

# 海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)胞外产物对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的致病性\*

陈德芳<sup>1</sup> 汪开毓<sup>2,3</sup> 王均<sup>2</sup> 耿毅<sup>2,3</sup>  
黄凌远<sup>2</sup> 胡迪<sup>2</sup> 景简飞<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学动物科技学院 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物医学院 雅安 625014;  
3. 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)

**提要** 采用硫酸铵盐析法提取海豚链球菌 DGX07 菌株的胞外产物(ECPs), 通过平板扩散法对其主要酶成分进行初步研究, 对酶热稳定和溶血活性进行测定; 并对腹腔注射接种海豚链球菌(*S. iniae*)胞外产物的斑点叉尾鲷进行组织病理学观察。结果显示, 菌株胞外产物具有蛋白酶、DNA 酶和溶血活性; DNA 酶表现出一定的热稳定性, 而蛋白酶和溶血活性在 80℃或 100℃作用 10min 均丧失; 胞外产物对人(O 型)、兔、斑点叉尾鲷、草鱼、鲤鱼、鲫鱼、黄颡鱼和长吻鲶的红细胞均表现出不同程度的溶血活性; 人工感染试验显示, 0.222mg/ml 的 *S. iniae* ECPs 对斑点叉尾鲷具有明显的致病性, 死亡率达 100%; 临床特点表现为: 游动缓慢、体表褪色、鳍条边缘褪色, 内脏器官肿胀并伴有腹水; 组织学病变主要表现为全身性多组织、器官炎性水肿, 伴有组织内出血, 实质细胞变性和坏死, 尤以肝胰脏、脾脏、肾脏、肠道和心脏的损伤最为严重。试验结果表明海豚链球菌胞外产物含有多种毒力因子, 与该菌的致病性密切相关。

**关键词** 斑点叉尾鲷; 海豚链球菌; 胞外产物; 酶活性; 致病性

**中图分类号** S941.4

海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)是一种重要的水产动物致病菌, 可以感染罗非鱼、杂交条纹鲈、虹鳟、斑点叉尾鲷等 30 多种淡、海水鱼类并引起暴发性死亡(Agnew *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011b); 同时, 海豚链球菌被认为是一种人鱼共患病原菌, 能引起人类蜂窝织炎、关节炎、脑膜炎和菌血症的发生, 目前全球至少有 25 例人类海豚链球菌病的报道(Facklam *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2003)。关于海豚链球菌致病因子的研究已有一些报道, 如胞外产物中溶血素 S (Fuller *et al.*, 2002)、表面毒力因子 SiM 蛋白(Locke *et al.*, 2008)、荚膜多糖(Locke *et al.*, 2007)、C5a 肽酶和 $\alpha$ -烯醇酶等。胞外产物(Extracellular products, ECPs)是指细菌在生长与繁殖过程中不断向环境中释放出来的代谢产物, 主要是酶和毒素等的混合物; 已有研究

显示嗜水气单胞菌、河流弧菌、副溶血弧菌、嗜麦芽寡养单胞菌和迟缓爱德华氏菌等多种水产动物病原菌的胞外产物在细菌感染致病中发挥着重要作用(储卫华等, 2000; 李太武等, 1999; 徐海圣等, 2002; 陈德芳等, 2008; 葛艳等, 2000)。目前对海豚链球菌胞外产物的研究主要集中在免疫原性上, 如 Shin 等(2007)将海豚链球菌 ECPs 作为疫苗研究, 结果显示其比全菌苗具有更强的交叉保护性; 但对海豚链球菌胞外产物的组成因子及其功能还不甚清晰。研究海豚链球菌胞外产物的生物学特性与病理损伤是阐明细菌致病机理的重要基础, 本试验通过对海豚链球菌 DGX07 菌株的胞外产物的成分进行分析, 对胞外产物热稳定和溶血活性进行检测, 并对其致病性进行研究, 旨在明确菌株胞外产物中的主要组成因子及其相关的

