应用进一步深化。

二. 免疫应答的细胞、组织和器官及其免疫应答的基本过程

1. 免疫应答的主要组织和器官 真骨鱼类免疫应答的主要组织和器官有肾(特别是前肾)、脾、胸腺、消化道的淋巴组织、血液和淋巴等。Ellis(1977)通过对蛙(*Salmo salar*)的研究,发现胸腺是最早形成的淋巴组织,其次是肾,脾形成较晚。真骨鱼类的胸腺是由胸腺细胞,原始淋巴细胞及其结缔组织形成的致密器官。它的外表有一层被膜,其间有一些直径大约15微米的小孔,作用尚不十分明了,可能是抗原进入胸腺的一个通道(Chilmonczyk,1984)。胸腺在鱼类免疫应答中的作用还不完全清楚,切除胸腺似乎并不影响硬头鲈的移植排斥,甚至还能刺激鲤鱼和硬头鲈的抗体形成(Manning *et al.*, 1982a)。有人认为胸腺主要承担着细胞免疫功能。真骨鱼类的前肾有致密的血管网,它包括许多造血组织和淋巴细胞丛,以及噬黑色素细胞和淋巴细胞;鱼类的脾也跟哺乳动物一样,由红髓和白髓组成,其间充满椭圆形的淋巴小结,内含大量的淋巴细胞、巨噬细胞和噬黑色素细胞(Secombers & Manning, 1980)。很多事实证明,真骨鱼类的前肾和脾与体液免疫有关,其中前肾起着很大的作用(Neale & Chavin, 1971; Rijkers *et al.*, 1980a)。真骨鱼类也有发达的淋巴系统。鳊鱼(*Pleuronectes platessa*)的淋巴约占整个血液的1.5—5%(Dunier, 1983)。此外鱼类的肠道粘膜中也存在着淋巴细胞。

2. 鱼类淋巴细胞的异质性 鱼类参加免疫应答的细胞主要有巨噬细胞和淋巴细胞。鱼类淋巴细胞异质性问题,早在七十年代就提出来了。科学家通过大量的试验,现在已经证明了鱼类具有类似哺乳动物的T淋巴细胞和B淋巴细胞(Stolen & Makela, 1975; Yocum *et al.*, 1975; Etlinger, *et al.*, 1976; Cuchens & Clem, 1977; Ruben *et al.*, 1977; Chilmonczyk, 1978)。最近又应用单克隆抗体技术,再一次证明了鲑鳟鱼类,斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)和鲤鱼具有这两种类型的淋巴细胞(Lobb & Clem, 1982; De Luca, *et al.*, 1983; Egberts *et al.*, 1983)。

3. 鱼类免疫应答的基本过程 颗粒或可溶性抗原进入鱼体后,通过巨噬细胞的吞噬或胞饮作用,送至肾和脾吸收、积累(Ellis, 1976; Secombers & Manning, 1980; Davina *et al.*, 1982)。信息传递给淋巴细胞后,使淋巴增殖从而形成体液和细胞免疫。目前尚未在鱼类的胸腺中发现巨噬细胞和异体抗原,即使胸腺在免疫应答中有一定的作用,而且存在着能与抗原相偶联的细胞(Ellis & de Sousa, 1974; Ruben *et al.*, 1977)。鱼和哺乳动物一样,抗原进入机体后有一段潜伏期,这时血清中的抗体很少或没有,鱼类对病原体的免疫保护力也很低。在适宜条件下,抗原刺激一段时间后在鱼类的肾脏和脾中产生相应的抗体,然后释放到血液中(Dorson, 1984a),这时称效应期。鱼类的免疫应答从潜伏期到效应期的长短受环境而变化,依鱼种而不同(Plumb, 1973; 安德森, D. P. 1974; Heatwell, 1975; 杨先乐等, 1986)。免疫原进入鱼体的途径是人们所关注的一个问题,争议也较大。Smith (1983), Tatner & Horne (1983)等认为,在浸泡和喷雾免疫中鳃对抗原的吸收起着主要的作用,其次是侧线,尤其是蛋白质等颗粒性抗原,鳃对它的通透性较可溶性抗原大;然而 Amend & Johnson (1981), Groberg (1982), Hoekney *et al.* (1983)等得到的结论却恰恰相反,他们认为鱼的后部是抗原吸收的主要场所。Hoekney (1983, 1985)还认为皮肤在抗原吸收中也有很大的作用。在口服免疫中,抗原被肠的第二段所吸收,经巨噬细胞吞噬后送至脾中(Evelym, 1984)。

三. 非特异性体液因子

鱼类的非特异性体液因子在免疫保护中起着一定的作用,但目前尚难对它们准确估计,因为某些因子的保护作用大小随种类而异;它们的物理性质,起动机制以及在免疫应答中的作用方式还知之甚少。较常见的非特异性体液因子有:

1. 补体 鱼类的补体系统是由多种蛋白质组成,存在于血清中,它不同于哺乳动物的补体,对热很敏感,45°C、20分钟即可灭活。鱼类补体也存在着补体激活第二通路(Lukyanenko & Mikheeva,

1963)。它的主要作用是导致细胞溶解,协助抗体杀灭病原体。

2. C 反应性蛋白 很多鲈科鱼类具有 C 反应性蛋白,它能使真菌、细菌和寄生虫中的糖类和磷酸脂产生沉淀(Baldo & Fletcher, 1973)。与哺乳动物不同的是鱼类的 C 反应性蛋白是组成血清的成份之一。C 反应性蛋白在琼脂双向扩散试验中能产生跟抗体一样的沉淀线,因而用琼脂扩散检测血清抗体要加倍小心。

3. 干扰素 鱼类干扰素是一种重要的抗病毒感染因子,主要由巨噬细胞所分泌,它的产生受温度影响。据测定被病毒感染的硬头鲈在 10°C 时 4 天才有干扰素产生,而 15°C 却只要 2 天(Dorson, 1974)。

4. 溶菌酶 它是一种水解酶,存在于鱼类的粘液、血清和巨噬细胞中。鱼类溶菌酶的活性与季节有关。血清中的溶菌酶一般来自嗜中性细胞和单核细胞,而粘液中的溶菌酶来源尚不清楚,因为分泌粘液的杯状细胞中并不含有溶菌酶。溶菌酶能杀死病原微生物,使鱼获得保护。

5. 天然溶血素 鱼类血清中存在一种小分子的蛋白质——天然溶血素,它可能是一种酶,能溶解外源红细胞。有人推测,它具有杀菌作用,但目前尚未证实(Chiller *et al.*, 1969)。

