

# 上海地区小鼠诺瓦克病毒的检测分析及病毒分离

刘芹<sup>1,2,3</sup>, 魏晓锋<sup>3</sup>, 田立立<sup>3</sup>, 高诚<sup>2,3</sup>

(1. 复旦大学, 上海 200032; 2. 上海市计划生育科学研究所, 上海 200032; 3. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

**【摘要】** 目的 了解上海地区实验小鼠自然感染小鼠诺瓦克病毒 (murine norovirus, MNV) 的状况, 并分离毒株。方法 抽取委托检测单位送检的 SPF 小鼠 319 只, 分别采集盲肠内容物及血液样本, 应用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法扩增小鼠盲肠内容物样本中 MNV 的特异性基因片段来检测 MNV 的感染情况, 同时采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 与核酸检测方法进行对比。将 RT-PCR 扩增结果为阳性的盲肠内容物样本稀释并经 0.22 μm 滤膜过滤, 接种到小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞, 盲传后采用 RT-PCR 方法鉴定。结果 RT-PCR 检测的 319 份小鼠盲肠内容物样本中, 阳性样本 95 份, 阳性率为 29.78%。对 180 份经 RT-PCR 检测的小鼠血清进行 ELISA 检测, 阳性样本 70 份, 阳性率为 38.89%。RAW 264.7 细胞盲传 5 代后在 72 h 内出现细胞病变, 经 RT-PCR 鉴定, 显示 187 bp 的目的条带。结论 通过核酸检测方法和血清学方法证实上海地区实验小鼠存在 MNV 自然感染, 且感染率较高, 应加强实验小鼠的饲养管理。

**【关键词】** 小鼠诺瓦克病毒; 自然感染; 逆转录-聚合酶链反应; 酶联免疫吸附试验

**【中图分类号】** Q95-33, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0080-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.018

## Detection and isolation of murine norovirus in laboratory mice in Shanghai area

LIU Qin<sup>1,2,3</sup>, WEI Xiao-feng<sup>3</sup>, TIAN Li-li<sup>3</sup>, GAO Cheng<sup>2,3</sup>

(1. Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032; 3. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203)

**【Abstract】 Objective** To investigate the natural infection status of murine norovirus (MNV) in laboratory mice in Shanghai area and isolate MNV from mouse cecal feces. **Methods** To collect cecal contents and serum samples from 319 specific pathogen-free (SPF) mice coming from different research institutions. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect MNV infection in the mice, respectively. The positive stool samples were diluted and filtered through 0.22 μm membrane, inoculated into RAW 264.7 cells, and then identified by RT-PCR. **Results** There were 95 positive results in the 319 cecal samples by RT-PCR, and the positive rate was 29.78%. Among 180 serum samples which were tested by RT-PCR, 70 samples were positive by ELISA, and the positive rate was 38.89%. The infected RAW 264.7 cells showed cytopathic effect (CPE) within 72 h. After 3 times of freezing and thawing, RT-PCR obtained a 187 bp band. **Conclusions** The results from the present study show that there is a high natural infection rate of MNV in laboratory mice in Shanghai area, and the strict breeding management must be strengthened.

**【Key words】** Murine norovirus (MNV); Natural infection; RT-PCR; ELISA

诺瓦克病毒 (Norwalk-like viruses, NLV), 也称为诺如病毒 (Noroviruses, NVs) 或小圆结构病毒 (Small round structured virus), 是一种高致病性、低致病剂量病毒<sup>[1]</sup>, 该病毒于 1972 年由 Kapikian<sup>[2]</sup> 应

[基金项目] 上海市科委创新行动计划“小鼠诺瓦克病毒的特性研究”(NO. 12140900502)。

[作者简介] 刘芹(1987-)女, 硕士, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: liuqin870101@126.com

[通讯作者] 魏晓锋, 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: wei.xf@outlook.com

