

唐定,张瑞安,卢佳,等. 新型冠状病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 100–104, 154.
Tang D, Zhang RA, Lu J, et al. Evaluation index for non-human primate SARS-CoV-2 infection models [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 100–104, 154.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.015

新型冠状病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标

唐 定,张瑞安,卢 佳*,李新国*

(武汉生物制品研究所有限责任公司生物安全三级实验室,武汉 430207)

【摘要】 随着新型冠状病毒肺炎疫情的爆发,新型冠状病毒(新冠病毒,SARS-CoV-2)发病机制、功能结构、相关疫苗和药物的研究步伐迅速加快,动物感染模型对 SARS-CoV-2 的相关研究不可或缺,非人灵长类动物在生理上与人类非常相似,因此新冠病毒非人灵长类动物感染模型是新冠病毒研究中最重要动物模型之一。然而,基于伦理道德、研究资质和成本等条件限制,新冠病毒的非人灵长类动物感染模型数量相对较少,所以保证每次动物试验结果的有效性就显得尤为关键。本文结合现已发表的新冠病毒动物感染模型相关文献和人类患者临床数据对新冠病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标进行总结分析,包括临床表现指标、影像学诊断、血液学指标、病原学指标、病理学指标、免疫学指标等,为新冠病毒非人灵长类动物感染模型的成功建立提供参考。

【关键词】 新型冠状病毒;非人灵长类动物;感染模型;评价指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0100-05

Evaluation index for non-human primate SARS-CoV-2 infection models

TANG Ding, ZHANG Ruian, LU Jia*, LI Xinguo*

(Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd, Biosafety Level 3 Laboratory, Wuhan 430207, China)

【Abstract】 With the outbreak of the novel coronavirus pneumonia, coronavirus disease 2019 (COVID-19), research on the pathogenesis and functional structure of the causative virus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), as well as on COVID-19-related vaccines and drugs, has accelerated rapidly. Animal infection models, especially those using non-human primates, are indispensable for research on COVID-19. Owing to their physiological similarity to humans, non-human primate models are among the most important animal models in SARS-CoV-2 research. However, there are relatively few studies using non-human primate infection models for COVID-19 owing to various constraints, including ethics, research qualifications, and cost; therefore, it is particularly critical to ensure the validity of each animal test result. This article summarizes and analyzes evaluation indicators for the non-human primate model of SARS-CoV-2 infection, including clinical scores, imaging diagnosis, hematology indicators, and pathogens, from the published literature on SARS-CoV-2-infected animal models and clinical data, which could provide a useful reference for the successful establishment of more effective non-human primate models of SARS-CoV-2 infection.

【Keywords】 SARS-CoV-2; non-human primates; infected animal model; evaluation index

一种被命名为 SARS-CoV-2 的新型冠状病毒爆发,导致呼吸系统疾病,病死率约为 2.2%^[1]。我国将 SARS-CoV-2 按照第二类病原微生物进行管理,涉及病毒培养和动物感染实验则必须在生物安全三级或以上级别实验室进行^[2-3]。尽管人类患者的数量非常的庞大,但 SARS-CoV-2 某些方面的发病

【基金项目】 国家重点研发计划(2020YFC0842100)。
【作者简介】 唐定(1996—),男,硕士,研究方向:感染性疾病非人灵长类动物模型制备。E-mail: 17830913706@163.com
【通信作者】 李新国(1973—),男,副研究员,研究方向:细菌类疫苗及联合疫苗。E-mail: Lixinguo@sinopharm.com
卢佳(1984—),女,副研究员,研究方向:多价手足口病疫苗研制工作。E-mail: johnsonchau@163.com * 共同通信作者

