

文章编号:1000 - 0615(2006)02 - 0264 - 08

综述·

我国渔用疫苗的研制

杨先乐, 曹海鹏

(上海高校水产养殖学 E 研究院,农业部渔业动植物病原库,上海水产大学,上海 200090)

关键词:渔用疫苗;研制

中图分类号:S942.5 文献标识码:A

The development of aquaculture vaccines in China

YANG Xian-le, CAO Hai-peng

(E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission,

Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Fish vaccines play an important role in the control of fish diseases, especially in the control of some malignant infectious diseases, such as the prevention and cure of some viral diseases like hemorrhage disease of grass carp, spring viremia of carp, infectious pancreatic necrosis, etc., bacterial diseases like furunculosis, etc., and the control of diseases happening in large waters like lakes and reservoirs, etc.; they are also able to avoid the inefficacy of disease treatment caused by resistance of pathogens to drugs, therefore, their use in the control of fish diseases is considered as most important means by harmless fishery. The history of fish vaccines is only a little more than 30 years in China, fortunately, they went through a rapid development period and now are at a new age during which high technologies expand rapidly, vaccines evolve sharply and traditional and new generation vaccines clash repeatedly, however, still many obstacles appeared during their development, Some of which brought more difficulties to their development, such as the variation of pathogens, diversity of antigens and limited understanding of immunity functional genes; others affected their applications, such as the ambiguity of immune response mechanism, the lack of convenient effective methods and measures in administration and immunization efficacy enhancement; still others caused no commercial fish vaccines available now in China, such as the failure in the establishment of effective evaluating systems and methods. Hence, it points out in this review that first, the development trends of vaccinology must be catered for by researchers; second, basic theories of fish vaccinology should be further perfected; then, the application and innovation of fish vaccines in China should be further intensified by means of one or two grave aquatic animal diseases successfully cured; and then, the development of traditional vaccines and that of new generation vaccines should be combined; finally, in order to quicken the development of fish vaccines, new technologies should also be applied to their development of fish vaccines, depending on the research achievements of human and animal vaccinology.

Key words: aquaculture vaccines; development

翻开疫苗学的发展史,镌刻着以下里程碑:1796 年 Jenner 首次发现预防天花的牛痘疫苗,开创了疫苗免疫防病的新纪元^[1],1870 年 Pasteur 发明了第一个兽禽疫苗—

鸡霍乱细菌减毒活疫苗^[1],1942 年 Duff 研制了第一个渔用疫苗——杀鲑气单胞菌疫苗^[2],1986 年我国第一个渔用疫苗——草鱼出血病细胞培养灭活疫苗诞生^[3]。疫苗伴

收稿日期:2005-05-23

资助项目:上海市教育委员会 E 研究院建设资助项目(E03009);上海市重点学科建设资助项目(Y1101)

作者简介:杨先乐(1948-),男,湖南桃源人,教授,主要从事水产动物病害研究。Tel:021-65710870, E-mail:xlyang@shfu.edu.cn

随着人类与各种疾病的斗争而不断发展。但是与人、兽用疫苗的发展进程相比,渔用疫苗显得步履蹒跚^[4],在我国,渔用疫苗的研制和应用与世界第一水产养殖大国的称号极不相称,与把我国建设成为水产养殖强国的目标相距甚远。本文试图结合疫苗学的发展趋势,从我国渔用疫苗研制的历程中剖析其困惑,从而提出相应的建议和对策。本文用“渔用疫苗”而不用“鱼用疫苗”,是期待扩大疫苗在水产养殖中的应用范围;用“研制”而不用“研究”,是期待推动我国渔用疫苗生产和应用的进程。

1 渔用疫苗 - 水产动物疾病控制的有效途径

2002 年全世界水产养殖总产量达 5.139×10^7 t,在渔业总产量中所占的比率由 1970 年的 3.9% 增至 35.5%。然而水产动物病害频发、暴发、并发、多发,已成为水产养殖业持续发展的瓶颈。据统计,2000 年韩国水产养殖动物因病害所造成的死亡率就达 11.8%^[5];我国水产养殖病害的发生也相当严峻,仅病害就有 300 种以上,每年约有 1/10 的养殖面积受到侵袭,直接经济损失在百亿元以上^[6]。控制水产动物疾病的发生和蔓延已成为水产养殖持续发展的关键,而与其它防治途径相比,以疫苗为主的免疫防治有不可替代的优势。渔用疫苗在世界水产养殖的发展中已初露锋芒。渔用疫苗的使用,已使挪威鲑鱼产量由 1987 年的 4.60×10^4 t 上升到 2.92×10^5 t,年人均产量由 30 t 增加到 152 t,而抗生素的使用量却由 48.560 kg 骤降至 1.031 kg。1991 年 Alpha 推出的油剂疔疮病疫苗 Bioject 1500 可使免疫鱼获得终身保护。毫无疑问,渔用疫苗已显示出诱人的发展前景^[7]。

1.1 渔用疫苗自诞生之初就展示了强大的生命力

上世纪 30 - 40 年代初,由杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 引起的疔疮病严重威胁了鲑鱼类养殖业^[8]。加拿大学者 Duff 制备的世界上第 1 个渔用疫苗——疔疮病灭活疫苗,不仅使鲑鱼类增强了对杀鲑气单胞菌的免疫力,而且还在其血液中检测到凝集抗体^[9]。Snieszko 和 Fiddle 认为用疫苗口服免疫的效果不亚于当时具有轰动效应的磺胺类药物^[10]。此后, Krants 等^[11]、Spence 等^[12]将疔疮病疫苗的研制和应用推向纵深。1970 年挪威 Alpha 公司对疔疮病疫苗进行了商品性生产,进一步展现了渔用疫苗的应用前景。

