



大鼠细小病毒检测技术研究进展*

吴定宇¹ 吕瑞青² 彭 芳³

(1. 大理大学实验动物中心,大理 671003)(2. 成都大熊猫繁育研究基地,成都 610081)
(3.大理大学药学与化学学院,大理 671003)

摘要:大鼠细小病毒是一种 DNA 病毒,存在多种血清型,分为不同毒株。该病毒可自然感染实验大鼠和野鼠,不同毒株感染后临床症状不一。该病毒可对大鼠的组织或器官造成影响,导致大鼠生理生化参数改变,直接影响实验结果。因此,对感染大鼠的筛选鉴定至关重要。本文旨在系统阐述大鼠细小病毒检测技术的研究情况,对比不同的方法,提出了问题和展望,为实验动物质量控制提供帮助。

关键词:大鼠细小病毒;ELISA;PCR;xTAG

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0080-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.017

实验动物是生命科学研究的基础和条件。其质量直接影响实验结果的准确性和可靠性。实验动物质量控制的核心是对实验动物携带的微生物和寄生虫进行严格控制。

大鼠细小病毒(Rat Parvovirus,RPV)属于细小病毒科、细小病毒属,单链负链 DNA 病毒,无囊膜,具有多种血清型。该病毒存在于实验大鼠、野生大鼠和自然环境中,严重危害实验大鼠健康,感染后可造成动物死亡和种群繁殖率下降,造成环境污染。大鼠排泄物和分泌物是主要的传染源。该病毒同时会污染血清、细胞培养物、胚胎等生物样品,尤其是该病毒某些毒株可以污染肿瘤细胞系,对肿瘤细胞造成抑制。为控制该病毒传播,确保实验动物质量,已建立了 RPV 的多种检测方法。本文就目前大鼠

细小病毒检测方法进行综述。

1 大鼠细小病毒毒株分类

RPV 分为三个血清型包括 RPV-1 (Rat Parvovirus Type 1),KRV (Kilham Rat Virus)和 H-1 (Toolan’s H-1)^[1]。根据我国实验动物微生物学检测的规定^[2],SPF 级实验大鼠须检测 RPV 的 KRV 株和 H-1 株。国外对 RPV 分类与检测范围和我国不同,美国查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)^[3],指出 RPV 病毒包括 RPV-1,RPV-2 (Rat Parvovirus Type 2),RMV (Rat Minute Virus),KRV,H-1。欧洲实验动物学会联合会(FELASA)^[4]要求检测 KRV,RMV,RPV 和 H-1。具体见表 1。

表 1 不同国家和地区 SPF 级实验大鼠 RPV 血清型的检测

Table 1 The Serological detection of RPV for SPF rat in different countries and regions

大鼠细小病毒毒株	中国实验动物国家标准	Charles River Laboratories	欧洲实验动物学会联盟 (FELASA)	日本实验动物中央研究所	台湾大学医学院实验动物中心
KRV	●	●	●	●	●
H-1	●	●	●	●	●
RPV		●	●		●
RMV		●	●		

注:●代表检测
Note:●show detection

收稿日期:2018-04-24
* 基金项目:国家自然科学基金项目 (No.81560600)
作者简介:吴定宇 (1987—),男,讲师,研究方向:实验动物与比较医学.E-mail:fetoio@ sina.com
通信作者:彭 芳 (1956—),女,教授,研究方向:抗肿瘤药物研究.E-mail:pengfang6556@ aliyun.com

1959 年 Kilham 和 Olivier^[5]发现在大鼠肿瘤细胞系中存在一种污染性物质,经分离发现该污染物为病毒,并称为 Kilham rat virus (KRV) 或 Rat Virus (RV)。1960 年 Toolan 等^[6]总结前人研究,通过移植人类肿瘤的无细胞 (Cell-free) 游离成份,会导致仓鼠出现病变,认为这种可滤过性因子是病毒引起的,并从大鼠中分离该因子,移植到人肝癌细胞 1 (HEp-1) 中,最终鉴定为病毒,这种病毒称之为 Toolan 病毒,通常称之为 H-1 病毒。

