

三种鲤对暴发性鱼病抗病力的差异

蔡完其 孙佩芳

(上海水产大学, 200090)

提 要 本文报道三种鲤对嗜水气单胞菌引起暴发性鱼病的抗病力试验结果。当菌液浓度为 6.0×10^8 CFU/ml, 采用 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 四个稀释度、0.3 ml/尾注射剂量时, 建鲤、野鲤和镜鲤的半数致死量(LD₅₀)分别为 $10^{-1.375}$ 、 $10^{-0.976}$ 、 $10^{-0.562}$ 。这三种鲤的半数致死量差异显著($F > F_{0.05}$)。从四个方面研究了抗病机理: 白细胞吞噬功能和补体替代途径(C₃旁路)杀菌能力, 镜鲤强于野鲤和建鲤, 但无显著差异($F < F_{0.05}$); 红细胞C_{3b}受体花环率和补体总量(单位/ml), 是建鲤>野鲤>镜鲤, 差异极显著($F > F_{0.01}$)。本研究结果还表明建鲤的红细胞C_{3b}受体花环率和补体总量稍高, 但对暴发性鱼病病原(嗜水气单胞菌)较易感染。以上结果证明, 不同品系鲤鱼对暴发性鱼病有种内特异性。

关键词 建鲤, 野鲤, 散鳞镜鲤, 暴发性鱼病, 抗病力

八十年代后期以来, 我国主要养殖地区出现暴发性鱼病, 病势凶猛, 传染性强, 死亡率高。发病遍及鲫、团头鲂、鲢、鳙、鲤等绝大部份养殖鱼类, 对养殖生产危害很大。许多学者研究了该病的病原、病理及其与环境的关系, 但针对我国主要淡水养殖鱼类对暴发性鱼病抗病力的研究尚属开始。蔡完其和孙佩芳[1993年]报道了鲫对暴发性鱼病的抗病力存在显著的种内差异, 认为彭泽鲫对暴发性鱼病抗病力较强, 为其推广提供了理论依据。鲤是我国主要养殖鱼类之一, 产量在我国淡水养殖鱼类中占第4位。鲤的地方群体或品系较多, 为查明不同鲤鱼对暴发性鱼病抗病力的差异, 作者选择了商品养殖中较重要的野鲤、人工选育的散鳞镜鲤及建鲤作为研究对象, 通过对暴发性鱼病抗病力的种内差异测定和比较, 探讨其抗病机理, 以期对养鱼业有所裨益。

一、材 料 和 方 法

1. 试验鱼及试验菌种 野鲤由上海市南汇县水产养殖场提供, 建鲤和镜鲤分别来自淡水渔业研究中心和黑龙江水产研究所。三种鱼在上海市南汇县水产养殖场上海水产大学种质资源试验站同塘饲养3个月, 以清除养殖环境因子对试验的影响。试验鱼体长14.5-16.3 cm, 体重82-100 g, 均无暴发性鱼病发病史。试验菌种为鲤鱼暴发性病原菌——嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)

2. 方法 所有器皿均经灭菌处理, 以下操作均为无菌操作。

(1) 半数致死量(LD₅₀)测定 每种试验鱼取40尾。用浓度为 6.0×10^8 CFU/ml 的菌液, 以 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 及 10^{-3} 四种稀释度, 每尾鱼腹腔注射0.3 ml。半数致死量计算方法参考 Reed-

Muench 法[安德森,1984年中译本]。

(2)补体试验 补体试验包括血清制备、血清抗体检查、补体替代途径(C_3 旁路)杀菌试验及补体总量测定。进行补体试验的鱼同时也作白细胞吞噬和红细胞 C_{3b} 受体花环试验,3种鱼各测定10尾。