四. 细胞免疫

Smith *et al.*, (1980) 在研究疖疮病疫苗时发现,鱼类存在着细胞免疫反应,他指出该疫苗能加强鱼类的细胞免疫,类似 T 细胞的吞噬细胞在杀菌中起着很大的作用。

对鱼类细胞免疫的研究还很肤浅。业已发现真骨鱼类存在着迟发型超敏反应 (Bartos & Sommer, 1983), 同种异体移植排斥(Hildemann, 1970; Bothum *et al.*, 1980), 混合淋巴反应 (Etlinger *et al.*, 1976; Ellis, 1977), 巨噬细胞移动抑制(Smith *et al.*, 1980) 等现象,并具有淋巴细胞毒素,但不能充分证明这都是由细胞介导的,因为目前还缺乏细胞免疫被动转移试验的证据。

很多学者认为,某些免疫鱼未能检测到体液抗体,但有一定的免疫保护力,这是细胞免疫作用的结果。林义浩等(1983)用 PHA 免疫刺激治疗草鱼后分离出一种特殊的血清蛋白成份 6,它与细胞免疫功能相联系。Song & Kou (1981) 用灭活的迟钝爱德华氏菌苗(*Edwardsiella tarda*) 免疫鳊鱼后测得每个白细胞的吞噬指数为 6.78—16.10,而正常鱼只有 2.31,并测得血清的调理指数为 5.29,证实了鳊鱼具有细胞免疫的功能。

五. 体液免疫

1. 真骨鱼类的免疫球蛋白 目前多数人认为,真骨鱼类只有一种免疫球蛋白,类似于哺乳动物的 IgM,它由两条重链和两条轻链组成一个单体,在血清中通过连接链 J 四个单体形成一个四聚体(表 1),它的沉降系数除了 19S 和 16S 外,还存在 7S 和 6.4S 的单体 IgM 类型(Jurd, 1985)。真骨鱼类抗体的轻链分子量一般为 19000,但也存在着 22000、24000 及 26000 三个异型(Lobb *et al.*, 1984)。鱼类免疫球蛋白的半衰期受温度影响,如果有少量抗原持续刺激鱼体,而使免疫球蛋白不断合成,这样它的半衰期就比实际上长得多(如鲤鱼可达一年以上)(Dorson, 1984b)。然而也有人认为真骨鱼类存在着两种以上的免疫球蛋白。Trump & Hildeman (1970) 发现鲫鱼血清中存在着抗原性和电泳图谱各不相同的两种抗体;Clem (1971) 发现依氏石斑鱼(*Epinephelus itaira*) 存在着一种由 IgM 分化而来,失去了 μ 链、沉降系数为 5.9、命名为 IgN 的免疫球蛋白。但是到目前为止,尚无任何人证实鱼类的这些免疫球蛋白与哺乳动物的 IgG 或其它已知的 Ig 类型是同源。

2. 粘液抗体 鱼类的抗体除了存在于血清、组织液中外,还存在于肠道、皮肤和鳃的粘液中(Harris, 1972; Harrell *et al.*, 1976; Ourth, 1980; Paterson *et al.*, 1981; Dorson, 1984a)。鱼类的粘液抗体也只发现类似 IgM 的类型(Fletcher & Grant, 1969)。它的来源,目前尚有争执。有人认为它来自于血清抗体(Harrell *et al.*, 1976; Paterson *et al.*, 1981),也有人认为它是粘膜的浆细胞所分泌(Discozza & Halliday, 1971; Fletcher & White, 1973)。Lobb & Clem (1981), St. Louis-cornier *et al.* (1984) 提

表1 鱼类的免疫球蛋白与哺乳动物 IgM 比较
Table 1 Comparison of IgM between fish and human

项 目	真 骨 鱼 类	软 骨 鱼 类	哺 乳 动 物
分子结构	四个单体构成的四聚体	五个单体构成的五聚体	五个单体构成的五聚体
抗原决定簇	8	10	5—10
分子 量	700,000	900,000	900,000
沉降系数	19s, 16s	19s	19s
重链类型	类似 μ 链	类似 μ 链	μ 链
重链分子量	70,000(鲷鱼)		70,000(人)
轻链分子量	19,000(鲷鱼)		23,000(人)
半衰期(日)	14(18°C)		5(人)
免疫球蛋白含量(mg/ml)	0.94—3.04 (300—600 μ 鲷鱼)	17.2(匙吻鲟)	60—200(mg%)

资料来源: Dorson 1984a, 1984b; Ellis 1977; Matsubara 等, 1985.

出了鱼类存在着分泌性免疫系统的假说, 他们指出鱼类的皮肤和胆汁中存在着一一种由局部产生的分泌性免疫球蛋白(IgS), 它们在结构上与血清中的免疫球蛋白有较大的区别, 并且用间接荧光抗体技术从硬头鲈的粘膜浆细胞中检测出了这种免疫球蛋白。

3. 抗体产生的一般规律 (1)与哺乳动物和鸟类相比, 鱼类抗体形成期较长, 抗体滴度增高较慢, 冷水性鱼类则更长更慢些(Krantz *et al.*, 1963; Dorson, 1972; Maisse & Dorson, 1976; Ellis, 1978; Dunier, 1983; 杨先乐等, 1986)。 (2)在初次应答中, 鱼类抗体持续期较长。据测定初次免疫后的草鱼对鱼呼肠孤病毒的中和抗体第80天时仍具较高水平(杨先乐等, 1986); 注射嗜水产气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)疫苗的河鲈(*Salmo fario*), 10个月后血凝抗体才回到基础水平(Krantz *et al.*, 1963); 用弧菌疫苗免疫的硬头鲈, 46周后仍能从血清中检测出相应的抗体(Thuvander *et al.*, 1987)。 (3)自Avtalin (1969)首先报导鲤鱼对牛血清白蛋白具有免疫回忆反应之后, 已先后证明鲫鱼、鲷鱼、鲑鳟鱼类等也具有类似的反应(Thump & Hildemann, 1970; Ambrosius & Frenzel, 1972; Ingram & Alexander, 1980; Anderson *et al.*, 1982; Dunier, 1984; Lamers *et al.*, 1985)。一般来说, 它有以下特点: ①获得较强的二次应答要经过较长的记忆时间(Rajkers *et al.*, 1980c; Smith *et al.*, 1980; Lamers *et al.*, 1985)。 ②二次应答与初次应答抗体价的比率一般较哺乳动物低(Avtalin, 1969; Thump & Hildemann, 1970), 有的鱼类(如硬头鲈)在某些时候二次应答与初次应答的抗体价几乎没有区别(O'Neill, 1980; Dunier, 1984), 这种二次应答抑制现象, 可能由于鱼类淋巴细胞增殖能力减弱所致(Dorson, 1984a)。 ③免疫记忆还受温度的影响(Dorson, 1984b)。

