

蛙病毒三重荧光 PCR 检测方法的建立^①

李江宇^{②*} 王树云 * 王 姝** 任 彤* 高志强* 谷 强* 张 伟* 刘艳华*
王 娜*** 张 旻*** 景宏丽*** 江育林*** 张利峰^{③*}

(* 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 北京 10113)

(** 北京市水产技术推广站 北京 100021)

(*** 中国检验检疫科学研究院 北京 100176)

摘 要 根据 GenBank 中收录的蛙病毒属虹彩病毒主要衣壳蛋白(MCP)基因序列设计了一对通用引物和 3 条 Taqman 探针,通过 PCR 反应体系的优化以及反应的特异性、灵敏性和干扰性试验,建立了一种可检测蛙病毒属大部分成员并能进行初步分类的三重荧光 PCR 方法。通过鉴定分析将蛙病毒属成员分为三类,其中第一类包括蛙病毒 3 型(FV3)、饰纹汀蛙虹彩病毒(BIV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)、欧洲鲶鱼病毒(ECV)、欧鲶病毒(ESV)、中华鳖虹彩病毒(STIV)、大鲵虹彩病毒(ADIV)、沼泽绿牛蛙虹彩病毒(RGV)和虎纹蛙病毒(TFV),第二类是 Santee-Cooper 蛙病毒(SCRV),由大口黑鲈虹彩病毒(LMBV)、裂唇鱼病毒(DFV)和孔雀鱼病毒(GV6)组成,而新加坡石斑鱼虹彩病毒(SGIV)则单独作为第三类。进一步分析发现各病毒的最低检测量均达到 10^2 拷贝,表明该方法除了具有良好的特异性和稳定性之外还具有高度灵敏性。建立的该蛙病毒三重荧光 PCR 方法可为蛙病毒的快速诊断和分子流行病学调查提供一种有效的技术手段。

关键词 蛙病毒, 虹彩病毒, 主要衣壳蛋白(MCP)基因, 三重荧光 PCR, Taqman 探针

0 引言

蛙病毒(ranaviruses)属虹彩病毒科(Iridoviridae),蛙病毒属(Ranavirus)为裸露或有囊膜的二十面体病毒粒子,基因组为单分子、线状双链 DNA,病毒直径约 150 ~ 170 nm, DNA 全长为 150 ~ 170 kb^[1]。近年来,由蛙病毒引起的鱼类、两栖类和爬行类动物的疾病遍布全球,出现病症后的动物死亡率可高达 100%^[2],被称为冷血动物的杀手^[3],对自然生态平衡和水产养殖业造成了重大影响,引起各国研究人员的重视。世界动物卫生组织(OIE)已于 2009 年正式将“蛙病毒感染”列入必须报告的水生

动物疫病名录。在亚洲、大洋洲、欧洲、北美洲和南美洲等地区,从自然生存或养殖的健康以及死亡的蛙体中均分离到了蛙病毒^[2,4],到目前为止,已经分离到十几种不同的毒株,种类还在增加。蛙病毒 3 型(Frog virus 3, FV3)为蛙病毒的模式株,其他毒株有流行性造血器官坏死病毒(epizootic hematopoietic necrosis virus, EHNV)、饰纹汀蛙虹彩病毒(boheliridovirus, BIV)、欧洲鲶鱼病毒(European catfish iridovirus, ECV)、欧鲶病毒(European sheethfishiridovirus, ESV)、虎纹钝口螈病毒(ambystomatigrinum virus, ATV)、大口黑鲈虹彩病毒(largemouth bass ranavirus, LMBV)、裂唇鱼病毒(doctor fish virus, DFV)和

① 国家科技支撑计划(2013BAD12B02)资助项目。

② 女,1987 年生,硕士;研究方向:微生物学与免疫学;E-mail: lijianyu@163.com

③ 通讯作者,E-mail: zlf1973@163.com

(收稿日期:2015-03-04)

