

李晓波,王吉,付瑞,等. 实验动物中新型冠状病毒的感染情况调查 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 21-24.
Li XB, Wang J, Fu R, et al. Investigation on the infection of SARS-CoV-2 in laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 21-24.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.09.004

实验动物中新型冠状病毒的感染情况调查

李晓波^{1#},王吉^{1#},付瑞¹,王莎莎¹,王淑菁¹,李威¹,秦晓¹,黄宗文¹,
贺争鸣¹,岳秉飞^{1*},林更涛^{2*}

(1.中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 102629; 2.东营市疾病预防控制中心,山东 东营 257091)

【摘要】目的 对实验动物中新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的感染情况进行初步调查。方法 采用双抗原夹心 ELISA 方法对 2020 年各实验动物生产单位送检的实验动物血清中新型冠状病毒抗体进行检测,包括 25 个品系的小鼠 90 只,5 个品系的大鼠 38 只,豚鼠 20 只,3 个品系的兔 27 只,比格犬 5 只。结果 对 2020 年各实验动物生产单位送检的 90 只小鼠,38 只大鼠,20 只豚鼠,27 只兔及 5 只比格犬采用双抗原夹心 ELISA 检测新型冠状病毒抗体,其结果均为阴性。结论 初步研究还不能证实实验动物中存在新型冠状病毒。
【关键词】 新型冠状病毒;实验动物;酶联免疫吸附实验
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2020) 09-0021-04

Investigation on the infection of SARS-CoV-2 in laboratory animals

LI Xiaobo^{1#}, WANG Ji^{1#}, FU Rui¹, WANG Shasha¹, WANG Shujing¹, LI Wei¹, QIN Xiao¹,
HUANG Zongwen¹, HE Zhengming¹, YUE Bingfei^{1*}, LIN Gengtao^{2*}
(1. Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China.
2. Dongying Center for Disease Control and Prevention, Dongying 257091)

【Abstract】 Objective We investigated the infection of SARS-CoV-2 in laboratory animals. Methods The double-antigen sandwich ELISA method was used to detect SARS-CoV-2 antibodies in the serum samples from five laboratory animal production facilities in 2020, including 90 mice of 25 strains, 38 rats of 5 strains, 20 guinea pigs, 27 rabbits of 3 strains and 5 beagle dogs. Results A total of 90 mice, 38 rats, 20 guinea pigs, 27 rabbits, and 5 beagle dogs sent for testing by various experimental animal production units in 2020 were tested for SARS-CoV-2 antibodies by double antigen sandwich ELISA, and the result were all negative. Conclusions Preliminary studies have not confirmed the existence of SARS-CoV-2 in laboratory animals.
【Keywords】 SARS-CoV-2; laboratory animals; ELISA

由新型冠状病毒引起的肺炎,截至 2020 年 6 月 24 日,全球感染病例近千万,死亡近 50 万人。我国在较短时间内完成了该病毒的鉴定和基因组测序工作,国际病毒专家小组将此次爆发的新型冠状病毒命名为 SARS-CoV-2^[1]。冠状病毒为有包膜的单股正链 RNA 病毒,具有跨物种传播和宿主适应性强等特点。

[作者简介] 李晓波(1980—),副研究员,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: lxb8493059@163.com
王吉(1974—),女,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: wj_nd_jds@sina.com #共同第一作者
[通信作者] 岳秉飞(1960—),研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: y6784@126.com
林更涛(1981—),主管技师,研究方向:微生物检验。E-mail: lingt@163.com * 共同通信作者

Enserink 等在国际上首次提出 2003 年的 SARS 冠状病毒来自蝙蝠,后通过果子狸传播给人类^[2]。本次新型冠状病毒溯源及可能的动物中间宿主还不明确,其在除了人类以外的动物中感染情况还不清楚,目前疫情防控重点主要放在人上,而对动物的防控是盲区,动物体内如果存在病毒会对疫情的防控产生巨大威胁。本研究对实验小鼠、大鼠、豚鼠、兔及犬中新型冠状病毒的感染情况进行了初步调查,为实验动物相关从业人员的防护提供基础数据,同时对防范新冠病毒的传播提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验动物血清均来自 2020 年各实验动物生产单位送检样品[SCXK(京)2017-0005][SYXK(京)2017-0013],其中小鼠血清 90 份,编号 M1~M90;大鼠血清 38 份,编号 R1~R38;豚鼠血清 20 份,编号 G1~G20;兔血清 27 份,编号 Ra1~Ra27;犬血清 5 份,编号 C1~C5,详细信息见表 1,已通过本院伦理审批(中检动(福)第 2019(A)001 号)。

1.2 主要试剂与仪器

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)双抗原夹心 ELISA 抗体检测试剂盒为洛阳普泰生物技术有限公司生产(2019 兽药 GMP 证字 16016 号),批号: E22A2002S。酶标仪(美国 Thermo 公司,型号 MK3);恒温培养箱(日本三洋公司,型号 MIR-262)。

