

一株棘胸蛙源蛙病毒的分离与鉴定

程晓云¹, 傅秋华¹, 王卫东¹, 郑善坚^{2*}, 张乃芳¹

(1. 浙江省遂昌县生态林业发展中心, 浙江丽水 323300; 2. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

摘要 通过对棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)患病个体结合人工感染试验、PCR检测和系统发育分析对分离病原进行鉴定。结果表明,将患病的棘胸蛙肝、脾、肾等组织研磨匀浆液接种鲤鱼上皮瘤细胞(EPC),出现明显细胞病变。人工注射感染棘胸蛙表现出与自然患病相似的症状,14 d累计死亡率达到80%。通过对蛙病毒MCP基因的PCR检测及系统发育树分析发现,分离的棘胸蛙病毒与蛙病毒属病毒的相似性在99%以上,且与蛙病毒属FV3病毒类群聚为同一分支,暂命名为棘胸蛙蛙病毒(*Quasipaa spinosa* ranavirus, QSRV)。

关键词 棘胸蛙;蛙病毒属;鉴定

中图分类号 S947.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)05-0100-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.05.027

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation and Identification of a Ranavirus from *Quasipaa spinosa*

CHENG Xiao-yun, FU Qiu-hua, WANG Wei-dong et al (Ecological Forestry Development Center of Suichang County, Lishui, Zhejiang 323300)

Abstract The isolated pathogens were identified by combining with artificial infection test, PCR detection and phylogenetic analysis on the diseased individuals of *Quassipaa spinosa*. The results showed that the liver, spleen, kidney, and other tissues of the diseased *Q. spinosa* were inoculated into the squid epithelial cells (EPC), and the cytopathic effect (CPE) appeared. The artificially injected infection of *Q. spinosa* showed similar symptoms with those of the natural disease, with a mortality rate of 80% on the 14th day. After PCR detection and phylogenetic analysis of the MCP gene of *Ranavirus*, the similarity between the isolated *Quassipaa spinosa* virus and the ranavirus was found to be more than 99%, and it was clustered with the FV3 virus group of *Ranavirus*. It was tentatively named as *Quassipaa spinosa* ranavirus (QSRV).

Key words *Quasipaa spinosa*; *Ranavirus*; Identification

近年来,虹彩病毒可导致蛙类、龟鳖等两栖爬行类以及众多海、淡水鱼类染病,并引发大量死亡,因而愈来愈受到关注。根据国际病毒分类委员会(CTV)第9次报告,虹彩病毒科被分为5个属:虹彩病毒属(*Iridovirus*)、绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*)、蛙病毒属(*Ranavirus*)、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)和肿大细胞虹彩病毒属(*Megalocytivirus*)^[1]。其中,蛙病毒属(*Ranavirus*)是一类感染两栖类、爬行类及鱼类等动物的双链DNA病毒。张奇亚等^[2]于1996年从患有溃疡性致死综合症的沼泽绿牛蛙(*Rana grylio*)分离到蛙病毒,并将其命名为沼泽绿牛蛙病毒(*Rana grylio* virus, RGV)。蛙病毒具有极强的传播能力,近年来随着两栖爬行类品种养殖规模的逐渐扩大,蛙病毒感染造成的危害也愈加严重^[3-5]。Green等^[6]分析了1996—2001年美国两栖类死亡事件,其中57%的两栖类死亡事件与蛙病毒有关。

棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)是我国重点保护野生动物之一,也是我国养殖的特色经济蛙类,因其肉质细腻、鲜美、营养丰富,兼具食用和药用功能,具有显著的经济、社会和生态效益^[7]。近年来,棘胸蛙养殖中的病害种类也逐渐增多,已陆续报道了歪头病、白内障、烂皮病等病害^[8-11]。2016年浙江等地的棘胸蛙养殖场陆续发现未知病原引起的病害,主要表现为四肢肿胀或溃烂,腹部有发红充血点。死亡率高,给养殖户造成较大的经济损失。为明确其病因,笔者对浙江某棘胸蛙养殖场患病蛙进行了病原分离,通过回归感染验证其病