1.2 渔用疫苗是控制并发症、恶性传染病及其它杂症得心应手的工具

近年来,水产动物疾病继发和并发的现象十分普遍,往往 3~4 种疾病交织在一起,如草鱼出血病与烂鳃病、肠炎病、赤皮病等并发,中华鳖的腐皮、疔疮、出血病并发等,再加上一些恶性传染病及其他疑难杂症,给防治带来了困难。使用疫苗对控制这类疾病具有较好的效果。上世纪

90 年代,我国研制的“四联土法疫苗”和草鱼出血病细胞培养灭活疫苗^[13]在治疗草鱼疾病上曾发挥了较大的作用。丹麦和法国研制的 SVC 疫苗也成功控制了鲤春病毒病 (SVC),在阻止欧洲 SVC 的流行中起到了重要作用^[14]。此外,应用疫苗,传染性胰脏坏死病 (IPN)、传染性造血器官坏死病 (IHN) 均在一定程度上得到了控制。

1.3 渔用疫苗是大水面疾病控制的有效手段

水产养殖的发展,除了走工厂化、集约化之路外,向较大水域拓展已是另一途径,如浅海养殖、滩涂养殖、深水网箱养殖、湖泊、水库养殖等,然而面对这类水域日益严重的疾病发生,传统的疾病防治手段往往无能为力。渔用疫苗是控制这类养殖方式疾病发生的一项更为有效措施。

1.4 渔用疫苗可避免因耐药性而造成治疗无效的困境

日本和欧洲等国的学者曾大规模调查研究了鱼类细菌的耐药及其变迁状况,发现因药物使用造成的耐药菌株产生快,数量多,普遍存在交叉耐药的现象^[15]。病原体耐药性的产生无疑增加了整个疾病防治的难度。20 世纪 40 和 50 年代,磺胺类等抗菌药物大量使用,导致疔疮病的病原体产生较强的耐药性,使该病的防治一筹莫展;而 FSA 菌苗的研制和应用给该病的防治带来了曙光^[16]。

1.5 渔用疫苗可满足无公害渔业对疾病控制的要求

疯牛病、口蹄疫、禽流感、二噁英、氯霉素等事件,已使食品质量和安全问题受到广泛关注,水产品中有毒有害物质的残留也日益受到重视,以前被养殖者列为法宝的药物防治也在一定程度上受到质疑。渔用疫苗以其副作用小、无残留、安全性强的优点逐渐受到人们的青睐,要保障水产品的安全,要控制水产养殖动物疾病的发生,使用渔用疫苗是最佳的选择。

2 渔用疫苗 - 在我国的快速孕育历程

我国渔用疫苗的研制仅 30 余年历史,但它却处在一个高新技术迅速扩张、疫苗急速演变、经典疫苗和新型疫苗不断碰撞的变革时期,30 多年来它走过了一个快速孕育的发展历程。

2.1 萌芽期 - 组织浆等土法疫苗的使用是我国渔用疫苗研制和应用的“预演”(1973 - 1986 年)

1973 年研究者开展了对草鱼出血病组织浆灭活疫苗 (即土法疫苗) 的研究,并取得了受试草鱼免疫长达 14 个月、攻毒感染后成活率高达 93%~100% 的效果。该疫苗在湖北、湖南、江苏等省市草鱼主要养殖区推广应用后,使草鱼种的成活率由原来的 30% 左右提高到 80% 以上^[17]。与此同时,草鱼烂鳃、肠炎等细菌性组织浆灭活疫苗的研究也在如火如荼的进行,其研究成果不仅在一定程度上解除了草鱼病的危害,而且拉开了我国渔用疫苗研制的序

幕。

2.2 奠基期 - 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研制正式迈出我国渔用疫苗研制的步伐(1986 - 2000年)

1986年,通过草鱼肾细胞(CIK)培养的草鱼出血病病毒灭活疫苗取得了较好的免疫效果和较高的中和抗体效价^[4],此后草鱼细菌性疫苗,如斑点气单胞菌苗、草鱼烂鳃病菌苗、肠炎菌苗等的研制也取得了较大的成果^[17]。上世纪90年代初,中华鳖嗜水气单胞菌灭活菌苗的研制^[18],海水鲈鱼鳃弧菌口服微胶囊疫苗的制备等^[19],进一步推动了我国渔用疫苗研制的进程。与此同时,研究者们开始致力于致病体保护性抗原研究^[20-23],如嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompTS* 的表达及其免疫原性^[21],副溶血弧菌外膜蛋白的抗原性^[22],爱德华氏菌脂多糖对日本鳊的免疫原性^[23]等,这些研究均奠定了我国渔用疫苗研制的基础。

2.3 发展期 - 新技术的诞生激发了我国渔用疫苗研制的新思路(2000年以后)

分子生物学、基因工程技术等学科的发展从分子水平上为研究疫苗的结构及其免疫机制提供了强有力的工具,也为疫苗的研制创建了新的思路,新型疫苗从此登上了疫病防治的舞台,掀开了疫苗学崭新的一页。我国渔用疫苗

