

卵形鲳鲹对刺激隐核虫的免疫应答和免疫保护研究

但学明^{1,2} 李安兴¹ 林小涛³ 柏建山¹ 张海发⁴

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 3. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632;
4. 广东省大亚湾水乡实验中心 516081)

摘要: 用刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 的幼虫对卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 进行腹腔注射和体表感染, 然后每隔一周用阻动试验 (Immobilization assay) 检测免疫鱼的抗血清和皮肤培养液对刺激隐核虫幼虫的阻动效价, 在第 14 周中, 分别用亚致死剂量和致死剂量的刺激隐核虫幼虫对免疫鱼攻毒以检测所产生的免疫保护力。实验结果显示: 两种免疫方法都能让卵形鲳鲹的血清和皮肤生成阻动刺激隐核虫幼虫的特异性抗体, 并能使被免疫鱼获得明显的免疫保护, 但是体表感染免疫组的血清和皮肤培养液的阻动效价都要比腹腔注射免疫组高, 所获得的免疫保护力也更强。同时还发现, 免疫鱼血清和皮肤培养液中的抗体存在明显的差异: 两者的最初生成时间、达到峰值的时间、变化规律以及阻动效价等都不一致。因此, 我们推测鱼类的系统免疫应答和皮肤黏膜免疫应答有可能是相互独立的, 或者是不同步的。鱼类的体液免疫应答, 特别是黏膜免疫应答对抵御刺激隐核虫的感染起了重要的作用, 采用刺激隐核虫虫体疫苗可能成为预防海水鱼类白点病的一种选择。

关键词: 免疫应答; 免疫保护; 主动免疫; 刺激隐核虫; 卵形鲳鲹

中图分类号: S942.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)01-0013-06

刺激隐核虫是一种鱼类专性寄生虫, 寄生于热带、亚热带海水鱼身体引起“白点病”^[1], 刺激隐核虫的宿主范围很广泛, 除软骨鱼类对刺激隐核虫有较强抵抗力外, 海水硬骨鱼类普遍能被刺激隐核虫感染, 严重感染会导致鱼类大量死亡^[2-7]。近年来在中国南海海水养殖区“白点病”年年暴发, 对水产养殖业造成了很大损失, 特别是卵形鲳鲹的死亡率可达到 100%。但目前防治海水鱼类“白点病”的方法很有限, 虽然一些物理和化学方法能起到一定效果, 但它们都或多或少存在一些缺陷, 如对鱼有毒性、效果不确定或者不适用于大水体等等^[5,8-13]。Colomni 曾提出鱼类对刺激隐核虫可能会产生获得性免疫保护^[9]。此后他进一步提出: 由于刺激隐核虫生长于宿主的上皮层内, 与宿主有着更密切的关系, 合适的疫苗可能成为防治刺激隐核虫的有效方法^[1]。但是要对某种鱼采用免疫预防措施, 首先就要弄清楚该种鱼是否能对刺激隐核虫的感染产生获得性免疫力, 是否能得到足够的免疫保护。Burgess 等人首次

证明了鲷鱼 (*Chelon labrosus*) 可以对刺激隐核虫产生获得性免疫保护, 且保护力与感染强度成正比^[14]。Yoshinaga 等人发现经刺激隐核虫免疫后底鲈 (*Fundulus heteroclitus*) 能产生抗血清, 该血清能使寄生虫的幼虫纤毛聚积成团并发生阻动 (Immobilization)^[15]。我们在以卵形鲳鲹作为动物模型进行刺激隐核虫标准化传代过程中也发现, 随着被感染次数的增加, 卵形鲳鲹的抗感染能力逐渐加强, 感染上鱼的寄生虫数量逐渐减少^[16]。这些报道都未曾揭示被刺激隐核虫感染后鱼类体液免疫应答的规律, 然而弄清楚这种规律对采用免疫预防措施是非常重要的。

