

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00654

大口黑鲈肝脾肿大病原研究

马冬梅, 邓国成, 白俊杰, 李胜杰, 江小燕, 杨小静

中国水产科学研究院 珠江水产研究所 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380

摘要: 为了查明 2009 年 10 月广东省佛山地区养殖大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)中暴发的传染性疾病的病原, 对病鱼的肝脏、脾脏和腹隔膜进行切片电镜观察, 发现细胞质中有大量病毒颗粒, 切面为六角形, 直径约 145~150 nm, 病毒为二十面体对称结构、无囊膜、似虹彩病毒的病毒粒子。用除菌的病鱼组织滤液感染健康大口黑鲈, 被感染鱼死亡率达 90%以上。根据已知虹彩病毒主要衣壳蛋白(MCP)基因序列设计特异引物, 提取人工感染发病鱼的肝脏、脾脏、肾脏组织的 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增片段进行序列测定与分析, 结果表明该序列与已报道的鳊(*Siniperca chuatsi*)传染性脾肾坏死病毒(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)MCP 基因同源性为 98%。电镜观察和 MCP 基因测序分析结果显示, 该病毒的分类地位为虹彩病毒科(Iridoviridae)细胞肿大病毒属(*Megalocytivirus*)。

关键词: 大口黑鲈; 病原; 肝脾肿大; 传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0654-07

虹彩病毒科(Iridoviridae)病毒是正二十面体病毒, 直径 120~300 nm^[1]。该病毒是单分子线性双链DNA病毒, 基因组大小 170~200 kb^[2]。虹彩病毒科包括 5 个属: 感染脊椎动物的蛙病毒属(*Ranavirus*)、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)、细胞肿大病毒属(*Megalocytivirus*)和感染无脊椎动物的虹彩病毒属(*Iridovirus*)、绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*)^[3]。其中, 细胞肿大病毒属虹彩病毒是鱼类重要的病毒性病原之一, 多种细胞肿大病毒属虹彩病毒陆续被发现, 其宿主几乎涵盖了中国主要的海水养殖鱼类以及重要的淡水养殖鱼类, 严重阻碍了鱼类养殖业的健康发展, 给水产养殖业造成重大的经济损失^[4]。

2009 年 10 月, 广东省佛山市南海区多个养殖池塘的大口黑鲈陆续发生严重的病害, 主要症状为病鱼体色变黑, 肝脏、脾脏、肾脏肿大、变色, 死亡率高, 给大口黑鲈养殖业带来了严重的影响。

本研究在疾病调查的基础上查明病原, 旨在为疾病防治工作的开展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 鲤上皮瘤细胞系(Epithelioma Papulosum Cuprini, EPC)、草鱼肾细胞系(Ctenopharyngodon Idellus Kidney, CIK)和肥头鲤上皮细胞系(Fathead Minnow, FHM)由本实验室保存。

1.1.2 实验动物 2009 年 10 月, 从广东省佛山市 3 个有大口黑鲈发病的养殖场各取病鱼 20 尾, 体质量 250~300 g。另外, 感染试验用健康大口黑鲈来自珠江水产研究所水产良种基地, 体质量 100~120 g。

1.2 方法

1.2.1 电镜观察 取病鱼的肝、脾、腹隔膜组织切成约 0.5~1.0 mm³大小, 分别放进装有戊二醛的小瓶进行固定, 用 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液漂

收稿日期: 2010-05-15; 修订日期: 2010-07-27.

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD01A1209); 广东省科技计划项目(2007B020708008); 农业部公益性行业科研专项(200903045).

作者简介: 马冬梅(1978-), 女, 博士, 助理研究员, 从事鱼类生物技术研究. E-mail: madongmei2003@163.com

通信作者: 白俊杰, 研究员. E-mail: baijj2005@21cn.com

洗后,依次用2%锇酸固定、乙醇系列脱水、Spurr包埋、切片,用醋酸铀柠檬酸铅双染色,PHILIPS CM10电镜观察。

1.2.2 病毒滤液的制备 分别取患病大口黑鲈的肝、脾、腹隔膜病灶组织用无血清的MEM培养液(每毫升含1 000 IU/mL青霉素和1 000 µg/mL链霉素)按1:10的比例用匀浆器研磨,制成组织滤液,−20℃冰融1次后10℃下10 000 r/min离心30 min,取上清液,再经0.22 µm的微孔过滤器过滤除菌,除菌液4℃保存,滤液接种于LB平板28℃培养48 h,观察无菌生长,此滤液用于人工感染试验鱼。

