

我国实验小鼠群中巨细胞病毒 自然感染情况的调查

汤家铭 袁云华 程 鸿

(上海医科大学实验动物部, 上海200032)

5858.926.5

提 要

迄今为止, 有关MCMV在实验小鼠群中的自然感染情况报道极少。我们在MCMV实验感染的基础上对国内常用的小鼠品系进行MCMV自然感染的调查。结果发现在334份不同品系小鼠颌下腺中无1份分离出MCMV, 而特异性抗体存在于所检查的10个品系中, 阳性率为10.9—87.5%。抗体阳性率与鼠龄有关, 随鼠龄的增长而上升。对全国部分省市40家实验动物机构的556份小鼠血清的调查结果表明MCMV的抗体阳性率达61.0%, 提示在我国实验小鼠群中MCMV的自然感染是相当普遍的。这种病毒分离阴性而抗体阳性的状态表明隐性感染和潜伏感染是MCMV自然感染的主要方式。

关键词: 小鼠巨细胞病毒 自然感染 病毒分离 血清学调查

实验动物

小鼠巨细胞病毒(MCMV)是首先被分离出来并在组织细胞中传代的巨细胞病毒。由于MCMV感染与HCMV感染极为相似, 国外已广泛用作研究HCMV感染的实验模型^[1,2]。

但是在实验小鼠的生产中由于MCMV的自然感染可造成实验小鼠质量下降, 影响实验结果的准确性和重复性, 干扰生物医学科研的进行。例如, MCMV感染可引起呼吸道功能的改变, 易继发细菌、真菌和病毒感染^[3]; 影响鼠群的生殖能力, 造成流产、死胎、畸胎和产仔数减少^[4]。更重要的是MCMV感染可对宿主免疫系统功能产生广泛的影响, 如抑制特异性抗体的产生、抑制脾细胞对非特异性促有丝分裂素的反应、抑制同种异体移植排斥反应、抑制干扰素的产生和Tc细胞功能等^[1,5]。因此有的学者建议将MCMV检测作为无特定致病菌(SPF)动物应排除感染的检测项目^[1,6]。但是目前国内有关MCMV在实验小鼠群中的自然感染情况报道甚少。为此我们用常规的病毒学诊断方法即病毒分离和血清学方法对国内常用的实验小鼠品系和全国部分省市实验小鼠群中MCMV的自然感染情况进行调查。

1989年6月6日收到。

* 国家自然科学基金资助项目

材 料 和 方 法

一、动物来源 不同品系小鼠来源于上海五个实验动物机构的普通级动物, 计10个品系444只, 包括7个近交系和3个远交系。每个品系按鼠龄分为3周前乳鼠、5~7周成鼠、怀孕鼠和老龄淘汰鼠4个组。对全国部分省市实验小鼠群MCMV感染的血清学调查的动物来自8个省市40家实验动物机构, 采用5~7周龄成鼠共556只。上述动物采集时均采取随机挑选, 雌雄各半的原则。

二、标本的采集 不同品系小鼠购来后, 不经饲养立即眼球摘除取血清分离血清, -20℃保存, 用于间接免疫荧光; 无菌取颌下腺制成20%匀浆, 用于病毒分离。对全国部分省市实验小鼠MCMV感染的调查仅采血取血清, -20℃保存。

三、病毒分离 取0.1ml待检颌下腺匀浆标本上清加0.9ml 5%小牛血清-Eagle's液接种鼠胚纤维母细胞, 37℃吸附1小时后用Hanks液洗2次, 加2.5ml 5%小牛血清-Eagle's液37℃孵育。每天观察细胞病变。MCMV特征性细胞病变为接种后3~7天出现灶状细胞肿大、融合、折光性增强, 继而脱落。接种后10~12天未出现细胞病变者视为病毒分离阴性。