用免疫电镜(IEM)从患者粪便标本中首次找到致病病毒颗粒,将其命名为诺瓦克病毒(Norwalk viruses, NVs)。

小鼠诺瓦克病毒(MNV)属于杯状病毒科,诺如病毒属,无包膜,呈线性,是单股正链 RNA 病毒<sup>[3]</sup>,基因组 RNA 长约 7.4 kb,3'端有一个多聚 A 尾结构,5'端共价连接病毒蛋白 VPg<sup>[4]</sup>。NVs 的 RNA 基因组由三个主要的开放阅读框(Open Reading Frames, ORFs)组成<sup>[5,6]</sup>。据文献报道小鼠诺瓦克病毒(Murine norovirus, MNV)是目前发现的第一个能在细胞内增殖的诺瓦克病毒,它既可以在原代巨噬细胞和树突状细胞内生长,也可以在传代细胞小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞内生长并产生细胞病变效应(cytopathic effects, CPE)<sup>[7]</sup>,同时, MNV 被认为是实验小鼠内流行最广泛的一种病毒,其在小鼠中的感染率是排在第二位的细小病毒的 10 倍<sup>[8]</sup>。目前国内对 MNV 的相关研究较少,2010 年袁文等<sup>[9]</sup>对广东省内 7 个小鼠繁育设施进行了 MNV 感染情况的调查,阳性率为 37.38%,这是国内首次有关实验小鼠携带 MNV 的报道。本实验利用 RT-PCR 方法及 ELISA 方法对上海地区各实验动物生产或使用机构送检小鼠的 MNV 感染状况进行调查,并对两种检测方法的结果进行分析比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物、MNV 毒株及细胞

动物:上海地区实验动物生产或使用单位委托上海市实验动物质量监督检验站检测的实验小鼠,采样时间为 2012 年 11 月至 2013 年 8 月,共 13 家检测单位的 319 只 SPF 级小鼠。MNV 毒株(MNV strain Guangzhou/K162/09/CHN, GenBank 序列号: HQ317203.1)由广东省实验动物监测所赠送。实验所用 RAW264.7 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂

AMV 反转录酶, recombinant RNase inhibitor (RRI), dNTP (2.5/10 mmol/L), Oligo d(T)<sub>18</sub> Primer, rTaq DNA 聚合酶, DNA 分子量 marker 等购自 Takara 公司;病毒 RNA 提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit)购自 Qiagen 公司;ELISA 试剂盒购自 Biotech Trading Partners (SMART-M35, 美国);DMEM、FBS、Pen-Strep 购自美国 GIBCO 公司。

### 1.3 RT-PCR 方法

#### 1.3.1 样本采集及处理

小鼠安乐死后,无菌采集约米粒大小的小鼠盲肠内容物,置于去 RNA 酶的 1.5 mL 离心管内,加入 400  $\mu$ L DEPC 水配置的无菌 PBS 溶液,震荡涡旋 30 s, 4000 g/min 离心 20 min,取上清液经 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤待用。

#### 1.3.2 RNA 提取

按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒说明书进行操作,提取所采集盲肠内容物样本总 RNA,取预处理样本 140  $\mu$ L,最终得到 60  $\mu$ L 总 RNA,测量 RNA 浓度, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.3.3 引物

根据文献<sup>[10]</sup>报道,由 Invitrogen(上海)公司合成,上游引物 F: CAGATCACATGCTTCCCAC,下游引物 R: AGACCACAAAAGACTCATCAC,引物位于 MNV 序列保守区域衣壳蛋白基因 ORF2 编码区位置,其扩增产物大小为 187 bp (5473-5659nt)。

#### 1.3.4 反转录

在去 RNA 酶的 0.2 mL 离心管内依次加入如下试剂:模板 RNA 4  $\mu$ L, 5  $\times$  AMV buffer 4  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu$ L, RRI 0.5  $\mu$ L, AMV 1  $\mu$ L, Oligo d(T)<sub>18</sub> 1  $\mu$ L, DEPC-H<sub>2</sub>O 补足反应体系至 20  $\mu$ L。混匀后室温放置 10 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 置冰上冷却 2 min,得到的反应产物即为 cDNA。

#### 1.3.5 PCR

以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,在一无菌的 0.2 mL 离心管内依次加入 cDNA 模板 4  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 2  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ L, 上下游引物 F/R (20  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, rTaq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补足反应体系至 20  $\mu$ L, 混匀。95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每次反应均以 ddH<sub>2</sub>O 替代模板 cDNA 做阴性对照,以广东 MNV 毒株为阳性对照进行 RT-PCR 扩增。