1.2.3 实验鱼感染 用上述组织滤液原液和10倍稀释液(0.65%的生理盐水稀释),分别腹腔注射健康大口黑鲈,每个浓度注射10尾,每尾注射量为0.2 mL,同时以注射生理盐水的10尾鱼作对照,每日观察发病情况。感染实验的水体均为150 L,实验期间水温控制在28℃左右。

病毒重新分离和感染实验:将人工感染出现有明显症状的病鱼再次按1.2.2方法制备组织滤液并进行感染实验。

1.2.4 细胞感染 取上述组织滤液用无血清的MEM培养基稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 浓度。把已长成单层的FHM、EPC、CIK细胞各5瓶,倒掉培养液,分别加入上述2个浓度的稀释液,28℃吸附1 h后,倒掉组织滤液,加入含2%血清的MEM维持液,置28℃恒温培养,逐日观察细胞病变(Cytopathic Effect, CPE)情况。

1.2.5 MCP基因的扩增与序列分析 根据已知的鳊(*Siniperca chuatsi*)虹彩病毒主要衣壳蛋白(MCP)基因序列(AF370008)设计引物, P1: 5'-ATGTCTGCAATCTCAGGT-3'; P2: 5'-TTACAGGATAGGGAAGCCTG-3', 委托上海英骏生物技术有限公司合成。用基因组提取试剂盒(Tiangan公司)分别提取病鱼肝脏、脾脏和腹隔膜基因组DNA, 方法参照试剂盒使用说明书。提取的DNA经琼脂糖凝胶电泳检测后进行PCR扩增, 反应体系为50 µL, 其中10×Buffer(含 Mg^{2+})5.0 µL, dNTPs(10 mmol/L) 1 µL, P1和P2(10 µmol/L)各0.5 µL, Taq DNA聚合酶1 U,

模板约DNA 100 ng。PCR反应条件为: 94 预变性3 min; 94 变性30 s, 60 退火30 s, 72 延伸30 s, 32个循环; 72 延伸10 min。取5 µL PCR产物电泳检测, 其余PCR产物用ABI 3730自动测序仪进行序列测定。测序结果在GenBank中进行比对, 分析病毒的进化分类地位。

2 结果与分析

2.1 发病大口黑鲈临床症状

此次流行的大口黑鲈传染性疾病的临床症状包括: 病鱼在水面离群慢游, 鳃变白或伴有出血点, 肝脏肿大变白或土黄色, 少数鱼肝脏有出血斑, 脾脏肿大变黑红色, 肾脏也肿大(图1)。一些病鱼腹隔膜破裂、溃烂, 黏在一起。部分病鱼体色变黑, 下颌至腹部发红, 眼眶四周充血, 严重时个别眼球突出。该病以肝脾的肿大为主要特征, 暂命名为大口黑鲈肝脾肿大病。



图1 发病大口黑鲈症状

箭头示肝脏和脾脏肿大。

Fig. 1 Clinical signs of infected largemouth bass
Arrows show tumefaction of liver and spleen.

2.2 电镜观察结果

将自然发病大口黑鲈肝脏、脾脏和腹隔膜组织进行超薄切片电镜观察, 发现细胞质中存在大量的病毒颗粒, 病毒颗粒呈六角形, 直径大小为145~150 nm, 为正二十面体结构, 无囊膜(图2)。

2.3 毒力实验结果

用组织滤液原液和10倍稀释液腹腔注射健康大口黑鲈, 感染鱼从第12天开始发病, 1周内全部死亡。重新分离感染实验结果与上述实验相同, 组织病毒滤液感染健康大口黑鲈全部发病死亡(表1), 病鱼出现体色变黑, 鳃变白色, 肝脏、

