

文章编号:1000-0615(2007)02-0250-07

人工感染溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响

鄢庆枇^{1,2}, 张俊杰¹, 邹文政¹, 陈强¹, 庄峙厦², 王小如²

(1. 集美大学水产学院,福建 厦门 361021;

2. 厦门大学化学化工学院,福建 厦门 361005)

摘要:为了解大黄鱼在抗溶藻弧菌感染时免疫功能的变化规律,将160尾健康大黄鱼分为感染组和对照组,通过腹腔分别注射0.2 mL浓度为 2×10^7 CFU · mL⁻¹的溶藻弧菌和灭菌生理盐水,在注射0,1,3,7,11,15,19 d后从两组各取6尾大黄鱼,尾静脉取血,进行外周血的血相、NBT阳性细胞数、血清抗菌活力、抗体效价等免疫学指标的测定。结果显示:在人工感染的初期,感染组大黄鱼外周血的红细胞、白细胞、淋巴细胞和NBT阳性细胞的数量及血清抗菌活力等指标均较对照组有显著提高;在注射后1 d外周血粒细胞的数量显著低于对照组;抗体效价在7 d开始增加,15 d达到峰值,且用间接ELISA和试管凝集两种方法所得结果具有非常高的同步性。结果表明:在感染溶藻弧菌后,大黄鱼能通过红细胞和白细胞增殖、释放抗菌物质、产生特异性抗体等方式提高其对溶藻弧菌的免疫力;在感染的早期阶段非特异性免疫因子起主要作用,在感染后期阶段特异性免疫因子起重要作用;NBT阳性细胞数可以作为细菌感染的指标。

关键词:大黄鱼;溶藻弧菌;血细胞计数;NBT阳性细胞;抗菌活力;抗体效价

中图分类号:S 942.3

文献标识码:A

Effect of experimental infection with *Vibrio alginolyticus* on immune parameters of *Pseudosciaena crocea*

YAN Qing-pi^{1,2}, ZHANG Jun-jie¹, ZOU Wen-zheng¹,

CHEN Qiang¹, ZHUANG Zhi-xia², WANG Xiao-ru²

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Chemistry and Chemical Engineering College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: To investigate the effect of experimental infection with *Vibrio alginolyticus* on immune parameters of *Pseudosciaena crocea*, one hundred and sixty healthy fish were categorized into infected and control groups. Each fish in infected group was injected intraperitoneally with 0.2 mL of bacteria suspension with a concentration of 2×10^7 CFU · mL⁻¹, while each fish in control group was injected i. p. with 0.2 mL of sterile saline solution. *P. crocea* in both groups were sacrificed at 0, 1, 3, 7, 11, 15 and 19 d post-injection to evaluate immune parameters such as haematocyte counting, NBT-positive cells, serum antibacterial activity, and serum antibody titer. The results showed that: experimental infection with *V. alginolyticus*

收稿日期:2006-05-08

资助项目:国家“八六三”高新技术发展计划(2002AA639600);福建省自然科学基金项目(B0410022);福建省青年创新基金项目(2002J037)

作者简介:鄢庆枇(1971-),男,福建永泰人,副教授,博士,主要从事水产病害防治研究。Tel: 0592-6180204, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

would increase the numbers of erythrocytes, leucocytes, lymphocytes in peripheral blood as well as peripheral serum antibacterial activity and antibody titer of *P. crocea*, and reduce peripheral blood granulocytes number significantly, in comparison with those in control group. These results suggested that after infected by *V. alginolyticus*, *P. crocea* would enhance its resistance to the invaded bacteria by means such as erythrocyte and leucocyte proliferating, antibacterial substance excreting, antibodies synthesizing; non-specific immune factors including antibacterial substance in peripheral blood played an important role at the initial stages of infection, and then specific immune factors such as antibody played an important role at the later stages; the number of NBT positive cell was a good indicator of bacterial infection.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; *Vibrio alginolyticus*; haematocyte counting; NBT-positive cells; antibacterial activity; antibody titer

