

## 大口黑鲈蛙病毒分子流行病学及组织病理分析

杨展展<sup>1,2</sup>, 林强<sup>2\*</sup>, 付小哲<sup>2</sup>, 罗霞<sup>2</sup>, 刘礼辉<sup>2</sup>, 梁红茹<sup>2</sup>,  
牛银杰<sup>2</sup>, 左绍志<sup>2</sup>, 张晓婷<sup>2</sup>, 李宁求<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室,  
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380)

**摘要:** 为探讨大口黑鲈蛙病毒 (LMBV) 的分子流行规律及在感染后的组织病理变化, 实验对 2019—2021 年采集的 723 份患病大口黑鲈样品进行荧光定量 PCR (qPCR) 检测。结果显示, LMBV 的阳性率为 63.62%, 挑选阳性样品接种鳃脑细胞 (Chinese perch brain cells, CPB), 共获得 93 株 LMBV。通过对分离株 MCP、ATP 酶、DNA 聚合酶和甲基转移酶基因进行 PCR 扩增与测序分析, 发现上述基因在 LMBV 分离株中均保守, 其中 MCP、ATP 酶基因一致性均为 100.0%、甲基转移酶基因一致性为 99.7%~100.0%、DNA 聚合酶基因一致性为 99.8%~100.0%。选取 1 株 LMBV 毒株感染健康大口黑鲈, 采用 qPCR 方法对不同组织中的病毒载量进行检测, 结果显示, 大口黑鲈蛙病毒在心脏、肝脏、脾脏、肾脏、胃、肠和脑等组织中均有分布, 人工感染 LMBV 后的前 5 天病毒载量逐步升高; 感染后第 5 天, 心脏中病毒载量最高 ( $9.5 \times 10^5$  个/mg 拷贝), 脑组织中病毒载量最低 ( $2.9 \times 10^2$  个/mg 拷贝)。组织病理结果表明, LMBV 可导致大口黑鲈多种组织坏死, 其中肝脏、肾脏和心脏病变较为严重, 典型病理特征包括肝细胞排列紊乱、肝窦扩张、核质疏散; 肾组织细胞疏散、巨噬细胞破裂; 心室外膜纤维坏死等。实验结果可为大口黑鲈蛙病毒病防控提供参考。

**关键词:** 大口黑鲈蛙病毒; 分子流行病学; 组织病理; 荧光定量 PCR (qPCR)

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 俗称加州鲈, 属广温性鱼类, 原产于北美密西西比河流域, 因其具有生长快、耐低温、肉质鲜美和易捕捞等特点, 已成为我国重要的淡水养殖品种<sup>[1-2]</sup>。根据《2021 年中国渔业统计年鉴》统计, 2020 年全国淡水养殖大口黑鲈产量为 61.95 万 t, 相比于 2019 年增长了 29.66%<sup>[3]</sup>。然而由于养殖密度越来越大, 大口黑鲈的病害问题也逐渐增多<sup>[4-5]</sup>。近年来, 大

口黑鲈经常会出现体表大面积肌肉坏死的症状, 其病原为大口黑鲈蛙病毒 (largemouth bass ranavirus, LMBV)<sup>[6]</sup>。大口黑鲈蛙病毒隶属于虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 蛙病毒属 (*Ranavirus*), 是一类裸露的或有囊膜结构的二十面体病毒, 病毒粒子直径约 150~170 nm, 基因组 DNA 全长为 150~170 kb, 为单分子线状双链 DNA。大口黑鲈感染蛙病毒后, 死亡率极高, 严重威胁大口黑鲈养殖业。

收稿日期: 2022-01-29 修回日期: 2022-03-04

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900501); 国家自然科学基金 (31872589); 广东省现代农业产业技术创新团队专项 (2019KJ140, 2019KJ141); 广东省海洋经济发展 (六大产业) 专项基金项目“海洋源虹彩病毒高效疫苗创制与应用”; 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2019SJ-XT4); 广州市科技计划项目 (202002030045)

第一作者: 杨展展 (照片), 从事水产动物疾病与免疫研究, E-mail: darren3133@163.com

通信作者: 林强, 从事水产动物疾病与免疫研究, E-mail: lin9902057@163.com;

李宁求, 从事水产动物疾病与免疫研究, E-mail: liningq@126.com



1991年在美国佛罗里达州首次发现大口黑鲈病毒<sup>[6]</sup>,我国最早于2008年在广东佛山地区发现大口黑鲈病毒,病鱼死亡率高达60%<sup>[7]</sup>。Mao等<sup>[8]</sup>通过对病毒蛋白分析、限制性片段长度分析、DNA聚合酶和主衣壳蛋白基因分析,随后将LMBV与FV3、GV6、DFV的主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因和DNA聚合酶基因的限制性内切酶图谱和氨基酸序列进行比对,结果发现,LMBV和DFV、GV6同源性较高,和FV3的同源性较低,因此将大口黑鲈病毒归类为虹彩病毒科蛙病毒属成员。研究发现,大口黑鲈蛙病毒病普遍在夏季高温时暴发,30℃左右是大口黑鲈病毒感染的最佳温度<sup>[9]</sup>。大口黑鲈感染LMBV前期常表现为体色发黑、食欲不振、嗜睡、肝脏发白或呈现土黄色等症状,后期则会出现体表针尖状出血甚至大面积肌肉坏死症状。在自然条件下,大口黑鲈蛙病毒病死亡率与养殖环境关系密切,高密度饲养和水体环境的剧变都能增加大口黑鲈的死亡率<sup>[10]</sup>。同时,有些毒株感染大口黑鲈后短短几天就会出现明显的症状并且死亡,而有些毒株则不表现出任何症状,因此,不同的LMBV毒株的致病性存在一定的差异<sup>[11]</sup>。为了查明LMBV的分子流行规律,本研究对2019—2021年采集的723份患病大口黑鲈样品进行病毒检测、病毒分离及相关基因测序分析、病毒感染后组织分布和病理分析,旨在为大口黑鲈蛙病毒病防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和主要试剂

健康的大口黑鲈在水温为(29±1)℃的水族系统中暂养2周,每天饲喂适当饵料,并在攻毒之前,随机取10尾大口黑鲈进行病毒检测,确保没有感染大口黑鲈蛙虹彩病毒、传染性脾肾坏死病毒和弹状病毒。鳃脑组织细胞系(Chinese perch brain cells, CPB)<sup>[12]</sup>由本实验室建立保存。

L-15培养基、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、胰酶及Hanks液购于Gibco公司(美国),荧光定量试剂盒(Premix Ex Taq™(Probe qPCR))购于湖南艾科瑞生物工程有限公司。

### 1.2 病鱼样品的检测

从患病的大口黑鲈取肝脏、脾脏、肾脏和心脏等组织各2份置于1.5 mL离心管中,1份用于

病毒检测,1份置于-80℃超低温冰箱存样。对组织样品进行研磨后,使用磁珠法病毒总核酸抽提试剂盒进行核酸提取。对提取的核酸进行qPCR检测,LMBV Q-PCR引物片段:上游引物序列5'-TCAGGGTCTACCAATTTC-3',下游引物序列5'-GATGCGGATAATGTTGTG-3',探针:FAM-CCTGACCAACGCAAGCATCAA-BHQ。反应体系为20 μL: Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL, 上、下游引物各0.5 μL, ROX 0.5 μL, 探针0.5 μL, DNA模板2 μL。反应条件:95℃30 s; 95℃5 s, 60℃34 s, 40个循环。