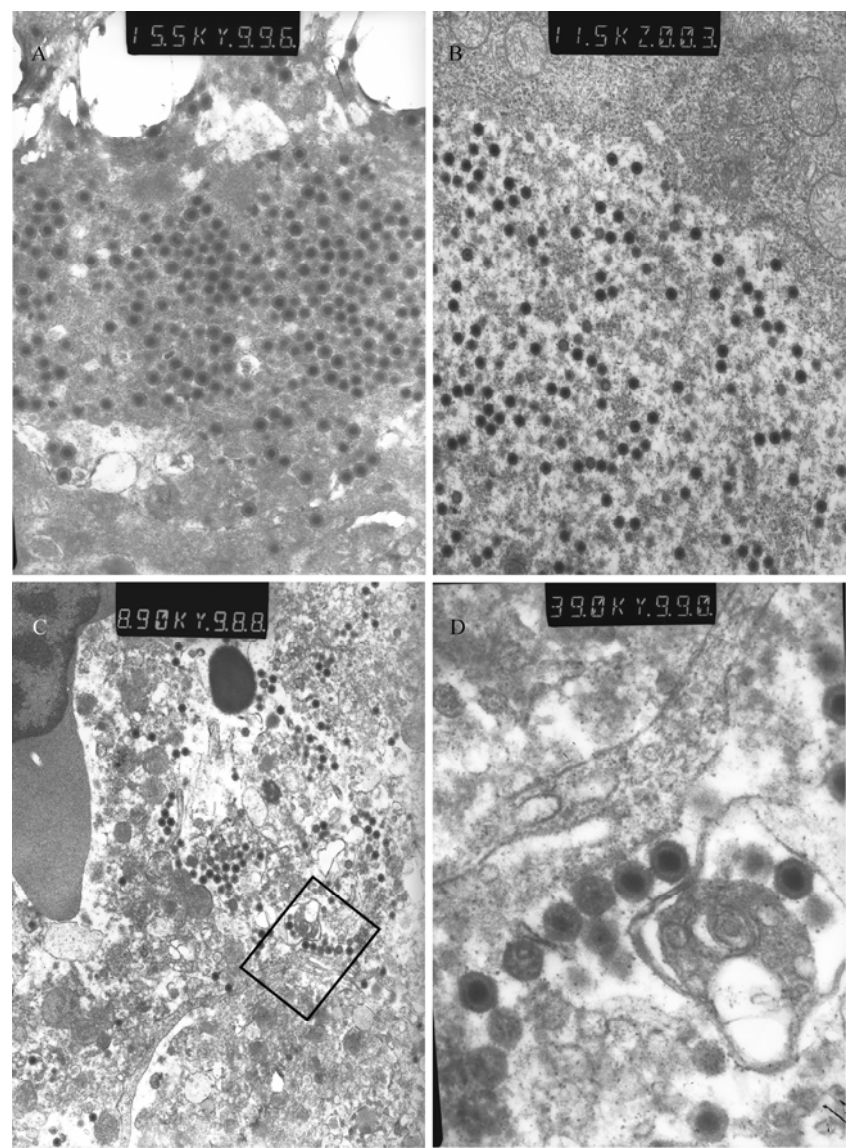


图 2 电镜观察病鱼组织中病毒颗粒

A: 肝脏组织(×15 500); B: 腹隔膜组织(×11 500); C: 脾脏组织(×9 800); D: C 框中放大图(×39 000).

Fig. 2 Electron micrographs of the virus from infected fish

A: Virus in liver (×15 500); B: Virus in pleuroperitoneal membrane (×11 500); C: Virus in spleen (×9 800); D: Magnified image of the box in C (×39 000).

表 1 病毒滤液实验感染大口黑鲈的死亡率

Tab.1 Mortality of largemouth basses experimentally infected with viral filtrate

分组 group	个体数 <i>n</i>	稀释度 dilution	剂量/mL injection volume	发病率/% morbidity	死亡数 death number	死亡率/% mortality
腹腔注射	10	10 ⁻⁰	0.2	100	10	100
intraperitoneal injection	10	10 ⁻¹	0.2	100	9	90
重分离注射	10	10 ⁻¹	0.2	100	10	100
re-isolation and injection						
注射生理盐水	10	/	0.2	0	0	0
injection with physiological saline						
空白对照	10	/	0.2	0	0	0
negative control						

脾脏、肾脏肿大,肝脏变白,脾脏变黑红色等典型发病症状,与自然发病的大口黑鲈症状相似。

2.4 细胞病变观察

将制备的肝、脾、肾组织滤液分别稀释 100 倍和 1 000 倍,接种于已长成单层的 FHM、EPC、CIK 培养细胞,28℃ 恒温培养 8 d 后均未出现细胞病变,又盲传 1 代后仍未出现细胞病变。

2.5 病毒 MCP 基因扩增和序列分析

分别用提取的病鱼肝脏、脾脏和肾脏组织 DNA 作为模板,以 P1 和 P2 为引物,PCR 扩增病毒 MCP 基因,产物经电泳检测大小约为 1 500 bp (图 3)。PCR 产物直接测序,测序结果见图 4。将测得