六. 影响免疫应答的因素

免疫应答是一种极为复杂的生理现象, 受很多因素影响。影响鱼类免疫应答的重要因素有:

1. 抗原方面 抗原的性质、进入机体的途径以及抗原的剂量对免疫应答有显著影响。研究表明, 鲑鳟鱼类对鲑或鳃的血蓝蛋白的免疫应答要远远强于牛血清白蛋白, 对绵羊红细胞的应答则介于二者之间。一般病毒和细菌等病原对鱼类都是较强的抗原。抗原的使用剂量要适当。De Kinkelin (1984)认为以每克鱼体重注射 2×10^6 puf (空斑形成单位) 给予量的 VHS 灭活疫苗时, 硬头鲈的成活率可达90%; 杨先乐等(1987)测得草鱼出血病细胞培养灭活疫苗(854疫苗)的有效给予剂量为 $3-5 \times 10^4$ *TCID₅₀/尾。

值得注意的是,有的抗原使用剂量过大会导致鱼类产生免疫耐受(Avtalion *et al.*, 1980; Mannig *et al.*, 1982; Loon van *et al.*, 1981)。抗原之间还存在着相互竞争或激活作用(Desvaux & Charlemagne, 1981; Tebbit, 1983)。Richter & Ambrosius(1972)首先发现了抗原间的相互竞争现象。O'Neill(1981)用 MS2 噬菌体和灭活的杀鲑产气单胞菌(*A. salmonicida*)疫苗免疫硬头鳞,发现初次免疫后,后者能激活硬头鳞产生抗 MS2 抗体,而再次免疫后却得到了相反的结果。佐剂对鱼类免疫应答有无影响至今仍有争议。Kranntz *et al.* (1963), Paterson & Fryer (1974), Borek(1977), Weber & Zwicke(1979), Walke & Foste (1981), Paterson (1981), Klontz (1982), Tather & Horne (1983), Dunier(1983, 1984)等认为佐剂能使抗原在鱼体内缓慢持续地释放,促进抗原的吸收,增强巨噬细胞和浆细胞的活性,加快抗体的生成,从而能提高免疫效果。而 Agius *et al.* (1983), Horne (1984)等却得到了相反的结果。Dorson (1984a)认为在注射免疫中佐剂有增效作用,而在浸泡与口服免疫中效果尚未确定。目前生产中应用佐剂的唯一例子是市场出售的疝疮病与弧菌病疫苗。

2. 机体方面 鱼的年龄和体重,营养情况,生理状态以及性别、群体效应等均能影响鱼类免疫。Dorson(1974, 1977)率先探讨了硬头鳞的年龄、体重与免疫应答的关系。此后 Manning *et al.* (1982b), Loon van *et al.* (1981)进行了更深入的研究,探讨了硬头鳞和鲤鱼产生免疫应答的年龄。而 Johnson *et al.* (1982)认为,免疫应答发生与否,鱼的体重比年龄更重要。De Kinkelin (1984)在阐述鱼的生理年龄对免疫应答的影响时说,幼鱼易于接受免疫原,而大鱼则易排除之。产卵期的亲鱼对外界抗原不产生免疫应答(Corbel, 1975)。鱼群处于拥挤状态下也会影响免疫应答,Perlmutter *et al.* (1973)认为这是因为拥挤外激素释放于水中可引起了免疫抑制的缘故。

3. 环境方面 影响免疫应答的主要环境因素有温度、季节、光周期以及溶解于水中的有机物、重金属离子等免疫抑制剂。温度是最重要的因素之一。本世纪初,人们就注意到温度能影响免疫应答,但比较详细的研究是从四十年代末才开始的。目前主要的结论有:① 低温能延缓或阻止鱼类免疫应答的发生。各种鱼类具有不同的免疫临界温度,一般来说温水性鱼类的较高,冷水性鱼类较低;免疫临界温度还取决于鱼类原来接触的水域(温带/寒带),原来是否接触过同类抗原(Bandouy *et al.*, 1980)。② 对于温度影响免疫应答的机制,Bisset (1948)认为低温会限制浆细胞释放抗体,当温度下降到免疫临界温度之下时,抗体的滴度会迅速下降,这时体液免疫系统则失去了防御疾病的作用;而 Avtalin *et al.* (1973)认为只要鱼类在初次接触抗原时有一短暂时间在免疫临界温度之上(如鲤鱼置于 25°C 3—4天),那么抗体的形成就不再受温度的影响,因为免疫活性细胞的吞噬、捕获、清除抗原的作用以及抗体的合成和释放都可在低温下进行。③ 温度不仅能影响体液免疫,而且也能影响细胞免疫。T 协助细胞的成熟和释放对温度是敏感的(Avtalion & Milgrom, 1976)。④ 在鱼类生长的适宜温度下,温度越高,免疫应答越快,抗体滴度越高,达到峰值的时间也越短(Johnson *et al.*, 1982)。

七. 免疫学防治

目前鱼类免疫防治的主要内容是研制鱼用疫苗,进行人工免疫,以增强养殖鱼类对传染性疾病的抵抗能力。

1. 鱼用疫苗的研制方法 死苗常采用化学灭活、热灭活和紫外线照射灭活的方法。减毒疫苗获得的方法有:① 从不敏感的其它鱼类分离出天然的减毒株(Hill *et al.*, 1980);② 利用敏感的细胞系连续传代减毒,如 Rewa VHSV 减毒株(Vestergaard-Jorgenson, 1982)。③ 从不敏感的细胞系传代减毒,如 VHSV 的 F₁ 株(De Kinkelin *et al.*, 1980)。以上方法获得减毒活疫苗是一个盲目过程,机率小,费时,如果用单克隆抗体技术进行筛选,可能是一条成功的捷径(Coulon *et al.*, 1982)。

2. 鱼用疫苗研究现状 目前商品化生产和实验室研究的疫苗有16种,其中病毒病疫苗6种,细菌病疫苗9种,寄生虫病疫苗1种(表2)。鱼用疫苗(特别是病毒病疫苗)尚还存在免疫效果不够稳定,成本较高,缺乏合理、有效、方便的给予途径等问题,有待克服。