四、间接免疫荧光试验(IFA)测抗MCMV抗体 用MCMV-Smith株感染鼠胚纤维母细胞, 待病变达90%时用胰酶消化成单个细胞, Hanks液洗3次, 调整细胞浓度至 1×10^4 /ml。滴加在印有 $\phi 4$ mm圆圈载玻片上, 干燥后放入冷丙酮内固定15分钟。取出吹干后置-20℃冰箱保存, 为MCMV细胞片。

实验时每孔加入1:20稀释的待检血清(用15%兔血清稀释, 37℃湿盒内孵育30分钟, 用0.01 mol/L pH7.4 PBS搅拌洗涤3次, 加兔抗小鼠IgG荧光抗体(含0.01%伊文思蓝), 37℃30分钟, 再搅拌洗涤3次。用50%甘油盐水封片后荧光显微镜下检查。阴性细胞染成红色, 阳性细胞胞浆和核内出现特异性荧光染色。根据荧光强度分为+、++、+++。每块玻片均同时设阴性和阳性对照。

结 果

一、不同品系小鼠颌下腺MCMV分离情况

我们共分离了334份颌下腺匀浆标本。从表1可见从这些标本中未能分离出MCMV。值得注意的是其中69份怀孕鼠标本也无1份分离出病毒。

表1 不同品系小鼠颌下腺MCMV分离情况
Table 1 Isolation of MCMV from submaxillary glands in different strains of mice

品系 Strains	3周前乳鼠 Suckling	5~7周成鼠 Adult	怀孕鼠 Pregnant	老龄淘汰鼠 Retired	阳性率 positive rate
CBA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40 (0%)
BALB/C	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40 (0%)
DBA/1N	—	0/10	—	0/10	0/20 (0%)
DBA/2N	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40 (0%)
C57/BL	0/10	0/30	0/2	0/10	0/52 (0%)
TA ₁	—	0/5	—	0/10	0/15 (0%)
615	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40 (0%)
ICR	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40 (0%)
NIH	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40 (0%)
Kunming	—	—	0/70	—	0/7 (0%)
阳性率 Positive rate	0/70 (0%)	0/105 (0%)	0/69 (0%)	0/90 (0%)	0/334 (0%)

二、不同品系小鼠抗MCMV抗体的检出情况

从实验结果看,各品系小鼠均存在MCMV的自然感染,但感染率各不相同。其中CBA小鼠抗体阳性率最低(10.9%),昆明种小鼠阳性率最高(87.5%)。不同鼠龄组中,阳性率最高的为老龄淘汰鼠,其次为怀孕鼠和5—7周成鼠,3周前乳鼠的阳性率最低。表明阳性率随鼠龄的增长而上升(老龄淘汰鼠与3周前乳鼠、5—7周成鼠和怀孕鼠组间差异有极显著意义, $P < 0.01$, 怀孕鼠与3周前乳鼠组间差异有显著意义, $P < 0.05$, 其它各组间差异无显著意义, $P > 0.05$)。

抗体滴度与鼠龄也有一定关系。在225份阳性标本中,(++)以上强阳性占19.1%(43/225)。3周前乳鼠无强阳性,5~7周成鼠占5.6%(4/72),怀孕鼠占22.2%(8/36),老龄淘汰鼠中强阳性最多,占32.3%(31/96),表明随着鼠龄的增长,抗MCMV抗体滴度也上升。

表2 不同品系小鼠抗MCMV抗体检出情况

Table 2 Detection of antibodies to MCMV in different strains of mice

品系 Strains	3周前乳鼠 Suckling	5~7周成鼠 Adult	怀孕鼠 Pregnant	老龄淘汰鼠 Retired	阳性率 Positive rate
CBA	0/10	3/25	0/10	3/10	6/55(10.9%)
BALB/C	2/10	5/35	1/10	7/10	15/65(23.1%)
DBA/1N	—	2/10	—	6/10	8/20(40%)
DBA/2N	5/10	3/15	4/10	5/10	17/45(37.8%)
C ₃ yBL	0/10	22/30	0/2	4/10	26/62(50%)
TA ₁	—	5/5	—	7/10	12/15(80%)
615	7/10	7/10	8/10	5/10	27/40(67.5%)
ICR	7/10	10/10	9/10	9/10	35/40(87.5%)
NIH	0/10	0/10	7/10	9/10	16/40(40%)
Kunming	—	15/20	7/10	41/42	63/72(87.5%)
阳性率 Positive rate	21/70 (30%)	72/170 (42.4%)	36/72 (50%)	96/132 (72.7%)	225/444 (50.7%)

