

## 4-16 鱼类疫苗接种技术

谢海侠 译

(中国科学院水生生物研究所鱼病室, 武汉, 430072)

1942 年, Duff 首先研制出了抗疔疮病的疫苗, 然而这并没有引起疫苗制备的热潮。二战后的那些年人们主要运用化学疗法: 内用抗生素, 含硫药物等; 外用福尔马林, 高锰酸钾, 孔雀石绿等。直到 70 年代末, 由于化学疗法的种种弊端逐渐显露, 人们才把目光转向疫苗——一种有效而又经济的鱼病防控手段。

疫苗通常有四种免疫途径。即: 浸泡免疫, 注射免疫, 口服免疫, 喷洒免疫。如何更好的使用疫苗, 从而达到事半功倍的效果呢? 下面, 从疫苗使用的原理及技术细节方面予以详细阐述。

**直接浸泡:**

浸泡免疫是一种已被广泛采用的操作简便而又极为高效的疫苗使用途径: 鱼类通过体表摄取抗原, 更主要的是由鳃来吞取。我们通过实验及试验得出了商业疫苗使用的几个主要的标准参数。

Tab 1 鱼类浸泡免疫的标准参数

疫苗的稀释倍数	浸泡时间及技巧	浸泡鱼的数量
1: 10	浸泡小批鱼 30-60 秒	100kg
1: 500	加入水, 1 小时	35-50kg
1: 300 (shrimp)	加入水, 3-6 小时	200, 000
鱼的大小	种类	保护时间
0. 5-2. 0 g	鲑鱼	<4 月
2. 0-20 g	鲑鱼	9-12 个月

我们用作疫苗的, 能给机体以保护力的菌苗的量, 在大多情况下是不确定的。例如, 气单胞菌属菌苗的保护性抗原是调节铁离子的外膜蛋白, 而其它的抗原只起辅助作用。弧菌属菌苗的脂多糖是保护力的渊源。这样, 菌苗高度纯化后, 我们只是用无蛋白的部分作为抗原, 结果保护力很低或根本没有保护力。由此可见, 菌苗的蛋白部分在免疫鱼过程中作用极大, 这当然并不排除在纯化过程中脂多糖的抗原性受到破坏。纯化的疫苗中缺少一、二个抗原性因子, 就使疫苗的稀释倍数变得不确定了。因此, 疫苗生产商考虑到疫苗可能过度稀释, 不得不在疫苗使用说明中加上安全范围。同时一些试验表明适度稀释并不会导致疫苗保护力下降, 但过度稀释却会导致保护力的急剧下降。疫苗的可稀释程度依疫苗, 鱼苗等而定。

浸泡免疫的时间也并不是严格确定的。实验表明: 细菌性抗原的接入, 在 8-10 秒

时达到最大。这样的数据往往是从实验室得到的。在渔场,每次打捞 5—10 kg 的受试鱼,鱼群拥挤,鳃盖紧闭,达到最佳效果一般需 30 秒。就疖点病而言,一般需 60 秒,以获取最大程度的保护。

当抗原浓度较低时,延长浸泡时间,对提高保护力有一定的作用。例如,想在鱼群不受任何人为干扰时免疫鱼,可将疫苗直接加到纳鱼池,以更长的暴露时间来补偿疫苗的低浓度。鱼夫以鱼的种类,体质,水温以及能生活一小时的最小水体积为依据,按 1:500 加入疫苗,增氧,一小时末,重新开始注入清水。如此可见,决定疫苗数量的关键因子是水体积。

浸泡小鱼,操作方便,价格低廉,深受人们欢迎。一般 15 g 以下浸泡免疫,15-30 g 泼洒免疫,30 g 以上注射免疫。Amend and Johnson 认为,免疫免疫系统尚未发育完善的小鱼,会引起免疫耐受。不到 1 g 鱼,免疫反应弱,具有保护力的时间非常短。1—2 g 的鱼,有 3—4 个月的保护力。2 g 或 2 g 以上的鱼,可得到长期保护。

总之,如果鱼苗在最初几个月时就会发病,则在尽可能早得时候免疫,如在成鱼池要得到好的保护,则需再次免疫;或在 3—5 g 准备离开孵化池时进行免疫。

太早暴露抗原而引起的免疫耐受,使得鱼类不能识别异物,这在理论上是冒险的,但在大规模的生产实践中却未作为问题提出。免疫疗法引起大量幼鱼死亡,因尔,宜以早期免疫的效果作为审核对象。

