

吕琦,刘明娅,戚菲菲,等. 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在三文鱼食材中的活性[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 98-101.

Lyu Q, Liu MY, Qi FF, et al. Persistence of SARS-CoV-2 on the surface of salmon [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(2): 98-101.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.02.015

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在三文鱼 食材中的活性

吕琦,刘明娅,戚菲菲,龚姝然,周沙沙,鲍琳琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 研究 SARS-CoV-2 粘附在三文鱼肉上的活性保持情况,为科学防控冠状病毒提供理论依据。**方法** 检测在 4℃ 和 22℃ 条件下,粘附在三文鱼肉上和 4% NaCl 仿海盐水中 SARS-CoV-2 病毒的活性情况。**结果** 4℃ 条件下,三文鱼表面病毒活性可保持 4 d,4% NaCl 仿海盐水中病毒活性可保持 7 d,1 d 内病毒活性均衰减超过 50%。22℃ 条件下,三文鱼表面病毒活性可维持 1 d,4% NaCl 仿海盐水中病毒活性可维持 2 d,1 d 内病毒活性衰减均超过 50%。**结论** 4℃~22℃ 条件下,三文鱼表面 SARS-CoV-2 病毒可存活 1~4 d,4% 仿海盐水中 SARS-CoV-2 病毒可存活 2~7 d。

【关键词】 SARS-CoV-2;三文鱼;活性;4% NaCl 仿海盐水

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 02-0098-04

Persistence of SARS-CoV-2 on the surface of salmon

LYU Qi, LIU Mingya, QI Feifei, GONG Shuran, ZHOU Shasha, BAO Linlin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, 100021 Beijing, China)

【Abstract】 To investigate the persistence of SARS-CoV-2 on the surface of salmon to provide data for the control of COVID-19. **Methods** A 100 μ L droplet of virus culture was pipetted onto the surface of salmon and then incubated at 4℃ or 22℃ for up to 5 days. A 100 μ L droplet of virus culture was also pipetted into 4% NaCl imitation seawater and then incubated at 4℃ and 22℃ for up to 9 days. The infectivity of virus collected from salmon surfaces and from the 4% NaCl brine was titrated using the Vero E6 cell line. **Results** The virus on salmon surfaces retained viability for 4 days at 4℃, and for 1 day at 22℃; 50% of infectivity was lost after 1 day at both temperatures. Virus in 4% NaCl imitation seawater retained viability for 7 days at 4℃ and for 2 days at 22℃; 50% of infectivity was lost after 1 day at both temperatures. **Conclusions** SARS-CoV-2 remained viable on salmon surfaces for 1-4 days at 4℃ and 22℃. SARS-CoV-2 remained viable in 4%

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2020-I2M-CoV19-009)。

【作者简介】 吕琦(1982—),女,硕士,主管技师,主要从事新发及再发传染病病原学检测研究。E-mail: lwdk1988@hotmail.com

【通信作者】 鲍琳琳(1979—),女,教授,研究员,博士生导师,主要从事新发及再发传染病动物模型创制的研究。

E-mail: bllmsl@aliyun.com

NaCl imitation sea water for 2–7 day sat 4°C and 22°C.

【Keywords】 SARS-CoV-2; salmon; persistence; 4% NaCl imitation seawater

目前,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情全球流行,由于该病病原体新型冠状病毒(SARS-CoV-2)传染性强,传播迅速,截至2020年9月全球累计确诊人数超过2500万例,死亡人数超过85万,新型冠状病毒肺炎对人类健康造成巨大威胁。SARS-CoV-2病毒主要通过飞沫传播和密切接触传播^[1-3],所以病毒在环境中的稳定性和在物体表面的活性直接影响了病毒传播的效能,这些数据的掌握对制定有效的新冠病毒疫情控制措施极为重要。疫情爆发初始,以及国内疫情有效控制后,局部地区出现感染事件,似乎都围绕着海鲜产品而发生,推测由于海鲜产品在包装、运输过程中,新冠病毒污染了装运的外环境,并具有低温冷藏环境下长时间存活的能力,这些条件的共存使得病毒容易向外传播或扩散,导致到货地区和人员的污染和感染。

