

中国实验动物学会实验动物模型鉴定与评价申请表

申请人		薛婧（身份证号码: 11010119830817102X）			
地址		北京市朝阳区潘家园南里 5 号			
联系人	张冬	电话	15738529566	邮箱	zhangdong@cnilas.org
实验动物模型名称		中文：猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠模型			
		英文：CAST/EiJ mice model infected with Mpox virus (MPXV) by intraperitoneal injection			
申报实验动物模型等级		A ☐ B ☒ C ☐			
主要参与人员及单位		薛婧 中国医学科学院医学实验动物研究所 魏强 中国医学科学院医学实验动物研究所 谭文杰 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 丛喆 中国医学科学院医学实验动物研究所 黄保英 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 朱林 中国医学科学院医学实验动物研究所 李娜 中国医学科学院医学实验动物研究所 马建荣 中国医学科学院医学实验动物研究所 侯勇志 中国医学科学院医学实验动物研究所 张冬 中国医学科学院医学实验动物研究所			
摘要（简述模型建立的目的和意义，主要造模方法、与临床的相似度及评价方法，模型的创新点和应用价值） 猴痘（Mpox/Monkeypox）是由猴痘病毒（Monkeypox virus, MPXV）引起的人兽共患传染病。自2020年5月以来在全球131个国家/地区报告了超过1.3万以上的病例，成为令人担忧的全球性问题。考虑到全球威胁，世界卫生组织（WHO）分别于2022年7月23日和2024年8月14日宣布猴痘为国际关注的突发公共卫生事件（PHEIC）。由于缺乏有效疫苗和抗病毒药物，针对猴痘病毒的疫苗和药物研发成为研究热点。当前流行的西非株猴痘病毒感染动物模型是基础研究及疫苗/药物有效性评价的重要工具。本模型选用4-10周龄的CAST/EiJ小鼠，通过腹腔注射西非株猴痘病毒（7.8×10^5 PFU / 1×10^6					

TCID₅₀)，监测小鼠体重、行为等日常指标。于感染后第0、4、7、11、21、28天采集血液、心、肝、脾、肺、肾、脑、肠、胃及淋巴结，检测病毒载量。结果显示，感染后小鼠体表无明显痘斑或皮肤损伤，大体解剖观察到淋巴结和脾脏肿大。病毒载量分析表明，血浆病毒载量于感染后第4天达峰值(10^{5.65} copies/mL)，感染后第4-11天各组织均检测到猴痘病毒DNA，其中第4天的脾脏和肠组织病毒载量最高(达10⁷ copies/μg DNA)。病理分析显示，感染后第4天脾脏存在显著病理损伤，脾脏免疫细胞中B细胞、T细胞、NK细胞及cDCs数量显著增加，而CD4+/CD8+ T细胞比例显著下降。 本模型中，CAST/EiJ小鼠感染猴痘病毒西非株后表现出淋巴结肿大，与临床上猴痘病毒感染者区别于其他痘病毒感染的典型症状一致。此外，模型还观察到脾脏肿大这一重要体征。本模型采用的CAST/EiJ小鼠作为啮齿类易感动物，能有效模拟猴痘病毒感染宿主后的病毒复制和疾病进程，提供较为全面的评价指标，为研究猴痘病毒的致病机制、疫苗及药物评价提供了重要工具。
申请人保证书 本实验动物模型申请人保证：本申请表及本次的动物模型鉴定与评价材料所申报的内容和所附资料均真实、合法；本次动物模型的实验数据均为申请者研究和检测该产品得到的数据。如有不实之处，本申请人愿负相应法律责任，并承担由此造成的一切后果。 申请人(签章) 法定代表人/推荐人(签字) 年 月 日
中国实验动物学会实验动物模型鉴定与评价工作委员会秘书处意见： (签名)： 年 月 日

备注：1. 本表申报内容应填写完整、清楚、不得涂改；
2. 申请人为个人者，需在申请人项下填写个人身份证号码；
3. 填写此表前，请认真阅读有关规定。未按申报要求申报的资料，将不予受理。

中国实验动物学会实验动物模型鉴定与评价工作委员会制

中国实验动物学会实验动物模型研发报告

实验动物模型名称 (中、英文)	猴痘病毒腹腔注射感染CAST/EiJ小鼠模型 CAST/EiJ mice model infected with Mpox virus (MPXV) by intraperitoneal injection		
申请人名称	薛婧		
研究人地址	北京市朝阳区潘家园南里5号		
研究人电话	010-67779771		
主要研究者及单位	薛婧 中国医学科学院医学实验动物研究所 魏强 中国医学科学院医学实验动物研究所 谭文杰 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 丛喆 中国医学科学院医学实验动物研究所 黄保英 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 朱林 中国医学科学院医学实验动物研究所 李娜 中国医学科学院医学实验动物研究所 陈霆 中国医学科学院医学实验动物研究所 马建荣 中国医学科学院医学实验动物研究所 侯勇志 中国医学科学院医学实验动物研究所 张冬 中国医学科学院医学实验动物研究所		
研究起止日期	2023 年 7 月 至 2026 年 6 月		
原始资料的保存地点	北京市朝阳区潘家园南里5号中国医学科学院医学实验动物研究所		
联系人姓名	张冬	15738529566	zhangdong@cnilas.org
一、摘要（简述研究的目的是和意义，主要造模方法、与临床的相似度及评价方法，概述模型的创新点和应用价值） 猴痘（Mpox/Monkeypox）是由猴痘病毒（Monkeypox virus, MPXV）引起的人兽共患传染病。自2020年5月以来在全球131个国家/地区报告了超过1.3万以上的病例，成为令人担忧的全球性问题。考虑到全球威胁，世界卫生组织（WHO）分别于2022年7月23日和2024年8月14日宣布猴痘为国际关注的突发公共卫生事件			