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea* Richardson) 是中国特有的海洋鱼类, 分布于黄海南部至南海北部海域。现在大黄鱼已成为我国养殖量最大的海水鱼类, 并被农业部确定为我国 6 种最具优势的出口水产品之一。但是, 随着大黄鱼养殖规模的扩大, 各种传染性疾病发生也日益频繁, 严重制约着大黄鱼养殖业的健康发展, 其中由溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 引起的弧菌病是养殖大黄鱼最常见的传染性疾病之一, 其发病率和死亡率高, 给大黄鱼养殖业带来严重的经济损失^[1-2]。目前养殖业者主要靠抗生素来防治这种弧菌病, 但抗生素的不合理使用会导致耐药性细菌增加和破坏生态平衡等严重的负面影响^[3]。在水产品的安全问题日益引起社会关注的今天, 如何进行养殖疾病的无公害防治是摆在养殖业者和相关科研人员面前一个急需解决的问题。在药物防治的替代措施中, 使用免疫增强剂和疫苗是很有潜力的无公害疾病防治方法, 已有一些学者在这方面进行了一些研究, 并取得了一定的成果^[4-5]。但是关于大黄鱼免疫功能的基础研究却很薄弱, 也未见有关细菌感染对大黄鱼免疫功能影响的研究报道。鱼类作为低等脊椎动物, 已经具有比较完善的免疫系统, 能够对侵入体内的病原菌产生免疫应答, 包括非特异的先天性免疫和特异性的免疫应答, 以清除病原菌, 维持机体生理功能稳定^[6]。因此, 鱼类的许多免疫指标可作为它们健康状况和抗感染免疫能力强弱的标志。本文通过测定人工感染溶藻弧菌后大黄鱼多项免疫指标的变化, 以期了解病原弧菌感染对大黄鱼免疫功能的影响, 为大黄鱼弧菌病的免疫防治提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼

体重 350 ~ 500 g 左右的健康大黄鱼 160 尾, 购自厦门刘五店大黄鱼养殖渔排, 分两组暂养于集美大学海水养殖场, 每池 80 尾。每天换水、投饵 1 次, 暂养 1 周后开始实验, 实验期间水温 22 ~ 24 °C。

1.2 溶藻弧菌

分离自患病大黄鱼, 并经回归感染证明具有较强毒力^[2], 保存于本实验室 -80 °C 超低温冰箱。感染前 1 天接种于含 2% NaCl 的营养琼脂斜面, 30 °C 过夜培养, 用灭菌生理盐水洗脱菌苔, 稀释至 2×10^7 CFU · mL⁻¹ 备用。

1.3 注射和采样

大黄鱼经过丁香酚麻醉后, 感染组每尾通过腹腔注射 0.2 mL 上述菌悬液, 对照组每尾注射 0.2 mL 灭菌生理盐水。

在感染后 0, 1, 3, 7, 11, 15, 19 d 分别从感染组与对照组随机各取 6 尾大黄鱼, 从尾静脉取血, 每尾鱼先取 0.4 mL 血液与 0.1 mL 肝素混合, 其余血液在室温下放置 1 h 使其凝固, 然后于 4 °C 冰箱中过夜, 析出血清。为使有足够样品用于多个免疫指标检测, 将同组两尾大黄鱼的抗凝血与血清分别混合后进行检测。

1.4 血细胞计数

参考赵维信^[7]的方法进行红细胞和白细胞计数: 20 μL 抗凝血经 3.98 mL 血液稀释液稀释和染色后, 在光学显微镜下分别计数血球计数板 5 个中方格中的红细胞和白细胞数量, 每个样品

