

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.
MOU Weihao, GENG Yi, OUYANG Ping, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a ranavirus isolated from *Rana nigromaculata*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(2): 40-46.

1 株黑斑蛙源蛙病毒的分离鉴定及系统进化分析

牟维豪, 耿 毅, 欧阳萍, 陈德芳, 黄小丽, 汪开毓, 赵若璇, 白明焕

(四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】为探究四川某养殖场黑斑蛙 *Rana nigromaculata* 蝌蚪爆发传染病病因。【方法】通过对患病蝌蚪进行病理学检查与病毒分离, 并结合人工感染试验、电镜观察、PCR 检测和系统发育分析对分离的病原进行鉴定。【结果】黑斑蛙患病蝌蚪主要临床特征为体表出血、腹部肿胀、腹腔内淡黄色腹水; 组织病理学上, 患病蝌蚪肝、肾、脾与胰腺等组织器官受损, 出现明显的变性与坏死病灶, 且在一些病变细胞胞浆内见嗜碱性包涵体。患病蝌蚪组织匀浆接种鲤鱼上皮瘤 (EPC) 细胞, 25 °C 培养 4 d 后出现明显细胞病变效应 (CPE), TCID₅₀ 为 10⁸ mL⁻¹。用病毒液进行人工感染试验, 感病蝌蚪表现出与自然患病蝌蚪相似的症状, 死亡率达到 80%, 证实分离病毒的病原性。电镜观察发现, 病毒颗粒为正六边形, 有囊膜, 对角线直径 (135±8) nm, 在胞质中呈晶格状排列或游离状。针对蛙病毒 *MCP* 基因的 PCR 检测显示, 自然患病蝌蚪、饲养水源以及分离病毒均为阳性, 基于 *MCP* 全序列的遗传进化分析发现, 分离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。【结论】证实导致此次黑斑蛙蝌蚪大量死亡的病原为蛙病毒属病毒, 将其命名为黑斑蛙蛙病毒 (*Rana nigromaculata* ranavirus, RNRV)。

关键词:蛙病毒; 分离鉴定; 系统发育分析; 病理损伤; 黑斑蛙

中图分类号: S941.41

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)02-0040-07

Isolation, identification and phylogenetic analysis of a ranavirus isolated from *Rana nigromaculata*

MOU Weihao, GENG Yi, OUYANG Ping, CHEN Defang, HUANG Xiaoli,

WANG Kaiyu, ZHAO Ruoxuan, BAI Minghuan

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract:【Objective】To explore the etiology of a serious infectious disease occurred in *Rana nigromaculata* tadpoles in a farm of Sichuan Province.【Method】Pathological examination and virus isolation were carried out for the diseased tadpoles of *R. nigromaculata*. The isolated pathogen was identified by artificial infection test, transmission electron microscopy, PCR detection and phylogenetic analysis.【Result】External clinical signs included hemorrhage on body surface and swollen abdomen with yellow ascites. Based on histopathological observation, we found that liver, spleen, kidney, pancreas and other organs had damages with obvious degeneration and necrosis focus, and basophilic inclusions appeared in the cytoplasm of some pathological cells. The tissue homogenates of diseased tadpoles were inoculated into epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells under 25 °C and caused typical cytopathic effect (CPE) after four days with the TCID₅₀ of

收稿日期: 2018-05-21 网络首发时间: 2019-01-30 09:11:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20190129.1006.024.html>

作者简介: 牟维豪 (1993—), 男, 硕士研究生, E-mail: mouweihao@126.com; 通信作者: 耿 毅 (1974—), 男, 教授, 博士, E-mail: genyisicau@126.com

基金项目: 四川省淡水鱼产业技术创新团队建设项目 (2017SICAD002); 四川省重点研发项目 (2018NZ0007)

10^8 mL⁻¹. In the artificial infection test of virus fluid, the tadpoles showed the symptoms similar to those observed in naturally infective tadpoles and the mortality reached 80%, which suggested that the isolated virus was the determined pathogen of this disease. Transmission electron microscopic observation showed that the virus was regular hexagon with capsule, the diagonal diameter was (135±8) nm, and virus particles arrayed in crystalline or freely in the cytoplasm. PCR examination of the *MCP* gene showed positive results for samples of diseased tadpoles, aquaculture water source and isolated virus. Phylogenetic analysis based on *MCP* gene sequences indicated that the sequence of isolated virus had above 99% similarity to ranavirus, and the isolated virus belonged to the FV3-like virus group. 【Conclusion】 This study confirmed that ranavirus was the causative agent of this outbreak, and the virus is named as *Rana nigromaculata* ranavirus (RNRV).