### 1.3 细胞培养及病毒分离

**细胞培养** 进行传代时,首先用磷酸盐缓冲溶液(PBS)润洗2次细胞,然后加入适量胰酶消化,直至细胞从培养瓶底部全部消化下来,接着加入适量含10% FBS的L-15培养基,吹打混匀,水平摇晃均匀后放入28℃培养箱中进行培养。

**病毒分离** 取病鱼组织样品100 mg加入1 mL PBS进行研磨,向匀浆液中加入浓度为1 μg/mL的双抗(青霉素和链霉素),在4℃冰箱孵育2~4 h后,4℃离心机8 000 r/min离心20 min,通过0.22 μm滤器过滤收取上清。取出铺满单层的细胞,倒掉培养基,用PBS润洗2遍,加入100倍稀释的组织过滤液,孵育1 h后补加含有5% FBS的L-15,置于28℃培养箱中继续培养。每日观察细胞是否产生细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),若产生CPE,待细胞脱落后,收取病毒液分装于离心管中,通过qPCR检测是否为LMBV,检测方法同“病鱼样品的检测”。对产生CPE现象且检测为LMBV的毒株传代3次;若没有CPE则盲传3代,每代观察7 d,盲传3代依然没有出现CPE现象,则放弃传代。将确定为LMBV的毒株置于-80℃冰箱保存。

### 1.4 病毒基因序列的扩增与测序

在GenBank中下载大口黑鲈蛙病毒的全基因组序列,根据其MCP、ATP酶、DNA聚合酶和甲基转移酶的基因序列分别设计相应特异性引物(表1),PCR扩增相应基因片段,反应体系为50 μL: Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 16 μL, 上、下游引物各2 μL, DNA模板5 μL,将扩增产物送到广州艾基生物技术有限公司进行测序。

### 1.5 回归感染实验

从广东某养殖场带回体质量为(6.0±1.0) g,

表 1 大口黑鲈蛙病毒基因扩增所用引物及序列

Tab. 1 Primers and primer sequences for gene amplification

引物名称 primers name	序列 (5'-3') sequences (5'-3')	用途 amplification
MCP-F	ATGTCTTCTGTTACGGGTTCTGGC	扩增MCP基因
MCP-R	TTACAGGATGGGAAACCCATG	
ATP酶-F	TTACTCGTCGTCAGTCTCG	扩增ATP酶基因
ATP酶-R	ATGTACTACTTAAAAACAAGATATGG	
DNA聚合酶-F	AGCAGTACGCAGACGAAAAGAGC	扩增DNA聚合酶基因
DNA聚合酶-R	CCTGGCCATCAGCACTCCC	
甲基转移酶-F	ATGGCAAAAACGGTGTGG	扩增甲基转移酶基因
甲基转移酶-R	TCAACAGTCTTGACATAAATTCAAC	

体长为 (8±1) cm 的健康大口黑鲈于养殖系统暂养 2 周后, 随机取其中 50 尾进行腹腔注射 100 μL LMBV-2007064 (浓度为 3.72×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 mL) 作为实验组, 另随机取 50 尾腹腔注射 100 μL L-15 作为对照组, 饲养水温 (29±1) °C。每日观察并记录大口黑鲈症状及死亡情况。按照“细胞培养及病毒分离”方法, 重新分离死亡大口黑鲈体内的病毒, 并进行检测。

### 1.6 人工感染与样品采集

将健康大口黑鲈于养殖系统暂养 2 周后, 随机取其中 150 尾进行腹腔注射 100 μL LMBV-2007064 (浓度为 3.72×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) 作为实验组, 另随机取 150 尾腹腔注射 100 μL L-15 作为对照组, 饲养水温 (29±1) °C。每日观察并记录大口黑鲈症状及死亡情况。感染后分别在 0 h、4 h、8 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 采样, 实验组与对照组每次随机选取 3 份 (各 3 尾) 大口黑鲈, 取样之前观察体表和内脏器官变化, 1 份采集肝脏、脾脏、肾脏、胃、肠、脑、心脏和鳃组织加入 4% 多聚甲醛固定液 (中性) 进行固定; 1 份采集肝脏、脾脏和肾脏组织加入 1 mL 2.5% 戊二醛固定液 (pH=7.3), 4 °C 固定至少 2 h; 1 份采集肝脏、脾脏、肾脏、胃、肠、脑、心脏和鳃组织置于 -80 °C 冷冻保存。

### 1.7 组织切片观察病理变化

**病理切片** 经 4% 多聚甲醛固定液固定 24 h 后的组织进行乙醇脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋, 用旋转式切片机把蜡块切成 5 μm 厚度, 苏木精-伊红 (H.E) 染色, 中性树胶封片<sup>[13]</sup>, 光学显微镜下拍照并观察各个组织的病理损伤情况。

**电镜切片** 组织电镜切片制作时取出经过 2.5% 戊二醛固定液固定 2 h 后的组织经过丙酮脱水、树脂透析、高温聚合以及切片染色等技术制作电镜切片, 然后用透射电子显微镜观察。细胞电镜切片则先将接毒病变细胞刮下, 吸取至 1.5 mL 离心管内, 3 000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清, 加入 1 mL 2.5% 戊二醛固定液固定后进行切片制作。

### 1.8 荧光定量检测蛙病毒组织分布情况

取出上述 -80 °C 冰箱冻存的组织, 每个组织切取 10 mg 进行研磨后, 取 200 μL 上清使用磁珠法病毒总核酸抽提试剂盒进行核酸提取, 提取后的核酸保存于 -20 °C 冰箱。采用“病鱼样品的检测”所述 qPCR 方法检测病毒载量。

## 2 结果

### 2.1 样品检测及病毒分离鉴定

2019—2021 年共检病鱼样品 723 个, 取样地点集中在广东省内地区 (表 2), 检测结果表明, LMBV 阳性样品为 460 个, 阳性率为 63.62% (表 3), 2019—2021 年检出阳性率分别为 58.90%、69.66% 和 55.94%。发病鱼症状多为花身、烂身、烂鳃、体表点状浅表性溃疡、肝脏萎缩有白点等 (图版 I)。对阳性样品接种 CPB 细胞后, 每日观察, 共有 93 个样品产生了 CPE, 大部分样品 2~3 d 出现 CPE 现象, 表现为细胞圆缩, 然后脱落 (图版 II), 经检测证实均为 LMBV。