计数 3 次。

参考王军等^[8]的方法进行白细胞分类计数: 将每个抗凝血样品推出 3 个血涂片, 晾干后用甲醇固定 2~3 min, 用蒸馏水冲洗并晾干, 用瑞氏染液染色 15 min 并冲洗干净, 在油镜下随机计数 200 个白细胞中粒细胞与淋巴细胞的数量。

1.5 NBT 阳性细胞计数

参考 Anderson 等^[9]的方法: 将 0.2 g NBT 溶于 100 mL 的无菌生理盐水中制得 NBT 贮藏液, 与含 1 mg · mL⁻¹ 葡萄糖的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.15 mol · L⁻¹, pH 7.2) 等量混合得到 NBT 应用液。将 50 μL 的抗凝血滴在 1 个干净的盖玻片上, 在 30 °C 湿盒中温育 30 min, 用 PBS (0.067 mol · L⁻¹, pH 6.4) 轻轻洗去大部分红细胞。将 1 滴 NBT 应用液滴于载玻片上, 并将上述盖玻片反扣在 NBT 应用液上, 再于 30 °C 湿盒中温育 30 min, 然后在光学显微镜下随机选择 10 个视野, 计数其中所有呈现深蓝色的阳性细胞, 每个血样计数 3 个盖玻片, 取平均数作为该血样的 NBT 阳性细胞数。

1.6 血清抗菌活力 (Ua) 测定

参考 Mackintosh 等^[10]的方法进行血清抗菌活力 (Ua) 的测定。将过夜培养的溶藻弧菌用无菌 PBS (0.1 mol · L⁻¹, pH 6.4) 洗脱, 并调整菌浓度至 10⁶ CFU · mL⁻¹。0.3 mL 菌悬液与等量大黄鱼血清或者无菌蛋白胨水 (10 g 蛋白胨, 5 g NaCl 溶于 1 000 mL 蒸馏水中, pH 7.2, 作为空白对照) 混合, 30 °C 水浴振荡 30 min 后用平板菌落计数法测定菌浓度。血清抗菌活力 (Ua) 依照下面的公式进行计算:

$$Ua = (\text{空白组菌落数} - \text{血清组菌落数}) / \text{空白组菌落数}$$

1.7 血清抗体效价检测

参考鄢庆彬等^[11-12]的方法进行间接酶联免疫吸附 (ELISA) 检测血清抗体效价。在酶标板各孔中加入 0.1 mL 溶藻弧菌悬液 (10⁷ CFU · mL⁻¹) 或者生理盐水 (作为阴性对照), 60 °C 烘干包被, 用含有 0.5% Tween-20 的磷酸盐缓冲液 (PBS-T, pH 7.4) 洗涤 3 次后, 各孔加满含 5% 牛血清白蛋白的 PBS, 37 °C 封闭 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 各孔加入系列稀释的大黄鱼血清 0.1 mL, 37 °C 温育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 再加入本实验室制备的兔抗大黄鱼 IgM 血清^[12] (0.05 mol ·

L⁻¹ 的 PBS 稀释 10 000 倍) 0.1 mL, 37 °C 温育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 然后加入羊抗兔 IgG-HRP (稀释 1 000 倍) 0.1 mL, 37 °C 温育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 各孔加入 0.1 mL 新鲜配制的邻苯二胺 (OPD) 底物溶液, 37 °C 避光温育 30 min, 加入 2 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 50 μL 终止反应, 于 492 nm 处测定各孔 OD 值。按常规试管凝集法检测血清抗体的凝集效价。

