

## 温度对草鱼出血病影响的初步探讨

丁清泉 余兰芬 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

### 提 要

将鱼呼肠孤病毒(FRV)感染的草鱼饲养在人工控温的水族箱内, 水温在24—30℃恒温时其死亡率无显著差异( $P>0.05$ ), 而在20℃和33℃恒温时死亡率则明显降低, 与24—30℃恒温相比死亡率有非常显著差异( $P<0.01$ )。人工感染恒温饲养期间, 死亡高峰期随水温降低而推迟, 缓慢改变水温能降低死亡率, 在低于20℃攻毒并维持一星期左右, 即使逐步升温至30℃也不会导致感染鱼的大批死亡。

**关键词:** 鱼呼肠孤病毒 草鱼出血病 温度

根据初步研究认为草鱼出血病的病原系鱼呼肠孤病毒<sup>[1,2]</sup>。流行病学研究表明: 草鱼出血病流行的季节性很强, 在夏秋气温高的季节爆发流行, 而在冬春季节则不流行<sup>[3]</sup>。鱼类是变温动物, 水温不仅直接影响鱼体内的新陈代谢, 而且也在疾病的流行过程中起重要作用。我们在室内人工感染增殖病毒的过程中, 就温度对草鱼出血病的影响进行了初步探讨, 现将结果报道如下。

### 材 料 和 方 法

1. **鱼呼肠孤病毒株:** 从邵阳市水产科学研究所提供的患草鱼出血病病鱼中分离。
2. **健康草鱼鱼种:** 由湖北省野芷湖水产良种场提供。
3. **人工感染:** 取患草鱼出血病症状明显的病鱼内脏加入少量0.01mol/L磷酸缓冲液匀浆, 经冻融二次, 按每克内脏加3—5ml量补足磷酸缓冲液, 加双抗处理。每尾鱼腹腔注射0.3—0.4ml, 在水族箱中控温通气饲养。

人工感染后死亡鱼按已报道的方法解剖观察其肌肉及内脏病理学变化<sup>[4]</sup>, 同时经初提纯后在电镜下观察以确证是否病毒感染所致<sup>[5]</sup>。

### 结 果

#### 一、电镜观察

取人工感染死亡后的病鱼内脏(肾、肝、脾、肠)经差异离心初步提纯, 负染色后

本文于1989年5月25日收到

本文表1表2的统计学数据处理承湖北医学院陈冬斌老师协助完成, 特此致谢。



图1. 从发病死亡鱼内脏分离的病毒粒子

Fig1. Virions isolated from dead grass carp

在电镜下可见典型的病毒粒子(图1), 与已报道的形态基本相同<sup>[5]</sup>。证实人工感染死亡确系病毒感染所致。

## 二、恒温饲养对草鱼发病的影响

将人工感染草鱼放入不同水族箱内, 水温分别控制在 20℃、24℃、27℃、30℃ 和 33℃。另设未感染健康鱼(注射等量磷酸缓冲液)对照水浴箱, 温度控制在28℃。逐日统计发病死亡数(24小时内死亡数不在统计之列), 直至死亡不再发生, 感染鱼游动正常并大量摄食时为止。15天后, 未死亡的感染鱼一般不再死亡。三次试验结果见表1。经统计学的  $\chi^2$  测验处理数据<sup>[6]</sup>, 各次试验中 20℃—33℃ 恒温时各温度组致死率有非常显著差异 ( $P < 0.01$ ), 但其中 24℃—30℃ 则无显著差异 ( $P > 0.05$ )。经  $\chi^2$  检验和超几何分布的直接概率法(精确法)计算同一温度的3次结果均无显著性差别, 故将三次结

表1 恒温饲养时发病死亡统计结果

Table 1 Dead statistics of infected grass carp in constant water temperature

实验组	水 温 (°C)					CK 28	
	33	30	27	24	20		
I	感染数	24	23	25	25	25	15
	死亡数	17	21	25	24	13	0
	致死率(%)	70.8	91.3	100	96.0	52.0	0
II	感染数	/	25	18	26	21	20
	死亡数	/	25	16	23	12	0
	致死率(%)	/	100	88.9	88.5	57.1	0
III	感染数	25	28	27	28	28	20
	死亡数	17	24	23	26	12	0
	致死率(%)	68.0	85.7	85.2	92.9	46.2	0
总 计	感染数	49	76	70	79	72	55
	死亡数	34	70	64	73	37	0
	致死率(%)	69.39	92.1	91.43	92.41	51.39	0

果予以合并(表1),同时计算各温度组间的差异,结果显示24℃、27℃、30℃三组致死率无显著差异,而20℃与33℃二组致死率与上述三组有非常明显的差异(表2),由此推测33℃和20℃是草鱼出血病流行爆发的上限和下限的临界温度。