三、全国部分省市实验小鼠群中MCMV感染的血清学调查

从表3中可以看出在所调查的各省市实验小鼠群中均有MCMV的感染,抗体阳性率在42.4%—85%之间,表明MCMV感染在我国实验小鼠群中是相当普遍的。

表3 全国部分省市实验动物群中MCMV感染的血清学调查

Table 3 Incidences of MCMV infection in laboratory mouse colonies in China

地区 Areas	单位数 No. of institutions	品系 Strains	IFA阳性率 IFA positive rate
吉林 Jilin	4	Kunming	29/39 (74.4%)
辽宁 Liaoning	4	Kunming	27/39 (69.2%)
北京 Beijing	7	Kunming, NIH, Laca	64/98 (65.3%)
天津 Tianjin	5	Kunming	24/50 (48%)
山东 Shandong	2	Kunming	19/30 (63.3%)
江苏 Jiangsu	7	Kunming, ICR, NIH	53/70 (75.7%)
浙江 Zhejiang	6	Kunming, NIH	51/60 (85%)
上海 Shanghai	5	7 inbred strains 5 outbred strains	72/170 (42.4%)
合计 (Total)	40		339/566 (61.0%)

讨 论

迄今为止,有关MCMV在实验小鼠群中的自然感染情况报道不多。自从Smith(1954)分离出第1株MCMV后有学者试图用病毒分离方法来研究MCMV在实验小鼠群中的自然感染,结果发现分离率仅0.47%^[7],而野鼠中的分离率高达65~81%^[8],因而认为MCMV在实验小鼠中的感染是少见的。近年来用敏感血清学方法检测发现MCMV在实验小鼠群中的感染率要比以前所认为的高,达54.7%^[9],表明在实验小鼠群中确实存在MCMV的自然感染。

我们用MCMV实验感染发现,感染7天后病毒就能从颌下腺分离出来。尽管血清中存在特异性抗体,病毒分离时间仍可达70—105天,分离率约70%^[11,11]。但本调查对10个品系不同鼠龄组的334只小鼠颌下腺作病毒分离却无一阳性。这个结果与Mannini报道的0.47%(1/213)分离率^[7]相比无统计学意义,但有意义的是这个阳性是从怀孕鼠中分离到的。用正常唾液腺匀浆接种50只小鼠,其中非怀孕鼠病毒分离均阴性,而怀孕鼠中有2/8阳性,提示怀孕加外来刺激容易分离出MCMV。我们分离了69只怀孕鼠结果均阴性,但未对怀孕鼠进行激活试验,这是很遗憾的。

虽然对334只小鼠病毒分离均阴性,但用IFA却发现抗体阳性率高达50.7%,颌下腺病毒包涵体也有15.2%阳性。这种病毒分离与血清学试验结果不相符合提示MCMV在实验小鼠中的自然感染可能常以隐性感染和潜伏感染的方式存在,因此不容易分离到病毒。此外,病毒分离方法本身敏感性低可能也是一个重要原因。

我们发现MCMV抗体阳性率与鼠龄有密切关系,随着鼠龄的增长而上升,强阳性数量也增多。这与Anderson报道的相似,他发现4个不同品系的老鼠淘汰鼠MCMV抗体阳性率均高于同品系8周龄小鼠^[9]。HCMV感染也有此现象。据报道HCMV的重复感染和潜伏病毒的激活在维持抗体水平中起一定作用。年龄越大,重复感染和潜伏病毒激活的机率越多,抗体阳性率和抗体水平就越高,而低年龄组则相反^[12]。