2 结果

2.1 人工感染溶藻弧菌对大黄鱼各种血细胞数量的影响

腹腔注射溶藻弧菌后大黄鱼外周血中血细胞计数的结果如图 1 所示。从图 1-a 可以看出, 在注射后 19 d 内, 虽然两组大黄鱼外周血中红细胞数量都在 (8.2 × 10⁵) ~ (10.4 × 10⁵) mL⁻¹ 之间波动, 但感染组的红细胞数量在注射后 1, 3, 7 d 高于对照组, 其中在 1 d 存在显著性差异 ($P < 0.05$), 说明在溶藻弧菌感染初期, 大黄鱼外周血红细胞数量会有一定程度的增加。从图 1-b 可以看出在注射后 1 d, 感染组大黄鱼外周血中白细胞数量略低于对照组, 而在 3 d 和 7 d 感染组大黄鱼的白细胞数量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 然后在 15 d 和 19 d 两组又趋于一致, 这说明溶藻弧菌感染初期能引起大黄鱼白细胞的增殖。大黄鱼外周血中淋巴细胞在人工注射后的数量变化规律如图 1-c 所示, 在 3 d 感染组大黄鱼外周血中淋巴细胞的数量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在注射后 15 d, 感染组大黄鱼外周血中淋巴细胞的数量略低于对照组, 在其余时间都是感染组大黄鱼外周血中淋巴细胞的数量略高于对照组, 说明溶藻弧菌感染初期能引起大黄鱼淋巴细胞增殖。如图 1-d 所示, 在注射溶藻弧菌和生理盐水后, 大黄鱼外周血中粒细胞的数量波动很大, 在 1 d 感染组大黄鱼的粒细胞显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其余各时间两组数据都没有显著差异。溶藻弧菌注射初期能引起大黄鱼红细胞与白细胞的增殖, 其中白细胞主要包括淋巴细胞和粒细胞。虽然 1 d 时感染组的淋巴细胞数量略高于对照组, 但是此时感染组的粒细胞显著低于对照组, 导致感染组白细胞数量略低于对照组。3, 7 d 感染组的淋巴细胞和粒细胞数量都高于对照组, 因此此时感染组白细胞数量显著高于对照组。

2.2 注射溶藻弧菌对大黄鱼血液 NBT 阳性细胞数量的影响

人工注射后大黄鱼血液 NBT 阳性细胞计数的结果如图 2-a 所示。在人工注射后的 1,3,7,11 和 15 d,感染组大黄鱼外周血液 NBT 阳性细胞数量都高于对照组,其中在注射后 3 d 和 7 d 感染组的 NBT 阳性细胞数量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。这说明注射溶藻弧菌能显著增加大黄鱼外周血中的 NBT 阳性细胞。

2.3 注射溶藻弧菌对大黄鱼血清抗菌活力的影响

人工注射后大黄鱼血清抗菌活力的检测结果如图 2-b 所示,在感染后的 1,3,7 d 感染组血清

抗菌活力高于对照组,其中在 1,7 d 两组存在显著性差异 ($P < 0.05$),而在注射后 11,15,19 d 两组数据相当接近。这说明注射溶藻弧菌在初期能显著增加大黄鱼血清的抗菌活力。

2.4 注射溶藻弧菌对大黄鱼血清抗体效价的影响

注射后大黄鱼血清抗体效价的检测结果如表 1 所示,间接 ELISA 测得感染组的抗体效价在 7 d 开始增高,在 15 d 达到峰值(1: 5120);而对照组的效价在 1: 160 ~ 1: 320 之间波动。在通过试管凝集法检测得到的结果中,感染组的血清抗体效价也在 7 d 开始增高,15 d 达到峰值(1: 40),而对照组血清没有出现凝集现象。

