



鼠诺如病毒概述

田胜男, 刘云波

(中国医学科学院实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心 卫生部实验动物检测中心 北京 100021)

【摘要】 实验动物的质量与动物实验能否顺利进行关系非常密切。我国要求实验用 SPF 级小鼠必须排除的病毒有 11 种, 尽管如此仍然会因为动物本身携带的微生物而干扰实验结果。鼠诺如病毒就是从意外死亡的实验小鼠中分离得到, 免疫缺陷小鼠感染这种病毒后发生炎症反应甚至死亡。我国关于鼠诺如病毒的研究还比较少, 其致病力及对实验研究的影响尚不完全清楚, 也没有明确的感染情况调查。本文重点阐述了鼠诺如病毒的发现及危害、检测情况、病原特性和国内现状, 并给出建议以便更好的了解 MNV 并控制该病毒的传播。

【关键词】 小鼠; 诺如病毒

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)07-0068-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.015

A brief introduction of murine norovirus

Tian Sheng-nan, Liu Yun-bo

(Monitoring Centre of Laboratory Animal, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Whether animal experiments can proceed (progress) smoothly is closely related to the quality of the laboratory animals. It is required by our country that the SPF level laboratory mice must be excluded from 11 kinds of virus, nevertheless, the microorganism carried by the themselves can still interfere the result of the experiments. Murine Norovirus was isolated from the accidental died mice, which can induce inflammation and even death in the immunodeficient mice. The reports on murine norovirus virus are still relatively infrequent in domestic, understanding of its pathogenicity and the influence on the experiment is still not entirely clear. In this paper, we will mainly introduce the discovery, hazards, detection and pathogen features of the Murine Norovirus, then give advices so that we can understand MNV and control the spread of the virus better.

【Key words】 Murine Norovirus

2003 年 Karst 等人首次从实验中意外死亡的免疫缺陷小鼠 (RAG/STAT^{-/-}) 体内分离得到鼠诺如病毒, 该病毒与其他诺如病毒一样具有着高度的变异性^[1]。近年来多个地区及实验室报道其实验小鼠具有较高的诺如病毒感染率^[2-5], 从而受到各国重视。随着生物学技术的广泛应用, 鼠诺如病毒的

研究也取得了很大的进展。本文对鼠诺如病毒的基本情况介绍。

1 危害

免疫缺陷鼠感染诺如病毒后短时间内死亡, 致使实验终止, 免疫活性小鼠感染该病毒后也将对试

[基金项目] 国家科技支撑计划“实验动物质量保证条件和认可评价关键技术与示范”(2011BAI15B03)。

[作者简介] 田胜男 (1989 -) 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: tianshn@163.com。

[通讯作者] 刘云波, E-mail: yunbolu@126.com。

验结果产生一定的影响,对科研工作造成一定的损失。

对于不同的免疫缺陷动物,感染诺如病毒后症状有一定的差异,先天性免疫系统应答组分缺陷的小鼠,如信号转导子和转录激活子 1 缺陷 (STAT1^{-/-}) 小鼠、I 型和 II 型干扰素受体同时缺陷 (IFN $\alpha\beta$ R^{-/-}/IFN γ R^{-/-}) 小鼠发生致死性感染,表现为体重减轻、竖毛和弓背等临床症状,组织病变主要包括脑炎、脑膜炎、脑脉管炎、肝炎和肺炎,但 RAG1^{-/-}/RAG2^{-/-} 小鼠感染 MNV 后仍能存活,在持续感染后 90 天时仍能检测到病毒存在,也就是说,在某些免疫缺陷动物体内 MNV 能够持续存在^[6]。

免疫活性小鼠和大多数免疫缺陷小鼠感染后不表现临床症状和病理变化。但在进行小鼠实验的过程中,携带有 MNV 的小鼠可能会对实验结果产生影响。MCMV (murine cytomegalovirus) 小鼠模型感染 MNV 后,CD8⁺T 细胞应答免疫减弱,但并不影响 MCMV 效价也没有引起 MCMV 的再活化。表明 MNV 对小鼠体内 MCMV 的免疫应答会产生影响^[7]。尽管免疫活性小鼠感染 MNV 的临床症状不明显,但该病毒疑似能够改变实验小鼠的表现型,主要是引起炎症和免疫反应^[8]。还未见大鼠感染诺如病毒报道^[9]。

