

李晓波,付瑞,王吉,等. 小鼠诺如病毒检测方法团体标准的编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 79-83.
Li XB, Fu R, Wang J, et al. Establishment of group standards on detection methods for murine norovirus [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 79-83.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 03. 013

小鼠诺如病毒检测方法团体标准的编制

李晓波,付 瑞,王 吉,王淑菁,王莎莎,李 威,秦 骁,
黄宗文,贺争鸣,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 102629)

【摘要】 随着生命科学的发展,对实验动物质量的要求也越来越高,实验动物标准的不断完善就变得尤为重要,小鼠诺如病毒在实验小鼠中有很高的感染率,小鼠感染后不仅对动物本身造成危害,对实验结果也会产生较大影响。我国的实验动物国家标准目前还未将小鼠诺如病毒纳入常规检查项目,我们参考国内外小鼠诺如病毒的最新研究成果及国外相关标准,编制了小鼠诺如病毒的团体标准。本文介绍了小鼠诺如病毒检测方法团体标准编制的背景、法律法规依据,对标准内容的设置进行了解释。本标准的编制完善了实验动物相关标准,为推动实验动物质量的提高,适应实验动物国际化发展的需求提供了技术支持。

【关键词】 实验动物;团体标准;小鼠诺如病毒
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 03-0079-05

Establishment of group standards on detection methods for murine norovirus

LI Xiaobo, FU Rui, WANG Ji, WANG Shujing, WANG Shasha, LI Wei, QIN Xiao, HUANG Zongwen,
HE Zhengming, YUE Bingfei*

(Institute of Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 With the increasing need for high-quality lab animals, the continuous improvement of lab animal standards has become particularly important. Murine norovirus (MNV) has a high infection rate in lab mice. MNV infection not only harms the animals themselves, but also has a great impact on the experimental results. The national standards for laboratory animals in China do not yet include murine norovirus in the list of routine examination items. We have compiled group standards for murine norovirus by referring to the latest research results on murine norovirus at home and abroad, along with relevant foreign standards. This paper introduces the background, and legal and regulatory basis for the preparation of murine norovirus group standards and explains the sets for the standard content. The establishment of such standards should improve the quality of lab animals. They can provide technical support for promoting improved quality of lab animals and adapting to the needs of the international development of lab animals.

【Keywords】 laboratory animal; group standards; murine norovirus

[作者简介] 李晓波(1980—),男,副研究员,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: lixiaobo@nifdc.org.cn
[通信作者] 岳秉飞(1960—),男,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: y6784@126.com

小鼠诺如病毒在实验小鼠中有很高的感染率,其对动物本身及实验结果均会产生较大影响,目前我国还没有制定小鼠诺如病毒的相关标准。中国实验动物学会结合实际需求提出了小鼠诺如病毒检测方法团体标准的研究和撰写,由中国食品药品检定研究院和广东省实验动物监测所共同完成。本文介绍了该标准编制的背景、法律法规依据,并对标准内容的设置进行了解释。

1 编制背景

2003 年 Karst 等人通过脑内连续传代的方法,从死亡的先天免疫缺陷小鼠($RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}$)体内分离得到一种新的病原体,经鉴定该病原体属于杯状病毒科,诺如病毒属,命名为小鼠诺如病毒 1 型(murine norovirus, MNV-1)。小鼠死于脑炎、脑膜炎、肝炎以及肺炎等致死性感染^[1]。随后其他 MNV 毒株相继被分离,这些新发现的毒株其病原特性与原始分离株不尽相同^[2]。