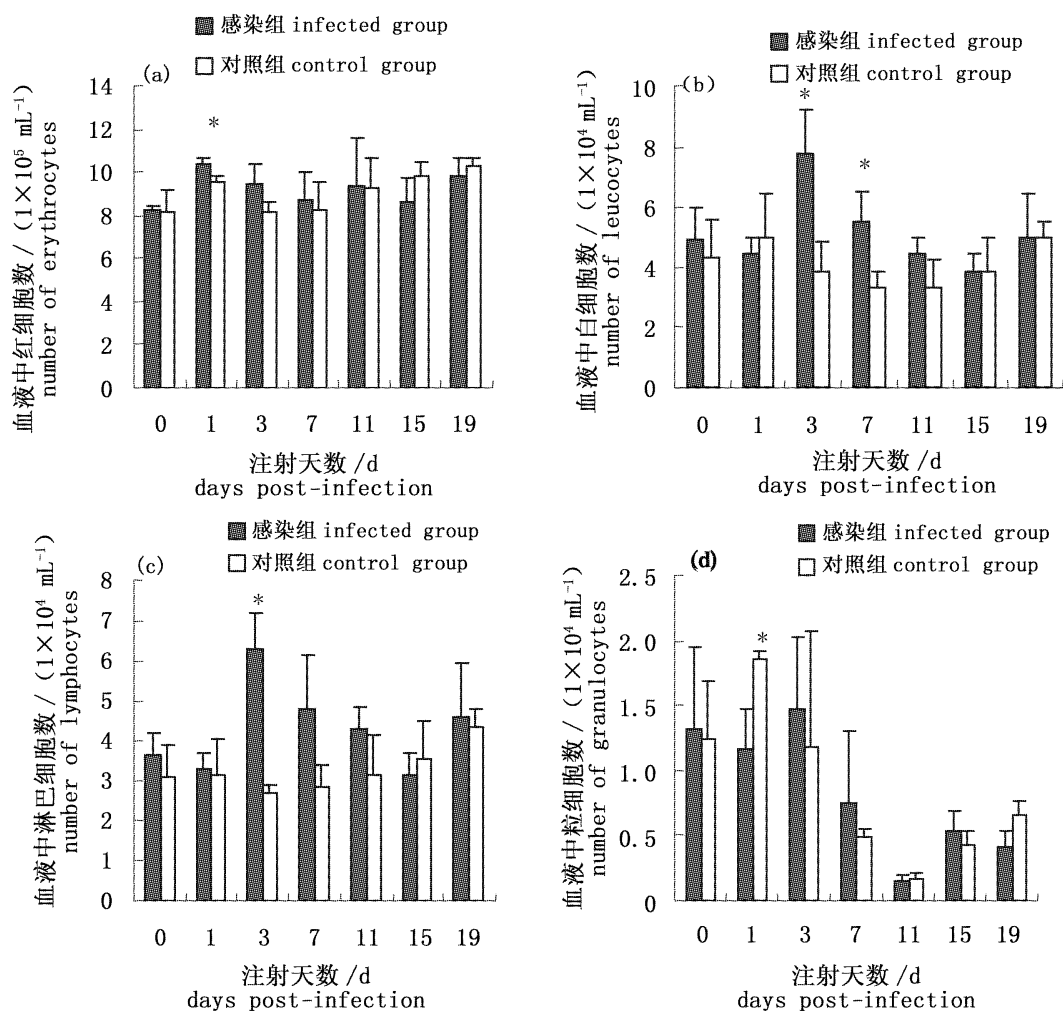


图 1 注射溶藻弧菌或生理盐水后大黄鱼外周血细胞数量变化

Fig. 1 The variation of hematocyte numbers in peripheral blood of *P. crocea* after injected by *V. alginolyticus* or saline solution

* 表示感染组和对照组之间存在显著性差异

* significantly different between two groups ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 注射溶藻弧菌对大黄鱼外周血细胞数量的影响

在脊椎动物防御外来病原体的过程中,常可见到白细胞增殖的现象^[13-14]。研究表明,注射溶藻弧菌能够刺激大黄鱼白细胞的增殖。粒细胞的吞噬作用在鱼类免疫防御中起着重要的作用。Ranzani-Paiva 等^[14]的研究表明尼罗罗非鱼在受分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 感染后的 1 d 白细胞就开始增加,其增加的原因是嗜中性粒细胞增殖和淋巴细胞轻微增殖所引起。本文中