2 检测情况

近年来各个地区纷纷发表了有关鼠诺如感染的报道。2005 年,用血清学的方法检测美国和加拿大实验小鼠诺如病毒感染率约为 22.1%,它在小鼠中的感染率是细小病毒(感染率为 2.5%)的 9 倍^[2]。2011 年,欧洲采用血清学和 PCR 的方法对其实验小鼠进行检测,MNV 感染率高达 58%~64%。2011 年韩国也对其实验小鼠进行了 MNV 的流行病学调查,结果显示,由经销商供应的小鼠中血清阳性为 6.6%,实验室饲养小鼠阳性率为 9.6%,转基因鼠 MNV 血清阳性最高,为 27.0%。原因可能是由于基因改变的过程中免疫活性下降引起的^[3]。从感染小鼠粪便中分离病毒进行鉴定,韩国实验小鼠感染的 MNV 均为 MNV GIV 型诺如病毒。2012 年,日本野生啮齿类动物中感染率为 14.9%,感染动物中 85.4% 为姬鼠,其余为黑鼠。分离病毒进行序列分析,该病毒属于 MNV V 型^[4]。2010 年袁文等^[5]首次报道我国广东省实验小鼠携带有

MNV,用 RT-PCR 的方法检测 206 份小鼠盲肠内容物,其中 MNV 阳性为 77 份,阳性率 37.38%。各品系小鼠易感性差异无显。诺如病毒已经成为目前实验小鼠感染率较高的一种病毒,但 MNV 对小鼠的致病力及其对实验研究的影响尚不完全清楚。

3 病原特性

3.1 致病机理

MNV-1 首次从实验中意外死亡的免疫缺陷小鼠(RAG/STAT^{-/-})体内分离得到,RAG/STAT^{-/-}小鼠缺少启动基因 2 (RAG) 和具有转录激活作用的信号转导分子(STAT1)。随后,不断有学者从这种免疫缺陷小鼠中分离到鼠诺如病毒,研究表明,STAT1 固有免疫的小鼠对 MNV-1 有抑制作用,同时干扰素对提高小鼠抵抗 MNV-1 的能力有很大帮助,只有在 IFN $\alpha\beta$ 和 IFN γ 受体的共同作用下,STAT1 才能够作为一种信号分子参加细胞内信号转导通路^[1]。T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞缺陷的小鼠也能够持续感染 MNV-1^[6]。免疫活性小鼠经口或颅内感染 MNV-1 衣壳蛋白后血清中有抗体产生但并没有任何临床症状以及组织病理改变。

3.2 传播方式

小鼠诺如病毒的传播方式多种多样,粪口传播是其最主要的传播方式,它也可以通过空气中的微粒进入呼吸道而感染。通过垂直传播感染的同窝仔鼠换窝代乳可以有效抑制 MNV 感染^[10]。有研究表明实验小鼠的生存环境及来源与其 MNV 感染率有着一定的关系。在 MNV-1 存在的环境中饲养幼龄小鼠,小鼠会在短短几天之后检测到感染该病毒,在感染后一周就可以检测到抗体产生,25~38 天左右抗体效价达到最高值^[2]。屏障环境中饲养的小鼠 MNV 感染率要高于普通环境,可能是由于其屏障环境较闭塞。一旦环境中存在 MNV 就很难完全去除。

无论是屏障环境还是普通环境,繁殖都不是 MNV 传播最主要的途径^[7]。尽量减少饲养环境中人员出入,每次引种前对环境设施彻底消毒,避免同笼鼠之间的粪口传播,保证饲料清洁,及时清理动物排泄物,定期更换笼具是控制 MNV 的有效方式^[11]。

4 国内现状

我国对鼠诺如病毒的研究较晚,2010 年首次报

道我国广东省实验小鼠携带有 MNV, 北京大学实验动物中心实验小鼠也有 MNV 感染。其他地区还未报到 MNV 检出情况。我国目前 MNV 检测以 RT-PCR 方法为主, 由于鼠诺如病毒感染小鼠后在动物体内的繁殖情况以及动物对 MNV 的免疫机制尚不清楚, RT-PCR 可能难以检出已经感染过但不携带病原的小鼠。建立血清学的检测方法对于我国实验小鼠 MNV 筛查及控制是非常必要的, 医科院实验动物所检测中心已经初步建立了 PCR 方法以及 IFA 方法(未发表文章), 我们下一步将鼠诺如病毒的检测方法进行完善, 并对我所以及其他单位的实验小鼠 MNV 感染进行筛查。

