

北京地区实验小鼠诺如病毒流行情况

刘芳妮^{1,2}, 吕军苹^{2,3}, 柯跃华², 王长军^{1,2}, 郭金鹏²

(1. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 110122; 2. 解放军疾病预防控制中心应急处置大队科室, 北京 100071; 3. 中央民族大学药学院, 北京 100081)

[摘要] **目的** 调查北京地区19家生物公司自然条件下养殖的实验小鼠感染小鼠诺如病毒 (mouse norovirus, MNV) 的情况。**方法** 从19家公司生产的小鼠中随机抽取, 每品种品系、每批次14只小鼠合为一笼, 共计1 396笼19 544只小鼠。对每笼取粪便样本, 采用TaqMan探针荧光定量PCR法, 用MNV-1引物检测各品系小鼠感染MNV的情况, 根据循环阈 (cycle threshold, Ct) 值判断小鼠是否被感染; 采用卡方检验对5种小鼠粪便样本阳性率进行统计学差异性分析; 将5种小鼠阳性样本的Ct值进行统计描述; 采用非参数检验法对5种小鼠Ct值进行差异性分析。**结果** 共检测粪便样本1 396份, BALB/c、C57BL/6、ICR、KM、BALB/c-nude小鼠的粪便MNV检出阳性率分别为17.65%、39.33%、10.57%、18.32%和27.4%。C57BL/6小鼠的粪便MNV检出阳性率大于BALB/c、ICR、KM小鼠 ($P < 0.05$), 且BALB/c-nude小鼠的粪便MNV检出阳性率大于ICR、BALB/c小鼠 ($P < 0.05$); BALB/c-nude小鼠和C57BL/6小鼠的病毒载量总体上大于KM小鼠 ($P < 0.001$, $P < 0.05$)。**结论** MNV-1引物可应用于小鼠MNV感染情况的检测; 北京市5种实验小鼠MNV阳性率在10%~40%, 其中C57BL/6小鼠和BALB/c-nude小鼠的MNV阳性检出率较高。

[关键词] 小鼠诺如病毒; TaqMan探针; 荧光定量PCR; 自然感染

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0205-08



Prevalence of Mouse Norovirus in Experimental Mice in Beijing

LIU Fangni^{1,2}, LU Junping^{2,3}, KE Yuehua², WANG Changjun^{1,2}, GUO Jinpeng²

(1. School of Public Health, China Medical University, Liaoning 110122, China; 2. Emergency response brigade department, PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China; 3. college of pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Correspondence to: GUO Jinpeng (ORCID: 0000-0001-5966-4109), E-mail: pengpla@126.com

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the infection of mouse norovirus (MNV) in experimental mice raised under natural conditions from 19 biological companies in Beijing. **Methods** The mice used in this study were randomly selected from mice produced by 19 companies, and 14 mice of each strain and batch were combined into one cage, totaling 1 396 cages of 19 544 mice. The fecal samples from BALB/c, C57BL/6, ICR, KM, and BALB/c-nude mice were collected. TaqMan probe fluorescence quantitative PCR method was used to detect MNV infection of mice with MNV-1 primer, and whether the mice were infected with MNV was determined according to cycle threshold (Ct value). The chi-square test was used to analyze the difference of positive rate among the fecal samples from the five types of mice. The Ct values of the positive samples were statistically described; the non-parametric test was used to analyze the differences in Ct values among the five types of mice. **Results** A total of 1 396 fecal samples were collected. The positive rates of fecal MNV detection in BALB/c, C57BL/6, ICR, KM, and BALB/c-nude mice were 17.65%, 39.33%, 10.57%, 18.32% and 27.4%, respectively. According to the chi-square test results, the positive rate of fecal in C57BL/6 mice was higher than that in BALB/c, ICR, and KM mice (all $P < 0.05$), and the positive rate of BALB/c-nude mice was higher than that in ICR and BALB/c mice ($P < 0.001$, $P < 0.05$). The viral load of BALB/c-nude or C57BL/6 mice was generally greater than that of KM mice ($P < 0.05$). **Conclusion** MNV-1

[基金项目] 军队后勤生物安全研究专项“生物样本多途径核酸及血清学调查技术研究”(2019T03901)

[第一作者] 刘芳妮 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 诺如病毒感染机制研究。E-mail: fangniliu@163.com

[通信作者] 郭金鹏 (1977—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 军事预防医学。E-mail: pengpla@126.com。ORCID: 0000-0001-5966-4109

primers can be applied to the detection of MNV infection in mice. The positive rate of MNV in five types of experimental mice in Beijing ranges from 10% to 40%, among which C57BL/6 mice and BALB/c-nude mice have higher positive rates of MNV than the others.

