

嗜水气单胞菌在欧洲鳗鲡体内的 免疫组织化学定位与病理观察

郭松林 冯建军 熊 静 关瑞章

集美大学水产学院/鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021

摘要 采用从鳗鲡分离的嗜水气单胞菌进行人工感染试验,以探讨感染后不同时期嗜水气单胞菌在欧洲鳗鲡肝脏、肾脏和肠道内的定位和由此引起的组织病理学变化。将细菌分2次对鳗鲡进行肌肉注射。第1次采用每克体质量 $10^3 \sim 10^7$ cfu的不同剂量注射以确定该菌的半数致死量,结果表明其半数致死量为 5×10^4 cfu/g。第2次以每尾鱼 1×10^7 cfu的剂量注射欧洲鳗鲡,此后分别在注射后6、24、48 h采集鳗鲡的肝脏、肾脏、肠道进行组织病理学和免疫组织化学定位研究。结果表明:3个时期的临床症状和病理变化存在一定的差别,鳗鲡早期无明显病理变化,而后期主要表现为败血症症状;鳗鲡肾脏组织的病理变化较其他脏器明显,主要表现为肾小管上皮细胞肿胀和肾小球坏死脱落;鳗鲡肝脏则主要表现为严重充血,肠道偶见肠粘膜脱落。免疫组织化学定位结果表明,感染细菌主要分布在鳗鲡肾脏内,肝脏和肠道也有感染细菌分布。

关键词 欧洲鳗鲡;嗜水气单胞菌;人工感染;病理变化;免疫组织化学定位

中图分类号 Q 959.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0494-06

嗜水气单胞菌为鱼类常见致病菌,也是鳗鲡的重要致病菌,在春夏交替时节能引起鳗鲡败血症、烂尾病等传染性很强的疾病,日本鳗和欧洲鳗均可发生,是引发福建省鳗鲡大面积细菌性败血症最主要的病原菌,每年都给鳗鲡养殖业带来较大的经济损失^[1]。当鳗鲡生长环境温度过高时容易感染该病^[2]。关于该菌致病因子和致病性的报道较多^[3-4],在对鳗鲡的致病性方面,可引起日本幼鳗败血腹水病^[5]、欧洲鳗狂游症等^[6]。近年来,有些学者开始对鱼类致病原菌的组织病理和感染途径进行研究^[7-9],亦见有关免疫增强剂对嗜水气单胞菌的抗感染作用研究^[10],但未见该菌对鳗鲡致病后其病原在鱼体内的免疫组织化学定位和病理学相关研究的报道。2002—2008年间,笔者所在课题组从几批以败血症为主要症状的发病欧洲鳗鲡肝脏、肾脏、腹水均分离到1株毒性很强的嗜水气单胞菌,人工感染试验表明,鳗鲡肌肉注射该菌每克体质量 10^6 cfu的剂量时即可导致其100%的死亡率。本研究通过健康鳗鲡人工感染该菌的肝脏分离株后,取对照组(生理盐水注射)和人工感染组鳗鲡的肝脏、肾脏和肠道进行病

理学和免疫组织化学定位研究,找出其所致病鳗的组织病理变化以及其在这些脏器中的定位情况,从而为该细菌的鉴定和该菌引起疾病的诊断、治疗和流行病学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试鳗鲡

80尾欧洲鳗鲡购自福建省福清市一养鳗场,其中60尾平均体质量为5 g,另20尾平均体质量为15 g。试验前将欧洲鳗鲡置于试验室水簇箱内,水簇箱规格100 cm×80 cm×60 cm,水深40 cm。养殖用水为曝气后的自来水,室温养殖,水温在23~26℃之间,试验期间水簇箱保持充气,每天投饵2次,早晚各1次;换水2次,换水时间为投饵后3 h,日换水量为40%。鳗鲡暂养1周后进行注射感染。

1.2 细菌和血清

用于试验的细菌分离于发病欧洲鳗鲡的肝脏,生化鉴定(Biolog, Gen III)为嗜水气单胞菌,针对该菌的兔抗血清由笔者所在研究室制备。

1.3 细菌半数致死量的测定

取60尾体质量为5 g左右的鳗鲡,平均分为6

收稿日期: 2010-12-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001136); 国家公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-043)