1998 年 Ball-Goodrich 等^[7]发现了一种新的大鼠细小病毒 PRV-1,通过克隆、DNA 序列分析来与其他细小病毒进行比对发现,PRV-1 的编码衣壳蛋白的 VP1 序列和其他细小病毒的 VP1 序列相似度不超过 69%,这就解释了 PRV-1 的抗原差异性。同时,Ball-Goodrich 进行抗体检测分析发现,其有别于 KRV 和 H-1 不同的血清型,是第三种血清型。2002 年 Wan 等^[8]发现了之前三种大鼠细小病毒不同的 RMV 毒株,分别是 RMV-1a,RMV-1b,RMV-1c,通过基因组核苷酸序列分析和蛋白质氨基酸序列预测的方法,发现三种 RMV 毒株它们有着共同的启动子和剪切区域,转录起始密码子和终止密码子,它们基因序列的同源性约 97%,氨基酸序列的相似性约 95%,RMV 与 KRV 和 H-1 的基因序列差异性小,但是与 PRV-1 存在较大差异。通过 HAI 试验发现,RMV 有着与 KRV、H-1 和 RPV-1 不同的血清型。

2 大鼠细小病毒检测方法

2.1 毒株分离与鉴定

对疑似感染细小病毒的大鼠进行组织取材,取材部位根据可能感染毒株的不同而不同。将取材的组织进行培养,获取上清液,用滤膜过滤,滤过液接种特定细胞进行培养,然后进行病毒检测,如动物回归实验、分子生物学鉴定、血清学鉴定等。

国外一般采用 NB-324 K 细胞对 H-1 毒株进行分离培养^[9-11],如 Leuchs 等在研究如何高质量大规模纯化生产 H-1 毒株时,采用由 SV40 转化的新生儿肾细胞 NB-324 K,来提高 H-1 作为 DNA 病毒的复制扩增能力。对 KRV 株一般采用 DMEM 培养基培养大鼠肾细胞 (NRK 细胞)^[12-13],KRV 病毒在 NRK 细胞上会形成吞噬斑,所以可以通过病毒空斑实验检测 KRV 毒株。

刘先菊等^[14-15]分别建立了大鼠细小病毒 KRV

株和 H-1 株的细胞培养方法。采用大鼠胶质瘤细胞系 (Rat glial cell line C6) 培养大鼠细小病毒 KRV 和 H-1,待细胞病变达到测定标准后,进行 FITC 鉴定所培养病毒的抗原,用 HA 测定培养物上清效价,用 DNA 测序鉴定所培养病毒,结果发现采用 C6 细胞系可以大量培养 KRV 和 H-1。

2.2 血清学检测

血清学检测是诊断和鉴定病毒的重要方法之一。我国实验动物标准规定了四种方法用于大鼠细小病毒的检测^[2]:血凝抑制试验 (HI)、免疫酶试验 (IEA)、免疫荧光试验 (IFA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)。

吴小闲等^[16]采用 HI 方法检测大鼠细小病毒 RV 株 (也称 KRV) 和 H-1 株,均发现存在阳性感染的情况。贺争鸣等^[17]采用 ELISA、IEA 和 HI 这三种方法进行比较,检测了大鼠细小病毒 RV 株,发现 ELISA 和 IEA 在重复性和抗体阳性检出率方面均优于 HI ($P < 0.05$)。王翠娥等^[18]采用 ELISA 方法对 2012 年至 2013 年国内 36 家单位的大鼠和小鼠血清进行病毒抗体检测,检测出来的阳性样品再用免疫荧光试验 (IFA) 进行复检,大鼠细小病毒检测项目按照查尔斯河实验室的检测项目进行,发现大鼠细小病毒毒株 RPV、H-1、KRV、RMV 均呈阳性。李晓波等^[19]报道,在 16 个实验动物质量检测实验室进行比对中,14 个实验室采用 ELISA,占 87.5%,3 个实验室采用 IFA 方法,另有 1 个实验室同时采用 IFA 和 ELISA 方法。目前,对大鼠细小病毒进行检测的进口 ELISA 试剂盒一般采用 Charles River、Biotech Trading Partners、XpressBio Life Science 等公司产品。国产 ELISA 大鼠细小病毒检测试剂盒主要采用中国食品药品检定研究院产品。付瑞等^[20]建立了 H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法,经试验发现与大鼠 KRV 病毒有交叉反应。