为准确评估新冠病毒潜在风险及为疫情防控、病毒检疫提供科学依据,本研究选择海鲜产品三文鱼,配制4% NaCl 仿海盐水来简单模拟海水主要成分(海水平均盐度为35‰)^[4]。将病毒滴加在三文鱼表面和4%仿海盐水中,分别放置在不同温度条件,不同时间测定病毒滴度评估病毒在三文鱼及仿海盐水中的存活情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞

VeroE6细胞,由中国医学科学院医学实验动物研究所病原中心保存。

1.1.2 病毒株

SARS-CoV-2/WH-09/human/2020/CHN (GenBank: MT093631.2),由中国医学科学院医学实验动物研究所、北京协和医学院比较医学中心分离。

1.2 主要试剂与仪器

三文鱼块:采购于食品生鲜超市;胎牛血清(Gibco, 12109290CP);青/链霉素(Penicillin/Streptomycin)双抗生素溶液(Gibco, 2076677);DMEM培养基(Hyclone, AE29431646);0.25% Trypsin-EDTA(Gibco, 2085264)。

生物安全柜(Thermo, 1287, 美国);二氧化碳细胞培养箱(Thermo, 371, 美国);-80°C超低温冰箱(Thermo, 905, 美国);15 mL、50 mL管离心机(SIGMA, 6K15, 美国);1 mL管台式离心机(KUBOTA, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 病毒在三文鱼表面活性的测定

实验分设2组,22°C组(室温)和4°C组,每组各6块三文鱼块(长宽高为4 cm×4 cm×1 cm)。取100 μL 10^{6.5} TCID₅₀/mL病毒液加至各组受试鱼块表面,分别在22°C(室温)和4°C放置0 h、1 d、2 d、3 d、4 d和5 d后,利用2 mL DMEM培养基(100 U/mL青霉素和100 μg/mL)反复冲洗三文鱼表面3~5次,冲洗液离心收集上清液,测定滴度。实验中除温度外,环境湿度和风速基本一致,实验重复3次。

1.3.2 病毒在4%仿海盐水中活性的测定

实验分设为2组。22°C组(室温)和4°C组每组各8管浓度为4% NaCl 灭菌盐水做为仿海盐水,每管0.9 mL。各取100 μL 10^{5.33} TCID₅₀/mL病毒液加至各组盐水管中,分别在22°C(室温)和4°C下存放0 h、1 d、2~5 d、7 d和9 d收集盐水和病毒液混合液测定滴度。实验中除温度外,环境湿度和风速基本一致,实验重复3次。

1.3.3 病毒滴度测定

10倍系列稀释的病毒液接种于单层VeroE6细胞中,37°C 5% CO₂ 孵育1 h后,弃掉吸附液,加入200 μL病毒培养基(DMEM培养基中加入100 U/mL青霉素,100 μg/mL和2%胎牛血清),37°C,5% CO₂ 孵育3 d,观察细胞CPE,Reed and Muench方法计算病毒组织细胞半数感染量(TCID₅₀)^[5]。

1.4 统计学方法

病毒滴度在不同组之间存在的差异运用GraphPad Prism 8.0软件进行ANOVA单因素方差分析。 $P < 0.05$ 时,认为两者之间存在显著性差异。

2 结果

2.1 病毒在三文鱼表面活性的测定

将100 μL 10^{6.5} TCID₅₀/mL病毒液放置在三文鱼块表面,分别在22°C(室温)和4°C条件下放置

0 h、1 d、2 d、3 d、4 d 和 5 d, 收集三文鱼表面病毒液, 测定滴度。起始(0 h) 收集病毒液, 测定滴度为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL。三文鱼放置在 4℃ 时, 在 1 d、2 d、3 d 和 4 d 均能测得病毒滴度, 分别为 $10^{4.17}$ TCID₅₀/mL、 $10^{3.57}$ TCID₅₀/mL、 $10^{3.11}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{2.44}$ TCID₅₀/mL, 病毒活力在 1 d 内衰减超过 50%, 5 d 后病毒滴度低于检测下限; 放置在 22℃ (室温) 时, 仅在 1 d 测得病毒滴度, 为 $10^{2.67}$ TCID₅₀/mL, 病毒活力在 1 d 内衰减超过 50%, 2 d 后病毒滴度均低于检测下限。见图 1、图 2。