郭松林, 博士, 副教授, 研究方向: 鱼类病害与免疫防治, E-mail: gsl@jmu.edu.cn

通讯作者: 关瑞章, 博士, 教授, 研究方向: 渔业水体生态与病害, E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

组,每组鳗鲡为 10 尾,每组设 2 个平行对照,每个平行对照有鳗鲡 5 尾。其中 1 组为生理盐水注射对照组,5 组为不同浓度细菌注射组。嗜水气单胞菌于 28 ℃肉汤培养 24 h 后,用灭菌生理盐水配成 1.0×10^9 cfu/mL 菌液,经 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4 倍稀释后分别注射 5 组鳗鲡。用一次性灭菌注射器于鳗鲡背部肌肉注射,对照组注射生理盐水,试验组注射嗜水气单胞菌液,剂量均为每尾鳗鲡 0.05 mL。每个试验浓度 1 个水族箱,每箱内放鳗鲡 5 尾。每只水族箱配有充气设备,防止试验鱼缺氧死亡,试验过程中,定时投饵、排污、换水,以消除人为管理因素引起试验鱼死亡。水温 23~26 ℃,期间观察并记录 10 d 内试验鳗鲡的发病及死亡情况。计算细菌对鳗鲡的半数致死量(LD₅₀)。计算方法参考 Reed-Muench 法^[11]。计算公式如下:lg LD₅₀=algb+c;a 为距离比例,a=(高于 50%的死亡率-50%)/(高于 50%的死亡率-低于 50%的死亡率);b 为稀释系数,本试验中 $b=10^{-1}$;c=高于 50%死亡率的最小稀释度的对数。

1.4 人工感染和脏器材料的采集

将 20 尾平均体质量为 15 g 的鳗鲡平均分为对照组和试验组,每组 10 尾。细菌于 28 ℃肉汤培养 24 h 后,用灭菌生理盐水配成 1.0×10^8 cfu/mL 菌液,用一次性灭菌注射器于鳗鲡背部肌肉注射,对照组注射生理盐水,每尾剂量均为 0.1 mL。注射 6、24、48 h 后取试验组和对照组各 3 尾鳗鲡,观察其外部症状,解剖后观察其内部各脏器的组织病理变化。采集不同时间段各组鳗鲡的肝脏、肾脏和肠道,每个时间段采 3 尾鳗鲡,将脏器切成 3 mm×3 mm×3 mm 大小的组织块。

1.5 病理切片的制作和病理观察

采集的脏器固定于 10%福尔马林磷酸缓冲液(pH 7.2~7.4)中,浸泡 24 h 后转移至 70%的乙醇溶液。对各组织块进行脱水、透明、包埋、切片、病理学染色及观察。具体步骤如下:80%乙醇 10 min→90%乙醇 10 min→95%乙醇 10 min→无水乙醇 I 10 min→无水乙醇 II 10 min→无水乙醇 III 10 min→无水乙醇:二甲苯=1:1 20 min→二甲苯 I 10 min→二甲苯 II 10 min→二甲苯 III 10 min→二甲苯:石蜡=1:1(45 ℃)20 min→石蜡 I 20 min→石蜡 II 20 min→石蜡 III 20 min→包埋→4~6 μm 切片→石蜡组织切片复水:二甲苯 I 15 min→二甲苯 II 15 min→无水乙醇 I 5 min→无水乙醇 II 1 min→95%乙醇

1 min→70%乙醇 1 min→流水 2 min→米氏苏木精染色 15 min→伊红染色 1 min→观察并拍照。

1.6 免疫组织化学染色和观察

石蜡切片按本文“1.5”的方法制作,脱蜡后参考文献[12-13]进行免疫组织化学染色:复水后的石蜡组织切片用双蒸水漂洗 2 次,每次 2 min;玻片置柠檬酸缓冲液[柠檬酸 18 mL(21.01 g)+柠檬酸钠 82 mL(29.41 g)+双蒸水 900 mL,pH6.0]中 97 ℃水浴 40 min,以进行抗原修复^[14];PBST 漂洗 3 次,每次 2 min;加兔血清白蛋白于 37 ℃封闭 30 min;用兔血清白蛋白将嗜水气单胞菌的兔抗血清稀释 200 倍作为一抗,加一抗于玻片上 37 ℃孵育 1 h;PBST(pH7.0)漂洗 3 次,每次 2 min;3% H₂O₂ 于 37 ℃下孵育 30 min 以消除内源性过氧化物酶活性;PBST 漂洗 3 次,每次 2 min;用 0.01 mol/L(pH 7.0)的 PBS 缓冲液将山羊抗兔 IgG 抗体(二抗)稀释 50 倍,加二抗于玻片上 37 ℃下孵育 30 min;PBST20 漂洗 3 次,每次 2 min;以 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)作为发色剂染色 8 min,双蒸水漂洗以终止反应;以米氏苏木精作背景染色 20 s,流水 5 min 后对玻片进行观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 细菌对鳗鲡的半数致死量