的研制也在这一新思路的指引下,迈出了新的步伐。近几年,渔用疫苗研制的特点主要表现在以下几个方面:致病体重要功能基因的寻找,如张义兵等^[24]对草鱼出血病抗病相关基因的研究,陈晓艳等^[25]对斜带石斑鱼神经坏死病毒外壳蛋白基因克隆与序列分析的研究,黄新新等^[26]对副溶血弧菌外膜蛋白及抗原性的研究等。新型疫苗的研制,如嗜水气单胞菌亚单位疫苗^[27]、鳃弧菌抗独特性抗体疫苗的研制^[28]等。疫苗制备方法的研究,如微胶囊口服疫苗的研制及其效果的评价^[19]。新的思路促进了我国渔用疫苗研制的快速发展。

3 渔用疫苗 - 前进中的困惑

从 Duff^[2]发明了世界上第一个渔用疫苗以来,至今国外已有一些疫苗投入商品性生产和使用^[29-32](表1),它们在水产动物疾病防治上发挥了重要的作用;此外,基因工程疫苗、DNA疫苗等新型疫苗的研制也取得了较大的进展^[8,33,34]。然而我国仅有草鱼出血病细胞灭活疫苗和嗜水气单胞菌灭活疫苗获得国家新兽药证书,但这两种疫苗尚未实现真正意义的产业化应用,这使我国渔用疫苗的研制与国外相比,与我国水产养殖在世界上的地位相比,显得极不相称,较多的问题困扰着我国渔用疫苗研制的进展。

表1 国外已商品化的渔用疫苗

Tab.1 The commercial aquaculture vaccines in foreign countries

类型 type	疫苗名称 name of vaccine	使用国家或地区 countries or areas	
细菌疫苗 bacteria vaccine	杀鲑气单胞菌苗 <i>Aeromonas salmonicida</i> bacterin	欧洲、北美	
	自生菌苗 autogenous bacterin	欧洲、北美	
	鲑鱼爱德华氏菌苗 <i>Edwardsiella ictaluri</i> bacterin	北美	
	弧菌苗 <i>Vibrio</i> bacterin	亚洲、北美	
	鳃弧菌苗 <i>Vibrio anguillarum</i> bacterin	亚洲、欧洲、北美	
	副溶血弧菌苗 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> bacterin	亚洲	
	杀鲑弧菌苗 <i>Vibrio salmonicida</i> bacterin	欧洲、北美	
	鲁氏耶尔森氏菌苗 <i>Yersinia ruckeri</i> bacterin	欧洲、北美	
	爱德华氏菌苗 <i>Edwardsiella ictaluri</i> bacterin	北美	
	巴斯德菌苗 <i>Pasteurella</i> bacterin	欧洲	
	链球菌苗 <i>Streptococcus</i> bacterin	亚洲、北美	
	对虾多价菌苗 multivalent bacterin of prawn	亚洲	
	鳃弧菌 - 海鱼弧菌苗 <i>Vibrio anguillarum damsela</i> bacterin	北美	
	鳃弧菌 - 奥德弧菌苗 <i>Vibrio anguillarum Ordalii</i> bacterin	北美	
	鳃弧菌 - 杀鲑弧菌苗 <i>Vibrio anguillarum salmonicida</i> bacterin	北美	
	杀鲑气单胞菌 - 弧菌苗 <i>Aeromonas salmonicida-Vibrio</i> bacterin	北美	
	鳃弧菌 - 海鱼弧菌 - 耶尔森氏菌苗 <i>Vibrio anguillarum damsela-Yersinia ruckeri</i> bacterin	北美	
	气单胞菌 - 鳃弧菌 - 杀鲑弧菌苗 <i>Aeromonas-Vibrio anguillarum salmonicida</i> bacterin	北美	
	病毒疫苗 virus vaccine	病毒性出血败血症疫苗 viral haemorrhagic septicemia vaccine	欧洲
		传染性胰脏坏死病毒疫苗 infectious pancreatic necrosis vaccine	欧洲
传染性造血器官坏死症疫苗 infectious hematopoietic necrosis vaccine		北美	
虹彩病毒疫苗 iridovirus vaccine		亚洲	
草鱼出血病疫苗 hemorrhage disease of grass carp vaccine		亚洲	
鲤春病毒血症疫苗 spring viremia of carp vaccine	欧洲		

3.1 病原体的变异和抗原的多样性成为有效疫苗研制的主要障碍

弧菌、气单胞菌是水产动物疾病的 2 个重要致病菌。目前发现嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 能引起多种水产动物的败血症,其抗原型复杂,多达数十种,每个基因型和表型也包括多种不同的 O 抗原^[35];弧菌已经正式定名的有 37 种,它们的生物学、遗传学、血清学和表型各有差异,如鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*),至少具有 5 个生物型^[36],能使 50 多种海水养殖动物致病。病原体抗原的多样性无疑给疫苗研制造成了困难。除此之外,由于环境等因素的影响,病原体频频发生变异^[37],更加阻碍了疫苗研制的进程。虽然我国针对这 2 种致病菌疫苗的研究投入了大量的人力和物力,但至今仍无较突出的进展。

3.2 疫苗所针对的免疫对象的免疫应答机理不清,不仅增加了合理有效的免疫方案制定的难度,而且导致疫苗研制和使用的盲目性

我国水产养殖品种多达数十种,除了鱼类之外,还有甲壳类、两栖类和爬行类等,它们的免疫应答反应各有其特点,如果对其缺乏了解,势必会影响疫苗理想的免疫效果。“八五”和“九五”期间,我国曾对草鱼和中华鳖的免疫应答规律进行过探讨^[14,38,39],制定了疫苗的制检和使用规程。最近还研制了对虾的弧菌疫苗和 WSSV 基因重组病毒囊蛋白亚单位疫苗^[40-42],并获得了一定的效果,但是,令人疑惑的是,在对对虾免疫机理的背景完全缺乏了解的情况下,这种盲目的“疫苗研制”之路到底能走多远?