2.2 病毒在 4% 仿海盐水中活性的测定

将 100 μL $10^{5.33}$ TCID₅₀/mL 病毒液放入 4% 仿海盐水中, 分别在 22℃ (室温) 和 4℃ 放置 0 h、1 d、2 ~ 5 d、7 d 和 9 d, 收集盐水病毒混合液, 测定病毒滴

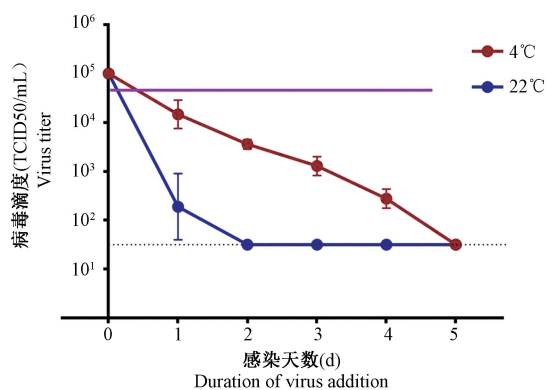


图 1 在 4℃ 和 22℃ 条件下, 不同时间三文鱼表面病毒液滴度

Figure 1 Virus titers on salmon surfaces at 4°C and 22°C in different times

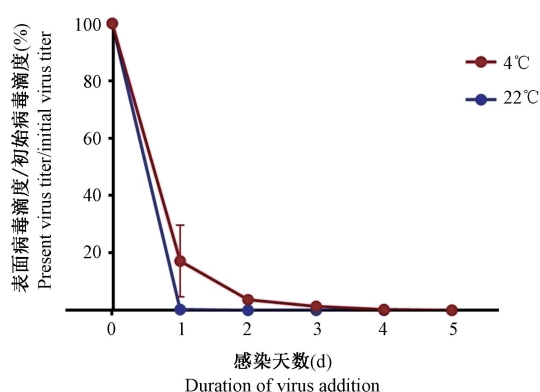


图 2 在 4℃ 和 22℃ 条件下, 三文鱼表面病毒液与初始病毒液滴度比值

Figure 2 Present virus titer/initial virus titer on salmon surfaces at 4°C and 22°C in different times

度。起始(0 h) 收集混合液, 测定滴度为 $10^{4.33}$ TCID₅₀/mL。4℃ 时, 1~5 d 和 7 d 均能测得病毒滴度, 分别为 $10^{3.89}$ TCID₅₀/mL、 $10^{3.44}$ TCID₅₀/mL、 $10^{3.28}$ TCID₅₀/mL、 10^3 TCID₅₀/mL、 $10^{2.67}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{2.17}$ TCID₅₀/mL, 病毒活力在 1 d 内衰减超过 50%, 9 d 后病毒滴度低于检测下限; 22℃ (室温) 时, 仅在 1 d、2 d 测得病毒滴度, 分别为 $10^{2.78}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{2.44}$ TCID₅₀/mL, 病毒活力在 1 d 内衰减超过 50%, 3 d 后病毒滴度均低于检测下限。见图 3、图 4。