原性,并对该病原进行分子生物学鉴定,旨在为该病的诊断与防控提供依据与参考。

1 材料与方法

1.1 材料 发病棘胸蛙于2016年6月采自浙江省遂昌县某养殖场,共采集病蛙3只(2雄、1雌),平均体质量为(45.5±7.8)g,用于病原分离;健康棘胸蛙幼蛙取自金华某养殖场,共25只,平均体质量为(23.0±1.5)g,用于人工感染试验。胎牛血清(FBS)、M199培养基、0.25%的胰酶溶液(含EDTA)均购自Hyclone公司;Vira DNA/RNA Kit试剂盒购自康为世纪。

1.2 临床症状观察及细菌学检查 观察送检棘胸蛙体表及内脏情况,无菌操作取肝脏、脾、肾脏划线接种于琼脂平板,在30℃条件下培养24~48h,观察细菌生长情况。

1.3 病毒培养 将患病的棘胸蛙内脏组织匀浆液按1:5(V/V)加入混有双抗(青链霉素活性为1000 U/mL)的无菌水冰上研磨匀浆,4℃条件下12000 r/min离心6 min,0.22 μm滤膜过滤后接种于单层的鲤鱼上皮瘤细胞(*Epithelioma papulosum cyprini*, EPC)培养液中,25℃培养,盲传3代,逐日观察细胞病变。在EPC细胞70%~80%出现病变时收获细胞培养物,-80℃和室温条件下冻融2次,于4℃条件下4000 r/min离心20 min,收集上清液,备用。采用Reed-Muech法^[12]计算病毒半数感染量(TCID₅₀)。

1.4 人工感染试验 人工感染试验在室内蛙槽中进行,水温(23±1)℃,健康棘胸蛙室内暂养7 d后,分为试验组与对照组,每组10只。试验组腹腔注射0.2 mL 1×10⁷ TCID₅₀/mL病毒液,对照组注射0.2 mL M199培养液。试验观察14 d,每天观察棘胸蛙的发病、死亡情况。

作者简介 程晓云(1975—),女,浙江遂昌人,高级工程师,从事森林资源管理研究。*通信作者,副教授,硕士,硕士生导师,从事水生动物疾病研究。

收稿日期 2019-10-02

1.5 MCP 基因的 PCR 检测 取“1.3”收集的上清液按 *Vira DNA/RNA Kit* 试剂盒进行 DNA 提取。根据 Mao 等^[13]对蛙病毒属蛙病毒 3 型(FV3)MCP 的保守区设计引物 P1(5'-GACTTGGCCACTTATGAC-3') 和 P2(5'-GTCTCTGGAGAAGAA-3')。预期扩增病毒 MCP 基因片段长度约 500 bp。以提取的病毒 DNA 为模板,PCR 反应体系如下:6.5 μ L *Taq* 聚合酶,1.0 μ L 上引物,1.0 μ L 下引物,1.0 μ L 模板 DNA,加上 15.5 μ L 无菌水。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min 充分变性;95 $^{\circ}$ C 30 s 变性;52 $^{\circ}$ C 30 s 复性;72 $^{\circ}$ C 1.5 min 延伸;30 个循环;72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μ L 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。以 FV3 作为阳性对照,以无菌水为阴性对照。

1.6 系统发育分析 取上述 PCR 产物送至上海生工进行测序。测序结果提交 GenBank,并根据 NCBI 网站中收录的其他虹彩病毒 MCP 基因序列,采用 Mega 5.0 软件中的邻近法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 临床症状和细菌学检查 棘胸蛙患病个体主要表现为摄食减少甚至不摄食、活动减少、并可见腹部肿胀,下颌与腹部等体表出血,病程急,7 d 内棘胸蛙的死亡率达到 70% 以上。剖检可见腹腔内肝肿大充血,肠道内无食物,轻微充血(图 1)。对患病棘胸蛙的肝脏、胰脏和肾脏进行细菌接种培养,未分离到细菌。