### 2.2 LMBV 基因测序及系统进化分析

扩增得到 93 株 LMBV 的 MCP、ATP 酶、DNA 聚合酶和甲基转移酶的基因片段, 经测序获

表 2 2019—2021 年大口黑鲈病鱼样品来源地

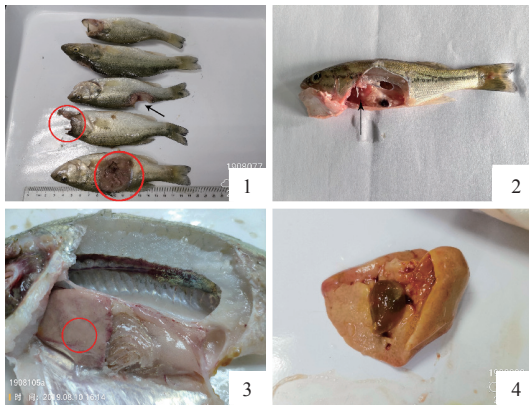
Tab. 2 Sources of diseased *M. salmoides* samples in 2019–2021

取样地点 sampling locations		取样数量/份 no. of samples
广州	Guangzhou	133
佛山	Foshan	497
珠海	Zhuhai	5
肇庆	Zhaoqing	23
江门	Jiangmen	20
中山	Zhongshan	4
韶关	Shaoguan	1
省外	outside the province	40
合计	total	723

表 3 2019—2021 年大口黑鲈发病样品 LMBV 检测结果汇总

Tab. 3 The positive rate of diseased *M. salmoides* samples tested in each year from 2019–2021

年份/年 year	样品总数/份 total number of samples	阳性样品/份 positive samples	阳性率/% positive rate
2019	73	43	58.90
2020	389	271	69.66
2021	261	146	55.94
合计 total	723	460	63.62



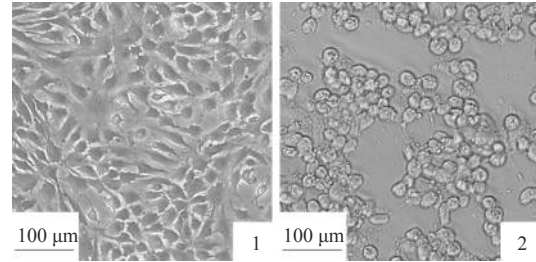
图版 I 感染 LMBV 的大口黑鲈症状

1. 断头、烂身；2. 肝脏萎缩；3. 肝脏颜色暗淡有白点；4. 肝脏发黄

Plate I Symptoms of *M. salmoides* infected with LMBV

1. decapitation and rotten body. 2. liver atrophy. 3. dark liver with white spots. 4. yellow liver

得基因序列，将测序结果用 MEGA7 软件进行序列比对，构建系统进化树，结果显示各毒株 MCP 基因一致性为 100.0%，(图 1-a)，ATP 酶基因序列一致性为 100.0%(图 1-b)，甲基转移酶基因序



图版 II 大口黑鲈病毒细胞病变

1. 对照组, 2. 实验组

## Plate II LMBV cytopathic

1. control group, 2. experimental group

列一致性为 99.7% 至 100.0%(图 1-c)，DNA 聚合酶基因一致性为 99.8% 至 100.0%(图 1-d)，系统进化分析结果显示所有毒株均聚成一支。

## 2.3 LMBV 回归感染实验

从分离的病毒中，挑选 LMBV-2007064 进行回归感染，大口黑鲈感染 LMBV-2007064 后 4~12 h，鱼体颜色开始加深，剖检发现肝脏颜色暗淡发白，脾脏发黑，(图版 III-1)；2~3 d 后胸鳍基部和背鳍出现白色絮状物及体色发黑，食欲不振(图版 III-2)；4~5 d 体表针尖状点状出血并开始出现死亡，(图版 III-3~5)；6 d 左右，尾鳍烂，鱼嘴发红，剖检可见脾脏萎缩(图版 III-6~8)。攻毒后从第 3 天开始死亡，持续到第 6 天，死亡率为 100%(图 2)，对发病死亡的鱼剖检进行 qPCR 检测，结果发现均为 LMBV 阳性；用死亡鱼的组织匀浆液进行细胞接毒，均能产生明显的 CPE，经检测为 LMBV 阳性；分离病毒的 MCP、ATP 酶、DNA 聚合酶和甲基转移酶的基因序列与 LMBV-2007064 同源性为 100%。对照组体表剖检均无变化，且没有出现死亡。

## 2.4 LMBV 感染大口黑鲈的组织病理变化

与对照组相比，大口黑鲈感染蛙病毒后 1~4 d，肝细胞肿胀，胞浆呈空泡状；感染后 5 d，肝细胞排列紊乱，肝窦扩张，核质疏散，胞浆稀疏淡染；感染后 6 d，肝板结构紊乱，胞浆稀疏淡染(图版 IV-1~4)。

与对照组相比，大口黑鲈感染蛙病毒后 1~4 d，无肾单位及明显肾小梁结构，红细胞聚集区域与白细胞聚集区域明显；感染后 5 d，黑色素巨噬细胞破裂；感染后 6 d，肾组织细胞疏散(图版 IV-5~8)。

与对照组相比，大口黑鲈感染蛙病毒后 1~3 d，

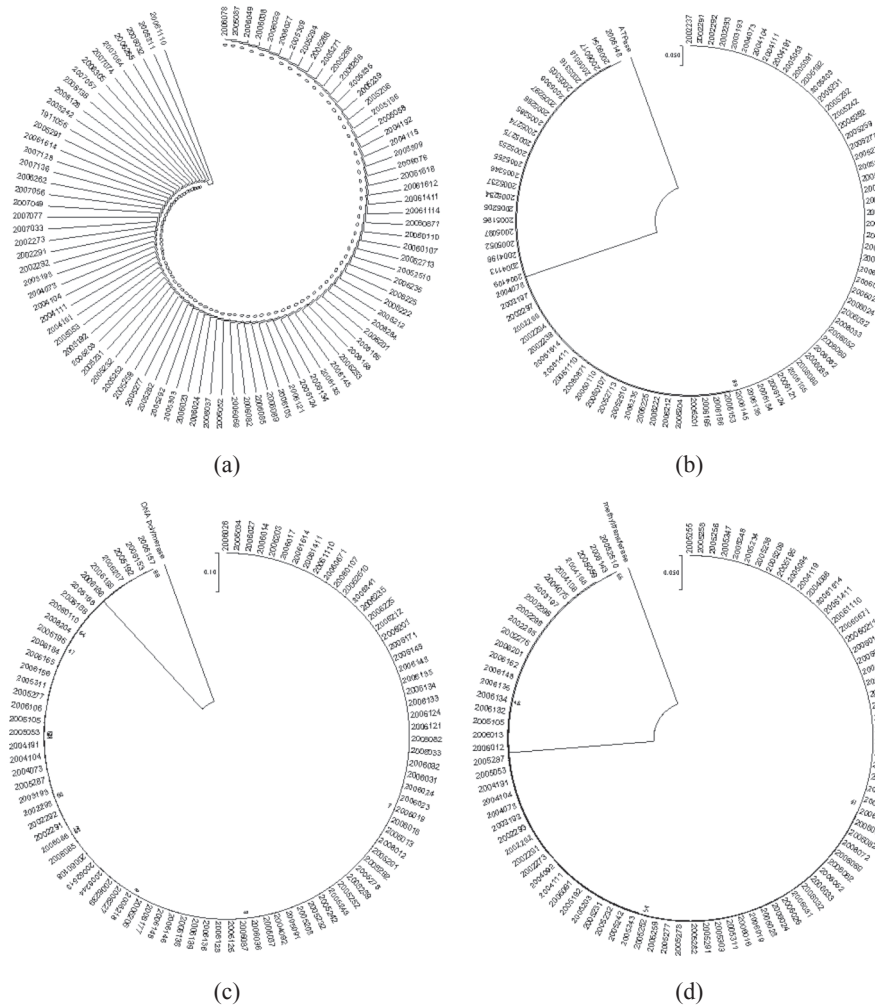


图 1 大口黑鲈蛙病毒系统进化分析

(a) MCP, (b) ATP 酶, (c) DNA 聚合酶, (d) 甲基转移酶; 基于 LMBV 各基因序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of LMBV

