

## 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：猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型		
	英文：Non-human primates model infected with Mpox virus (MPXV) by intravenous injection		
申报实验动物模型等级	A <input type="checkbox"/> B <input checked="" type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/>		
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 张冬 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 张京京 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 陆佳涵 中国医学科学院医学实验动物研究所		
<p>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）</p> <p>猴痘（Mpox/Monkeypox）是由猴痘病毒（Monkeypox virus, MPXV）引起的一种人兽共患传染病。2022年全球多地爆发的猴痘疫情引发广泛关注。当前，针对猴痘病毒的疫苗和药物研发是研究热点，而西非株猴痘病毒感染的动物模型是基础与应用研究的重要工具。</p> <p>本模型采用非人灵长类动物中国恒河猴（Rhesus macaques）和食蟹猴（Cynomolgus monkey），通过静脉注射感染西非株猴痘病毒，监测体温、体重、痘斑数量等指标，并在攻毒前后不同时间点采集血液样本，检测外周血病毒载量、细胞因子、炎症标志物及中和抗体水平变化。感染后第10天，部</p>			

分动物实施安乐死，解剖取材进行组织病毒载量检测和病理分析。结果显示，感染猴痘病毒后，实验猴体重保持相对稳定，体温在感染初期略有波动。感染后第7天，实验猴皮肤出现痘斑，第10天痘斑数量达峰值，主要分布于四肢、脚底和面部。恒河猴和食蟹猴血浆病毒载量分别在攻毒后第10天和第7天达到高峰（恒河猴： $10^{7.5}$  copies/mL；食蟹猴： $10^{6.4}$  copies/mL）。感染后第10天，各组织均可检测到猴痘病毒，其中皮损部位病毒载量最高，并伴明显病理损伤。恒河猴血清中多种细胞因子和炎症标志物水平显著升高，表明感染引发强烈炎症反应。此外，恒河猴血清中针对猴痘病毒的中和抗体于感染后第10天开始产生，第28天达到峰值（1:100），至第180天仍可检测到一定水平的中和抗体。

本模型作为西非株猴痘病毒的非人灵长类动物感染模型，能较好模拟人类感染后的疾病进程和病理特征，为研究西非株猴痘病毒的致病机制、免疫逃逸及疫苗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)	猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型 Non-human primates model infected with Mpox virus (MPXV) by intravenous 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 张冬 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 张京京 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 陆佳涵 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
<p>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）</p> <p>猴痘（Mpox/Monkeypox）是由猴痘病毒（Monkeypox virus, MPXV）引起的一种人兽共患传染病。2022年全球多地爆发的猴痘疫情引发广泛关注。当前，针对猴痘病毒的疫苗和药物研发是研究热点，而西非株猴痘病毒感染的动物模型是基础与应用研究的重要工具。</p>			

本模型采用非人灵长类动物中国恒河猴（*Rhesus macaques*）和食蟹猴（*Cynomolgus monkey*），通过静脉注射感染西非株猴痘病毒，监测体温、体重、痘斑数量等指标，并在攻毒前后不同时间点采集血液样本，检测外周血病毒载量、细胞因子、炎症标志物及中和抗体水平变化。感染后第10天，部分动物实施安乐死，解剖取材进行组织病毒载量检测和病理分析。结果显示，感染猴痘病毒后，实验猴体重保持相对稳定，体温在感染初期略有波动。感染后第7天，实验猴皮肤出现痘斑，第10天痘斑数量达峰值，主要分布于四肢、脚底和面部。恒河猴和食蟹猴血浆病毒载量分别在攻毒后第10天和第7天达到高峰（恒河猴： $10^{7.5}$  copies/mL；食蟹猴： $10^{6.4}$  copies/mL）。感染后第10天，各组织均可检测到猴痘病毒，其中皮损部位病毒载量最高，并伴明显病理损伤。恒河猴血清中多种细胞因子和炎症标志物水平显著升高，表明感染引发强烈炎症反应。此外，恒河猴血清中针对猴痘病毒的中和抗体于感染后第10天开始产生，第28天达到峰值（1:100），至第180天仍可检测到一定水平的中和抗体。

本模型作为西非株猴痘病毒的非人灵长类动物感染模型，能较好模拟人类感染后的疾病进程和病理特征，为研究西非株猴痘病毒的致病机制、免疫逃逸及疫苗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