MNV 在实验小鼠中有很高的感染率。其作为一种胃肠道病原体,主要通过粪口途径传播,也可经呼吸道传播,小鼠经口感染 MNV 后可持续通过粪便向外排毒,排毒时间可达 8 周以上,病毒可在粪便中及潮湿物体表面存活 40 d 以上,同时各种品系小鼠均易感,因此很容易在实验小鼠群体中形成爆发流行,据称 MNV 是目前实验小鼠中感染率最高的病毒,其感染率是排在第二位的小鼠细小病毒的 10 倍^[3]。Masaaki 等于 2009 年首次报道了 MNV 在日本的感染,其对来自 6 个实验小鼠种群的 37 份小鼠粪便样本进行检测, MNV 阳性率为 22% (8/37)^[4]。Kim 等对来自韩国的 15 个动物设施的 11 个近交系或封闭群的 745 份小鼠血清调查表明,总 MNV 抗体阳性率为 15% (112/745),其中包括内部繁殖种群,外购动物及基因修饰动物^[5]。Ohsugi 对来自日本和美国的 29 个动物设施的 96 只小鼠调查表明,日本普通级小鼠和 SPF 级小鼠中 MNV 抗体阳性率分别为 67.3% (37/55) 和 39.1% (9/23);美国普通级小鼠阳性率为 62.5% (10/16),SPF 级小鼠中未检出 (0/2)^[6]。Charles River 对客户送检的 42000 份小鼠血清中的 MNV 进行检测发现其阳性率为 32.4%^[3]。Mahler 等对来自西欧的 100 多个动物设施中实验大、小鼠流行的 24 种病毒及支原体的检测显示,在众多病原体中, MNV 是感染率最高的病原体,阳性率为 31.8% (2670/8394)^[7]。我国

MNV 的感染情况也不容乐观,袁文于 2010 年首次报道我国广东省实验小鼠 MNV 感染率为 37.38% (77/206),且不同设施来源的病毒基因型有差异^[8]。中国食品药品检定研究院对 2014 和 2015 年来自全国 17 个实验动物生产和使用单位的实验小鼠进行了 MNV 的监测,结果显示 MNV 抗体阳性率为 18.3% (204/1114),核酸阳性率为 34.8% (181/520)^[9]。有报道对北京地区的 600 只小鼠检测显示 MNV 感染率为 11.67%,阳性小鼠主要来自动物实验设施(阳性率 30.94%),而商品小鼠的感染率仅为 0.27%^[10]。

MNV 的感染会对实验动物造成很大危害。MNV 感染会导致免疫缺陷小鼠(如 $Stat1^{-/-}$ 和 $IfnR^{-/-}$ 小鼠)组织发生系统性病变,导致肝、脾、肺、小肠等产生炎症和坏死^[11];免疫功能正常小鼠感染 MNV 后虽然大部分不表现临床症状,但有报道野生型 129 小鼠在感染 MNV 后出现肝的轻到中度损伤,小肠淋巴结生发中心增大,脾红髓增生,骨髓活化等病理改变^[12]。很多研究通过免疫组化,免疫荧光,原位杂交等方法证实 MNV 能够感染不同组织里的巨噬细胞和树突状细胞,包括肝、肺、肠系膜淋巴结、腹膜、小肠、脾和主动脉等,说明不论免疫缺陷小鼠还是正常小鼠均可能发生 MNV 的全身性播散^[13-15]。以上事实表明 MNV 感染对小鼠组织的损伤不容忽视。

MNV 的感染会对实验结果产生较大影响。随着对 MNV 研究的深入, MNV 感染对实验的影响越来越受到重视,一些研究表明 MNV 感染会对实验造成一定影响,严重的会导致结果出现偏离。Doom 等报道小鼠巨细胞病毒(MCMV)模型在同时感染 MNV 后,虽然并不影响 MCMV 的感染滴度也没有引起 MCMV 的再活化,但会导致 CD8⁺ T 细胞对 MCMV 的免疫优势表位的应答减弱^[16]。Lencioni 等发现 MNV 的急性感染可通过增强树突状细胞的抗原递呈活性来改变肠炎小鼠模型的疾病进程,如会加重 $Mdrla^{-/-}$ 小鼠细菌性肠炎的进程,但对 $Smad3^{-/-}$ 小鼠影响不大^[17-18]。还有报道发现 MNV-1 的感染会加重重复感染大肠杆菌小鼠模型的炎症反应,导致其死亡率明显提高^[19]。有趣的是在某些动物模型中 MNV 的感染会对动物起到保护作用,Thepaut 等报道 MNV 的共感染会延长绿脓杆菌所致急性肺损伤小鼠的存活期,减少体内促炎因子的产生,但这也说明 MNV 的感染会显著改变传统动物