表2  $\chi^2$  测验不同温度组间致死率差异  
Table 2. Differences of the death-rate of the different temperature with  $\chi^2$  test

组 别(℃)	$\chi^2$	P
33 和 30	10.9999	<0.01
33 和 27	9.63	<0.01
33 和 24	11.68	<0.01
33 和 20	3.896	<0.05
30 和 27	0.022	>0.05
30 和 24	0.0049	>0.05
30 和 20	30.6	<0.01
27 和 24	0.0478	>0.05
27 和 20	27.71	<0.01
24 和 20	32.0384	<0.01

人工感染草鱼均有一个与温度有关的爆发死亡高峰期。以表1第Ⅲ组每日病死率作图(图2),可见温度愈低、死亡高峰期愈迟,24℃—30℃恒温时感染鱼爆发死亡期为单峰型,24℃死亡高峰在11天,27℃为7天,30℃为5天。33℃为双峰型,20℃则为不规则型。其它两组试验也证实了上述结果,但死亡高峰时间相差1天左右。

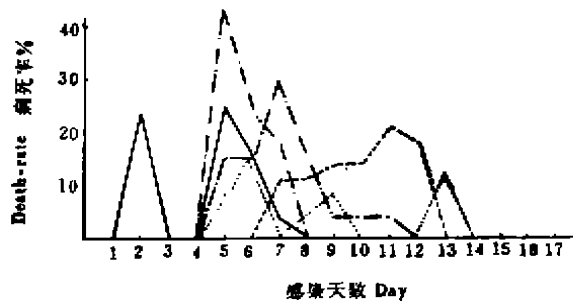


图2. 不同水温饲养人工感染鱼发病死亡率曲线

—— 33℃      - - - - - 30℃  
- · - · - · 27℃      - - - - - 24℃  
····· 20℃

Fig 2. Dead curve in different water temperature (W.T.)

### 三、温度变化对草鱼发病的影响

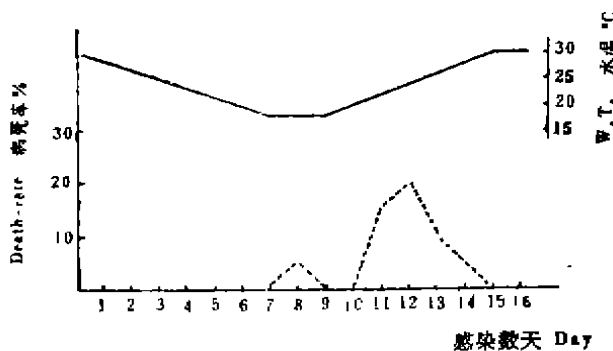


图3. 降温饲养人工感染鱼发病死亡曲线

Fig 3. Dead curve in reduced water temperature (W.T.)

水温变化对草鱼出血病有明显影响。图 3 为先降温后升温的发病死亡率曲线, 感染鱼 20 尾。感染后从高温 (30℃) 以日均 2℃ 下降, 至感染后第 8 天 (水温 18℃) 死鱼一尾, 18℃ 维持三天后以日均 2℃ 升温至 30℃ 后维持恒温, 总死亡率为 55%, 低于同次试验中 30℃ 恒温饲养时的死亡率 (85.7%), 这表明在感染初期降温能减少鱼的死亡。

图 4 为升温饲养人工感染鱼发病死亡率曲线, 感染鱼 30 尾。感染后从 15℃ 起以日均 1℃ 升温至 22℃, 嗣后以日均 2℃ 升至 30℃ 再维持恒定, 在此期间仅死鱼一尾 (死亡率为 3.3%), 远低于同次试验中 30℃、20℃ 恒温饲养的死亡率 (分别为 85.7%、46.2%)。15 天后对存活鱼再次攻毒并维持水温 30℃, 10 天内鱼无一死亡, 表明人工感染鱼已产生免疫力。

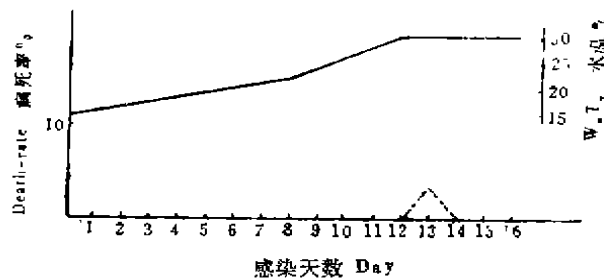


图 4. 升温饲养人工感染鱼死亡曲线  
Fig. 4. Dead curve in raised water temperature (W.T.)