3.3 功能基因的研究缺乏扎实的前期研究基础

病原体功能基因——抗原基因、致病基因、免疫相关基因等的研究,已成为疫苗研制的一个前卫方向,Boudinot 等^[43]、Lorenzen 等^[44]分别获得了能诱导硬头鳞产生特异性免疫应答的 IHNV 和 VHSV 糖蛋白基因;Zou 等^[45]、Liu 等^[46]分别成功地克隆了细胞因子 IL-1 和趋化因子 CC;张义兵等^[24]也从灭活的草鱼出血病病毒中鉴定了 23 个抗病相关基因。这些研究均推开了新型渔用疫苗的研制大门。但是,由于对病原体的基本生物学特性如致病力、稳定性、变异、复制、保藏等还缺乏深刻的了解,对其基本理论和技术还未能完全掌握,以致后续的研究好似“空中楼阁”,难以获得理想的结果。

3.4 渔用疫苗的应用缺乏有效、方便的给予途径

与人、兽用疫苗不同,渔用疫苗的给予途径较为复杂,故使疫苗的应用显得更为重要。目前渔用疫苗的给予主要有 3 种方式:注射、口服、浸浴或喷雾。注射因易引起鱼体受伤,且费时费力,受到较大的限制^[47];口服虽然是一种方便的途径,它不会受到时间、地点和鱼体的大小限制,可减少劳动强度和因水产动物的应激所带来的不良反应^[48],但疫苗的抗原性易受消化液破坏,再加上疫苗用量大,免疫效果差等影响而在应用上受到较大的限制^[48-50]。

浸浴和喷雾均均作用鱼体外部,常被视为同一种给予方式,也是目前常使用的一种给予途径,但也存在很多困惑:

疫苗进入鱼体的路径问题,是通过皮肤、鳃、侧线鳞还是其它部位^[49];疫苗是以可溶性还是颗粒性的抗原进入鱼体^[51];疫苗诱导的免疫是通过血液循环系统还是粘膜系统起作用;影响疫苗进入鱼体的因素问题,如高渗、疫苗和鱼体接触的时间、喷雾免疫时对鱼体的压力等^[52,53];新型渔用疫苗在采用浸浴的方法给予时,在技术上仍存在需前处理和给予浓度大的难题,在经济上也受到因成本高而不能应用于生产的困扰^[54]。

3.5 较多因素制约着疫苗的使用效果

渔用疫苗虽然是一种生物制品,但人们习惯将其看成一种“药物”,药物针对患病动物群体,而疫苗却针对健康动物群体;如果在时间和对象上盲目使用,疫苗就不能发挥预期效果。此外,其他因素也会影响疫苗的效果,如环境(水温、水质、光照、季节等)^[55,56],机体状况(年龄、体重、营养状况、生理状态、群体效应等)^[50,57],以及疫苗本身(免疫原性、制备、贮藏、运输、给予方式、剂量和次数等)^[58,59]等。目前研究者较多强调了渔用疫苗的实验室研制,而忽略它们在“大田”、在生产上应用的研究,因此,我国渔用疫苗目前还仅仅是一种停留于实验室里中“看”而不中“用”的“香饽饽”。

3.6 缺乏增强疫苗免疫效果的措施和方法

使用佐剂是增强渔用疫苗免疫效果的一个重要手段,如在对草鱼进行浸浴免疫时,有人使用茛菪碱,以增强疫苗的免疫效果,他们认为茛菪碱可促进鱼体的微循环,提高鱼体对疫苗抗原的吞噬和吸收^[60,61]。但对佐剂的增效作用有人尚持有否定观点,他们认为铝佐剂的增效作用不明显^[62,63],使用弗氏佐剂能导致佐剂病,建议渔用疫苗不使用佐剂^[64]。但这些报告,均缺乏直接的依据。如何增强渔用疫苗效果尚存在较多需弄清的问题。

3.7 缺乏有效的疫苗效果评估体系和方法

一个较好的渔用疫苗,它应该具备以下特点:较高的安全性,既要保证疫苗作用对象的安全,也要保证人类和生态环境安全;能刺激动物机体产生较强的免疫应答,对所防治的疫病起到较强的免疫保护作用;有较长的免疫保护期且不宜产生免疫耐受;生产工艺成熟、稳定,便于贮藏和运输;价廉和方便使用。在某种程度上说,渔用疫苗较人、兽用疫苗的研制稍容易,但由于目前仍缺乏可操作的评估系统和方法,所以无法对所研制的渔用疫苗做出正确、科学地判断。

3.8 商品性渔用疫苗迟迟不能应市

目前我国已经批准了草鱼出血病疫苗和嗜水气单胞菌苗可进行商品性生产,但是仍旧没有得到推广应用。为什么我国的商品性渔用疫苗迟迟不能应市?可能有以下几个方面的原因:疫苗免疫原性较差,免疫效果不理想,而导致免疫保护率较低^[65],在生产上没有使用前景;不