（PHEIC）。由于缺乏有效疫苗和抗病毒药物，针对猴痘病毒的疫苗和药物研发成为研究热点。当前流行的西非株猴痘病毒感染动物模型是基础研究及疫苗/药物有效性评价的重要工具。本模型选用4-10周龄的CAST/EiJ小鼠，通过腹腔注射西非株猴痘病毒（ 7.8×10^5 PFU / 1×10^6 TCID₅₀），监测小鼠体重、行为等日常指标。于感染后第0、4、7、11、21、28天采集血液、心、肝、脾、肺、肾、脑、肠、胃及淋巴结，检测病毒载量。结果显示，感染后小鼠体表无明显痘斑或皮肤损伤，大体解剖观察到淋巴结和脾脏肿大。病毒载量分析表明，血浆病毒载量于感染后第4天达峰值（ $10^{5.65}$ copies/mL），感染后第4-11天各组织均检测到猴痘病毒DNA，其中第4天的脾脏和肠组织病毒载量最高（达 10^7 copies/ μ g DNA）。病理分析显示，感染后第4天脾脏存在显著病理损伤，脾脏免疫细胞中B细胞、T细胞、NK细胞及cDCs数量显著增加，而CD4+/CD8+ T细胞比例显著下降。

本模型中，CAST/EiJ小鼠感染猴痘病毒西非株后表现出淋巴结肿大，与临床上猴痘病毒感染者区别于其他痘病毒感染的典型症状一致。此外，模型还观察到脾脏肿大这一重要体征。本模型采用的CAST/EiJ小鼠作为啮齿类易感动物，能有效模拟猴痘病毒感染宿主后的病毒复制和疾病进程，提供较为全面的评价指标，为研究猴痘病毒的致病机制、疫苗及药物评价提供了重要工具。

二、研究报告正文（可以附件形式编制，编制要点附后）

见附件

猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠模型研发报告

一、动物模型的命名。

猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠模型

CAST/EiJ mice model infected with Mpox virus (MPXV) by intraperitoneal injection

二、研究背景

1. 研究背景

猴痘（Mpox/Monkeypox）是由猴痘病毒（Monkeypox virus, MPXV）感染引起的一种人畜共患传染病。主要表现为高热、头痛、淋巴结肿大以及全身水疱和脓疱，病死率约为1%-10%。猴痘病毒主要分为中非分支或刚果盆地分支（分支I）以及西非分支（分支II），刚果分支与西非分支病毒基因组具有99%序列一致性。[两种毒株的致病性差异显著](#)，刚果分支的病死率高达10%，而西非分支的病死率仅约1%。2022年，猴痘西非株在非猴痘流行国家，如英国、美国、澳大利亚、西班牙、加拿大、瑞典等多个国家引起诸多病例。同年7月，猴痘疫情被世界卫生组织宣布为“国际关注的突发公共卫生事件（PHEIC）”，这是世卫组织向全球发出的最高等级的公共卫生警报。在我国，多个省份和地区也[相继](#)出现猴痘感染病例。

目前针对猴痘病毒疫苗和药物研发成为研究热点，当前流行的西非株猴痘病毒感染的动物模型会成为基础和应用研究的有利工具。在对猴痘病毒的研究中，曾报道多种对猴痘病毒敏感的动物，如松鼠、树松鼠、冈比亚鼠、睡鼠以及各种非人灵长类动物如恒河猴与食蟹猴等^{1,2}。根据对猴痘病毒的敏感性，非人灵长类动物和啮齿类动物常被用于作为猴痘病毒感染的动物模型开展研究。CAST/EiJ 小鼠因其对正痘病毒的易感性强，成为正痘病毒致病机制研究的良好动物模型^{3,4,5}。但目前国内尚无利用 CAST/EiJ 小鼠建立猴痘病毒感染动物模型报道。

2. 研究目的

鉴于当前猴痘病毒疫情严重，[急需研制出稳定有效的动物感染模型](#)来研究猴痘病毒致病机制，[以及评价候选疫苗和药物的有效性](#)。本模型计划利用当前国内流行的猴痘病毒西非株（MPXV Clade IIb），以 CAST/EiJ 小鼠作为猴痘病毒感染动物，通过腹腔注射途径进行攻毒，构建猴痘病毒西非株 CAST/EiJ 小鼠感染模型。