## 讨 论

根据草鱼出血病流行病学调查, 每年 6—9 月是此病的主要流行季节, 水温一般在 27℃ 以上最容易流行<sup>[5]</sup>。我们在室内控温饲养, 发现人工感染草鱼发病死亡与自然界发病流行一样受温度影响很大。24℃—30℃ 恒温时发病死亡率经统计学处理无明显差异, 这个温度范围也正好是夏秋时的水温范围。20℃ 时鱼发病死亡无明显规律, 但明显低于 24℃ 以上恒温时总的死亡率, 20℃ 可能是该病流行的临界温度。33℃ 恒温时在感染后 48 小时左右出现爆发性死亡, 经解剖和电镜观察, 仍系病毒感染所致, 这与罗楞等报道的结果相似<sup>[8]</sup>。我们曾对一些渔场进行了流行病学调查, 发现在夏季气温偏高时草鱼出血病反而不流行。室内人工感染结果经统计学处理 33℃ 与 24℃—30℃ 恒温时的死亡率有非常显著差异, 33℃ 恒温饲养时各组死亡率均低。因此推测在高于 33℃ 水温时, 该病的流行将受到抑制。在人工感染增殖材料的情况下以 24℃—30℃ 恒温饲养为宜。

在改变人工感染鱼的饲养温度时, 从高温 (30℃) 逐渐降温可以降低发病死亡率 (见图 3)。即使在 24℃—30℃ 范围内变化也可以降低发病死亡率 (结果未表示)。

范至刚等的隐性感染试验表明在初冬 (水温 10℃ 左右) 用强毒浸泡的鱼种可以获得很强的免疫力<sup>[6]</sup>。我们采用腹腔注射攻毒, 水温从 15℃ 缓慢升至 30℃ 并维持一段时间, 发病死亡率相当低, 即使再次攻毒, 也没有出现死鱼现象。这表明在稍低于临界温度的情况下攻毒, 并不需要很长时间就能使鱼产生免疫力。

尾崎永雄曾指出,以海胆精子为抗原,使鲤鱼产生凝集素,28℃时7天前后可检测出凝集素,15℃要晚4—8天<sup>[9]</sup>。高汉蛟等的研究证实,草鱼的免疫反应更加依赖于温度,用草鱼出血病组织疫苗免疫草鱼,水温控制在20℃以上时,免疫后第4天就能使草鱼获得免疫力,15℃需20天,10℃需30天;2.3℃—9℃时需33天才能产生免疫力<sup>[10]</sup>。我们曾用血凝抑制试验检测强毒感染鱼的病毒抗体产生的时间,发现20℃恒温时出现抗体时间为感染后第八天,而在27℃恒温时时间为第四天,可检测抗体出现的时间比发病死亡高峰时间稍早。

我们认为,在人工感染条件下,草鱼出血病的结局取决于病毒在鱼体内增殖的数量及鱼对病毒的免疫能力。在24℃以上时,病毒增殖速度快,在鱼体免疫功能尚未发挥作用之前,病毒在鱼体内增殖的数量足以导致鱼的死亡。在低于20℃时,病毒的增殖速度受到抑制,部分病毒失去感染性而保留其免疫原性,尽管低温时特异性抗体产生的时间较晚,但在病毒尚未达到鱼致死量之前就发挥了作用,由此可见,温度对草鱼出血病流行的影响主要在控制病毒增殖速度方面。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1984, 淡水渔业, (4)7—9。
- [2] 陈燕藻、江育林, 1983, 科学通报, 28(9), 1138—1140。
- [3] 黄琪琰主编, 1983, 鱼病学, 上海科学技术出版社, 上海, P60。
- [4] 中国科学院水生生物研究所, 1978, 水生生物学集刊, 6(3), 321—330。
- [5] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1984, 淡水渔业, (2)21—22。
- [6] 中国医学科学院流行病防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术, 科学出版社, 北京, P398。
- [7] 罗楞等, 1985, 江西水产科技(1)5。
- [8] 范至刚, 1984, 康慧, 淡水渔业, (4)10—11。
- [9] 尾崎久雄著, 许学龙等译, 1982, 鱼类血液与循环生理, 上海科学技术出版社, 上海, P236。
- [10] 高汉蛟等, 1980, 鱼病简讯, (3)1—8。

## Preliminary Study of the Influence of Water Temperature on the Grass Carp Hemorrhage Disease

Ding Qing-quan Yu Lan-fen Ke Li-hua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

The grass carps infected by the Fish Reovirus (FRV) were fed in constant temperature water, in which there are no notable differences of the death-rate ( $P > 0.05$ ) from 24°C to 30°C. However, when the water temperature was cut down to 20°C and gone up to 33°C the death-rate were marked reduction ( $P < 0.01$ ). Because of reduction of the water temperature the peak of death would be delayed. The result indicated that it did not cause a large number of grass carps to die under the condition of infection below 20°C for a week even though the water temperature was gradually gone up to 30°C.

**Key words:** Fish reovirus Hemorrhage disease Temperature