1.3 实验方法

1.3.1 ELISA 测定实验动物血清中新型冠状病毒抗体

按照 ELISA 试剂盒的操作说明检测实验动物血清样品中的新型冠状病毒抗体,具体步骤如下:

a.加样:取抗原包被板,每板设阴性对照 3 孔,阳性对照 2 孔和空白对照 1 孔,分别在相应孔中加入待测样品 100 μL ,阴、阳性对照每孔加入 50 μL ,记录样品加样顺序。

b.温育:封板膜封板,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。

c.洗板:揭掉封板膜,每孔加满洗液,静置 30 s,弃掉,重复洗板 5 次,最后一次尽量扣干。

d.加酶:每孔加入酶标试剂 100 μL ,空白孔除外,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。

e.洗板:同步骤 c。

f.显色:每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μL ,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。

g.测定:每孔加入终止液 50 μL ,轻轻振荡混匀,设定酶标仪测定波长 450 nm,用空白孔调零后测定各孔 A 值。

1.3.2 结果判定

阴性对照孔 A 值 <0.1 ,阳性对照孔 A 值 >0.19 ,实验成立;临界值=0.16+阴性对照孔 A 值均值(阴性对照孔低于 0.03 按 0.03 计算),样品 A 值 $\geq$ 临界值判为新冠病毒抗体阳性,样品 A 值 $<$ 临界值判为新冠病毒抗体阴性。

2 结果

ELISA 结果见表 2,阳性对照均值为 0.588,阴性对照均值为 0.006,实验成立;计算临界值=0.19,根据临界值判断 90 份小鼠、38 份大鼠、20 份豚鼠、27 份兔及 5 份犬血清样本中新冠病毒抗体均为阴性。

3 讨论

ELISA 检测病毒抗体是实验动物国家标准常用的病毒检测方法。ELISA 具有灵敏度高,特异性好,操作简便等特点,对动物血清中病毒抗体检测可显示动物的既往感染情况,并可避免病毒潜伏感染造成的核酸检测假阴性结果。近期北京新增多个病例核酸检测阴性,而抗体检测阳性,均可能由于人体免疫系统对病毒进行了一定程度的清除,此时对咽拭子样本进行核酸检测就可能出现核酸检测结果阴性。

本研究采用的 ELISA 检测试剂盒来自洛阳普泰生物技术有限公司,该公司通过了兽药 GMP 认证(2019 兽药 GMP 证字 16016 号)。试剂盒采用双抗原夹心法检测病毒抗体,特异性良好,与小鼠肝炎病毒、大鼠冠状病毒等冠状病毒属病毒均无交叉反应。试剂盒相关内容已制定成团体标准“T/CVMA 15-2020 新型冠状病毒动物血清抗体双抗原夹心酶联免疫吸附实验检测方法”,且生产单位参与了标准的制定,其检测性能可靠。不过抗体检测也有其局限性,如抗体的产生依赖于动物的免疫状态,不适用于免疫缺陷动物的检测;同时抗体的产生需要窗口期,在窗口期检测会出现假阴性结果,因此后续的实验还需结合核酸检测进行研究。

本实验检测的样品既包含了常用品系动物,如 KM、BALB/c 小鼠,SD、Wistar 大鼠等,也有各种模式动物,结果显示新冠病毒抗体均为阴性。推测可能的原因之一是这些种类的动物机体细胞无新冠病毒受体,因而对新冠病毒不易感。由于新冠病毒

的强致病性和感染性,操作活病毒需要生物安全 3 级以上实验室,目前还未有实验动物人工感染新冠病毒的报道;另一原因可能在于实验动物是一类特殊群体,饲养环境、微生物状况、饲养人员、饲料和垫料等均严格控制,获得感染的几率很小,故新冠病毒抗体为阴性。