图 1 发病棘胸蛙的临床症状

Fig. 1 Clinical symptoms of diseased *Q. spinosa*

2.2 病毒培养 将经 0.22 μ m 滤膜过滤的患病棘胸蛙的组织匀浆滤液与 EPC 细胞混合培养,于 25 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后出现明显 EPC 细胞病变现象。连续盲传 3 代。EPC 细胞的病变现象主要表现为部分细胞变形,细胞核变大,胞内体增加,最后在培养瓶中形成空洞状不规则的细胞层(图 2)。

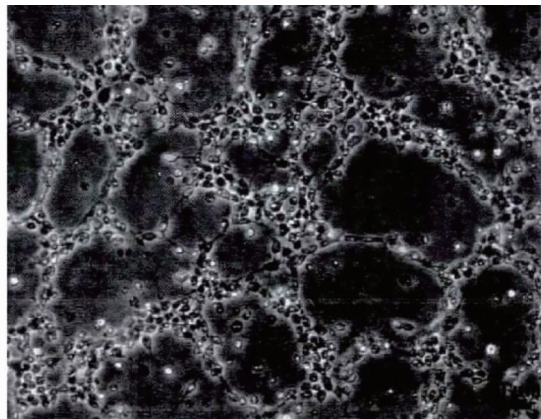


图 2 患病棘胸蛙组织匀浆液感染 EPC 细胞后引起的细胞病变

Fig. 2 Cytopathic effect caused by inoculation of EPC cells with tissue filtrate from diseased *Q. spinosa*

2.3 人工感染试验 人工感染病毒上清 3 d 后棘胸蛙开始出现死亡,第 4~5 天为死亡高峰期,人工感染 14 d 累计感染死亡 8 只,累计死亡率达 80%,对照组全部存活、无异常(表 1)。感染组发病死亡的棘胸蛙与自然患病个体的临床表现相似,腹部发红肿胀明显,剖检腹腔内肝肿大充血。

2.4 病毒 MCP 基因的 PCR 检测 对患病棘胸蛙分离的病毒上清使用蛙病毒 MCP 基因设计的引物进行 PCR 扩增,结果显示从患病棘胸蛙分离的病毒上清能扩增出约 500 bp 的清晰条带,与预期目的片段大小基本一致(图 3)。将扩增条带经上海生工测序,得到其 MCP 基因序列,将测序结果在 GenBank 数据库上进行比对,发现该序列与已知蛙病毒属病毒黑斑侧褶蛙虹彩病毒(*Rana nigromaculata ranavirus*, RN-RV, MG791866)、蛙病毒 3(frog virus 3, FV3, KJ175144)、甲鱼虹彩病毒(soft-shelled turtle iridovirus, STIV, EU627010)的 MCP 基因具有高达 99% 的相似性,由此可推断出棘胸蛙分离的病毒为蛙病毒属的成员,暂命名为棘胸蛙虹彩病毒(*Quasipaa spinosa ranavirus*, QSRV)。

表 1 人工感染试验结果

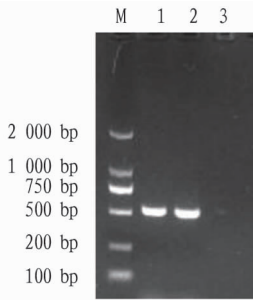
Table 1 Results of artificial infection experiment

组别 Group	累计感染死亡数 Cumulative dead number after infection//只														
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d
注射组 Injection group	0	0	0	2	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8
对照组 Control group	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.5 系统发育分析 对该分离株 QSRV 的 MCP 基因序列与其他 16 种已分离虹彩病毒的 MCP 基因构建系统发育树,结果发现该分离株 QSRV 归为蛙病毒属 FV3 病毒类群(图 4),且在进化关系上与同样分离自我国的 RGV、STIV 和 RN-RV 的亲缘关系最近。

3 讨论

细胞培养分离技术是最准确的病毒诊断方法之一,也是世界动物卫生组织(OIE)推荐的病毒检测首选方法。该研究通过对患病棘胸蛙的组织滤液进行 EPC 细胞培养,发现能引起 EPC 细胞病变,证明患病棘胸蛙有病毒感染。