# 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型研发报告

## 一、动物模型的命名

猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型

Non-human primates model infected with Mpox virus (MPXV) by intravenous injection

## 二、研究背景

### 1. 研究背景

2022年在全球多个国家爆发的猴痘疫情引起广泛关注，世界卫生组织宣布其为“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。

猴痘（Mpox/Monkeypox）是由猴痘病毒（Monkeypox virus, MPXV）感染引起的一种人兽共患传染病。主要表现为高热、头痛、淋巴结肿大以及全身水疱和脓疱。系统进化分析显示，猴痘病毒主要分为中非或刚果盆地分支（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。刚果分支的病死率高达10%，而西非分支的病死率仅为1%。2022年引起广泛流行的猴痘病毒经鉴定为西非分支IIB毒株，其致病性相对较弱。

目前猴痘尚无针对性的疫苗和药物，临床上治疗手段主要采取对症治疗，针对疫苗和药物的研发成为研究热点，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，曾报道了多种对猴痘病毒敏感的动物，如松鼠、冈比亚鼠、睡鼠以及各种非人灵长类动物如恒河猴（*Rhesus macaques*）与食蟹猴（*Cynomolgus monkeys*）等<sup>1,2</sup>。而其中的非人灵长类动物（恒河猴与食蟹猴）由于与人类亲缘关系较近，能更加相近地模拟人类感染猴痘病毒的真实病症，因此成为研究猴痘病毒的良好动物模型。目前国外研究团队已经报道了猴痘病毒刚果分支的恒河猴感染模型，并用于猴痘疫苗的评价<sup>3-5</sup>。国内目前尚无西非分支猴痘病毒感染恒河猴及食蟹猴模型报道。

### 2. 研究目的

鉴于当前猴痘病毒疫情严重，急需非人灵长类动物模型研究病毒感染与宿主免疫反应机制、评价疫苗和药物，推动防治策略向临床转化。本研究针对当

前国内流行株猴痘病毒西非株（MPXV Clade IIb），以恒河猴和食蟹猴为研究对象，通过静脉注射途径进行攻毒，构建猴痘病毒感染非人灵长类动物模型。

### 3. 研究意义

构建猴痘非人灵长类动物模型在疫情防治中的意义主要体现在以下 4 个方面：

（1）进行疫苗和药物的有效性评估：猴痘非人灵长类动物模型可以模拟人类感染的症状和病程，从而准确评价疫苗和药物的有效性，在较短时间内获得疫苗和药物的有效性和安全性数据，为快速应对疫情提供技术支持。

（2）探索病毒传播机制：非人灵长类动物模型还可以用于研究猴痘病毒的传播机制，了解病毒在不同条件下的传播模式，有助于制定更有效的防控策略，减少病毒的传播风险。

（3）进行安全性评估：除了评估有效性，非人灵长类动物模型也是评估疫苗和药物安全性的重要工具。通过对动物模型干预后的检测，可提前发现潜在的副作用或不良反应，从而优化产品的安全性，为临床试验奠定基础。

（4）为临床试验提供基础数据：动物模型提供的实验数据可以为人类的临床试验设计提供重要参考，如剂量选择、给药途径等，制定个性化的防治方案。

### 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. Zuiani, A., *et al.* A multivalent mRNA monkeypox virus vaccine (BNT166) protects mice and macaques from orthopoxvirus disease. *Cell* **187**, 1363-1373.e1312 (2024).
4. Aid, M., *et al.* Mpox infection protects against re-challenge in rhesus macaques. *Cell* **186**, 4652-4661 e4613 (2023).
5. Jacob-Dolan, C., *et al.* Comparison of the immunogenicity and protective efficacy of ACAM2000, MVA, and vectored subunit vaccines for Mpox in rhesus macaques. *Science translational medicine* **16**, ead14317 (2024).

