

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00345

嗜麦芽寡养单胞菌胞外产物对斑点叉尾鲷损伤的病理学研究

耿毅^{1,2} 汪开毓^{1,2} 肖丹³ 陈德芳¹ 黄锦炉¹

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 四川农业大学, 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014;
3. 通威股份有限公司, 成都 610041)

摘要: 采用硫酸铵盐析从嗜麦芽假单胞菌培养物中提取其胞外产物, 通过腹腔注射方式, 进行了嗜麦芽假单胞菌(*P. maltophilia*)胞外产物对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)损伤的系统病理学研究。结果表明, 嗜麦芽假单胞菌胞外产物具有较强的毒力, 对斑点叉尾鲷(42.5±4.4)g 的半致死剂量(LD₅₀)为 3.21 mg 蛋白/kg 体重。病鱼出现神经症状, 腹部和下颌充血、出血, 腹部膨大, 腹腔内充满大量淡黄色或带血的腹水, 胃肠道黏膜充血、出血, 肠套叠, 肝、脾、肾肿大等临床病变。组织学病变主要表现为全身多组织、器官水肿, 出血、变性、坏死以及炎症反应, 特别是脑、骨骼肌、肝、脾、肾和胃肠道的损伤较为严重。超微结构观察发现病鱼肝、脾、肾和骨骼肌等器官的细胞的超微结构均有较为严重的破坏, 线粒体肿胀, 嵴断裂或溶解消失, 呈空囊状, 内质网扩张, 细胞核变形, 染色质溶解或固缩; 研究中还发现嗜麦芽假单胞菌胞外产物可致淋巴细胞凋亡, 脾和肾间质内淋巴细胞均表现为细胞核染色质浓缩边移, 或核固缩成一个或数个团块凝聚在核膜周边, 形成凋亡小体。

关键词: 嗜麦芽假单胞菌; 胞外产物; 致病性; 病理学; 斑点叉尾鲷

中图分类号: S941.49 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0345-08

斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)亦称沟鲶, 原产于北美洲, 我国于 1984 年引进该品种, 目前已推广到 20 多个省市进行养殖, 特别是在广东、湖北、江苏、四川和重庆等省市形成了较大的养殖规模。斑点叉尾鲷嗜麦芽寡养单胞菌病是近年来发现的一种新的暴发性传染病, 严重威胁着我国斑点叉尾鲷养殖的健康发展^[1]。嗜麦芽寡养单胞菌(*S. maltophilia*)以前又称嗜麦芽假单胞菌(*P. maltophilia*)或嗜麦芽黄单胞菌(*X. maltophilia*), 为一种需氧非发酵型, 不形成芽孢的革兰氏阴性杆菌, 广泛分布于自然界, 是人类重要的条件致病菌和院内感染菌, 可引起败血症、心内膜炎、肺炎、结膜炎、脑炎、尿道、消化道和伤口感染等^[2]。近年来研究发现, 该菌的感染范围在不断扩大, 不仅感染人, 对水稻^[3]、山羊^[4]、猪^[5]、鳄鱼^[6]、黄缘闭壳龟^[7]、卵型鲟^[8]、

中华绒毛蟹^[9]和斑点叉尾鲷^[1]等动植物都有感染致病的报道, 特别是对斑点叉尾鲷的感染具有发病率和死亡率高的特点, 一旦发病往往导致严重的经济损失。胞外产物(Extracellular products, ECPs)的生物学特性与病理损伤研究是阐明细菌致病机理的重要基础数据, 关于嗜麦芽假单胞菌胞外产物的生物学特性已有研究报道^[10], 但其对斑点叉尾鲷的病理损伤还缺乏相应的研究资料。本文通过腹腔接种斑点叉尾鲷嗜麦芽假单胞菌胞外产物, 进行了系统的病理学研究, 以期阐明该病的致病机理提供试验数据, 为科学防治该病提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

斑点叉尾鲷购自四川省斑点叉尾鲷繁殖基地,

收稿日期: 2008-09-25; 修订日期: 2009-06-20

基金项目: 农业部动物疫病监测与防治项目(2130108); 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(IRTO848); 国家农业公益性行业科研专项(200803013); 通威股份有限公司国家认定企业技术中心配套项目(TYKY2007-05)资助