#### 1.3.6 凝胶电泳及测序

取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳,纯化回收阳性产物,并送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定,用 NCBI 的 BLAST 软件对测序结果进行分析。

### 1.4 血清学方法

#### 1.4.1 样本处理

无菌条件下采用摘眼球法采集小鼠血液,室温静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min,小心将上层血清

吸出分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  储存备用。

#### 1.4.2 酶联免疫吸附试验

参考相关文献[11], 采用美国 Biotech Trading Partners 公司的 ELISA 试剂盒 (SMART-M35), 按照试剂盒说明书进行操作: 取经 RT-PCR 检测小鼠中的 180 份冻存血清进行检测, 血清样本及试剂盒内的标准液均作 50 倍稀释, 阴阳性对照不稀释, 孵育 30 min, 洗板, 加酶结合物孵育 30 min, 洗板, 加底物显色 10 min, 加入终止液轻拍混匀, 用酶标仪测 450 nm 光吸收值并分析结果。

#### 1.5 病毒分离

取 2 个 RT-PCR 检测结果为阳性的样本进行病毒分离。复苏 RAW264.7 细胞, 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 DMEM 培养液传代培养。待细胞在 24 h 内长满培养瓶 90% 左右时, 弃去原来的培养液, 并用 DMEM 冲洗两次, 将粪便样本用 PBS 溶液稀释并通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 取 100  $\mu\text{L}$  滤液轻轻覆盖在细胞表面, 放  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内孵育 1 h, 期间每隔 15 min 轻轻晃动培养瓶, 防止细胞表面干涸。1 h 后弃去接种病毒液, 立即加入含 4% 胎牛血清的 DMEM 维持液并于培养箱内培养, 72 h 内观察细胞是否出现 CPE。因样本中可能含有其他致细胞病变物质, 可将细胞冻融三次后的过滤液继续进行盲传, 待细胞能在 24 ~ 72 h 内出现稳定的 CPE 时, 将细胞冻融三次后回收病毒并用 RT-PCR 方法鉴定, 保存在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

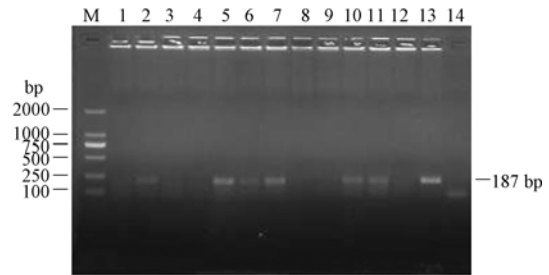
#### 1.6 统计学处理

应用 SPSS 13.1 版本统计学软件, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 PCR 产物电泳及测序结果

PCR 产物电泳, 在凝胶成像系统下观察, 阳性样本在 187 bp 处显示目的条带, 与阳性对照位置一致 (图 1)。送上海生物工程技术服务有限公司进行测序, PCR 产物大小为 187 bp。应用 NCBI 的 BLAST 软件对测序结果进行分析显示, 与 GenBank 中登陆的广州株 (HQ317203) 核酸同源率为 99.5% (图 2), 由此可证实引物扩增的片段为 MNV 基因片段, 阳性检测结果的小鼠有 MNV 感染。GenBank 中登陆的 MNV 毒株多为欧美国家, 也有亚洲的韩国、日本、中国台湾, 中国大陆登录株为广州株 (HQ317203)。



注: M: DNA marker DL2000; 1 ~ 12: 部分检测样本; 13: 阳性对照; 14: 阴性对照。

图 1 部分样本 RT-PCR 电泳结果

Note: M: DNA marker DL2000; Lane 1-12: samples; Lane 13: positive control; Lane 14: negative control

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR products from some samples