相对于多子小瓜虫细致而深入的免疫学研究^[17-22], 刺激隐核虫的研究工作才刚刚开始。刺激隐核虫与多子小瓜虫具有相似的生活史、感染模式和病理特征^[1,18], 鱼类对这两种纤毛虫的免疫防御机制可能也有很多相似之处, 因此我们可以借鉴一些研究多子小瓜虫的方法来对刺激隐核虫加以研究。本实验将采用阻动试验 (Immobilization assay) 来检测免疫鱼的抗血

收稿日期: 2006-11-19; 修订日期: 2007-03-27

基金项目: 国家自然科学基金 (30440052); 广东省科技计划项目 (2007B080701009); 珠海市科技计划项目 (200411022); 惠州市科技计划项目 (2006P58); 华南农业大学校长科学基金资助

作者简介: 但学明 (1972—), 男, 汉族, 四川眉山人; 博士; 主要从事水生经济动物病害防治研究。E-mail: dxm72@sohu.com

通讯作者: 李安兴, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

清和皮肤培养液对刺激隐核虫幼虫的阻动效价,揭示经刺激隐核虫感染后卵形鲳鲹的体液免疫应答规律。

1 材料和方法

1.1 刺激隐核虫的来源 实验中采用的虫株为本实验室建立的刺激隐核虫 GD1 株,我们已经成功地用卵形鲳鲹作为动物模型,建立起了一套高效的 GD1 株传代系统,可以随时获得足够的寄生虫用于实验^[16]。

1.2 实验鱼的来源、检测及咸化 实验所用的卵形鲳鲹((124.5 ± 38.1) g, n = 510) 购于广东省新会市,该地区海水盐度 3 ‰—7 ‰。为确认实验用鱼是否曾被刺激隐核虫感染过,随机抽取 20 尾鱼,用阻动试验检测其血清和皮肤培养液对刺激隐核虫幼虫的阻动效价。实验前对实验鱼进行咸化,在 2 周内把海水盐度从 7 ‰升高到 30 ‰。

1.3 实验分组和免疫方法 实验分为 3 组:对照组(210 尾鱼)、体表感染免疫组(150 尾鱼)和腹腔注射免疫组(150 尾鱼),整个实验过程水温均控制在(27 ± 0.5) °C。养殖用海水均由 600 目筛绢网过滤,盐度 29 ‰—32 ‰,溶氧 ≥ 5.0 mg/L, pH 7.9—pH 8.3,亚硝酸盐 < 0.1 mg N/L。

1.3.1 体表感染免疫方法 在刺激隐核虫的标准化传代过程中,按 Dan 等人的方法收集孵化 1h 内的活跃幼虫并计算出浓度^[16],分别在第 0 周(即实验刚开始)、第 2 周和第 12 周分 3 次感染实验鱼,感染剂量均为 8 × 10³ 幼虫/鱼。感染在 1000L 的塑料桶中进行,每尾鱼用水 5L,在黑暗条件下感染 3h 后开启循环水正常饲养。感染 60h 后鱼鳃和体表上出现明显的白色滋养体,再过 48h,滋养体全部从鱼体上脱落,附着于缸底形成包囊。为避免包囊孵出幼虫造成再次感染,此时把鱼移至另外一个干净的缸中饲养,原养殖缸用 200 μL/L 的福尔马林浸泡 8h,洗净后备用。

1.3.2 腹腔注射免疫方法 按 Dan 等人的方法收集刺激隐核虫死幼虫于 - 80 °C 保存^[16]。分别于第 0 周、第 2 周和第 12 周分 3 次免疫实验鱼。免疫前先将死幼虫解冻,加入 0.15 mol/L PBS 重悬,初次免疫加入等量的福氏完全佐剂(Sigma),加强免疫用福氏不完全佐剂(Sigma)。用振荡器把混合液振荡至乳液状,然后每尾鱼腹腔注射 0.2 mL,内含 1.5 × 10⁵ 个幼虫。

