

田思璐,袁羽,徐乐,等.1株沼泽绿蛙源蛙病毒的分离鉴定及系统发育分析[J].华中农业大学学报,2025,44(2):258-264.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.02.026

1株沼泽绿蛙源蛙病毒的分离鉴定及系统发育分析

田思璐¹,袁羽¹,徐乐¹,欧阳萍¹,陈德芳²,黄小丽²,耿毅¹

1. 四川农业大学动物医学院,成都 611130; 2. 四川农业大学动物科技学院,成都 611130

摘要 为探究四川某养殖场沼泽绿蛙(*Rana grylio*)暴发性高死亡率疾病的病因,对病蛙进行病理学检查和病原分离,并结合电镜观察、PCR检测和系统发育分析对分离病原进行鉴定。患病蛙主要病症为皮肤溃疡与四肢肿胀;剖检见肝、脾与肾肿大。组织病理学观察见肝、脾、肾与肠道等组织器官发生变性、坏死与炎症反应。接种病料的鲤鱼上皮瘤细胞25℃培养4d呈典型细胞病变效应,TCID₅₀为10^{4.12}/0.1 mL。电镜观察到大量正六边形、对角线直径约165 nm的病毒粒子呈晶格状排列。对内脏组织及接种细胞进行蛙病毒主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因的特异性PCR检测,结果均为阳性。基于MCP基因全序列的同源性和遗传进化分析显示,分离病毒与蛙病毒属病毒相似性在99%以上,且属于FV3类群。以上结果表明分离病毒(TSL210813)为蛙病毒,是本次沼泽绿蛙疫病的病因。

关键词 沼泽绿蛙; 蛙病毒; FV3; 蛙病毒主要衣壳蛋白基因; 病理损伤

中图分类号 Q943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)02-0258-07

沼泽绿蛙(*Rana grylio*),又名美国青蛙,属两栖纲、无尾目、蛙科,原产于北美洲,1987年引进我国,由于其生长速度快、易饲养管理等优点迅速推广到全国范围^[1]。沼泽绿蛙营养丰富,其肉质具有高蛋白、低脂肪、低胆固醇的特点,已成为我国淡水养殖的重要经济动物之一^[2]。2021年中国淡水蛙类养殖产量高达17万t,较2020年增长26%^[3],随着蛙类养殖规模的快速发展与养殖密度的加大,疾病逐渐成为制约蛙类养殖的重要因素之一,不断有蛙病毒(ranavirus)^[4-6]、米尔伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)^[7]、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[5]、荧光假单胞菌(*Pseudomonas baderia*)^[8]与多种寄生虫^[9]感染致病的报道,其中蛙病毒感染常常造成严重危害。

蛙病毒属于虹彩病毒科,是一类大型双链DNA病毒,主要危害鱼类、两栖动物和爬行动物。自1966年从北方豹蛙(*Lithobates pipiens*)中分离出第1株蛙病毒FV3以来^[10],其宿主范围逐渐扩大,到目前为止已知蛙病毒可感染53个科的175种变温脊椎动物^[4]。基于蛙病毒26个核心基因的系统发育分析发现蛙病

毒属分为FV3样病毒、CMTV样病毒、ATV样病毒和SGIV样病毒4个类群。不同类群的病毒感染宿主范围有所不同,SGIV样病毒主要感染鱼类,CMTV样病毒偏好感染两栖类,ATV样病毒既感染两栖类也感染鱼类,FV3样病毒则对两栖类、鱼类、爬行类3类动物均可感染^[4]。但最近的研究也发现蛙病毒属应还有不同于上述4个类群基因特征的新类群^[11]。四川是蛙类养殖与消费大省,尽管目前已有蛙病毒感染黑斑蛙致病的报道^[6],但对沼泽绿蛙尚无确切的危害证据,为此,本研究对2021年8月四川某养殖场的沼泽绿蛙以体表溃疡、出血及高死亡率为特征的疑似蛙病毒感染的病例进行病理学检查和病原分离,并结合电镜观察、PCR检测和系统发育分析对分离病原进行鉴定,以期明确其病因。

1 材料与方法

1.1 病料与主要试剂

患病沼泽绿蛙由四川德阳某养殖场送检,体质量150~250 g。M199和胎牛血清(FBS)购自Hy-

收稿日期:2024-02-05

基金项目:四川省自然科学基金项目(24NSFSC0858);四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目(SCCXTD-25-15);中央引导地方发展科技项目(2024ZYD0317)