#### 2.2 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 检测的 319 份盲肠内容物样本中 95 份为阳性, 阳性率为 29.78%。13 家送检单位的实验小鼠均有 MNV 检出, 阳性率最低为 11.11%, 最高为 91.67%, 卡方检验分析显示不同送检单位之间的 MNV 自然感染率差异有显著性 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。近交系、封闭群、免疫缺陷小鼠和基因工程小鼠均有 MNV 感染, 不同品系的实验小鼠之间 MNV 感染状况也不同, 卡方检验分析显示不同品系小鼠之间的 MNV 自然感染率差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 其中 ICR 小鼠阳性率最高 (47.13%), 而免疫缺陷小鼠阳性率最低 (13.95%) (表 2)。

#### 2.3 ELISA 检测结果

ELISA 检测的 180 份血清样本中有 70 份血清抗体阳性, 阳性率为 38.89%。11 家送检单位均有抗体阳性检出, 阳性率在 14.29% 到 75% 之间, 卡方检验分析显示不同送检单位之间的 MNV 抗体阳性率差异有显著性 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。不同品系小鼠间 MNV 抗体阳性率差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 封闭群 ICR 小鼠 MNV 抗体阳性率最高 (71.05%), 免疫缺陷小鼠阳性率最低 (25%) (表 2)。

#### 2.4 共同检测结果

在同时经过 RT-PCR 扩增和 ELISA 检测的 180 只小鼠中, 阳性小鼠分别为 45 只和 70 只, 阳性率分别为 25% 和 38.89%, 两种方法同为阳性的有 34 只, 阳性率为 18.89%。

#### 2.5 病毒分离结果

阳性样本经 RAW264.7 细胞盲传至第 5 代, 接种病毒液的细胞与未接毒的细胞相比, 在 24 h 内出现 CPE, 72 h 内 CPE 逐渐明显, 主要表现为细胞变

圆, 变大, 接触抑制消失, 而未接毒的细胞逐渐脱落死亡(图 3, 见彩插 8)。细胞冻融 3 次之后, 接毒后的细胞培养物经 RT-PCR 方法, 在 187 bp 处出现预

期目的条带, 测序结果显示与组织样本扩增测序结果一致, 而未接毒的对照细胞冻融液无目的条带(图 4)。

Murine norovirus strain Guangzhou/K162/09/CHN, complete genome  
Sequence ID: [gb|HQ317203.1](#) Length: 7380 Number of Matches: 1

Range 1: 5473 to 5659 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
340 bits(184)	2e-90	186/187(99%)	0/187(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAGATCACATGCTTCCCACATGTCATGTGTGATGTGCGCACCCCTGGAGCCATTCAACTC			60
Sbjct 5473	CAGATCACATGCTTCCCACATGTCATGTGTGATGTGCGCACCCCTGGAGCCATTCAACTC			5532
Query 61	CCTCTTCTTGACGTGCGTCGAGTTCTTTGGCATGCTACCCAGGATCAGGAGGAATCTATG			120
Sbjct 5533	CCTCTTCTTGACGTGCGTCGAGTTCTTTGGCATGCTACCCAGGATCAGGAGGAATCTATG			5592
Query 121	CGCCTGGTTTGCATGCTGTACACGCCACTCCGCACAAACAGCCCGGGTGATGAGTCTTTT			180
Sbjct 5593	CGCCTGGTCTGCATGCTGTACACGCCACTCCGCACAAACAGCCCGGGTGATGAGTCTTTT			5652
Query 181	GTGGTCT	187		
Sbjct 5653	GTGGTCT	5659		

图 2 与广州株(HQ317203)的序列对比结果

Fig. 2 Alignment results of DNA fragments with HQ317203

表 1 各送检单位小鼠 MNV 的感染情况

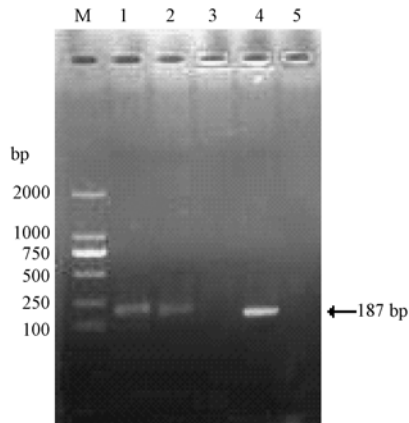
Tab. 1 MNV infection of different tested units