1.4 抗血清和皮肤培养液样品的制备 从第 0 周开始,每 2 周采血一次。采血时每个实验组随机抽取 10 尾鱼,用 100 μL/L 的丁香酚把鱼麻醉,每条鱼从尾部采血 2 mL,分装于 1.5 mL 离心管中,4 °C 过夜,然后 10000 r/min 离心 10 min (Eppendorf 5804R),收集

上层血清,56 °C 灭活 30 min,按每管 100 μL 等份分装, - 80 °C 保存,二个月之内测定其阻动效价。

每尾鱼采集血样后,再从体侧取 500 mg 完全皮肤组织(包括表皮层和真皮层),清除黏液、脂肪和肌肉后参照 Xu 等人的方法制备皮肤培养液样品^[22],样品按每管 100 μL 等份分装, - 80 °C 保存,二个月之内测定其阻动效价。

1.5 血清抗体和皮肤抗体阻动效价的测定 阻动试验在 96 孔组织培养板中进行,用灭菌海水以 2 倍数连续稀释抗血清或皮肤培养液,然后每孔同时加入等量的幼虫液(100 μL,约含 200 个活跃的幼虫),室温孵育 1h 后,用倒置显微镜(Olympus IX70)观察阻动试验结果,如果此时全部幼虫都死亡或停止游动聚集于板底,则视为有效阻动。能使幼虫有效阻动的最高稀释倍数即为该样本的阻动效价。如果样本在最低稀释倍数(1:2)的情况下都不能使全部幼虫有效阻动,则该样本的阻动效价记为 0。

1.6 幼虫对实验鱼致死剂量的测定 测定在实验第 13 周进行,此时实验鱼平均重量达到了(251.4 ± 30.1) g (n = 30)。按 Dan 等人的方法收集孵化 1h 内的活跃幼虫并计算出浓度^[16],从对照组随机抽取 60 尾鱼,分别用 10 × 10³、12 × 10³、15 × 10³、18 × 10³、20 × 10³、25 × 10³ 幼虫/鱼的剂量感染卵形鲳鲹,每个剂量组感染 10 尾鱼,感染时海水用量为 5 L/鱼,然后统计各组鱼的死亡率,能使全部实验鱼死亡的最低感染剂量即为致死剂量。

1.7 攻毒及免疫保护力的评价标准

1.7.1 用致死剂量幼虫攻毒 实验第 14 周,分别从每个实验组随机抽取 20 尾鱼,作好标记后一起放入 500 L 塑料缸中,同时用致死剂量的幼虫(2.0 × 10⁴ 幼虫/鱼)感染,海水用量为 5 L/鱼,感染 3h 后开启循环水,不再按标记把鱼分开,停止投喂。每天记录各实验组鱼的死亡数,最后统计各实验组实验鱼的死亡率。

1.7.2 用亚致死剂量幼虫攻毒 实验第 14 周,分别从每个实验组随机抽取 20 尾鱼,按上述方法用低剂量的幼虫(6 × 10³ 幼虫/鱼)感染。60h 后,体鱼表和鳃上出现明显的白色滋养体,此时用 100 μL/L 的丁香酚溶液把实验鱼麻醉后称重,然后剪破心脏放血,等血流尽后再把右侧第二鳃片完整地剪下,在体视镜(Olympus BX40)下数出鳃片两侧的滋养体总数。

用相对感染强度(Relative infestation intensity, RII)来表示寄生虫的感染程度,用相对感染强度下降率(Reduction rate of RII)来表示鱼的抗感染能力:

相对感染强度(Relative infestation intensity, RII)

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{第二鳃片上滋养体数量}}{\text{鱼体重(g)}} \\ &\text{相对感染强度下降率 (Reduction rate of RII)} \\ &= \frac{\text{对照组相对感染强度} - \text{实验组相对感染强度}}{\text{对照组相对感染强度}} \times 100\% \end{aligned}$$

1.8 数据统计方法 实验中的数据用 SPSS11.0 (SPSS Inc.)和 Microsoft Excel (Microsoft Corp.)软件分析处理。