表2 鱼用疫苗的研究及应用概况
Table 2 Research and application of fish vaccine

疫苗名称	针对的病原体	主要免疫途径*	现状	最初报道者
传染性胰脏坏死疫苗	IPNV	(1)(2)	仅用于实验室。	Dorson(1977)
病毒性出血败血症疫苗	VHSV	(1)(2)	有灭活疫苗和 Reva 与 F ₂₅ (21)减毒疫苗。	Vestergard-Jorgenson(1976)
鲤春病病毒疫苗	SVCS	(1)	实验室免疫效果一般	Wolf & Quimob(1962)
传染性造血器官坏死疫苗	IHNV	(1)(2)	减毒疫苗免疫效果较好,但安全性差,已被禁用。	Fryer et al.(1976)
斑点叉尾鲷病毒疫苗	CCV	(1)(2)	有灭活疫苗与减毒疫苗,均仅用于实验室。	Plumb(1973)
草鱼出血病疫苗	FRV	(1)	有组织浆和细胞培养灭活疫苗两种。	高汉姣等(1980)
迟钝爱德华氏菌疫苗	<i>Edwardstella tarda</i>	(1)(2)	日本、台湾已有试验性商品疫苗上市。	Song & Kon(1981)
斑点叉尾鲷肠道败血症疫苗	<i>E. ictaluri</i>	(1)(2)	近期内可能形成商品化生产。	Saeed(1983)
弧菌病疫苗	<i>Vibrio anguillarum</i> & <i>V. ordalii</i>	(1)(2)(3)(4)	有商品化疫苗上市,有单价,双价,多价等类型。	Antipa(1976)
红嘴病疫苗	<i>Yersinia ruckeri</i>	(1)(2)(3)(4)	有商品化疫苗上市。	Ross & Klontz(1965)
疖疮病疫苗	<i>Aeromonas salmonicida</i>	(1)(2)(3)	有商品化疫苗上市。	Duff(1942)
嗜水产气单胞菌疫苗	<i>A. hydrophila</i>	(1)(2)(4)	仅用于实验室。	Schaperclaus(1954)
柱状曲烧杆菌疫苗	<i>Flexibacter columnaris</i>	(1)(2)(3)	国外研究不普遍,国内正起步。	
细菌性肾脏病疫苗	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	(1)	研究刚起步。	Paterson et al.,(1980)
类结节症疫苗	<i>Pasteurella piscicida</i>	(1)(2)(3)	仅用于实验室。	Fukuda & Kusuda(1981)
多子小瓜虫病疫苗	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	(1)(2)	仅用于实验室。	Bauer(1953,1959)

* (1)注射 (2)浸泡 (3)口服 (4)喷雾

3. 免疫途径 疫苗的给予途径主要有注射、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,获得较高的免疫效果,并能利用佐剂的作用,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。但该方法会因注射操作而使鱼体受伤,且需较多的劳动力,对较小的鱼注射也很不方便(Evelym & Ketcheson, 1980; Amend & Johnson, 1981; Aguis et al., 1983)。口服免疫尽管存在着免疫效果较差,疫苗消耗量大等缺点,但因它实施方便,不受时间地点和鱼的大小限制,对鱼无损伤,仍引起了人们的高度重视。目前仅有少量的关于弧菌病疫苗、疖疮病疫苗、类结节症疫苗等口服免疫成功的报导。为了避免前消化道分泌物对抗原的破坏,Johnson & Amend (1983) 通过肛门插入法用灭活的弧菌疫苗免疫红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)获得了较好的免疫效果。这一发现为

口服免疫开拓了广阔的前景,他们认为若用某种胶囊包被疫苗,使其避免胃液或胆汁的破坏,那么只需较少的抗原就可获得较理想的免疫效果。浸泡和喷雾均作用鱼体外部,能导致相同的免疫应答,基本属于同一种类型。Amend & Frender (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 & Amend (1977)用稀释的弧菌疫苗直接浸泡红大麻哈鱼又获得了成功。与此同时,喷雾免疫的方法亦开始研究,起初喷雾所用的压力是 $6.3\text{kg}/\text{cm}^2$,后来降到 $0-1\text{kg}/\text{cm}^2$ 也同样有效(Gould *et al.*, 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最主要给予途径。Tatner & 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的大小有关。

八. 免疫学诊断

从30年代开始,人们就应用血清学方法诊断细菌性和病毒性鱼病,对鱼病早期诊断起到了很大的作用。近十多年来,由于人、兽医诊断新技术的渗透,细菌学、病毒学和组织病理学的诊断方法正逐步被快速、准确的血清学诊断技术所取代。目前常采用的方法有:血清中和试验、凝集反应、沉淀反应(琼脂扩散、免疫电泳等)、补体参与的反应、免疫标记检测方法(免疫荧光技术、免疫酶技术、放射免疫测定法)以及免疫电泳等(表4)。此外花环试验、移动抑制试验、巨噬细胞吞噬功能试验等体外细胞免疫测定法也曾用来进行鱼类免疫学诊断。

表3 几种主要的鱼类血清学诊断方法
Table 3 Main serodiagnosis to fish diseases

血清学诊断技术		特 点	相 对 灵敏度	血清抗体最 低检测量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	应 用 范 围
名 称	常用类型				
血清中和试验	细胞病变法 噬斑减少法	灵敏度高,特异性强,但费时,操作麻烦。	10^6	10^{-3}	各种色类病毒病。
沉淀反应	琼脂扩散、对流免疫电泳	可靠、方便,特异性强,但灵敏度低。	10^3	20	VHS, IPN, COV, PFR, 弧菌病, 疔疮病等。
补体结合		灵敏度高,但存在自然溶血,嗜异性系统干扰等问题。	10^3	0.1—1	IPN, VHS, 以及疔疮病, 红嘴病等细菌性鱼病
凝集反应	直接血凝、间接血凝、被动血凝、协同凝集反应	简单、迅速、准确,但应用有一定的局限性。	10^4	0.03	IHN, SVC, IPN, 鲟鱼溃疡病, 细菌性肾脏病, 弧菌病, 疔疮病, 红嘴病等。
免疫荧光	间接、直接 荧光抗体法	方便、迅速,已广泛应用;但存在着试剂不稳定,特异性差,有自发荧光,需一定设备等问题。	10^0	20	IPN, COV, SVC, IHN, VHS, 细菌性肾脏病, 疔疮病, 爱德华氏病, 嗜水产气单胞菌病等。
放射免疫测定		灵敏度高,特异性强,迅速,但需一定设备,应用不广泛。	10^5	10^{-3}	IPN, PFR, 等。
酶联免疫吸附试验(ELISA)		灵敏度高,特异性强,迅速方便,有应用前景。	10^5	10^{-3}	COV, IHN, IPN, 弧菌病, 疔疮病, 红嘴病, 爱德华氏菌病等。