3 讨论

SARS-CoV-2 病毒主要通过飞沫传播和密切接触传播^[1-3], 所以病毒在环境中的稳定性和在物体

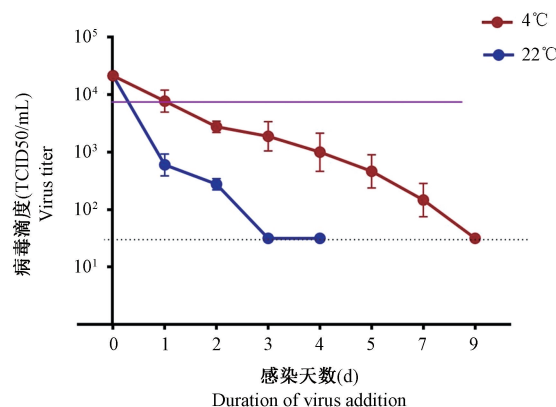


图 3 不同温度条件下, 不同时间 4% NaCl 仿海盐水中病毒液滴度

Figure 3 Virus titers in 4% NaCl imitation seawater at 4°C and 22°C in different times

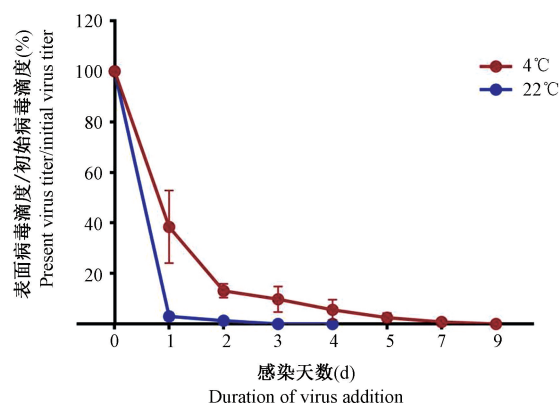


图 4 不同温度条件下, 4% NaCl 仿海盐水中病毒液与初始病毒液滴度比值

Figure 4 Present virus titer/initial virus titer in 4% NaCl imitation seawater at 4°C and 22°C in different times

表面的活性直接影响了病毒传播的效能。众所周知,病毒通常在零度下易于长期存活,但在通常 4℃ 或不同室温条件下活性维持时间不得而知,而这样的温度,也是日常生活中三文鱼等食材最常处于的温度,研究调查病毒在这样条件下的活力,对海鲜市场的病毒控制具有重要意义。

结果显示 4℃~22℃ 条件下,三文鱼表面病毒可存活 1~4 d,4% NaCl 仿海盐水中病毒可存活 2~7 d,从病毒滴度结果看出,SARS-CoV-2 在三文鱼表面具有一定活性,因此被病毒污染三文鱼在解冻后低温状态具有较长时间活性;病毒在仿海水中也能稳定存活,所以伴随运输的海水如有污染,也会携带病毒,并具一定时间的活性。有研究对三文鱼体内 ACE2 进行分析,其结构异于人 ACE2,所以无法与病毒 S 蛋白结合,从而不能感染病毒^[6],北京新发地三文鱼案板上检测到的病毒通过全基因组测序比对,发现病毒与欧洲流行株相似。所以推测三文鱼在进口前就已被环境或者操作人员污染而粘附病毒。所以对进口食品的病毒检疫、售卖环境的消毒和经手人员的预防都应该给予重视。

本文通过三文鱼鱼肉表面病毒活性的检测获得的结果,让我们初步了解在三文鱼表面病毒随温

度的活性变化,掌握新冠病毒的一些生物特性,对我们进一步了解病毒和制定有效的防控策略提供有力的科学支撑。

参考文献:

- [1] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395(10223): 497-506.
- [2] Wu Y, Jing W, Liu J, et al. Effects of temperature and humidity on the daily new cases and new deaths of COVID-19 in 166 countries [J]. Sci Total Environ, 2020, 729: 139051.
- [3] Yu P, Qi F, Xu Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 [J]. Animal model Exp Med, 2020, 3(1): 93-97.
- [4] Yan LG, Wang ZM, Liu CY, et al. On the determination and simulation of seawaterfreezing point temperature under high pressure [J]. Advances in Polar Sci, 2019, 30(4): 38-45.
- [5] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. Nature, 2020, 583(7818): 830-833.
- [6] Hayashi T, Aboko K, Masaki M, et al. Molecular analysis of binding region of an ACE2 as a receptor for SARS-CoV-2 between humans and mammals [J]. bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.09.196378>.

[收稿日期] 2020-09-08