感染模型的实验参数,从而导致错误的实验结果^[20]。

鉴于 MNV 的上述特征,国际上的一些实验动物权威监管和检测机构如欧盟实验动物科学联合会(FELASA)、Charles River 实验室、杰克逊实验室等均将其列为实验小鼠的常规必检项目^[21],遗憾的是我国的实验动物国家标准和其他相关标准均不包括 MNV,为提高实验小鼠质量,适应我国目前实验动物科学的发展水平和应用要求,与国际标准接轨,亟需制定小鼠诺如病毒检测技术的相关标准。

2 法规依据

质检总局、国家标准委、民政部于 2017 年底发布的《团体标准管理规定(试行)》对团体标准的制定、实施和监督进行了详细的规定^[22],第三条对团体标准进行了定义:“团体标准是依法成立的社会团体为满足市场和创新需要,协调相关市场主体共同制定的标准”。小鼠诺如病毒检测方法团体标准的制定均严格遵照该规定的要求执行。

《团体标准管理规定(试行)》第十三条“团体标准的编写参照 GB/T 1.1《标准化工作导则第 1 部分:标准的结构和编写》的规定执行”。本标准的编写也严格参照了本导则的规定进行。

本标准收集、整理了国内外有关组织、地方和实验动物专业生产公司的实验小鼠诺如病毒检测的先进标准,在研究分析质量标准和控制要求的异同点后,在我国现有的实验小鼠目前微生物质量控制研究基础之上制定。在确定本标准各项指标时,以国家科委第 2 号令《实验动物管理条例》和国家科委与国家技术监督局联合颁发的《实验动物质量管理办法》为依据,同时参考了国家标准《实验动物微生物学等级及监测》、《实验动物 微生物学检测方法》,以及国际公认的具有权威性的资料如 FELASA 及世界动物卫生组织(OIE)等资料,使本标准的各项指标与国际水平接轨,符合国家标准的要求,使标准具有一定的可操作性。

3 内容编制

3.1 检测方法的设置

随着对 MNV 研究的深入,MNV 的检测方法也越来越趋于成熟,目前已建立和应用的主要实验室检测技术有病毒的分离和鉴定、免疫荧光法(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链式反应

(PCR)及实时荧光 PCR(qPCR)等。单一的检测方法都有其优缺点,考虑到既能检测 MNV 抗原,又能检测病毒抗体,我们参考了欧盟实验动物科学联合会(FELASA)有关 MNV 的检测技术^[21],在本团体标准中规定了病毒的分离培养、IFA、ELISA、PCR 及 qPCR 等检测方法。《团体标准管理规定(试行)》第十条规定:“团体标准的技术要求不得低于强制性标准的相关技术要求”。列入本标准的检测方法主要有两个来源,一是起草单位实验室建立并验证的方法,列入本标准的大部分方法均来自于此;另一部分是文献报道的方法,这些方法经起草单位实验室验证其敏感性、特异性及稳定性等指标,选择指标良好的方法列入本标准。没有一种检测方法是万能的,每种方法都有其优缺点及检测的局限性:病毒的分离和鉴定多用于急性病例的确诊,IFA 和 ELISA 主要用于检测 MNV 抗体,ELISA 可用于大量样本的筛查,IFA 可做确认试验。PCR 和实时荧光 PCR 用于检测病毒核酸,准确快速,可在 MNV 抗体未出现阳转之前检测到抗原,并且适用于不产生抗体的免疫缺陷动物中 MNV 的检测,同时小鼠粪便作为检测样本,取样方便,不需处死动物,符合实验动物福利伦理的要求,因此目前应用较广泛。这两种方法相比,PCR 方法操作简便,但实验操作较费时,并且 PCR 产物电泳步骤增加了交叉污染的风险;荧光 PCR 方法简便快捷,样品反应和结果观察均在一个体系内完成,减少了交叉污染的机会,被越来越多的广泛应用,但成本较高。在实际应用中,可根据各个实验室的检测需求和实验室的现有条件,从中选用 1~2 种方法应用即可。各种检测方法如果有合适的商品化试剂也可购买使用,但必须对所购买的试剂进行质控验证。