(a) MCP, (b)ATPase, (c) DNA polymerase, (d) methyltransferase; phylogenetic tree constructed based on LMBV gene sequences

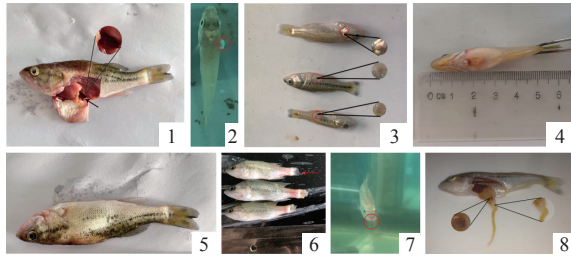
心肌纤维相互交叉排列, 结构有序, 形成复杂的三维空间网状结构, 心肌纤维着色均匀, 形态正常, 组织未见明显异常; 感染后 4 d, 心室外膜小范围纤维坏死, 坏死纤维呈嗜酸性丝网状, 并见较多坏死细胞碎屑, 伴少量炎性细胞浸润; 感染后 5 d, 心室外膜纤维坏死, 坏死纤维呈嗜酸性丝网状, 并见较多坏死细胞碎屑, 伴少量炎性细胞浸润, 心房广泛见肌纤维坏死、溶解, 呈嗜酸性均质样或絮状, 并见较多坏死细胞碎屑, 并见较多炎性细胞渗出, 动脉球外膜层亦见结缔组织坏死 (图版 IV-9~12)。

用 LMBV 毒株接种 CPB 细胞, 待细胞发生病变后, 制作电镜切片, 可以观察到大量正六边形病毒粒子聚集 (图版 V-1); 对肝脏、脾脏、肾脏进行电镜切片观察, 病鱼脾脏组织中有病毒包

涵体, 存在大量病毒粒子 (图版 V-2)。

### 2.5 LMBV 在大口黑鲈体内的动态分布

LMBV-2007064 感染大口黑鲈后的病毒定量检测结果显示, 心脏中最早被检测到病毒, 在感染后 4 h 检测出病毒; 脾脏、肾脏在第 8 小时检测出病毒; 肝脏、胃在感染后 12 h 开始检测出微量病毒; 肠、脑和鳃在感染后 1 d 时才检测出病毒 (图 3)。结果显示, 在感染前期所有组织中的病毒含量随时间变化整体呈上升趋势, 且在第 5 天均达到峰值, 显著高于其他时间点 ( $P < 0.05$ )。感染后 5 d, 肝脏、脾脏、肾脏、胃、肠和心脏的病毒含量显著高于脑和鳃 ( $P < 0.05$ ), 心脏的病毒含量最高, 单位样品质量 (mg) 达到了  $9.5 \times 10^5$  个拷贝, 而脑中的病毒含量达到峰值时仅有  $2.9 \times 10^2$  个



图版III LMBV 回归感染大口黑鲈的临床症状

1. 肝脏黯淡发白, 脾脏发黑, 体色稍有变化, 4~12 h; 2. 体表出现白色絮状物, 体色发黑, 3 d; 3. 体表针尖状出血, 4 d; 4. 腹部出现溃烂, 5 d; 5. 出现炎症病灶, 5 d; 6. 尾部熟身, 断尾, 6 d; 7. 鱼嘴发红, 6 d; 8. 脾脏萎缩, 脏器官伴有轻微黏液

**Plate III Clinical symptoms of LMBV regression in *M. salmoides***

1. The liver is dull and white, the spleen is black, and the body color changes slightly, 4-12 h; 2. white flocs appear on the body surface, the body color is black, 3 d; 3. needle-like hemorrhage on the body surface, 4 d; 4. abdomen is ulcerated, 5 d; 5. inflammatory lesions appears, 5 d; 6. tail matured, tail docked, 6 d; 7. fish mouth is red, 6 d; 8. spleen atrophy and slight mucus in organs

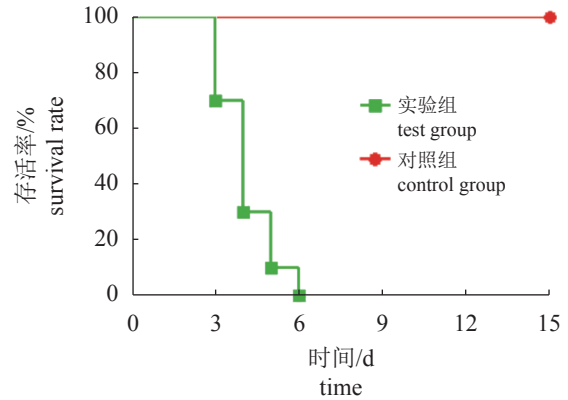
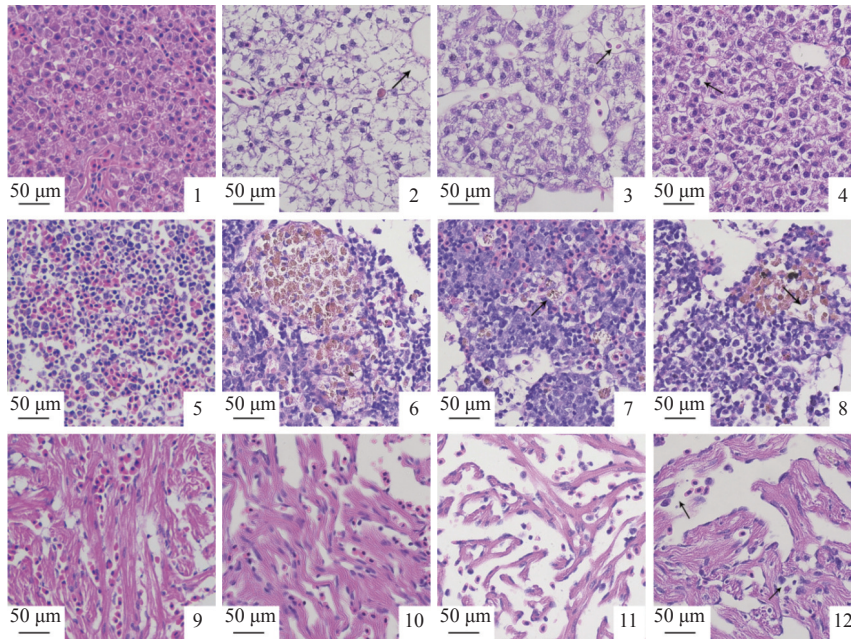