作者简介: 耿毅(1974—), 男, 四川安岳人; 副教授, 博士; 主要从事病理学的研究与教学工作。E-mail: gengyisicau@126.com

通讯作者: 汪开毓, Tel: 0835-2885910; E-mail: kywang@sicau.edu.cn

体重(42.5±4.4) g, 在玻璃水族箱内暂养 7d, 确认健康后用于试验。

1.2 试验菌株

嗜麦芽寡养单胞菌从发病斑点叉尾鲴分离, 并经细菌形态学, 生理生化及 16S rRNA 序列分析鉴定^[1]。

1.3 胞外产物的制备

参考石存斌等的方法^[11,12], 将 *S. maltophilia* 接种到 TSB 肉汤, 120 r/min 28℃ 震荡培养 48h, 培养物 4℃ 12000 r/min 离心 30min, 收集上清液, 过滤除菌(0.22 μm 微孔滤膜), 上清液中加入固体硫酸铵至 70% 的饱和度, 4℃ 静置过夜, 4℃ 12000 r/min 离心 30min, 弃上清液, 沉淀溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液中, 经透析, 聚乙二醇(PEG)10000 浓缩, 得 ECPs, 分装保存于 -20℃ 备用。胞外产物中蛋白质含量的测定采用考马斯亮兰法(Bradford)法。

1.4 试验鱼分组与染毒

健康斑点叉尾鲴 70 尾, 随机分成 7 组, 每组 10 尾, 经预试验, 将制备的 ECPs 调整到适当浓度, 等比稀释后腹腔注射斑点叉尾鲴, 每尾 0.5 mL; 对照组注射无菌的等量生理盐水(0.85% NaCl)(表 1)。注射后仔细观察鱼的临床表现, 统计死亡情况, 并对死亡鱼及时进行剖解观察各器官、组织的形态变化, 连续观察 7d, 试验结束后, 采用寇氏法(Kärber)计算 ECPs 对斑点叉尾鲴的 LD₅₀。

表 1 斑点叉尾鲴腹腔注射嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 的死亡情况

Tab. 1 The mortality of channel catfish injected *S. maltophilia* ECPs intraperitoneally

组别 Groups	样本数 (尾) No.	接种 EPC 蛋白量 Challenge dose (mg/kg)	死亡数 (尾) Dead No.	死亡率 Mortality (%)
I	10	5.29	10	100
II	10	4.07	7	70
III	10	3.13	4	40
IV	10	2.40	2	20
V	10	1.85	1	10
VI	10	1.42	0	0
Control	10	0	0	0

1.5 病理组织学观察

分别采取发病死亡鱼的骨骼肌、鳃、心、肝、脾、肾、脑、胃和肠道等组织, Bouin'S 液固定, 石蜡包埋切片, H.E 染色, 光学显微镜观察。

1.6 超微结构观察

分别采取病鱼的肝、脾、肾和骨骼肌, 2.5% 的戊二醛固定 76h, 乙醇梯度系列脱水, 环氧树脂(618)包埋, 超薄切片, 醋酸铀及柠檬酸铅染色, 日立 H-600 透射电镜观察。

2 结果

2.1 症状与剖检变化

斑点叉尾鲴腹腔注射 *S. maltophilia* ECPs 后 2—3h, I、II 组试验鱼陆续表现出呼吸频率加快, 游动缓慢, 无力, 并出现间隙性的兴奋症状及头向上尾向下的特殊姿势; 随病程的发展体表可见不规则的褪色斑块。8h 后试验鱼开始发生死亡, 试验结束时各组斑点叉尾鲴的死亡情况(表 1)。死亡鱼剖检见腹水, 胃扩张, 积液, 肠道充血、出血, 肠腔内充满大量含血的或淡黄色的液体, 部分鱼还出现肠套叠(图 1); 肝、脾、肾肿大。试验结束后, 根据各组的死亡率, 采用寇氏法(Kärber)得 *S. maltophilia* ECPs 对斑点叉尾鲴的 LD₅₀ 为 3.21 mg 蛋白/kg 体重。

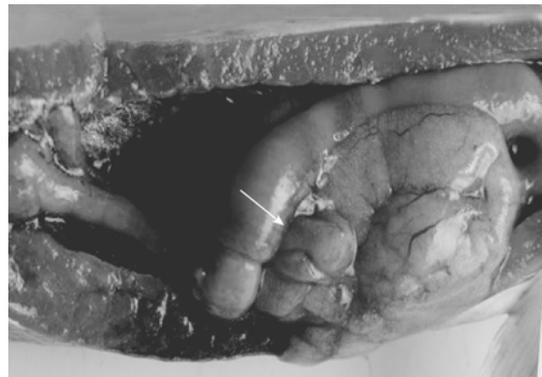


图 1 ECPs 致斑点叉尾鲴肠套叠

Fig. 1 Intussusception in rectum induced by ECPs

2.2 病理组织学变化

心: 心外膜疏松, 水肿, 血管扩张淤血, 淋巴细胞与单核细胞浸润; 心肌纤维颗粒变性, 肌横纹模糊不清或消失, 肌间隙增宽, 水肿, 血管扩张淤血, 淋巴细胞、单核细胞等炎症细胞浸润。