\* 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目, IRT0848 号。陈德芳, 讲师, E-mail: defangchen@yahoo.com

通讯作者: 汪开毓, 教授, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

收稿日期: 2012-06-22, 收修改稿日期: 2012-08-18

生物学特性,为阐明细菌的致病机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株及动物

海豚链球菌 DGXO7 菌株分离自广西某网箱养殖的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*),经细菌形态学、生理生化及 16S rRNA 基因测序鉴定为海豚链球菌(Chen *et al.*, 2011b)。健康斑点叉尾鲷(200g±5g),购自四川眉山市某养殖场,暂养 1 周,观察健康无症状后备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

脑心浸液培养基(Brain Heart Infusion, BHI, 阿拉丁有限公司),考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京生物建成公司),TGL-16 高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司),Nikon ECLIPSE 50 型显微镜(Nikon 公司)。

### 1.3 胞外产物的制备

无菌条件下接种海豚链球菌于 BHI 培养基中,37℃,120r/min,振荡培养 24h。将海豚链球菌培养物收集至离心管,4℃、8000r/min 离心 30min 后,收集上清液。上清液经 0.22μm 微孔过滤除去菌体后用 75%饱和硫酸铵沉淀,4℃冰箱过夜。次日,4℃、8000r/min 离心 30min 弃上清,用 0.02mol/L Tris-HCl (pH=7.5)缓冲液重悬,将液体收集入透析袋中透析过夜,用分子量为 10000 的聚乙二醇进行覆盖浓缩,即得胞外产物。采用考马斯亮兰法(Bradford)测定胞外产物蛋白质含量后,将其分装保存于-20℃备用。

### 1.4 胞外产物酶活性分析

采用平板扩散法对胞外产物酶活性进行分析(储卫华等, 2000; 陈德芳等, 2008; Chen *et al.*, 1997)。将胞外产物分别接种以用琼脂补底的鉴别培养基(表 1)平板上,37℃下静置孵育 48h 后观察结果。

### 1.5 胞外产物热稳定性检测

参考 Chen 等(1997)方法,将海豚链球菌胞外产物分别置于 80℃和 100℃下作用 10min 后,将其加入鉴别培养基中,检测其胞外产物的稳定性。

### 1.6 胞外产物的溶血价和溶血谱检测

参考耿毅等(2010)方法,在每个无菌离心管中加 100μl 无菌生理盐水,对胞外产物进行倍比稀释后,分别加入人 O 型血、兔、鲫鱼、斑点叉尾鲷、长吻鮠等 8 种不同来源的 1%红细胞悬液 100μl 于每管中,37℃孵育 1h,4℃过夜,以溶解 50%的红细胞的最高稀释度为溶血价,根据溶血结果绘制海豚链球菌胞外产物溶血谱。

### 1.7 胞外产物对斑点叉尾鲷病理损伤观察

将健康斑点叉尾鲷 24 尾,随机分成 4 组,每组 6 尾,分别编号为 I、II、III 和空白对照组。I、II、III 组分别每尾腹腔注射接种浓度为 0.074、0.148 和 0.222mg/ml 的胞外产物 0.5ml;对照组注射相同量的缓冲液。接种后观察和记录发病症状和死亡情况,试验连续观察 7d,并采集病鱼的心、肝、脾、肾、脑、胃、肠等组织,固定于 4%的中性福尔马林中,石蜡切片,H·E 染色,光镜观察组织病理学损伤情况,选取典型病变进行显微照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 胞外产物的酶活性与热稳定性

海豚链球菌胞外产物在蛋白酶平板上形成透明水解圈(图 1a),在 DNA 酶平板上形成透明溶解环,且周围出现深染晕圈(图 1b),在脱纤维兔血平板上形成透明无色的溶解圈(图 1c),而其它检测平板未见眼观变化,表明海豚链球菌胞外产物具有蛋白酶、DNA 酶和溶血活性,不具有淀粉酶、脂酶、明胶酶、卵磷脂酶和脲酶活性;经 80℃或 100℃10min 处理后,蛋