5 建议

5.1 病毒检测方法

鼠诺如病毒可在感染小鼠的多种组织, 粪便及血清中检测到, 粪便中的 MNV 常温保存两周后仍然能够检测得到。其检测方法主要是电镜法、血清学方法以及分子生物学方法。

5.1.1 电镜法

电镜法分为直接电镜法和免疫电镜法。但由于电子显微镜价格昂贵, 操作过程对实验人员熟练程度要求较高, 不适合于对大量动物进行 MNV 筛查。

5.1.2 血清学方法

血清学方法主要以多重荧光免疫分析(MFI)和酶联免疫法(ELISA)为主。MFI 与常规的 ELISA 方法相比较具有高通路、自动化筛选的优点^[2]。

5.1.3 分子生物学方法

分子生物学方法以 RT-PCR 方法为主。对氯化铯纯化的 MNV-1 RNA 进行 RT-PCR, 其敏感性可达到 100ag(假设纯化后的 RNA 全部为 MNV-1 RNA, 100 ag 仅相当于 25 个病毒粒子)^[6]。2009 年, Masaaki Kitajima 等建立了适合于本地 MNV 株的巢式 RT-PCR 的方法, 它比常规的一轮 RT-PCR 敏感性更高^[12]。随后又建立了定量 RT-PCR 方法将病毒检测量化, 定量范围为 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝/PCR 管。尽管如此, 对于感染一周以内的实验小鼠, 仍然很难检测到。

5.2 预防及控制

免疫缺陷鼠感染诺如病毒后短时间内死亡, 致使实验终止, 免疫活性小鼠感染该病毒后也将对试验结果产生一定的影响, 对科研工作造成一定的损

失。因此, 严格控制和预防实验小鼠感染诺如病毒对实验动物饲养及动物实验是非常必要的。

5.2.1 对饲养环境及饲养人员的要求

控制鼠群内诺如病毒感染及传播, 就要建立严格的饲养环境, 包括饲养温度、湿度以及饲养密度等, 对笼具、饲料和垫料定期进行消毒。外购动物进入动物房前要了解动物健康情况, 严禁有流行病学史动物进入。另外, 还应该避免野生小鼠、蚊蝇和昆虫进入动物房。动物饲养人员要经过对皮肤表面和服装消毒之后方可进入动物房内, 禁止外来人员进入。鼠群要定期进行病毒和细菌检测以保证小鼠健康状况^[13]。

5.2.2 在环境中的稳定性

鼠诺如病毒对温度及压力敏感, 有研究表明, 70℃水浴 1 h 或 0℃下 200 MPa 处理 5 min 即可对 MNV-1 产生灭活效果, 400 MPa 处理 5 min 可使 MNV-1 活力降至无检出水平^[14]。多种消毒剂以及紫外线都可以使该病毒失去活性, 当氯的消毒剂量在 5 mg/L ~ 10 mg/L 时, 就能够达到很好的灭活效果。浓度在 60% 以上的酒精也可以达到灭活的目的^[15]。在 240 000 μJ 紫外线下暴露数分钟也可^[16]。

6 小结

诺如病毒最早被称作诺瓦克病毒, 最早是从 1968 年在美国诺瓦克市暴发的一次急性腹泻的患者粪便中分离得到。由于缺少良好的细胞培养体系, 诺如病毒的生物学特性及病理机制的研究一直受到阻碍^[6]。2003 年首次发现小鼠感染诺如病毒, 其全基因组序列与人诺如病毒相似度非常高, 次年 Wobus 等^[17]建立了适合 MNV-1 病毒的细胞培养方法, 首次实现了诺如病毒的体外培养, 鼠诺如病毒便成为了研究人诺如病毒的最佳模型, 人们对诺如病毒的认识才逐渐清晰起来。小鼠诺如病毒是实验小鼠中检出率较高的一种病毒。许多国家均有当地实验小鼠感染诺如病毒的报道, 但迄今还未见正常小鼠感染 MNV 后表现出临床症状及任何组织病理改变的报道, 已经证实该病毒能够使缺少 STAT1 和干扰素受体两种因子的免疫缺陷动物致病^[1]。MNV 在小鼠中传播方式多样化, 以粪口传播为主, 也存在飞沫传播, 其传播具有一个很重要的特点为低剂量感染, 也就是说同笼以及同房间的小鼠中有一只感染 MNV 后, 该笼或房间的小鼠都有被感染的高度可能性。因此, 定期对环境设施进行