2 结 果

2.1 特异性抗体对幼虫的阻动

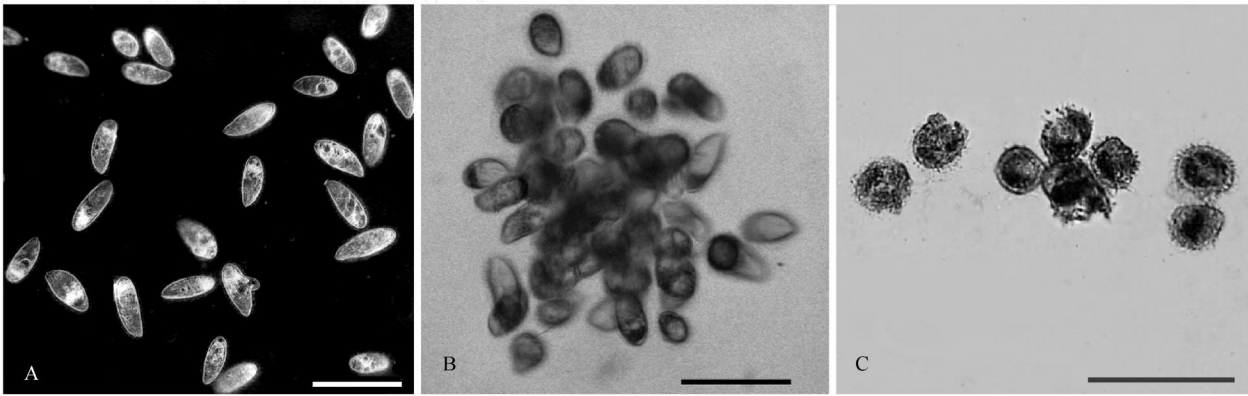


图1 幼虫被特异性抗体阻动的过程

Fig. 1 The immobilization of immunized fish antiserum to theronts of *C. irritans*

A. 正常运动的幼虫;B. 被特异性抗体凝聚的幼虫;C. 破裂的幼虫;标尺 = 100μm

A. The fresh theronts;B. Clumping of the theronts caused by the specific antibody in fish antiserum;C. The ruptured theronts;Scale bar = 100μm

2.2 各实验组血清阻动效价的变化规律

图2的结果显示,在整个实验中对照组鱼血清的阻动效价都为0,证明该组实验鱼在实验中没有被刺激隐核虫感染过。体表感染免疫组的实验鱼在接受初次免疫2周后血清阻动效价就上升,再次免疫2周后,血清阻动效价急速上升,在第6周达到峰值,然后略微下降,第8—12周保持在一个较稳定的水平。但是在第12周经过第三次加强免疫2周后,血清阻动效价又显著升高,出现了第二个峰值。腹腔注射免疫组血清阻动效价的变化规律类似于体表感染免疫组,但是增长比较缓慢,在第8周才出现第一个峰值,并且在整个实验过程中,该组的血清阻动效价均明显低于体表感染免疫组。

2.3 各实验组皮肤培养液阻动效价的变化规律

图3的结果显示,在整个实验中对照组鱼皮肤培养液的阻动效价都为0。体表感染免疫组的实验鱼在接受初次免疫2周后皮肤培养液阻动效价就略有上升,再次免疫2周后,阻动效价显著上升,在第8周达到峰值,然后就一直维持在一个比较稳定的

在阻动试验中,幼虫遇到抗血清和皮肤培养液中的特异性抗体时,幼虫纤毛上的抗原与抗体结合,使得幼虫纤毛相互交联,游动速度逐渐变缓,当它们游动过程中碰在一起时,彼此的纤毛就粘在一起,造成虫体凝集,失去自由运动能力,即阻动 (Immobilization)。当抗体浓度足够高时,会使虫体形态由梭形变为圆形,最后细胞膜破裂,原生质溢出(图1)。实验前的抽样检测结果显示所有被检鱼的血清和皮肤培养液的阻动效价均为0,说明该批试验鱼没有被刺激隐核虫感染过。