田思璐, E-mail: tiansilu2023@126.com

通信作者:耿毅, E-mail: gengyisicau@126.com

Clone公司,DNA提取试剂盒购自TaKaRa公司,Mix-reaction buffer、DNA Marker等购自宝生物工程(大连)有限公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 患病蛙病症及细菌学检查

仔细检查病蛙的外部情况后,无菌环境下进行剖检并拍照记录。将腹水、肝、脾、肾组织划线接种BHI琼脂平板,28℃培养24~48 h,观察细菌生长情况。

1.3 组织病理学检查

将病蛙的肌肉、肝、脾、肾、肺与肠等组织置于4%的福尔马林溶液中固定,常规石蜡切片,经苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,H.E)染色,中性树胶封片后光学显微镜下观察其主要病变并拍照。

1.4 病毒分离和滴度测定

参考牟维豪等^[6]的方法,取病蛙肝、脾、肾组织匀浆后,经0.22 μm滤膜过滤后,取1 mL匀浆接种鲤鱼上皮瘤(epithelioma papulosum cyprini,EPC)细胞,25℃恒温培养,每天观察直至出现细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)。同时设置正常细胞为对照组。待出现80% CPE时,-80℃和4℃反复冻融3次,8 000 r/min离心30 min取上清即为病毒液,-80℃保存备用。采用Reed-Muench法计算病毒半数感染量(TCID₅₀)。

1.5 透射电镜观察

参照张丽娟等^[12]的方法,用细胞刮刀收集接种病毒后70%细胞出现CPE的EPC细胞,10 000 r/min离心10 min弃上清,3%戊二醛固定后,按常规方法经脱水、包埋后切片,进行透射电镜观察。

1.6 蛙病毒MCP基因的特异性PCR检测

取病蛙的组织磨样液、收取的病毒液按照DNA提取试剂盒说明书提取DNA作为模板。参考Mao等^[13]合成针对蛙病毒主要衣壳蛋白(major nucleocapsid protein,MCP)基因高度保守片段的特异性引物(F:5'-GACTTGGCCACTTATGAC-3';R:5'-GTCTCTGGAGAAGAA-3'),进行PCR扩增,预期扩增片段为500 bp。PCR反应体系(25 μL)为:12.5 μL Taq聚合酶,8.5 μL ddH₂O,1 μL上游引物,1 μL下游引物,2 μL模板DNA。反应条件为:95℃预变性3 min;95℃变性15 s,54℃退火15 s,72℃延伸15 s,共30个循环;最后,72℃延伸5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

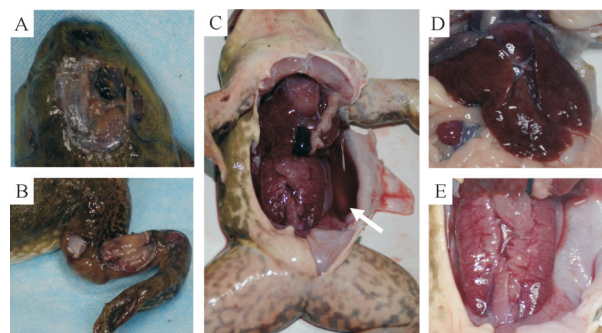
1.7 MCP基因开放阅读框全长的克隆测序及系统发育分析

采用Huang等^[14]设计的扩增蛙病毒MCP基因ORF区全长序列引物(F:5'-ACAGTCACCGTG-TATCTTA-3',R:5'-GGAAAAGACTTTGC-GCTGAA-3'),预期扩增片段为1 500 bp。提取的病毒液DNA为模板,PCR反应体系同本文“1.6”。反应条件为:95℃预变性3 min;95℃变性15 s,54℃退火15 s,72℃延伸30 s,共30个循环;最后,72℃延伸5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测,将符合预期片段1 500 bp大小的PCR产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。将测序结果上传至GenBank,并下载NCBI中其他虹彩病毒MCP基因序列,使用Mega 7.0进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 患病蛙病症与细菌学检查

病蛙表现为精神沉郁、食欲不振、行为迟缓,眼球突起,角膜浑浊,下颌、腹部等体表分布出血点,头部、腿部皮肤出现严重溃疡(图1A、B),四肢肿胀。剖检见腹腔内红色积液(图1C),肝、脾、肾肿大(图1D、E),肺与胃肠充血。患病蛙的腹水、肝、脾、肾划线接种BHI平板,28℃培养48 h后未观察到细菌生长。



A: 头部溃疡;B: 腿部溃疡;C: 腿部肿胀,腹腔内红色腹水(→);D: 肝、脾肿大;E: 肾肿大。A: Ulceration on head; B: Ulceration on leg; C: Swelling of limbs, red ascitic fluid (→); D: Enlarged liver and spleen; E: Enlarged kidney.