不同浓度细菌肌肉注射鳗鲡后除每克体质量 10^3 cfu 注射剂量外,其他各注射剂量组均引起了不同程度的死亡,生理盐水注射对照组未引起鳗鲡死亡(表 1)。据半数致死量的计算公式得到嗜水气单胞菌对鳗鲡的半数致死量为 5×10^4 cfu/g。

表 1 不同浓度细菌肌肉注射鳗鲡后引起的鳗鲡死亡率

Table 1 Eel's mortality after the injection(i. m) of different concentrations of *Aeromonas hydrophila*

细菌注射量/(cfu/g) Quantity of bacterium	鳗鲡死亡数 Number of dead eel	鳗鲡死亡率/% Eel's mortality
10^7	10	100
10^6	10	100
10^5	7	70
10^4	3	30
10^3	0	0
0(生理盐水对照 Saline control)	0	0

2.2 鳗鲡感染后的解剖病理变化

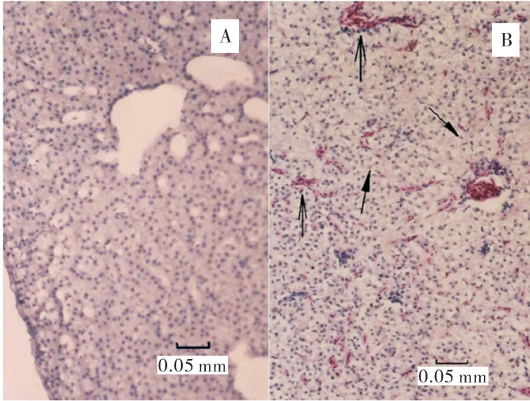
生理盐水注射对照组中无鳗鲡死亡,也未出现发病的临床病理症状。试验组鳗鲡注射 6 h 后无明显病理变化,但见多数鳗鲡在水中快速游动,有的浮于水面,剖检时见肝脏充血,肾脏轻微肿大。注射后

24 h 已有 1 尾鳢鲈死亡,其他鳢鲈均处于濒死状态,可见注射部位溃烂、皮肤脱黏,剖检时见肝脏严重充血,腹部有胶冻状黄色液体流出,肾脏肿大明显。注射后 48 h 剩余 3 尾鳢鲈全部死亡,注射部位严重溃烂,皮肤黏液大面积脱落,下颌严重充血,剖检时见肝脏肿大,部分呈土黄色,腹部有腥臭的胶冻状黄色液体流出,肾脏严重肿大。试验组鳢鲈的注射部位均出现直径 0.5~2.0 cm 大小的圆形或椭圆形溃烂区,溃烂区的皮肤和肌肉严重充血。另外,从对照组鳢鲈体内均未分离到感染菌。而从试验组鳢鲈的肝脏、肾脏和腹水中均再次分离到与感染菌生

化鉴定相同的菌株。

2.3 鳢鲈感染后肝脏、肾脏和肠道组织病理学变化

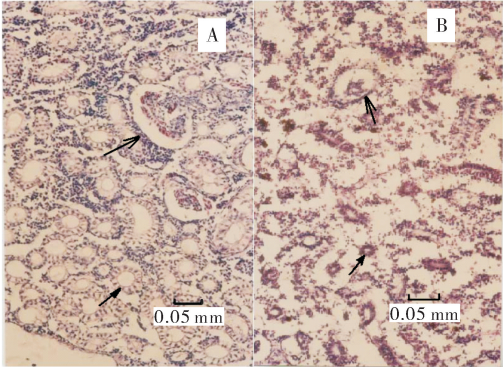
细菌感染 48 h 后,对照组鳢鲈各脏器中均未见组织病理学症状(图 1-A,图 2-A)。试验组鳢鲈的组织病理学症状相似。肝脏的病变表现为严重充血,肝细胞间有大量红细胞浸润,肝细胞间隙增大,肝细胞核中可见空泡变性(图 1-B)。肾脏病变表现为肾小管间大量红细胞和淋巴细胞浸润,肾小管坏死、崩解,部分肾小管萎缩,上皮细胞严重萎缩、崩解;肾小球毛细血管萎缩,坏死,有的成为一个大空泡(图 2-B)。未见鳢鲈肠道组织的病变。