水平。经过第三次加强免疫2周后,皮肤培养液阻动效价又一次显著升高,由18.0升高到25.6。腹腔注射免疫组皮肤培养液的阻动效价在接受初次免疫2周后没有明显地变化,但是再次免疫2周后就显著上升,然后就一直维持在一个比较稳定的水平,即

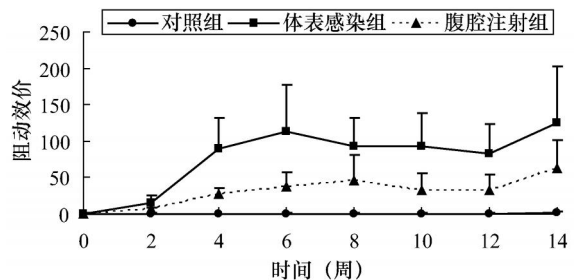


图2 各实验组血清阻动效价的变化规律

Fig. 2 Immobilization titers of serum antibody in different tested groups 腹腔注射免疫组和体表感染免疫组的鱼分别在第0周、第2周和第12周免疫三次;图中每个数据为10个样本的平均值 The fish in the intraperitoneal (i. p.) injection group and the fish in the immersion group were immunized three times respectively in week 0, 2 and 12. Each value is the mean of 10 samples

使在第 12 周经过第三次加强免疫后,阻动效价也没有显著升高。在实验过程中,腹腔注射免疫组皮肤培养液的阻动效价一直明显低于体表感染免疫组。

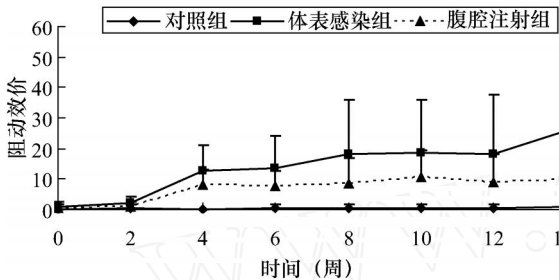


图 3 各实验组鱼皮肤培养液阻动效价的变化规律

Fig. 3 Immobilization titer of skin culture supernatants antibody in different test groups

腹腔注射免疫组和体表感染免疫组的鱼分别在第 0 周、第 2 周和第 12 周免疫三次;图中每个数据为 10 个样本的平均值
The fish in the intraperitoneal (i. p.) injection group and the fish in the immersion group were immunized three times separately in week 0, 2 and 12. Each value is the mean of 10 samples

2.4 低剂量幼虫攻毒后各实验组鱼的感染情况

表 1 结果显示,使用低剂量幼虫 (6×10^3 个幼虫/鱼) 感染后,与对照组相比较,腹腔注射免疫组和体表感染免疫组的幼虫相对感染强度显著下降。经 LSD 检验,对照组、腹腔注射免疫组和体表感染免疫组的幼虫相对感染强度之间都存在显著差异。

表 1 各实验组鱼经低剂量幼虫 (6×10^3 个幼虫/鱼) 攻毒后的感染情况

Tab. 1 The infection level of fish in different groups after a exposure of low dose of theronts (i. e. 6×10^3 theronts per fish)

实验组 Groups	相对感染强度 (平均值 $\pm$ 标准偏差) RII (Mean $\pm$ SD)	相对感染强度下 速率 (%) Reduction rate of RII (%)
对照组 Control	1.39 $\pm$ 0.25 ^a	
体表感染免疫组 Immersion injection group	0.71 $\pm$ 0.17 ^b	50.6
腹腔注射免疫组 Intraper- itoneal (i. p.) injection group	0.89 $\pm$ 0.31 ^c	37.2

注:在同一列中,如果数据后面标有不相同的小写字母,则表示这些数据之间有显著差异 ($p < 0.05$, LSD 多重比较)

Note: Within a column of infection rate, mean values followed by the different lower case letter are significantly different ($p < 0.05$) with LSD multiple comparisons