Key words: ranavirus; isolation and identification; phylogenetic analysis; pathological lesion; *Rana nigromaculata*

蛙病毒 (Ranavirus) 是一类感染鱼类、两栖类、爬行类等动物的双链 DNA 病毒, 属于虹彩病毒科 Iridoviridae^[1]。其感染宿主至少包括 52 个科 175 种野生或养殖的变温脊椎动物, 故又被称为“冷血动物杀手”^[2]。同时蛙病毒具有极强的传播能力, 随着近年动物国际化贸易逐渐频繁与规模的扩大, 蛙病毒在全球两栖类、爬行类以及鱼类中的传播呈现愈加严重的趋势^[3]。张奇亚等^[4]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, 并命名为沼泽绿牛蛙病毒 (*Rana grylio* virus, RGV); 随后王晓红等^[5]在人工养殖虎纹蛙 *R. tigrina* 中又分离得到虎纹蛙病毒 (Tiger frog virus, TFV); 2011 年耿毅等^[6]也对由蛙病毒导致的人工养殖中国大鲵 *Andrias davidianus* 大规模死亡事件进行了报道。在过去的 20 年内, 已相继有鲈鱼 *Micropterus salmoides*^[7]、林蛙 *R. dybowskii*^[8]、牛蛙 *R. catesbeiana*、甲鱼 *Trionyx Sinensis*^[9] 以及似鮈高原鳅 *Triphophysa siluroides*^[10] 等多种动物感染蛙病毒并导致大量死亡的报道, 给中国养殖业的发展与珍稀物种的保护造成了严重的危害。

黑斑蛙 *R. nigromaculata* 是我国的一种重要特色养殖蛙类, 但近年来红腿病、红斑症、腹水病和烂皮病等流行疾病的不断发生造成了巨大的经济损失^[11-12], 严重影响了黑斑蛙养殖业的发展。自 2012 年以来, 四川成都、绵阳等地的黑斑蛙养殖场陆续爆发由未知病原引起的高死亡率传染病, 患病蝌蚪全身多处出血、肿胀, 发病 1 周左右死亡率即可达 90% 以上。为明确其病因, 本研究从四川某养殖场患病蝌蚪体内进行了病原的分离, 通过回归感染验证其病原性, 并对该病原进行了形态学、病理损伤观察和分子生物学鉴定, 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 试验材料

患病黑斑蛙蝌蚪, 由四川双流某养殖场送检, 体长 (1.85±0.25) cm, 体质量 (2.6±0.5) g; 健康黑斑蛙蝌蚪购自四川德阳某黑斑蛙养殖场, 体长 (2.20±0.22) cm, 体质量 (3.0±0.5) g, 体表健康无损伤。胎牛血清 (FBS)、M199 培养基、体积分数为 0.25% 的胰酶溶液 (含 EDTA)、抗生素均购自 Hyclone 公司; DPBS、pMD-19T 质粒连接试剂盒、PCR-Mix reaction buffer、DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒和 DNA 分子质量标准 DL-2000 均购自上海生物工程有限公司。

1.2 临床症状观察及细菌学检查

仔细观察送检蝌蚪体表情况, 随后在无菌环境下解剖, 取肝脏、腹水进行组织涂片, 革兰染色后镜检, 同时划线接种于 BHI 琼脂平板, 在 28 ℃ 条件下培养 24~48 h, 观察平板细菌生长情况。

1.3 组织病理学检查

将患病蝌蚪剪开腹部并去除尾部, 置于体积分数为 10% 的中性福尔马林固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 中性树胶封片后光学显微镜下观察其主要病变。

1.4 病毒分离

取患病蝌蚪内脏组织剪碎后放入组织匀浆器内, 按 1:5 的体积比加入混有抗生素的 M199 培养基 (青链霉素活性为 1 000 U·mL⁻¹) 于冰上均浆成悬液。4 ℃ 下放置过夜后, 8 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 经 0.22 μm 孔径滤器过滤后, 接种于鲤鱼上皮瘤 (*Epithelioma papulosum cyprini*, EPC) 细胞, 25 ℃ 培养, 逐日观察细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE)。待 80% 以上细胞出现病变后, 收获病毒保存