表 1 海豚链球菌胞外产物酶成分测定及培养基类型  
Tab.1 Different mediums and enzymes analysis of *S. iniae* ECPs

鉴定项目	平板成分	结果判定
蛋白酶	80g/L 脱脂牛奶	加入 10%三氯乙酸溶液,加样孔周围有透明水解圈为阳性
脂肪酶	10ml/L 吐温 80	直接观察,加样孔周围有白色不透明晕圈为阳性
淀粉酶	2g/L 淀粉	加入卢哥氏碘液,加样孔周围有透明圈为阳性
卵磷脂酶	25ml/L 蛋黄	直接观察,加样孔周围有不透明的乳白色水解圈为阳性
脲酶	20ml/L 尿素	直接观察,加样孔周围有淡红色圈为阳性
明胶酶	4ml/L 明胶	滴加 HgCl <sub>2</sub> 溶液,加样孔周围有透明水解圈为阳性
DNA 酶	2g/L 脱氧核糖核酸	加入 1mol/L HCl,加样孔周围有透明圈为阳性
溶血活性	80ml/L 脱纤维兔血	直接观察,加样孔周围有透明无色或半透明草绿色溶解圈为阳性

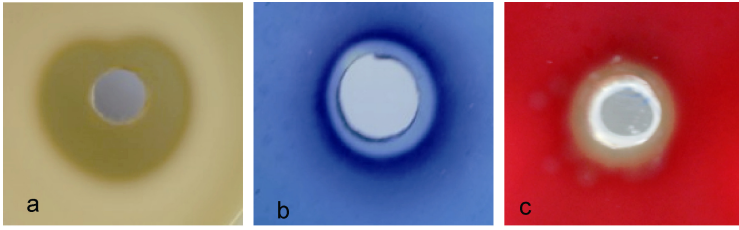


图 1 海豚链球菌胞外产物酶活性阳性结果

Fig.1 Positive results of enzymatic activity of *S. iniae* ECPs  
a. 蛋白酶; b. DNA 酶; c. 溶血活性

白酶和溶血活性丧失; 而 DNA 酶活性经 80℃ 处理后仍具有活性, 100℃ 处理后活性丧失。

## 2.2 胞外产物的溶血价与溶血谱

通过检测胞外产物对多种动物红细胞的溶血价, 结果见表 2。表 2 结果表明, 海豚链球菌胞外产物对人 O 型血和斑点叉尾鲷红细胞溶解能力最强, 对草鱼、鲫鱼、鲤鱼和家兔的红细胞溶解能力次之, 而对长吻鲈和黄颡鱼的红细胞溶解能力较弱。

表 2 海豚链球菌胞外产物溶血性和溶血价

Tab.2 Hemolytic ability and hemolytic titer of *S. iniae* ECPs

红细胞	溶血价(log <sub>2</sub> )	红细胞	溶血价(log <sub>2</sub> )
人 O 型血	8	黄颡鱼	2
家兔	4	斑点叉尾鲷	8
鲫鱼	4	长吻鲈	3
鲤鱼	4	草鱼	5

## 2.3 胞外产物感染斑点叉尾鲷病理损伤

### 2.3.1 症状与解剖变化

斑点叉尾鲷腹腔注射 *S. iniae* ECPs 后 5h, 高浓度组(III 组)试验鱼表现为游动缓慢或静伏于缸底、呼吸频率加快, 随着病程的发展试验鱼鳃盖扇动微弱、鳍条边缘逐渐褪色; 接种感染 24h 后试验鱼开始死亡, 试验结束时 I、II、III 组和对照组死亡率分别为 50% (3/6)、66.7% (4/6)、100% (6/6) 和 0% (0/6)。剖检发病鱼可见淡黄色腹水, 胃壁充血变薄并可见积液; 肠壁变薄, 肠道内充有白色或黄色的粘液; 肝胰脏肿胀, 被膜紧张具有光泽; 脾脏肿大; 肾脏肿胀、出血; 脑膜充血。