孔雀鱼病毒(guppyfishiridovirus, GV6)^[4],其中 LM-BV、DFV 和 GV6 统称为 Santee-Cooper 蛙病毒(Santee-Cooper ranavirus, SCRv) 病毒^[5]。我国也从中华鳖、沼泽绿牛蛙、虎纹蛙、大鲵以及石斑鱼中分别分离到了中华鳖虹彩病毒(soft-shelled turtle iridovirus, STIV)^[6]、沼泽绿牛蛙虹彩病毒(*Ranagrylio* virus, RGV)^[7]、虎纹蛙病毒(tiger frog virus, TFV)^[8]、大鲵虹彩病毒(Andrias davidianus iridovirus, ADIV)^[9]和新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)^[10]。我国每年由水产病害造成的经济损失超过 100 亿元,其中由蛙病毒等虹彩病毒所致的损失高达数十亿元^[11]。对于蛙病毒感染,目前尚没有特效的治疗方法,只有早期诊断和提前防控,才能有效防止蛙病毒的传染。因此,建立快速灵敏的蛙病毒检测方法,对于及时有效地进行病害防控,促进水产养殖业经济的可持续发展,有重大意义。目前部分蛙病毒的常规 PCR 和荧光 PCR 检测方法已有报道^[12-18],与这些方法相比,本研究建立的蛙病毒三重荧光 PCR 方法有所不同,其明显的优点在于能够在检测蛙病毒属的大部分成员的同时能够将蛙病毒鉴定区分为三大种类,其检测的特异性强、灵敏度高,检测时探针之间无相互干扰现象,是一种高通量、低成本、高效率的检测方法,也是一种进行流行病学研究调查的有效技术手段。

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞系

采用现有保存的蛙病毒进行三重荧光 PCR 方法的建立,其中蛙病毒 3 型(FV3)、饰文汀蛙虹彩病毒(BIV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)、中华鳖虹彩病毒(STIV)、大鲵虹彩病毒(ADIV)和斑点叉尾鲷病毒(Channel catfish virus, CCV)由本实验室保存,大口黑鲈虹彩病毒(LMBV)由中国水产科学院珠江水产研究所惠赠,新加坡石斑鱼虹彩病毒(SGIV)由中科院南海海洋研究所秦启伟教授惠赠。鲤鱼上皮瘤细胞(Epitheliomacarpapulosumcyprini, EPC)和斑点叉尾鲷卵巢细胞(Channel catfish ovary, CCO)由本实验室保存。

1.2 仪器与试剂

主要的仪器为 Roche Light Cycler 480 II 荧光 PCR 检测仪。主要的试剂如下: M199 和 DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶均购自 Gibco 公司; Taq DNA 聚合酶、10 × recreation buffer、25mM MgCl₂ 均购于 Promega 公司; 10 mM dNTP 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物、探针和特异性质粒均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 探针与引物设计

主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)是虹彩病毒(iridovirus)的主要组成部分,占整个病毒粒子多肽的 40% ~ 50%,具有高度的保守性,是虹彩病毒进化和分类的重要依据^[19],所以本研究针对 GenBank 中收录的虹彩病毒蛙病毒属病毒(FV3、BIV、EHNV、欧洲鲷鱼病毒(ECV)、欧鲈病毒(ESV)、STIV、ADIV、沼泽绿牛蛙虹彩病毒(RGV)、虎纹蛙病毒(TFV)、SGIV、裂唇鱼病毒(DFV)和孔雀鱼病毒(GV6))主要衣壳蛋白(MCP)基因序列,首先采用 MEGA 3.1 构建了蛙病毒的系统发育树(见图1),分析了不同蛙病毒之间的亲缘