单位编号 Units NO.	RT-PCR 检测 RT-PCR Test		ELISA 检测 ELISA Test	
	总数/阳性数/只 Total/Positive No.	阳性率/% Positive rate	总数/阳性数/只 Total/Positive No.	阳性率/% Positive rate
A	23/4	17.39	23/7	30.43
B	27/11	40.74	24/13	54.17
C	18/7	38.89	4/2	50.00
D	16/5	31.25	16/5	31.25
E	12/11	91.67	3/1	33.33
F	48/15	31.25	20/7	35.00
G	24/7	29.17	12/9	75.00
H	18/2	11.11	18/5	27.78
I	25/8	32.00	24/12	50.00
J	27/7	25.93	0/0	
K	41/12	29.27	0/0	
L	15/3	20.00	15/6	40.00
M	25/3	12.00	21/3	14.29
合计 Total	319/95	29.78	180/70	38.89

表 2 不同品系小鼠 MNV 感染情况

Tab. 2 MNV infection in mice of different strains

小鼠品系 Strains		RT-PCR 检测 RT-PCR Test		ELISA 检测 ELISA Test	
		总数/阳性数/只 Total/Positive No.	阳性率/% Positive rate	总数/阳性数/只 Total/Positive No.	阳性率/% Positive rate
近交系小鼠 Inbred strain	BALB/c	47/16	34.04	17/5	29.41
	C57	83/18	21.69	64/18	28.13
	FVB	6/2	33.33	0/0	
封闭群小鼠 Closed colony	ICR	87/41	47.13	38/27	71.05
免疫缺陷小鼠 Immunodeficient mice	Nu/Nu	43/6	13.95	32/8	25.00
基因工程小鼠 Genetically engineered mice	Figα <sup>-/-</sup> Cre Rag1 等	53/12	22.64	29/12	41.38
合计 Total		319/95	29.78	180/70	38.89



注: M: DNA marker DL2000; 1-2: 接毒后; 3: 未接毒; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照

图 4 RAW264.7 细胞冻融液 RT-PCR 结果

Note: M: DNA marker DL2000; Lane 1-2: inoculated with stool filtrate (72 h); Lane 3: un-inoculated with stool filtrate (72 h); Lane 4: positive control; Lane 5: negative control.

Fig. 4 RT-PCR results of RAW 264.7 cells freeze-thaw liquid

### 3 讨论

2003 年, Karst<sup>[12]</sup>等在信号转导蛋白和转录激活因子(STAT1)以及重组体激活基因 2(RAG2)缺陷(RAG/STAT1<sup>-/-</sup>)小鼠中首次发现并分离得到 MNV, 并将其命名为 MNV-1, MNV-1 可以导致 RAG/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠发生致死性感染, 病变主要有脑炎、脑膜炎、脑脉管炎、肝炎和肺炎, 并且 MNV-1 在干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  受体阴性(IFN- $\alpha\beta\gamma$ R<sup>-/-</sup>)小鼠内较野生型小鼠内表现出更强的毒力, 而在免疫功能正常小鼠内通常无明显临床症状。自 MNV-1 发现之后, 各地又陆续分离得到其他多个 MNV 毒株, 不同的 MNV 毒株会导致不同程度的肠道病变及 CPE 等<sup>[13]</sup>。

本研究分别采用核酸检测和血清学检测两种方法对上海地区实验动物生产或使用单位送检的 SPF 小鼠进行了 MNV 自然感染状况的调查。结果显示各送检单位小鼠均有 MNV 感染, 采用 RT-PCR 核酸检测的阳性率为 29.78%, ELISA 检测的血清抗体阳性率为 38.89%, 由此可见上海地区实验小鼠普遍存在 MNV 的自然感染, 检测结果显示不同品系的实验小鼠均有阳性结果检出, 这一方面说明感染的普遍性, 另一方面也说明 MNV 的感染或许与动物饲养环境、饲养密度等相关。MNV 属于 RNA 病毒, 在自身增殖过程中较易发生突变, 如果突变发生在与病毒毒力相关的减毒位点, 则容易引起动物的