### 2.3.2 病理组织学观察

**鳃:** 鳃小片增粗, 毛细血管扩张淤血, 呼吸上皮肿胀扩张, 与毛细血管浮离, 鳃小片基部大量淋巴细胞、单核细胞等炎症细胞浸润(图 2a)。

**肝胰脏:** 肝组织炎性水肿, 被膜下静脉和肝血窦严重淤血, 内侧肝组织水肿, 肝细胞离散; 低浓度组(I 组)感染肝组织严重水肿, 狄氏间隙明显增宽; 肝

血窦受压缩小、崩解, 红细胞和吞噬细胞弥散在肝组织间隙; 肝细胞肿胀, 胞浆内出现大小不等蛋白颗粒或空泡, 严重的肝细胞溶解坏死(图 2b)。肝脏内胰腺组织中血管充血, 血管内外均有大量炎性细胞出现, 且周围胰腺腺细胞表现为凝固性坏死(图 2c)。

**肾脏:** 肾小球毛细血管充血、肿大, 肾小囊被肿大的肾小球挤压、封闭; 肾小管上皮细胞颗粒变性、坏死、溶解, 管腔结构严重崩解; 肾间小血管广泛淤血、出血, 血管内外出现大量炎性细胞, 肾间质水肿, 细胞离散, 大量巨噬细胞和中性细胞浸润(图 2d)。

**脾脏:** 脾脏严重淤血、出血, 红白髓界限不清, 白髓淋巴细胞数量显著减少, 脾实质内大量巨噬细胞和中性白细胞浸润(图 2e)。

**胃:** 粘膜上皮变性、坏死, 脱落于管腔内, 固有膜组织炎性水肿, 血管扩张充血, 胃腺上皮细胞肿胀, 坏死, 脱落, 肌层水肿, 炎性细胞浸润, 浆膜疏松、炎性水肿, 血管充血、出血, 炎性细胞浸润(图 2f)。高浓度组(III 组)粘膜上皮坏死、脱落至管腔, 固有膜裸露。

**肠:** 肠粘膜上皮大量脱落于肠腔内, 固有膜、粘膜下层和肌层疏松水肿, 伴有炎性细胞浸润, 浆膜组织疏松水肿, 细胞离散, 血管淤血。高浓度组(III 组)粘膜上皮完全脱落, 固有膜结构崩解(图 2g)。

**心:** 心外膜水肿疏松, 血管扩张充血, 心肌纤维肿胀、变性, 肌间水肿、间隙增宽, 有炎性细胞浸润(图 2h)。

**脑:** 脑膜毛细血管扩张充血(图 2i); 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。

## 3 讨论

### 3.1 海豚链球菌 ECPs 对斑点叉尾鲷损伤机理探讨

水生动物病原菌分泌的胞外蛋白酶是导致水生动物致病的主要因子之一, 一方面能分解膜蛋白等蛋白成分, 导致动物机体损伤, 如鱼源嗜麦芽寡养单胞菌的胞外蛋白酶为金属蛋白酶, 其对斑点叉尾鲷 LD<sub>50</sub> 为 3.49μg/g, 导致鱼体重要功能器官变性、坏死, 实质细胞肿大等病理变化, 引起肝、肾、脾等功能降低或丧失, 从而引起斑点叉尾鲷死亡(黄小丽等, 2008, 2011)。另一方面, 胞外蛋白酶具有较好的免疫原性, 如哈维弧菌的胞外蛋白酶为半胱氨酸蛋白酶, 分子量为 55kDa, 是主要致病因子之一, 具有良好的免疫