图 2 LMBV-2007064 感染大口黑鲈后的存活率

Fig. 2 Survival of *M. salmoides* with LMBV-2007064

拷贝, 肝脏、脾脏、肾脏、胃和肠的病毒拷贝数差异不显著, 在  $2.8 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^5$  个拷贝。实验结果表明, LMBV 可以侵染大口黑鲈体内的各个器官, 且在心脏、肝脏、脾脏、肠、胃和肾脏中的表达量相对较高。

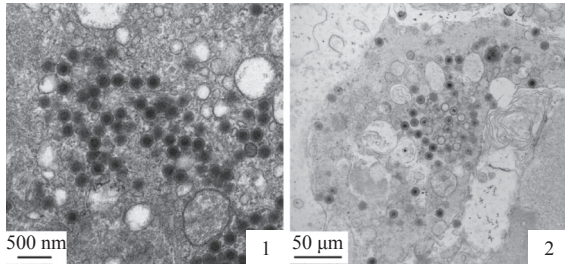


图版IV LMBV 感染大口黑鲈的组织损伤

1. 肝脏对照组; 2. 肝细胞肿胀, 胞浆空泡, 1 d; 3. 肝细胞排列紊乱, 肝窦扩张, 核质疏散, 胞浆稀疏淡染, 5 d; 4. 肝板结构轻度紊乱, 胞浆稀疏淡染, 6 d; 5. 肾脏对照组; 6. 无肾单位及明显肾小梁结构, 1 d; 7. 黑色素巨噬细胞破裂, 5 d; 8. 肾组织细胞疏散; 9. 心脏对照组; 10. 心脏组织未见明显异常; 11. 心室外膜小范围纤维坏死, 并见较多坏死细胞碎屑, 伴少量炎性细胞浸润, 4 d; 12. 心室外膜纤维坏死, 心房广泛见肌纤维坏死、溶解, 并见较多炎性细胞渗出, 动脉球外膜层亦见结缔组织坏死, 5 d

**Plate IV Tissue damage of LMBV infected *M. salmoides***

1. liver control group; 2. hepatocyte swelling, cytoplasmic vacuoles, 1 d; 3. hepatocyte arrangement disorder, hepatic sinusoid dilation, nucleoplasm is scattered, cytoplasm is sparse and lightly stained, 5 d; 4. liver plate structure is slightly disordered, cytoplasm is sparse and lightly stained, 6 d. 5. kidney control group; 6. no nephron and obvious renal trabecular structure, 1 d; 7. melanoma macrophage rupture, 5 d; 8. evacuation of renal tissue cells. 9. heart control group; 10. no obvious abnormalities in the cardiac tissue; 11. small-scale fibrous necrosis of the ventricular membrane, and more necrotic cell debris, with a small amount of inflammatory cell infiltration, 4 d; 12. fibrous necrosis of the ventricular membrane, extensive muscle fiber necrosis and dissolution in the atrium more inflammatory cell exudation, and connective tissue necrosis in the adventitia of the aortic bulb, 5 d



图版 V LMBV 病毒电镜图

1. 细胞透射电镜; 2. 脾脏组织透射电镜

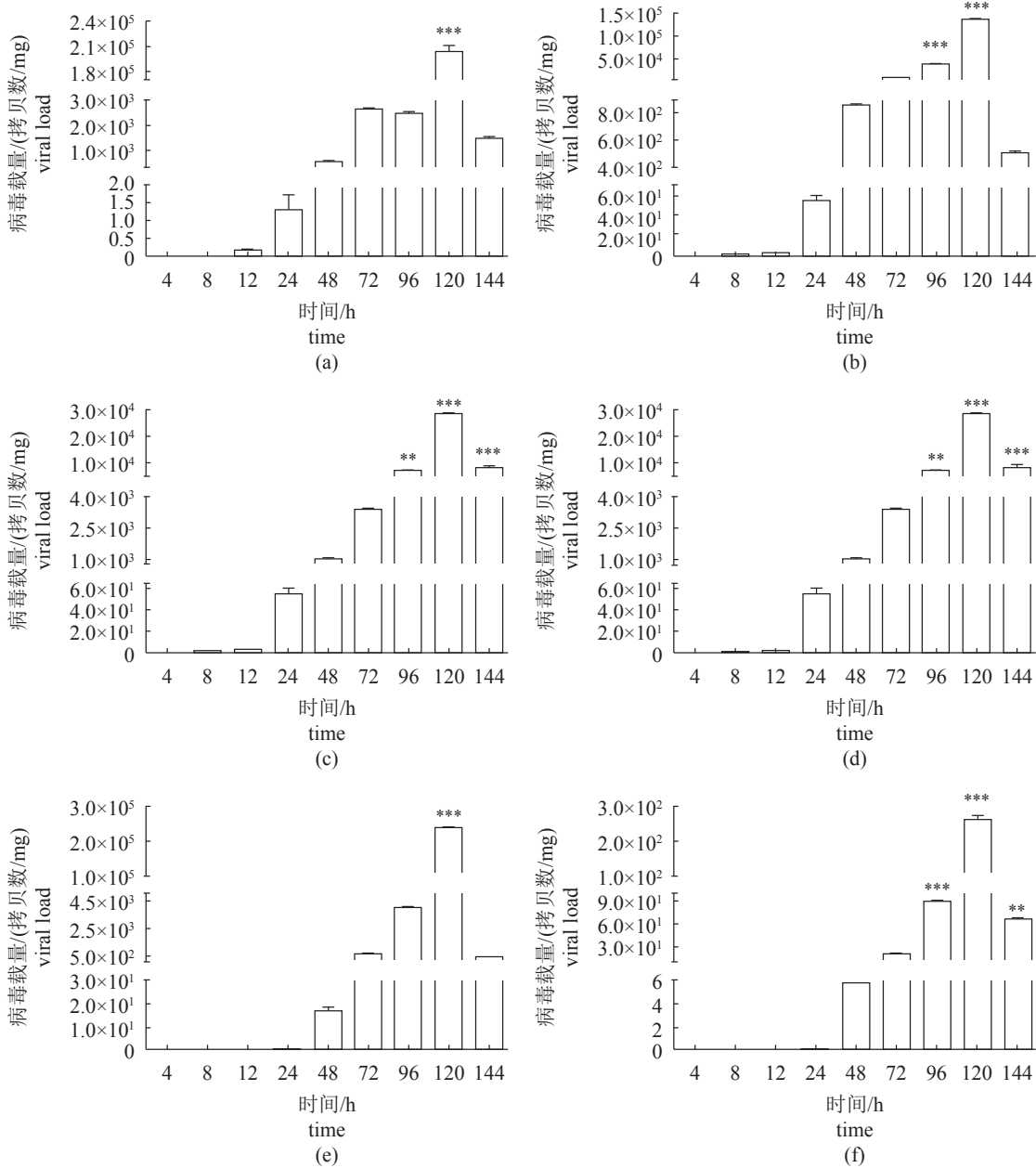
Plate V Electron micrograph of LMBV virus