[Key words] Mouse norovirus; TaqMan probe; Fluorescence quantitative PCR; Natural infection

诺如病毒 (noroviruses, NOV) 是杯状病毒科的单股正链 RNA 病毒。杯状病毒科目前分为 5 个属: 疱疹病毒属、兔出血症病毒属、纽布病毒属、札幌病毒属和诺如病毒属。杯状病毒为 T = 3 的二十面体颗粒, 含有 180 个主要衣壳蛋白; 该病毒体积微小, 无包膜, 大多由 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORF) 构成; ORF 大多包括 ORF-1、ORF-2 和 ORF-3, 可编码 8 种病毒蛋白^[1-2]。除 ORF-1、ORF-2 和 ORF-3 外, 小鼠诺如病毒 (murine noroviruses, MNV) 额外包含 ORF4。诺如病毒 G I 和 G II 是引起人类感染的主要病毒基因群, G I 和 G II 进一步分为 9 和 27 个基因型, 其中 G II.4 病毒是大多数诺如病毒感染爆发的原因^[3-4]。人诺如病毒 (human noroviruses, HuNoV) 流行范围广泛, 各年龄组均可被感染, 是地方性急性胃肠炎的主要病因, 在全世界胃肠炎病例中占比高达 20%^[5-6]。此外, 诺如病毒不断进化, 每 2~4 年产生新的毒株, 并在全球范围内引起流行^[7-8]。MNV 是唯一一种在细胞培养和小动物模型中可复制的诺如病毒, 可用于构建研究诺如病毒生物学和发病机制的小动物模型, 同时 MNV 也是研究 HuNoV 的理想病毒模型^[9]。

研究表明, 实验室鼠群体在正常屏障饲养环境下 MNV 感染率较高。经调查日本 67.3% 的普通级小鼠、39.1% 的 SPF 级小鼠和 62.5% 的美国普通级小鼠感染了 MNV, 且商用 SPF 级 C57BL/6 小鼠中也发现了 20% 的小鼠存在 MNV 抗体^[10]。关于北美地区 MNV 的流行情况, 有学者调查了 12 639 只小鼠, 结果表明当地的 MNV 感染率为 22.1%^[11]。研究发现, MNV 是小鼠群体中最为流行的病毒, 其总流行率 (32%) 比其他病毒高 10 倍以上^[12]。近年来, 有学者对我国各地实验 MNV 感染情况进行调查, 发现广东地区实验小鼠的阳性率为 37.38%^[13], 上海地区实验小鼠的阳性率为 29.78%^[14], 重庆地区实验小鼠高达 78%^[15] 等。此外, 对 36 家国内机构送检的 1 182 份实验小鼠的血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和免疫荧光法 (IFA) 联合进行 MNV 检测, 发现阳性率高达 42.2%^[16]。

本实验利用筛选得到的最佳引物 MNV-1, 采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法, 对北京市 19 家生物公

司生产的 5 种常用实验小鼠的 MNV 携带率进行了调查。本研究对了解北京市实验小鼠感染 MNV 情况以提高实验小鼠健康水平, 以及我国未来制定实验动物相关政策以控制生物公司小鼠 MNV 携带率提供参考; 而且, 本实验建立了成熟的 TaqMan 探针检测方法, 可供相关实验动物部门和检测机构控制实验潜在性病毒感染提供技术参考和支持。现将调查结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 小鼠粪便收集

从北京 19 家生产实验小鼠的生物公司, 抽取每品系、每批次 14 只小鼠合为一笼, 对每笼小鼠垫料中的粪便进行随机收集, 然后送至解放军疾病预防控制中心进行检测。共检测 1 396 笼, 总共 19 544 只小鼠。5 个品种品系小鼠及其数量分别是: BALB/c 小鼠 425 笼, C57BL/6 小鼠 267 笼, ICR 小鼠 265 笼, KM 小鼠 202 笼、BALB/c-nude 237 笼。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括病毒 RNA 提取试剂盒、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、SuperReal 荧光定量探针法试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; MNV 质粒标准品由北京擎科生物技术有限公司合成, 经过测序验证合格。仪器包括离心机 (德国 Eppendorf AG 公司, 型号 5424R)、A2 生物安全柜 (美国 Thermo 公司, 型号 1300 Series A2)、PCR 仪 (美国 Thermo 公司, 型号 9700)、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号 CFX96™ Touch)。

1.3 样本采集、处理以及 RNA 提取

用 1.5 mL 离心管在每笼小鼠的垫料中收集粪便, 后根据收取的粪便量加入适量无 RNA 酶水, 放置于冰盒中运输, 尽可能对当天到达实验室的粪便样本进行 RNA 提取; 若条件所限, 也应将粪便储存在 -80 ℃, 于样本到达一周内进行 RNA 提取。对所采集的 1 396 份小鼠粪便样本均采用一致的样本处理方法, 处理过程: 采用 12 000 r/min 的速度将装有样本的离心管离心 5 min, 取 140 μL 样本上清液; 按照病毒 RNA 提取试