的核酸序列在 GenBank 中进行比对,结果表明与已报道的细胞肿大病毒属的鳃传染性脾肾坏死病毒(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV, AF371960 和 AF370008)和短鲷虹彩病毒(Dwarf Gourami Iridovirus, DGIV, AY989901)的同源性最高,均为 98.0%。根据核酸序列推测的氨基酸序列与 ISKNV(AAL98730 和 AAL72276)和 DGIV(AAY58048)氨基酸序列的同源性均为 99.0%,表明该病毒在分类上属于虹彩病毒科细胞肿大病毒属(*Megalocytyivirus*)。将感染鳃的 ISKNV、本研究分离得到的感染大口黑鲈的虹彩病毒(LBIV)和感染大口黑鲈的大口黑鲈溃疡综合



图3 各组织中病毒 MCP 基因的扩增

1,4,7,10,13: 肝脏组织 DNA 扩增产物; 2,5,8,11,14: 脾脏组织 DNA 扩增产物; 3,6,9,12,15: 腹隔膜组织 DNA 扩增产物; C: 以双蒸水为模板的阴性对照; M1: DL2000 DNA 分子量标准; M2: λ -Hind DNA 分子量标准。

Fig. 3 PCR results of viral MCP gene from different tissues

1,4,7,10,13: PCR results of liver DNA; 2,5,8,11,14: PCR results of spleen DNA; 3,6,9,12,15: PCR results of pleuroperitoneal membrane DNA; C: Negative control with ddH₂O as template; M1: DL2000 DNA marker; M2: λ -Hind marker.

```

1  GATGCGATGGAGACCCACTTGTACGGCGGCGACAATGCCGTGACCTACTTTGCCCGTGAG
61  ACCGTGCGTAGTTCTGGTACAGCAAACTGCCCGTACCCTGTCAAAACAGACTGGCCAT
121  GCCAATTTTGGGCAGGAGTTTAGTGTGACGGTGCGAGGGGCGCGACTACCTCATTAAT
181  GTGTGGCTGCGTGTTAAGATCCCCTCCATCAGCAAGGAGAGACGCTACATCCGC
241  TGGTGCACAACTCTGATGCACAATCTAGTGAGGAGGTGTCGGTGTCTTAAACGACCTG
301  GTGGCACAGACCCCTCACCAGCGAGTTCCTTGACTTCTGGAACGCCTGCATGATGCCTGGC
361  AGCAACAGTCTGGCTACAACAAGATGATTGGCATGCGCAGCGACCTGGTGGCCGGCATC
421  ACCAACGGCCAGACTATGCCCGCGTCTACCTTAATTTGCCCATTCCTCTTTTACC
481  CGTGACACGGGCTGGCGTTGCCTACTGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGCGCATCCAC
541  TTCAAGCTGCGGCGCTGGGAGGACCTGCTCATCAGCCAGAGCAGCCAGGCCGACATGGCC
601  ATATCAACCGTCACCCTGGCTAACATTGGCAATGTAGCACCTGCACTAACCAATGTGTCT
661  GTGATGGGCACTTACGCTGTGCTGACAAGCGAGGAGCGTGAGGTGGTGGCCAGTCTAGT
721  CGTAGCATGCTCATTGAACAGTGCCAGGTGGCGCCCGCGTGGCCGTACGCCCGCAGAC
781  AATTCTTGGTGCATCTGGACCTCAGGTTCAAGTACCCCGTGAAGGCCTTGTCTTTGCA
841  GTAAAGAAGCTACCCACCGCAACGTGCAAGCAACTACACCGCGGCCAGTCCCGGTGAC
901  GTCAACAACAAGGTGAANCTGCCTTTGATGGCCACCAATCCCCTGTCCGAGGTGCTACTC
961  ATTTACGAGAACCCCTCGGCTCCACCAGATGGGAGTAGACTACTTCACATCTGTCGAC
1021  CCCTACTACTTTGCGCCAGCATGCCTGAGATGGACGGTGTATGACCTACTGCTATACG
1081  CTGGACATGGGCAATATCAACCCCATGGGCTCAACCAACTACGGCCGCGCTGCCAACGTC
1141  ACCCTGTGATGTAAGGTGTCGGACAATGCAAAGACCACCGCGGCGGGCGGTGGCGGCAAC
1201  GGCTCCGGCTACACGGTAGCCCAAAAGTTTGAAGTGGTCGTTATTGCTGTC