重视中试转化环节,实验室的研究与生产应用脱节^[66];缺乏良好的疫苗生产基地,疫苗生产的工艺水平低,生产成本较高;Michel 等在对疫苗的保护力和经济效益进行评价时指出:渔用疫苗能否具有商品性生产前景的关键是有无经济效益^[66];部分疫苗有返强现象,安全性得不到保证;渔民缺乏对疫苗的正确理解和合理有效使用疫苗的方法,不是对疫苗期望值过高,就是盲目使用,未能对免疫动物起到免疫保护作用;我国水产养殖的种类多,疾病类别多,而疫苗的特异性、专一性又较强,导致渔用疫苗的市场狭窄,开发生产成本高,影响渔用疫苗的商品化进程。

4 渔用疫苗 - 发展趋势

渔用疫苗的诞生是世界文明进步的象征,渔用疫苗的发展也将在一个方面折射世界文明进步的足迹,渔用疫苗在控制水产动物疾病方面所表现出的经济性、商业性以及无比的魔力^[64]将不断推动着我国渔用疫苗的研制工作。虽然我国渔用疫苗的研制面临着一些僵局,但它仍孕育着美好的前景。

4.1 强化“渔用疫苗学”基础理论的研究

我国渔用疫苗的研究起步较晚,起步水平较低,水产动物基础免疫学知识薄弱,加之水产动物跨越的物种范围大、种类多,导致渔用疫苗的研制和应用也受到较大的制约。加强“渔用疫苗学”基础理论的研究,完成渔用疫苗学从经验归纳到概念演绎的过渡显得尤为重要。目前,所要解决的主要问题是:水产动物的免疫系统及其功能;抗原分子诱导水产动物机体产生反应的过程和免疫应答规律;病原体的结构、功能、生物学性质;渔用疫苗设计、制作的技术基础及方法学;渔用疫苗的免疫效果与环境、机体之间的关系等。

4.2 集中精力,以解决 1~2 个严重的水产动物疾病为突破口,推动渔用疫苗研制的进展

纵观疫苗的发展史,每一个重要的里程碑都是建立在其成功控制一个重大疾病的基础上。从 1796 年接种的第 1 个牛痘疫苗攻克天花开始,到 1870 年第 1 个鸡霍乱细菌减毒活疫苗的发明,1884 年第 1 个病毒减毒活疫苗——狂犬病疫苗的应用,1986 年第 1 个重组疫苗——重组乙型肝炎疫苗的生产以及近期对艾滋病疫苗的挑战^[1],无不体现了这一点。渔用疫苗的研制也是如此,第 1 个渔用疫苗的诞生^[2];我国草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的问世^[3];第 1 个鱼类基因工程疫苗——传染性造血器官坏死症疫苗专利的获得^[67]等。针对目前对我国水产养殖危害较大的、较普遍的传染性疾病进行疫苗的研制,将有助于推动我国渔用疫苗学的理论与实践的发展。

4.3 经典与新型渔用疫苗的研制相互依存、共同发展

经典渔用疫苗是将整个病原体灭活或减毒或是对抗

原进行纯化后而制备的一种疫苗。这类疫苗在制备上较容易,机体可产生较高的应答水平,但极有可能保留一些活的致病体(因素)或是在抵抗多血清型,易变异的病原时缺乏相应的保护作用;新型渔用疫苗是以生物化学技术、免疫学技术、分子生物学技术作为疫苗研制平台,设计和制造的一种全人工控制的疫苗,如重组疫苗、核酸疫苗、特异化疫苗等,由于该疫苗是针对经典疫苗诸多弊端而发展起来的,故具有较多的优点。但新型渔用疫苗还存在着较多理论和技术上的盲点,距临床应用还有一定距离。如鲑鳟鱼类传染性造血器官坏死症(IHN)和病毒性出血败血症(VHS)DNA 疫苗虽然取得了一些令人鼓舞的进展,但目前仍处于实验室的摸索阶段^[68-70],加上疫苗安全性确认、免疫给予途径等方面的原因,近期尚难以商品性生产。因此,研究者不应该把全部精力集中在新型疫苗的研制上,而应兼顾目前的研究水平、水产养殖的亟需以及学科的发展与进步等方方面面的因素,使二种类型渔用疫苗的研制相互结合、相互渗透。

4.4 将新技术贯穿于渔用疫苗研制领域,借助人、兽用疫苗学研究的成果,加快渔用疫苗的研制进程

随着生物化学、物理化学、分子生物学等技术的进步,疫苗的研制有了更多的手段^[71],如与有机化学和物理化学技术相结合的层析技术,与生物化学相结合的多糖分离技术、电泳技术、裂解技术、酶解技术,与微生物学与基因工程相结合的发酵技术、DNA 重组技术;此外还有免疫学检测技术,实验动物技术,投递系统技术以及在筛选鱼类免疫调节相关基因中展现前景的抑制消减杂交(SHH)技术^[72,73]和在鱼类免疫系统研究中崭露头角的噬菌体抗体库技术^[74]等。如若将这些新技术有机地融入渔用疫苗的研制,无疑会极大地提高其研制水平,加快其研制进程。

4.5 渔用疫苗给予途径的研究关系到渔用疫苗的效果,是疫苗研制的一个重要组成部分

浸浴和口服是目前渔用疫苗给予途径的重点研究方向。浸浴要解决的问题有确定免疫原所需的量、提高免疫效果以及降低疫苗成本等。口服是渔用疫苗的一种理想的给予方式,英国水产养殖疫苗有限公司(AVL)已开发出 AquaVac 抗弧菌口服疫苗和 AquaVac ERM 口服疫苗。近年来,由于微囊化技术的迅速发展,口服微球缓释疫苗的研究展开,渔用疫苗口服给予途径的研究又有了新技术^[48,75],其研究方向是:建立一种能在饲料和水产动物肠胃中保持疫苗抗原稳定性的系统;开发一种封装疫苗抗原能进入以上系统而不会使疫苗效价损失的方法;寻求简单、经济、有效的接种策略^[76]。