图1 患病蛙主要病症

Fig.1 Clinical symptoms of diseased *Rana grylio*

2.2 组织病理学检查

组织病理学检查发现患病蛙肌肉、肝脏、脾脏、肾脏等组织均发生明显变性、坏死与炎症反应(图2)。肌肉纤维变性肿胀,部分肌纤维肌浆凝固或溶解,大量淋巴细胞浸润;肝索结构紊乱,肝细胞肿胀、

坏死,并伴有炎性细胞浸润(图2B);脾淋巴细胞显著减少(图2D);肾小球血管内皮细胞与系膜细胞坏死,肾小球萎缩甚至消失,肾小管上皮细胞变性坏死、管内有大量渗出物,肾间质出血、炎性细胞浸润,甚至发生灶性坏死(图2F);肠上皮细胞变性、坏死、脱落,固有膜内多量淋巴细胞浸润(图2H);肺囊上皮细胞变性、坏死、脱落,固有膜与肌层有大量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润(图2J)。同时在肝、脾、肾小管上皮细胞内均发现嗜碱性胞浆包涵体(图2B、D)。

2.3 病毒分离与滴度测定结果

25℃培养EPC细胞,对照组细胞正常生长(图3A),病蛙组织研磨液接种EPC细胞,25℃培养4d后部分细胞变圆皱缩,开始脱落;7d后接毒细胞大量死亡脱落,呈破鱼网状(图3B)。收毒后再次接种EPC细胞,25℃培养3d后出现相同的CPE。将病毒液 $10^{-1} \sim 10^{-11}$ 稀释后加入96孔板,培养7d。采用Reed-Muech法计算其病毒滴度为 $10^{4.12}$ TCID₅₀/0.1 mL。

2.4 电镜观察

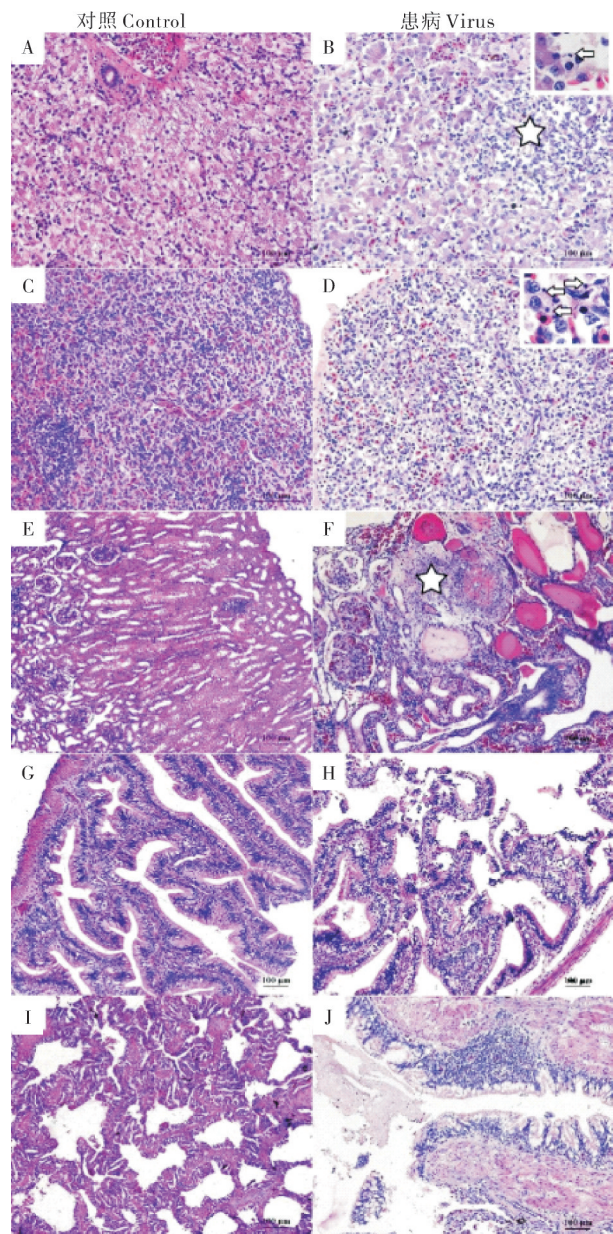
将表现出典型CPE的EPC细胞制备超薄切片进行透射电镜观察。可见大量处于不同时期、对角线直径为 (165 ± 8) nm的病毒颗粒。胞浆内大量成熟的病毒粒子聚集呈晶格状排列(图4A)或游离分布(图4B),部分病毒粒子通过出芽的方式从细胞膜释放并获得外膜(图4B),蛙病毒感染EPC细胞导致细胞坏死,细胞核固缩,染色质凝聚(图4C),细胞核染色质发生浓缩、核边移(图4D)。上述观察结果与蛙病毒粒子特征一致,推测其是蛙病毒属成员。