```

图4 本研究分离大口黑鲈病毒 MCP 基因的核苷酸序列

Fig. 4 Nucleic acid sequence of MCP gene of the largemouth bass virus isolated in this study

征病毒(Largemouth Bass Ulcerative Syndrome Virus, LBUSV, ADB77863)、大口黑鲈病毒(Largemouth Bass Virus, LMBV, AAC29488)的 MCP 部分氨基酸序列进行比较,可以看出, LBUSV 与 LMBV 的 MCP 蛋白同源率为 98%, 而与研究分离得到的虹彩病毒同源性仅 44%, 4 种虹彩病毒 MCP 部分蛋白序列比较见图 5。

3 讨论

近年来在东亚、东南亚和欧洲地区,由细胞肿大病毒属病毒引起的鱼类疾病已呈明显上升趋势,给水产养殖业造成重大的经济损失,严重阻碍了鱼类养殖业的健康发展^[4]。传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)是细胞肿大病毒属中研究较多的病毒之一,自然感染 ISKNV 的患病鳊主要症状为:肝脏肿大,呈灰白色或土灰色,或白灰相间呈花斑状,有小出血点;肾脏肿大,充血,糜烂,暗红色;脾脏肿大,糜烂,紫黑色。组织切片观察,脾脏和肾脏中都能见到由病毒感染引起的细胞肿大^[5]。ISKNV 毒力实验表明,实验注射 ISKNV 可引起大口黑鲈感染患病,死亡率为 100%^[6-7],但细胞肿大病毒属病毒自然感染大口黑鲈,引起大口鲈发病死亡目前未见报道。本研究首次从自然感染患病的大口黑鲈体内分离得到了细胞肿大病毒属病毒,经人工感染实验证实该病毒为致病病原。病毒经电镜观察为直径约 145~150 nm 的正二十面体结构,与 ISKNV 大小和结构相似,且该病毒的 MCP 基因与 ISKNV MCP 基因核苷酸同源性为 98%,氨基酸同源性为 99%,说明该病毒与鳊传

染性脾肾坏死病毒(ISKNV)有很近的亲缘关系,也可能就是 ISKNV 的一个病毒株。

目前已知虹彩病毒科病毒可以引起鱼类很多严重的疾病。就大口黑鲈而言,已报道的可引起大口黑鲈自然感染死亡的虹彩病毒有大口黑鲈病毒(LMBV)^[8-9]和大口黑鲈溃疡综合征病毒(LBUSV)^[10],这 2 种病毒都属于虹彩病毒科蛙病毒属,亲缘关系较近^[10],但它们的感染症状区别明显。LMBV 是从美国南卡罗来那州 Santee-Cooper 水库的野生大口黑鲈群体中分离出来的,自然感染 LMBV 的大口黑鲈主要症状为在水面漂浮游泳,鱼鳃变大,泌气腺变大,体表没有溃疡,未见肝脏、脾脏和肾脏的肿大^[8]。LBUSV 是 2008 年在中国广东省佛山地区的养殖大口黑鲈群体中分离出来的一种病毒,自然感染 LBUSV 的鱼主要症状为体表皮肤和肌肉红肿溃烂,有时可观察到肝脏和脾脏肿大,未见鱼鳃异常^[10]。而本研究分离得到的病毒,其自然感染大口黑鲈症状为病鱼在水面离群慢游,肝脏、脾脏、肾脏肿大。这 3 种病毒均可感染大口黑鲈并引起其死亡,但其症状不同,因此从大口黑鲈发病的症状可初步判断属于哪种病毒感染。

将制备的肝、脾、肾组织滤液接种于 FHM、EPC、CIK 培养细胞,培养 8 d 后,又盲传 1 代均没有出现细胞病变,这与以前鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)的研究报道相似^[11]。

MCP 基因序列分析表明,本研究分离得到的虹彩病毒为细胞肿大病毒属病毒,与 ISKNV 亲缘关系最近,氨基酸同源性为 99%;而用广东佛山



图 5 4 种虹彩病毒 MCP 部分蛋白序列比较

LBIV: 本研究分离得到的大口黑鲈病毒; ISKNV: 传染性脾肾坏死病毒 (AAL98730); LBUSV: 大口黑鲈溃疡综合征病毒 (ADB77863); LMBV: 大口黑鲈病毒 (AAC29488)。

Fig.5 Comparison of partial MCP amino acid sequences from four iridovirus

LBIV: Largemouth bass virus isolated in this study; ISKNV: Infected spleen and kidney necrosis virus (AAL98730); LBUSV: Largemouth bass ulcerative syndrome virus (ADB77863); LMBV: Largemouth bass virus (AAC29488)。