(3)白细胞吞噬试验 测定三种鲤白细胞吞噬百分率。

上述三项试验方法请参见蔡完其与孙佩芳[1993]。

(4)红细胞 C_{3b} 受体花环试验 参考郭峰[1982]的方法。①红细胞悬液制备。从鱼的尾动脉抽血2滴,分别置于离心管中,用0.85%生理盐水洗涤、离心两次(2000转/分,5分钟),弃上清液,取沉淀物用显微计数法配制成浓度为 1.25×10^7 个/ml的红细胞悬液。②致敏酵母的处理。用少量生理盐水溶解致敏酵母,然后洗涤、离心一次(2000转/分,5分钟),洗涤的同时充分混匀,使其在显微镜下呈单个分离状态,最后配成 1×10^8 个/ml的致敏酵母悬液。③ C_{3b} 受体花环的形成。将 C_{3b} 致敏酵母悬液与红细胞悬液各100 μ L等量混合,20 $^{\circ}$ C水浴孵育30分钟后,再加等量生理盐水稀释,用50 μ L 0.25%戊二醛固定,轻轻摇匀。④玻片制备。每尾鱼制备3片,涂片薄而均匀,高倍镜下每视野7-8个红细胞为宜,涂片后冷风吹干,甲醇固定,瑞氏染色液染色。⑤镜检。高倍镜下计数200个红细胞中的酵母花环数(粘附两个及两个以上酵母细胞为一个花环),并换算成百分率,作为 C_{3b} 受体活性的指标。

二、结 果

(一) 半数致死量(LD₅₀)的测定结果

三种鲤鱼感染后,三天内的死亡情况如表1,半数致死量(LD₅₀)如表2。方差分析[Zar, 1974]表明三种鲤的半数致死量差异显著($F > F_{0.05}$)。

(二) 补体试验

1. 试验鱼血清抗体检查 试验鱼的血清无凝集现象,证实试验鱼均未感染嗜水气单胞菌。

2. 补体替代途径(C_3 旁路)杀菌试验 三种鲤鱼补体替代途径(C_3 旁路)杀菌试验结果如表3。它清楚地表明,随着培养时间的延长,残存菌数量增加。经过12小时的培养,血清中残存菌量在 10^8 - 10^9 数量级。

对残存率的方差分析表明,三种鲤鱼血清的补体替代途径(C_3 旁路)杀菌力无显著者差异($F < F_{0.05}$),但是随着培养时间的延长,镜鲤血清补体替代途径(C_3 旁路)杀菌力逐渐稍强于野鲤和建鲤(表3)。

3. 补体总量测定 三种鲤鱼补体总量测定结果列于表4。建鲤平均为3.9单位/ml[补体总量以1 ml未稀释血清所含的50%溶血剂量(CH₅₀单位)数表示],野鲤平均为3.1单位/ml,镜鲤平均为2.03单位/ml,三者差异极显著($F > F_{0.01}$)。

(三) 白细胞吞噬试验

三种鲤鱼的白细胞吞噬百分率如表5。二次试验结果的方差分析表明差异均不显著(第一次 $F_{0.25} < F < F_{0.10}$,第二次 $F_{0.10} < F < F_{0.05}$),但二次试验值的顺序均为镜鲤>野鲤>建鲤。

表1 三种鲤人工感染嗜水气单胞菌三天内死亡率的比较
Table 1 Comparison of mortality in 3 strains of common carp infected
by *Aeromonas hydrophila* within 3 days

试验组	品系	病菌 稀释度	试验组			累积数			
			存活数	死亡数	死亡比数	总死亡数	总存活数	比数	百分率
第一次 试验	建 鲤	10 ⁰	5	0	5/5	9	0	9/9	100
		10 ⁻¹	4	1	4/5	4	1	4/5	80
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	6	0/6	0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	11	0/11	0
	野 鲤	10 ⁰	5	0	5/5	7	0	7/7	100
		10 ⁻¹	2	3	2/5	2	3	2/5	40
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	8	0/8	0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	13	0/13	0
	镜 鲤	10 ⁰	3	2	3/5	5	2	5/7	71.4
		10 ⁻¹	2	3	2/5	2	5	2/7	28.5
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	10	0/10	0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	15	0/15	0
第二次 试验	建 鲤	10 ⁰	5	0	5/5	9	0	9/9	100
		10 ⁻¹	4	1	4/5	4	1	4/5	80
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	6	0/6	0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	11	0/11	0
	野 鲤	10 ⁰	3	2	3/5	7	2	7/9	78
		10 ⁻¹	4	1	4/5	4	3	4/7	57
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	8	0/8	0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	13	0/13	0
	镜 鲤	10 ⁰	5	0	5/5	6	0	6/6	100
		10 ⁻¹	1	4	1/5	1	4	1/5	20
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	9	0/9	0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	14	0/14	0