注: M. DL2000 DNA Marker; 1. 分离的病毒上清; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1. Isolated virus supernatant; 2. Positive control; 3. Negative control

图3 MCP基因的PCR检测结果

Fig. 3 PCR detection results of MCP gene

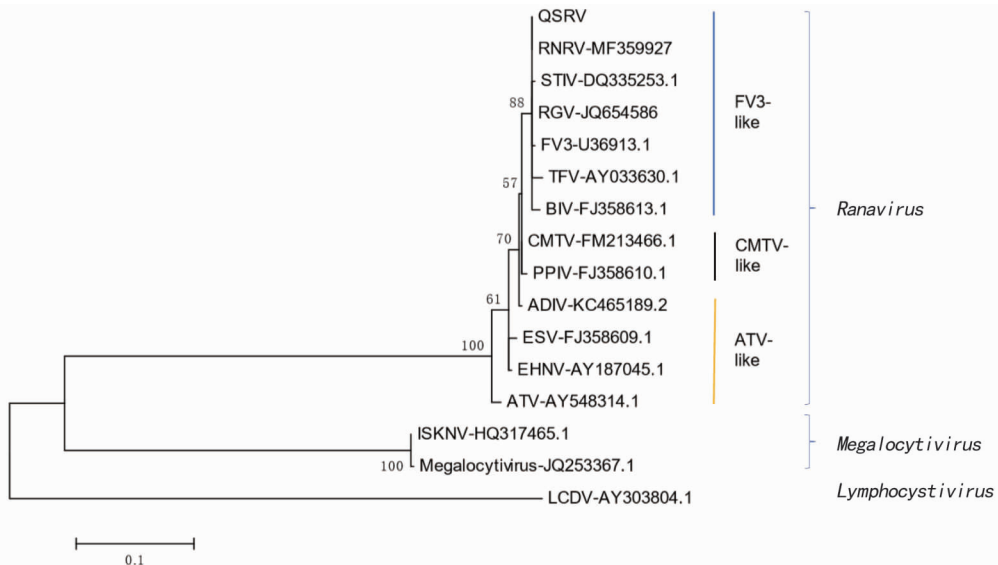


图4 基于MCP基因序列构建的不同虹彩病毒株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree construction of different strains of Ranavirus based on MCP gene sequences

毒具有很强的环境适应能力,它能长时间潜伏于不敏感宿主或池塘基质中,通过水的传播持续对环境中的敏感宿主造成威胁^[16],因此在养殖过程中需要做好养殖环境的消毒处理,掌握好投饲量,及时清除残饵粪便和病死蛙的无害化处理,定期进行水体和养殖区域的消毒处理,在饵料中定期添加免疫多糖提高机体的抗病力,对预防该病毒的发生及传播具有较好的效果。胡金春等^[17]研究表明,注射或体表免疫棘胸蛙虹彩病毒疫苗,其相对免疫保护率达到60%以上,因此,开展疫苗免疫是预防棘胸蛙病毒感染的一个较好的途径。该研究发现棘胸蛙感染的蛙病毒QSRV为蛙病毒FV3病毒类群,与RGV、STIV和RNRV的亲缘关系很近。今后可进一步开展相关病毒的亲缘进化、流行与免疫机制研究,为棘胸蛙健康养殖及病害防控等提供技术保障。