2.5 蛙病毒MCP基因的特异性PCR检测结果

针对病蛙的组织匀浆与收取的病毒液基于蛙病毒MCP基因的特异性PCR检测结果显示患病蛙的组织匀浆、收取的病毒液均扩增出约500 bp预期大小片段(图5A),表明本分离株为虹彩病毒科蛙病毒属成员。

2.6 MCP基因的PCR扩增测序与系统发育分析

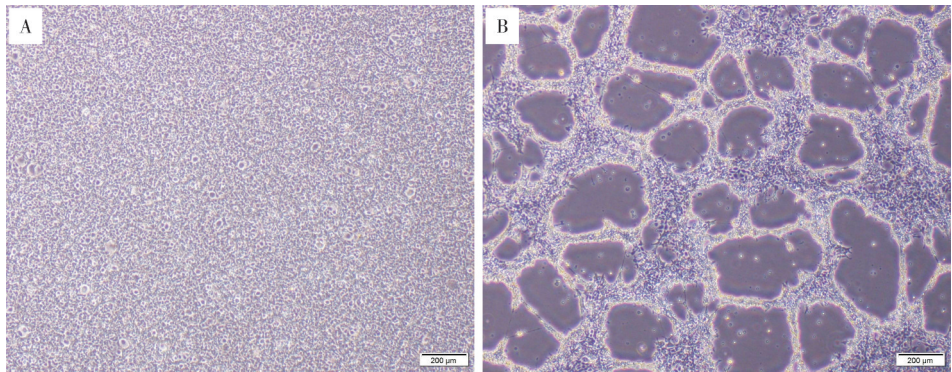
PCR扩增出预期1500 bp大小的片段(图5B),测序后上传GenBank(登录号:OQ632452)。该序列与GenBank中虹彩病毒科、蛙病毒属的蛙虹彩病毒(*Rana grylio* iridovirus, RGV, JQ654586)、中华鳖虹彩病毒(soft-shelled turtle iridovirus, SSTV, EU627010)等的MCP基因相似性高达99%。在采用Mega 7.0基于MCP基因全序列构建的系统发育树上,分离株TSL210813与FV3类群的中华鳖虹彩



A: 对照组肝脏; B: 肝细胞变性, 灶性坏死(☆), 胞浆内嗜碱性包涵体(→); C: 对照组脾脏; D: 脾淋巴细胞减少, 胞浆内嗜碱性包涵体(→); E: 对照组肾脏; F: 肾灶性坏死(☆), 肾小球坏死、萎缩; G: 对照组肠; H: 肠上皮细胞坏死、脱落; I: 对照组肺; J: 肺囊上皮细胞坏死, 炎性细胞浸润。A: Control liver; B: Degeneration in hepatocytes, focal necrosis in liver(☆), basophilic inclusions in intracytoplasm(→); C: Control spleen; D: Lymphocytes reduction in spleen, basophilic inclusions in intracytoplasm(→); E: Control kidney; F: Focal necrosis in kidney(☆), glomerular necrosis and atrophy; G: Control intestine; H: Necrosis and shedding of epithelia in intestine; I: Control lung tissue; J: Necrosis of pulmonary epithelial, infiltration of a large number of inflammatory cells.

图2 患病蛙的组织病理损伤

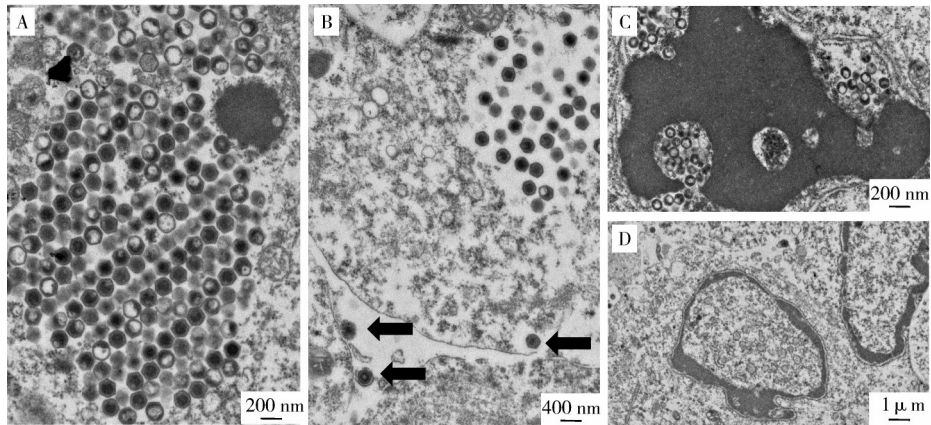
Fig.2 Histopathological lesions of diseased *Rana grylio*



A: 正常细胞;B: 接种 7 d 的细胞。A: Control cells; B: Cells after virus infection.