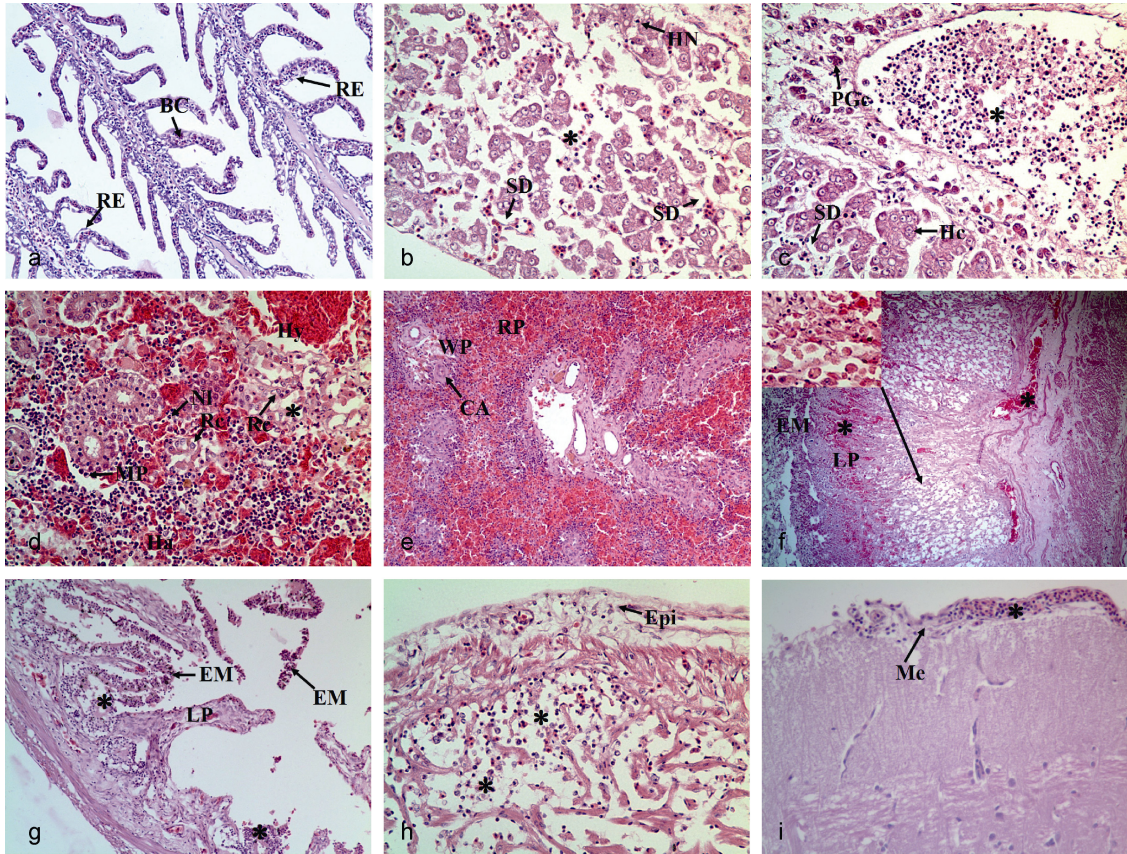


图 2 ECPs 感染斑点叉尾鲷组织病理变化

Fig. 2 Histopathological changes of channel catfish by ECPs

a. 鳃小片增粗, 毛细血管(blood capillary, BC)扩张淤血, 呼吸上皮(respiratory epithelium, RE)肿胀分离; ×200, I 组; b. 肝组织炎性水肿, 狄氏间隙(space Disse, SD)增宽, 肝细胞溶解、坏死(hepatocyte necrosis, HN), 肝细胞索结构崩解, 红细胞和吞噬细胞弥散在肝组织内(\*); ×400, I 组; c. 胰腺腺细胞(pancreas glandular cell, PGc)凝固坏死, 胰腺内血管出现大量炎性细胞(\*). 肝细胞(hepatocyte, Hc), 狄氏间隙(space Disse, SD); ×400, I 组; d. 肾间质充血(hyperaemia, Hy)、出血(haemorrhage, Ha), 大量巨噬细胞(macrophage, MP)和中性白细胞(neutrophilic leucocyte, NI)浸润; 肾小管上皮细胞(Renal tubular epithelial cells, Rc)变性、坏死, 管腔结构崩解(\*); ×400, III 组; e. 脾广泛性严重出血. 中央动脉(central artery, CA), 白髓(white pulp, WP), 红髓(red pulp, RP); ×400, III 组; f. 胃粘膜上皮(epithelium mucosae, EM)坏死脱落于管腔, 固有膜(lamina propria, LP)血管充血(\*), 胃腺上皮细胞肿胀、坏死(左上图); ×100, III 组; g. 