4.6 建立简便、正确、有效的渔用疫苗评价系统

渔用疫苗免疫效果的评价不仅关系到渔用疫苗本身,而且关系到渔用疫苗学的发展。评价系统除了要对疫苗安全性、免疫保护率及其所诱导的免疫学效应和免疫学

指标进行评价外,还要注重它的流行病学评价。只有通过疫苗现场流行病学效果的评价,才能对疫苗的质量和效果做出正确的判断^[71]。这种评价,是关系到我国渔用疫苗能否进入商品流通领域的关键。渔用疫苗评价系统既要有效,又要便于操作和比较。

4.7 加快渔用疫苗的中试试验基地建设

中试试验基地,是连接实验室和市场的重要桥梁,也是渔用疫苗再研究的一个重要场地。我国目前之所以没有商品性渔用疫苗上市,其原因之一就是缺乏中试试验基地。实验室所研究的疫苗,是否能真正阻止传染性疾病的流行,是否能真正在生产上使用,还需要中试试验基地的进一步研究,还需要中试试验基地的进一步验证。中试试验基地不仅要拥有先进的设备和仪器,也要拥有一支以我国渔用疫苗学研究为主体的优秀科研队伍,更需要较多的经费支撑。

4.8 注重水产动物免疫增强剂和佐剂的研究与开发

佐剂是伴随着疫苗的研制而被发现和发展的,从 Ramon 首先发现木薯淀粉等可增强疫苗的免疫抗体水平以来,至今已有 70 余年的历史。佐剂在增加渔用疫苗抗原的表面积,延长其在体内的存留时间,增强巨噬细胞和免疫相关细胞的活性,提高细胞介导的致敏反应能力,加快抗体产生和提高抗体水平等方面均起到了重要作用^[77-79]。由于基因重组疫苗、多肽疫苗以及核酸疫苗等新型疫苗免疫原性较弱,开发新型佐剂已成为渔用疫苗学的一个重要课题^[80]。其目前重点研究方向是:佐剂的作用机理,如佐剂的储存作用、抗原递呈作用、刺激 APS 分泌调节因子作用等;佐剂的正确选择。佐剂对渔用疫苗的增效作用并不是一致的^[77-79],有的佐剂能使鱼体生长减缓,导致“佐剂病”^[81],因此只有正确地选择佐剂,才能增强疫苗的免疫反应,减少副作用,使机体产生预期的免疫效果;拓宽思路,开发新型佐剂,并对其效果进行探讨。如胞壁酰二肽(MPP),它可提高病毒亚单位疫苗、合成肽疫苗以及某些寄生虫疫苗的免疫保护力;又如用多聚甲基丙烯酸酯(PMMA)纳米颗粒制备的多肽疫苗佐剂,它可明显提高疫苗的免疫原性和抗原性^[82];佐剂使用的安全性;佐剂的给予方式及其评价。

渔用疫苗在水产动物疾病防治上的不可替代性已展现了它的应用前景。我们认为,渔用疫苗研制应该迎合疫苗学的发展方向,力争在更高层次上发展创新:如研制出能同时控制多种水产动物严重传染性疾病的联合疫苗;改变疫苗只能预防的老观念,开发出治疗性疫苗;通过转基因技术,制备饵料食物疫苗,使水产动物在摄取饵料的同时也可获得免疫。总之,随着渔用疫苗研制在一个较高的科学技术支点上发展,我国一定会迎来渔业发展的新一轮曙光。

参考文献:

- [1] CDC. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases (Sixth Edition) [M]. Department of Health & Human Services, 2001. 1.
- [2] Duff D C B. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida* [J]. J Immun, 1942, 44 :87 - 93.
- [3] 杨先乐,杜森英,曾令兵,等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告[J]. 淡水渔业,1986,3:1 - 5.
- [4] 杨先乐,陈远新. 渔用疫苗的研究现状及其发展趋势[J]. 水产学报,1996,20(2):159 - 165.
- [5] Park M S, Lee B Y, Sung H J, et al. Status and prospects of fish diseases in Korea [A]. World Aquaculture Society[R], 2002. 586.
- [6] 黄艳平,杨先乐,湛嘉,等. 水产动物疾病控制的研究和进展[J]. 上海水产大学学报,2004,13(1):60 - 66.
- [7] Gudding R, Lillehuang A, Eversen C. Recent development in fish vaccinology [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 72: 203 - 212.
- [8] Duff D C B. Furunculosis on the pacific coast [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1932, 62:249 - 255.
- [9] Duff D C B. Dissociation in *Bacillus salmonicida*, with special reference to the appearance of a G form of culture [J]. J Bacteriology, 1937, 34:49 - 67.
- [10] Snieszko S F, Fiddle S B. Prophylaxis of furunculosis in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by oral immunization and sulphamerazine [J]. Progressive Fish-Culturist, 1949, 11:161 - 168.
- [11] Krantz G E, Reddecliff J M, Heist C E. Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout [J]. J Immun, 1963, 91:757 - 760.
- [12] Spence K D, Fryer J L, Pilcher K S. Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida* [J]. Canadian J Micro, 1965, 43:397 - 405.
- [13] 杨先乐,曾令兵. 草鱼对 CFRV 疫苗免疫应答的研究[J]. 水产学报,1993,17(4):312 - 318.
- [14] De Kinkelin P, Bernard J, Hattenbergen - Baudovy A - M. Immunization against viral diseases occurring in cold water [A]. Symposium on Fish Vaccine O I E, 1984. 186 - 191.
- [15] Aoki T, Kanazawa T, Kiao T. Epidemiological surveillance of drug resistant *Vibrio anguillarum* strains [J]. Fish Pathol, 1985, 20(2/3):199 - 208.
- [16] Klontz Gw, Anderson D P. Oral immunization of salmonids: a review [A]. Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes in Washington D C, 1970. 16 - 20.
- [17] 倪达书,汪建国. 草鱼生物学与疾病 [M]. 北京:科学出版社, 1999. 2 - 6, 78 - 86, 334 - 348.
- [18] 杨先乐,柯福恩,周剑光,等. 中华鳖嗜水气单胞菌灭活的研究 [J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(4):389 - 394.
- [19] 余俊红,沈继红,王祥红,等. 鳃弧菌口服胶胶囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(2):76 - 79.