3. 研究意义

构建猴痘病毒西非株 CAST/EiJ 小鼠感染模型的研究意义在于提供一种可重复、可控的动物模型，用于深入研究猴痘病毒的生物学特性、免疫反应机制、以及评估疫苗和治疗药物的有效性与安全性。具体如下：

（1）用于病毒致病机制研究：小鼠模型使研究人员能够深入探讨病毒在体内的传播途径、感染细胞的种类以及引发疾病的具体机制，对揭示猴痘病毒的致病原理，进而开发针对性的治疗策略具有重要意义。

（2）用于免疫反应研究：基于猴痘小鼠模型可以研究宿主对猴痘病毒感染的免疫反应，包括体液免疫和细胞免疫，有助于理解免疫系统如何抵御病毒感染，并指导疫苗的设计，以提高其免疫保护效力。

（3）搭建疫苗和药物的评价平台：小鼠模型为猴痘疫苗和抗病毒药物的初步评估提供了一个高效的实验平台。通过小鼠实验可快速筛选出具有潜力的候选疫苗和药物，为进一步的临床试验提供依据。同时，动物模型还可以用于评估疫苗的长效性、药物的疗效，以及不同剂量和给药方式的效果。

（4）支撑快速反应机制的建立：在突发猴痘疫情时，构建和利用小鼠模型可以迅速评估现有疫苗和药物的应急效果。这有助于公共卫生部门在短时间内做出科学决策，从而控制疫情的蔓延。

（5）用于新疗法的开发和验证：猴痘小鼠模型还可以用于研究新型治疗手段，如基因疗法、免疫疗法等。通过在小鼠模型中的验证，这些创新疗法可以更快进入临床阶段，提供更有效的治疗选择。

参考文献

1. Alakunle, E., Moens, U., Nchinda, G. & Okeke, M.I. Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. *Viruses* **12**(2020).
2. Marennikova, S.S. & Seluhina, E.M. Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection. *Bulletin of the World Health Organization* **53**, 13-20 (1976).
3. Americo, J.L., Moss, B. & Earl, P.L. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models. *Journal of virology* **84**, 8172-8180 (2010).
4. Earl, P.L., Americo, J.L. & Moss, B. Natural killer cells expanded in vivo or ex vivo with IL-15 overcomes the inherent susceptibility of CAST mice to lethal infection with orthopoxviruses. *PLoS Pathog* **16**, e1008505 (2020).
5. Americo, J.L., Earl, P.L. & Moss, B. Virulence differences of mpox (monkeypox) virus clades I, IIa, and IIb.1 in a small animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2220415120 (2023).

三、动物模型的制备方法

1. 病毒毒株

本模型构建过程中使用的病毒毒株为 MPXV-B.1-China-C-Tan-CQ01（猴痘病毒中国重庆分离株），由中国疾病预防控制中心谭文杰教授分离并提供。

2. 实验动物

4-10 周龄的 SPF 级 CAST/EiJ 小鼠，雌雄各半，由中国医学科学院医学实验动物研究所保种并繁育。本实验过程涉及一类病原微生物的动物感染实验，所有操作均在中国医学科学院医学实验动物研究所动物生物安全三级实验室（ABSL-3）中进行。实验动物的使用严格遵循 3R 原则，本实验得到了中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用和管理委员会的批准（批准号：XJ23002）。

3. 实验试剂及仪器

表 1 实验试剂一览表

名称	生产厂家
QIAamp DNA Mini Kit	德国 Qiagen 公司
QIAamp DNA blood Mini Kit	德国 Qiagen 公司
TaqMan® Gene Expression Master Mix	美国 ThermoFisher 公司
PCR 反应引物及探针	美国 Invitrogen 公司
75%酒精	北京通广精细化工公司
0.01M PBS	美国 Hyclone 公司
DEPC Treated Water	白鲨生物科技有限公司
无水乙醇	北京通广精细化工公司
多聚甲醛	北京通广精细化工公司
CD19 抗体	美国 Biolegend 公司
CD3 抗体	美国 ThermoFisher 公司
CD4 抗体	美国 ThermoFisher 公司
CD8a 抗体	美国 ThermoFisher 公司
CD49b 抗体	美国 ThermoFisher 公司
CD11c 抗体	美国 ThermoFisher 公司

表 2 仪器设备一览表

名称	生产厂家
流式细胞仪	美国碧迪公司
II 级生物安全柜	ESCO 生命科学集团
低速冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司
组织研磨仪	广州露卡测序仪器有限公司
Applied Biosystems™ 7500 实时荧光定量 PCR 仪	美国 ThermoFisher 公司
-80℃超低温冰箱	日本 SANYO 公司
微型涡旋混合仪	美国 SCILOGEX 公司
金属浴	大龙兴创实验仪器公司
移液器	德国 Eppendorf 公司
高压灭菌器（TOMY SX-700）	日本 Tomy Digital Biology 公司
IVC 独立通风笼具	意大利 TECNIPLAST 公司
体重秤	广东香山衡器集团股份有限公司
照相机	日本佳能公司
注射器	双鸽医疗器械有限公司
手术器械	上海三友外科器材有限公司