### 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提供。

#### 2. 实验动物

中国恒河猴 6 只，雌雄各半，食蟹猴 3 只，均为雄性，年龄为 3-5 岁。

动物的使用及其相关操作，经过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（IACUC）批准，IACUC 批准号为 XJ23004。本研究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。

#### 3. 实验试剂及仪器

表 1 实验试剂一览表

试剂名称	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
0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）	美国 Hyclone 公司
DEPC 水	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
舒泰 50	法国维克公司
ELLA 检测芯片	ProteinSimple 公司
NHP ProcartaPlex 8-Plex Plate	美国 ThermoFisher 公司
Monkey CRP SimpleStep ELISA® Kit	英国 Abcam 公司
Monkey serum amyloid A1 (SAA1) ELISA Kit	武汉华美生物

表 2 仪器设备一览表

试剂名称	生产厂家
生物安全柜	ESCO 生命科学集团
低速冷冻离心机	美国贝克曼库尔特公司
组织研磨仪	广州露卡测序仪器
Applied Biosystems™ 7500 实时荧光定量 PCR 仪	美国 Thermo 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
注射器	双鸽医疗器械有限公司
采血管	碧迪医疗器械有限公司
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) 猴痘病毒攻毒：通过静脉注射方式对实验猴进行猴痘病毒感染，接种剂量恒河猴为  $4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/只/次，食蟹猴为  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/只/次，每只实验猴接种 1 次。

(2) 实验周期：共 180 天，攻毒当天为 D0。于攻毒后 10 天 (D10) 安乐 3 只恒河猴和 3 只食蟹猴。剩余 3 只恒河猴继续观察到 180 天 (D180)。

#### 6. 评价指标

(1) 一般临床观察：在实验期间，每天观察记录动物的一般症状。在攻毒前和攻毒后第 1、4、7、10、14、21、28 和 35 天持续监测动物的体重和体温变化。

(2) 临床出痘数：攻毒前和攻毒后第 1、4、7、10、14、21、28 和 35 天对所有组存活动物进行痘斑数量观察和统计。

(3) 病毒载量检测：攻毒前和攻毒后第 1、4、7、10、14、21、28 和 35 天采集血样，提取感染猴血浆中的猴痘病毒 DNA，利用实时荧光定量 PCR 检测血浆病毒载量。

攻毒后第 10 天 (D10) 安乐 3 只恒河猴和 3 只食蟹猴，取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、腹股沟淋巴结、回肠、结肠、睾丸、皮损等部位进行猴痘病毒组织载量检测。

(4) 病毒滴度测定：攻毒后 10 天，取恒河猴和食蟹猴皮肤痘斑，加入 DMEM 培养基研磨成悬液，反复冻融三次后离心取上清，梯度稀释后噬斑法测定病毒滴度。

(5) 细胞因子和炎症标志物检测：取攻毒后 10 天的恒河猴血清 56℃30 分钟灭活，利用 ELISA 和基于 ELISA 的微流控系统 (Ella) 检测血清中细胞因子和炎症标志物水平。

(6) 中和抗体检测：取攻毒前 D0 和攻毒后 10、28、56、120、180 天恒河猴血清，利用噬斑法检测血清中针对猴痘病毒的中和抗体效价。

(7) 病理分析：攻毒后 10 天安乐的实验猴皮损组织进行固定、包埋和切片，并进行 HE 染色和病理结果分析。

(8) 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。

(9) 本实验重复两次，结果一致。

#### 四、动物模型的评价与验证

##### 1. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物临床指标观察

恒河猴感染猴痘病毒期间体温在 38-41℃ 范围内波动。除感染后第 4 天，部分恒河猴体温较感染后第 1 天有所升高外 ( $P < 0.05$ )，没有明显规律性变化，波动较平稳 (图 1A、1D)。食蟹猴感染猴痘病毒期间体温在 37-39℃ 范围内变化。除一只动物有一定小幅波动外，其他两只动物基本无变化 (图 1G)。