于-80 °C 备用，并按照 Reed-Muech 法^[13]计算病毒半数感染量 (TCID₅₀)。

1.5 人工感染试验

人工感染试验在室内塑料水族箱中进行，水温 (22±2) °C，健康黑斑蛙蝌蚪室内暂养 7 d 后，分为试验组与对照组，每组 20 尾。试验组：取 5 L 曝气水与 10 mL 病毒液 (TCID₅₀=10⁸ mL⁻¹) 混匀，然后将 20 尾蝌蚪放入其中浸泡 8 h，浸泡结束后用干净的曝气水将其全部更换；对照组：按试验组同等操作，但将加入的 10 mL 病毒液换为 10 mL M199 培养液。试验期 3 周，每日观察蝌蚪的发病、死亡情况。

1.6 电镜观察

EPC 细胞接种病毒后，待出现 50 % 以上 CPE 时吸去细胞维持液，加入体积分数为 2.5% 的戊二醛进行固定，3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，收集细胞沉淀经 PBS 溶液重悬洗涤后，10 000 r·min⁻¹ 离心 30 min，重新加入体积分数为 2.5% 的戊二醛于 4 °C 条件下避光固定，然后按常规方法经固定、脱水、包埋后进行切片，最后透射电镜观察。

1.7 MCP 基因的 PCR 检测

参考 Mao 等^[14]针对蛙病毒 MCP 基因 5' 端 500 bp 大小片段设计的特异性引物进行 PCR 扩增，上游引物：5'-GACTTGGCCACTTATGAC-3'；下游引物：5'-GTCTCTGGAGAAGAA-3'。DNA 扩增模板样本来源包括自然患病蝌蚪组织匀浆液、自然患病蝌蚪饲养水源样本（样本的制备参考吴楚等^[15]的 NaCl-AlCl₃·6H₂O 沉淀法）以及已分离的病毒液，然后通过 DNA 提取试剂盒提取 DNA 作为扩增模板。PCR 反应体系 (12.5 μL)：8.5 μL ddH₂O, 2 μL 引物，2 μL 模板 DNA。反应条件：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 1 min, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min，共 30 个循环；最后，72 °C 延伸 10 min。随后用 10 g L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物的大小。

1.8 MCP 基因克隆测序及系统发育分析

参照合成 Huang 等^[16]扩增蛙病毒 MCP 全基因序列引物，上游引物：5'-ACAGTCACCGTGTATCTTA-3'；下游引物：5'-GGAAAAGACTTGCCTGAA-3'。扩增的 DNA 模板为采用 DNA 提取试剂盒从已分离的病毒液中提取的 DNA。PCR 反应体系和条件同“1.7”。

10 g L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物大小，并将产物纯化后送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。测序结果提交 GenBank，并根据 NCBI 中收录的其他虹彩病毒 MCP 基因序列，采用 Mega5.0 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 临床特征与细菌学检查

黑斑蛙患病蝌蚪主要表现为摄食减少甚至不摄食、活动减少、游动缓慢，并可见腹部肿胀，下颌与腹部等体表出血（图 1），发病水温约 22 °C，病程较急，1 周内蝌蚪的死亡率达约 90%。剖检可见腹腔内有淡黄色腹水，肝肿大充血，肠道空虚且腔内充有大量黏液。