感染组大黄鱼外周血的粒细胞数量并没有随着白细胞数量的增加而同步增加,反而出现一定程度的下降。这可能是由于粒细胞具有趋化和吞噬作用,本文所采用的腹腔注射导致大量的粒细胞因趋化作用而聚集到病原菌聚集的腹腔,从而引起外周血中粒细胞数量下降,同时吞噬作用也会引起部分粒细胞死亡,进一步导致外周血中粒细胞数量的下降。在感染的中后期,感染组和对照组大黄鱼外周血中粒细胞的数目都出现同步大幅下降,这可能是由于试验过程的采样经常惊扰大黄鱼所致,而养殖过程中大黄鱼受到惊扰容易死亡可能也与其粒细胞的数目降低有关。

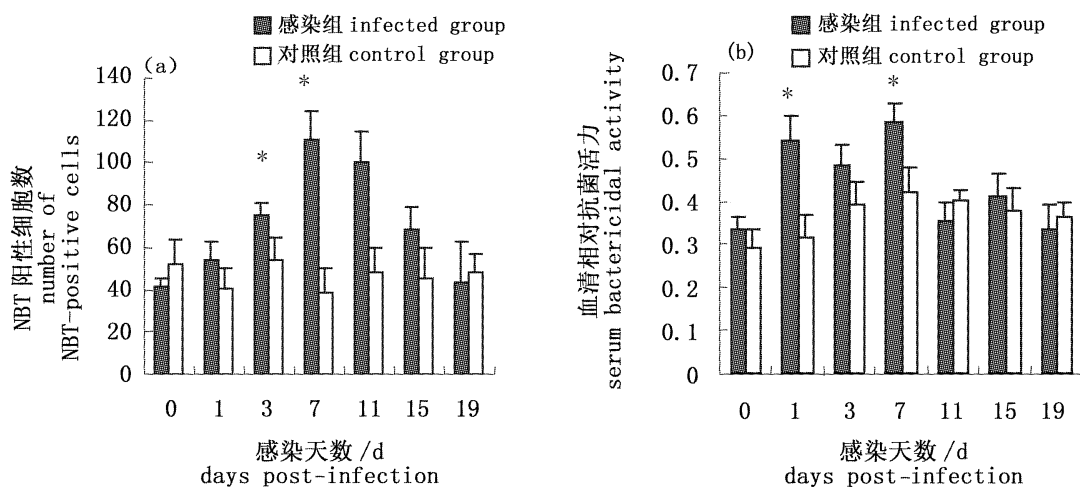


图2 注射溶藻弧菌或生理盐水后大黄鱼外周血中 NBT 阳性细胞数量和血清抗菌活力的变化

Fig. 2 The variation of NBT-positive cells and serum bactericidal activity in peripheral blood of *P. crocea* after injected by *V. alginolyticus* or saline solution.

* 表示两组之间有显著性差异

* significantly different between two groups ($P < 0.05$)

表1 注射溶藻弧菌对大黄鱼血清抗体效价的影响

Tab. 1 The effect of *V. alginolyticus* injection on serum antibody titer of *P. crocea*

注射天数(d) days post-injection	酶联免疫吸附法 ELISA		试管凝集法 tube agglutination	
	感染组 infected group	对照组 control group	感染组 infected group	对照组 control group
0	160	160	<10	<10
1	320	320	<10	<10
3	320	160	<10	<10
7	640	160	10	<10
11	1280	320	20	<10
15	5120	320	40	<10
19	1280	320	10	<10