资料来源: Ahne, W. (1981); Busch, R. A. (1981);
Mamoru Yoshimizu & Takahisa Kimura (1985)。

近几年来,鱼类免疫学诊断技术出现了新的飞跃。Schultz *et al.* (1985)首先应用单克隆抗体技术建立了分泌抗 IHNV 的杂交瘤细胞系 M-IHNV-W1,接着 Ainsworth *et al.* (1986)又建立了一株 Ed1 杂交瘤细胞, Austin (1986)也获得了抗耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)和杀鲑产气单胞菌的单克隆抗体。单克隆抗体技术的应用,为鱼类免疫学诊断和血清试剂商品化生产创造了条件。此外, Wise (1985)用 DNA 分子杂交检测斑点叉尾鲷病毒,开辟了鱼病诊断的更新前景。

九. 鱼类免疫学发展趋势

至今,鱼类免疫学的知识还很不系统,发展和丰富鱼类免疫学的任务还很艰巨。笔者认为,鱼类免疫学今后发展的主要方向是:一方面进行基础理论的研究,逐步弄清鱼类免疫的基本原理,填补空白,对应用免疫学中的某些异常结果进行解释;另一方面加强应用研究,用新发现的理论指导应用实践,通过应用研究丰富免疫学基础理论。

(1) 鱼类的免疫器官(特别是胸腺)和哺乳动物相比有很大的差异,它们的确切作用还应更深入的研究;很多试验结果证明,鱼类存在着类似哺乳动物的B细胞和T细胞,下一步的主要任务是对这两种细胞进行分离,以确认它们与哺乳动物的异同及它们在体液免疫和细胞免疫中的作用;目前公认鱼类的免疫球蛋白只有IgM一种,除此之外是否存在其它类型和亚类;鱼类抗感染的防御机制还有很多疑点,尚需正确地解释。

(2) 鱼类细胞免疫的资料还很贫乏,它的机理、特点,在感染中的作用以及与体液免疫之间的关系等问题尚需查清。

(3) 粘液抗体在鱼类免疫中有一定的地位,它的产生和作用在今后研究的一个课题;免疫球蛋白能否通过卵黄转移,很多试验均未成功(Ellis, 1977; Clerx, 1978; Loon *et al.*, 1981)。这一现象是否存在影响鱼类免疫应答的因素,除了温度研究得较多之外,其它因素如日照、性成熟度,水域环境等尚待进一步研究。

(4) 当前疫苗商品化生产状况与鱼类养殖规模还很不适应,其主要困难是:①有些疫苗在大面积使用时免疫效果欠佳;②成本太高,部分细菌疫苗不能大规模生产;③减毒疫苗还缺乏安全性保证;④缺乏简易、高效、经济的接种途径。鱼用疫苗的发展正面临着一种严峻的挑战:有人认为开发鱼类疫苗不如进行品种改良,加强饲养管理、鱼病监测和药物治疗,他们对疫苗发展前景不太乐观(Munro, 1984; Plum, 1984)。要克服疫苗研制中所遇到的困难,还有很多基础工作要做,如病原体分子生物学及鱼用疫苗免疫机制的研究,探索筛选高免疫原性减毒变异株的简单方法,提高浸泡与口服免疫效果等。1988年我国台湾省拨款340万台币进行鱼类疫苗的研究,美国奥立岗州立大学梁程娇安已着手进行IPNV和IHNV基因工程疫苗的研究(海博, 1988),国内也开始研究草鱼出血病基因工程疫苗。笔者认为,鱼类疫苗的研究一定会闯过难关,展现出美好的前景。

(5) 鱼类免疫学诊断已经显示出生命力,今后的主要任务是进一步完善和发展,使诊断试剂商品化,诊断程序标准化,诊断仪器简单化。在诊断中,不仅能够定性分析,而且能够定量分析,充分发挥它准确、快速的特点。

Dorson, M. (1981a)指出,鱼类免疫学所研究的对象是十分复杂的,各种鱼类的免疫应答都有着一一定的特殊性,要获得一个准确的答案是很不容易的。Ellis (1982)也告诫研究者们,用特定的结果作出鱼类免疫学的一般结论是十分轻率的。因此,对鱼类免疫学进行深入地探讨和研究是艰辛的,然而又是非常必要的。

参 考 文 献

- 安德森, D. P. (张寿山, 华鼎可译), 1974. 鱼类免疫学, 15-22, 54-57. 农业出版社(京).
- 杨先乐等, 1986. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告. 淡水渔业, 8: 1-5.
- 林义浩等, 1983. 草鱼出血病免疫刺激防治的研究, II. PHA 免疫刺激治疗草鱼的血清蛋白分析. 淡水渔业, 5: 25-32.
- 陈汇, 1984. 免疫学基础, 68-71. 人民卫生出版社(京).
- 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: 82-89.
- 马场 威, 1984. 比较免疫学からみた鱼類の免疫特性. 鱼病研究, 18(4): 209-219.