表2 三种鲤人工感染嗜水气单胞菌的半数致死量(LD₅₀)测定值
Table 2 Observed values of median lethal dose (LD₅₀) in 3 strains
of common carp infected by *A. hydrophila*

品系	建 鲤	野 鲤	镜 鲤
第一次试验	10 ^{-1.375}	10 ^{-0.83}	10 ^{-0.5}
第二次试验	10 ^{-1.375}	10 ^{-1.123}	10 ^{-0.625}
均 值	10 ^{-1.375}	10 ^{-0.976}	10 ^{-0.562}

表3 三种鲤补体替代途径(C₃旁路)杀菌试验结果Table 3 Study results of bactericidal reaction by the alternative pathway of complement (C₃ shunt) for 3 strains of common carp

		1(h)	3(h)	6(h)	12(h)
		残存菌(CFU/ml) 残存率	残存菌(CFU/ml) 残存率	残存菌(CFU/ml) 残存率	残存菌(CFU/ml) 残存率
不加 热 不加 EGTA	建鲤	7.6×10 ⁵	2.8×10 ⁶	3.0×10 ⁶	7.0×10 ⁸
		0.82	3.03	3.24	756.76
	野鲤	5.6×10 ⁵	2.1×10 ⁶	2.8×10 ⁶	6.0×10 ⁸
		0.61	2.27	3.03	648.65
	镜鲤	8.4×10 ⁵	2.3×10 ⁶	2.9×10 ⁶	5.0×10 ⁸
		0.91	2.49	3.14	540.54
不加 热 加 EGTA	建鲤	8.7×10 ⁵	2.7×10 ⁶	3.5×10 ⁶	7.0×10 ⁸
		0.94	2.92	3.78	756.76
	野鲤	7.2×10 ⁵	2.5×10 ⁶	4.3×10 ⁶	7.0×10 ⁸
		0.78	2.70	4.65	756.76
	镜鲤	9.0×10 ⁵	2.7×10 ⁶	2.9×10 ⁶	6.0×10 ⁸
		0.97	2.92	3.14	648.65
加 热 不 加 EGTA	建鲤	8.9×10 ⁵	3.0×10 ⁶	6×10 ⁶	2.3×10 ⁹
		0.96	3.24	6.49	2486.49
	野鲤	8.4×10 ⁵	2.8×10 ⁶	6.0×10 ⁶	2.3×10 ⁹
		0.91	3.03	6.49	2486.49
	镜鲤	1.0×10 ⁵	2.8×10 ⁶	6.5×10 ⁶	1.6×10 ⁹
		1.08	3.03	7.03	1729.73

注:(1)菌液浓度3.7×10⁶CFU/ml;(2)EGTA—二醇双乙酰胺-N,N-四乙酸,最终浓度10⁻⁶Mol。

表4 三种鲤补体总量测定值(单位/ml)

Table 4 Observed values of total amount of complements in 3 strains of common carps (unit/ml)

品系	各次测定值				均值±标准差
	1	2	3	4	
建鲤	3.90	3.95	3.85	3.90	3.90±0.04
野鲤	3.10	3.15	3.15	3.00	3.10±0.07
镜鲤	2.03	2.00	2.06	2.04	2.03±0.02