恒河猴和食蟹猴体重在猴痘病毒感染期间保持在 -10%~10% 范围内波动，整体体重指标变化平稳 (图 1B、1E 和 1H)。

此外，在观察周期内，恒河猴及食蟹猴均未出现死亡（图 1C、1F 和 1I）。

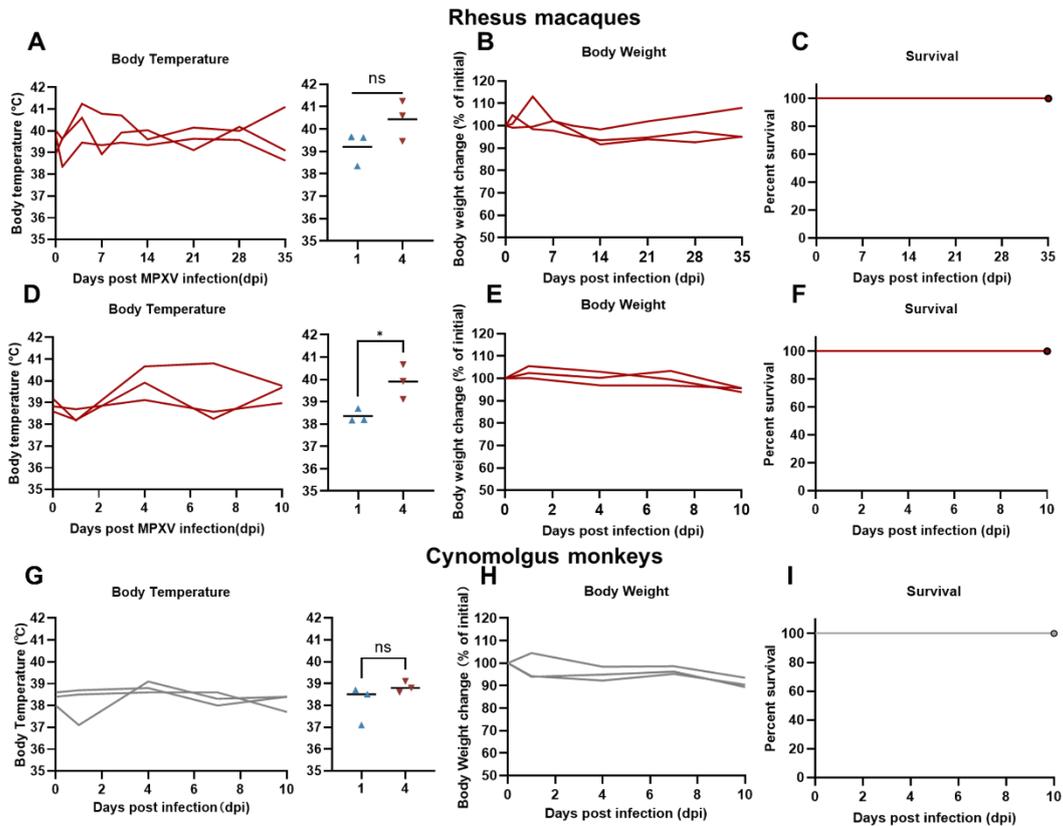


图 1. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物临床指标变化

注：A-C 猴痘病毒感染后长期观察的 3 只恒河猴的体温、体重及生存数据；D-F 猴痘病毒感染后 10 天安乐的 3 只恒河猴体温、体重及生存数据；G-I 猴痘病毒感染的食蟹猴体温、体重及生存数据。

鉴于实验猴感染猴痘病毒后，体重和体温整体变化不明显，动物未出现死亡，因此体重变化、体温变化和生存率不作为模型评价指标。

## 2. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型出痘结果

恒河猴和食蟹猴在感染猴痘病毒第 7 天时皮肤表面出现痘斑，第 10 天痘斑数达到峰值，主要集中在感染猴的四肢、足底、面部和臀部等部位（图 2A，2B），在感染 14 天时痘斑数逐渐减少，并在感染 21 天时恢复正常，痘斑消失。