2.5 致死剂量幼虫攻毒后各实验组鱼的死亡情况

在确定幼虫对卵形鲳鲹的致死剂量时,我们发现幼虫感染剂量达到 2.0×10^4 个幼虫/鱼时就可以致全部鱼死亡,因此把致死剂量定为 2.0×10^4 个幼虫/鱼。结果显示(图 4),对照组的实验鱼在攻毒 2

天后开始出现死亡,3 天内死亡率达到了 100%,而腹腔注射免疫组和体表感染免疫组的累计死亡率分别只有 60%和 40%。

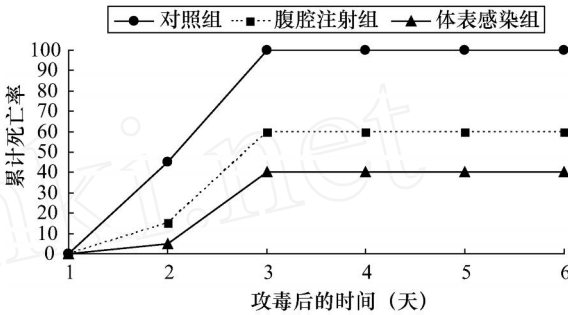


图 4 各实验组鱼经致死剂量幼虫 (20×10^3 个幼虫/鱼) 攻毒后的死亡情况

Fig. 4 The mortality of fish in different groups after an exposure of lethal dose of theronts (i. e. 20×10^3 theronts per fish)

3 讨论

本研究通过阻动试验揭示了由刺激隐核虫幼虫引发的卵形鲳鲹体液免疫应答规律:初次免疫 2 周后,就会引起宿主的系统免疫应答,经再次免疫 4—6 周后,系统免疫应答达到高峰;而皮肤的黏膜免疫应答在初次免疫 4 周后才能较明显的显示出来。每一次加强免疫都会导致宿主体液免疫应答增强。无论是腹腔注射死幼虫还是体表感染活幼虫,卵形鲳鲹的血清和皮肤培养液中都能生成阻动幼虫的特异性抗体,并都能获得有效的免疫保护,这意味着免疫预防可能成为防治海水鱼类“白点病”的一个有效途径。有效的免疫预防明显比其他的防治措施更具有优势,因为它对鱼和环境几乎没有危害。

关于鱼类纤毛类寄生虫的活幼虫感染宿主后能引发宿主的免疫应答已经得到了一致的认识^[13—15, 23],但是死幼虫是否也能引发宿主的免疫应答还存在有争议。Goven 等和 Wang 等分别用多子小瓜虫死幼虫的体表纤毛和纤毛膜蛋白中的纯化阻动抗原免疫斑点叉尾鲴,都能使免疫鱼获得很好的免疫保护^[13, 24]。Burkart 等却发现腹腔注射多子小瓜虫死幼虫不能让宿主产生任何免疫保护,他们认为可能是因为有效的免疫原只存在于活虫上,或是因为杀死幼虫的方法(如冰冻,脱纤毛或福尔马林固定)使相关的抗原失活^[23]。在本实验中,用刺激隐核虫的死幼虫腹腔注射鱼体后能在宿主血清和皮肤中生成特异性抗体,并能获得较好的免疫保护,这说明刺激隐

核虫的死幼虫的确能引发宿主的免疫应答。但是,在整个实验中,腹腔注射死幼虫所引发宿主的系统免疫应答强度(即抗血清的阻动效价)和皮肤黏膜免疫应答强度(即皮肤培养液的阻动效价)都一直低于体表感染所引发的免疫应答强度。