在不同品系中,MCMV的感染率各不相同。这种差异可能仅仅反映了不同鼠群的易感情况,并无足够证据证明感染率与品系的遗传特性有关。因为不论是易感还是抵抗品系,感染后抗体产生的水平是没有差异的^[13]。

对全国8个省市40个实验动物机构的556只小鼠的血清学调查结果表明,绝大多数单位的实验小鼠中存在MCMV的自物感染,抗体阳性率达61.0%,提示MCMV感染在我国实验小鼠中相当普遍。

环境和饲养条件对MCMV感染亦有一定的影响。由于MCMV主要通过唾液、尿及胎盘传播,一般来说不易传播给邻近笼内的健康小鼠。有学者发现用笼具上的滤膜罩就可有效地把感染小鼠和健康小鼠隔开。因此良好的环境和饲养条件在控制感染上起重要作用。但是一旦鼠群中发生了MCMV感染,则饲养条件无论多好,仍然不能根除感染。所以筛选和引进无MCMV感染小鼠、屏障系统饲养、逐步淘汰MCMV感染鼠群是根除MCMV感染的关键。

由于MCMV感染给生物医学科研带来很大的影响,而MCMV感染在我国实验小鼠中

又是如此普遍,因此建议与免疫学、肿瘤学、药理学、毒理学有关的科研课题应选用无MCMV感染的SPF小鼠,以进一步排除MCMV感染的影响。

参 考 文 献

- (1) Hudson, J.B., 1979, *Arch.Virol.*62: 1—29.
- (2) 汤家铭, 1988, 上海实验动物科学 8: 79—82.
- (3) Leung, W.C.T.et al, 1986, *Microbiol.Immunol.*30: 761—776.
- (4) Basker, J.F.et al, 1985, *J.Infect.Dis.*152: 621—624.
- (5) Anderson, C.A.et al, 1983, *J.Clin.Microbiol.*18: 753—758.
- (6) Lusnier, C.et al, 1987, *Can.J.Vet.Res.*51: 249—252.
- (7) Mannini, A.et al, 1961, *Am.J.Hyg.*73: 329—343.
- (8) Gardner, M.B.et al, 1974, *Infect.Immun.*10: 966—969.
- (9) Anderson, C.A.et al, 1986, *J.Clin.Microbiol.*23: 1152—1154.
- (10) 汤家铭, 1990, 上海实验动物科学 10: 129—132.
- (11) 汤家铭, 1991, 上海实验动物科学 11: 8—10.
- (12) Haldane, E.V.et al., 1969, *WHO.Bull.*40: 969—973.
- (13) Chalmer, J.E.et al, 1977, *J.Gen.Virol.*37: 107—114.

A Survey on the Natural Infection of Murine Cytomegalovirus in Laboratory Mouse Colonies in China

Tang Jia-ming Yuan Yun-hua Chen Hong

(Department of Laboratory Animal Science, Shanghai Medical
University, Shanghai200032)

Up to present, few was reported about the natural infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in laboratory mice. Based on the experimental infection of MCMV, we made a survey on the natural infection of MCMV in 10 common used strains of mice. It was found that of 334 samples of sub-maxillary gland homogenate, none were positive for viral isolation, whereas specific anti-MCMV antibodies were found in 10.9-87.5% of different strains of mice. There were tendencies of increase in antibody positive rates as the mice grew older. A serological survey of 556 mouse sera from 40 laboratory animal institutions of some provinces showed that the antibody positive rate was as high as 61.0%, indicating that the natural infection of MCMV in laboratory mice was common in our country. The state of viral isolation negative-antibody positive suggested that the inapparent and latent infection were the main way of natural infection of MCMV.

Key words, Murine cytomegalovirus (MCMV) Natural infection
Viral isolation Serological survey