肠粘膜上皮(epithelium mucosae, EM)脱落到肠腔中, 肠固有膜(lamina propria, LP)疏松水肿、血管淤血, 伴有炎性细胞浸润(\*); ×100, III 组; h. 心外膜(epicardium, Epi)毛细血管扩张充血, 心肌间炎性细胞浸润(\*); ×400, I 组; i. 脑膜(Meninges, Me)疏松、增厚, 血管扩张充血(\*), 伴有炎性细胞浸润; ×400, II 组

原性; 纯化的ΔPro 融合蛋白对大黄鱼免疫保护率可达 75% (郝贵杰等, 2010; 潘晓艺等, 2010)。而细菌产生的 DNA 酶可使长链 DNA 水解成寡核苷酸链, 如链球菌 DNA 酶(链道酶)能分解粘稠脓液中具有高度粘性的 DNA, 使脓汁稀薄, 利于病菌扩散。本研究表明, 海豚链球菌 DGX07 株胞外产物能分泌蛋白酶和 DNA 酶, 具有溶血活性和斑点叉尾鲷致病性, 且 DNA 酶经 80℃ 处理 10min 表现出一定的耐热性; 这些酶活性有利于链球菌的繁殖和扩散, 并能直接参与组织损伤。

溶血素是包括链球菌在内的多数致病菌的毒力

因子。海豚链球菌溶血素具有溶解红细胞和损伤中性白细胞、淋巴细胞和多种宿主细胞的功能(Fuller *et al*, 2002; Nizet *et al*, 2000)。本研究表明海豚链球菌 DGX07 株胞外产物能溶解包括斑点叉尾鲷、草鱼、鲤鱼、鲫鱼、长吻鲩和黄颡鱼在类的多种常见养殖鱼类的红细胞, 且感染斑点叉尾鲷后可见肝胰脏和脾脏内中性白细胞和淋巴细胞的损伤及减少的现象。自 1995 年加拿大首次报道人感染海豚链球菌以来, 海豚链球菌感染人类主要引起蜂窝织炎和关节炎, 严重的诱发脑膜炎和菌血症, 是一种人鱼共患的病原菌(Facklam *et al*, 2005; Lau *et al*, 2003)。Fuller 等(2002)

通过小鼠皮下感染模型证实海豚链球菌溶血素 S 与局部组织坏死性溃疡形成有关。本实验菌株对人 O 型血和家兔红细胞具有较强的溶血活性, 其对高等动物的局部组织损伤危害情况还有待进一步评估。