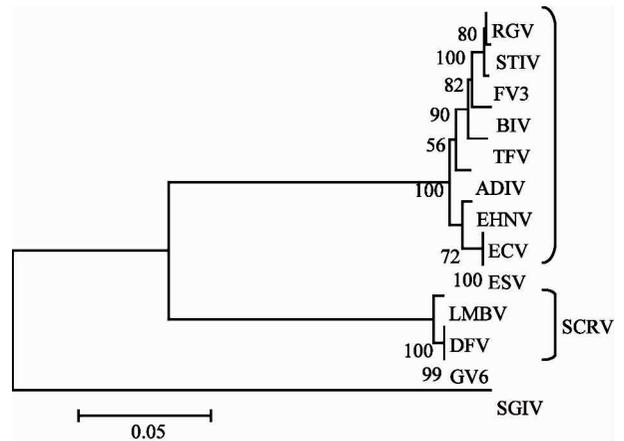


图1 蛙病毒系统进化树

关系。BLAST 序列比对发现 FV3、BIV、EHNV、ECV、ESV、STIV、ADIV、RGV、TFV 这几种蛙病毒的 MCP 编码基因的相似性均大于 96%,亲缘关系较近,所以将其归为一大类进行鉴定,区别于另外 2 种蛙病毒——SCRv^[5]和 SGIV。然后利用 oligo 6.0 软件针对 MCP 基因设计了荧光 PCR 引物及其 Taqman 探针,设计了一对通用引物,正向引物为 5'-ATGGT-

GCARAACGTCA -3', 反向引物为 5'-GCTCCA KSAC-SGTGTT -3', 设计的 3 条 Taqman 探针如表 1 所示, 其中探针 1 是根据 GenBank 中收录的 FV3、BIV、EHNV、ECV、ESV、STIV、ADIV、RGV 和 TFV 的 MCP

基因设计的, 蛙病毒三重荧光 PCR 检测时, 当 FAM 检测通道出现明显的“S”型扩增曲线时, 表明该检测样本感染 FV3、BIV、EHNV、ECV、ESV、STIV、ADIV、RGV 和 TFV 的蛙病毒中的某一种。

表 1 蛙病毒三重荧光 PCR 探针

探针	所检测蛙病毒种类
探针 1: 5'-FAM-CTTCCGTCGGCTCCAATTACACC-BHQ1-3'	FV3、BIV、EHNV、ECV、ESV、STIV、ADIV、RGV、TFV
探针 2: 5'-HEX-CCAACAACAGGAGTGACGCAAGTG-BHQ1-3'	SCRV
探针 3: 5'-CY5-CTGTGGGTTCAAATTATACGTGTGT-BHQ3-3'	SGIV

1.4 三重荧光 PCR 方法的建立

1.4.1 病毒的增殖和病毒 DNA 的提取

试验所用各蛙病毒 (FV3、BIV、EHNV、STIV、ADIV、LMBV、SGIV) 均采用鲤鱼上皮瘤细胞 (EPC) 增殖, 加入含 10% 胎牛血清 M199 培养基, 25℃ 培养; 斑点叉尾鲴病毒 (CCV) 用斑点叉尾鲴卵巢细胞 (CCO) 增殖, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 25℃ 培养。待细胞病变达到 85% 以上收毒, 并反复冻融 3 次, 取病毒悬液 200μL, 采用病毒基因组提取试剂盒 (天根) 提取核酸, 同时提取不接种病毒的细胞 DNA, 作为阴性对照模板。

1.4.2 三重荧光 PCR 扩增条件的优化

将通用引物浓度从 0.1μM 至 0.9μM 以每 0.1μM 递增; 探针浓度从 0.1μM 至 0.4μM 以每 0.05μM 递增; 将 Mg²⁺ 的浓度从 1mM 至 5.0mM 以每 0.5mM 递增; 将酶用量分别以 1.25U、2.5U 和 3.75U 用量进行重复试验, 通过对引物和探针浓度、Mg²⁺ 浓度和酶用量进行优化, 筛选最佳反应浓度。针对 Roche Light Cycler 480 II 荧光 PCR 检测仪, 对扩增退火温度进行了优化。