鳃: 鳃小片增粗, 毛细血管扩张淤血, 呼吸上皮肿胀与毛细血管分离, 甚至坏死, 鳃小片基部大量淋巴细胞、单核细胞等炎症细胞浸润(图版 I -1)。

肝: 肝水肿, 狄氏间隙明显增宽, 肝血窦受压缩小, 甚至闭锁; 肝细胞肿胀, 空泡变性, 胞质内出现红染的蛋白颗粒或大小不等的空泡(图版 I -2),

病变严重的区域细胞核浓缩、碎裂或溶解消失,表现为坏死。

肾:肾小球肿大,几乎填满整个肾小囊;肾小管上皮细胞肿胀,颗粒变性与空泡变性,甚至溶解,坏死,肾小管结构破坏;肾间质水肿,拟淋巴细胞坏死减少,大量巨噬细胞与中性白细胞浸润(图版 I-3)。

脾:脾脏严重淤血、出血,红骨髓界限不清,大量含铁血黄素沉积,白髓淋巴细胞数量显著减少(图版 I-4),脾实质内大量巨噬细胞和中性白细胞浸润。

骨骼肌:肌浆均质红染,横纹模糊,甚至消失,病变严重的区域肌纤维断裂,坏死,肌浆溶解,肌间隙增宽,水肿,毛细血管扩张淤血,大量炎症细胞浸润(图版 I-5)。

胃:黏膜上皮变性、坏死,脱落,固有膜裸露,固有膜毛细血管扩张淤血,较多淋巴细胞、中性白细胞和巨噬细胞浸润,胃腺上皮细胞肿胀,坏死,脱落;浆膜血管扩张,淤血。

肠:肠上皮变性、坏死,脱落,脱落的上皮细胞、单核细胞和黏液及大量中性白细胞和红细胞充滞于肠腔内,固有膜和黏膜下层毛细血管扩张淤血,多量淋巴细胞、中性白细胞和巨噬细胞浸润;肌层肌纤维变性肿胀,浆膜层血管扩张淤血,炎症细胞浸润;病变严重的病例可见固有膜、黏膜下层,甚至整个肠壁都发生坏死,细胞崩解,组织结构破坏。

脑:脑基质水肿,疏松多孔,呈海绵状,血管周围间隙增宽,血管扩张淤血。神经细胞肿胀,体积增大,胞核淡染,靠边,甚至发生坏死、固缩,小胶质细胞增生,并出现“噬神经原现象”(图版 I-6)。

2.3 超微结构变化

肝:肝细胞内糖原颗粒明显减少,甚至消失,线粒体肿胀,体积增大,嵴结构不清,或断裂,溶解,消失,整个线粒体呈囊泡状(图版 II-1),滑面内质网扩张,而粗面内质网的变化不大;细胞核变形,染色质溶解,电子密度降低,部分细胞的染色质浓缩,边集于核膜下。

脾:淋巴细胞核膜扩张,不规则,胞核内染色质浓缩,碎裂成大小不等的团块,边移于核膜下,胞浆内线粒体肿胀,嵴断裂溶解,内质网扩张(图版 II-2),表现为凋亡的形态学变化。一些淋巴细胞核表现为固缩,体积缩小,电子密度增高,碎裂呈大

小不等的团块(图版 II-3)

肾:肾小管上皮细胞线粒体肿胀,体积增大,结构模糊,内质网扩张;核膜扩张,细胞核固缩,碎裂。肾间造血组织淋巴样细胞核膜扩张,染色质浓缩,边集,呈环状或半月状(图版 II-4、5),甚至裂解呈多块边移于核膜下(图版 II-6),表现为凋亡的形态学变化。

骨骼肌:肌节结构不清,Z线排列紊乱,呈锯齿状或阶梯状,I带消失,M线模糊不清,肌原纤维排列紊乱,间距不匀,并且有的发生断裂、溶解,形成空白区,线粒体肿胀,嵴模糊不清,甚至发生溶解消失,呈囊泡状,肌浆网扩张。病变严重的区域肌原纤维广泛性溶解、坏死,整个肌束呈空囊状,仅见外周的肌束膜,或在肌束膜下见一些残存的,团块状的,无结构的电子密度较低的物质。

3 讨论

3.1 嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 对斑点叉尾鲷的致病性

胞外产物(ECPs)是细菌在生长与繁殖过程中,不断向外界环境中释放的代谢物质,包括多种酶和外毒素,现已发现嗜水气单胞菌^[13]、副溶血弧菌^[14]、拟态弧菌^[15]、溶藻弧菌^[16]和迟缓爱德华氏菌^[17]等多种水产动物病原菌的胞外产物具有明显的致病性,并导致鱼类出现与这些病原菌感染相似的症状与病理变化,从而证实这些病原菌的胞外产物在它们的感染致病中发挥着重要的作用,为阐明这些病原菌的致病机理提供了重要的资料。本研究中发现嗜麦芽寡养单胞菌的胞外产物对斑点叉尾鲷也具有明显的致病性,其对斑点叉尾鲷的 LD₅₀ 为 3.21 mg 蛋白/kg 体重,试验鱼腹腔注射嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 后出现神经症状及体表褪色斑、腹水,胃肠道充出血,肠套叠和肝、脾、肾肿大等病理变化,与该菌感染的症状与病变相似^[18],表明 ECPs 是其重要的致病因子,在疾病的发生与发展过程中起着重要的作用。