- 海 博, 1988. 生物技术如何应用的水产生产. 养鱼世界(台湾), 1:14.
- Aaser, C. S., 1995. Gjeddepesten in 1923. *Norsk Veterinaertidsskrift*. (Cited by Pliszka).
- Aguis, C. et al. 1983. 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.
- Ahne W., 1981. Serological techniques currently used in fish virology. In International Symposium on Fish Biologies: Serodiagnosis and Vaccine (D. P. Anderson & W. Haunessen Eds.), Develop. Biol. Standard. 49, 3-27. Lee-town W. Va USA.
- Ainsworth, A. J. et al., 1986. Use of monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for the diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*. *J. Fish Dis.*, 9: 439-444.
- Alexander, J. B. et al., 1983. Antigen clearance in trout. *Dev. Comp. Immunol.* 7(4): 707-708.
- Ambrosius, H. & Frende, B. V., 1972. Anti-DNP antibodies in carps and tortoises *Immunochimistry*, 9: 65-71.
- Amend, D. F. & Frende, D. C., 1976. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions: A model for vaccinating fish. *Science.*, 192: 793-794.
- Amend, D. F. & Johanson, K.A. 1981. Current status and future needs of *Vibrio anguillarum* bacterins. *J. p. Biol. Standard*, 49: 402-417.
- Anderson, D. P. et al., 1982. Investigation of immunological memory in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to DNP conjugates. *Dev. Comp. Immunol.*, Supplement. 2: 115-122.
- Austin, B., 1986. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric red-mouth furunculosis in fish farms. *J. Fish Dis.* 9: 169-174.
- Avtalion, R. R., 1969. Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against serum bovine albumin (SBA). *Immunology*, 17: 927.
- Avtalion, R. R. et al., 1973. Influence of environment temperature on the immune response in fish. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 61: 1-35.
- Avtalion, R. R. & Milgrom, L., 1976. Regulatory effect of temperature and antigen upon immunity. I. Influence of hapten density on the immunological and serological properties of penicilloyl-carrier conjugates *Immunology*, 31(4): 589.
- Avtalion, R. R. et al., 1980. Regulatory effect of temperature on specific suppression and enhancement of the humoral response in fish. In Immunological Memory (M. J. Manning Ed.), 113-121. Elsevier/Amsterdam.
- Babes, V. & Riegler, P., 1903. Ueber eine fischepidemie bei bukarest. *Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig.*, 33. (Cited by Pliszka.)
- Balbo, B. A.; Fletcher, T. C., 1973. C-reactive protein-like precipitins in plaice. *Nature, Lond.* 246: 145-147.
- Baron, J. M. & Sommer, C. V., 1981. In vivo cell mediated immune response to *M. tuberculosis* and *M. salmoniphilum* in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Dev. Comp. Immunol.* 5: 75-83.
- Baudouy, A. M., et al., 1980. Virémie printanière de La carpe: étude expérimentale de l'infection évoluant à différentes températures. *Ann. Virol. (Institut Pasteur)*, 131E:479-488.
- Bergman, A. 1911. En Smittosam ögonsjukdom, keretomalaci, hos torsk vid sveriges sydöst-skandinavisk Veterinär-Tidskrift. (Cited by Pliszka).
- Bissett, M. J., 1948. The effect of temperature on antibody production in cold-blooded vertebrates. *J. Path. Bact.*, 60: 87-92.
- Borek, E., 1977. Adjuvants. In The Antigens, Vol. IV (M. Sela Ed.), 370-420 Academic Press. New York.
- Boham, J. W. et al., 1980. Ontogeny of first and second set alloimmune reactivity in fish. In Phylogeny of Immunological Memory (M. M. Manning Ed.), 83. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Busch, R. A., 1981. The current status of diagnostics serology for the major bacterial diseases of fish. In International Symposium on Fish Biologies: Serodiagnosis Vaccines (D. P. Anderson & W. Haunessen Eds.), Develop. Biol. Standard. 49: 85-95. Lee-town W. Va USA. S. Karger, Basel.

- Chiller, J. M. *et al.*, 1969. Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). 2. Studies on the kinetic development of antibody-production cells and on complement and natural hemolysin. *J. Immun.*, **102**:1202-1207.
- Chilmonczyk, S., 1978. *In vitro* stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Annales d'Immunologie*, **129**(1): 3-12.
- , 1980. Some aspects of trout gill structure in relation to Egtved virus infection and defense mechanisms. In *Fish Diseases* (W. Ahne Ed.), 18-22. Springer Verlag.
- , 1984. Evolution of the thymus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) In *Proceedings of Fish Symposium*, 11-13 July 1983. Plymouth.
- Clem, L. W., 1971. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*. *Journal of Biological*, **246**: 9-15.
- Clerx, J. P. M., 1978. Studies on pike fry rhabdovirus the immunoglobulin of pike (*Esox lucius*). Thesis, Drukkerij J. H., Pasmans, S' Grarenhage.
- Corbel, M. J., 1975. The immune response in fish: a review. *J. Fish Biol.*, **7**:539-563.
- 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.
- Croy, T. R. & Amend, D. F., 1977. Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquacult.*, **12**: 317-325.
- Cuchens, M. A. & Clem L. W., 1977. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell Immunology*, **34**: 317-325.
- Davina, J. H. *et al.*, 1980. Lymphoid and non-lymphoid cell in the intestine of cyprinid fish. In *Development and Differentiation of Vertebrate Lymphocytes*. (J. D. Horton Ed.), 129-140. Elsevier/North Holland.
- , 1982. Effect of oral administration of *Vibrio* bacterin on the intestine of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2**: 157-166.
- De Kinkelin, P. *et al.*, 1980. Viral hemorrhagic septicaemia of rainbow trout: selection of a thermoresistant virus variant and comparison of polypeptide synthesis with the wild type virus strain. *J. Virol.*, **36**: 652-653.
- , 1984. Immunization against virus diseases occurring in cold water. In *Symposium on fish vaccination* (P. de kinkelin Ed.), 167-198. O. Z. E. Paris, 20-22 Feb. 1984.
- De Luca, D. *et al*, 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.*, **13**: 546-553.
- Desvaux, F. X. & Charilemagne, J., 1981. The goldfish immune response. I. Characterization of the humoral response to particular antigens. *Immunology*, **43**: 755.
- Disconza, J. J. & Halliday, W. J., 1971. Relationship of catfish antibodies to immunoglobulin in mucous secretions. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **49**: 517-519.
- Dorson, M., 1972. La réponse immunitaire chez La truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri*): Quelques caractéristiques des immunoglobulines produites lors d'une réaction primaire. *Ann. Rech. Veter.*, **3**(1): 93-107.
- , 1974. Production d'anticorps précipitants anti-dinitrophénol chez les alevins de truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri*) immunisés à L'âge d'un mois. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **t. 278**: 3151-3152.
- , 1977. Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis. *Bulletin de L'office International des Epizooties*, **87**(5-6). 405-406.
- , 1983. Infectious pancreatic necrosis of salmonids: Overview of current problems. Antigenes of Fish Pathogens. Collection Fondation Marcel Mérieux.
- , 1984a. Applied immunology of fish. In *Symposium on Fish Vaccination* (P. de Kinkelin Ed.), 39-74. O. I. E. Paris, 20-22 Feb. 1984.
- , 1984b. Summary of questions and discussion, report 2. In *Symposium on Fish Vaccination* (P. de Kinkelin Ed.), 224. O. I. E. Paris, 20-22 Feb. 1984.
- Duff, D. C. P., 1942. The oral immunization of trout against *Bactrium salmonicida*. *J. Immun.*, **44**: 37-94.