A. 对照 Control of the liver; B. 感染后 48 h 的肝脏切片,图中空头箭头示肝实质出血,大量红细胞浸润;实心箭头示肝细胞核呈空泡状 48 h after infection, liver biopsyplan in short arrows indicate parenchymal hemorrhage, a large number of red blood cell infiltration; solid arrows indicate hepatocyte nuclear vacuolar.

图 1 肝脏病理切片

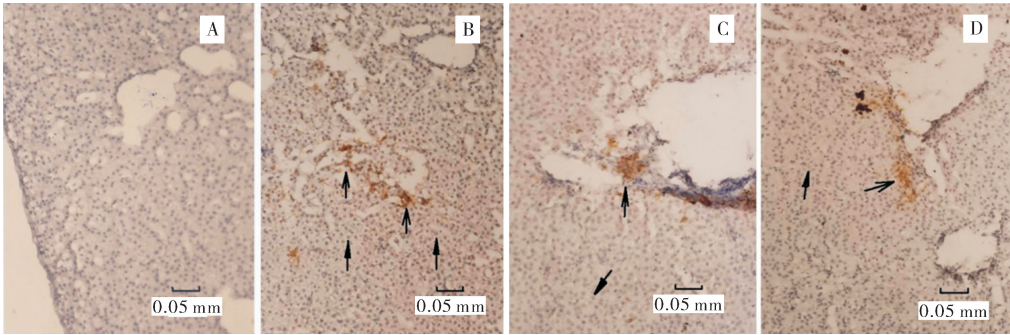
Fig.1 Liver pathological section



A. 对照,空头箭头示正常肾小球,实心箭头示正常肾小管 Control of the kidney, short arrow indicates the normal glomerulus, solid arrows indicate the normal renal tubular; B. 感染后 48 h 肾脏病理切片,空头箭头示肾小球坏死崩解,实心箭头示肾小管萎缩 48 h after infection and renal biopsy, the figure short arrows indicate the collapse of glomerular necrosis, solid arrows show tubular atrophy.

图 2 肾脏病理切片

Fig.2 Kidney pathological section



A. 对照 Control of the liver; B. 细菌感染 6 h 后肝脏组织化学切片,图中空头箭头示呈阳性反应的细菌;实心箭头示肝细胞核空泡化 Bacterial infection of the liver after 6h group of slices, short arrow indicates the diagram of free-positive bacteria; solid arrows indicate hepatocyte nuclear vacuolation; C. 细菌感染 24 h 后肝脏组织化学切片,图中空头箭头示呈阳性反应的细菌;实心箭头示肝细胞核呈空泡状 24 h after bacterial infection of the liver group of slices, short arrow indicates the diagram of free-positive bacteria; solid arrows indicate hepatocyte nuclear vacuolar; D. 细菌感染 48 h 后的肝脏切片,空头箭头示呈阳性反应的细菌;实心箭头示肝细胞核呈空泡状 Bacterial infection of the liver after 48 h group of slices, short arrow indicates the positive reaction of the free bacteria; solid arrows indicate vacuolation of liver cell nucleus.