3.2 嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 对斑点叉尾鲷损伤的靶器官与损伤特点

系统的病理学观察发现嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 对斑点叉尾鲷主要的病理损伤是全身广泛性水肿、细胞变性、坏死和多组织、器官的炎症反应,特别是肝、肾、脑、胃肠道和骨骼肌的损伤较为严

重,为其损伤的靶器官。肝表现为水肿,体积增大,细胞肿胀,空泡变性,甚至发生溶解坏死。肾表现为肾小球肿大,肾小管和集合管广泛性的变性、坏死及肾间质水肿,肾间造血组织坏死,大量炎症细胞浸润。由于肝、肾的损伤,导致体内水、钠代谢平衡失调,出现全身性水肿,在临床上出现腹部膨大,腹水的表现。胃肠道黏膜上皮广泛性的变性、坏死,脱落,固有膜、黏膜下层水肿、血管扩张充血、出血、炎症细胞浸润,表现为卡他性-出血性-坏死性胃肠炎。脑水肿,表现为非化脓性脑炎,由于脑的损伤,致鱼出现神经症状,表现间隙性的兴奋及头向上尾向下的特殊姿势。

超微结构观察发现嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 对斑点叉尾鲷主要器官的细胞超微结构都造成明显的损伤,特别是对线粒体的损伤较为严重。线粒体表现为肿胀,嵴断裂和溶解消失,从而使线粒体呈空囊状等病理变化。线粒体是细胞内重要的能量代谢场所,三羧酸循环、呼吸链电子传递和氧化磷酸化等产能过程均在此进行,其病变使细胞的能量代谢受到严重破坏,由于能量供应不足促使全身多组织与器官,特别是心、鳃、肝、肾和脑等生命活动重要器官的细胞发生变性、坏死,从而造成全身多器官功能障碍,甚至衰竭,最终导致鱼体死亡。

3.3 嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 致淋巴细胞凋亡

细胞凋亡(Apoptosis)是由 Kerr, *et al.*于1972年首先提出的,它是机体在生长发育、细胞分化和病理过程中由基因编码调控的细胞自主性死亡过程^[19]。机体通过凋亡将衰老、畸变和病变的细胞清除,因而,凋亡在生理及病理过程中都具有重要的作用。凋亡细胞在形态学上表现为细胞变圆,与邻近细胞脱离,失去微绒毛,细胞核染色质密集呈半月状或固缩、裂解,细胞质浓缩,质膜内陷将细胞分隔为有膜包裹且内容物不外泄的凋亡小体(Apoptotic body)^[20,21]。本研究中发现嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 致斑点叉尾鲷肾和脾内的淋巴细胞凋亡,细胞核表现为染色质浓缩、裂解边移等变化,这与副溶血弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌的 ECPs 对斑节对虾^[22],溶藻弧菌 EUPs 对大黄鱼^[16]的损伤相似。由于 ECPs 导致淋巴细胞凋亡,进一步引起鱼体淋巴细胞(T、B 淋巴细胞)数量减少、活性降低,从而造成机体的体液免疫和细胞免疫功能受损,在斑点叉尾鲷发病与死亡方面具有重要意义。

3.4 嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 对斑点叉尾鲷损伤机理探讨

研究表明嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 具有蛋白酶、脂酶、溶血素和明胶酶等酶活性,同时具有肠毒素活性、溶血活性与细胞毒性^[10]。本研究发现其对斑点叉尾鲷多组织、器官都造成变性、坏死和明显炎症反应的病理损伤,就其损伤发生的机理可能与其多种酶活性、肠毒素活性、溶血活性与细胞毒性有关。由于明胶酶、蛋白酶分解胶原等蛋白成分,脂酶分解脂质,明胶酶、蛋白酶和脂酶联合作用可破坏膜性结构,再加上细胞毒性活性作用从而导致机体组织结构的广泛性损伤,表现为变性、坏死等变化,致使各组织、器官功能的降低,甚至丧失,而引起死亡;与此同时嗜麦芽寡养单胞菌 ECPs 的溶血素活性导致红细胞溶解,血液中红细胞数量减少,载氧量降低,而致机体缺氧进一步加速了鱼体的死亡。肠毒素活性致肠道明显的损伤,表现为变性、坏死、水肿和炎症细胞浸润,由此可见该菌的产肠毒素性可能是其感染斑点叉尾鲷出现肠毒血症,表现为肠炎、肠积液和肠套叠的重要原因。但对其胞外产物中具有这些活性的物质是单一成分还是多种成分,以及这些物质在疾病的发生和发展过程中的作用等都还有待研究,以进一步阐明该菌的致病机理。

参考文献:

- [1] Geng Y, Wang K Y, Chen D F, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of a pathogenic bacterium in channel catfish [J]. *Acta Microbiological Sinica*, 2006, **46**(4): 649—652 [耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鲷一株致病菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 2006, **46**(4): 649—652]
- [2] Denton M, Kerr K G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, **11**(1): 57—80
- [3] Singh N I, Swings I J, Devi R K T, *et al.* White stripe, a new disease of rice caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in India [J]. *Indian Phytopathology*, 2001, **54**(2): 276
- [4] Johnson E H, Busaidy R, Hameed M S. An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 2003, **50**(2): 102—104
- [5] Zhang H J, Xie M Q, Zhang J F, *et al.* Cloning and sequen-

- ceing of 16S rRNA gene of *Stenotrophomonas maltophilia* from swine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, **34**(6): 3—5 [张浩吉, 谢明权, 张健骊, 等. 猪源嗜麦芽窄食单胞菌 16 S rRNA 基因的克隆和序列分析. 中国兽医科技, 2004, **34**(6): 3—5]
- [6] Harris N B, Rogers D G. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis subsp. tetraspis*)[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, **13**(3): 255—258
- [7] Huang B, Chen S F, Chen Y. Study on cystitis disease of *Cistoclemmys flaciomarginata* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, **32**(5): 44—46 [黄斌, 陈世锋, 陈勇. 黄缘闭壳龟囊肿病的研究. 淡水渔业, 2002, **32**(5): 44—46]
- [8] Zhou Y C, Zhu W H, Zhang B, *et al.* Isolation and prevention of the pathogen causing large scale death on *Trachinotus ovatus* [J]. *Marine Sciences*, 2001, **25**(4): 40—44 [周永灿, 朱伟华, 张本, 等. 卵形鲳鲹大规模死亡的病原及其防治. 海洋科学, 2001, **25**(4): 40—44]
- [9] Li J N, Jiang D F, Li L, *et al.* Coding identification on 28 stains pathogenic bacteria of aquatic animal [J]. *Reservoir Fisheries*, 2004, **24**(2): 62—64 [李瑾年, 江定丰, 李琳, 等. 28 株水产动物致病菌的编码鉴定. 水利渔业, 2004, **24**(2): 62—64]
- [10] Chen D F, Wang K Y, Geng Y, *et al.* Characteristics and pathogenicity of the extracellular products of *Stenotrophomonas maltophilia* from channel catfish [J]. *Reservoir Fisheries*, 2008, **28**(1): 99—101 [陈德芳, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾鲷源嗜麦芽寡养单胞菌胞外产物的生物学特性与致病性研究. 水利渔业, 2008, **28**(1): 99—101]
- [11] Shi C B, Hu X F, Chen X G, *et al.* Characteristics of the Extracellular Products of two pathogenic *vibrio harveyi* strains [J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, 2007, **31**(1): 83—87 [石存斌, 胡学峰, 陈献稿, 等. 两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析. 水生生物学报, 2007, **31**(1): 83—87]
- [12] Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish Pathology*, 1984, **19**(2): 89—96
- [13] Rodriguez L A, Ellis A E. Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1992, **13**(1): 17—24
- [14] Xu H S, Shu M A, Zhan X A, *et al.* Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured *Eriocheir sinensis* and pathogenicity of its extracellular products [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, **26**(4): 357—362 [徐海圣, 舒妙安, 占秀安, 等. 养殖河蟹弧菌病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性. 水产学报, 2002, **26**(4): 357—362]
- [15] Li Y Y, Li J N, Yu W Y, *et al.* Study on the cytotoxicity and pathogenicity of the extracellular Products of *vibrio minicus* from *Eriocheir sinensis* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2004, **24**(5): 78—80 [李玉英, 李瑾年, 余为一, 等. 蟹源拟态弧菌胞外产物的细胞毒性和致病性初步研究. 水利渔业, 2004, **24**(5): 78—80]
- [16] Jin S, Zheng T L, Wang G L, *et al.* Pathogenicity of Extracellular Products of *Vibrio alginolyticus* to Great Yellow Croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2004, **24**(5): 439—441 [金珊, 郑天伦, 王国良, 等. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性. 中国兽医学报, 2004, **24**(5): 439—441]
- [17] Ge Y, Chen H Q, Lu C P. Cytotoxicity and Pathogenicity in the Mice and Fish of Extracellular Products of *Edwardsiella tarda* [J]. *Chin J Vet Sci*, 2000, **20**(1): 34—37 [葛艳, 陈怀青, 陆承平. 迟缓爱德华氏菌胞外产物的细胞毒性与动物致病性. 中国兽医学报, 2000, **20**(1): 34—37]
- [18] Wang K Y, Geng Y, Chen D F, *et al.* Isolation of pathogen and observation on pathology of acute epidemic disease in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(3): 457—465 [汪开毓, 耿毅, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鲷急性流行性传染病的病原分离与病理学观察. 中国水产科学, 2007, **14**(3): 457—465]
- [19] Kerr J, Wyllie R, Curie A H. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetic [J]. *British Journal of Cancer*, 1972, **26**: 239—257
- [20] Berhammer F A, Hochegger K, Froschl G, *et al.* Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A + B, without enhanced activation of cdc2 kinase [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1994, **126**: 827—883
- [21] Shi B, Girolamiu D, He J, *et al.* Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, **98**(9): 1979—1990
- [22] Zhang C X, Wang J, Su Y Q. Studies on pathogenesis of extracellular products from pathogenetic bacteria in *Penaeus monodon* Fabricius [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, **22**(5): 94—99 [张朝霞, 王军, 苏永全. 斑节对虾病原菌胞外产物的致病性研究. 海洋学报, 2000, **22**(5): 94—99]