4. 引物和探针

表 3 引物和探针一览表

病毒名称	引物名称	序列（5' → 3'）
猴痘病毒	F3L-F	CTCATTGATTTTTCGCGGGATA
	F3L-R	GACGATACTC CTCCTCGTTGGT
	F3L-P	FAM-CATCAGAATCTGTAGGCCGT-MGB

5. 实验方案

（1）病毒感染：CAST/EiJ 小鼠通过腹腔注射方式接种猴痘病毒，每只小鼠的攻毒量为 7.8×10^5 PFU / 1×10^6 TCID₅₀，感染 1 次。

（2）实验周期：28 天，攻毒当天为 D0。

6. 评价指标

(1) 生存率分析和临床症状观察：CAST/EiJ 小鼠感染猴痘病毒后观察症状，记录小鼠竖毛、皮损、体重和死亡率等。

(2) 取材：攻毒前和攻毒后 4、7、11、21、28 天时，分别对实验组小鼠进行安乐取材（ $n=4$ /时间点），取小鼠血浆、心、肝、脾、肺、肾、脑、直肠、胃、淋巴结，测定病毒载量及病理分析。

(3) 病毒载量检测：对小鼠安乐所取材料进行组织研磨，提取病毒 DNA，并利用实时定量 PCR 进行病毒载量的检测。

(4) 病理分析：小鼠安乐时进行组织取样，10%多聚甲醛固定后进行组织包埋、切片以及苏木精-伊红染色。

(5) 流式细胞检测：取 CAST/EiJ 小鼠的脾脏，研磨过滤收集单细胞，抗体染色后使用 BD FACSAria II 流式细胞仪进行数据采集，FlowJo v10 进行流式数据分析。

(6) 目前尚无针对猴痘的阳性药物，因此暂时无法研究阳性药物对模型指标的证实效应。

(7) 本实验重复两次，结果一致。

四、动物模型的评价与验证

1. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠临床指标观察

CAST/EiJ 小鼠通过腹腔注射感染猴痘病毒之后，分别于第 0、4、7、11、21、28 天时观察小鼠的状态，记录小鼠体重和生存率等信息，并对数据进行差异统计， P 值小于 0.05 认为差异具有统计学意义。结果显示，CAST/EiJ 小鼠感染猴痘病毒后，在 28 天观察周期内，小鼠未出现皮损/痘斑，小鼠体重在感染猴痘病毒的第 7 天内呈现一定程度的增加，随后体重下降（图 1A），但变化均无统计学差异（ $P>0.05$ ）。整个观察期内，小鼠未出现死亡情况（图 1B）。

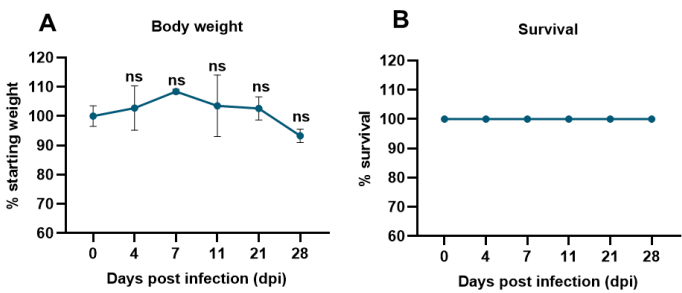


图 1. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠体重与生存率变化

鉴于小鼠感染后体重无显著变化，无明显皮肤损伤/痘斑，也无明显的临床表现或死亡，因此体重变化、临床症状和生存率不作为模型评价指标。

2. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠组织器官病变

对感染猴痘病毒后不同天数（0、4、7、11、21、28）的 CAST/EiJ 小鼠进行安乐取材，并对脾脏、肺脏和淋巴结进行拍照和称重，以评价猴痘病毒感染对小鼠脾脏、肺部与淋巴结形态变化的影响。结果显示在感染猴痘病毒第 4、7、11 天的 CAST/EiJ 小鼠中发现显著的脾肿大现象（图 2A），对肺部没有显著影响（图 2B），与人类感染猴痘病毒一致，CAST/EiJ 小鼠在感染猴痘病毒时出现一定程度的淋巴结（颈部淋巴结）肿大（图 2C）。同时，我们也分析了感染不同天数时（0、4、7、11、21、28）脾脏和肺脏占全身体重的比值。结果显示，与未感染组（感染 0 天）相比，感染猴痘病毒 4 天、7 天和 11 天时 CAST/EiJ 小鼠的脾脏/体重比值显著变大（图 2D， $P<0.001$ ），脾重/体重比值增加 100%以上，而对肺脏重量并无显著的影响（图 2E， $P>0.05$ ）。该研究结果显示猴痘病毒腹腔途径感染的 CAST/EiJ 小鼠有显著的脾肿大病理体征。