1.4.3 三重荧光 PCR 标准曲线的建立

分别合成相对应的特异性质粒标准品 (生工), 使用已知拷贝数的 10 倍系列稀释的纯化质粒 (每个梯度 3 个平行样), 按照 1.4.2 的优化好的方法进行三重荧光 PCR 扩增, 以各质粒标准品的起始拷贝数为 X 轴, 以 CT 值为 Y 轴建立标准曲线, 用于判定本实验所建立的三重荧光 PCR 的最低检测极限。

1.4.4 三重荧光 PCR 特异性试验

以优化的三重荧光 PCR 条件对提取的各蛙病毒 (FV3、BIV、EHNV、STIV、ADIV、LMBV、SGIV) 和 CCV 病毒 DNA 分别进行 PCR 扩增, 以检测该方法的特异性。

1.4.5 三重荧光 PCR 敏感性试验

将各蛙病毒 (FV3、BIV、EHNV、STIV、ADIV、LMBV、SGIV) 的 DNA 模板分别 10 倍系列稀释后使用前面试验优化获得的最佳三重荧光 PCR 条件进行扩增, 确定该方法可检测各蛙病毒 DNA 的最低量, 并与各蛙病毒的单重荧光 PCR 能够检测到的最低含量比较, 以评价试验的灵敏性。单重荧光 PCR 反应体系 (25 μL) 如下: 5 μL 的 DNA 模板, 10 × recreation buffer 2.5 μL, 25mM MgCl₂ 3 μL, 10 mM dNTP 0.5 μL, 通用正向引物 (20 μM) 0.5 μL, 通用反向引物 (20 μM) 0.5 μL, 探针 (20 μM) 0.25 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 用水补足至总体积 25 μL。

1.4.6 三重荧光 PCR 干扰性试验

选取 ADIV、LMBV 和 SGIV 模板进行不同浓度组合 (最高浓度: 最低浓度 ≥ 1000), 取各浓度的 3 种病毒各 2 μL, 即将 6 μL 混合模板加入三重荧光 PCR 反应体系中进行检测, 确定高浓度模板对低浓度模板的扩增是否有抑制作用, 在检测时是否存在相互干扰现象。

2 结果

2.1 反应条件优化结果

反应优化结果表明, 采用 0.8 μM 的引物浓度、

0.4 μM 的探针浓度和 3.0mM 的 Mg^{2+} 浓度,获得的 CT 值最小且荧光增加值 (ΔRn) 较大,优化的三重荧光 PCR 反应体系 (25 μL) 如下:5 μL 的 DNA 模板,10 \times recreation buffer 2.5 μL ,25mM MgCl_2 3 μL ,10 mM dNTP 0.5 μL ,通用正向引物 (20 μM) 1 μL ,通用反向引物 (20 μM) 1 μL ,探针 1 (20 μM) 0.5 μL ,探针 2 (20 μM) 0.5 μL ,探针 3 (20 μM) 0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶 (5U/ μL) 0.5 μL ,用水补足至总体积 25 μL 。对试验的退火温度进行了优化,确定的最佳扩增条件如下:第一阶段:95 $^\circ\text{C}$ /3 min;第二阶段:95 $^\circ\text{C}$ /15 s,54 $^\circ\text{C}$ /15 s,60 $^\circ\text{C}$ /30 s,40 个循环,60 $^\circ\text{C}$ 延伸时收集荧光。

2.2 标准曲线的建立

使用 10 倍系列稀释的特性质粒作为模板,分别进行三重荧光 PCR 试验 (每个稀释度作三个平行样品),以各标准品的起始拷贝数为 X 轴,以 CT 值为 Y 轴建立标准曲线,如图 2 所示。得到的 ADIV、