图 3 肝脏组织化学切片

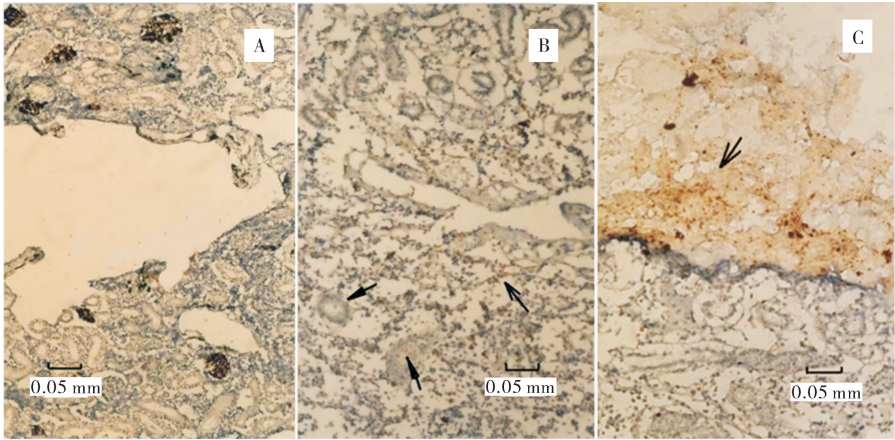
Fig.3 Immunohistochemistry of liver sections (IHC)

2.4 感染后细菌在鳗鲡肝脏、肾脏和肠道的免疫组化定位结果

对照组鳗鲡在 3 种脏器经免疫组织化学染色后均无阳性结果(图 3-A,图 4-A,图 5-A)。肝血管和血窦周围可见明显着色的细菌(图 3-B),肝内血管周围的实质组织往往染色较明显(图 3-C),而远离血管的组织也有明显染色的细菌定居(图 3-D)。

研究发现,肾实质内寄生大量明显染色的细菌和吞噬细胞,肾小球结构完全崩解,肾小管管腔内膜增生,使管腔变窄,少数管腔内可见淡褐色颗粒(疑

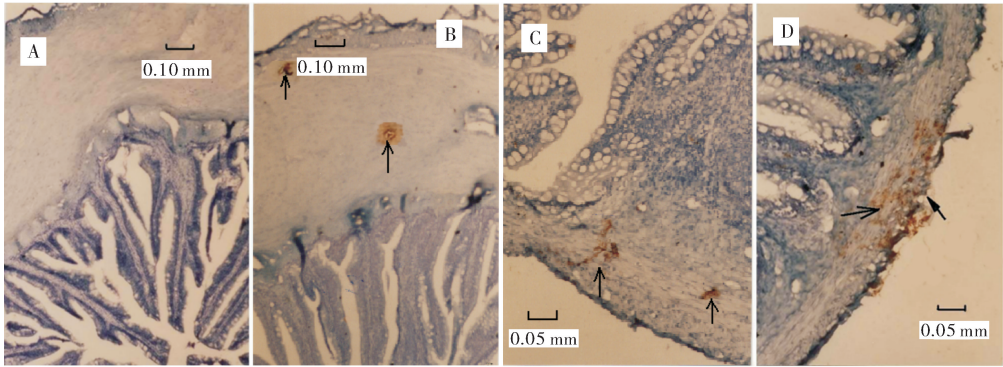
为细胞崩解后的游离抗原),肾小管管壁细胞坏死,其细胞核崩解,细胞呈空泡状,细胞表面携带大量抗原,呈明显的褐色(图 4-B)。肾脏外周结缔组织也有大量明显染色的细菌(图 4-C)。肠道内肠绒毛上常可观察到大量呈明显阳性的细菌(图 5-C),有时可见部分肠绒毛溃烂和脱落,但肠肌层中出现的明显着色的溃疡点显示,肌层中有细菌侵蚀使肌肉出现病灶(图 5-B)。在某些切片中还可以看到肠管的肌肉层和浆膜层阳性明显,浆膜层溃烂脱落(图 5-D)。



A. 对照 Control of the kidney; B. 细菌感染 48 h 后的肾脏切片,图中空头箭头示呈阳性反应的细菌;实心箭头示肾小管萎缩,上皮细胞混浊肿胀 Bacterial infection of the kidney after 48 h group of slices,short arrow indicates the diagram of free-positive bacteria; solid arrows indicate tubular atrophy,cloudy swelling of epithelial cells; C. 细菌感染 48 h 后的肾脏结缔组织,图中空头箭头示呈阳性反应的细菌 48 h post-infection of renal tissue-positive staining,short arrow indicates the diagram of free positive bacteria.