### 3.2 海豚链球菌 ECPs 对斑点叉尾鲷损伤的靶器官与损伤特点

海豚链球菌感染斑点叉尾鲷不仅引起病鱼体表的点状出血, 也可造成肝脏、脾脏、肾脏等多组织器官出现广泛性充血、出血, 导致病鱼表现为全身性急性败血症(Chen *et al*, 2011a)。本实验组织病理学观察发现海豚链球菌胞外产物对斑点叉尾鲷主要的病理损伤是多组织器官炎性水肿、细胞变性和坏死, 以肝脏、脾脏、肾脏、肠道和心脏的病变尤为明显, 是胞外产物损伤的靶器官。靶器官内血管淤血/充血, 周围组织炎性水肿, 细胞离散, 伴有大量的炎性细胞浸润, 如肝水肿, 心脏炎性细胞浸润; 进一步的血窦/血管出血如脾脏红髓区域和肾间质区域, 由于严重的血管反应, 血液供氧不足, 导致局部组织细胞出现坏死如肝细胞、胰腺腺细胞、肾小管上皮细胞。肝脏是鱼类最大的消化器官, 它能制造胆汁, 促进脂肪分解, 合成肝糖原和蛋白质, 并能吸收分解有毒物质。肾脏是鱼类的排泄器官, 调节机体内环境的稳定性。由于肝脏和肾脏的损伤, 导致鱼体内水、钠代谢平衡失调, 临床上可见腹部膨大、腹水表现。但因为胞外产物作用的持久性和毒性有限, 其临床表现的腹水症状不如全菌感染明显。胃肠道是鱼类的消化吸收的重要场所。海豚链球菌胞外产物感染斑点叉尾鲷引起胃肠粘膜脱落, 固有膜裸露, 固有膜结构疏松, 这是否与胞外产物中某种蛋白酶对固有层内成纤维细胞分泌的功能蛋白降解有关, 还是与溶解连接组织和细胞外基质的酶有关还有待进一步研究。脾脏是鱼类重要的免疫器官, 脾脏广泛性出血为主, 导致鱼体自身抵抗力下降。脑和鳃以血管充血为主。

胞外产物感染斑点叉尾鲷与全菌感染症状相似, 但其临床表现的体表出血症状以及脑和鳃的损伤状况较全菌感染轻微。此外, 胞外产物组织学变化集中表现为血管反应, 而炎性细胞浸润和实质细胞变性、坏死较全菌感染轻微。分析认为, 在全菌感染中, 海豚链球菌侵入血液循环, 并在血中生长繁殖, 持续性产生胞外产物而引起严重的全身性感染; 而胞外产物主要是细菌生长代谢过程中分泌到体外发生作用的酶和毒素等物质, 胞外产物中的酶和毒素物质进入组织后很快发挥作用而消耗殆尽, 所造成的组织

损伤程度有限。综上所述, 海豚链球菌胞外产物可引起斑点叉尾鲷多组织器官内血管充血扩张, 周围组织炎性水肿、细胞离散, 伴有炎性细胞浸润, 严重的组织出血, 实质细胞变性、坏死; 组织结构损伤破坏了正常生命功能的实施, 特别是全身心血管系统的强烈炎症反应, 导致机体供能供氧障碍, 鱼体衰竭死亡。

### 参 考 文 献

- 李太武, 苏秀榕, 丁明进, 1999. 皱纹盘鲍脓疱病菌——河流弧菌 II 胞外产物的研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 22(3): 231—234
- 陈德芳, 汪开毓, 耿毅等, 2008. 斑点叉尾鲷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, 28(1): 99—101
- 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺等, 2010. 哈维氏弧菌 GYC1108-1 胞外产物蛋白酶的制备及免疫原性研究. 渔业科学进展, 31(3): 107—112
- 耿毅, 汪开毓, 陈德芳等, 2010. 斑点叉尾鲷嗜麦芽寡养单胞菌溶血素分离、纯化与特性研究. 淡水渔业, 40(1): 61—65
- 徐海圣, 舒妙安, 占秀安等, 2002. 养殖河蟹弧菌病病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性. 水产学报, 26(4): 357—362
- 黄小丽, 苏秀梅, 汪开毓等, 2011. 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶对斑点叉尾鲷的组织病理学影响. 中国兽医科学, 41(5): 453—458
- 黄小丽, 汪开毓, 耿毅, 2008. 斑点叉尾鲷嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的特性研究. 水生生物学报, 32(6): 845—849
- 葛艳, 陈怀青, 陆承平, 2000. 迟缓爱德华氏菌胞外产物的细胞毒性和动物致病性. 中国兽医学报, 20(1): 34—37
- 储卫华, 陆承平, 2000. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性. 南京农业大学报, 23(2): 80—84
- 潘晓艺, 沈锦玉, 余旭平等, 2010. 哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因的克隆表达及免疫原性. 水生生物学报, 34(1): 152—156
- Agnew W, Barnes A C, 2009. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance infection in Nile tilapia. Vet Microbiol, 136: 180—183
- Chen D F, Wang K Y, Geng Y *et al*, 2011a. Pathological changes in cultured channel catfish *Ictalurus punctatus* spontaneously infected with *Streptococcus iniae*. Dis Aquat Organ, 95: 203—208
- Chen D F, Wang K Y, Geng Y *et al*, 2011b. *Streptococcus iniae*, isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China. Isr J Aquacult-Bamid, 63(3): 105—115
- Chen S-C, Adams A, Richards R H, 1997. Extracellular products from *Mycobacterium* spp. in fish. J Fish Dis, 20: 19—25
- Facklam R, Elliott J, Shewmaker L *et al*, 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae*