- [20] 孙建和,严亚贤,陈怀青,等. 致病性嗜水气单胞菌保护性抗原的研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1997,13(3):20-23.
- [21] 谢俊峰,叶巧珍,何建国. 嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 ompTS 高效表达及其免疫原性[J]. 生物工程学报,2002,18(3):300-303.
- [22] 张晓华,徐怀恕,Peter Robertson,等. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性的研究[J]. 中国水产科学,1997,4(4):49-52.
- [23] 陈昌福,吴志新. 三种爱德华氏菌脂多糖对日本鳃鲷免疫原性的比较[J]. 水生生物学报,1982,22(增刊):126-131.
- [24] 张义兵,张奇亚,徐德全,等. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因[J]. 科学通报,2003,27(2):581-588.
- [25] 陈晓艳,黄剑南,吕铃,等. 斜带石斑神经坏死病毒外壳蛋白基因克隆与序列分析[J]. 水产学报,2004,28(2):181-188.
- [26] 黄新新,陆承平. 迟缓爱德华菌外膜蛋白抗原分析[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(6):385-387.
- [27] 孙建和,严亚贤,陈怀青,等. 嗜水气单胞菌亚单位疫苗的研制[J]. 中国兽医学报,1996,16(1):11-15.
- [28] Lightner D V. *Vibrio* disease of shrimps[A]. Sindermann C J, ed. Disease diagnosis and control in North American [N]. Elsevier Scientific Publishing Company (Amsterdam-Oxford-New York),1977.19-26.
- [29] Newman S G. Bacterial vaccines for fish[J]. Annual Rev of Fish Disasters,1993,145-185.
- [30] Ellis A E. Fish vaccination[M]. Academic Press, San Diego C A,1988. 255.
- [31] Leong J C. Viral vaccines for aquaculture[J]. Annual Rev of Fish Disasters,1993,225-240.
- [32] Christie K E. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis[J]. Dev Biol Stand,1997,90:191-199.
- [33] Anderson E D, Mourich D V, Leong J C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA[J]. Mol Mari Bio Biotech,1996,5:105-113.
- [34] Jenkins P G. Aspects of the molecular biology of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in relation to vaccine design[A]. First European Crustacean Conference (Paris) [C],1992,8:76-77.
- [35] Janda J M, Abbott S L, Khashe S, et al. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the gene *Aeromonas* [J]. J Clin Microbiol,1996,34:1930-1933.
- [36] Larsen J L, Jensen N L. The ulcus syndrome in cod (*Gadus morhua*), a bacteriological investigation [J]. Medd Vet Med, 1979,31:189-196.
- [37] Lightner P V, Lewis D H. A septicemia bacterial disease syndrome of penaeid shrimp [J]. Marine Fisheries Review, 1975,37(5/6):25-28.
- [38] 杨先乐,左文功. 水温影响草鱼免疫应答关系的研究[J]. 动物学报,1997,43(1):42-48.
- [39] 杨先乐,艾晓辉,周建光,等. 影响中华鳖免疫应答因素的探讨-免疫原(菌苗)与环境条件[J]. 水生生物学报,2000,24(3):227-233.
- [40] 陶保华,胡超群,任春华,等. 弧菌疫苗对斑节对虾和日本对虾免疫预防的作用[J]. 水产学报,2000,24(6):564-569.
- [41] Alabi A O, Jones D A, Iatchford J W. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi* [J]. Aquaculture,1999,178:1-11.
- [42] Witteveldt J, Cifuentes C C, Vlaskovic J M, et al. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination [J]. J Virol,2004,78(4):2057-2061.
- [43] Boudinot P, Blanco M, Kinkelin P. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of the viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and non-specific response in rainbow trout [J]. Virol,1998,249:297-306.
- [44] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, et al. DNA vaccines as a tool for analyzing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2000,12:439-453.
- [45] Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, et al. Molecular cloning of interleukin I beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site [J]. Cytokine,1999,11:552-560.
- [46] Liu L, Fujiki K, Dixon B, et al. Molecular cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) C C chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNT decoy receptor using cDNA fragments containing AU-rich elements [J]. Cytokine,2002,2:71-81.
- [47] Aguis C, Horne M T, Ward P D. Immunization of rainbow trout, salmon gairdneri richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes [J]. J Fish Diseases,1983,6:129-134.
- [48] Joosten P H M, Tiemersma E, Threels A, et al. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles [J]. Molecular Immunology,1997,7:471-294.
- [49] Fletcher T C, White A. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens [J]. Aquaculture,1973,1:417-428.
- [50] Dorson M. Applied immunology of fish [A]. OIE Press,1984. 39-74.
- [51] 陈秀男,郭光雄. 疫苗在鱼病防治上的应用 [J]. 中国水产(台湾),1987,411:32-39.
- [52] Tatner M F, Horne M T. Factors influencing the uptake of 14C-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout *salmo gairdneri richardson* [J].