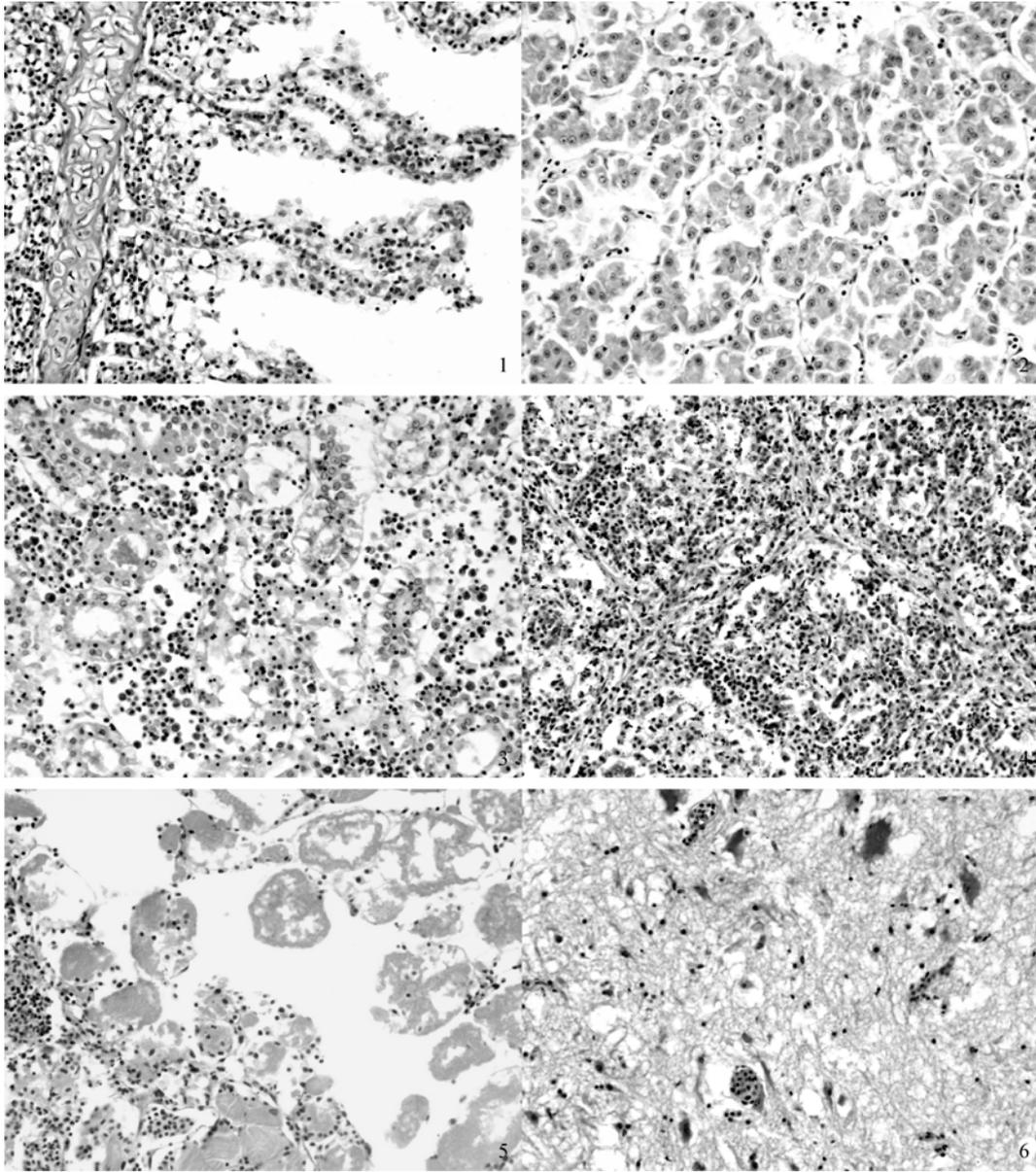
PATHOLOGICAL STUDIES ON CHANNEL CATFISH INDUCED BY EXTRACELLULAR PRODUCTS OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