剂盒说明书, 提取样本上清液中病毒总RNA; 反转录后, 保存于 -20°C 冰箱备用。

1.4 引物和探针合成

从GenBank获取MNV全基因组序列, 根据MNV基因组中高度保守的区域, 采用NCBI的Primer-Blast软件设计引物。共设计引物3对, 根据引物的特异性、敏感性等选择了最佳引物MNV-1, 上游引物P1序列为5'-TCTGTCTGCGCTGGGTC-3', 下游引物P2序列为5'-GCTGCGCCATCACTCATCC-3', 探针序列为ATGCTGAGACCCCGCAGGAACG。普通PCR引物MNV-P-F2, 上游引物序列为5'-ATGGTRGTCC-CACGCCAC-3', 下游引物序列为5'-TGCGCCATCA-CTCATCC-3'。以上引物及探针均由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.5 反转录反应和PCR标准曲线的建立

利用FastKing cDNA第一链合成试剂盒和SuperReal荧光定量探针法试剂盒对病毒总RNA进行反转录反应。反转录反应的cDNA链合成需要按照第一链合成试剂盒说明书进行操作。反应体系为2 μL 10 $\times$ King RT Buffer、1 μL FastKing RT Enzyme Mix、2 μL FQ-RT Primer Mix、5 μL RNase-Free ddH₂O, 最后加入提取的10 μL 病毒RNA进行反转录。反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 min, 冷却至4 $^{\circ}\text{C}$ 后放置于 -20°C 冰箱保存。

建立PCR标准曲线: 连续进行7次10倍梯度稀释, 得到8个稀释度的MNV质粒标准品, 范围为 $2.712 \times 10^2 \sim 2.712 \times 10^9$ 拷贝/ μL , 每个稀释度重复检测3次。反应体系包括: PreMix 12.5 μL , 正向、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 分别0.75 μL , 荧光探针0.5 μL , DNA模板1 μL 。PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预变性15 min, 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 变性3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸。采集40个循环的荧光, 然后绘制质粒DNA在不同浓度下的循环阈(cycle threshold, Ct)值标准曲线。

1.6 TaqMan 荧光定量PCR法检测样本中的MNV病毒

以抽检的1396份小鼠粪便样本中反转录合成的cDNA为模板, 参照1.5节中荧光定量PCR实验步骤进行荧光定量PCR实验操作, 检测样本中的MNV含量。结果判读: 阳性样本结果的Ct值有数值出现, 且其扩增曲线的起峰超过基线; 阴性样本结果的Ct值为NA, 未出现起峰或者起峰未超过基线。

1.7 TaqMan 荧光定量PCR法进行MNV特异性检测

采用1.5节方法, 对12个已知病毒的RNA进行荧光定量PCR检测。12种病毒均来自解放军疾病预防控制中心菌毒种库, 需保存于 -80°C 冰箱, 病毒分别为: ev71、MNV (NCBI编号HQ317203)、鼠肝炎病毒、冠状病毒229e、脊髓灰质炎病毒、MNV (NCBI编号: MF973199)、柯萨奇病毒、埃可病毒、腺病毒、甲流病毒、乙流病毒、甲肝病毒。采用无RNA酶水作为阴性对照。

1.8 PCR产物测序及序列比较分析

将抽检样本中的经荧光定量PCR检测, 结果为阳性的20个小鼠粪便病毒RNA样本, 进行普通PCR实验。PCR反应体系: 2 $\times$ T5 Super PCR Mix (Colony) 12.5 μL , 上下游引物各1 μL , DNA模板1.5 μL , 无RNA酶水9 μL , 总反应体积为25 μL 。反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。然后将PCR产物送至北京擎科生物技术有限公司进行测序, 通过NCBI网站的Blast软件进行同源性核苷酸分析。

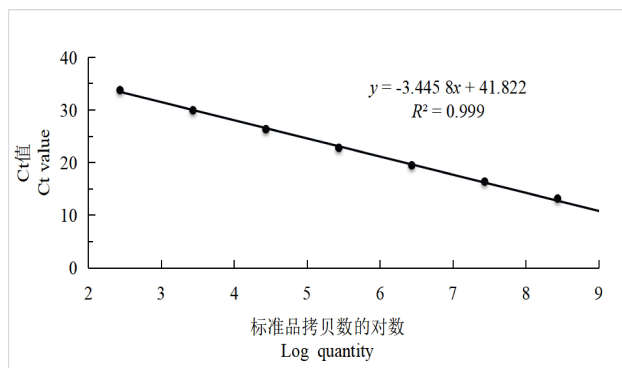
1.9 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学软件对以上检测结果进行统计分析。采用非参数Kruskal-Wallis检验对5个品种品系小鼠的Ct值进行差异性分析, 若各类小鼠的Ct值分布存在差异, 则再用Kruskal-Wallis检验的多重比较对各类小鼠Ct值进行差异性分析。使用卡方检验分析5个品种品系小鼠的MNV阳性检出率之间是否有差异, 若5个品种品系小鼠的阳性检出率整体上存在差异, 则需用卡方分割法进行组间两两比较, 同时用Bonferroni法校正P值, 最后得出检验结果。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MNV-1引物的PCR标准曲线