图 3 患病蛙组织匀浆接种 EPC 细胞引起的细胞病变

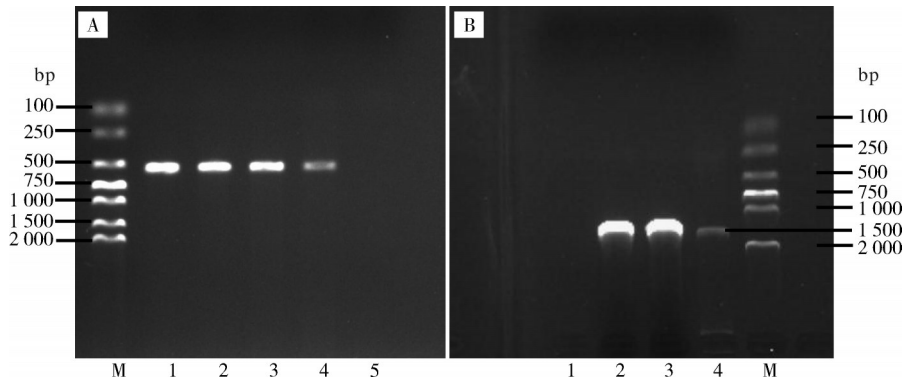
Fig.3 CPE produced by inoculation of EPC cells with tissue filterate from diseased *Rana grylio*



A: 晶格状排列的病毒粒子;B: 病毒粒子出芽;C: 细胞核固缩, 染色质凝聚;D: 细胞核染色质浓缩、边移。A: Virion arrayed in crystal-lines; B: Virion is budding through the cell membrane; C: Nuclear pyknosis, chromatin condensation; D: Nuclear chromatin condensation, edge accumulation.

图 4 电镜观察 EPC 细胞培养分离的蛙病毒样病毒粒子

Fig.4 Electron micrograph of the ranavirus-like particles infecting EPC cells



A: 基于 MCP 基因的特异性 PCR 检测 (M: DNA 分子质量标准; 1: 阳性对照; 2~3: 分离的病毒液; 4: 病蛙的组织匀浆; 5: 阴性对照); B: MCP 基因 ORF 区全长序列 PCR 扩增 (M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 分离的病毒液; 3: 病蛙的组织匀浆; 4: 阳性对照)。A: MCP gene-specific PCR (M: DL2000 DNA Maker; 1: Positive control; 2-3: Isolated virus fluid; 4: Tissue sample of diseased *Rana grylio*; 5: Negative control); B: Amplification of full length MCP ORF by PCR (M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: Isolated virus fluid; 3: Tissue sample of diseased *Rana grylio*; 4: Positive control).

图 5 MCP 基因的 PCR 检测与扩增

Fig.5 Electrophoresis of PCR product of MCP gene

病毒(SSTV, DQ335253、EU627010)、蛙虹彩病毒(RGV, JQ654586)、黑斑侧褶蛙虹彩病毒(*Rana nigromaculata* ranavirus, RNRV, MF359927)的亲缘关系较为接近,表明分离株 TSL210813 为蛙病毒属 FV3 病毒类群(图6)。

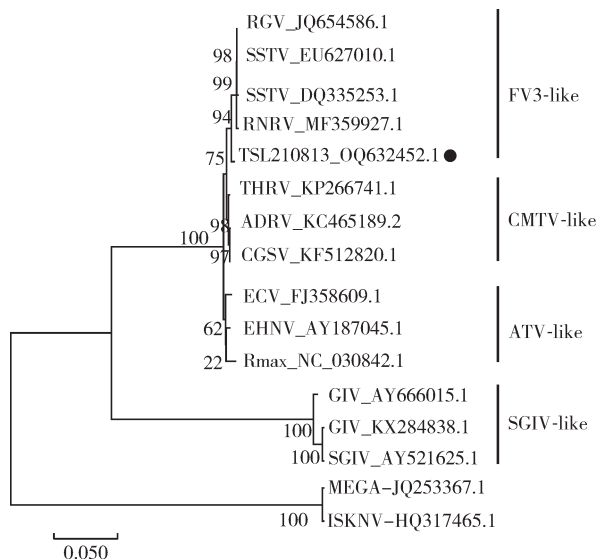


图6 基于MCP基因构建的不同蛙病毒株的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of different ranavirus strains based on MCP gene sequences