GENG Yi^{1,2}, WANG Kai-Yu^{1,2}, XIAO Dan³, CHEN De-Fang¹ and HUANG Jin-Lu¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014, China; 3. Tong Wei Limited Company, Chengdu 610041, China)

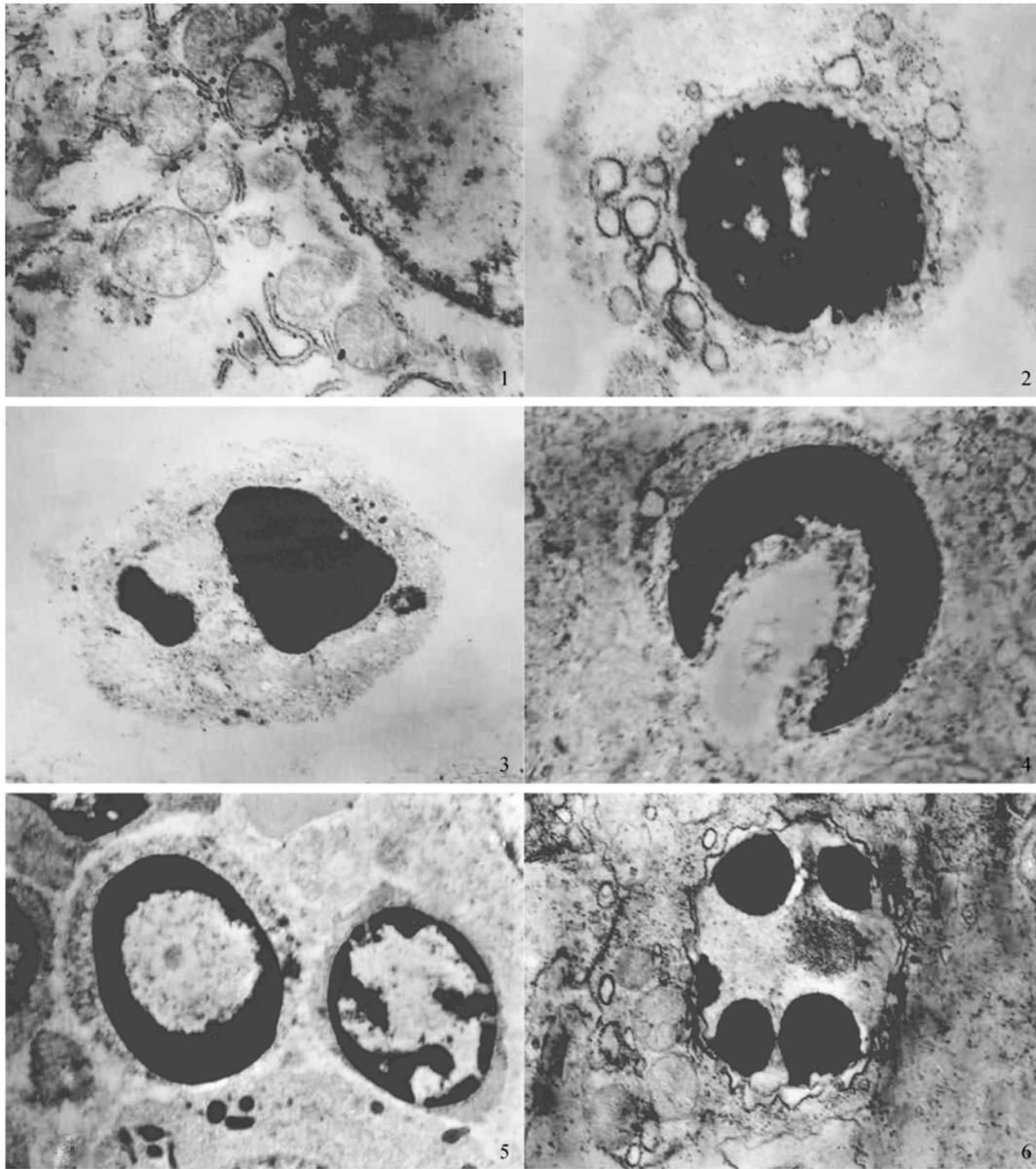
Abstract: *Stenotrophomonas maltophilia* is an aerobic, nonfermentative, gram-negative bacterium ubiquitous in nature. It is a causative agent of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *S. maltophilia* infection is capable of causing high morbidities and mortalities in channel catfish, it is considered to be the most significant factor affecting commercial catfish aquaculture. A strain of *S. maltophilia*, isolated from the diseased channel catfish in a fish farm in Sichuan Province, was identified by morphology, physiological and biochemical characteristics analysis, and 16srRNA gene sequence detection. In order to understand *S. maltophilia* pathogenetic mechanism, the pathology of channel catfish induced by extracellular products (ECPs) of *S. maltophilia* was studied. The ECPs of *S. maltophilia* was extracted with ammonium sulfate precipitation, and challenged with channel catfish by the intraperitoneal (i. p.) route. The test was conducted for 7d, with doses of 1.42mg/kg, 1.85 mg/kg, 2.40 mg/kg, 3.13 mg/kg, 4.07 mg/kg and 5.29 mg/kg body weight, respectively. The mortality was respectively 0.00%, 10.00%, 20.00%, 40.00%, 70.00% and 100.00%. The results showed that the ECPs of *S. maltophilia* had quite strong virulence to channel catfish, and the LD₅₀ to channel catfish was about 3.21mg-protein/kg body weight. Challenged fish showed neurosis, congestion and hemorrhage in the abdomen and lower jaw, distension of abdomen, yellowish or flooded fluid in the peritoneal cavity, congestion and hemorrhage in mucosa of gastrointestinal tract, intussusception in rectum, swelling in liver, kidney and spleen. Histopathological examination showed edema, hemorrhage, degeneration, necrosis and the inflammatory response in many organs; especially, serious lesions in brain, kidney, liver, gastrointestinal tract, spleen and skeletal muscle. The kidney showed edema, degeneration and necrosis in renal tubular epithelia, and with macrophages and neutrophil infiltration in the interstitial substance. Edema, vacuolar degeneration and necrosis were seen in liver cells. Epithelia of the gastrointestinal tract underwent degeneration and necrosis, while the lamina propria and tunica submucosa showed edema and infiltration with lymphocytes, macrophages and neutrophil. Congestion, hemorrhage and reduction of the lymphocytes were observed in spleen. Degeneration, necrosis and inflammatory cells infiltration appeared in skeletal muscles. Edema and neuronal shrinkage appeared in brain. Concentrated nucleolus, swelling mitochondria and dilated endoplasmic reticulum were ultrastructurally observed in visceral organ (liver, spleen and kidney) cells. The lymphocytes of spleen and kidney underwent chromatin condensation and margination, forming the apoptotic bodies. These results indicated that the ECPs was an important pathogenic factor of *S. maltophilia*, which could induce apoptosis in the lymphocytes, multiple organ damage and death.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*; Extracellular Products (ECPs); Pathogenicity; Pathology; Channel catfish