1. cell transmission electron microscope; 2. transmission electron microscope of spleen tissue

3 讨论

蛙病毒能够感染鱼类、两栖类和爬行类, 严重危害水生动物安全。蛙病毒最早是在 20 世纪 60 年代从豹蛙 (*Rana pipiens*) 上分离得到<sup>[14]</sup>。目前, 在该属的成员已经从除南极洲以外的所有大陆的至少 175 种爬行动物和两栖动物中分离出来, 被认为是导致全球野生爬行动物和两栖动物种群死亡的重要病原体<sup>[15]</sup>, 因此, 蛙病毒有着“冷血动物杀手”之称。

LMBV 作为蛙病毒属的一个成员, 是近年来发现的严重危害大口黑鲈养殖的一种病原。本研



(图 3 Fig. 3)

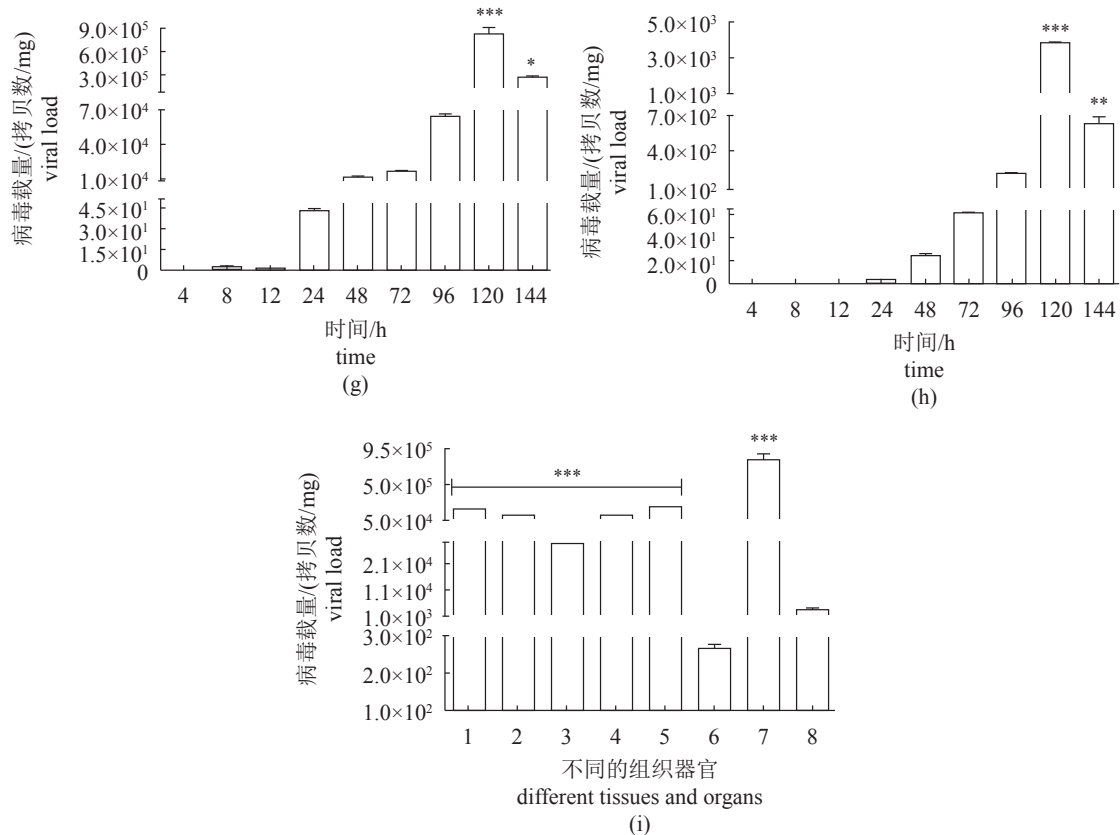


图3 LMBV在感染大口黑鲈后各组织器官内不同时间点病毒载量变化

(a)~(h)为不同时间点肝脏、脾脏、肾脏、胃、肠、脑、心脏和鳃中的病毒载量变化,随着感染时间的增加,各组织中病毒载量呈上升趋势,并在第5d达到峰值;(i)为第5d达到峰值时不同的组织器官中病毒载量;1.肝脏,2.脾脏,3.肾脏,4.胃,5.肠,6.脑,7.心脏,8.鳃;心脏中病毒载量最高,脑组织中病毒载量最低

Fig. 3 Changes of viral load of LMBV in different tissues and organs at different time points after infection of *M. salmoides*

(a)~(h) show the changes of viral load in liver, spleen, kidney, stomach, intestine, brain, heart and gill at different time points, with the increase of infection time, the viral load in each tissue showed an upward trend, and at the peak value was reached on the 5th day; (i) shows the viral load in different tissues and organs when the peak value was reached on the 5th day; 1. liver, 2. spleen, 3. kidney, 4. stomach, 5. intestine, 6. brain, 7. heart, 8. gills; the highest viral load was that in the heart, and the lowest was that in the brain tissue

究发现 2019—2021 年采样的患病大口黑鲈的 LMBV 阳性率为 63.62%, 并且在每年 5—9 月温度较高时发病率较高。对分离的 LMBV 的 MCP、ATP 酶、甲基转移酶和 DNA 聚合酶基因进行序列比对分析,发现目前分离的 LMBV 是一个高度保守的蛙病毒。Mao 等<sup>[8]</sup>通过对 LMBV 蛋白分析、限制性片段长度分析、DNA 聚合酶和主衣壳蛋白基因分析发现, LMBV 保守性极高,且与 DFV、GV6 同源性较高。LMBV 传播媒介较多,能够通过水体接触病原或者带有病原的饵料感染,并且在人工感染实验中,腹腔注射和浸泡感染都能够使大口黑鲈感染 LMBV<sup>[16]</sup>。

本研究对大口黑鲈进行腹腔注射感染 LMBV,感染前期,鱼体表颜色逐渐加深变黑,剖检发现,

肝脏颜色暗淡发黄,脾脏发黑;中期体表出现白色絮状物,有针尖状出血点,部分鱼伴有肠道炎症症状;后期出现熟身、烂尾、鱼嘴发红等症状,脏器伴有轻微黏液,临床表现与剖检特征与自然感染基本一致,因此可以作为在自然状态下感染大口黑鲈蛙病毒的示例病症进行研究。马冬梅等<sup>[17]</sup>研究发现,大口黑鲈在感染蛙病毒后的症状多为体表溃烂,肝脾肾肿大,肌肉坏死以及鳍条基部和尾部出血或充血。Zilberg 等<sup>[18]</sup>以腹腔注射 LMBV 的方式进行人工感染实验,实验结果发现,病鱼出现螺旋状游动的现象,鱼体色发黑无活力,食欲不振,腹部膨大,感染后的鱼在 3~5 d 内全部死亡,并且在即将死亡的鱼体内也能够检测到病毒,对濒死个体进行剖检观察,发现肝脏发