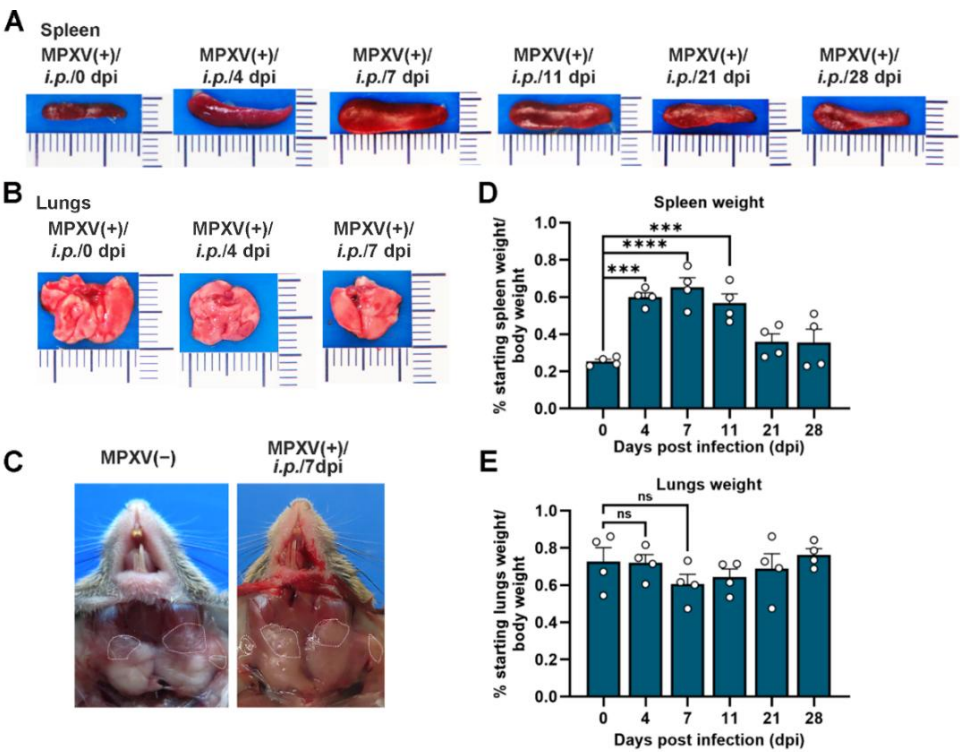


图 2. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠组织器官的变化

鉴于小鼠感染猴痘病毒后脾明显肿大，脾重/体重比值增加 100%以上，因此脾肿大应作为猴痘病毒感染 CAST/EiJ 小鼠模型评价指标之一，证实模型成立的脾肿大指标参数标准为：脾重/体重比值增加 80%以上。

3. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠脾脏病理损伤分析

对感染猴痘病毒第 4 天安乐的 CAST/EiJ 小鼠取脾脏，利用 10%多聚甲醛进行固定，随后进行组织包埋、病理切片，并利用苏木精-伊红染色法（hematoxylin-eosin, HE）进行染色后进行病理分析。组织学分析显示，通过腹腔注射途径感染 MPXV 西非株的 CAST/EiJ 小鼠可产生显著的脾脏病理变化，其特征是白髓生发中心明显、红髓髓外造血增加以及红髓中巨噬细胞浸润显著增加。

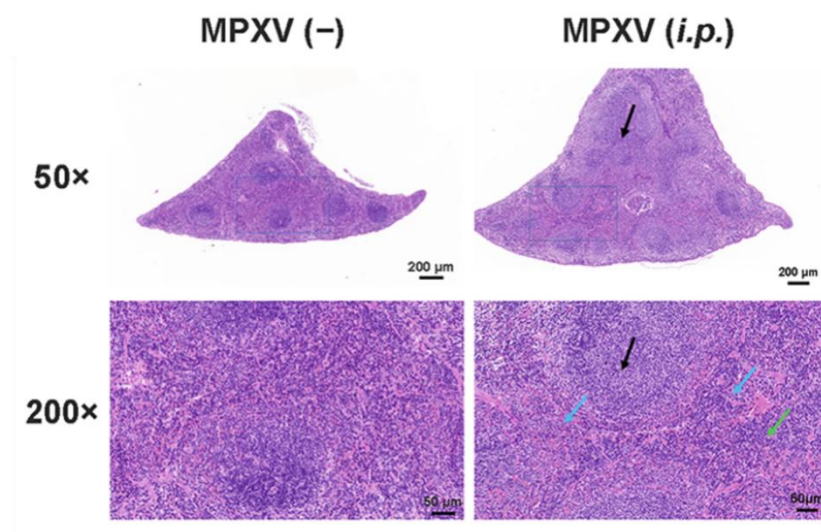


图 3. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠脾脏病理损伤

注：图像以 50 倍（上）和 200 倍（下）的分辨率拍摄。箭头：黑色箭头表示脾脏白髓生发中心明显，蓝色箭头表示红髓中有明显的巨噬细胞浸润，绿色箭头表示红髓髓外造血。