Lobb 发现用多子小瓜虫活幼虫经体表感染斑点叉尾鲴后,大多数鱼在皮肤黏液中可检测到特异性抗体,而血清中则未检测到,据此,他认为斑点叉尾鲴的黏膜免疫应答与系统免疫应答无关^[25]。在研究斑点叉尾鲴对多子小瓜虫的免疫应答时,Maki 等也发现斑点叉尾鲴血清和黏液分泌物中阻动抗体的产生是不同步的^[21]。在本实验中,我们采用 Xu 等的方法离体培养免疫鱼的皮肤^[22],在采样时,已经将皮下组织和体表黏液洗脱,培养液中的抗体只能由皮肤的淋巴细胞产生,排除了从血清中渗透到皮肤黏液中的可能性。实验结果显示,同一免疫鱼的血清抗体和皮肤抗体存在很大的差异:两类抗体的最初生成时间、达到峰值的时间、变化规律以及阻动效价都不一致,这也说明鱼类的系统免疫应答和皮肤黏膜免疫应答可能是相互独立的,或者是不同步的。但是皮肤抗体的诱导机制、分泌位置、产生过程以及怎样到达肠、鳃和皮肤表皮的,还有待进一步的研究。

致谢:

Intervet 新加坡有限公司的谭子龙博士对本文的英文摘要和图表的英文说明做了修改,在此表示诚挚的感谢。

参考文献:

- [1] Colomi A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of white spot disease in marine fish: an update [J]. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1997, **1**: 217—238
- [2] Lom J. Diseases caused by protists [A]. In Kinne O (Eds.), *Diseases of Marine Animals* [C]. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, 1984, 114—168
- [3] Sikama Y. Preliminary report on the white-spot disease in marine fishes [J]. *Suisan Gakkaishi*, 1937, **7**: 149—160
- [4] Sikama Y. Ueber die Weisspükchenkrankheit bei Seefischen [J]. *Journal of the Shanghai Science Institute*, 1938, **4**: 113—128
- [5] Nigrelli R, Ruggieri G. Enzootics in the New York aquarium caused by *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (= *Ichthyophthirius marinus* Sikama, 1961), a histophagus ciliate in the skin, eyes and gills of marine fishes [J]. *Zoologica*, 1966, **51**: 97—102
- [6] Wilkie D, Gordin H. Outbreak of *Cryptocaryonosis* in marine aquaria at scripps institution of oceanography [J]. *California Fish and Game*, 1969, **55**: 227—236
- [7] Burgess P J, Matthews R A. Fish host range of seven isolates of *Cryptocaryon irritans* [J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, **46**: 727—729
- [8] Huff J, Burns C. Hypersaline and chemical control of *Cryptocaryon irritans* in red snapper, *Lutjanus campechanus*, monoculture [J]. *Aquaculture*, 1981, **22**: 181—184
- [9] Colomi A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1985, **1**: 19—22
- [10] Rasheed V. Diseases of cultured brown-spotted grouper *Epinephelus tauvina* and silvery black porgy *Acanthopagrus cuvieri* in Kuwait [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1989, **1**: 102—107
- [11] Matthews R, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora): primary infection in thick-lipped mullet *Chelon labrosus* (Risso) [J]. *Journal of Fish Diseases*, **18**: 329—335
- [12] Hines R, Spira D. *Ichthyophthiriasis* in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.) V. acquired immunity [J]. *Journal of Fish Biology*, 1974, **6**: 373—378
- [13] Wang X T, Dickerson H W. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory*, 2002, **9**: 176—181
- [14] Burgess P, Matthews R. *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora): acquired protective immunity in the thick-lipped mullet, *Chelon labrosus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1995, **5**: 459—468
- [15] Yoshinaga T, Nakazoe J. Acquired protection and production of immobilization antibody against *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora, Hymenostomatida) in Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) [J]. *Fish Pathology*, 1997, **32**: 229—230
- [16] Dan X M, Li A X, Lin X T, et al. A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Aquaculture*, 2006, **258**: 127—133
- [17] Buchmann K, Singh J, Nielsen C V, et al. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2001, **100**: 105—116
- [18] Dickerson H, Clark T. *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes [J]. *Immunological Reviews*, 1998, **166**: 377—384
- [19] Dickerson H W, Clark T G, Leff A A. Serotypic variation among isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* based on immobilization [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1993, **40**: 816—820
- [20] Lin T L, Dickerson H W. Purification and partial characterization of immobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *The Journal of Protozoology*, 1992, **39**: 457—463
- [21] Maki J L, Dickerson H W. Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* Clin [J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003, **10**: 876—881
- [22] Xu D H, Klesius P H. Antibody mediated immune response against *Ichthyophthirius multifiliis* using excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, **25**: 299—306
- [23] Burkart M, Clark T, Dickerson H. Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Four