不同国家或地区检测大鼠细小病毒毒株类型不同,初检和复检的方法也有所差异。如美国查尔斯河实验室的动物诊断研究服务部^[21]对近五年北美地区和西欧 (主要是法国) 的大鼠和小鼠流行病学情况进行研究。共收集了 50 万份小鼠样品和 8 万份大鼠样品。采用血清学方法检测大鼠细小病毒 (病毒毒株为 KRV、RMV、H-1 和 RPV)。初步检测采用多重免疫荧光方法 (Multiplexed Fluorometric Immunoenzyme Assay, MFIA) 或 ELISA,对于检测出的阳性样品复检采用 IFA 或 HAI,具体见表 2。

表 2 SPF 级大鼠细小病毒血清学检测(查尔斯河实验室)
Table 2 The Serological detection of rat parvovirus for
SPF rat in Charles River Laboratories

毒株	方法	
	初次检验	复检
Kiham rat virus (KRV, RV)	MFIA/ELISA	IFA, HAI
Rat minute virus (RMV)	MFIA/ELISA	IFA
Rat parvovirus (RPV)	MFIA/ELISA	IFA
Toolan's H-1 virus (H-1)	MFIA/ELISA	IFA, HAI

Manjunath 等^[22]对印度 26 个实验动物机构的大鼠和小鼠进行了血清学调查,每个机构分别采集 5 份大鼠和 5 份小鼠血样,在 130 份大鼠血样中用 ELISA 方法检测大鼠细小病毒 KRV 株和 RPV 株,发现 RPV 感染率在 5.38%,KRV 无感染。McInnes 等^[23]在 2004 年到 2009 年间从澳大利亚、新西兰和新加坡等国家的大学、研究中心、科研机构获取 SPF 级的大鼠和小鼠,采用过量 CO₂ 安乐死,在收集的血清和组织样品中检测出大鼠细小病毒,毒株包括 H-1、KRV、RMV 和 RPV。检测方法为首先进行 ELISA 检测,对于 ELISA 检测结果不确定或可疑的,再用 IFA 进行重测。Liang 等^[24]、Zenner 和 Reqnault^[25]以及 Schoondermark 等^[26]对不同国家或地区大鼠和小鼠进行病毒流行调查和血清学筛查,均采用 ELISA 作为大鼠和小鼠细小病毒的首选检测方法。

综上所述,国内外实验室在检测大鼠细小病毒毒株种类上存在差异,但普遍采用血清学检测方法,ELISA 使用最多。对于某些血清样品结果的不确定性,通常采用 IFA 或 HAI 进行复检,以对检测结果进行确认。

2.3 分子生物学检测

采用普通 PCR 检测大鼠细小病毒,如 Besselsen 等^[27]采用 PCR 技术来检测 H-1 和 KRV 毒株,通过设计引物来扩增 H-1 和 KRV 编码衣壳蛋白的 VP 基因为目的片段。Wan 等^[28]采用 PCR 检测 RPV 和 RMV 病毒,设计引物分别扩增 RPV 的 NS 区序列和 RMV 的 VP 区序列目的基因。