感染后第 4 天的脾脏病理损伤应作为模型评价指标之一，证实模型成立的脾脏病理损伤指标应该为白髓生发中心明显、红髓髓外造血增加以及红髓中巨噬细胞浸润增加。

4. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠病毒血症

在 CAST/EiJ 小鼠感染猴痘病毒后第 0、4、7、11、21、28 天时分别进行安乐取材，取小鼠全血离心获得小鼠血浆，提取血浆病毒 DNA。采用实时荧光定量 PCR 测定 CAST/EiJ 小鼠血浆中的病毒载量。结果显示，CAST/EiJ 小鼠血浆病毒载量在感染后第 4 天达到峰值（5.65 log copies/mL），在感染第 11 天后血浆病毒载量低于检测下限。

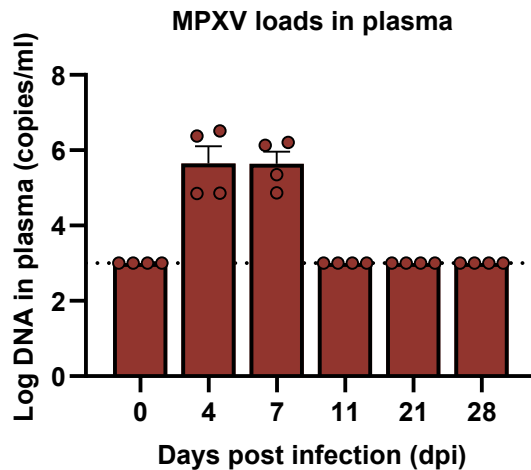


图 4. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠血浆载量变化

感染后第 4 天的血浆病毒载量应作为模型评价指标之一，证实模型成立的血浆第 4 天病毒载量应大于 4.5 log copies/mL。

5. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠组织病毒载量分布情况

在 CAST/EiJ 小鼠感染后的第 0、4、7、11、21、28 天分别进行安乐（n=4/时间点），对各部分组织（心、肝、脾、肺、肾、脑、肠、胃、腹股沟淋巴结）进行组织研磨。对研磨的组织进行猴痘病毒 DNA 的提取，利用猴痘病毒 F3L 基因区段的引物和探针进行病毒载量的测定。结果显示，在各组织脏器中均检测到猴痘病毒 DNA，其载量在感染后第 4 天时最高，在感染 21 天时逐渐降低至检测限。在感染峰值 4 天的各组织中，脾脏和肠道中猴痘病毒载量更高（峰值高达 10^7 copies/ μ g DNA）。

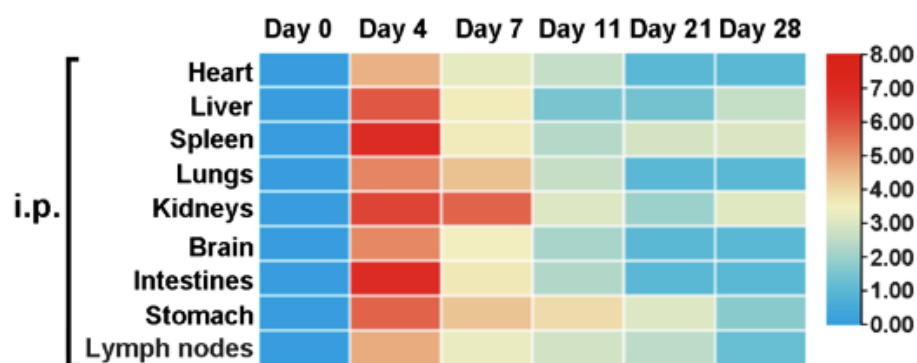


图 5. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠组织病毒载量分布

感染后第 4 天的脾脏病毒载量应作为模型评价指标之一，证实模型成立的脾脏第 4 天病毒载量应大于 6.0 log copies/ μ g DNA。

6. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠脾脏免疫细胞比例变化

我们进一步分析了 CAST/EiJ 小鼠感染猴痘病毒前后脾脏组织中免疫细胞的数量和比例变化。在感染猴痘病毒西非株第 4 天，对安乐的小鼠脾脏进行研磨获取单细胞悬液，并通过流式细胞术分析 B 细胞、T 细胞、NK 细胞和 cDCs 细胞群数量和比例。结果显示，猴痘病毒感染导致脾脏免疫细胞中 B 细胞、T 细胞、NK 细胞和 cDCs 的数量增加。此外，猴痘病毒感染导致脾脏 T 细胞中 CD4⁺ T 细胞比例降低（68.0% vs. 59.3%），CD8⁺ T 细胞比例增加（28.8% vs. 35.5%），并显著降低了 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值。这些结果表明腹腔注射途径感染猴痘病毒的 CAST/EiJ 小鼠可能通过激活脾脏中的免疫细胞比例进而导致小鼠出现脾脏肿大这一特征性病变。