以MNV-1为引物, 8个稀释度的MNV质粒标准品($2.712 \times 10^2 \sim 2.712 \times 10^9$ 拷贝/ μL)为模板, 进行荧光定量PCR实验; 每个梯度进行3次重复。接着, 以MNV质粒cDNA模板量的对数值(X)为标准曲线的横坐标, 以荧光信号超过阈值时的Ct值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线。计算得到标准曲线方程为: $Y = -3.4458X + 41.822$ 。相关系数(r^2)为0.999, 扩增效率 $E = 95\%$, 提示标准曲线的重复性良好(图1)。



注: Ct是循环阈值。

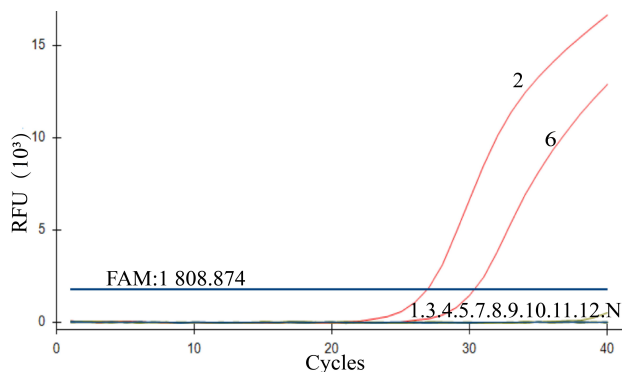
Note: Ct, cycle threshold.

图1 MNV-1引物的实时荧光PCR标准曲线图

Figure 1 The Standard curve of real-time PCR for MNV-1 primer

2.2 MNV特异性的PCR验证结果

以MNV-1为引物,对12种已知病毒ev71、MNV(HQ317203)、鼠肝炎病毒、冠状病毒229e、脊髓灰质炎病毒、MNV(MF973199)、柯萨奇病毒、埃可病毒、腺病毒、甲流病毒、乙流病毒、甲肝病毒(编号分别为1~12)的RNA进行荧光定量PCR检测,结果显示第2和6号样本的PCR结果为阳性且有明显起峰,其余结果均为阴性(图2)。



注: 2、6号为小鼠诺如病毒; 其余病毒依次为1号 ev71、3号鼠肝炎病毒、4号冠状病毒 229e、5号脊髓灰质炎病毒、7号柯萨奇病毒、8号埃可病毒、9号腺病毒、10号甲流病毒、11号乙流病毒、12号甲肝病毒; N为阴性对照。基线值为 FAM: 1 808 874。

Note: No.2 and No.6 are murine noroviruses; The other viruses are as follows: No.1 is ev71, No.3 is murine hepatitis virus, No.4 is Coronavirus 229e, No.5 is poliovirus, No.7 is coxsackie virus, No.8 is echovirus, No.9 is influenza A virus, No.11 is influenza B virus, No.12 is hepatitis A virus. N: negative control. The baseline value was FAM:1 808 874.

图2 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 MNV 特异性的结果

Figure 2 Results of specificity test of the TaqMan real-time RT-PCR assay for murine noroviruses (MNV)

2.3 MNV 的 PCR 产物测序结果分析

采用荧光定量 PCR 法检测所有抽检小鼠粪便的病毒 RNA 样本后,将 20 个阳性样本进行测序,结果显示病毒基因测序结果相同。再利用 Clustalk W 软件,将本研究测序结果与基因数据库 Genbank 所收集的几种诺如病毒成员的核苷酸序列数据进行比对,显示与 MNV 核苷酸的同源性为 100%,阳性符合率为 100%,证实本研究检测序列为 MNV 核酸片段。

2.4 5 个品种品系小鼠粪便样本检测 MNV 阳性情况及其差异性

荧光定量 PCR 检测结果显示, BALB/c、C57BL/6、ICR、KM、BALB/c-nude 小鼠粪便的 MNV 阳性检出率分别为 17.65%、39.33%、10.57%、18.32% 和 27.4%, 5 个品种品系小鼠的总体阳性检出率为 22.21% (表 1)。卡方检验结果显示,各个品种品系小鼠阳性检出率存在差异 ($\chi^2=76.704$, $P<0.05$),再采用卡方分割法进行两两比较,结果显示 C57BL/6 小鼠的 MNV 阳性检出率大于 BALB/c、ICR、KM 小鼠 ($P<0.05$),且 BALB/c-nude 小鼠的 MNV 阳性检出率大于 BALB/c 和 ICR 小鼠 ($P<0.05$)。