淋巴细胞在鱼类的体液免疫和细胞免疫中都发挥着重要的作用。本文的研究结果表明注射溶藻弧菌能引起大黄鱼淋巴细胞的增殖,这与 Ranzani-Paiva 等^[14]的研究结果相吻合。作为鱼类免疫细胞的一种,红细胞的表面拥有大量的补体片段(C3b)受体,它们能够介导病原菌与红细胞之间的结合,促进吞噬细胞对病原菌的清除^[15]。尽管天然感染迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)或者注射分枝杆菌的罗非鱼,都观察到红细胞数量的下降^[14,16]。但对于金鱼,嗜水气单胞菌感染能促使血液中有更多的未成熟红细胞出现^[17],说明细菌感染能引起鱼类红细胞增殖。本文的研究结果表明大黄鱼在溶藻弧菌感染初期出现红细胞增殖,以此来提高对病原菌的清除能力,也说明试验所用溶藻弧菌对大黄鱼红细胞的溶血能力不强。

3.2 注射溶藻弧菌对大黄鱼外周血中 NBT 阳性细胞数量影响

鱼体内存在着各种的吞噬细胞,它们在完成对侵入机体的病原菌的吞噬后,其膜内结合的 NAD(P)H 氧化酶可以将分子氧转化为超氧阴离子(O_2^-),这个过程称为呼吸爆发^[18]。这种活性氧对于入侵的病原体有很大的杀伤力,它可以独立地或与其它溶酶体酶类协同地发挥作用^[19]。在这些活性氧的产生过程中,细胞可将渗入的 NBT 由淡黄色还原为深蓝色,这个反应成为鱼体健康状况或者免疫增强剂效果评定的有效参考指标^[9]。Shariff 等^[20]用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染爪哇鲤鱼后提高了吞噬细胞的 NBT 反应活性。在人工感染溶藻弧菌后,大黄鱼外周血的 NBT 阳性细胞数量明显升高,这表明人工感染的溶藻弧菌已经进入血液循环,导致外周血中处于吞噬后杀菌状态的细胞数量有显著的提高,细菌计数结果表明在感染后 11 d 鱼体内的弧菌已被清除,随着外来病原菌的清除,NBT 阳性细胞数量又下降到对照组的水平。这说明 NBT 阳性细胞数可以作为鱼体是否受到细菌感染的一个指标。

3.3 注射溶藻弧菌对大黄鱼血清抗菌活力的影响 包括嗜中性粒细胞和巨噬细胞在内的吞噬细胞在吞噬细菌的同时能够向血液中释放补体、凝集素、溶菌酶、抗菌肽等物质,这些物质能够直

接杀灭或抑制入侵的病原菌^[21]。本实验中感染组大黄鱼血清在 1~7 d 对溶藻弧菌的杀灭作用显著高于对照组,这说明大黄鱼免疫细胞中的抗菌因子能在很短时间内被激活,释放到细胞外环境中。在感染中后期,随着外来病原菌的清除,感染组大黄鱼血清抗菌活力恢复到对照组水平,这说明这些抗菌物质的释放与细菌的存在密切相关,而且这些抗菌物质在鱼体中的存在时间很短。

3.4 注射溶藻弧菌对大黄鱼血清抗体效价的影响 鱼体对入侵的病原菌会产生针对其抗原决定簇的特异性抗体,这是鱼类免疫系统的特征之一^[21]。对鱼体内抗体效价的检测常被用于评估免疫接种的效果和病原微生物对鱼体所产生的影响^[22-23]。本实验中感染组大黄鱼血清抗体效价在 7 d 开始升高,并在 15 d 达到高峰,这与 Chandran 等^[24]的结果相符合。对比血清抗菌活力可知,在感染的 1~7 d 内血清抗菌活力显著增加,血清抗体效价并未同步升高,而在感染的 7~19 d 内血清抗体效价显著增加,血清抗菌活力反而恢复到原来的水平。这些结果显示,在感染的早期阶段非特异性免疫因子在抗感染免疫中起着关键性的作用,在感染的后期阶段特异性的免疫因子起着关键性的作用。在测定抗体效价时,试管凝集法简便,易行,但其灵敏度较低,间接 ELISA 不仅能够避免自身凝集所引起的误差,而且所需要的样品量少,灵敏度高。本文用试管凝集法测得的大黄鱼血清抗体效价最高为 1:40,用间接 ELISA 测得大黄鱼血清抗体效价高达 1:5120,这说明间接 ELISA 的灵敏度高于试管凝集法。由于间接 ELISA 的灵敏度很高,所以测得对照组大黄鱼血清也有 1:160 至 1:320 的效价,这与 Chandran 等^[24]的结果相一致。其原因可能是由于以前曾有少量含有相同抗原的细菌进入鱼体,刺激其产生抗体,也可能是高浓度的大黄鱼血清中有极少量抗体直接结合到酶标板所致。