注:表中数据为10尾鱼血清混和测定值。

表5 三种鲤白细胞吞噬百分率

Table 5 Percentage of leucocyte phagocytic of 3 strains of common carp

品系		试验鱼编号					均值±标准差
		1	2	3	4	5	
第一次	建鲤	23.3	18.7	26.5	23.2	38.3	26.0±7.4
	野鲤	37.8	39.1	23.4	20.9	23.3	28.9±8.8
试 验	镜鲤	39.4	41.4	24.2	39.3	34.4	35.7±6.9
第二次	建鲤	20.9	26.0	20.1	28.0	18.0	22.6±4.2
	野鲤	28.5	19.0	31.0	24.1	21.2	24.8±5.0
试 验	镜鲤	21.0	30.0	36.0	40.0	30.0	31.4±4.2

(四) 红细胞 C_{3b} 受体花环试验

C_{3b} 致敏酵母与鲤红细胞形成花环。试验结果建鲤高于镜鲤和野鲤(表6),差异极显著($F > F_{0.01}$)。

表6 三种鲤红细胞 C_{3b} 受体花环率Table 6 Percentage of erythrocyte C_{3b} receptors aggregates of 3 strains of common carp

	红细胞 C_{3b} 受体花环率(%)								均值±标准差
	1	2	3	4	5	6	7	8	
建鲤	7.7	7.8	7.5	9.5	8.0	9.6	8.7	8.5	8.4±0.8
野鲤	8.7	6.4	7.2	5.8	6.7	7.3	6.6	5.7	6.8±1.0
镜鲤	6.3	5.6	5.8	9.6	5.3	6.0	5.8	6.8	6.4±1.4

三、讨 论

1. 本文是继蔡完其、孙佩芳[1993]所作三种鲫对暴发性鱼病的抗病力的研究之后,探讨另一主要养殖对象鲤对暴发性鱼病的抗病力的种内差异。研究路径是,首先进行半数致死量(LD_{50})测定,再从白细胞吞噬功能、补体替代途径(C_3 旁路)杀菌能力、补体总量及红细胞 C_{3b} 受体花环率四个方面进行抗病机理研究。

在半数致死量(LD_{50})方面,当菌液浓度为 6.0×10^8 CFU/ml,采用 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 四个稀释度,0.3 ml/尾注射剂量时,半数致死量(LD_{50})依次是:建鲤 $10^{-1.375}$ 、野鲤 $10^{-0.976}$ 、镜鲤 $10^{-0.562}$,差异显著($F > F_{0.05}$)。在白细胞吞噬功能和补体替代途径(C_3 旁路)杀菌能力方面,差异均不显著,但测定值均是镜鲤较强于野鲤和建鲤,这和半数致死量(LD_{50})测定结果的顺序基本一致。而在补体总量和红细胞 C_{3b} 受体花环率方面,差异均极显著($F > F_{0.01}$),顺序是建鲤>野鲤>镜鲤。

建鲤是经过多年选育的优良品种,其选育目标是生长速度和体型[张建森等,1990],并未在抗病力方面进行选育。本试验测定表明,建鲤免疫力较强,这可能是在长期的生长速度选育中产生的附加效应。但从半数致死量(LD_{50})试验结果看,同野鲤和镜鲤相比,建鲤对暴发性鱼病病原(嗜水气单胞菌)较易感染。众所周知草鱼易患多种疾病,但对暴发性鱼病病原(嗜水气单胞菌)却不易感染。这两种情况表明,某种鱼对某些病原体具有易感性。三种鲤对暴发性鱼病病原感染程度的不同,正表明不同鲤鱼对暴发性鱼病具有种内特异性。这与作者对鲫鱼的研究结果一致[蔡完其、孙佩芳,1993]。

2. 红细胞免疫功能是现代免疫学的一个新领域,自1981年美国学者[Siegel等,1981]提出“红细胞免疫系统”以来,医学界对人类的红细胞免疫调节功能已进行了研究[郭峰,1991]。至于鱼类红细胞的免疫功能,冯来坤等(1992)对鲤、草鱼、金鱼作过初步研究,但对鱼类红细胞