2.5 5 个品种品系小鼠粪便 MNV 阳性样本的 Ct 值分布及其差异性

2.5.1 病毒载量 Ct 值的分布

5 个品种品系小鼠中, BALB/c-nude 小鼠样本的 Ct 值 [32~40] 分布范围较广, BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠 Ct 值主要在 [34~40] 低病毒载量区间, ICR 小鼠和 KM 小鼠的 Ct 值主要在 [36~40] (图 3)。所有小鼠的 Ct 值集中在 38~40 的阳性样本量占比最多,几乎占总阳性量的 48%, 36~38 区间的阳性样本量占比达 38%, 少部分样本 Ct 值分布在 32~36 区间,说明只有少部分小鼠粪便携带高浓度的 MNV 病毒。

2.5.2 5 个品种品系小鼠阳性样本 Ct 值间差异性分析

采用非参数 Kruskal-Wallis 检验对 5 种小鼠的 Ct 值进行差异性分析,结果显示 $H(k)=18.660$ 、 $P=0.001$,提示各类小鼠的 Ct 值分布之间存在差异;再用 Kruskal-Wallis 检验的多重比较法对各类小鼠的 Ct 值进行两两比较,根据 Bonferroni 校正后的 P 值得出结论,结果显示 KM 小鼠与 BALB/c-nude 小鼠、C57BL/6 小鼠的 Ct 值之间差异均有统计学意义 ($P<0.001$ 、 $P=0.023<0.05$)。

将各类小鼠的统计分析结果绘制箱式图 (图 4),

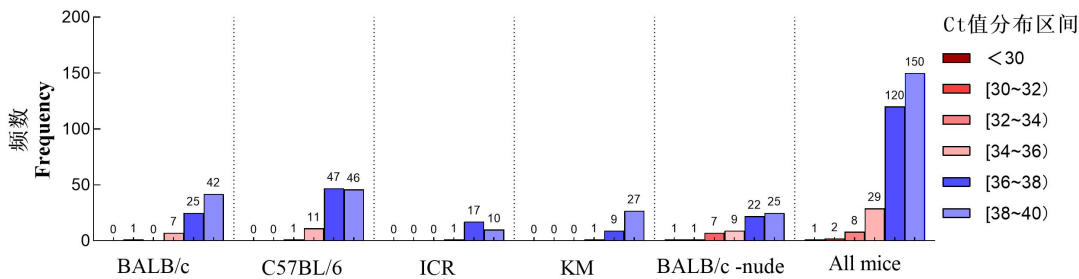
表1 北京市小鼠粪便样本的 MNV 病毒检出情况

Table 1 Detection of MNV in mouse fecal samples in Beijing

小鼠品种品系	样本数	阳性数量	阳性率
Stock or strain of mice	Samples	Positive samples	Positive rate/%
BALB/c	425	75	17.65 [△]
C57BL/6	267	105	39.33
ICR	265	28	10.57 ^{*△}
KM	202	37	18.32 [*]
BALB/c-nude	237	65	27.40 [*]
总样本数量	1 396	310	22.21
The total number of sample			

注：经卡方分割法检验，^{*}示与 C57BL/6 小鼠相比， $P < 0.05$ ；[△]示与 BALB/c-nude 小鼠相比， $P < 0.05$ 。

Note: According to the chi-square test, ^{*} represents compared with C57BL/6 mice, $P < 0.05$; [△] represents compared with BALB/c-nude mice, $P < 0.05$.



注：“[”表示包含端点值，“)”表示不包含端点值。

Note: “[” represents inclusion of endpoint value; “)” represents exclusion of endpoint value.

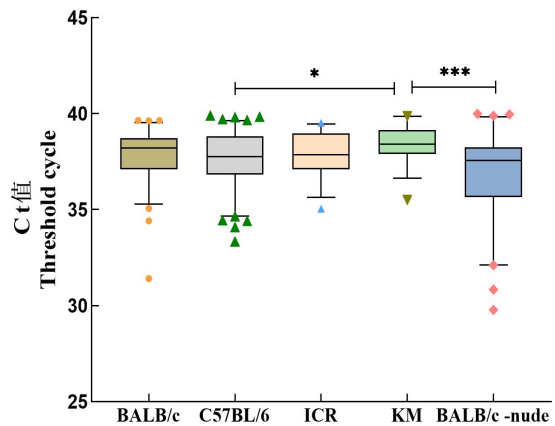
图3 小鼠 Ct 值频数分布直方图

Figure 3 Histogram of frequency distribution of Ct values of mice

结果显示：裸小鼠相对于其他 4 种小鼠其 Ct 值分布较为分散，5 种小鼠中 ICR 小鼠的 Ct 值分布最为集中。根据非参数检验结果可知，KM 小鼠与 BALB/c-Nude 小鼠、C57BL/6 小鼠的 Ct 值中位数之间差异有统计学意义（校正后的 P 值分别为 $P < 0.001$ 、 $P = 0.023$ ），KM 小鼠 Ct 值的中位数大于其他两种小鼠，提示 BALB/c-Nude 小鼠和 C57BL/6 小鼠的病毒载量总体上大于 KM 小鼠。