白, 脾脏鲜红色, 肠系膜和靠近盲肠部位的脂肪有充血现象<sup>[9]</sup>。

本研究发现, LMBV 能引起大口黑鲈多个组织器官不同程度的损伤, 其中肝脏、脾脏、心脏病变严重, 感染后病毒载量也较高, 是 LMBV 感染的重要靶器官。大口黑鲈感染 LMBV 后, 肝细胞出现排列紊乱、肿胀、胞浆空泡状等症状; 肾脏组织细胞疏散; 心室外膜小范围纤维坏死, 肌纤维坏死、溶解, 动脉球外膜结缔组织坏死等。有研究发现, 感染 LMBV 的鱼肝脏、脾脏、胃和肠等组织表层发现有坏死病灶及炎性病变, 然而深层结构表现正常, 鱼鳃与腹部接触处可见纤维蛋白渗出物, 胃肠黏膜上层表皮组织局部坏死病灶, 感染后期, 鱼体表会出现溃烂症状<sup>[18-19]</sup>, 与本实验组织出现的病症基本相同, 原因可能是肝脏和肾脏是水钠代谢和平衡的关键器官, 随着感染时间造成的渐进性损伤, 极大程度导致器官功能衰竭, 造成水钠平衡失调, 所以很多器官出现组织水肿等症状。而脾脏的损伤则导致淋巴细胞的减少, 从而使机体免疫功能下降<sup>[20]</sup>。且由于各组织器官受损, 导致机体多种免疫相关因子功能失调, 从而加重病情, 加速了大口黑鲈的死亡。Beck 等<sup>[11]</sup> 对大口黑鲈进行浸泡攻毒实验, 结果显示, 所有濒死的大口黑鲈全部浮在水面, 鱼鳃肿胀肿大。此外, 组织病理学结果显示, 多数被感染的鱼都伴有炎性病灶等症状, 但与其同一种属病毒中的 DFV 和 GV6 引起的症状不同, DFV 和 GV6 一般引起造血器官坏死病变<sup>[21]</sup>。

为了研究蛙病毒致病机理, 本实验通过 qPCR 检测发现大口黑鲈感染 LMBV 后各组织中均能检测到蛙病毒, 其中心脏中的病毒载量最高, 肝脏、脾脏、肾脏、胃和肠的病毒载量较高。彭超等<sup>[22]</sup> 对蛙病毒在鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*) 各个器官组织中的分布进行研究, 原位杂交结果显示, 脾脏和肾脏中的杂交信号最强; 荧光定量 PCR 检测结果显示蛙病毒在脾脏含量最多。Beck 等<sup>[11]</sup> 以浸泡感染方式检测了大口黑鲈各组织器官的病毒含量, 结果显示, 在攻毒后的 4~5 d 是感染高峰期, 发现其鱼鳃、鳃和后肾最容易受 LMBV 感染的器官, 而在本实验中, 肝脏、肾脏和心脏病毒载量较高, 对于其出现的差异性, 是因为感染方式不同造成, 浸泡感染是经过鳃进行呼吸感染病毒, 鱼鳃作为辅助呼吸器官, 也极易感染病毒。谢简等<sup>[23]</sup> 研究了美国青蛙 (*R. grylio*)

幼蛙在感染蛙病毒后的组织分布情况, 免疫组化结果显示, 肺和肠中的阳性信号最强。Jiang 等<sup>[24]</sup> 采用原位杂交技术研究大鲵虹彩病毒 (CGSIV) 在感染大鲵后各组织病毒含量变化, 结果显示, 感染后的大鲵其脾脏和肾脏中的病毒含量较高。Balseiro 等<sup>[25]</sup> 通过蝾螈 (*Salamandridae*) 和产婆蛙 (*Alytes obstetricans*) 感染产婆蟾蛙病毒 (CMTV) 实验发现, 感染后肾脏中病毒含量最高。综上表明, 蛙病毒具有严重的侵染性, 这表明蛙病毒的感染宿主范围很广, 几乎能够感染水生动物的各个组织器官, 其对多种鱼类具有极强的致病性。

本实验对 LMBV 的分子流行特征、组织病理观察以及病毒感染后各组织中病毒载量的变化进行研究, 结果显示, LMBV 在心脏、肝脏、脾脏和肾脏可能更容易增殖, 且随着感染时间的增加, 病毒含量呈上升趋势, 到第 5 天达到峰值, 从第 6 天开始下降。经过多次实验证明, 蛙病毒在感染大口黑鲈后, 在其心脏中病毒载量最高, 这与之前的研究存在一定的差异, 值得继续研究, 在肝脏、脾脏、肾脏、胃和肠中的病毒载量相差不大, 而在脑和鳃中病毒载量虽然也有, 但显著低于其他组织中的病毒载量。对于蛙病毒在大口黑鲈体内具体的感染机制还有待进一步研究, 为更有效地防控大口黑鲈蛙病毒病提供参考意义。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 李胜杰. 加州鲈养殖技术概述[J]. 内陆水产, 2008, 33(9): 26-28.  
Li S J. Overview of breeding technology of *Micropterus salmoides*[J]. Inland Fisheries, 2008, 33(9): 26-28 (in Chinese).
- [2] 梁素娴, 白俊杰, 叶星, 等. 养殖大口黑鲈的遗传多样性分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 260-263.  
Liang S X, Bai J J, Ye X, et al. RAPD analysis of genetic diversity for cultured largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(4): 260-263 (in Chinese).
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.  
Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2021. (in Chinese)
- [4] Jiang B, Lu G L, Du J J, et al. First report of trypanoso-