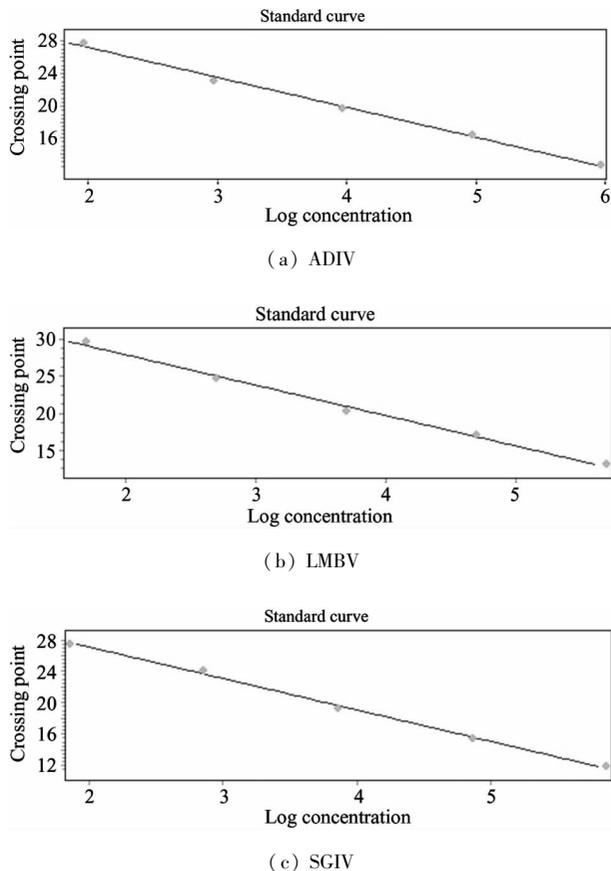


图 2 三重荧光 PCR 标准曲线

LMBV、SGIV 线性回归方程分别为 $Y = -3.674\lg X + 34.50$ (相关系数为 0.9983), $Y = -4.091\lg X + 36.04$ (相关系数为 0.9984), $Y = -4.002\lg X + 35.07$ (相关系数为 0.9986)。

2.3 特异性检测结果

在三重荧光 PCR 反应体系中,加入其中一种蛙病毒 (FV3、BIV、EHNV、STIV、ADIV、LMBV、SGIV) 核酸作为模板进行扩增,结果在相应的检测通道呈典型的“S”型扩增曲线,而且以斑点叉尾鮰病毒核酸为模板经 PCR 扩增未出现典型的扩增曲线,见图 3 (FV3、BIV、EHNV 和 STIV 图略),表明所设计的引物和探针具有特异性,与其它病毒无交叉反应。

2.4 灵敏性检测结果

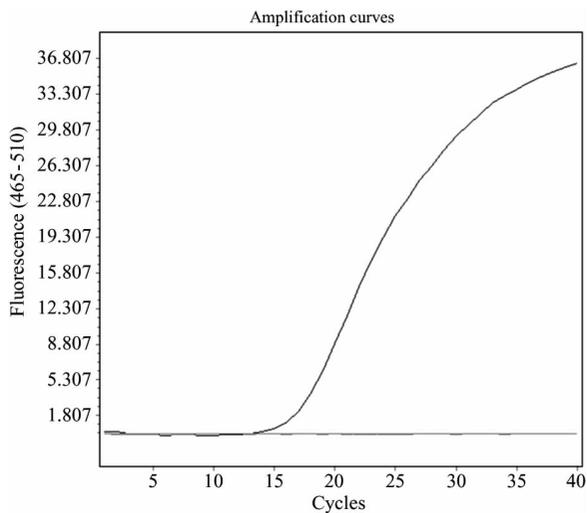
将 FV3、BIV、EHNV、STIV、ADIV、LMBV、SGIV 核酸 10 倍系列稀释,灵敏性检测结果如图 4 所示 (FV3、BIV、EHNV 和 STIV 图略),根据 3.2 蛙病毒三重荧光 PCR 建立的标准曲线结果进行换算,FV3、BIV、EHNV、STIV、ADIV、LMBV 和 SGIV 的最低检测极限均达到 10^2 拷贝。三重荧光 PCR 比单重荧光 PCR 的灵敏度降低 10 倍。