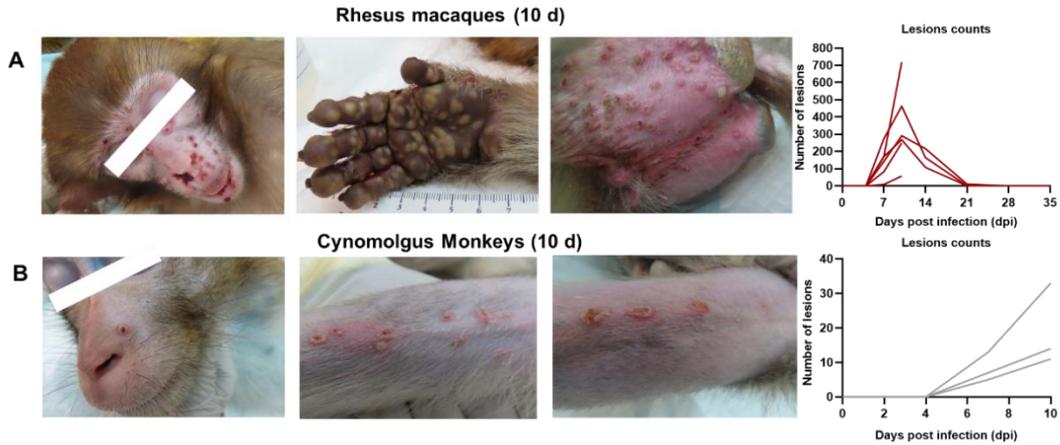


图 2. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物痘斑情况

注：A 猴痘病毒感染的恒河猴皮肤痘斑情况；B 猴痘病毒感染的食蟹猴皮肤痘斑情况。

鉴于实验猴在感染猴痘病毒 7 天时皮肤表面出现痘斑，并在感染 10 天时痘斑数量达到峰值，因此痘斑应作为猴痘病毒感染非人灵长类动物模型评价指标之一。证实模型成立的痘斑指标参数标准为：感染后 10 天左右，即痘斑峰值大于 10 个。

### 3. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型血浆病毒载量变化

恒河猴感染猴痘病毒后，血浆病毒载量逐渐升高，在第 10 天达到峰值，平均约为  $10^{7.5}$  copies/mL，随后逐渐下降，并在 28 天至 35 天转为阴性。食蟹猴感染后，血浆病毒载量也是逐渐升高，在感染后第 7 天病毒载量达到峰值，平均约为  $10^{6.4}$  copies/mL（图 3A，3B）。这些结果表明非人灵长类动物感染猴痘病毒后具有显著的病毒血症。

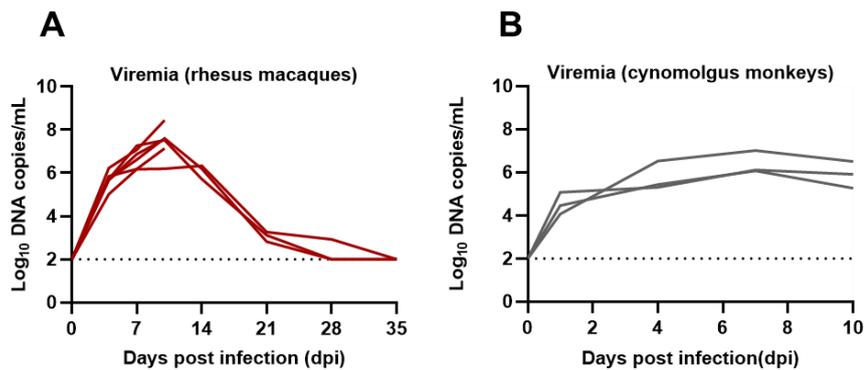


图 3. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类病毒血症

注：A 猴痘病毒感染的恒河猴病毒血症变化；B 猴痘病毒感染的食蟹猴病毒血症变化。

实验猴感染猴痘病毒后，出现明显的病毒血症，因此血浆病毒载量应作为模型评价指标之一，血浆病毒载量峰值出现在感染后第 7-14 天，应大于  $10^{5.0}$  copies/mL。

#### 4. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型组织病毒载量和痘斑病毒滴度结果

感染猴痘病毒 10 天后，恒河猴及食蟹猴的多组织器官中均可检测到猴痘病毒 DNA 的存在，包括心、肝、脾、肺、肾、痘斑、腹股沟淋巴结、回肠、结肠、睾丸。其中在痘斑部位检测到的病毒量最高（载量均值高于  $10^{7.0}$  copies/ $\mu$ g DNA，病毒滴度均值大于  $10^{6.0}$  PFU/g）。除此以外，恒河猴腹股沟淋巴结（ $10^{5.69}$  copies/ $\mu$ g DNA）、食蟹猴的脾脏（ $10^{5.18}$  copies/ $\mu$ g DNA）和睾丸（ $10^{5.62}$  copies/ $\mu$ g DNA）也显示出较高的病毒载量（图 4A、4B 和 4C）。