机制和疫苗的前期评估只能在动物感染模型中才能够实现反复采样和病理解剖。因为非人灵长类动物(non-human primates, NHP)在亲缘关系上与人类非常接近,并且生理结构和解剖病理结构等都与人类十分类似,所以疫苗或药物一般会选择 NHP 进行临床前研究^[4-5]。在非人灵长类动物新冠病毒感染模型研究中发现,SARS-CoV-2 能够导致恒河猴的呼吸系统疾病,但 NHP 感染新冠病毒后大多表现为轻度到中度的临床症状,并且在感染后 1 周左右开始恢复^[6]。因此,单一的评价指标难以准确判断实验猴的感染阶段和感染模型的建立是否成功,正确选择能观察或检测表现疾病关键特征性的指标不仅能够节省人力、物力和时间,也更能保证实验结果的有效性。新冠病毒非人灵长类动物感染模型关键特征性评价指标包括临床表现指标、影像学诊断、血液学指标、病原学指标、病理学指标、免疫学指标等,结合这些指标综合判断动物感染模型的建立是否成功对后续实验结果的分析至关重要^[7-8]。

1 临床表现指标

临床评分是对实验动物的一些主要症状、体征和生理参数等进行加权或赋值,从而量化评价疾病的严重程度,预测后续发展,也能控制研究时的组间可比性^[9]。实验表明,非人灵长类动物在感染新冠病毒后会产生与人类患者相似的临床症状,主要表现为呼吸模式的变化、弓背姿势、体表苍白、脱水、食欲下降、偶尔咳嗽和体温变化等^[6]。对 NHP 感染新冠病毒后的临床症状进行赋值,建立临床评分标准,再根据标准对实验猴进行临床评分,其结果可以有效评估实验猴的感染阶段,有助于判断实验进程和实验终点(见表 1)^[6]。

2 影像学诊断

计算机断层扫描(CT)和 X 射线检查是影像学检查中非常重要的检查方法。在新冠病毒感染早期,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)方法很容易出现假阴性^[10],因此,识别该病的早期影像表现及临床特征在新冠肺炎诊断方面具有重要意义。临床诊断结果也证明使用 CT 或胸部 X 射线检查能对新冠病毒患者进行有效诊断,其中 CT 通常会产生更准确的结果。人类患者的影像特征包括单发或散在磨玻璃密度阴影,病变部位主要分布在胸膜下缘或肺中央,伴随征象包括胸腔积液、纵隔及肺门

区淋巴结增大等^[11]。通过制定新冠病毒非人灵长类动物感染模型的肺部 CT 评分方法,能够半定量分析肺内病变程度,评分标准为:无异常密度影,0 分;存在少量异常密度影,累及面积<5%,1 分;累及面积<25%,2 分;累及面积<50%,3 分;累及面积<75%,4 分;累及面积>75%,5 分^[12]。根据 CT 评分结果能够客观的评价实验猴的感染阶段,及时调整实验方案,取得更加理想的实验结果。

3 血液学指标

3.1 血常规检验

血常规是临床检测中应用最普遍的检测项目,其中外周白细胞计数、中性粒细胞与淋巴细胞比率(NLR)、衍生 NLR 比率(d-NLR,中性粒细胞计数除以白细胞计数减去中性粒细胞计数的结果)、血小板与淋巴细胞比率(PLR)和淋巴细胞与单核细胞比率(LMR)是炎症反应的指标^[13]。对动物感染模型临床检查中收集的血液进行血常规分析显示,大多数实验猴的单核细胞和中性粒细胞计数都在感染后短暂上升,然后恢复到基线水平;淋巴细胞则短暂下降再恢复;所有动物都观察到红血细胞压积、红细胞计数和血红蛋白下降,网织红细胞的百分比和计数也有所下降^[6]。淋巴细胞数量的下降与 COVID-19 感染的严重程度成正比,并且该疾病的存活率与淋巴细胞尤其是 T 淋巴细胞的更新能力有关,这对摧毁受感染的细胞至关重要^[14]。近年来,有研究表明平均血小板体积(MPV)可能是预测肺炎患者病情发展及预后的一个指标^[15]。研究发现 NLR 也可用作评估 COVID-19 患者的预后情况和临床症状的严重程度,NLR 与 COVID-19 的严重程度呈正相关^[12]。

3.2 血液生化检测

通过对临床病例分析发现,部分新冠患者的肝功能指标出现异常,主要表现为谷草转氨酶升高,谷丙转氨酶升高,谷草转氨酶和谷丙转氨酶比例异常,乳酸脱氢酶升高;但这不是普遍现象,与感染的毒株和患者年龄有较大关系^[16]。血尿素氮和血清肌酐都是肾损伤的常规指标,现有数据表明,新冠患者中急性肾损伤(AKI)的患病率相对较低,各项研究结果显示在 0.5%~19.1%之间^[17]。但是,在新冠病毒非人灵长类动物感染模型中,生化指标的变化较小,肾功能和肝功能的标志物基本保持不变^[18]。