参考文献

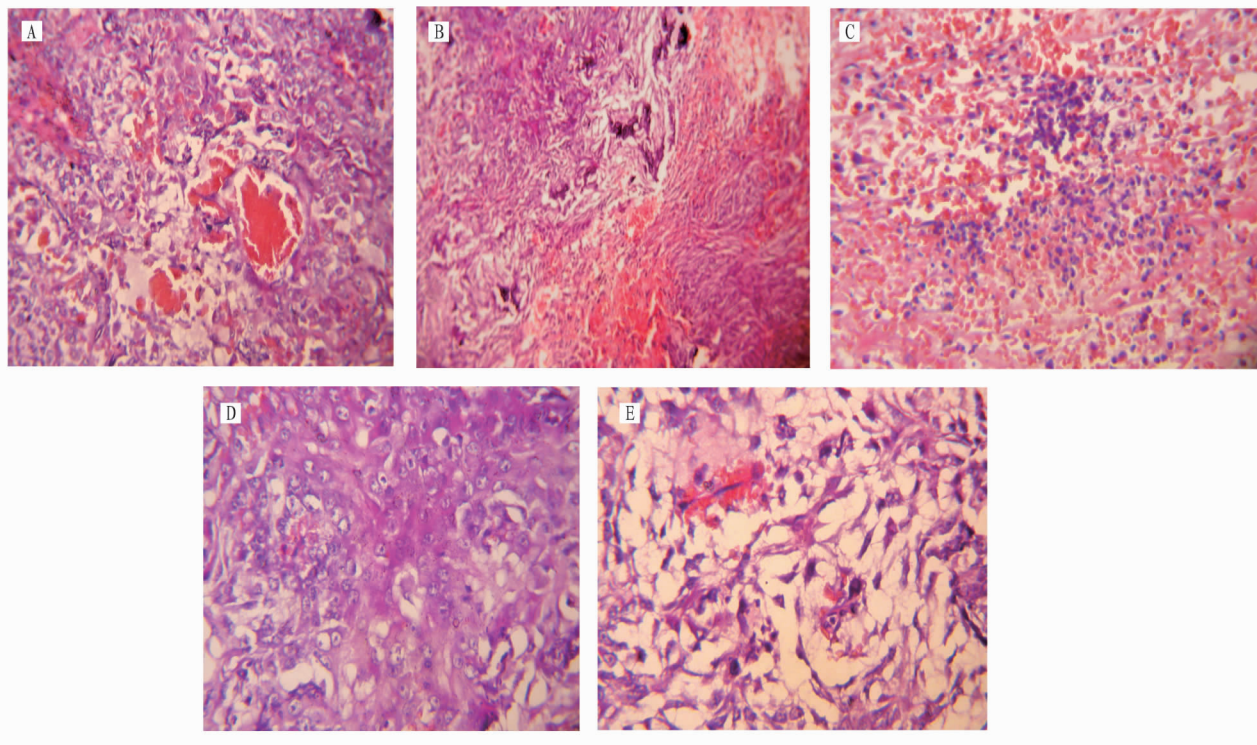
- [1] HOLT J G, KRIGE N R, SENATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th edition. London: Williams & Wilkin Press, 1994: 527-558.
- [2] 张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 390-392.

同时利用两栖类常见的虹彩病毒蛙病毒FV3的MCP基因设计引物,扩增出与预期目的片段大小基本一致的目的条带,从而鉴定出该病毒为棘胸蛙蛙病毒QSRV,为蛙病毒FV3病毒类群。

蛙病毒属主要危害两栖类,如大鲵(*Andrias davidianus*)^[3]、黑斑侧褶蛙(*Rana nigromaculatus*)^[14]、牛蛙(*Rana catesbeianus*)^[4]。李莉娟等^[15]首次报道了棘胸蛙感染虹彩病毒,主要临床症状表现为体表出血、后肢溃疡、活动无力、发病7d后达到死亡高峰,累计死亡率高达80%。该研究发现棘胸蛙虹彩病毒QSRV,其感染棘胸蛙具有发病迅速、死亡率高等特点,患病个体腹部肿胀,腹部体表充血,剖检见肝肿大充血。该研究结果与李莉娟等^[15]报道症状基本相似。