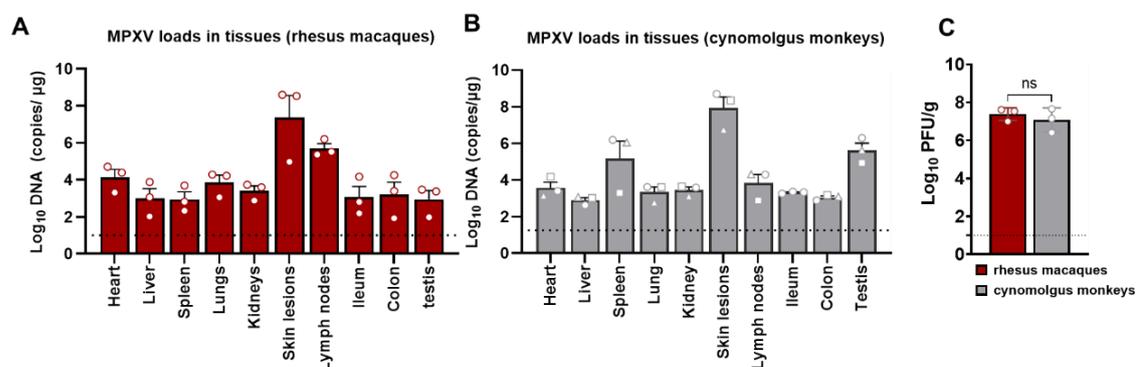


图 4. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物感染后 10 天组织病毒载量和痘斑病毒滴度结果

注：A 猴痘病毒感染恒河猴组织病毒载量；B 猴痘病毒感染食蟹猴组织病毒载量；C 猴痘病毒感染恒河猴和食蟹猴痘斑病毒滴度结果。

感染后第 10 天的皮损部位病毒载量应作为模型评价指标之一，证实模型成立的皮损部位第 10 天病毒载量应大于  $10^{4.0}$  copies/ $\mu$ g DNA。

#### 5. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型血清细胞因子和炎症标志物检测结果

恒河猴感染猴痘病毒 10 天时体内细胞因子和炎症因子，如 CXCL10、CCL5、IFN  $\gamma$ 、IL-6、CRP、SAA1 等的表达水平显著升高，表明体内的高炎症反应。GDF-15 的升高提示组织修复或损伤修复机制启动。

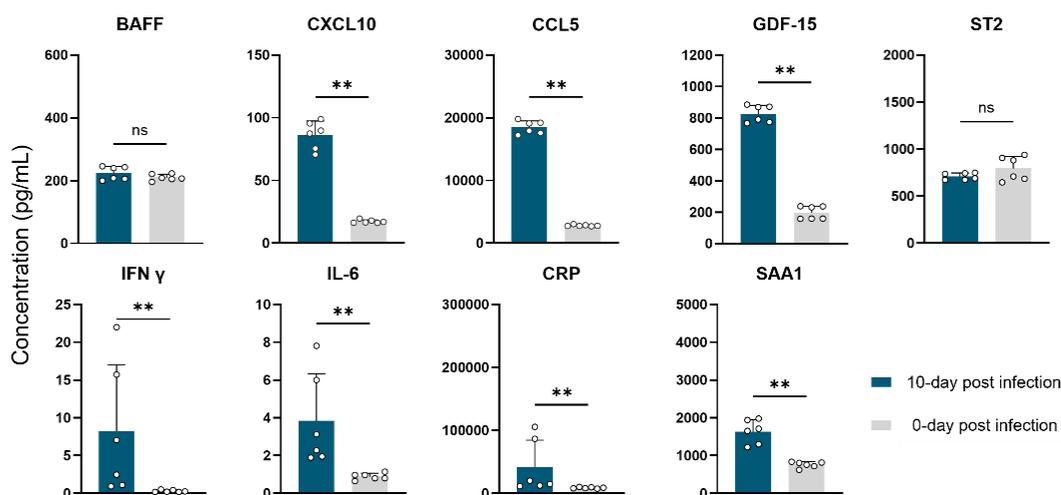


图 5. 猴痘病毒感染非人灵长类动物 10 天时血浆中细胞因子和炎症因子水平

猴痘病毒感染后血清细胞因子和炎症因子水平应作为模型评价的指标之一。典型表现为：感染后第 10 天的多种血清细胞因子和炎症因子的显著升高。

## 6. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型血清中和抗体水平变化

恒河猴在感染猴痘病毒 10 天时，血清中开始检测到针对猴痘病毒的特异性中和抗体，随后逐渐升高，并在感染第 28 天时到达峰值（约为 100 NT<sub>50</sub>），随后，中和抗体水平逐渐下降，至感染后 180 天时，中和抗体仍能保持一定水平。