3 讨论

蛙病毒病作为世界动物卫生组织(world organization for animal health, OIE)法定报告疾病,是变温脊椎动物中具有重要经济和生态意义的主要疫病之一^[15],其对两栖类种群的危害尤其严重。报道两栖类蛙病毒被怀疑是造成105种两栖动物面临物种灭绝的怀疑对象^[16],同时也是养殖蛙类健康的重要威胁^[4]。在我国,自1996年张奇亚等^[17]从患有传染性溃疡综合征的沼泽绿蛙中分离出沼泽绿蛙病毒(*Rana grylio virus*, RGV)以来,相继有牛蛙(*Rana cates-biana* Shaw)^[12]、黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)^[6]等多种养殖蛙感染蛙病毒病的报道。在早期报道中,蛙病毒暴发常见于蝌蚪和变态的幼蛙,在几天内可造成90%的死亡率^[18],成年蛙通过CD8 T细胞和抗蛙病毒抗体等介导的先天性免疫和适应性免疫在2~3周内清除病毒而不发病^[19]。近年来成年蛙感染蛙病毒发病死亡的报道增多,程晓云等^[20]2016年从青年棘胸蛙中分离到蛙病毒,病蛙四肢肿胀或溃烂,腹部有发红充血点,人工感染试验死亡率达80%,出现与自然患病个体相似的病症表现。张丽娟等^[12]从养殖场的成年牛蛙中分离出蛙病毒RGV-F,将RGV-F人

工感染成年牛蛙4 d后死亡率为94%,展现出较强致病性。结合本研究从养殖场成年发病蛙中分离得到蛙病毒株 TSL210813,提示蛙病毒可能不再局限于危害某一特定生长时期的蛙。Hoverman等^[21]发现在养殖场中分离出的蛙病毒毒力明显高于野生株,由此推测蛙病毒可能为适应在养殖环境下宿主高密度、病原竞争与宿主的免疫而进化出更强的毒力,从而导致其危害蛙的生长时期范围扩大。

各类两栖动物感染蛙病毒最为一致的病理学变化是表皮溃疡、真皮和多脏器出血、以肾小球和肾小管为特征的多组织坏死^[18,22]。本研究中病蛙表现出头部和腿部皮肤溃烂、体表点状出血、四肢肿胀的特征,病理组织学观察结果包括肠上皮细胞的坏死脱落,肾小管上皮细胞变性、坏死,以及局限性坏死灶,一些病变细胞内出现嗜碱性包涵体,与近年报道蛙病毒感染成年蛙的病变特征基本一致^[12,20,23],因此,患病蛙体表溃疡、全身性出血与病变细胞内出现嗜碱性包涵体等病变特征可作为蛙病毒感染蛙类的重要病理学诊断依据。蛙病毒不仅能够通过水体、污染物、接触感染动物在不同变温脊椎动物之间传播,而且能在一个地点同时感染多个物种^[23]。Teacher等^[24]报道蛙病毒病反复发作导致林蛙种群丰富度下降81%。我国已有四川^[6]、福建^[12]、浙江^[20]等多地大规模暴发蛙病毒病,且有黑龙江野外林蛙感染蛙病毒流行率达42%的报道^[25]。鉴于蛙病毒在我国易感宿主的种类众多且分布广泛,其传播可能会对水产养殖经济物种及野生珍稀物种的保护造成严重影响,因此需要对暴发蛙病毒的养殖场进行严格消毒,加强防范养殖蛙外逃,同时加强对野生两栖动物的蛙病毒监控,及时准确地了解蛙病毒在我国的流行情况。

本研究中,我们首先通过检测MCP基因中对蛙病毒属高度保守的特异性片段,确认分离株为蛙病毒属病毒。基于MCP基因全序列的系统发育分析发现分离的蛙病毒株 TSL210813 为FV3类群,但该病毒在进化树中未能完全与经典的FV3病毒构成的分支聚为一簇,与同样从沼泽绿蛙中分离出的病毒株 RGV-JQ654586 距离较远,而更靠近CMTV样蛙病毒分支。依靠独特且高度保守的MCP基因对新分离的蛙病毒株进行分类学上的归类是常用且便捷的方法,但这一蛋白高度保守的性质可能会掩盖不同病毒分离株之间的差异。2017年Claytor等^[26]发现首株CMTV样病毒与FV3样病毒的重组株,且毒