2.5 干扰性检测结果

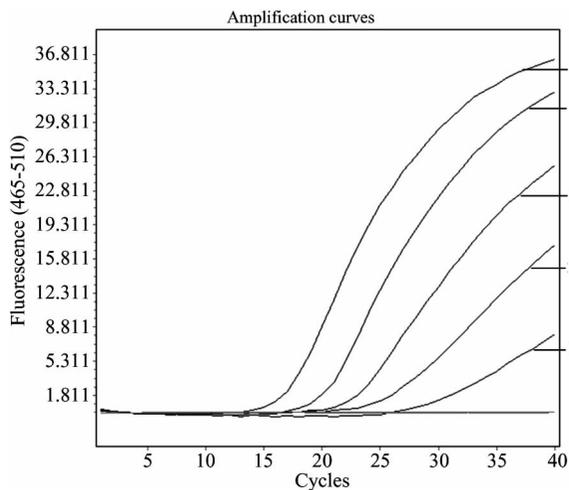
将 ADIV、LMBV 和 SGIV 模板进行不同浓度组合 (最高浓度:最低浓度 ≥ 1000),取各浓度的 3 种病毒各 2 μL ,即将 6 μL 混合模板加入荧光 PCR 反应体系中进行检测,结果在相应的检测通道呈典型的“S”型扩增曲线,说明在同时检测这 3 种病毒时不存在相互干扰现象,高浓度模板对低浓度模板的扩增未表现出抑制作用。干扰性试验结果见表 2。

3 讨论

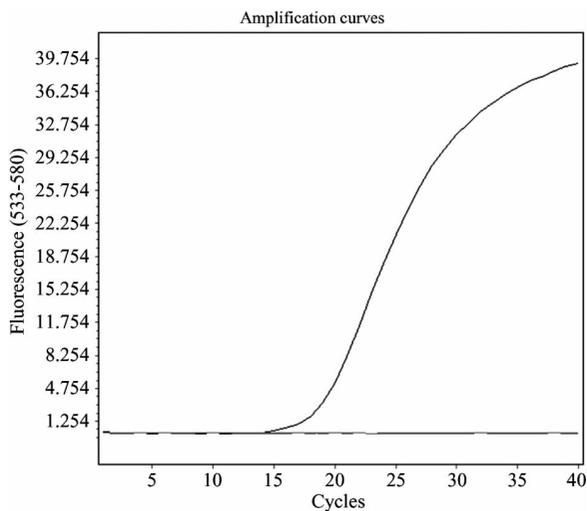
本文建立的蛙病毒三重荧光 PCR 方法具有高通量、低成本和高效率的优点。目前研究者们建立了部分蛙病毒的常规 PCR 方法和荧光 PCR 方法^[12-18],但还没有研究出 LMBV 和 SGIV 的荧光 PCR 方法,本研究首次建立了在同一反应管中同时筛查十几种蛙病毒的方法,检测覆盖种类多,而且能够将蛙病毒鉴定区分为三大种类。本研究设计采用