图版 Plate

1. 鳃小片淤血, 上皮肿胀, 坏死, 大量炎症细胞浸润(H.E ×400);
 2. 肝水肿与空泡变性(H.E ×400);
 3. 肾小管上皮变性、坏死, 间质大量炎症细胞浸润(H.E ×400);
 4. 脾白髓淤血、出血, 淋巴细胞明显减少(H.E ×400);
 5. 骨骼肌坏死, 溶解, 大量炎症细胞浸润(H.E ×400);
 6. 脑水肿, 神经细胞固缩, 出现“噬神经原现象”(H.E ×400)
1. Swelling and necrosis occurred in gill lamella epithelia, congestion and inflammatory cell infiltration appeared in gill lamella (H.E ×400);
2. Edema and vacuolar degeneration occurred in liver (H.E ×400);
3. Degeneration and necrosis appeared in renal tubular epithelia, inflammatory cells infiltration occurred in kidney interstitial substance (H.E ×400);
4. Congestion, hemorrhage and reduction of the lymphocytes appeared in splenic white pulps (H.E ×400);
5. Necrosis and inflammatory cells infiltration occurred in skeletal muscle (H.E ×400);
6. Edema and neuronal shrinkage appeared in brain (H.E ×400)



图版 Plate

1. 肝细胞线粒体肿胀, 嵴断裂、溶解(TME $\times 17000$); 2. 脾内淋巴细胞核膜不规则, 染色质浓缩, 内质网扩张(TME $\times 12000$); 3. 脾内淋巴细胞核浓缩、裂解 (TME $\times 12000$); 4. 肾间淋巴细胞核染色质浓缩边移, 呈半月状 (TME $\times 15000$); 5. 肾间淋巴细胞核染色质浓缩边移, 呈环状 (TME $\times 12000$); 6. 肾间淋巴细胞核染色质浓缩, 裂解, 边移于核膜下 (TME $\times 18000$)

1. Swelling, disintegration and lyses of the cristae occurred in liver cell mitochondria (TME $\times 17000$); 2. The chromatin condensation and the ER distension appeared in lymphocyte of spleen (TME $\times 12000$); 3. The nucleus of lymphocyte underwent concentration and schizolysis in spleen (TME $\times 12000$); 4. The chromatin condensation and margination appeared in lymphocyte of kidney interstitial substance, forming a half month shape (TME $\times 15000$); 5. The chromatin of lymphocyte underwent condensation and margination in of kidney interstitial substance, forming a crico-shape (TME $\times 12000$); 6. The chromatin condensation, schizolysis and margination occurred in lymphocyte of kidney interstitial substance (TME $\times 18000$)