3.2 抗原检测方法

3.2.1 病毒的分离培养^[23]

病毒的分离培养作为病毒感染检测的“金标准”,列入了本团体标准。MNV 是第一个能在体外通过细胞进行分离培养的诺如病毒,本标准规定了 MNV 用 RAW264.7 细胞进行分离培养的技术,RAW 细胞分离自白血病病毒诱发的小鼠淋巴瘤,属小鼠巨噬细胞系,易于传代培养,感染 MNV 后会产生明显的细胞病变,目前已被广泛用于 MNV 的体外培养分离。

3.2.2 核酸检测技术

(1)普通 PCR 方法:目前荧光 PCR 作为一种主

流的核酸检测技术,比普通 PCR 方法敏感性高 1 至 2 个数量级,且 PCR 产物无需琼脂糖凝胶电泳,节省了实验时间,并且减少了污染的几率,有着普通 PCR 不能比拟的优势,但其仪器较贵,并且 PCR 试剂的合成费用较高,对一些还不具备荧光 PCR 实验条件实验室可采用成本较低的普通 PCR 方法。本标准所列的 PCR 方法包含单次 PCR 和套氏 PCR 两种方法,单次 PCR 相比套氏 PCR,PCR 进行一轮扩增,所用时间短,但单次 PCR 的敏感性不如套氏 PCR;套氏 PCR 敏感性高,但需要进行两轮扩增,第 2 轮 PCR 反应是以第 1 轮的 PCR 产物为模板,因而增加了污染的几率,容易产生假阳性结果。这两种方法各有优缺点,可根据实际情况任选一种即可。

(2) 荧光 PCR:本标准所列的荧光 PCR 方法包含染料法^[9]和探针法两种方法,均可用来定量检测 MNV。染料法是在 PCR 反应体系中加入荧光染料,利用荧光染料能特异的掺入 DNA 双链从而发射荧光信号,而单链 DNA 则不会掺入结合的特点,荧光信号的增加与 PCR 产物的增加成正比,通过检查荧光信号来判断是否有产物扩增。探针法主要是采用一条特异性探针,在其两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。在探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;而在有特异 PCR 扩增时,Taq 酶的酶切活性将探针酶切降解,报告基团和淬灭基团分离,淬灭作用消失,因而产生荧光信号。从原理来看,染料法不含特异探针,只有一对特异性引物,其特异性会降低,因此结果判定需要结合溶解曲线来进行,但染料法的敏感性高于探针法,最低可检测到 10 拷贝/ μL MNV 核酸。两种方法也是各有优劣,同样可根据需要选择一种方法即可。

3.3 抗体检测方法

3.3.1 ELISA

ELISA 方法由于其操作简便易行的特点,是目前实验动物国家标准中检测病毒抗体的主流方法,其操作步骤参考 GB/T 14926.50-2001《实验动物酶联免疫吸附试验》。所用的检测抗原既可以是重组抗原也可以是纯化的病毒抗原,无论是重组抗原还是病毒抗原,都要求较高的纯度。

3.3.2 IFA

在 ELISA 检测为可疑结果的情况下(如 OD 值处于临界值的情况),可用 IFA 进行确认实验。本标准规定了 MNV 接种 RAW264.7 细胞的免疫荧光

检测方法,具体操作参照 GB/T14926.52-2001《实验动物 免疫荧光试验》。

4 未来展望

实验动物被誉为生命科学研究中的“活天平”和“活试剂”,实验动物质量关系到科学实验结果的可靠性和准确性,从而影响药品质量评价和人民群众的身体健康,因此对实验动物质量尤其是微生物和寄生虫等的预防与控制,显得尤为紧迫和需要。