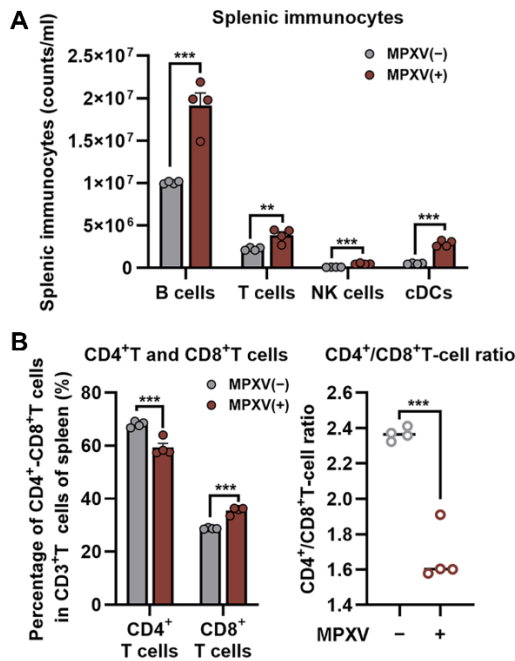


图 6. 猴痘病毒腹腔注射感染 CAST/EiJ 小鼠脾脏免疫细胞群变化

感染后第 4 天的脾脏免疫细胞比例的变化应作为模型评价指标之一，证实模型成立的小鼠感染猴痘病毒第 4 天时脾脏细胞显著增加的 B 细胞、T 细胞、NK 细胞和 cDCs 数量，以及 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值下降。

五、动物模型的生物安全性。

动物模型的制备和应用实验必须在具备相应资质的实验室开展。动物模型的制备、应用过程中的监督管理、处置措施、对环境和生态影响等应符合国家相关法律规定。

1. 猴痘病毒操作实验室条件

根据《人间传染的病原微生物目录》（国卫科教发〔2023〕24 号）分类，猴痘属于一类病原微生物，是一类高致病性病毒。涉及病毒培养、动物感染实验

以及活病毒的样本灭活操作需在 BSL-3 及以上实验室的生物安全柜内进行。灭活样本中的病毒 DNA 提取可在生物安全二级（BSL-2）实验室或 PCR 检测的专门区域或房间进行，严格按照分区操作原则操作（防控技术指南）。本实验中涉及的病毒培养、动物模型感染、安乐、取材及病毒核酸提取等实验均应于动物生物安全三级实验室（ABSL-3）中进行。

2. 实验操作人员防护

实验人员均经过生物安全培训获得证书，实验人员进入动物房之前，穿戴防护服、口罩、帽子、鞋套、手套、防护眼镜等进行防护，整个实验操作均在 ABSL-3 实验室的生物安全柜中进行，实验后将病毒毒株、动物尸体、尿垫等包装好进行高压灭菌处理，注射器放入利器桶处理；实验结束按要求，脱掉防护设备集中处理。

3. 动物模型制备中的风险点及处置措施

（1）实验人员在抓取小鼠时被抓伤或咬伤。抓取小鼠时，应在两层一次性手套外戴一层防咬手套，防止手被抓伤、咬伤；受伤后，立即脱下外层一次性手套，到工作走廊内，摘下内层一次性手套，检查受伤情况，立即挤出伤口处血液，并用大量的 75%酒精喷洒患处。人员从 ABSL-3 实验室出来后，立即向实验室主任和安全负责人报告，情况严重的应到定点医院进行救治。

（2）感染小鼠逃逸造成实验室污染。实验小鼠一旦逃离实验区域，立即确认房门关闭。佩戴防咬手套，用正确的方法抓取，未经过培训的人员不能进行此项操作。污染的区域用 5500mg/L 有效氯溶液擦拭消毒，作用 15 分钟后使用 75%酒精擦拭工作台面和地面，报告实验室主任和安全负责人，填写《事故记录表》。

（3）接种病毒、取血或解剖过程中，病毒、感染小鼠的血液或体液污染实验台面或操作人员手套。此操作应在生物安全柜或负压解剖台中进行，台面铺上一次性的尿不湿。一旦发生污染，用浸透 5500mg/L 有效氯溶液或 75%酒精的纸巾覆盖污染区域，15 分钟后将纸巾放入医疗废物专用包装袋，用新的消毒纸巾重新覆盖污染区域，待实验结束后，用 5500mg/L 有效氯溶液彻底消毒台面，15 分钟后使用 75%酒精擦拭台面，紫外照射。若溅到操作者手套上，则应将外层一次性手套喷 75%酒精消毒后摘除，将其置于医疗废物专用包装袋，换一副新的一次性手套。

（4）感染、取血或取材时，注射器针头、刀片、剪刀等锐器扎伤、割伤手指。使用注射器时，针头不要对人，使用完不能套上针套，要直接弃入利器桶中。解剖过程中可以佩戴防割手套，如受伤应迅速脱去外层一次性手套，到

工作走廊，脱去内层一次性手套，用生理盐水冲洗，如果可能尽量挤出损伤处的血液，禁止进行伤口的局部挤压。打开急救箱，使用 75% 酒精或碘伏消毒。如伤势情况严重立即离开实验室，到定点医院进行医疗处理。报告实验室主任和安全负责人，填写《事故记录表》。