- J Fish Biol,1983,22:585 - 591.
- [53] Gould R W, O 'Leary P J, Garrison R L, *et al.* Spray vaccination: a method for the immuneization of fish[J]. Fish Pathol,1978,13:63 - 68.
- [54] Fernandez-Alonso M, Alvarez F, Estepa A, *et al.* A model to study fish DNA immersion vaccination by using the green fluorescecent protein[J]. J Fish Dis, 1999, 22: 237 - 241.
- [55] Collazos M E, Barriga C, Ortega E. Enhanced granulocyte phagocytosis at low winter temperature and high summer temperature in the tench (*Tinca tinca* L.) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology,1994,109(3):643 - 648.
- [56] Zelikoff J T, Bowser D, Squibb K S, *et al.* Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: An alternative animal model for immunotoxicological studies [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health,1995,45(3):235 - 248.
- [57] van Loon J J A, van Oosterom R, van Muiswinkel W B. Aspects of developmental and comparative immunology I Salmon[M]. Pergamon Press,1981.469.
- [58] Kenji K, Riichi K. Field testing of oral *Vibrio anguillarum* bacterin in pond-cultured Ayu[J]. Fish Pathol,1985,20(2/3):413 - 419.
- [59] Johnson K A, Flynn J K, Amend D F. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins[J]. Journal of Fish Diseases,1982,5:197 - 205.
- [60] 张念慈. 莨菪对夏花草鱼浸泡免疫的增效作用[J]. 浙江水产学院学报,1990,9(2):79 - 83.
- [61] 赵建培, 史维舟. 在草鱼免疫反应中莨菪佐剂性的初步观察[J]. 淡水渔业,1995,25(1):3 - 5.
- [62] Manning M J, Tatner M F. Fish immunology [M]. Academic Press,1984. 171 - 184.
- [63] 杨先乐, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究:疫苗的稳定性和佐剂和加强免疫对草鱼免疫应答的影响[J]. 水生生物学报,1993,17(1):46 - 51.
- [64] Manning M J, Tatner M F. Fish immunology [M]. Academic Press,1985.221 - 229.
- [65] Walczak E M, Noga E J, Hartmann J X. Properties of a vaccine for channel catfish virus disease and a method of administration [J]. Dev Biol Standard,1981,49:419 - 429.
- [66] Michel C, Tixier M, Mevel M. Evaluation of the protective activity and economic efficacy of vaccines for fish[M]. OIE Press,1984.75 - 96.
- [67] Mark E H, Leong C L. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses[J]. Virus Res,1989,13(3):213 - 230.
- [68] Anderson E D, Mourich D V, Fahrenkrug S, *et al.* Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Mol Mari Bio Biotech,1996,5:114 - 122.
- [69] Anderson E D, Mourich D V, Leong J C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA[J]. Mol Mari Bio Biotech,1996,5:105 - 113.
- [70] Heppell J, Lorenzen N, Armstrong N K, *et al.* Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicemia virus genes as model [J]. Fish & Shellfish Immunol,1998,8:271 - 287.
- [71] 董德强. 疫苗技术基础与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2002.19 - 72.
- [72] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, *et al.* Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor beta CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridization [J]. Fish & Shellfish Immunol,2000,10(7):643 - 650.
- [73] Sangrador V A, Samuel A M M, Paul G O 'Dea, *et al.* Cloning and characterization of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type interleukin-1 receptor cDNA [J]. Eur J Biochem,2000,267:7031 - 7037.
- [74] Picchiatti S, Terribili F R, Mastrolia L, *et al.* Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L [J]. Anat Embryol,1997,196:457 - 463.
- [75] Eldridge J H, Staas J K, Meulbroek J A, *et al.* Biodegradable microspheres as vaccine delivery system [J]. Molecular Immunology,1991,28(3):287 - 294.
- [76] Lin L. Oral vaccine: a new idea for vaccination[J]. Fisheries International,2001,10:46.
- [77] Norris J R, Richmond M H. Applied microbiology [M]. Wiley and Sons,1981. 2 - 31.
- [78] Manning M J, Tatner M F. Fish immunology [M]. Academic Press (London),1984.171 - 184.
- [79] Stephen G N, John J M. Immunization of salmonids against furunculosis[J]. Fish Pathol,1985,20(2/3):403 - 411.
- [80] Kanellos T, Sylvester I D, Howard C R, *et al.* DNA はクンハク質と同等に抗体を誘導する[J]. 魚病研究,1999,34(2):91.
- [81] Manning M J, Tatner M F. Fish immunology [M]. Academic Press (London),1985. 221 - 229.
- [82] Kreuter J, Liehl E. Long-term studies of microencapsulated and absorbed influenza vaccine nanoparticles [J]. J Pharm Sci,1981,70(4):367 - 371.