表 1 临床评分表
Table 1 Clinical scoring sheet

动物编号 Animal number	评分日期 Scoring date	评分人 Rater	分值 Points	得分 Score
总体外观 General appearance	正常、警觉 Normal, alert		0	
	弓背姿势、眼神呆滞 Hunched posture, dull appearance to eyes		5	
	脱水、体重减轻、明显肿胀、组织肿块 Dehydration, notable weight loss, obvious swelling, tissue mass		10	
	任何天然孔出血(非生理性) Bleeding from any orifice (not related to routine procedures or menstruation)		15	
	被毛杂乱、脏污 Ruffled fur, unkept appearance		5	
皮肤、毛发 Skin, haircoat	皮疹、苍白、发红、出血点、瘀斑、伤口、脓肿、溃疡 Rash, pallor, redness, icterus, ecchymoses, wound, abscess, ulcer		10	
五官 Facial features	流鼻涕、流涎、流泪、眼发红、眼分泌物增多、上睑下垂 Nasal discharge, salivation, lacrimation, reddened eyes, ocular discharge, ptosis		5	
呼吸 Respiration	呼吸增加或减少、咳嗽 Increased or decreased respiration, cough		5	
	呼吸困难、张口呼吸、发绀 Dyspnea, open mouth breathing, cyanosis		15	
粪便、尿液 Feces, urine	粪便减少、粪便干或糊状、水样便、尿液减少 Decreased feces, dry, wet and pasty, watery feces, decreased urine		5	
	无粪便、无尿、血便、血尿、 Feces absent, urine absent, blood in feces or urine		10	
	下降(进食少于一半) Decreased(eating less than half the biscuits)		3	
食欲 Appetite	吃了水果,但没吃饲料 Eating fruit but no biscuits		5	
	食欲废绝 Severely decreased		10	
	多动症(盘旋、攻击性增加)、活动减少 Hyperactivity(circling, increased aggression), hypoactivity		5	
活力 Activity	共济失调、神经系统症状(震颤、头部倾斜)、对零食失去兴趣 Ataxia, neurological signs(tremors, head tilt), loss of interest in treats		10	
	不愿意移动、长期靠在笼子上、对人反应减弱 Reluctant to move, cage for support, decreased response to human presence		15	
	对人接近基本没有反应、昏迷 Minimal response to human approach, coma		35	
			总分 Total score	

注:分值达到 35 分则执行安乐死。
Note. Euthanasia will be performed if the score reaches 35.

4 病原学指标

Real-time PCR 是世界卫生组织(WHO)、中国国家卫生健康委员会等单位推荐的新冠肺炎确诊的标准之一,能够高效处理较大数量样本^[19]。在恒河猴的新冠感染模型中,鼻拭子、咽拭子和支气管肺泡灌洗液中的病毒载量都很高,并且能够从感染早期的鼻拭子、咽拭子和肺泡灌洗液中分离出新冠

病毒,也能从肺组织匀浆上清中分离出新冠病毒^[6];在呼吸系统及其附近的淋巴结中不仅检测到了高病毒载量,还检测到了新冠病毒的 mRNA,这表明新冠病毒在呼吸系统中具有较高的复制活性^[20-21]。通过新冠病毒的核酸检测,可以有效指示新冠病毒能够侵入的组织器官以及其中的病毒载量,这对疫苗的免疫保护力评价、病毒感染模型的构建和其它相关生物或化学制剂的作用研究都至关重要。