力是野生FV3样病毒株的2倍。2019年加拿大分离到1株FV3蛙病毒,全基因组分析发现其与CMTV样病毒株发生同源重组,属于FV3新分支^[27]。本毒株是否发生类似的重组现象而产生新的FV3分支,需要后续基于病毒全基因组进一步分析。病毒株重组后通过获得更多毒力基因、加快病毒复制或者进行免疫逃避等方式,表现出比野生株更强的毒力,这种病毒进化带来的致病性变化是否与蛙病毒感染宿主范围与感染同一物种不同生长时期的扩展有密切关系值得进一步探索。

参考文献References

- [1] 陈素芝,傅金钟,肖茂达.我国引进蛙类的初步研究[J].动物学杂志,1993,28(2):12-14.CHEN S Z, FU J Z, XIAO M D. A preliminary study on the introduction of frogs in China[J]. Chinese journal of zoology, 1993, 28(2): 12-14 (in Chinese with English abstract).
- [2] 李燕燕.沼泽绿牛蛙皮肤抗菌肽的分离纯化与活性检测[D].南昌:南昌大学,2007.LI Y Y. Isolation and purification, biological activity of antimicrobial peptides from skin of *Rana guentheri* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007 (in Chinese with English abstract).
- [3] 王丹,吴反修,宋丹丹.2022中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2022.WANG D, WU F X, SONG D D. 2022 China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2022.
- [4] ZHANG Q Y, KE F, GUI L, et al. Recent insights into aquatic viruses: emerging and reemerging pathogens, molecular features, biological effects, and novel investigative approaches [J/OL]. Water biology and security, 2022, 1(4): 100062 [2024-02-05]. <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100062>.
- [5] 肖双燕,韦冬冬,余庆,等.广西人工养殖牛蛙嗜水气单胞菌的分离鉴定及致病力分析[J].南方农业学报,2023,54(1):303-314.XIAO S Y, WEI D D, YU Q, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Aeromonas hydrophila* from farmed bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Guangxi [J]. Journal of southern agriculture, 2023, 54(1): 303-314 (in Chinese with English abstract).
- [6] 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 W H, GENG Y, OUYANG P, 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 (in Chinese with English abstract).
- [7] LEI X P, YI G, WANG K Y, et al. *Elizabethkingia miricola* infection in Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*) [J]. Transboundary and emerging diseases, 2019, 66(2): 1049-1053.
- [8] 徐悦玉,林德,赵淑芳.棘胸蛙致病性荧光假单胞菌的分离鉴定[J].丽水学院学报,2023,45(2):17-22.XU Y Y, LIN D, ZHAO S F. Isolation and identification of pathogenic *Pseudomonas fluorescens* from *Quasipaa spinosa* [J]. Journal of Lishui University, 2023, 45(2): 17-22 (in Chinese with English abstract).
- [9] BOWER D S, BRANNELLY L A, MCDONALD C A, et al. A review of the role of parasites in the ecology of reptiles and amphibians [J]. Austral ecology, 2019, 44(3): 433-448.
- [10] GRANOFF A, CAME P E, Jr RAFFERTY K A. The isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship to the renal adenocarcinoma of the leopard frog [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1965, 126(1): 237-255.
- [11] YU X D, KE F, ZHANG Q Y, et al. Genome characteristics of two ranavirus isolates from mandarin fish and largemouth bass [J/OL]. Pathogens, 2023, 12(5): 730 [2024-02-05]. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050730>.
- [12] 张丽娟,杨金先,陈强,等.1株牛蛙虹彩病毒的分离鉴定及其致病性[J].中国兽医学报,2022,42(10):2001-2008.ZHANG L J, YANG J X, CHEN Q, et al. Isolation, identification and pathogenicity of a *Rana grylio* virus [J]. Chinese journal of veterinary science, 2022, 42(10): 2001-2008 (in Chinese with English abstract).
- [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.
- [14] 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]. Journal of virological methods, 2006, 133(2): 117-123.
- [15] BOSCH J, MORA-CABELLO DE ALBA A, MARQUÍNEZ S, et al. Long-term monitoring of amphibian populations of a National Park in northern Spain reveals negative persisting effects of ranavirus, but not *Batrachochytrium dendrobatidis* [J/OL]. Frontiers in veterinary science, 2021, 8: 645491 [2024-02-05]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645491>.
- [16] GONZÁLEZ-DEL-PLIEGO P, FRECKLETON R P, EDWARDS D P, et al. Phylogenetic and trait-based prediction of extinction risk for data-deficient amphibians [J/OL]. Current biology, 2019, 29(9): 1557-1563.
- [17] 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.ZHANG Q Y, LI Z Q, JIANG Y L, et al. Isolation of swamp green bullfrog virus and preliminary study on its cell infection [J]. Acta hydrobiologica sinica, 1996, 20(4): 390-392 (in Chinese with English abstract).
- [18] RUGGERI J, RIBEIRO L P, PONTES M R, et al. Discovery of wild amphibians infected with ranavirus in Brazil [J]. Journal of wildlife diseases, 2019, 55(4): 897-902.
- [19] LESBARRÈRES D, BALSEIRO A, BRUNNER J, et al.