持续性感染<sup>[14]</sup>。所以应该加强实验动物饲养管理, 及时处理发生病变或病原感染的实验动物, 保证实验动物的质量。

Hsu<sup>[15]</sup>建立了一种高通量的新型血清学检测方法——流式荧光微球检测技术, 检测小鼠血清中 MNV 抗体, 密苏里大学的实验动物检测中心从美国和加拿大的研究机构送检的实验小鼠( $n = 12639$ )血清样本中, 经复用荧光免疫测定(Multiplexed fluorescent immunoassay, MFI)测得血清抗 MNV-1 抗体阳性率为 22.1%。本实验检测的 319 只实验小鼠中, 有 180 只小鼠既采用 RT-PCR 扩增, 同时又对血清进行了 ELISA 检测, 结果显示通过 RT-PCR 扩增为阳性的有 45 只, 通过 ELISA 检测为阳性的有 70 只, 两种检测方法均显示为阳性的有 34 只。ELISA 检出率比 RT-PCR 方法稍高, 共同检出率比单独检出率略低, 出现这种情况可能与以下因素相关: 一是与小鼠感染 MNV 的时间、感染量和样本种类有关, MNV 属于肠道病毒, RT-PCR 仅检测盲肠内容物中的病毒核酸。Hsu<sup>[15]</sup>通过人工灌胃的方法造成 10 只小鼠感染 MNV, 分别收集 0-7d 的粪便, 结果发现第 1 天时全部呈现阳性, 第 7 天时仅有两只为阳性。也有研究表明小鼠感染 MNV 后 8 周仍可在粪便中检测到病毒核酸, 感染具有很强的持续性<sup>[10,12]</sup>。ELISA 法用于检测血清抗体, 当小鼠感染 MNV 后, 体内抗体的形成需要一定时间, Hsu<sup>[10]</sup>通过人工灌胃法造成 10 只小鼠感染 MNV, 利用 MFI 法检测小鼠血清中 MNV 抗体, 结果发现第 1 周有两只小鼠处于临界值范围, 其余 8 只呈阴性; 第 2~5 周有 7 只处于临界值或呈阳性。因为两种检测方法不同, 所检测的对象不同, 所以检出率会出现一定差异。在感染初期, 免疫抗体尚未产生时可以采用 RT-PCR 检测病毒核酸, 感染 2 周后可以采用 ELISA 方法检测血清中的抗体。二是核酸检测与实验操作过程紧密相关, 如果粪便样本处理不当或样本中病毒量过少, RT-PCR 方法可能出现假阴性。所以两种方法相结合可以从一定程度上提高检出率。另外需要注意的是, 免疫缺陷小鼠亦有 MNV 病毒核酸和血清抗体阳性的检出, 这或许暗示 MNV 感染与机体的免疫系统相关, 有待进一步研究 MNV 感染的机制。

袁文等<sup>[9]</sup>对广东省实验小鼠感染 MNV 的调查中, 近交系、封闭群、免疫缺陷小鼠的阳性率均在 60% 以上。本实验中检测的实验小鼠各品系也均存在 MNV 感染, 卡方检验分析 MNV 的感染率差异有显著性, 两种检测方法结果显示 ICR 小鼠感染 MNV

的阳性率最高,免疫缺陷小鼠的阳性率最低(表 2),这可能与免疫缺陷小鼠的饲养环境更加严格有关。

CPE 是病毒在细胞内增殖及其对细胞产生损害的最明显表现,不同病毒作用于不同细胞会产生特异性 CPE,组织培养细胞内 CPE 的出现,一般可以认为是病毒增殖的确切证据,接种物内的非特异性毒性物质导致的非特异性 CPE 在盲传过程中可消失,而病毒可由于其对细胞培养物的适应导致 CPE 提前出现,病变更明显<sup>[16]</sup>。本实验 RAW264.7 细胞接种阳性盲肠内容物后,经过盲传至第 5 代,细胞在 24h 内出现 CPE,72h 内逐渐明显,与 MNV-1 致 CPE 表现<sup>[17]</sup>相似,细胞变圆、变大、接触抑制消失。同时接种病毒液后的细胞培养物经 RT-PCR 鉴定得到 187bp 的目的条带,未接种病毒的细胞培养物无目的条带,说明成功分离到病毒毒株,但为排除其他肠道病原体的存在,需进一步采用蚀斑纯化方法,挑取单克隆进行病毒纯化。