箭头所示位置可见腹部肿胀，体表多处出血

The arrowhead areas show swollen abdomen and hemorrhage on body surface

图 1 黑斑蛙患病蝌蚪临床症状

Fig. 1 Clinical symptoms of diseased tadpoles of *Rana nigromaculata*

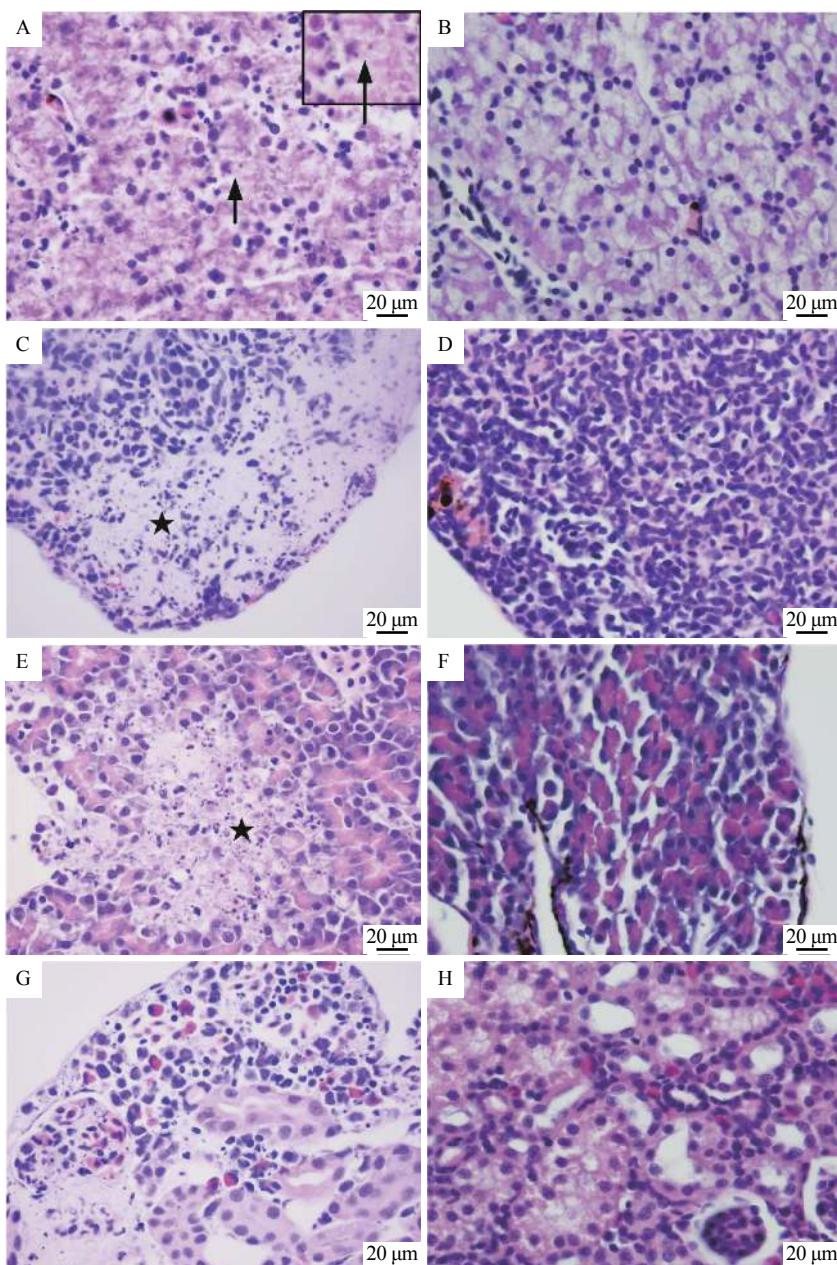
患病蝌蚪肝脏与腹水的组织涂片，经革兰染色后镜检未观察到细菌，且划线接种的 BHI 琼脂平板，在 28 °C 培养 48 h 后未发现细菌生长。

2.2 组织病理学检查

组织病理检查发现黑斑蛙患病蝌蚪肝脏、肾脏、脾脏、胰腺等组织均发生明显变性、坏死变化，且一些病变的细胞胞浆内见嗜碱性包涵体（图 2）。肝细胞肿胀，灶性坏死，一定量淋巴细胞浸润，在部分病变的细胞浆内见嗜碱性包涵体（图 2A）；脾脏淋巴细胞坏死，实质内出现大量核碎片，脾实质内淋巴细胞数量明显减少（图 2C）；胰腺上皮内酶原颗粒减少，胰腺灶性坏死（图 2E）；肾间造血组织坏死，细胞核表现为浓缩、裂解与溶解消失，肾小球坏死（图 2G），肾小管上皮细胞变性，甚至坏死，固有结构消失。

2.3 病毒分离

黑斑蛙患病蝌蚪组织匀浆液接种 EPC 细胞后，连续盲传 3 代都出现稳定明显 CPE 现象，感染初期细胞边缘皱缩、变圆变亮，然后逐渐脱落，形成大量空斑，接种 4 d 后对照组细胞生长正常（图 3A），而 EPC 细胞单层呈明显破渔网状（图 3B）。分离病毒暂命名为黑斑蛙蛙病毒 (*R. nigromaculata ranavirus*, RNRV)，按照 Reed-Muech 法测定其在 25 °C 条件下接种 EPC 细胞产生 80% CPE 时 TCID₅₀ 为 10⁸ mL⁻¹。