免疫功能的种内差异尚未见报道。本试验证明建鲤、野鲤和镜鲤的红细胞均能同 C_{3b} 致敏酵母结合形成花环,这是由于 C_{3b} 致敏酵母附有 C_{3b} 成份,它同红细胞上的 C_{3b} 受体结合形成 C_{3b} 受体花环所致。三种鲤的 C_{3b} 受体花环率依次是建鲤 > 野鲤 > 镜鲤,差异显著。这不仅证实了鱼类红细胞具有免疫功能;而且证明不同品系鲤鱼红细胞的免疫功能存在种内差异。

3. 本研究结果揭示不同品系鲤鱼免疫力不同,而对特定疾病病原的感染性同免疫力并不一致,即存在着对某种疾病的种内特异性。因此,在对鱼类抗病能力进行选育时,不仅要总体重视鱼体的健康程度,还要注意对特定疾病的抗病力,方能育成抗病力强的较理想品种。

细菌由上海水产大学孙其焕副教授提供,建鲤由淡水渔业研究中心张建森教授提供, C_{3b} 致敏酵母由第二军医大学郭峰教授提供,1992届淡水养殖专业学生郭占芳、钟波兰参加部份工作,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 安德森, D. P. (张寿山、华鼎可译), 1984. 鱼类免疫学, 110-113. 农业出版社(京)。
- [2] 张建森等, 1990. 建鲤选育的新工艺、新技术. 淡水渔业研究文集, 1-5. 科学出版社(京)。
- [3] 郭峰, 1991. 红细胞免疫系统研究展望. 中国免疫学杂志, 7(增刊): 2-3.
- [4] 郭峰等, 1982. 红细胞免疫功能的初步研究. 中华医学杂志, 62(12): 715-716.
- [5] 蔡完其、孙佩芳, 1993. 三种鲫鱼对暴发性鱼病的抗病力. 水产学报, 17(1): 44-51.
- [6] Siegel, I. *et al.*, 1981. The red-cell immune system. *The Lancet*, (12): 556-559.
- [7] Zar, J. H. 1974. *Biostatistical Analysis*. Prentice-HALL, Inc. Englewood Cliffs, N. J. pp 620.

WITHIN SPECIES VARIATION OF RESISTANCE OF COMMON CARPS IN THE CASE OF OUTBREAK-FISH-DISEASE

Cai Wanqi and Sun Peifang

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT This paper reports the resistance variation of wild, mirror and jian common carps to the outbreak-fish-disease caused by the *Aeromonas hydrophilla*. When the bacteria concentration was 6.0×10^8 CFU/ml (four gradients at 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}), injection dosage was 0.3 ml/fish, the median lethal dose (LD_{50}) for wild carp, mirror carp and jian carp was $10^{-0.976}$, $10^{-0.562}$ and $10^{-1.375}$ respectively, which indicated that there was a significant difference in the median lethal dose among strains ($F > F_{0.05}$). The mechanism of resistance was studied from 4 sides: In sides of leucocyte phagocytic function and bactericidal reaction by alternative pathway of complement (C_3 shunt), mirror carp was higher than wild carp and jian carp without significant differences ($F < F_{0.05}$); in the sides of erythrocyte C_{3b} receptors-aggregates and the total amount of complements, the rank was jian carp > wild carp > mirror carp at a high significant differences ($F > F_{0.01}$). Erythrocyte C_{3b} receptors-aggregates and the total amount of complements are two important indicators which reflect the immune capacity of fishes. This study found that the jian carp is little higher in these two

indicators, but it is more infectious to the pathogen of outbreak-fish-disease, *Aeromonas hydrophilla*, this situation represents that different strains of common carp have a within species heterogeneity to outbreak-fish-disease.

KEYWORDS wild common carp, mirror common carp, jian common carp, outbreak-fish-disease, resistance