目前 MNV 感染的小鼠对动物实验有何影响尚无定论,但是国外相关实验动物机构如 Charles River, Harlan 等已越来越重视对实验小鼠 MNV 的监测,并已开发出相应的检测方法。国内一些 CRO 公司也要求实验动物检测机构能开展对 MNV 的检测。本文通过对上海地区 MNV 感染状况的调查,在一定程度上了解了国内 MNV 的感染状况。同时本研究建立的检测方法可在实验动物生产单位和使用单位中推广应用,为进一步补充完善实验动物质量控制体系提供技术支持,促进实验动物事业的健康发展。另外,全世界范围内 90% 以上的非细菌性胃肠炎是由人诺瓦克病毒(Human Norovirus, HuNV)引起的<sup>[12]</sup>,由于 HuNV 缺乏有效的细胞培养体系及实验动物模型,无法在体外进行增殖,相关研究受到限制,而 MNV 与 HuNV 在基因组大小、结构和功能、病毒粒子大小(直径 28~35 nm)、形状、浮力密度、致病症状以及在自然界的传播方式(主要通过粪口途径传播)等<sup>[18]</sup>方面有一定的相似性, MNV 可以作为 HuNV 的研究模型,通过对 MNV 的研究,有助于开展对 HuNV 的研究,可以指导治疗及预防 HuNV 引起的胃肠炎,减少由 HuNV 感染导致的医疗损失。

(本文图 3 见彩插 8)。

#### 参 考 文 献

- [1] 王大鹏,吴清平,寇晓霞. 诺瓦克病毒研究进展[J]. 微生物学报. 2007, 47(5):942-946.
- [2] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis [J]. J Virol. 1972, 10(5):1075-1081.
- [3] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. Arch Virol. 2002, 147(8):1655-1663.
- [4] Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau ME, et al. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components [J]. J Biol Chem. 2006, 281(35):25315-25325.
- [5] Farkas T, Fey B, Keller G, et al. Molecular detection of murine noroviruses in laboratory and wild mice [J]. Vet Microbiol. 2012, 160(3-4):463-467.
- [6] Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, et al. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence [J]. J Virol. 2007, 81(19):10460-10473.
- [7] Courtney Cox, Shengbo Cao, Yuanan Lu. Enhanced detection and study of murine norovirus-1 using a more efficient microglial cell line [J]. Virol J. 2009, 6:196.
- [8] Henderson KS. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice [J]. Lab Anim. 2008, 37(7):314-320.
- [9] 袁文,张钰,刘忠华,等. 广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查 [J]. 中国比较医学杂志. 2010, 20(2):78-82.
- [10] Hsu CC, Riley LK, Wills HM, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses [J]. Comp Med. 2006, 56(4):247-251.
- [11] Ohsugi T, Matsuura K, Kawabe S, et al. Natural infection of murine norovirus in conventional and specific pathogen-free laboratory mice [J]. Front Microbiol. 2013, 4(12):1-6.
- [12] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT-1 dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. Science. 2003, 299:1575-1578.
- [13] Kahan SM, Liu G, Reinhard MK, et al. Comparative murine norovirus studies reveal a lack of correlation between intestinal virus titers and enteric pathology [J]. Virology. 2011, 421(2):202-210.
- [14] Bailey D, Thackray LB, Goodfellow IG. A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo [J]. J Virol. 2008, 82(15):7725-7728.
- [15] Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice [J]. Clin Diagn Lab Immunol. 2005, 12(10):1145-1151.
- [16] 殷震,刘景华,于康震,等. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社. 1997. 326-327.
- [17] Cox C, Cao SB, Lu YA. Enhanced detection and study of murine norovirus-1 using a more efficient microglial cell line [J]. Virol J. 2009, 6:196.
- [18] Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis [J]. J Virol. 2006, 80(11):5104-5112.

[收稿日期] 2014-01-06