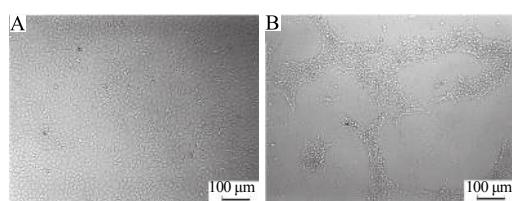


A: 肝细胞灶性坏死, 胞浆内见嗜碱性包涵体(→); C: 脾淋巴细胞坏死, 数量明显减少(★); E: 胰腺灶性坏死(★); G: 肾小球坏死, 肾间造血组织坏死; B、D、F 和 H 分别为健康蝌蚪的肝、脾、胰腺和肾组织

A: Focal necrosis in hepatocytes, basophilic inclusions in intracytoplasm (→); C: Lymphocytes necrosis and reduction in spleen (★); E: Focal necrosis in pancreas (★); G: Necrosis of glomerulus and interrenal hematopoietic tissue; B, D, F and H are liver, spleen, pancreas and kidney tissues of healthy tadpoles respectively

图2 黑斑蛙患病蝌蚪的组织病理学损伤

Fig. 2 Histopathological lesions of diseased tadpoles of *Rana nigromaculata*



A: 对照组细胞; B: 接种病毒 4 d 后细胞

A: Control cells; B: Cells four days after virus infection

图3 黑斑蛙患病蝌蚪组织匀浆液感染 EPC 引起的细胞病变

Fig. 3 CPE produced by inoculation of EPC cells with tissue filtrate from diseased tadpoles of *Rana nigromaculata*

2.4 人工感染试验

试验蝌蚪浸泡感染 3 d 后出现食欲减退, 游动缓慢现象, 5 d 后开始出现死亡, 第 7—14 天为死亡高峰期, 此时累计死亡 15 尾, 随后感染蝌蚪死亡趋于缓和, 直至人工感染 21 d 后, 共死亡 16 尾, 累计死亡率 80%, 对照组全部存活无异常(图 4)。试验组感染蝌蚪发病症状与自然患病蝌蚪临床表现相似, 腹部肿胀明显, 剖检腹腔内有淡黄色腹水, 肝脾大充血, 肠腔内充有大量黏液。

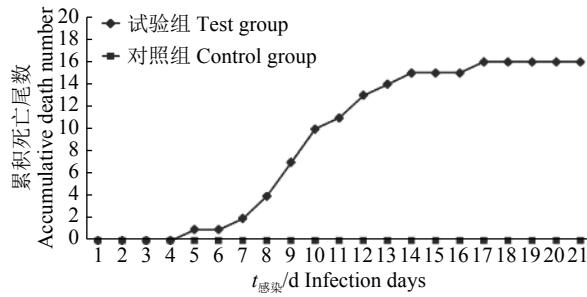
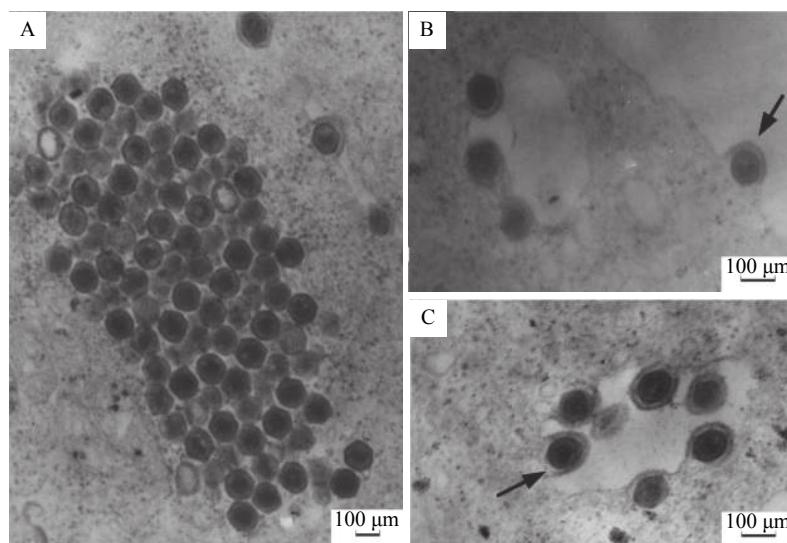


图 4 人工感染试验结果

Fig. 4 Result of artificial infection experiment



A: 排列成晶格状的虹彩病毒样粒子; B: 病毒以出芽方式从细胞膜释放并获得外膜 (→); C: 细胞质空泡内可见病毒粒子 (→)

A: Iridovirus-like particles arrayed in crystalline; B: Virion is budding through the cell membrane to obtain envelope (→); C: Virus particle in the cytoplasmic vacuole