我国目前对实验小鼠的微生物监测主要参照实验动物国家标准“GB 14922.2-2011 实验动物 微生物学等级及监测”,其中对清洁级小鼠病毒规定检测 5 项,SPF 级小鼠在清洁级小鼠的基础上增加 6 项。国家标准的历次修订均未考虑将 MNV 加入,这也造成了国内大部分实验小鼠的 MNV 感染情况处于无监管状态,实际感染状况堪忧,对实验动物的质量及实验结果造成的潜在影响不容忽视。

《团体标准管理规定(试行)》第二十五条“团体标准实施效果良好,且符合国家标准、行业标准或地方标准制定要求的,团体标准发布机构可以申请转化为国家标准、行业标准或地方标准”。本团体标准在将来的实施和实践中也会不断的改进和提高,随着实验动物科学的发展,实验动物质量标准要求的越来越高,团体标准转化为国家标准或地方标准势在必行,将成熟的经实践检验过的团体标准转化为实验动物的国家标准,从而填补国家标准中 MNV 检测的空白,也是促进我们的国家标准与国际接轨,提高我国实验动物质量整体水平的必然要求。

参考文献:

- [1] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus[J]. Science, 2003, 299: 1575-1578.
- [2] Hsu CC, Riley LK, Wills HM, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine novoviruses[J]. Comp Med, 2006, 56(4): 247-251.
- [3] Henderson KS. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice[J]. Lab Anim, 2008, 37(7): 314-320.
- [4] Kitajima M, Oka T, Tohya Y, et al. Development of a broadly reactive nested transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan[J]. Microbiol Immunol, 2009, 53: 531-534.
- [5] Kim JR, Seok SH, Kim DJ, et al. Prevalence of murine norovirus infection in Korean laboratory animal facilities[J]. Lab

- Anim Sci, 2010;1-12.
- [6] 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, article 12;1-6.
- [7] Mahler M, Kohl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in Western Europe[J]. Lab Anim(NY), 2009, 38(5):161.
- [8] 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.
- [9] 高洁,贺争鸣. 小鼠诺如病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(12):70-76.
- [10] Xiang ZG, Tian SN, Tong W, et al. MNV primarily surveillance by a recombin- ation VP1-derived ELISA in Beijing area in China [J]. J Immunol Methods, 2014;1-8.
- [11] Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures[J]. J Gen Virol, 2008, 89(pt 1):1-47.
- [12] Shortland A, Chettle J, Archer J, et al. Pathology caused by persistent murine norovirus infection[J]. J Gen Virol, 2014, 95 (pt 2):413-422.
- [13] Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages[J]. PLoS Biol, 2004, 2(12):2076-2084.
- [14] Ward JM, Wobus CE, Thackray LB, et al. Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection[J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(6):708-715.
- [15] Hsu CC, Piotrowski SL, Meeker SM, et al. Histologic lesions induced by murine norovirus infection in laboratory mice[J]. Vet Pathol, 2016;1-10.
- [16] 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, 392(2): 153-161.
- [17] Lencioni KC, Seamons A, Treuting PM,et al. Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease [J]. Comp Med, 2008, 58: 522-533.
- [18] Lencioni KC, Drivdahl R, Seamons A, et al. Lack of effect of murine norovirus infection on a mouse model of bacteria-induced colon cancer[J]. Comp Med, 61(3):219-226.
- [19] Kim YG, Park JH, Reimer T, et al. Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9:496-507.
- [20] Thepaut M, Grandjean T, Hober D, et al. Protective role of murine norovirus against *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia[J]. Vet Res, 2015, 46:91.
- [21] Mahler M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units[J]. Lab Animals, 2014, 48(3):178-192.
- [22] 国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会,民政部. 团体标准管理规定(试行) [OL]. <http://m.hexun.com/news/2017-12-26/192093452.html>,2017.
- [23] 李晓波,付瑞,岳秉飞,等. 鼠诺如病毒的体外分离与鉴定 [J].中国病毒病杂志,2011,1(4):293-296.

[收稿日期]2018-09-21