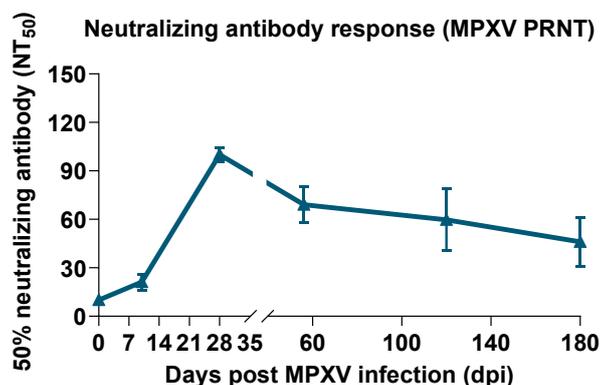


图 6. 猴痘病毒感染非人灵长类动物血清中和抗体水平

非人灵长类动物感染猴痘病毒后，血清中针对猴痘病毒的特异性中和抗体水平应作为模型评价的指标之一。典型表现为：感染后第 28 天血清中猴痘病毒特异性中和抗体高于 50 NT<sub>50</sub>。

## 7. 猴痘病毒静脉注射感染非人灵长类动物模型病理分析

在猴痘病毒感染第 10 天对实验猴进行安乐取材，将皮损部位进行固定、包埋、切片和 HE 染色，并进行病理分析。结果显示，恒河猴和食蟹猴的皮损处的组织结构均显示表皮不完整，损伤处可见坏死组织碎片及粒细胞、真皮层少量胶原纤维坏死，伴有少量以淋巴细胞与粒细胞为主的炎性细胞浸润，损伤边缘可见较大范围棘细胞层数增加。血管周围轻度或较大范围水肿，结缔组织排列疏松（图 7）。病理结果显示猴痘感染的非人灵长类动物具有典型的皮肤病理损伤。

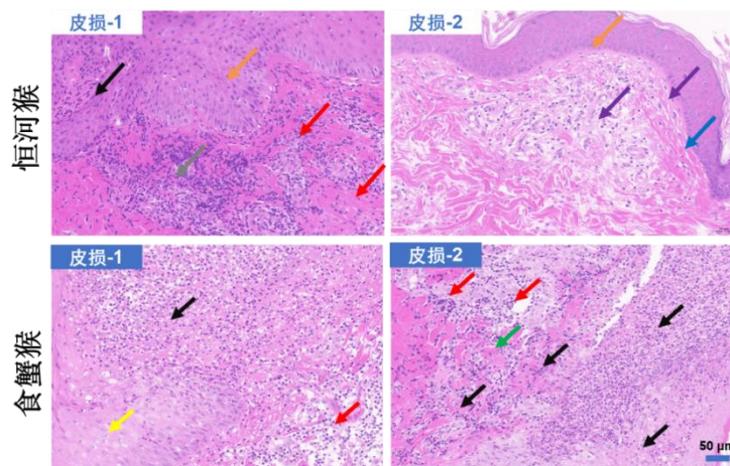


图 7. 猴痘病毒感染非人灵长类模型皮肤损伤病理分析结果（×200）

感染后第 10 天的皮肤病理损伤应作为模型评价指标之一。典型病理表现为：表皮不完整、炎细胞浸润和棘细胞层数增加。

## 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、手套、鞋套、防护面罩等进行防护，整个实验操作均在 ABSL-3 实验室的负压安全柜或生物安全柜中进行，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) 实验人员被病毒感染后的猴抓伤或咬伤。**猴咬伤和抓伤实验人员可能在实验人员猴饲养或麻醉猴时发生。麻醉猴时需要两位实验人员配合操作，操作前应在两层一次性手套外戴一层防咬手套，一名实验人员双手各握一侧推拉杆，缓慢拉出推拉杆，将实验猴固定在猴笼门和推拉挡板之间，保持稳定。另一名实验人员手持舒泰 50 注射器，进行注射。注射部位为实验猴臀部或大腿肌肉。在饲养猴和清理猴排泄物时防止猴抓咬。如被抓伤、咬伤，立即脱下外层手套，到工作走廊内，摘下内层手套，查看受伤情况。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处置。