图 4 肾脏组织化学切片

Fig. 4 Immunohistochemistry of kidney sections (IHC)



A. 肠道对照 Control of the gut;B. 细菌感染 6 h 后的肠道切片,空头箭头示示肌层毛细血管呈阳性反应的细菌 Intestinal bacterial infection after 6 h group of slices, short arrow indicates the muscle capillaries showed positive reaction of free bacteria; C. 细菌感染24 h 后的肠道切片,图中空头箭头示呈阳性反应的细菌 24 h after the bacterial infection of intestinal biopsy staining, figure in the short arrow shows positive reaction of free bacteria; D. 细菌感染 48 h 后的肠道切片,图中空头箭头示呈阳性反应的细菌,实心箭头示肠道浆膜层脱落 Bacterial infection of the intestinal group of 48 h slices, short arrow indicates the diagram of free-positive bacteria, solid arrow indicates the intestinal serosal off.

图 5 肠道组织化学切片

Fig. 5 Immunohistochemistry of gut sections (IHC)

3 讨 论

根据目前的研究,本试验所使用的这株嗜水气单胞菌的致病力较强,经人工注射感染后,在短时间内即可在肝脏和肠道等多处组织中定居。据病理变化和免疫组织化学染色结果可推断其最主要侵袭和寄生脏器为肾脏。这之前认为的主要寄生部位为肝脏等其他研究结果有所不同^[15],可能与菌株差异有关,也可能是该人工感染方法与自然感染不同所致。

发病鳊鲢的肾脏病灶较其他器官明显,包括肾小球坏死崩解,肾小管萎缩,上皮细胞混浊肿胀,有的上皮细胞核溶解,细胞呈空泡状。肾组织中大片细胞坏死、消失,细胞间质增宽。与人们普遍认为嗜水气单胞菌为条件致病菌,但人工注射感染的结果却发现其毒力较强的现象相符^[16-17]。这就可解释为,该株嗜水气单胞菌在正常条件下没有一个合适的侵袭途径,而只能在环境条件较恶劣、鱼体因抵抗力下降而发病。一旦该菌进入鱼体即可通过循环系统大量传播,快速繁殖,造成鳊鲢迅速发病死亡。

试验中发病鳊鲢的肝脏病变较肾脏轻,只在血管、血窦及其周围实质组织中有细菌寄生。而病鳊肠道内虽可发现明显着色的细菌,但并未发现其造成明显的组织病变,其肠壁的肌肉内却发现嗜水气单胞菌侵蚀,这些现象都与嗜水气单胞菌可通过血液循环系统大量繁殖而引起败血症密切相关^[18-19]。

免疫组织化学定位结果表明,在肝脏和肠道中短时间内(6 h)即发现有细菌定居,考虑到这些细菌主要定居在肝脏和肠道肌层的毛细血管周围(图 3-B,图 5-B),因此极可能是细菌经肌肉注射后,通过毛细血管的血循环入侵所致。

试验组鳊鲢的注射部位均出现明显的溃烂,表明使用传统注射方法进行攻毒试验有一定的缺陷。但用菌液浸泡法或与病鱼混养传染法可能会由于嗜水气单胞菌的侵袭力较弱而影响试验结果。有人认为人为地将鱼的皮肤划伤,去除黏液或者暴露伤口后再浸浴可以获得很好的结果^[20]。

本次试验除了对这株细菌进行病理和定位方面的研究外,还进行了免疫组织化学最佳条件的研究。试验发现一般对人和其他哺乳动物适用的免疫组织化学方法并不一定适合水产动物。与其他动物相比,水产动物的器官较小且组织疏松,不适于固定过

久,也不适于在二甲苯中透明过久。前者会造成组织切片终身小球样黑变,后者会造成组织脱片,为进行免疫组织化学试验和观察造成很大困难。同时,温度对组织的包埋和切片结果有很大影响,建议在 65℃ 下进行透蜡,20℃ 下进行切片,粘片后的石蜡切片在 37℃ 下过夜烘干后再脱蜡,以免引起脱片。