5 病理学指标

常用的病理学技术有苏木精-伊红(HE)染色和免疫组化技术,HE 染色可以观察细胞结构、组织层次,对组织器官的病理学诊断非常重要;免疫组化染色技术能对新冠病毒抗原进行定位、定性及相对定量的研究^[22-23]。迄今为止描述的 COVID-19 肺组织病理学表现在很大程度上是非特异性的,包括水肿、蛋白质渗出物、伴有透明膜形成的弥漫性肺泡损伤(DAD)、反应性肺细胞增生、以淋巴细胞为主的间质单核炎性浸润和多核巨细胞,通常没有出现病毒致细胞病变的变化或特性核内或胞浆内病毒包涵体^[24-30]。然而,血管血栓形成似乎在 COVID-19 患者的肺中更为常见^[31]。研究发现,非人灵长类动物新冠病毒感染模型中的病理学变化主要表现为以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,形成间质性肺炎;同时在多个组织器官中检测到新冠病毒抗原,包括整个呼吸道、扁桃体、纵膈淋巴结、肠系膜淋巴结、颈部淋巴结、胃肠道,在部分实验动物的心脏中也检测到了新冠病毒抗原^[6,20]。

6 免疫学指标

6.1 细胞免疫

细胞因子风暴被认为是急性呼吸窘迫综合征和多器官衰竭的主要原因之一,它在疾病加重过程中起着重要的作用。临床研究已经证实 COVID-19 的危重症患者体内存在细胞因子风暴^[32]。研究发现,与非重症患者相比,重症监护病房患者血浆中 IL-2、IL-7、IL-10、GCSF、IP-10、MCP-1、MIP-1a 和 TNF- α 的水平更高,提示重症患者体内可能存在细胞因子风暴^[33-34]。尽管呼吸道中的病毒滴度相似,但感染 SARS-CoV-2 的老年非人灵长类动物比受感染的年轻非人灵长类动物更容易出现免疫失调,导致更严重的临床症状,可能是过度的炎症反应而不是高病毒滴度导致老年非人灵长类动物的死亡^[35-38]。以上研究结果表明,细胞因子风暴与疾病严重程度呈正相关,因此在新冠病毒非人灵长类动物感染模型建立过程中监测实验猴的细胞因子水平有助于判断感染情况和疾病发展阶段。

6.2 体液免疫

大多数 COVID-19 患者在出现症状后 1~2 周内可检测到抗体反应^[39]。具体而言,在出现临床症状的第 2 天能够检测到 IgA 抗体,在临床症状出现后

的第 5 天能够检测到 IgM 和 IgG 抗体^[40-43]。最近的研究表明,中和抗体水平与 COVID-19 患者的严重程度密切相关,并且抗体反应在感染后数周内消退^[44]。此外,与有症状的个体相比,无症状个体的中和抗体水平下降得更快,并且水平较低^[45]。在新冠病毒恒河猴感染模型中,血清中 IgG 抗体水平在感染后第 7 天快速上升,在感染后第 14 天达到峰值;中和抗体水平在感染后第 10 天开始迅速上升,在感染后第 15 天左右达到峰值^[6]。监测实验动物血清中抗体水平的变化有助于判断其感染阶段和评估疫苗的免疫保护力。

6.3 固有免疫

固有免疫,即非特异性免疫,包括皮肤、粘膜、血脑屏障、固有免疫细胞等。作为基础保护屏障,虽然不存在病原特异性,但稳定性强,同时涉及到的免疫细胞种类繁多,因此同样具有重要的检测意义。采集黏膜拭子是对固有免疫系统指标监测的最常见途径,同时对相关免疫细胞,如单核-巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等的变化趋势检测也尤为重要。研究发现 SARS-CoV-2 能够侵入大脑并感染脑血管内皮细胞,导致动物模型中的脑损伤,但是病毒如何进入大脑的机制尚未可知^[46]。

7 总结

非人灵长类动物对大多数人类致病性病毒都具有易感性,可以很好地模拟人类感染病毒后的临床症状和病理变化等,非人灵长类动物感染模型对研究疾病的发病机制,疫苗、药物的评价都发挥着非常重要的作用。但是非人灵长类动物繁殖周期长,资源比较稀缺,并且成本高昂,所以选择合适的评价指标以正确评估动物模型是否成功建立,从而获得准确、有效的实验结果才能减少不必要的重复实验。临床表现指标、影像学诊断、血液学指标、病原学指标、病理学指标、免疫学指标对评价新冠病毒非人灵长类动物感染模型的建立具有重要作用。

参考文献:

- [1] Mallah SI, Ghorab OK, Al-Salmi S, et al. COVID-19: breaking down a global health crisis [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1): 35.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版) [J]. 中国实用乡村医生杂志, 2020, 27(3): 4-5.
- [3] 魏强. 动物实验中的生物安全问题 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 75-78.