- quet) :killed versus live vaccines [J]. *Journal of Fish Biology* ,1990 ,
13:401—410
- [24] Coven D A ,Dawe D L , Gratzek J B. Protection of channel catfish
against *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet by immunization [J].
Journal of Fish Biology ,1980 ,17:311—316
- [25] Lobb C J. Secretory immunity induced in catfish , *Ictalurus punctatus* ,
following bath immunization [J]. *Developmental and Comparative Im-*
munology ,1987 ,11:727—738

IMMUNE RESPONSE AND IMMUNOPROTECTION OF POMPANOS (TRACHINOTUS OVATUS) AGAINST CRYPTOCARYON IRRITANS

DAN Xue-Ming^{1,2} ,LI An-Xing¹ ,LIN Xiao-Tao³ ,BAI Jian-Shan¹ and ZHANG Hai-Fa⁴

(1. School of Life Sciences , Sun Yat-sen University , Guangzhou 510275; 2. College of Animal Science , South China Agricultural University , Guangzhou 510642;
3. Institute of Hydrobiology , Jinan University , Guangzhou 510632; 4. Daya Bay Aquatic Experiment center of Guangdong Province , Huizhou 516081)

Abstract : The humoral immune responses and host protection of pompanos (*Trachinotus ovatus*) ,against *Cryptocaryon irritans* were determined after immunization with live theronts and killed theronts of *C. irritans*. Two groups of pompanos (150 animals per group) were immunized three times with live theronts of *C. irritans* by immersion at a dose of 8×10^3 theronts per fish or with killed theronts of *C. irritans* by intraperitoneal (i.p.) injection at a dose of 1.5×10^5 theronts per fish. The immobilization titers of antiserum and skin culture supernatant of the immunized fish were determined with an immobilization assay every two weeks. Also the immunized fish were challenged with a sublethal dose of theronts (6×10^3 theronts per fish) or lethal dose of theronts (2×10^4 theronts per fish) in Week 14. The level of *C. irritans* infection (indicated by relative infection level ,RII) and survival of pompanos were determined after *C. irritans* challenge. The results showed that the specific immobilizing antibodies could be detected in both antiserum and skin culture supernatant in the immunized fish. Both immunization methods (immersion with live theronts or i.p. injection with killed theronts) could confer protection to fish because when all fish were challenged with a lethal dose of theronts of *C. irritans* ,some of the immunised fish survived ,but all control fish died. There was a positive correlation between higher levels of the specific immobilizing antibodies and host survival rate in the immunized fish. However ,compared with i.p. injection with killed theronts ,immersion with live theronts was more effective in stimulating immune responses ,which indicated by the higher immobilization titers in both antiserum and skin culture supernatant and the higher survival rate of the immunised fish. When fish immunised with live theronts and killed theronts were challenged with a sublethal dose of theronts of *C. irritans* , the reduction rate of RII of *C. irritans* were 50.6 % and 37.2 % respectively. When fish were challenged with a lethal dose of theronts of *C. irritans* ,the survival rate of fish immunised with live theronts and killed theronts were 60 % and 40 % respectively. In both groups of fish ,antibody levels in skin culture supernatant were much lower than those in serum. The immobilizing antibodies in serum and the immobilizing antibodies in skin culture supernatant of the immunized fish were different in terms of onset of immunity ,timing ,pattern of the peaks ,and immobilization titers. Therefore ,it is speculated that pathway of the systemic immune responses and mucosal immune responses were different. The present study indicates that humoral immune response ,especially mucosal immune response ,plays an important role in protection against *C. irritans* infection. Vaccination may be an effective way to prevent white spot disease of marine fish.

Key words : Immune response ; Immunoprotection ; Active immunity ; *Cryptocaryon irritans* ; *Trachinotus ovatus*