3 讨论

2003 年首次发现 MNV [17]，此后通过对生物公司等机构的小鼠进行常规检测，发现 MNV 在世界范围内的生物医学研究机构中是最普遍的一种病原体 [12,18-20]。MNV 在许多小鼠中引起无症状感染，包括免疫能力强的小鼠和缺乏适应性免疫反应的小鼠 [17,21]。目前基因库中有超过 100 种不同的 MNV 序列 [22]。有研究表明，实验小鼠感染 MNV 可能会对借



注：经 Kruskal-Wallis 检验的多重比较以及 Bonferrni 校正，^{***} $P < 0.001$ ，^{*} $P < 0.05$

Note: After K-W test for multiple comparisons and Bonferrni correction, ^{***} $P < 0.001$, ^{*} $P < 0.05$.

图4 5个品种品系小鼠阳性样本 Ct 值箱式图

Figure 4 The Box plot of Ct values for positive samples of five stocks or strains of mice

助小鼠模型进行生物学或发病机制研究的结果造成不良影响^[23-24]。

研究发现,除 MNV-1 外,大多数 MNV 毒株感染小鼠后可长期、持续性地通过粪便排出体外^[25],所以收集小鼠粪便,然后进行检测能较好地反映小鼠的 MNV 感染情况。中国医学科学院魏强团队采用 VP1 酶联免疫吸附法(ELISA)对北京地区 2007—2013 年的 600 份小鼠血清样本检测,发现 MNV 感染率为 11.67%,其中 377 例为生物公司的小鼠样本,其感染率为 0.27%,而其余来自实验室的样本感染率为 30.94%^[20]。本研究发现,北京 19 家生物公司的小鼠 MNV 感染率为 10%~40%,与上述研究结果存在差异,推测可能原因:(1)与多年来生物公司未重视 MNV 的定期监测及清除,使得 MNV 逐渐在实验室播散有关;(2)因为小鼠血清中抗体的形成需要 3~5 周^[26],但被 MNV 感染的小鼠的粪便中病毒可在感染后第 2 天至 8 周内持续被检出^[27];(3)可能与本研究所采用的检测方法不同有关。本研究结果显示,北京生物公司 5 类实验小鼠 BALB/c、C57BL/6、ICR、KM、BALB/c-nude 的粪便 MNV 阳性检出率分别为 17.65%、39.33%、10.57%、18.32%、27.4%。但有研究发现,自然感染的 KM 小鼠粪便样本中 MNV 阳性率为 11% (4/35)^[28],另有研究调查了广东省 BALB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠、KM 小鼠的 MNV 感染率分别为 70% (7/10)、100% (12/12)、64% (16/25)^[13]。以上几种小鼠的粪便检出阳性率与本研究相差较大,推测可能与样本量相差较大有关。

本研究中发现 C57BL/6 小鼠、BALB/c-nude 小鼠的粪便 MNV 检出阳性率较高,推测其原因可能是 C57BL/6 小鼠属于实验室最常用的近交系小鼠。有研究表明,C57BL/6 小鼠感染 MNV 后,表现为长期持续性感染,小鼠的肠道 MNV 含量处于较高水平^[29];该研究还发现,BALB/c-nude 小鼠的 T 细胞免疫缺陷可导致机体 B 细胞的活化减少,影响 MNV 特异性抗体的产生,T 细胞及 B 细胞在清除 MNV 的过程发挥重要作用,因此其 MNV 检出率阳性高。笔者推测,本研究中 ICR 小鼠粪便检出率最低的原因可能与该小鼠具有免疫活性以及健全的免疫系统有关。本研究中 KM 小鼠的阳性检出率为 18.32%,与广州某实验中心 KM 小鼠粪便 MNV 检出阳性率 23% (3/13)^[30] 相近。