除普通 PCR 方法之外,我国学者还采用多重 PCR 方法进行大鼠细小病毒的分子生物学检测。李晓波等^[29]建立对大鼠 H-1 和 KRV 毒株检测的双重 PCR 方法,分别设计特异性引物,扩增目的片段是病毒的衣壳蛋白基因编码区 (VP),并确定 2 对引物无交叉反应,实验结果发现能够高效检测大鼠细

小病毒的感染。饶丹等^[30]根据大鼠细小病毒基因特异性,采用双重 PCR 的方法,来检测 H-1、KRV、RMV 和 RPV 四种大鼠细小病毒,在 VP2 基因筛选一对用于特异扩增 RPV 毒株的引物,在 NS1 基因设计一对用于扩增 H-1、KRV 和 RMV 的引物,敏感实验表明,双重 PCR 的最低检测限可达 1 000 拷贝/μL。

以高通量测序方法为基础,可以进行不同毒株的大鼠细小病毒检测。传统的基因测序技术采用 Sanger 法,存在成本高、耗时及测序样品受限等不利因素,Life Sciences 公司发明了高通量测序技术又称第二代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 可以对上百万 DNA 分子进行测序检测。查尔斯河实验室已经开展了商业化高通量试验—检测 DNA 病毒服务。Höfler 等^[31]针对啮齿类实验动物存在的病毒、细菌的监控,开发出一种新的高通量多重 PCR 分析方法,称之为 rDVF (rodent DNA virus finder),可以同时鉴定 24 种大鼠和小鼠 DNA 病毒感染情况,其中大鼠细小病毒包括 H-1、RPV、KRV 和 RMV。

Luminex 液相芯片分析技术可进行多种微生物和病毒的检测,其技术包括 xMAP 技术和 xTAG 技术。xTAG 技术使用专有通用标签系统,易于进行优化和核酸检测开发,Luminex 公司所提供的基于 xTAG 技术的核酸检测,包括感染性疾病和基因检测相关的临床诊断检测。如对多种肠道病原体 and 呼吸道病毒均可以采用 xTAG 技术进行检测^[32-33]。Xu 等^[34]发明一种阵列式 xTAG 检测方法,可同时检测大鼠细小病毒 KRV、H-1、RPV 和 RMV,并对这四种毒株予以区别,通过 xTAG 技术和常规 PCR 技术检查了 50 个临床样品,结果显示高度一致。

3 结语

病毒分离培养和观察鉴定被认为是病原微生物检测的“金标准”(Gold Standard),但缺点是检测周期长,速度慢,对操作要求较高且成本也高。

血清学检测是现行的实验动物国家标准规定的方法,目前各实验室普遍采用 ELISA 进行大鼠细小病毒初筛,复检时用 IFA 或 HIA 进行。虽然 ELISA 和 IFA 检测敏感性好,但是由于大鼠细小病毒毒株的非结构蛋白相对保守,导致抗体会产生交叉反应,因此 ELISA 和 IFA 检测的特异性较差,不易将不同

毒株的细小病毒区分开来。HIA 检测有一定特异性,但由于其只针对抗体直接作用于不同毒株的血细胞凝集素上,形成血凝抑制反应,因此敏感性较低。

以 PCR 为主的分子生物学技术具有高效、快速、灵敏的优点,但该技术也存在有假阳性和假阴性的缺点。目前该技术及衍生技术广泛应用于国内外啮齿类实验动物病毒检测中。多重 PCR 及液相芯片分析技术等方法可以快速区分不同毒株的大鼠细小病毒。