- Dunier, M., 1983. La production d'anticorps sériques chez La truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri* Richardson): influence du rappel et des adjuvants. Thèse présentée à L'Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- , 1984. Absence of anamnestic to DNP-Haemocyanin and DNP-Ficoll in rainbow trout. In Proceedings of the Fish Immunology Symposium. 11-13 July 1983, Plymouth, Polytechnic.
- Egberts, E. et al., 1983. Analysis of lymphocyte heterogeneity in carp, *Cyprinus carpio* L., using monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*, 7(4): 749-754.
- Ellis A. E., 1976. Leucocyte and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 8: 143-156.
- , 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar* Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reaction. In Developmental Immunobiology (J. B. Solomon & J. D. Horton Eds.), 225. Elsevier/North Holland, Biomedical press, Amsterdam.
- , 1978. The immunology of teleosts. In Fish Pathology (R. J. Roberts Ed.), 92-104. Bailliere Tindall, London.
- , 1982. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In Microbial Diseases of Fish (R. G. Roberts Ed.), 1-29. Academic press.
- Ellis, A. E. & De Sousa, M., 1974. phylogeny of lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.*, 4: 338-343.
- Etlinger, H. M. 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.
- , 1977. Evolution of the lymphoid system. II. Evidence for immunoglobulin determinants on all rainbow trout lymphocytes and demonstration of mixed leukocyte reaction. *Eur. J. Immunol.*, 7: 881-887.
- Evelym, T. P. T. 1984. Summary of the questions and discussion, Report 5. In Symposium on Fish Vaccination (P. de Kinklin Ed.), 228. O. I. E. Paris. 20-22 Feb. 1984.
- Evelym, T. P. T & Ketchson, J. E., 1980. Laboratory and field observations on antivibrosis vaccines. In Fish Diseases, Third COPRAQ-Session (W. Ahne Ed.), 45-54. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Fletcher, T. C. & Grant, P. T., 1969. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochemical Journal*, 105(5): 65.
- Fletcher, T. C. & White, A., 1973. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1: 417-428.
- Gould, R. W. et al., 1978. Spray vaccination: A method for the immunization of fish. *Fish pathol.*, 13: 63-68.
- Graberg, W. J. Jr., 1982. Infection and immune response induced by *Vibrio anguillarum* in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Ph. D. Thesis, 107. Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- Harrell, L. W., et al., 1976. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*, 7(4):363-370.
- Harris, I. E., 1972. The Immune response of a cyprinid fish to infections of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*. *International Journal of Parasitology*, 2: 459-469.
- Heartwell, C. M. III., 1975. Immune response and antibody characterization of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to a naturally pathogenic bacterium and virus. *U. S. Fish & Wildl. Serv. Tech. Paper*, 85: 34.
- Hildemann, W. H., 1970. Transplantation immunity in fishes: Agnatha, Chondrichthyes & Osteichthyes. *Transplant Proc.*, 2: 253-259.
- Hill, B. J. et al., 1980. Studies on immunization of trout against IPN. In Fish Diseases (W. Ahna Ed.), Proceeding in Life Sciences, 29-36. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hockney, M. J., 1983. The possible role of skin in the spray vaccination of rainbow trout (*Salmo gair-*

- neri*). In Fish Immunology Symposium, 11-13 July 1983, Plymouth Polytechnic.
- , 1985. An investigation of the skin of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, for antigen uptake mechanisms following spray vaccination. In Fish Immunology (M. J. Manning & M. F. Tatner Eds.), 195-205. Academic Press, INC, London.
- Horne M. F., et al., 1984. The effects of the use potassium alum adjuvant in vaccines against vibriosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 7(2): 91-99.
- Ingram, G. A. & Alexander J. B., 1980. The immune response of the brown trout (*Salmo trutta*) to lipopolysaccharide. *J. Fish Biol.*, 16: 181-197.
- Johnson, K. A. et al., 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *J. Fish Dis.*, 5: 197-205.
- Johnson, K. A. & Amend, D. F., 1983. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *J. Fish Dis.*, 6: 473-476
- Jurd, R. D., 1985. Specialisation in the teleost and anuran immune response, A comparative critique In Fish Immunology (M. J. Manning & M. F. Tatner Eds.), 9-23. Academic Press, INC, London.
- Klontz, G. W., 1982. Bacterial kidney diseases in salmonids: an overview. In Antigens of Fish Paphogens (D. P. Anderson et al. Eds.). Foundation Marcel Mériéux, Lyon.
- Krantz, G. E. et al., 1963. Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout. *J. Immunol.*, 91: 757-760.
- Lamers, C. H. J. et al., 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination: Development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas hydrophilla* bacterin. *J. Fish Dis.*, 8: 253-262.
- Lele, S. H., 1984. On the physical morphology of the thymus gland in some common European fishes and in two cyclostomes. *J. Univ. Bombay*, 2: 33-42.
- Lobb, C. J. & Clem, L. W., 1981. The secretory immune system in fish: Local sythesis and immune response. In International Symposium on Fish Biologicals: Serodiagnostics Vaccines (D. P. Anderson & W. Hennessen Eds.), Develop. Biol. Standard. 49, 329-330. Leetown W. Va USA.
- , 1982. Fish lymphocyte differ in expression of surface immunoglobulin. *Dev. Comp Immunol.*, 6(3): 473-479.
- Lobb, C. J. et al., 1984. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. *J. Immunol.*, 132(4): 1917-1923.
- Loon van, J. J. A. et al., 1981. Development of the immune system in carp (*Cyprinus carpio*). In Aspects of developmental and Comparative Immunology (J. B. Solomon Ed.), 469. Pergamon press.
- Lukyanenko, V. I. & Mikheeva, G. A., 1963. Properdin content of fish. *Dokl. (Proc.) Acad. Sci. U. S. S. R.*, 148: 157-158.
- Maisse, G. & Dorson, M., 1976. Production d'agglutinines anti-*Aeromonas salmonicida* par la Truite Arc-en-Ciel. Influence de la température, d'un adjuvant et d'un immunodepresseur. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 7(4): 307-313.
- Mamoru Yoshimizu & Takahisa Kimura, 1985. A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral disease of fish. *Fish Pathol.*, 20(2/3): 243-261.
- Manning, M. J. et al., 1982a. Ontogenetic aspects of tolerance and immunity in carp and Rainbow Trout: studies on the role of thymus. *Dev. Comp. Immunol.*, Supplement 2: 71-82.
- , 1982b. Developmental aspects of immunity and tolerance in fish. In Microbial Diseases of Fish (R. J. Roberts Ed.), 31-46. Academic Press.
- Matsubara, A. et al., 1985. Quantitation of yellowtail immunoglobulin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Japan. Soc. Fish.*, 51(6), 439-444.
- Munro, A. L. S., 1984. Summary of questions and discussion, Report 4. In Symposium on Fish Vaccination (P. D. Kinkelin Ed.), 217. O. I. E. Paris, 20-22 Feb. 1984.
- Neale, N. L. & Chavin, W., 1971. Lymphocyte tissue alterations during the primary immune response of goldfish. *Mich. Acad.*, 3: 23-30.