图 5 电镜观察感染 EPC 细胞的虹彩病毒样粒子

Fig. 5 Electron micrograph of the iridovirus-like particles infecting EPC cells

2.6 MCP 基因的 PCR 检测

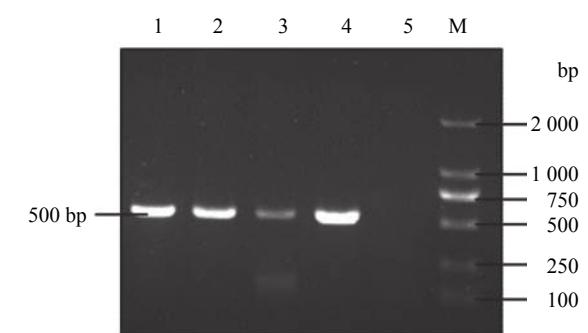
针对蛙病毒部分 *MCP* 基因进行 PCR 扩增, 结果显示自然患病蝌蚪、已分离的病毒液以及自然患病蝌蚪饲养水源样本在琼脂糖凝胶中均检测到约 500 bp 的清晰条带, 与预期目的片段大小基本一致 (图 6)。将扩增条带测序结果在 GeneBank 上进行比对, 发现该序列与已知蛙病毒属病毒如 FV3(KJ175144, FJ459783)、甲鱼虹彩病毒 (Soft-shelled turtle iridovirus, STIV, EU627010, GQ144408)、RGV(JQ654586, KY264205) 的 *MCP* 基因具有高达 99% 的相似性, 由此可证明该病毒为虹彩病毒科蛙病毒属成员。

2.7 MCP 基因克隆测序及系统发育分析

采用扩增蛙病毒 *MCP* 基因全序列的引物 PCR 扩增获得预期目的片段, 对该扩增产物纯化后测序, 基因全长 1 392 bp, 其 GenBank 登录号为 MF359927。对该序列与其他 14 种已分离虹彩病毒

2.5 电镜观察

对接种病毒并出现 CPE 的 EPC 细胞进行超薄电镜切片观察, 可见大量正六边形、有囊膜, 对角线直径为 (135 ± 8) nm (图 5) 的病毒颗粒。胞浆内的病毒粒子规则排列呈晶格状结构 (图 5A), 成熟的病毒颗粒以出芽的方式通过细胞膜被释放到细胞外 (图 5B), 病毒的复制与释放使细胞受损, 细胞质严重空泡化 (图 5C)。根据以上病毒形态学特征, 初步推断该病毒为虹彩病毒样病毒。



M: DL2000 DNA Marker; 1: 自然患病蝌蚪组织; 2: 分离病毒液; 3: 水源样本; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1: Tissue sample of diseased tadpole; 2: Isolated virus fluid; 3: Water sample; 4: Positive control; 5: Negative control

图 6 部分 *MCP* 基因的 PCR 检测结果Fig. 6 Electrophoresis of PCR-product of partial *MCP* genes

的 *MCP* 基因构建系统发育树, 结果发现该分离株归为蛙病毒属 FV3 病毒类群 (图 7), 且在进化关系上与同样分离自中国的 RGV 和 STIV 的亲缘关系最近。