细小病毒是严重影响实验大鼠健康的病毒之一,因此建立起灵敏、准确、操作方便的检测方法,是准确检测和有效控制该病毒传播的重要手段。

参 考 文 献

- [1] 田克恭,贺争鸣,刘群,等.实验动物疫病学[M].北京:中国农业出版社,2014. 199-209.
- [2] GB14922. 2-2011.实验动物微生物学等级监测[S].
- [3] Charles B C. Rat Parvoviruses Technical Sheet. http://www.criver.com/files/pdfs/infectious-agents/rm_ld_r_rat_parvoviruses.
- [4] 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]. *Laboratory Animals*, 2014, **48**(3): 178-192.
- [5] Kilham L, Olivier L J. A latent virus of rats isolated in tissue culture[J]. *Virology*, 1959, **7**: 428-437.
- [6] Toolan H W, Dalldorf G, Barclay M, *et al.* An unidentified filterable agent isolated from transplanted human tumors [J]. *National Acad Sciences*, 1960, **13**(1): 141-143.
- [7] Ball-Goodrich L J, Leland S E, Johnson E A, *et al.* Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup[J]. *Journal of Virology*, 1998, **72**(4): 3289-3299.
- [8] Wan C H, Sodelund-Venermo M, Pintel D J, *et al.* Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2002, **83**: 2075-2083.
- [9] Geletneky K, Leoni A L, Pohlmeier E G, *et al.* Pathology, Organ distribution, and Immune Response after Single and Repeated Intravenous Injection of Rats with Clinical-Grade Parvovirus H-1[J]. *Comparative Medicine*, 2015, **65**(1): 23-25.
- [10] Leuchs B, Roscher M, Muller M, *et al.* Standardized large-scale H-1PV production process with efficient quality and quantity monitoring[J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, **229**: 48-59.
- [11] Tattersall P, Bratton J. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice [J]. *Journal of Virology*, 1983, **46**(3): 944-955.
- [12] Zipris D, Lien E, Nair A, *et al.* TLR9-Signaling Pathways Are Involved in Kilham Rat Virus-Induced Autoimmune Diabetes in the Biobreeding Diabetes-Resistant Rat [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, **178**(2): 693-701.
- [13] Zipris D, Hillebrands J L, Welsh R M, *et al.* Infections That Induce Autoimmune Diabetes in BBDR Rats Modulate CD4⁺ CD25⁺ T Cell Populations [J]. *The Journal of Immunology*, 2003, **170**(7): 3592-3602.
- [14] 刘先菊,佟巍,张丽芳,等.大鼠细小病毒 H-1 株培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2011, **19**(6): 495-498.
- [15] 刘先菊,佟巍,张丽芳,等.大鼠细小病毒 KRV 株培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2011, **28**(5): 12-14.
- [16] 吴小闲,洪瑞珍,涂新明,等.实验小鼠和大鼠的病毒学监测(1984~1989) [J]. *中国实验动物学杂志*, 1993, **3**(1): 8-11.
- [17] 贺争鸣,卫礼,张然,等.检测大鼠细小病毒抗体的 ELISA、IEA 和 HI 法比较[J]. *上海实验动物科学*, 1993, **13**(3): 132-134.
- [18] 王翠娥,陈立超,周倩,等.实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. *实验动物科学*, 2014, **31**(2): 20-24.
- [19] 李晓波,王洪,付瑞,等.实验大鼠细小病毒 H-1 株抗体检测能力验证结果评价[J]. *中国药事*, 2014, **28**(9): 990-994.
- [20] 付瑞,李晓波,王淑菁,等.H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, **26**(3): 75-80.
- [21] Pritchett-Coring K R, Cosentino J, Clifford C B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Laboratory Animals*, 2008, **43**(2): 165-173.
- [22] Manjunath S, Kulkarni P G, Nagavelu K, *et al.* Sero-Prevalence of Rodent Pathogens in India [J]. *Plos one*, 2015, **10**(7): 1-11.
- [23] McInnes E F, Rasmussen L, Fung P, *et al.* Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period [J]. *Laboratory Animal*, 2011, **40**(11): 341-350.
- [24] Liang C T, Shih A, Chang Y H, *et al.* Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007 [J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2009, **48**(4): 381-386.
- [25] Zenner L, Regnault J P. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study [J]. *Laboratory Animals*, 2000, **34**(1): 76-83.
- [26] Schoondermark van de ven E M, Philipse-Bergmann I M, van der Logt J T. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003 [J]. *Laboratory Animals*, 2006, **40**(2): 137-143.
- [27] Besselsen D G, Besch-Willford C L, Pintel D J, *et al.* Detection of H-1 Parvovirus and Kilham Rat Virus by PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, **33**(7): 1699-1703.
- [28] Wan C H, Bauer B A, Pintel D J, *et al.* Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction [J]. *Laboratory Animals*, 2006, **40**(1): 63-69.
- [29] 李晓波,付瑞,王吉,等.大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, **25**(6): 46-52.