表 1 实验动物样本详细信息

Table 1 Information for laboratory animal samples

品种 Species	品系 Strain	等级 Grade	年龄 Age	数量 Number	编号 Serial number	来源 Source
小鼠 Mice	KM	SPF	6~8 周 6~8 weeks	48	M1~M48	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	BALB/c	SPF	6~8 周 6~8 weeks	3	M49~M51	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	BALB/cJ	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M52~M53	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	BALB/cAnSlac-nu	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M54~M55	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	C57BL/6J	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M56~M57	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	C57BL/6J-bg	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M58~M59	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	ddY	SPF	6~8 周 6~8 weeks	5	M60~M64	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	FVB/NJNju	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M65~M66	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	NCPC/2	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M67~M68	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	NPI	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M69~M70	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	NU/J	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M71~M72	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	T739	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M73~M74	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	SCID	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M75~M76	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	BNSG	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M77~M78	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	TIM4	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M79	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	APOE	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M80	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	LTAL	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M81	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	EPHAL	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M82	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	GA	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M83	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	KPC	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M84	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	NCoR	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M85	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	KCG	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M86	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	CSF1R	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	M87~M88	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	SCARB2	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M89	中检院 NIFDC
小鼠 Mice	NCPC/2	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	M90	中检院 NIFDC
大鼠 Rat	SD	SPF	6~8 周 6~8 weeks	24	R1~R24	中检院 NIFDC
大鼠 Rat	Wistar	SPF	6~8 周 6~8 weeks	10	R25~R34	中检院 NIFDC
大鼠 Rat	BN	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	R35	中检院 NIFDC
大鼠 Rat	F344	SPF	6~8 周 6~8 weeks	2	R36~R37	中检院 NIFDC
大鼠 Rat	三缺 T,B,Nk cell combined immunodeficiency	SPF	6~8 周 6~8 weeks	1	R38	中检院 NIFDC
豚鼠 Guinea pig	Hartley	SPF	3~4 周 3~4 weeks	10	G1~G10	中检院 NIFDC
豚鼠 Guinea pig	Hartley	普通级 Conventional	3~4 周 3~4 weeks	5	G11~G15	生产单位 1 Facility1
豚鼠 Guinea pig	Hartley	普通级 Conventional	3~4 周 3~4 weeks	5	G16~G20	生产单位 2 Facility2
兔 Rabbit	新西兰 New Zealand	SPF	2 月龄 2 months	12	Ra1~Ra12	中检院 NIFDC
兔 Rabbit	大耳白 Big ear white	SPF	2 月龄 2 months	3	Ra13~Ra15	中检院 NIFDC
兔 Rabbit	新西兰 New Zealand	普通级 Conventional	2 月龄 2 months	5	Ra16~Ra20	生产单位 3 Facility3
兔 Rabbit	大耳白 Big ear white	普通级 Conventional	2 月龄 2 months	5	Ra21~Ra25	生产单位 3 Facility3
兔 Rabbit	模式兔 Pattern rabbit	SPF	2 月龄 2 months	2	Ra26~Ra27	中检院 NIFDC
犬 Caine	比格犬 Beagles	普通级 Conventional	>12 月 >12 months	5	C1~C5	生产单位 4 Facility4

表 2 实验动物血清中新冠病毒抗体 ELISA 检测结果

Table 2 ELISA test results of anti-coronavirus antibody in serum of experimental animals

样品编号 Sample number	A 值 A value	样品编号 Sample number	A 值 A value	样品编号 Sample number	A 值 A value	样品编号 Sample number	A 值 A value	样品编号 Sample number	A 值 A value
M1	0.007	M31	0.006	M61	0.004	R1	0.006	R31	0.008
M2	0.012	M32	0.007	M62	0.004	R2	0.007	R32	0.007
M3	0.008	M33	0.007	M63	0.006	R3	0.009	R33	0.007
M4	0.008	M34	0.009	M64	0.031	R4	0.007	R34	0.008
M5	0.004	M35	0.009	M65	0.007	R5	0.007	R35	0.008
M6	0.006	M36	0.009	M66	0.009	R6	0.007	R36	0.009
M7	0.005	M37	0.004	M67	0.008	R7	0.006	R37	0.007
M8	0.007	M38	0.005	M68	0.008	R8	0.012	R38	0.006
M9	0.007	M39	0.005	M69	0.004	R9	0.007	G1	0.007
M10	0.013	M40	0.013	M70	0.004	R10	0.008	G2	0.008
M11	0.009	M41	0.008	M71	0.006	R11	0.009	G3	0.007
M12	0.008	M42	0.009	M72	0.016	R12	0.008	G4	0.009
M13	0.006	M43	0.010	M73	0.008	R13	0.007	G5	0.007
M14	0.006	M44	0.009	M74	0.009	R14	0.007	G6	0.011
M15	0.005	M45	0.010	M75	0.008	R15	0.006	G7	0.007
M16	0.006	M46	0.005	M76	0.009	R16	0.007	G8	0.007
M17	0.007	M47	0.006	M77	0.005	R17	0.006	G9	0.006
M18	0.009	M48	0.007	M78	0.056	R18	0.007	G10	0.006
M19	0.009	M49	0.008	M79	0.006	R19	0.007	G11	0.007
M20	0.008	M50	0.064	M80	0.006	R20	0.008	G12	0.007
M21	0.006	M51	0.009	M81	0.008	R21	0.008	G13	0.007
M22	0.005	M52	0.011	M82	0.009	R22	0.007	G14	0.009
M23	0.005	M53	0.009	M83	0.008	R23	0.007	G15	0.007
M24	0.006	M54	0.005	M84	0.008	R24	0.007	G16	0.006
M25	0.008	M55	0.005	M85	0.005	R25	0.037	G17	0.006
M26	0.009	M56	0.007	M86	0.005	R26	0.047	G18	0.007
M27	0.008	M57	0.008	M87	0.013	R27	0.005	G19	0.008
M28	0.009	M58	0.010	M88	0.006	R28	0.010	G20	0.007
M29	0.005	M59	0.009	M89	0.010	R29	0.004	Ra1	0.014
M30	0.005	M60	0.009	M90	0.011	R30	0.004	Ra2	0.009
								C5	0.004

参考文献:

[2] 陈嘉源,施劲松,丘栋安,等. 2019 新型冠状病毒基因组的生物信息学分析 [J]. 生物信息学, 2020, 18(2): 96-102.

[1] 黄明,雷武刚,梅海英. 新型冠状病毒肺炎患者初诊临床与 CT 征象分析 [J]. 医学理论与实践, 2020, 33(11): 1721-1723.

[收稿日期]2020-06-28