(5) 小鼠组织样本研磨处理过程中造成感染性材料外溢。标本进行研磨时，液体可能从研磨管口溢出或研磨管破裂，污染研磨仪，因此操作过程中，应盖紧研磨仪。如果研磨时研磨仪发生异常，关闭电源并且保持研磨仪盖子关闭 30 分钟使气溶胶沉积。如果研磨仪在使用中未发现异常，但在安全柜中打开研磨罐后发现研磨管漏液或破裂，应立即关闭研磨罐盖子，静置 30 分钟。同时用 75% 的酒精喷洒消毒研磨罐外表面。30 分钟后，小心打开保护盖，向罐内大量喷洒 75% 酒精，关闭研磨罐。30 分钟后，小心打开研磨罐，用镊子夹出研磨管碎片，置医疗废物专用包装袋中高压消毒。未破损的研磨管应放在另一个 5500mg/L 有效氯溶液的容器中消毒外表面后回收。用无腐蚀性消毒液彻底消毒研磨仪，包括研磨仪内壁、研磨轴、研磨卡槽、研磨仪机盖等可能受到污染的区域，要特别注意不光滑表面、沟、逢、槽等地方。再用水清洁并干燥。

(6) 离心时离心管破裂。实验室中离心机为生物安全型，使用时转子和保护盖保持密闭，离心结束后将转子和保护盖整体取出，在生物安全柜中打开，再将离心管取出。离心前，采血管必须严格配平，对角线放置。若离心时离心机发出异常声响，感觉离心管可能发生破裂时，应按下离心机的停止键，使离心机迅速停止转动。关闭电源保持离心机盖子关闭 30 分钟，使气溶胶沉积。如果离心机在使用中未发现异常，但在安全柜中打开保护盖后发现离心管发生了破裂，应立即关闭转子保护盖，静置 30 分钟。同时用 75% 的酒精喷洒消毒转子外表面。30 分钟后，小心打开保护盖，向转子内大量喷洒 75% 酒精，关闭保护盖。30 分钟后，小心打开保护盖，用镊子夹出离心管碎片，置医疗废物专用包装袋中高压消毒。未破损的离心管应放在另一个 5500mg/L 有效氯溶液的容器中消毒外表面后回收。用无腐蚀性消毒液彻底消毒离心机，包括离心机内壁、转子、轴、离心管套桶、离心机盖等可能受到污染的区域，要特别注意不光滑表面、沟、逢、槽等地方。再用水清洁并干燥。

4. 实验废弃物及动物尸体处理

实验结束后小鼠全部进行安乐死，并严格按相关规定处理动物尸体，即在生物安全柜内将感染性动物尸体装入医疗废物专用包装袋，表面喷洒消毒剂后取出，使用高压指示胶带封口，经高压灭菌后转移出实验室，统一存放在动物尸体存放专用冰箱，由专业机构集中回收无害化处理。

5. 本模型制备中依据的相关国家法律规定

- (1) 国家卫生健康委. 猴痘防控技术指南（2022 版）
- (2) 国家卫生健康委. 猴痘诊疗指南（2022 年版）
- (3) 《人间传染的病原微生物目录》（国卫科教发〔2023〕24 号）
- (4) 《中华人民共和国生物安全法》（中华人民共和国主席令第 56 号）
- (5) 《实验室生物安全通用要求》（GB 19489-2008）
- (6) WHO《生物安全手册》第四版（2020）
- (7) 《消毒剂使用指南》国家卫生健康委 2020
- (8) 国家卫生健康委员会《医疗废物分类目录（2021 版）》

六、讨论和结论

总结该模型鉴定和评价的技术方法和指标体系；分析该模型与国内外现有模型的异同；讨论该模型的技术难点、创新性和应用价值。

本模型的鉴定和评价生物技术方法主要为小鼠组织重量称量和实时定量 PCR，指标体系为：小鼠临床指标（体重、死亡率）、组织脏器病变和病理损伤、病毒血症、各组织中第 0、4、7、11、21、28 天的病毒载量以及脾脏免疫细胞群变化。鉴定和评价体系显示，感染猴痘病毒的 CAST/EiJ 小鼠淋巴结和脾脏出现显著肿大。病毒血症在第 4 天时达到峰值，在各组织中也检测到病毒载量，其中在脾脏和肠道中检测到更高的病毒载量。在感染后第 4 天的小鼠脾脏发现显著的病理损伤，以及显著的免疫细胞群变化。

科技查新显示，目前国内尚无猴痘病毒感染 CAST/EiJ 小鼠动物模型的相关报道。国外目前已有 CAST/EiJ 小鼠的猴痘病毒感染模型⁵，本实验与该模型的不同之处在于使用的毒株为我国分离的重庆患者分离株（系统进化上属于西非分支）。

本实验中的技术难点为 CAST/EiJ 小鼠个体较小，生性活泼，因此需要操作人员技术娴熟，避免小鼠逃逸和死亡的情况。CAST/EiJ 作为多种病毒的易感模型，对猴痘病毒也具有高易感性，可以模拟猴痘病毒的感染及宿主的免疫过程，为猴痘药物/疫苗的评价及猴痘病毒致病机制的研究提供有力的研究工具。

七、有助于动物模型鉴定和评价的其它材料

其它有助于评价的材料，包括第三方应用机构的证明、在行业一流学术刊物上发表学术论文和引用情况等材料。详细材料以附件形式一并提交。