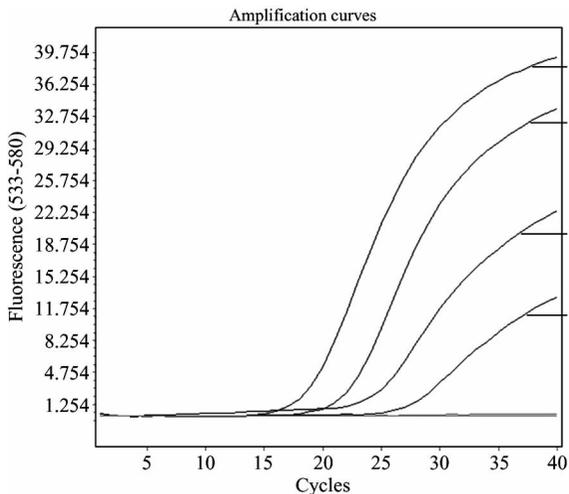
(a) ADIV



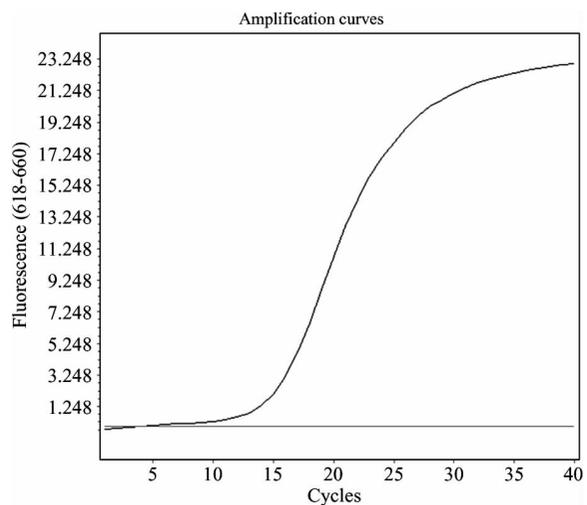
(a) ADIV



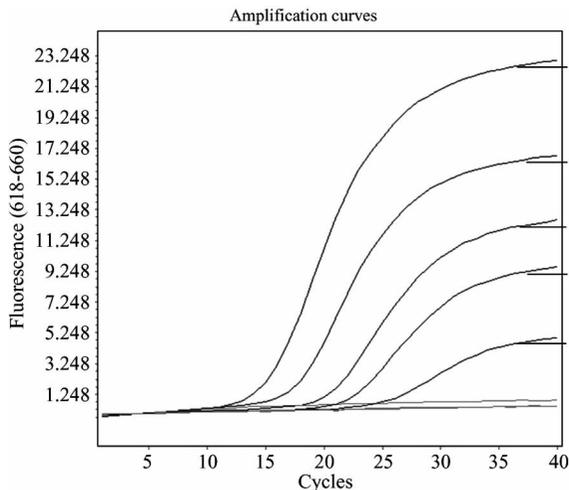
(b) LMBV



(b) LMBV



(c) SGIV



(c) SGIV

图3 蛙病毒三重荧光 PCR 特异性试验

图4 蛙病毒三重荧光 PCR 灵敏性试验

表 2 蛙病毒三重荧光 PCR 干扰性试验结果

	I			II			III		
	ADIV	LMBV	SGIV	ADIV	LMBV	SGIV	ADIV	LMBV	SGIV
核酸 浓度 (ng/ μ L)	64.86	61.63×10^{-3}	88.41×10^{-3}	64.86×10^{-3}	61.63×10^{-3}	88.41	64.86×10^{-3}	61.63	88.41×10^{-3}
CT 值	15.24 ± 0.23	27.16 ± 0.05	21.39 ± 0.34	22.13 ± 0.17	26.11 ± 0.47	12.86 ± 0.17	21.68 ± 0.12	16.78 ± 0.69	20.84 ± 0.04

了一对通用引物,避免了多对引物之间的相互干扰,而且设计的 3 条探针所标记的荧光基团间无相互干扰,且特异性强,其灵敏度接近单重荧光 PCR 的灵敏度。当体系中同时加入高浓度模板和低浓度模板时,高浓度模板对低浓度模板的扩增未表现出抑制作用,检测时无相互干扰现象。

综上所述,本研究建立的蛙病毒三重荧光 PCR 检测方法具有特异性好、灵敏性高、快速简便等优点,可用于蛙病毒的快速筛查和诊断,为蛙病毒的流行病学调查提供一种有效的技术手段。