- isolated from humans. *J Clin Microbiol*, 43: 933—937
- Fuller J D, Camus A, Duncan C *et al*, 2002. Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infect Immun*, 70: 5730—5739
- Lau S K P, Woo P C Y, Tse H *et al*, 2003. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside. North America. *J Clin Microbiol*, 41: 1004—1009
- Locke J B, Aziz R, Vicknair M R *et al*, 2008. *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PLoS One*, 3(7): 1—13
- Locke J B, Colvin K M, Vicknair M R *et al*, 2007. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish. *J Bacteriol*, 189: 1279—1287
- Nizet V, Beall B, Bast D *et al*, 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A *Streptococcus*. *Infect Immun*, 68: 4245—4254
- Shin Gee-Wook, Palaksha K J, Kim Young-Rim *et al*, 2007. Application of immuno-proteomics in developing a *Streptococcus iniae* vaccine for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Chromatogr B*, 849: 315—322

## PATHOGENICITY ON CHANNEL CATFISH *ICTALURUS PUNCTATUS* BY EXTRACELLULAR PRODUCTS OF *STREPTOCOCCUS INIAE*

CHEN De-Fang<sup>1</sup>, WANG Kai-Yu<sup>2,3</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, GENG Yi<sup>2,3</sup>,  
HUANG Ling-Yuan<sup>2</sup>, HU Di<sup>2</sup>, JING Jian-Fei<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014)

**Abstract** Extracellular products (ECPs) were extracted from strain DGX07 of *Streptococcus iniae* by ammonium sulfate precipitation method. The main enzyme ingredients were preliminary assayed by plate diffusion method. Enzyme thermal stability and hemolytic activity were performed. To observe the histopathologic changes, ECPs was challenged with channel catfish *Ictalurus punctatus* by intraperitoneal (i.p.) route. The experiment results indicate that ECPs were found to exhibit hemolytic activity and certain properties of protease and DNase. The protease and hemolytic activity were lost at 80 or 100 in 10min, while the DNase showed certain thermal stability. ECPs showed discrepantly hemolytic activities when acted on the red cells of human (type O), rabbit, channel catfish, grass carp, carp, crucian carp, yellow catfish, and longsnout catfish. ECPs were pathogenic to channel catfish at a concentration of 0.222mg/ml, and the mortality reached to 100% when injected under this dose. Clinical symptoms of challenged fish included slow-swimming, body surface and fin edge fading, and swelling visceral organs with ascites. Histological lesions included inflammatory edema of systemic multiple tissue and organ, organization internal bleeding, degeneration and necrosis of parenchyma cells, damage especially in the liver, spleen, kidney, intestine and heart. The results highlight that *S. iniae* extracellular products contained a variety of virulence factors, which were closely related to the pathogenicity of the bacteria.

**Key words** channel catfish *Ictalurus punctatus*; *Streptococcus iniae*; extracellular products; enzyme activity; pathogenicity