地区 2008 年分离得到的蛙病毒属病毒LBUSV MCP基因检测引物^[10]扩增病鱼组织,没有得到任何PCR产物,同时LBUSV与本次分离到的病毒氨基酸同源性仅约为 44%,说明在 2008–2009 年短期内有 2 种亲缘关系较远的虹彩病毒自然感染了该地区的大口黑鲈,并引起了病鱼死亡。

参考文献:

- [1] Williams T. The Iridoviruses [J]. Adv Virus Res, 1996, 46: 345–412.
- [2] Goorha R. Family Iridoviridae [R]//Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses (6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)”. Arch Virol Suppl, 1995, 10: 95–99.
- [3] Chinchar V G, Essbauer S, He J G, et al. Family Iridoviridae [R]// Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al, Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2005: 145–162.
- [4] 吴成龙, 孔晓瑜, 史成银. 鱼类细胞肿大虹彩病毒病研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(3): 70–74.
- [5] 何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊暴发性流行病病毒性病原研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1998, 37(5): 25–31.
- [6] He J G, Zeng K, Weng S P, et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Aquaculture, 2002, 204: 11–24.
- [7] 曾慷, 何建国, 翁少萍, 等. 传染性脾肾坏死病毒感染途径、宿主范围及对温度敏感性的研究[J]. 中国病毒学, 1999, 14(4): 353–357.
- [8] Plumb J A, Grizzle J M, Young H E, et al. An iridovirus isolated from wild largemouth bass[J]. J Aquat Anim Health, 1996, 8: 265–270.
- [9] Mao J, Wang J, Chinchar G D, et al. Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 37(2): 107–114.
- [10] 邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病的病原分离和鉴定初步研究[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871–877.
- [11] Dong C, Weng S, Shi X, et al. Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Virus Res, 2008, 135: 273–281.

Pathogeny of disease characterized by swollen liver and spleen in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

MA Dongmei, DEND Guocheng, BAI Junjie, LI Shengjie, JIANG Xiaoyan, YANG Xiaojing

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

Abstract: During October, 2009, a serious infectious disease began to break out in cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) of Foshan area in Guangdong province of China. Affected fish had following clinical signs including slowly swimming, floating at the surface of water, pale gill, swollen liver, spleen and kidney, pale liver and dark red spleen. Transmission electron microscopy of the focus liver, spleen and kidney revealed numerous cytoplasmic, icosahedral virion without envelope. The diameter of the virion was about 156–160 nm. Filtrate dilutions of liver, spleen and kidney were inoculated onto the monolayers of EPC, FHM and CIK cells respectively, but cytopathic effect (CPE) was not observed at the 8th days after infection. According to known MCP gene sequences of iridovirus, special primers were designed to amplify the MCP gene of the current virus. Liver, spleen and kidney DNA was extracted as PCR templates. PCR products were sequenced and the nucleic acid sequence of viral MCP gene is 98% identical to those of ISKNV (Infectious spleen and kidney necrosis virus) and DGIV (Dwarf gourami iridovirus), and the amino acid sequence is 99% to those of them. Transmission electron microscopy and MCP gene sequence of the virus indicated that the pathogen is a virus of genus *Megalocytivirus*, family Iridoviridae. Experimentally infection for healthy largemouth bass with filtrates of tissues by intramuscular injecting caused a more than 90% mortality and the signs of the infected fish were similar to those of natural infection. In contrast, control fish exhibited no mortality and no clinical signs of infection. LMBV was a ranavirus isolated from diseased largemouth bass in USA. Naturally infected largemouth bass with LMBV appeared normal and lacked external lesions, but they floated at water's surface with an enlarge swim bladder. A similar ranavirus was isolated in China in 2008, and its predicted amino acid sequence was 98% identical to corresponding sequence of LMBV, and naturally infected largemouth bass with the virus were all characterized by extensive ulceration in skin and muscle. Different from the symptoms of the above viruses, largemouth bass infected by the currently megalocytivirus exhibited swollen liver, spleen and kidney. All of the three viruses could cause death of largemouth bass, but the clinical signs of the infections were different. This study is the first report on largemouth bass naturally infected by megalocytivirus.

Key words: *Micropterus salmoides*; pathogen; the disease characterized by swollen liver and spleen; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)

Corresponding author: BAI Junjie. E-mail: baijj2005@21cn.com