- Nybelin, O., 1935. Ueber agglutininbindung bei fischen. *Z. Immun. Forsch.*, 81: 74.
- O'Neill, J. G., 1980. Temperature and the primary and secondary immune responses of three teleosts, *Salmo trutta*, *Cyprinus carpio* and *Notothenius rossii*, to MS2 bacteriophage. In *Phylogeny of Immunological Memory* (M. J. Manning Ed.). Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- , 1981. Antigenic competition in teleosts. In *Aspects of Developmental and Comparative Immunology* (J. B. Solomon Ed.), 473. Pergamon Press.
- Ourth, D. D., 1980. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, 4(1): 65-74.
- Paterson, W. D., 1981. *Aeromonas salmonicida* as an immunogen. In *International Symposium on Fish Biologies: Serodiagnostics Vaccines* (D. P. Anderson & W. Hennessen Eds.), *Develop. Biol. Standard*, 49, 375-385. Leetown W. Va USA. S. Karger, Basel.
- 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. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31: 1751-1755.
- Peterson, W. D. et al., 1981. The immune responses of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. to the causative agent of bacterial kidney disease, *Renibacterium salmoninarum*. *J. Fish Dis.*, 4: 99-111.
- Perlmutter, A. et al., 1978. The effect of crowding on the immune response of the blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, to Infectious Pancreatic Necrosis (INP) Virus. *Lif. Sciences*, 13: 363-375
- Pliszka, E., 1939: Untersuchungen über die agglutinine bei karpfen. Voriäuline mitteilung. *Zbl. Bakt.* 1 *Abt. Orig.*, 143: 362.
- Plumb, J. A., 1978. Neutrilization of channel catfish virus by serum of channel catfish. *J. Wildl. Dis.*, 9: 324-330.
- , 1984. immunization of warm water fish against five important pathogens. In *Symposium on Fish Vaccination* (P. de Kinkelin Ed.), 199-222. O. I. E. Paris, 29-23 Feb., 1984.
- Richter, R. & Ambrosius, H., 1972. Untersuchuge uber die "Konkurrenz von Antigenen" bei karpfen (*Cyprinus carpio* L.). *Acta. Biol. M.d. Germ.*, 29: 897-906.
- Rijkers, G. T. et al., 1980a. The haemolytic plaque assay in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol. Meth.*, 33: 79-86.
- , 1980b. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 19: 177-198.
- , 1980c. The immune system of cyprinid fish. The effect of antigen dose and route of administration on the development of immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*). In *Phylogeny of Immunological Memory* (M. J. Manning Ed.), 93-102. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Ruben, L. N. et al., 1977 Phylogenetic origins of immune recognition: Lymphoid heterogeneity and the hapten/varrier effect in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell. Immunol.*, 31:266-283.
- Schultz, C. L. et al., 1985. Production, and characterization of monoclonal antibody against infectious hematopoietic necrosis virts. *Fish Pathol.*, 20(2/3): 339-341.
- Secombes, C. J. & Manning M. J., 1980. Comparative studies on the immune system of fish and amphibians: Antigen localization in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Dis.*, 3(5): 399-412.
- Smith, P. T., 1983. Analysis of the hyprosnotic and bath methods for fish vaccination. Comprison of uptake of particulate antigens. In *Fish Immunology Symposium*, 11-13, July, 1983, Plymouth Polytechnic.
- , 1986. British manages buy vaccine firm. *Fish Farming International*, 13: 3.
- Smith, P. T. et al., 1980. Further studies on furunculosis vaccination In *Fish Disease, 3rd COPRAQ Session* (W. Ahne Ed.), 119-119. Springer-verlag.
- Snieszko, S. F. et al. 1938. Badania bakteriologiczne i serologiczne and bakterjami posocznicy karpi. *Bozpr. Biologiczne*, 16: 1.
- Song Y. L. & Kou, G. H., 1981. Immune response of eels (*Anguilla japonica*) agaist *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguillimortiferum* (*E. tarda*) infection. *Proc. Repub. of China. U. S. Coop. Sci.*

- Seminar on Fish Dis. *Nat. Sci. Conn. Series*, 3: 107-115.
- St. Louis-cormier, E. A. *et al.*, 1984. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Dev. Comp. Immunol.*, 8(1): 71-80.
- Stolen, J. S. & Makela, O., 1975. Carrier preimmunization in the antibapten response of a marine fish. *Nature*, 254: 718.
- Tatner, M. F. & Horne, M. T., 1983. Factors influencing the uptake of ¹⁴C-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 22: 585-591.
- Tebbit, G. L. & Goodrich, T. D., 1983. Vibriosis and the development of effective bacterins for its control. In *Antigens of Fish Pathogens*, 225. Collection Foundation Marcel Merieux.
- Thuvander, A. *et al.*, 1987. Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELISA after vaccination of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis. *J. Fish. Dis.*, 10: 479-486.
- Trump, G. N. & Hildemann, W. H., 1970. Antibody responses of goldfish to bovine serum albumin: Primary and secondary responses. *Immunology*, 19: 621.
- Vestergaard-jorgenson, P. E., 1982. Egtved virus: temperature-dependant immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish. Dis.*, 5: 47-56.
- Walker, P. D. & Foster, W. P., 1981. Bacterial vaccine production. In *Essays in Applied Microbiology* (J. R. Norris & M. H. Richmond Eds.), 2-31. Wiley & Sons.
- Wardle, C. S., 1971. New observations on the lymph system of the Plaice (*Pleuronectes platessa*), and other teleosts. *J. Mar. Biol. Assoc., U. K.* 51(4): 977-990.
- Weber, J. M. & Zwicker, B., 1979. *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar*): occurrence of specific agglutinins to three bacterial pathogens. *J. Fish. Res. Board. Canada.*, 36: 1102-1107.
- Weinberg, S., 1975. Occurrence of lymphoid cells in the intestine of the goldfish. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 45(2): 195-204.
- Wise, J. A. *et al.*, 1985. Detection of channel catfish virus in asymptomatic adult channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish. Dis.*, 8(6): 485-493.
- Yocum, D. *et al.*, 1975. The hapten-carrier effect in teleost fish. *J. Immunol.*, 114(3): 925-927.