本研究通过对各生物公司小鼠粪便样本的检测,探知了北京地区 5 种实验小鼠的 MNV 感染情况,对估

算全国小鼠的 MNV 感染状况可提供借鉴。本研究发现,实验小鼠 C57BL/6 和 BALB/c-nude 的 MNV 感染率较高。由于 MNV 在实验动物设施环境中顽固存在、难以消灭,因此建议养殖 C57BL/6 和 BALB/c-nude 小鼠时应设置哨兵动物,同时遵守严格的动物准入规则,采用血清抗体 ELISA 法检测结合粪便核酸检测,做到早发现并及时处理感染动物,杜绝病毒的引入和扩散。对于感染的小鼠也可通过胚胎移植到 MNV 阴性代孕小鼠体内,或出生后不久将幼崽交叉寄养给 MNV 阴性的养鼠^[31-33]。同时,采用二氧化氯溶液^[34]以及紫外线消毒法^[35-36]对房间进行消毒,可最大限度地降低环境中 MNV 滴度。总之,通过消除 MNV 感染引起的潜在混淆效应,可提高各实验室和研究机构中动物模型的一致性,提高小鼠实验结果的科学性和可靠性。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental protocols were carried out in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

刘芳妮负责小鼠粪便诺如病毒检测实验部分,并进行结果分析、文章撰写及修改;
吕军苹负责协助做实验以及实验指导;
柯跃华提出实验构思,并联系生物公司提供小鼠粪便;
王长军指导关键性实验并对论文进行补充;
郭金鹏对实验阶段性进展工作进行细致指导,并对文章框架及思路提供重要建议,以及最终版的论文审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] THORNE L G, GOODFELLOW I G. Norovirus gene expression and replication[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 2): 278-291. DOI: 10.1099/vir.0.059634-0.
- [2] PRASAD B V, HARDY M E, JIANG X, et al. Structure of Norwalk virus[J]. *Arch Virol Suppl*, 1996, 12: 237-242. DOI: 10.1007/978-3-7091-6553-9_25
- [3] CANNON J L, BARCLAY L, COLLINS N R, et al. Genetic and epidemiologic trends of Norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel G II .4 recombinant viruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(7): 2208-2221. DOI: 10.1128/JCM.00455-17.

- [4] VAN BEEK J, DE GRAAF M, AL-HELLO H, et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(5): 545-553. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30059-8.
- [5] AHMED S M, HALL A J, ROBINSON A E, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8):725-730. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.
- [6] PATEL M M, HALL A J, VINJÉ J, et al. Noroviruses: a comprehensive review[J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(1): 1-8. DOI: 10.1016/j.jcv.2008.10.009.
- [7] BLANTON L H, ADAMS S M, BEARD R S, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(3):413-421. DOI:10.1086/499315.
- [8] HALL A J, LOPMAN B A, PAYNE D C, et al. Norovirus disease in the United States[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8): 1198-1205. DOI: 10.3201/eid1908.130465.
- [9] WOBUS C E, THACKRAY L B, VIRGIN H W 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis[J]. *J Virol*, 2006, 80(11): 5104-5112. DOI: 10.1128/JVI.02346-05.
- [10] 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. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00012.
- [11] HSU C C, WOBUS C E, STEFFEN E K, 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*, 2005, 12(10): 1145-1151. DOI: 10.1128/CDLI.12.10.1145-1151.2005.
- [12] PRITCHETT-CORNING K R, COSENTINO J, CLIFFORD C B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats[J]. *Lab Anim*, 2009, 43(2):165-173. DOI: 10.1258/la.2008.008009.
- [13] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.02.019.
- YUAN W, ZHANG Y, LIU Z H, et al. Investigation of natural murine Norovirus in laboratory mice in Guangdong Province[J]. *Chin J Comp Med*, 2010, 20(2): 78-82. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.02.019.
- [14] 刘芹. 上海地区小鼠诺瓦克病毒的感染状况及病毒的分离和表达[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- LIU Q. Infection of Murine Norovirus and Expression of Isolated Viruses in Shanghai Area [D]. Shanghai: Fudan University, 2014.
- [15] 田娜, 何丽雯, 曾莉, 等. 重庆地区小鼠诺如病毒的感染及其对免疫功能影响的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(12): 1635-1641. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002256.
- TIAN N, HE L W, ZENG L, et al. Preliminary study on the infection of mouse norovirus and its effect on immune function in Chongqing[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2019, 44(12): 1635-1641. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002256.
- [16] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.02.005.
- WANG C E, CHEN L C, ZHOU Q, et al. Testing of multiple viral antibodies in laboratory rats and mice[J]. *Lab Animal Sci*, 2014, 31(2):20-24. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.02.005.
- [17] KARST S M, WOBUS C E, LAY M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus[J]. *Science*, 2003, 299(5612):1575-1578. DOI:10.1126/science.1077905.
- [18] HENDERSON K S. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice[J]. *Lab Anim (NY)*, 2008, 37(7):314-320. DOI: 10.1038/labani0708-314.
- [19] MÄHLER M, KÖHL 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): 161-165. DOI: 10.1038/labani0509-161.
- [20] XIANG Z G, TIAN S N, TONG W, et al. MNV primarily surveillance by a recombination VP1-derived ELISA in Beijing area in China[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 408: 70-77. DOI: 10.1016/j.jim.2014.05.007.
- [21] MUMPHREY S M, CHANGOTRA H, MOORE T N, et al. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses[J]. *J Virol*, 2007, 81(7):3251-3263. DOI:10.1128/JVI.02096-06.
- [22] KARST S M, WOBUS C E. Viruses in rodent colonies: lessons learned from murine noroviruses[J]. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 525-548. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055204.
- [23] LENCIONI K C, SEAMONS A, TREUTING P M, et al. Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease[J]. *Comp Med*, 2008, 58(6):522-533.
- [24] CADWELL K, PATEL K K, MALONEY N S, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene *Atg16L1* phenotypes in intestine[J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1135-1145. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.009.
- [25] THACKRAY L B, WOBUS C E, CHACHU K A, et al. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence[J]. *J Virol*, 2007, 81(19):10460-10473. DOI:10.1128/JVI.00783-07.
- [26] HSU C C, WOBUS C E, STEFFEN E K, 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. DOI: 10.1128/CDLI.12.10.1145-1151.2005.
- [27] HSU C C, RILEY L K, WILLS H M, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses [J]. *Comp Med*, 2006, 56(4): 247-251.
- [28] 向丹丹, 魏晓峰, 胡建华, 等. RT-PCR检测实验小鼠自然和实验感染鼠诺如病毒[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2013, 31