- miasis in farmed largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from China: Pathological evaluation and taxonomic status[J]. *Parasitology Research*, 2019, 118(6): 1731-1739.
- [5] Fogelson S B, Petty B D, Reichley S R, *et al.* Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(3): 338-344.
- [6] Grizzle J M, Altinok I, Fraser W A, *et al.* First isolation of largemouth bass virus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 50(3): 233-235.
- [7] 邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病病原的分离和鉴定[J]. *水产学报*, 2009, 33(5): 871-877.  
Deng G C, Xie J, Li S J, *et al.* Isolation and preliminary identification of the pathogen from largemouth bass ulcerative syndrome[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(5): 871-877 (in Chinese).
- [8] Mao J H, Wang J, Chinchar G D, *et al.* Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 37(2): 107-114.
- [9] 王庆, 李凯彬, 曾伟伟, 等. 大口黑鲈虹彩病毒病研究进展[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(2): 73-76.  
Wang Q, Li K B, Zeng W W, *et al.* Progress on viral disease caused by largemouth bass Ranavirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32(2): 73-76 (in Chinese).
- [10] Inendino K R, Grant E C, Philipp D P, *et al.* Effects of factors related to water quality and population density on the sensitivity of juvenile largemouth bass to mortality induced by viral infection[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2005, 17(4): 304-314.
- [11] Beck B H, Bakal R S, Brunner C J, *et al.* Virus distribution and signs of disease after immersion exposure to largemouth bass virus[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(3): 176-183.
- [12] Fu X, Li N Q, Lai Y, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 32-45.
- [13] 王宁军, 赵燕, 刘娟. 斑马鱼器官石蜡组织切片制作与观察[J]. *解剖学研究*, 2019, 41(3): 240.  
Wang N J, Zhao Y, Liu J. Preparation and observation of paraffin tissue sections of zebrafish organs[J]. *ANATOMY RESEARCH*, 2019, 41(3): 240 (in Chinese).
- [14] Granoff A, Came P E, Breeze D C. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*: I. The isolation and properties of virus from normal and tumor tissue[J]. *Virology*, 1966, 29(1): 133-148.
- [15] Duffus A L J, Waltzek T B, Stöhr A C, *et al.* Distribution and host range of Ranaviruses[M]//Gray M, Chinchar V. *Ranaviruses*. Cham: Springer, 2015.
- [16] 易婉盈. 大口黑鲈病毒(LMBV)DNA疫苗的研制及其免疫效果的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2019.  
Yi W Y. Construction of DNA vaccine and its protective efficiency on the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) challenged by largemouth bass virus[D]. Guangzhou: Jinan University, 2019 (in Chinese).
- [17] 马冬梅, 邓国成, 白俊杰, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒MCP基因的原核表达及重组蛋白的免疫效果初步分析[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 139-144.  
Ma D M, Deng G C, Bai J J, *et al.* Prokaryotic expression of MCP gene from largemouth bass ulcerative syndrome virus and the immune effect analysis of recombinant protein[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 139-144 (in Chinese).
- [18] Zilberg D, Grizzle J M, Plumb J A. Preliminary description of lesions in juvenile largemouth bass injected with largemouth bass virus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 39(2): 143-146.
- [19] Piaskoski T O, Plumb J A, Roberts S R. Characterization of the largemouth bass virus in cell culture[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, 11(1): 45-51.
- [20] Gray M J, Miller D L, Hoverman J T, *et al.* Ecology and pathology of amphibian ranaviruses[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 87(3): 243-266.
- [21] Hedrick R P, Mcdowell T S. Properties of iridoviruses from ornamental fish[J]. *Veterinary Research*, 1995, 26(5-6): 423-427.
- [22] 彭超, 马红玲, 郭志勋, 等. 石斑鱼蛙病毒在鞍带石斑鱼中的组织分布[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 88-94.  
Peng C, Ma H L, Guo Z X, *et al.* Tissue distribution of grouper iridovirus genus *Ranavirus* in infected farmed juvenile giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 88-94 (in Chinese).
- [23] 谢简, 李正秋, 张奇亚, 等. 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.  
Xie J, Li Z Q, Zhang Q Y, *et al.* Detection of *Rana grylio* virus (RGV) in host frog tissues by using immunohistochemistry assay[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(5): 438-443 (in Chinese).
- [24] Jiang N, Fan Y D, Zhou Y, *et al.* Characterization of Chinese giant salamander iridovirus tissue tropism and inflammatory response after infection[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 114(3): 229-237.
- [25] Balseiro A, Dalton K P, Cerro A D, *et al.* Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in Northern Spain: A comparative pathological study of an emerging ranavirus[J]. *The Veterinary Journal*, 2010, 186(2): 256-258.

## Molecular epidemiology and histopathological analysis of largemouth bass ranavirus

YANG Zhanzhan<sup>1,2</sup>, LIN Qiang<sup>2\*</sup>, FU Xiaozhe<sup>2</sup>, LUO Xia<sup>2</sup>, LIU Lihui<sup>2</sup>, LIANG Hongru<sup>2</sup>,  
NIU Yinjie<sup>2</sup>, ZUO Shaozhi<sup>2</sup>, ZHANG Xiaoting<sup>2</sup>, LI Ningqiu<sup>2\*</sup>

(1. School of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Fishery Drug Creation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immunology Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** *Micropterus salmoides* is a high-quality freshwater fish among the main aquaculture species in my country. In recent years, diseases of *M. salmoides* have occurred frequently, which has caused a great impact on my country's aquaculture industry. Largemouth bass ranavirus (LMBV) is a pathogen that seriously harms the *M. salmoides* farming industry. In order to explore the pathological changes of *M. salmoides* after infection with LMBV, and the relationship between the dynamic changes of virus content in the body and the occurrence of diseases. The typical symptom of diseased fish is muscle necrosis, commonly known as rotting. In this study, 723 diseased *M. salmoides* samples collected from 2019 to 2021 in Guangdong Province and surrounding areas were classified and sorted, and their liver, spleen and kidney tissues were collected for quantitative PCR detection. The results showed that the rate of positive LMBV was 63.62%. In addition, the incidence and detection rate are higher in the summer high temperature season. LMBV positive samples were selected to inoculate CPB cells, and a total of 93 strains of LMBV were obtained. Through PCR amplification and sequencing analysis of the isolates MCP, ATPase, DNA polymerase and methyltransferase, the results showed that these genes are highly conserved in LMBV isolates. The identity of the MCP and ATPase gene is 100.0%, and the methyltransferase gene identity is 99.7%-100.0%, and the DNA polymerase gene identity is 99.8%-100.0%, indicating that the variation between LMBV strains is minimal. The representative strain was selected to inject 100  $\mu$ L  $3.72 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL LMBV into the pectoral fins of *M. salmoides* to artificially infect the fish with LMBV. The samples showed similar symptoms to those infected with LMBV in the natural state, including darkening of the fish body, surface ulceration, and liver atrophy, etc. Four fish were randomly selected at 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d after infection, and liver, spleen, kidney, stomach, intestine, brain, heart and gill tissues were taken to make paraffin sections with HE staining for histopathological changes analysis. qPCR was used to detect the tissue distribution and kinetics of the virus. The results showed that the viral load of LMBV gradually increased within 5 days after infection, and the virus was distributed in the heart, liver, spleen, kidney, stomach, intestine, brain and other tissues, and the highest viral load in the heart was  $9.5 \times 10^5$  copies/mg. The minimum viral load in brain tissue was  $2.9 \times 10^2$  copies/mg. The histopathological results after virus infection showed that LMBV can cause a variety of tissue necrosis of *M. salmoides*, among which liver, kidney and heart diseases become more serious. Typical pathological features include disorder of liver cell arrangement, dilatation of liver sinusoids, nucleus evacuation, renal tissue cell evacuation, Macrophage rupture, necrosis of ventricular membrane fibers, etc.

**Key words:** largemouth bass ranavirus (LMBV); molecular epidemiology; histopathology; fluorescence quantitative PCR (qPCR)

**Corresponding authors:** LIN Qiang. E-mail: lin9902057@163.com;

LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900501); National Natural Science Foundation of China (31872589); Guangdong Modern Agricultural Industry Technology Innovation Team Special Project (2019KJ140, 2019KJ141); Guangdong Marine Economic Development (Six Industries) Special Fund Project "Creation and Application of Marine Iridovirus High-efficiency Vaccine"; Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Welfare Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences (2019SJ-XT4); Guangzhou Science and Technology Plan Project (202002030045)