#### 泼洒免疫

15-30 克 / 条的鱼放在传送带上,从上方的喷头喷洒 1:10 稀释的疫苗 5 秒以上。跟浸泡免疫一样,抗原经鳃进入体内,据此,每升未稀释的疫苗,要浸泡 2.50 kg 的鱼。尽管这种方法的田间试验效果良好,但人们还没有很好地利用。

#### 经口免疫

口腔免疫比浸泡和注射的代价为高。在渔民看来最理想的疫苗是口服疫苗,这种疫苗比目前任何方法都经济,而且只要一次口服就能 100% 产生保护力。但是这种可获得诺贝尔奖的疫苗在目前的技术条件下还不可能期望投入生产,因为经测试这种疫苗的成本比浸泡和注射要高得多。

肛门插管法免疫的成功,使人们得出这样得结论:如果疫苗在经过前肠时得到良好保护,就能完整到达后肠。经口免疫就应具有这样的效果。通常来说,这是不可能的。目标抗原不论是与动物胶,肠外被,还是脂质体结合成微囊以到达肠的特殊部位都并不难,只是抗原必须大量地穿过肠壁,到达淋巴组织,才能激起强的体液免疫反应。特别的是:鲑鱼好象抑制其肠壁细胞中的特殊抗原的传送。制作微囊使得成本增加,与未保护的抗原相比,还可能降低保护力。

佐剂能够增强免疫反应。经口免疫一般用免疫刺激复合物 (ISCOMs)

口服疫苗的适宜剂量需通过田间试验来估算。如果混合饲料中的疫苗量是个标准值,那么投饲量就需调准;如果疫苗混合率是个变量,那么饲料投喂率就是疫苗摄入量的决定

\* 谢海侠,中国科学院水生生物研究所在读博士生,导师: 戚品研究员

因子。人们常常把疫苗和饲料混合，做成大小适宜的丸子，于每天早上投喂。因此，人们可以根据日粮（摄食量占鱼体重的百分比），决定疫苗适当的投喂量。商品化生产中，可依照下表的配方进行：

Tab. 2 Dose calculation for oral vaccine administration in fish

Pellet size	Fish weight (g)	Daily feeding rate
2.5mm (D)	<50	0.7%
	50-75	0.6%
	75-100	0.5%
	>100	0.4%
4.0mm (D)	<150	1.2%
	150-200	1.0%
	200-250	0.9%
	>250	0.8%
6-9mm (D)	<750	0.5%
	750-1000	0.6%
	1000-1500	0.5%
	>1500	0.4%

建议使用的剂量是为了确保在几天内所喂养的所有鱼都能最终获取一最低剂量的疫苗。抗原过量的危险是不存在的，但如饲料配置中的免疫增强因子等其它成分却是剂量敏感性的。田间实验中口腔免疫效果参差不齐的部分原因是，不可能每条鱼都能获取必需的抗原性物质。然而，口腔免疫的好处是显而易见（表3）通过佐剂来提高免疫效果的研究还是很有必要。

Tab. 3 Claimed advantage of oral vaccination of fish

好处	论 据
性能提高	生长率稳恒 无因伤疤及色素而导致的级别下降
免疫操作简单易行	鱼不挨饿，无追胁 不需专门人员，不需特别设备
灵活性大	自由选择免疫时间 容易组织免疫
安全	无危险性操作 无由针传染传染病的危险

### 注射免疫

鲑鳟鱼的工业化生产中普遍使用的是注射免疫，一次注射免疫可获得终生高度保护。人工注射免疫，每天工作6-8小时可注射8-10000尾鱼，同时把鱼分级记数，丢弃畸形的并检查鱼病。注射单价疫苗一般10000单位每升，偶然500单位每升；多价苗建议10000，500

或更少都可以。

在注射免疫中有很多麻醉剂可供选择,如:苯,氯丁醇,和 MS-22 都是最常用的。由于使用是时的温度,剂量,麻醉剂的效用时间等不同,麻醉剂的使用浓度也就有所不同。根据试验得到经验值如表 4:

Tab. 4 Anaesthetics for fish used by inclusion in the holding water

麻 醉 剂	剂 量
4-氨基乙基安息香酸盐	50mg/l
氯丁醇	1g/l
三卡因甲烷磺酸盐	50-100mg/l

### 危险因子: 安全

一般而言,口腔免疫和浸泡免疫的风险很小。最大的危险可能存在于当鱼已患病但尚无症状,而我们在这时捕捞鱼进行免疫,攻击了鱼的免疫系统,致使在免疫后不久鱼即患病。然而注射免疫得担许多风险。首要的就是执针人的安全。