监测、消毒 对设施内哨兵鼠进行检测是控制 MNV 传播的必要方式和手段。实验动物的质量将直接影响动物实验的结果。全球最大的实验动物公司 Charles River Laboratories 已经将小鼠诺如病毒作为 VAF(Virus antibody Free) 级小鼠必须排除的一种病毒^[18]。了解我国实验小鼠诺如病毒感染情况,建立适合我国实验小鼠诺如病毒的检测方法,有效的控制鼠诺如病毒在实验小鼠中的传播,是摆在我们面前一项十分重要的任务。

参考文献:

- [1] Karst , S. M. , C. E. Wobus , M. Lay , et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. [J] Science 2003 299: 1575 - 1578.
- [2] Hsu CC , Wobus CE , Steffen EK , Riley LK and Livingston RS. 2005. Development of a Microsphere-Based Serologic Multiplexed Fluorescent Immunoassay and a Reverse Transcriptase PCR Assay to Detect Murine Norovirus 1 Infection in Mice. Clin Diag Lab Immunol 12(10) : 1145 - 1151.
- [3] Kim , Jong Rhan , Seok , Seung Hyeok , Kim , Dong Jae et al. Prevalence of Murine Norovirus Infection in Korean Laboratory Animal Facilities [J]. The Journal of Veterinary Medical Science , 2011 73(5) : 687 - 691.
- [4] Naoto TSUNESUMI , Go S AT O , Masahiro IWASA et al. Novel Murine Norovirus-Like Genes in Wild Rodents in Japan [J]. Virology , 74(9) : 1221 - 1224 , 2012
- [5] 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.
- [6] Virgin HW. 2005. Murine Norovirus: Discovery , Biology , and Pathogenesis. Wallace P. Rowe Lecture , 56th AALAS National Meeting , St. Louis , Missouri , Nov. 6 - 10 , 2005.
- [7] Doom CM , Turula HM , Hill AB , Investigation of the impact of the common animal facility contaminant murine norovirus on experimental murine cytomegalovirus infection. [J] Virology. 2009 Sep 30; 392(2) : 153 - 61.
- [8] conference guide noro2012 online [C].
- [9] Christiane E. Wobus , Larissa B. Thackray , Herbert W. Virgin IV. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. [J] VIROLOGY , June 2006 , p. 5104 - 5112.
- [10] Kastenmayer RJ , Perdue KA , Elkins WR. Eradication of Murine Norovirus from a Mouse Barrier Facility. [J] Am Assoc Lab Anim Sci. 2008 Jan; 47(1) : 26 - 30.
- [11] Bae , J. , Schwab , K. J. , Evaluation of murine norovirus , feline calicivirus , poliovirus , and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. Appl. Environ. [J] Microbiol. 2008. 74 , 477 - 484.
- [12] Vashist S , Urena L , Goodfellow I. Development of a strand specific real-time RT-qPCR assay for the detection and quantitation of murine norovirus RNA. [J] Virol Methods. 2012 Sep; 184(1 - 2) : 69 - 76.
- [13] Li , Dan , Tang , Qingjuan , Wang , Jingfeng et al. Effects of high-pressure processing on murine norovirus-1 in oysters (Crassostrea gigas) in situ. [J]. Food Control , 2009 , 20(11) : 992 - 996. DOI: 10. 1016/j. foodcont. 2008. 11. 012.
- [14] KELLER R; TETRO J A; SPRINGTHORPE V S. The influence of temperature on Norovirus inactivation by monochloramine in Potable Waters: testing with murine norovirus as a surrogate for human norovirus [J]. Food Environ Virol , 2010 , 2: 97 - 100. DOI: 10. 1007/s12560-010-9037-2.
- [15] Tian P , Yang D , Quigley C , Chou M , Jiang X. Inactivation of the tulane virus , a novel surrogate for the human norovirus. [J] Food Prot. 2013 Apr; 76(4) : 712 - 8.
- [16] Lee , J. , Zoh , K. , Ko , G. , Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. [J] Appl. Environ. Microbiol. 2008. 74 , 2111 - 2117.
- [17] Wobus , C. E. , S. M. Karst , L. B. Thackray , et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. [J] PLoS Biol. 2004. 2: 432.
- [18] VAF/Plus © and VAF/Elite © Health Profiles for Research Animal Models Charles River. 6/17/2012.

(修回日期) 2013-05-05