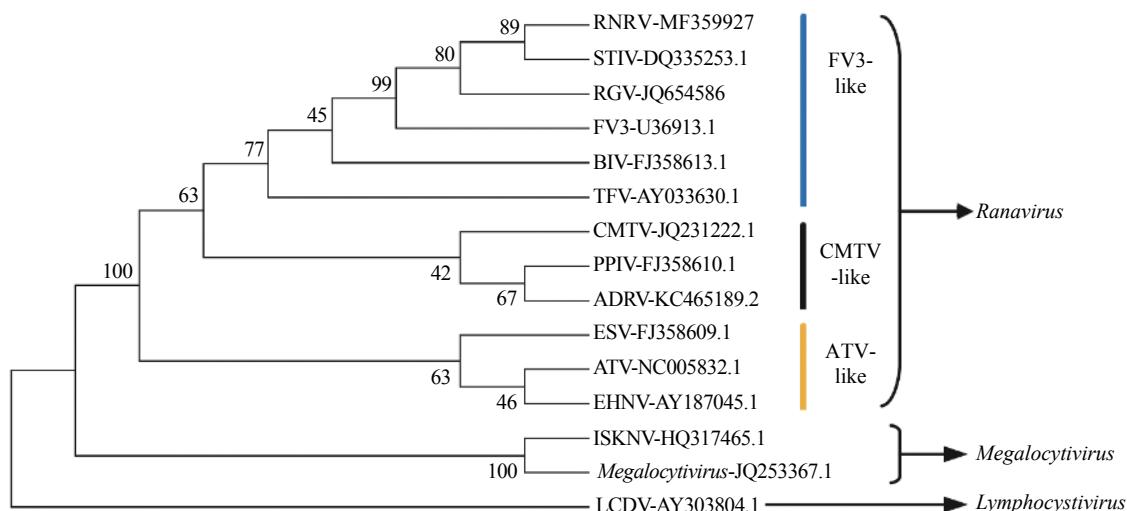


图 7 基于 *MCP* 基因序列的不同虹彩病毒株的系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of different ranavirus strains based on *MCP* gene sequences

3 讨论与结论

自 20 世纪 80 年代以来, 关于蛙病毒感染各类物种群的报道屡见不鲜, 其中不乏在生物保护与国际贸易上具有重要价值的鱼类、爬行类和两栖类, 这些动物种群数量的大量下降与蛙病毒感染的密切联系引发了全球性的关注^[17]。对于近 30 年蛙病毒感染的全球的出现的原因到底是病毒毒性的增强或是病毒的传播能力提高(通过自然或与人类相关的活动), 又或是诊断和检测能力的提升呢? 现在还没有定论。但不论如何, 蛙病毒如今已被认为是一种能够感染多种变温脊椎动物(鱼类、爬行类、两栖类)的病原体, 并引发很高发病率与死亡率。

本研究发现 RNRV 感染黑斑蛙蝌蚪具有发病迅速、死亡率高的特点, 患病蝌蚪腹部肿胀, 下颌与腹部等体表出血, 剖检见腹腔内有淡黄色腹水, 肝肿大充血, 肠道空虚且腔内充有大量黏液。对患病组织进行病理切片观察, 发现其肝、脾、肾、胰腺组织中均显示有明显的变性和坏死病灶, 同时在部分病变的细胞胞浆内见嗜碱性包涵体。这些临床特征与组织病理学变化表明了 RNRV 对宿主多器官的损伤与系统性的感染, 与其他蛙类感染蛙病毒的症状与病理变化基本一致^[18]。刘丹等^[19]和 Cheng 等^[20]报道肝、脾、肾是蛙病毒在感染两栖类或其他动物时主要靶器官, 其造血组织、血管内皮细胞和上皮细胞的出血、坏死, 以及胞浆内含有嗜碱性包涵体是常见的微观变化。此外通过对 RNRV 病毒粒子的电镜观察与病毒基因的特异性 PCR 检测, 其形态学特征与其他蛙病毒属病毒高度相似, 其 *MCP* 基因的进化分类结果也显示该病毒归为蛙病毒属,

且与 FV3 病毒类群具有更为紧密的进化关系, 因此综合判断该病毒为虹彩病毒科蛙病毒属成员。

在此事件中, 发病蝌蚪是从广东省购回的种蛙产卵孵化而来, 在蝌蚪发病期间, 种蛙未出现任何死亡。对蛙病毒的特异性 PCR 检测结果显示, 种蛙和蛙卵样本均呈阴性, 而水源样本却呈蛙病毒阳性。根据现场调查, 养殖场蝌蚪饲养水源来自未经任何处理的河水, 而河的上游同样有几个蛙类养殖场。因此, 本次养殖黑斑蛙蝌蚪大规模死亡的原因可能是由水源中的蛙病毒通过水平传播感染蝌蚪所致。有报道称, 蛙病毒具有很强的环境适应能力, 它能长时间的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存在的敏感宿主造成威胁^[21-22], 在养殖过程中蝌蚪由于环境应激或发育等因素导致自身免疫水平低从而引起感染致病; 同时蝌蚪具有同类相食的习性, 濒死或死亡蝌蚪往往会引起同类的撕咬分食, 而致病毒在种群中传播^[23-24]。由此可见, 在养殖过程中对水源的消毒处理以及及时清除与无害化处理病死动物在防止蛙病毒的发生与传播中具有重要的意义。

主要衣壳蛋白是蛙病毒属病毒主要的结构蛋白, 其基因序列的高度保守性使其常用于对不同株的蛙病毒的区分以及进化关系的分析。本研究通过对 RNRV *MCP* 基因的序列比对发现其与 RGV、FV3、STIV 等其他蛙病毒属成员相似度达 99% 以上, 且以 *MCP* 基因构建系统发育树结果显示其与以上几种蛙病毒都归属于蛙病毒中的 FV3 病毒类群。RGV、STIV 以及此次分离的 RNRV 都分离自我国的两栖类, 其中 RGV 是最早于 1996 年分离自美国进口的沼泽绿牛蛙, 也是我国第 1 株报道的蛙