本文的研究结果表明:在感染溶藻弧菌后,大黄鱼能通过红细胞和白细胞增殖、释放抗菌物质、产生特异性抗体等方式提高其对溶藻弧菌的抗感染能力。在感染的早期阶段非特异性免疫因子起主要作用,在感染后期阶段特异性免疫因子起重要作用。NBT 阳性细胞数可以作为细菌感染的指标。

参考文献:

- [1] 林克冰, 周 宸, 刘家富, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J]. 台湾海峡, 1999, 18: 342 - 346.
- [2] 鄢庆枇, 王 军, 苏永全, 等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(3): 191 - 196.
- [3] Ansary A, Haneef R M, Torres J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish[J]. J Fish Dis, 1992, 15: 191 - 196.
- [4] 鄢庆枇, 苏永全, 王 军, 等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(3): 134 - 137.
- [5] Jian J C, Wu Z H. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Aquaculture, 2003, 218: 1 - 9.
- [6] Corbel M J. The immune response in fish: a review [J]. J Fish Biol, 1975, 7(4): 539 - 563.
- [7] 赵维信. 鱼类生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992: 212 - 215.
- [8] 王 军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 免疫添加剂对大黄鱼血液白细胞数量及其吞噬功能的影响[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 44 - 46.
- [9] Anderson D P, Moritomo T, Grooth R. Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1992, 30: 419 - 429.
- [10] Mackintosh J A, Veal D A, Beattie A J, et al. Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 6139 - 6143.
- [11] 鄢庆枇, 王 军, 苏永全, 等. 大黄鱼病原菌——溶藻弧菌的 ELISA 快速检测研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 47 - 50.
- [12] 鄢庆枇, 韩一凡, 高天翔, 等. 大黄鱼血清 IgM 纯化及其免抗血清的制备[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 475 - 479.
- [13] Yildiz H Y. Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Isr J Aquac-Bamidgeh, 1998, 50: 82 - 85.
- [14] Ranzani-Paiva M J T, Ishikawa C M, Eiras A C, et al. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) [J]. Braz Arch Biol Technol, 2004, 47: 945 - 953.
- [15] Passantino L, Altamura M, Cianciotta A, et al. Fish immunology I. binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) [J]. Immunopharmacol & Immunotoxicol, 2002, 24: 665 - 678.
- [16] Benli A C K, Yavuzcan H Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda* [J]. Aquac Res, 2004, 35: 1388 - 1390.
- [17] Brenden R A, Huizinga H W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* [J]. J Fish Dis, 1986, 9: 163 - 167.
- [18] Babior B M, Kipnes R S, Curnutte J T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent [J]. J Clin Invest, 1973, 52: 741 - 744.
- [19] Grant J J, Loake G J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 21 - 30.
- [20] Shariff M, Jayawardena P A, Yusoff F M, et al. Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11: 281 - 291.
- [21] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1999, 9: 291 - 308.
- [22] Magnadottir B, Gudmundsdottir B K. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1992, 32: 179 - 189.
- [23] Palm R C J, Landolt M L, Busch R A. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Dis Aquat Org, 1998, 33: 157 - 166.
- [24] Chandran M R, Aruna B V, Logambal S M, et al. Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2002, 13: 1 - 9.