- (3): 63-69. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-9964.2013.03.011.
- XIANG D D, WEI X F, HU J H, et al. Detection of murine Norovirus from naturally and experimentally infected laboratory mice by RT-PCR method[J]. J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci, 2013, 31(3): 63-69. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-9964.2013.03.011.
- [29] 李晓波, 付瑞, 王淑菁, 等. 小鼠诺如病毒感染实验小鼠的抗体变化规律分析[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(4):343-350. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.127.
- LI X B, FU R, WANG S J, et al. Analysis of antibody changes in laboratory mice infected with murine Norovirus[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(4):343-350. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.127.
- [30] 肖建鹏, 马莉珍, 刘姝, 等. 实验小鼠感染鼠诺如病毒的检测[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(4):392-394, 403.
- XIAO J P, MA L Z, LIU S, et al. Detection of murine noroviruses from laboratory mice[J]. J Trop Med, 2011, 11(4): 392-394, 403.
- [31] COMPTON S R. Prevention of murine norovirus infection in neonatal mice by fostering[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008, 47(3):25-30.
- [32] BUXBAUM L U, DERITIS P C, CHU N S, et al. Eliminating murine norovirus by cross-fostering[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(4):495-499.
- [33] KIM H, BANG J, BAEK S H, et al. Eliminating murine Norovirus, Helicobacter hepaticus, and intestinal protozoa by embryo transfer for an entire mouse barrier facility[J]. Exp Anim, 2022, 71(1):28-35. DOI: 10.1538/expanim.21-0026.
- [34] KASTENMAYER R J, PERDUE K A, ELKINS W R. Eradication of murine norovirus from a mouse barrier facility[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008, 47(1):26-30.
- [35] PARK G W, LINDEN K G, SOBSEY M D. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation[J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 52(2): 162-167. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2010.02982.x.
- [36] WIELICK C, LUDWIG-BEGALL L F, DAMS L, et al. The use of germicidal ultraviolet light, vaporised hydrogen peroxide and dry heat to decontaminate face masks and filtering respirators contaminated with an infectious norovirus[J]. Infect Prev Pract, 2021, 3(1): 100111. DOI: 10.1016/j.infpip.2020.100111.
- (收稿日期:2022-08-16 修回日期:2022-12-18)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,赵宇朋)

[引用本文]

刘芳妮, 吕军苹, 柯跃华, 等. 北京地区实验小鼠诺如病毒流行情况[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 205-212. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.126.

LIU F N, LU J P, KE Y H, et al. Prevalence of mouse norovirus in experimental mice in Beijing[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 205-212. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.126.

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物科学与比较医学领域的一本专业学术期刊, 严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准, 包括但不限于《实验动物管理条例》(2017年3月1日修订版)和《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等, 同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识(如ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010等)。因此, 本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下:

1. 涉及动物实验的来稿, 需提供实验动物生产许可证和质量合格证, 以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配, 并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿, 需在考虑3R(替代、减少和优化)原则的基础上设计动物实验, 并提供作者单位实验动物福利伦理委员会(或相关机构)出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合, 并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药, 尤其是麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂, 特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂(如三溴乙醇、水合氯醛等)的相关性状及对实验动物的影响, 从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性, 而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择, 因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用, 请提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究, 本刊参考国内及国际通用准则, 建议单个肿瘤体直径不超过20 mm(小鼠)或40 mm(大鼠)且不出现在明显的肿瘤溃疡。如投稿文章有超出上述标准的研究内容, 需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件, 以及从科学角度判断肿瘤体积合理性的依据材料。