病毒, 本研究中发现 RNRV 与它在进化关系上具有较近的亲缘关系, 因此, 对于 RNRV 是否是由 RGV 进化而来值得进一步的研究。

参考文献:

- [1] WILLIANS T, BARBOSASOLOMIEU V, CHINCHAR V G. A decade of advances in iridovirus research[J]. *Adv Virus Res*, 2005, 48(65): 173-178.
- [2] CHINCHAR V G. Ranaviruses (family Iridoviridae): Emerging cold-blooded killers[J]. *Arch Virol*, 2002, 147(3): 447-470.
- [3] KOLBY J E, SMITH K M, BERGER L, et al. First evidence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and ranavirus in Hong Kong amphibian trade[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 907-913.
- [4] 张奇亚, 李正秋. 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, 12(4): 390-392.
- [5] 王晓红, 翁少萍, 何建国. 虎纹蛙病毒体外培养及其理化特性[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 363-367.
- [6] GENG Y, WANG K Y, ZHOU Z Y, et al. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese Giant Salamanders (*Andrias davidianus*)[J]. *J Comp Pathol*, 2011, 145(1): 95-102.
- [7] 马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 MCP 基因序列分析及 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1149-1156.
- [8] XU K, ZHU D Z, WEI Y, et al. Broad distribution of ranavirus in free-ranging *Rana dybowskii* in Heilongjiang, China[J]. *Ecohealth*, 2010, 7(1): 18-23.
- [9] 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, 11(2): 135-139.
- [10] 范玉蕾, 耿毅, 周燕, 等. 一株似鮀高原鳅源蛙病毒的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 556-562.
- [11] 汪建国. 两栖、爬行类疾病及其防治技术 (1): 蛙病[J]. 渔业致富指南, 2016, 15(21): 61-66.
- [12] 武正军, 李义明. 两栖类种群数量下降原因及保护对策[J]. 生态学杂志, 2004, 23(1): 140-146.
- [13] REED L, MUENCH H. A simple, method of estimating 50 percent end point[J]. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1938, 22(1): 112-117.
- [14] 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.
- [15] 吴楚, 吴宗斌. 水中病毒的检测方法研究[J]. 现代农业科学, 2008, 10(8): 48-50.
- [16] HUANG X H, HUANG Y H, YUAN X P, et al. Electron microscopic examination of the viromatrix of *Rana grylio* virus in a fish cell line[J]. *J Virol Methods*, 2006, 133(2): 117-123.
- [17] CHINCHAR V G, HYATT A, MIYAZAKI T, et al. Family Iridoviridae: Poor viral relations no longer[J]. *Curr Top Microbiol*, 2009, 328(1): 123-170.
- [18] BAYLEY A E, HILL B J, FEIST S W. Susceptibility of the European common frog *Rana temporaria* to a panel of ranavirus isolates from fish and amphibian hosts[J]. *Dis Aquat Organ*, 2013, 103(3): 171-175.
- [19] 刘丹, 耿毅, 汪开毓, 等. 大鲵蛙病毒感染大鲵的动态病理损伤及病原的组织分布[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 146-155.
- [20] CHENG K, JONES M E, JANCOVICH J K, et al. Isolation of a Bohle-like iridovirus from boreal toads housed within a cosmopolitan aquarium collection[J]. *Dis Aquat Organ*, 2014, 111(2): 139-152.
- [21] ROBERT J. Emerging ranaviral infectious diseases and amphibian decline[J]. *Diversity*, 2010, 2(3): 314-330.
- [22] BRENES R, GRAY M J, WALTZK T B, et al. Transmission of ranavirus between ectothermic vertebrate hosts[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 924-931.
- [23] BRUNNER J L, SCHOCK D M, COLLINS J P. Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus[J]. *Dis Aquat Organ*, 2007, 77(2): 87-95.
- [24] PEARMAN P B, GARNER T W J, STRAUB M, et al. Response of the Italian agile frog (*Rana latastei*) to a ranavirus, frog virus 3: A model for viral emergence in naive populations[J]. *J Wildlife Dis*, 2004, 40(4): 660-669.

【责任编辑 庄 延】