### 免疫接种的风险因子: 副作用

由于使用油性佐剂而获取的高水平的免疫保护力,特别是患疖点病的鱼免疫后就不再患任何疾病,这肯定在鱼体产生了不同程度的生理副作用。其程度随鱼所处的环境条件,生理状况,鱼的品系及所使用的疫苗而变化。免疫好几天后,鱼才能完全恢复摄食,这将导致生长率降低。有报道说即使在完全恢复摄食后,与未免疫鱼的比较低生长率仍会将持续下去。免疫后鱼可能会立即受到无常的攻击,人们一般用一或两次杀菌剂来预防之。

所有的注射免疫,即使是生物或矿物盐作佐剂,都会在腹腔引起外伤。最为严重的是生长减慢及一定比例的死亡。

然而,总的来看,由免疫操作所引起的品位下降及生长减缓的比例是极小的。更多的是免疫后死亡率极低,因而节省了管理的人力,用药的财力。

### 管理方针

上文中我们根据鱼的种类及市场行销,分别阐述了浸泡免疫,注射免疫及泼洒免疫。除鲢的爱德华氏菌属的疫苗外,我们尚不能获取商品化的口服疫苗。但口腔免疫在淡水及广泛养殖鱼类中显然占有一席之地。因为人们对早期的浸泡免疫能否充分防御种种料想的抗原攻击持怀疑态度。免疫的公用模式如表 5:

Tab. 5 Common regimes for the administration of vaccines to various sizes and species of fish

种 类	浸 泡 免 疫				注 射 或 泼 洒 免 疫	
	0.5g	1.0g	5g	10g	25g	>25g
鲑 鱼		(1,2)	1,2			
鳟 鱼		(1,2)	1,2			
大马哈鱼			(1,2)		<=2,3,4,7=>	<=2,3,4,7=>
鳊 鱼	3	3				

尖吻鲈		3	<=3=>			<=3=>
鲷		(3)6	(3)6	(3)6		
石斑鱼		3	3			
虾	5=>	<=5=>	<=5=>			

疫苗: 1. *Yersinia rucker* 2. *Aeromonas salmonicida* 3. *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalii*; 4. *vibrio salmonicida*; 5. *vibrio parahaemolyticus*; 6. *photobacterium damseli*; 7. infectious pancreatic necrosis; ( ) occasional use.

鲑科的ERM和疖点病疫苗一般用于3.5-5.0g淡水阶段幼鱼的浸泡免疫,在这种免疫保护下,不到12个月的生长期就可达到商品规格。如果疾病出现在早期或孵化期,就得使用额外得疫苗。人们常常在把鱼转入池塘或海水之前免疫,待鱼体恢复正常,保护形成才将鱼转入不同水体。这样使其得到尽可能长时间的保护并省去日后免疫的诸多麻烦。秋季水体转换时免疫最佳:水温尚高,体质很好。

在大麻哈鱼养殖中往往要先把鱼从孵化槽转到池塘或湖泊中的插箱,再转入海水,在过渡期,自然就可能接触病原。因此,需免疫两次:转出孵化槽时一次,转入海水时注射免疫一次。或者人们可设计一种免疫方案,使用油性佐剂,一劳永逸。

尖吻鲈养殖中,1.5-2.0g的仔鱼转出孵化槽前用弧菌菌苗浸泡免疫,可获得3-5个月的保护,当其长到6-12g时,进行第二次浸泡免疫,此时一般在插箱中进行,又获得10-15个月的保护,到那时即可达到市场规格。有时需在80g左右时进行第三次注射免疫。

象石斑鱼和鲷这样的温水鱼,又需采取不同的免疫方案。*Photobacterium damseli*常造成鲷幼鱼的大批死亡。因此从0.3g开始就得不断进行浸泡免疫。*Vibriosis*往往给石斑鱼带来慢性感染,并导致大鱼的生长率降低。故在5.0g左右进行早期免疫,接着注射免疫,以控制较晚开始出现的大鱼的综合症。

疫苗使用是大规模的水产养殖不可或缺的。但每种养殖都有自己独特性。我们需要因地制宜,对症下药。新品种出现后,我们要针对其免疫系统的独特性制定适宜免疫策略。甲壳类及贝类的大规模养殖也急需健康方案的出台。

本文主要参考 M.T.Horne,1997,Technical Aspects of the Administration of Vaccines; Gudding R,Lillehaug A,Midtylyng PJ,Brown F(eds):Fish Vaccinology. Dev Biol Stand Basel,Karger, 1997, vol 90, pp 79-89