**(2) 猴接种病毒的暴露。**猴痘病毒感染动物，在操作过程中病毒暴露，可能污染动物体表、操作人员手套或操作台面。因此此操作应在负压解剖台中进行，台面铺上一次性的尿不湿。一旦发生污染，用 75%的酒精喷洒污染动物体表或台面，实验后用 5500mg/L 有效氯溶液擦拭台面。若污染到操作者一次性手套上，则应将外层一次性手套喷 75%酒精消毒后摘除，将其置于医疗废物袋中，换一副新的一次性手套。

**(3) 感染病毒后的猴的唾液、血液、排泄物溅到工作人员的面部或皮肤上。**解剖感染猴时，实验人员应戴一次性面罩或正压头罩，防止感染物溅到实验人员面部和皮肤上。如感染物溅到防护服上应使用 75%的酒精喷洒消毒，必要时更换面罩、手套和防护服。

**(4) 猴逃逸造成实验室污染。**实验动物一旦逃逸，可造成病原微生物的扩散，后果严重。猴实验结束后要确认猴笼已经锁好。实验用猴一旦逃离猴笼或在实验情况下逃脱，立即确认关闭房门，防止猴逃离动物实验室，并立即通知课题负责人和实验室主任。确定有经验人员进行捕捉，应尽可能将猴控制在局部区域，用捕猴网捕捉。捕捉后用力固定，另一人注射麻醉剂麻醉动物。人员一定尽力远离猴头部避免被咬伤。待确认动物完全麻醉后，打开捕捉网敏捷地把上肢反背取出动物放入猴笼，污染的区域用 75%酒精或 5500mg/L 有效氯溶液消毒，报告实验室主任和安全负责人，填写《事故记录表》。

**(5) 采样时注射器针头扎伤、病理取材时手术刀割伤或修块时刀片割伤手指。**注射器使用时针头不要对准自己和别人，使用完不能套上针套，要直接弃入利器桶中。病理取材时使用的刀片要直接弃入利器桶中，修块时要戴防割手套，用镊子夹取组织。一旦出现扎伤和割伤应迅速脱去外层手套，到工作走廊，脱去内层手套，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》。

**(6) 动物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有效氯含量为 0.55% 的 84 消毒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。注意清洁时使用的所有材料均按感染性废物处理。消毒完毕后，填写《事故记录表》。

**(7) 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，置可高压灭菌型生物废物垃圾袋中高压消毒。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。注意清洁时使用的所有材料均按感染性废物处理。消毒完毕后，填写《事故记录表》。

#### 4. 实验废弃物及动物尸体处理

实验结束后实验动物全部进行安乐死，并严格按相关规定处理动物尸体，即在负压解剖台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冰柜，称重登记，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体重体温测量、实时定量 PCR、病理切片、ELISA 以及噬斑实验，指标体系为：临床指标观察（体温、体重、死亡率）、皮肤损伤痘斑监测、病毒血症、组织病毒载量分布、HE 病理分析、细胞因子和炎症标志物水平、中和抗体效价。鉴定和评价体系显示，感染猴痘病毒的恒河猴和食蟹猴皮肤表面出现损伤。恒河猴和食蟹猴病毒血症最高达  $10^8$  copies/mL。在安乐后的猴各组织部位均检测到猴痘病毒，其中皮损部位病毒载量最高。病理分析结果显示皮肤表现出明显的病理损伤。在感染后第 10 天，恒河猴血清中多种细胞因子和炎症标志物表达水平显著升高。恒河猴血清中猴痘病毒特异性中和抗体效价在感染后第 28 天达到峰值，并在感染后第 180 天时仍能检测到一定的猴痘病毒特异性中和抗体。

科技查新显示，目前国内尚无猴痘病毒感染恒河猴和食蟹猴动物模型的相关报道。国外目前已有相关的猴痘病毒感染模型及疫苗评价的报道<sup>3-5</sup>，本实验与国外报道模型的不同之处在于感染猴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），并且使用中国本土的恒河猴和食蟹猴进行猴痘病毒感染建模。

本实验中的技术难点为恒河猴和食蟹猴个体较大，其生性较为活泼，因此需要操作人员技术娴熟，避免在猴子饲养和排泄物处理时被咬伤和抓伤，同时需要防止猴逃逸和排泄物的污染。本模型是国内首个猴痘病毒非人灵长类动物感染模型，由于其与人类具有较高亲缘性，可以最大程度模拟猴痘病毒的感染人的症状及其体内的免疫过程，为猴痘药物/疫苗的评价及猴痘病毒致病机制的研究提供可靠的研究工具。

## **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。