参 考 文 献

- [1] 樊海平,徐娟儿,黄晓讽. 福建省养殖鳊鲢细菌性疾病的调查与防治[J]. 海洋湖沼通报,1996(2):66-70.
- [2] 艾红,李永振. 养殖鳊鲢的主要疾病与防治研究现状[J]. 湛江海洋大学学报,1998,18(4):71-76.
- [3] KO W C, CHIANG S R, YAN J J, et al. Comparative pathogenicity of bacteraemic isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(7): 553-558.
- [4] 汪开毓. 鲤鱼细菌性败血症的病理学研究[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(3): 257-262.
- [5] 董传甫,林天龙,陈日升,等. 日本鳊鲢败血腹水病病原研究[J]. 水产科学, 2002(1): 5-7.
- [6] 郑国兴,周凯. 嗜水气单胞菌欧洲鳊皮肤溃疡分离株的耐药性[J]. 中国水产科学, 1999(3): 69-72.
- [7] SMITH P A, ROJAS M E, GUAJARDO A, et al. Experimental infections of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis* [J]. Dis Aquat Org, 2004, 61: 53-57.
- [8] YAN Q P, CHEN Q, MA S, et al. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Aquaculture, 2007, 269: 21-30.
- [9] ENGELSEN A R, SANDLUND N, FIKSDAL I U, et al. Immunohistochemistry of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* experimentally challenged with *Vibrio anguillarum* [J]. Dis Aquat Organ, 2008, 80(1): 13-20.
- [10] GUPTA S K, PAL A K, SAHU N P, et al. Microbial levan in the diet of Labeo rohita *Hamilton juveniles*: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila* [J]. J Fish Dis, 2008, 31(9): 649-657.
- [11] BROWN W F. Variance estimation in the reed-muench fifty per cent end-point determination [J]. Am J Hyg, 1964, 79(1): 37-46.
- [12] 谢简,李正秋,张奇亚. 免疫组化法检测美国青蛙组织中的蛙虹彩病毒[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 438-443.
- [13] 夏永娟,黄威权,姜国良. 鳊弧菌感染牙鲆的组织学和免疫组织化学观察[J]. 海洋科学, 2002, 24(10): 41-43.
- [14] 陈世耀,王吉耀,纪元,等. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及

癌前病变基因突变中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2001(3): 302-307.

[15] 卢全章, 朱心玲. 鳗鲡肝肾病原菌的研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(4): 360-368.

[16] 郭松林. 鳗鲡病原菌的分类鉴定及相关免疫基础研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.

[17] REY A, VERJAN N, FERGUSON H W, et al. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish[J]. Vet Rec, 2009, 164(16): 493-499.

[18] 郭松林, 关瑞章, 冯建军. 嗜水气单胞菌感染对美洲鳗鲡不同血细胞免疫功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 463-466.

[19] MAKI J S, PATEL G, MITCHELL R. Experimental pathogenicity of *Aeromonas* spp. for the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*[J]. Curr Microbiol, 1998, 36(1): 19-23.

[20] 杜雄伟, 于博, 李叶, 等. 剑尾鱼感染嗜水气单胞菌的动态病理变化观察[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(10): 22-25.

Immunohistochemistry distribution and pathological characteristics of *Aeromonas hydrophila* in several organs of European eel (*Anguilla anguilla*) after artificial infection

GUO Song-lin FENG Jian-jun XIONG Jing GUAN Rui-zhang

Fishery College of Jimei University/Anguilla Modern Engineering Research Center of Industrial Technology of the Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract Eels were experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* which was isolated from European eel (*Anguilla anguilla*) in order to evaluate the pathological changes and distribution of the bacteria in the organs at different time after the infection. First, we injected *Aeromonas hydrophila* into the eel muscle in five doses to determine the LD₅₀ of this bacteria. The result showed the LD₅₀ was 5 × 10⁴ cfu/g of the eel's body weight. Then eels were injected the bacteria in the dose of 1 × 10⁷ cfu per fish into the eel muscle. We collected liver, kidney and intestine of the moribund eels at 6, 24 and 48 h after the injection, and we studied the pathological symptoms and immunohistochemistry distribution of the bacteria. The result indicated that clinical signs and pathological findings were in accordance with the blood poisoning of eels. Kidney showed more pronounced lesions including necrosis in sinusoids and peritubular capillaries in the kidney compared with the other organs. Liver lesions were hyperaemia, and abio-genetic desquamation of the plasma was in intestine. The most primary distribution of the bacteria in internal organs was kidney. The challenged bacteria were also found in liver and intestine of the eels.

Key words *Anguilla anguilla*; *Aeromonas hydrophila*; artificial infection; pathological change; immunohistochemistry localization

(责任编辑: 边书京)