参考文献

- [1] Chinchar G, Essbauer S, He J G, et al. (2005). Family Iridoviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A, eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145-161
- [2] Langdon J S, Humphrey J D. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 1987, 10 (4): 289-297
- [3] Chinchar V G. Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Archives of virology*, 2002, 147 (3): 447-470
- [4] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒学. 北京:中国高等教育出版社, 2008
- [5] Bister T J, Myers R A, Driscoll M T, et al. Largemouth bass population trends in two Texas reservoirs with LMBV-attributed die-offs. *ProcAnnuConf Southeast Assoc Fish and Wildl Agencies*, 2006, 60:101-105
- [6] Huang Y H, Huang X H, Liu H, et al. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae. *BMC Genom*, 2009, 10: 224
- [7] 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. *水生生物学报*, 1996, 20 (4):390-392
- [8] Wang X H, Weng S P, He J G. In vitro culture and physico-chemical properties of a virus isolated from diseased *Rana tigrina rugulosa*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(4): 363-367
- [9] 江育林, 张旻, 景宏丽等. 患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究. *病毒学报*, 2011, 27 (3):274- 282
- [10] Song W G, Qin Q W, Qiu J, et al. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. *Journal of Virology*, 2004, 78(22):12576-12590
- [11] 林端, 董燕红, 袁茵等. 鱼类虹彩病毒 PCR 快速检测试剂盒的准确度评价及其应用. *海洋环境科学*, 2007, 26(2): 190-193
- [12] World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals; Infection with ranavirus. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.1.02_RANAVIR-US.pdf; OIE, 2014
- [13] Pallister J, Gould A, Harrison D, et al. Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *Journal of fish diseases*, 2007, 30(7): 427-438
- [14] Jaramillo D, Tweedie A, Becker J A, et al. A validated quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of ranaviruses (Family Iridoviridae) in fish tissue and cell cultures, using EHNV as a model. *Aquaculture*,

2012, 356: 186-192

[15] Marsh I B, Whittington R J, Hyatt A D, et al. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molecular and cellular probes*, 2002, 16 (2): 137-151

[16] 李惠芳, 吕建强, 岳志芹等. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 172-176

[17] 王庆, 曾伟伟, 刘春等. 大口黑鲈虹彩病毒双重 PCR 检测方法的建立. *华中农业大学学报*, 2013, 32(4): 106-110

[18] 周勇, 曾令兵, 孟彦等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. *水产学报*, 2012, 36(5): 772-778

[19] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution?. *Virus genes*, 1998, 16(1): 59-66

Development of multiplex real-time PCR assay for detection of ranaviruses

Li Jiangyu^{*}, Wang Shuyun^{*}, Wang Shu^{**}, Ren Tong^{*}, Gao Zhiqiang^{*}, Gu Qiang^{*}, Zhang Wei^{*},
Liu Yanhua^{*}, Wang Na^{***}, Zhang min^{***}, Jing Hongli^{***}, Jiang Yulin^{***}, Zhang Lifeng^{*}

(* Inspection and Quarantine Technical Center of Beijing Enter-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 101113)

(** Beijing Aquatic Product Technology Promotion Department, Beijing 100021)

(*** Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176)

Abstract

Based on the sequences of major capsid protein (MCP) gene from the *Ranaviruses* downloaded from GenBank, a pair of universal primers and three Taqman probes were designed, and a multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of ranaviruses was developed by optimization of PCR reaction systems as well as the experiments on reaction's sensitivity, specificity and interference. Most of the ranavirus members were detected and they were divided into three subgroups by using the PCR method. The first subgroup included frog virus 3 (FV3), bohel iridovirus (BIV), epizootic hematopoietic necrosis virus (EHNV), European catfish iridovirus (ECV), European sheethfish iridovirus (ESV), soft-shelled turtle iridovirus (STIV), *Andrias davidianus* iridovirus (ADIV), rana grylio virus (RGV) and tiger frog virus (TFV), and thesecond subgroup was Santee-Cooper ranavirus (SCRV), consisting of largemouth bass ranavirus (LMBV), doctor fish virus (DFV) and guppyfish iridovirus (GV6), Singapore grouper iridovirus (SGIV) was the only member of the third subgroup. Moreover, a detection limit of 10^2 copies represented a high sensitivity of the new method, apart from its good specificity and stability. It would be an useful tool for rapid ranavirus detection and epidemiology investigation.

Key words: ranaviruses, iridovirus, MCP gene, multiplex real-time PCR, Taqman probe