- [4] Friedman H, Ator N, Haigwood N, et al. The critical role of nonhuman primates in medical research [J]. *Pathog Immun*, 2017, 2(3): 352-365.
- [5] 周小青, 唐成程, 邹庆剑. SARS-CoV-2 易感实验动物研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 128-134.
- [6] Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 268-272.
- [7] 秦川, 魏强, 袁志明, 等. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 动物模型制备指南: GB/Z 39502-2020 [S]. 2020.
- [8] 中国实验动物学会. 人类感染性疾病动物模型评价指南: T/CALAS 30-2017 [S]. 2018.
- [9] Khan AA, Parekh D, Cho Y, et al. Improved prediction of outcome in patients with severe acute pancreatitis by the APACHE II score at 48 hours after hospital admission compared with the APACHE II score at admission. *acute physiology and chronic health evaluation* [J]. *Arch Surg*, 2002, 137(10): 1136-1140.
- [10] Deng H, Li X. AI-Empowered Computational examination of chest imaging for COVID-19 treatment: a review [J]. *Front Artif Intell*, 2021, 4: 612914.
- [11] Xu X, Yu C, Qu J, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47(5): 1275-1280.
- [12] 马培旗, 袁玉山, 张磊, 等. 75 例新型冠状病毒肺炎病人首诊 CT 表现与检验结果分析 [J]. *国际医学放射学杂志*, 2020, 43(2): 127-130.
- [13] Yang A, Liu J, Tao W, et al. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106504.
- [14] Henry BM. COVID-19, ECMO, and lymphopenia: a word of caution [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): e24.
- [15] 孙虹佳, 姚立琼, 张磊, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情下血常规指标 NLR、MLR、MPV 在发热门诊患者筛查中的价值研究 [J]. *甘肃科技*, 2021, 37(11): 168-172.
- [16] 田婧琴, 王寅, 张军, 等. 新型冠状病毒肺炎患者早期血生化指标分析 [J]. *江苏预防医学*, 2020, 31(3): 275-276, 279.
- [17] Bohn MK, Lippi G, Horvath A, et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 58(7): 1037-1052.
- [18] Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 86-98.
- [19] 张礼堃, 邹秉杰, 宋沁馨, 等. PCR 技术在新冠病毒核酸检测中的应用 [J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(5): 539-544.
- [20] Pandey K, Acharya A, Mohan M, et al. Animal models for SARS-CoV-2 research: A comprehensive literature review [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(4): 1868-1885.
- [21] Chandrashekar A, Liu JY, Martinot AJ, et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 812-817.
- [22] 张晓云. 苏木精-伊红染色用于临床病理诊断的价值探究 [J]. *实用医技杂志*, 2021, 28(2): 247-248, 297.
- [23] 秦永亨. 提高免疫组化染色质量的经验总结 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2020, 7(1): 193-198.
- [24] Tian S, Hu W, Niu L, et al. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(5): 700-704.
- [25] Zhang H, Zhou P, Wei Y, et al. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19 [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(9): 629-632.
- [26] Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): 420-422.
- [27] Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction [J]. *Histopathology*, 2020, 77(2): 198-209.
- [28] Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, et al. COVID-19 autopsies, oklahoma, USA [J]. *Am J Clin Pathol*, 2020, 153(6): 725-733.
- [29] Wichmann D, Sperhake JP, Lutgehetmann M, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(4): 268-277.
- [30] Lax SF, Skok K, Zechner P, et al. Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome: results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(5): 350-361.
- [31] Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(2): 120-128.
- [32] Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(5): 517-528.
- [33] Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression [J]. *Lancet*, 2020, 395(10229): 1033-1034.
- [34] 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.
- [35] Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 [J]. *J Infect*, 2020, 80(6): 607-613.
- [36] 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.
- [37] Cleary SJ, Pitchford SC, Amison RT, et al. Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(21): 4851-4865.