棘胸蛙蛙病毒感染主要发生在浙江地区6—7月份,温度为22~28℃,非常适合病毒的扩散传播。据报道,蛙病

- [3] 孟彦. 大鲵虹彩病毒病原的分离、鉴定、基因组测序及大鲵群体遗传多样性分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2013.
- [4] 刘晓东, 杨金先, 龚晖, 等. 一株牛蛙源虹彩病毒的分离及鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20(1): 16-21.
- [5] 陈在贤, 郑坚川, 江育林. 从患“红脖子病”甲鱼体分离到虹彩病毒[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 135-139.
- [6] GREEN D E, CONVERSE K A, SCHRADER A K. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001[J]. Annals of the New York academy of sciences, 2002, 969(1): 323-339.
- [7] 梅祚芸, 叶容晖, 宋婷婷, 等. 浙江省棘胸蛙养殖现状及发展对策[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(7): 1122-1125.
- [8] 阙炳根. 棘胸蛙养殖常见的病害及防治方法[J]. 水产养殖, 2017(5): 41-43.
- [9] 王瑞君, 熊筱娟. 棘胸蛙烂皮病奇异变形杆菌的分离、鉴定及对药物敏感性研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(4): 31-34.
- [10] 刘子明, 金晶, 胡则辉, 等. 棘胸蛙白内障病原鉴定及病理组织观察[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(11): 1811-1818.
- [11] 李明, 宋婷婷, 郑荣泉, 等. 棘胸蛙歪头病病原分离·鉴定与药敏试验[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(3): 64-66, 98.
- [12] REED L, MUENCH H, REED L J, et al. A simple, method of estimating 50 percent end point[J]. Am Ind Hyg Assoc J, 1938, 22(1): 112-117.
- [13] MAO J H, HEDRICK R P, CHINCHAR V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses[J]. Virology, 1997, 229(1): 212-220.



注: A. 200×; B. 200×; C. 400×; D. 400×; E. 400×

图3 病犬组织病理学检查结果

Fig. 3 Histopathological examination results of sick dogs

过此方法在哈尔滨成功治愈了 1 例结肠癌病例,但今后病例治疗中具体还需根据病畜的病情而定。

参考文献

[1] 赵德明. 兽医病理学[M]. 北京:中国农业大学出版社,1998:136-151.
 [2] 张健. 几例犬肿瘤病例的诊治与体会[C]//全国畜医外科学第13次学术研讨会、小动物医学第1次学术研讨会暨奶牛疫病第3次学术讨论会论文集. 北京:中国畜牧兽医学会,2006.
 [3] 马卫明,王春璇. 狗病临床手册[M]. 北京:金盾出版社,2006:121-122, 502-503.
 [4] 胡玉龙. 成黄过程中胆汁 ConABP、胆红素、钙含量和胆囊壁组织结构的变化[D]. 扬州:扬州大学,2009.

[5] 何英,叶俊华. 宠物医师手册[M]. 2版. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2009:449.
 [6] 齐新永. 犬肿瘤的病理学诊断[J]. 上海畜牧兽医通讯,2009(5):112-113.
 [7] 叶俊华. 犬病诊疗技术[M]. 北京:中国农业出版社,2004:577-579.
 [8] MORGAN R V. 小动物临床手册[M]. 4版. 北京:中国农业出版社,2004:297-301.
 [9] 马庆华. 中国兽药[M]. 北京:中国兽药杂志出版社,2002:36-38.
 [10] 王振勇,李玉冰. 宠物病理[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:194-200.
 [11] 安徽生物细胞中心[EB/OL]. [2019-04-05]. <https://baike.sogou.com/v55150283.htm>.

(上接第 102 页)

[14] 牟维豪,耿毅,欧阳萍,等. 1 株黑斑蛙源蛙病毒的分离鉴定及系统进化分析[J]. 华南农业大学学报,2019,40(2):40-46.
 [15] 李莉娟,罗杨志,顾泽茂,等. 蛙病毒 3 介导棘胸蛙的暴发性死亡[C]//中国水产学会鱼病专业委员会 2013 年学术研讨会论文摘要汇

编. 海口:海南大学海洋学院,2013.
 [16] BRENES R,GRAY M J,WALTZEK T B,et al. Transmission of ranavirus between ectothermic vertebrate hosts[J]. PLoS One,2014,9(3):924-931.
 [17] 胡金春,胡霞臻,金米雪,等. 棘胸蛙虹彩病毒免疫方法研究[J]. 安徽农业科学,2018,46(7):86-87,154.