- Ranavirus: past, present and future[J]. *Biology letters*, 2012, 8(4): 481-483.
- [20] 程晓云,傅秋华,王卫东,等.一株棘胸蛙源蛙病毒的分离与鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(5): 100-102. CHENG X Y, FU Q H, WANG W D, et al. Isolation and identification of a ranavirus from *Quasipaa spinosa* [J]. *Journal of Anhui agricultural sciences*, 2020, 48(5): 100-102 (in Chinese with English abstract).
- [21] HOVERMAN J T, GRAY M J, HAISLIP N A, et al. Phylogeny, life history, and ecology contribute to differences in amphibian susceptibility to ranaviruses [J]. *EcoHealth*, 2011, 8(3): 301-319.
- [22] SAUCEDO B, SERRANO J M, JACINTO-MALDONADO M, et al. Pathogen risk analysis for wild amphibian populations following the first report of a ranavirus outbreak in farmed American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) from northern Mexico [J/OL]. *Viruses*, 2019, 11(1): 26 [2024-02-05]. <https://doi.org/10.3390/v11010026>.
- [23] BRUNNER J L, STORFER A, GRAY M J, et al. Ranavirus ecology and evolution: from epidemiology to extinction [M]// GRAY M, CHINCHAR V. *Ranaviruses*. Cham: Springer, 2015: 71-104.
- [24] TEACHER A G F, CUNNINGHAM A A, GARNER T W J. Assessing the long-term impact of ranavirus infection in wild common frog populations [J]. *Animal conservation*, 2010, 13(5): 514-522.
- [25] 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.
- [26] CLAYTOR S C, SUBRAMANIAM K, LANDRAU-GIOVANNETTI N, et al. Ranavirus phylogenomics: signatures of recombination and inversions among bullfrog ranaculture isolates [J]. *Virology*, 2017, 511: 330-343.
- [27] VILAÇA S T, BIENENTREU J F, BRUNETTI C R, et al. Frog virus 3 genomes reveal prevalent recombination between ranavirus lineages and their origins in Canada [J/OL]. *Journal of virology*, 2019, 93(20): 00765-19 [2024-02-05]. <https://doi.org/10.1128/jvi.00765-19>.

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

TIAN Silu¹, YUAN Yu¹, XU Le¹, OUYANG Ping¹, CHEN Defang², HUANG Xiaoli², GENG Yi¹

1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract To explore the etiology of a serious infectious disease affecting *Rana grylio* at a farm in Sichuan Province, pathological examinations and pathogen isolation were conducted on the diseased frogs. The isolated pathogen was identified using transmission electron microscopy, PCR detection, and phylogenetic analysis. External clinical signs included limb swelling and ulcerations on the body surface. The dead frog exhibited an enlarged liver, spleen and kidney. Histopathological observations revealed that the liver, spleen, kidney and other organs exhibited damage characterized by significant degeneration and necrosis foci. The carp epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line, inoculated with diseased samples at 25 °C, demonstrated typical cytopathic effects (CPE) after four days, including rounding and shedding, with a TCID₅₀ of 10^{4.12}/0.1 mL. Transmission electron microscopic observation showed that the virus exhibited a regular hexagonal shape with a crystalline array of its capsid, and the diagonal diameter measured approximately 165 nm. PCR by using specific primers for the major capsid protein (MCP) gene was performed on the internal tissues of infected frogs and on EPC cells with CPE, yielding positive results. Phylogenetic analysis based on MCP gene sequences indicated that the sequences of isolated virus shared over 99% identity with ranavirus and was classed as FV3-like. This study confirmed that the isolated virus, designated TSL210813, is a ranavirus, responsible for the disease observed in *R. grylio*.

Keywords *Rana grylio*; ranavirus; FV3; MCP gene; pathological lesion

(责任编辑:边书京)