- [30] 饶丹,朱余军,伍秒梨等.大鼠细小病毒双重 PCR 检测方法的建立[J].实验动物与比较医学,2017,**37**(1):32-35.
- [31] Höfler D, Nicklas W, Mauter P, *et al.* A Bead-Based Multiplex Assay for the Detection of DNA Viruses Infecting Laboratory Rodents[J].Plos one,2014, **9**(5):e97525.
- [32] Popowitch E B, O' Neill S S, Miller M B. Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP Fast Multiplex Assays for Detection of Respiratory Viruses [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013,**51**(5):1528-1533.
- [33] Goldenberg S D, Bacelar M, Brazier P, *et al.* A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalized patients[J]. Journal of Infection,2014, **70**(5):504-511.
- [34] Xu F, Yuan W, Zhang T, *et al.* Simultaneous detection of 4 prototypic rat parvoviruses using the lumniex xTAG assay in laboratory animal health monitoring [J]. Journal of Virological Methods, 2017, **248**:61-65.

Advances in Detection of Rat Parvovirus

WU Dingyu¹, LU Ruiqing², PENG Fang³

(1. Department of Experimental Animal, Dali University, Dali 671003, China)

(2. Chengdu Giant Panda Breeding Research Base, Chengdu 610081, China)

(3. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671003, China)

Abstract: Rat parvovirus (RPV) is a DNA virus which contains variety of serotypes and can be divided into different strains. Both experimental rats and wild rodents can be naturally infected with RPV, but clinical disease and histological lesions have been observed different in rat infected with different strains. The RPV can have appreciable deleterious effects on research by contaminating rat tissues or organs and then result ing in changes in physiological and pharmacological parameters of rat. Therefore, it is critical to identify the infected experimental rat to minimize the impact on research. This paper aims to systematically expound the research of rat parvovirus detection technology, compare different method, and put forward problems and its prospects to provide reference of the experimental animal quality control.

Key words: rat parvovirus; ELISA; PCR; xTAG

(上接第 79 页)

Pathological Changes of Radiation Pneumonia in Kunming Mice

YANG Qian, FENG Mali, ZHU Lina, TONG Liguó

(Department of Clinical Pharmacology, Shanxi Traditional Chinese Medicine Institute, Taiyuan 030002 China)

Abstract: Objective To clarify development of the pathological process of radiation pneumonia. **Method** Using 6MV X-ray, of which the cumulative dose is 20Gy, irradiates the full chest once. The hematoxylin-eosin staining was conducted respectively on the 7th day, 14th day and 28th day after irradiation for pathological study. In addition, the Image-Pro plus analysis system was applied to quantitatively analyze thickness of alveolar walls, and surface mass density of alveolar spaces and interstitial tissue. **Result** Alveolar atrophy, alveolar septum widening and inflammatory cell infiltration were observed along with the development process. The collapsed or consolidated alveolus and mild pulmonary fibrosis were observed after 28 days. Furthermore, the differences of thickness of alveolar walls and surface mass density of alveolar spaces and interstitial tissue were very significant. **Conclusion** Radiation pneumonia model in Kunming Mouse could be replicated successfully by the mentioned method, of which the pathological changes are in accordance with the clinical course.

Key words: irradiation; pneumonia; pathological observation