

ICS 65.020.30
CCS B44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS xxx-202x

实验动物 甲型流感动物模型制备与 评价规范

Laboratory animal - Preparation and Evaluation of Influenza A animal
models

（征求意见稿）

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国实验动物学会归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本文件由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本文件起草单位：中国医学科学院医学实验动物研究所、中国科学院武汉病毒研究所、首都医科大学附属北京儿童医院。

本文件主要起草人：鲍琳琳、姚艳丰、许黎黎、吕琦、戚菲菲、徐燕峰、李枫棣、赵文杰、邓然、梁徐健。

实验动物 甲型流感动物模型制备与评价规范

1 范围

本文件规定了甲型流感动物模型制备与评价的技术要求，涵盖生物安全风险控制、人员培训、动物质量控制、动物模型类型、动物麻醉、动物感染、模型症状观察、病原学检测（病毒检测、核酸检测）、血清学检测（血凝抑制试验）、病理组织学检测及模型判定。

本文件适用于甲型流感病毒感染小鼠、金黄地鼠、禽类（鸡）、雪貂和恒河猴动物模型的制备和评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件。不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 14925-2023 实验动物 环境及设施

GB14922-2022 实验动物 微生物寄生虫学等级与监测

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

GB/T 43051-2023 实验动物 动物实验生物安全通用要求

GB/T 39760-2021 实验动物 安乐死指南

GB/T 39646-2020 实验动物 健康监测总则

GB/T 35892-2018 实验动物 福利伦理审查指南

GB/T17999.1-2008 SPF鸡微生物学监测第1部分：SPF鸡微生物学监测总则

RB/T 173-2018 动物实验人道终点评审指南

DB32/T 2731.3-2015 实验用雪貂第3部分：遗传、微生物和寄生虫控制

人间传染的病原微生物目录（国家卫生健康委，2023年）

病原微生物实验室生物安全管理条例（国务院令第 424 号）

WHO information for the molecular detection of influenza viruses（2024年8月修订版）

3 术语和定义

规范性引用文件界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

甲型流感动物模型 Influenza A animal models

用甲型流感病毒人工感染动物，使其产生与人类流感相似病理和临床表现的疾病动物模型。

3.2

独立通风笼具 individually ventilated cages IVC

指以饲养盒为单位的实验动物饲养设备。空气经过高效过滤器处理后分别送入各独立饲养盒，使饲养盒保持一定压力和洁净度，以避免环境污染动物或动物污染环境。

3.3

血凝试验 hemagglutination test

流感病毒颗粒表面的血凝素蛋白，具有识别红细胞表面受体并使红细胞凝集的特性。利用这种特性设计的实验称血凝试验。

3.4

血凝抑制试验 hemagglutination inhibition test

基于特异性抗体与病毒血凝素结合后，阻止其与红细胞结合，从而抑制血凝现象的实验。

3.5

苏木精-伊红染色 Hematoxylin-Eosin Staining, H&E 染色

是组织学与病理学常规染色方法。苏木精为碱性染料，使细胞核内的染色质与细胞质内的核糖体着紫蓝色。伊红为酸性染料，使细胞质和细胞外基质中的成分着红色。通过两种染料的对比染色，可清晰观察细胞的形态结构和组织的病理改变。

4 生物安全风险控制与人员要求

生物安全风险控制与人员管理的具体要求见附录 A。

5 模型制备要求

5.1 实验动物福利伦理要求

甲型流感动物模型制备的饲养与实验方案，须经实验依托单位实验动物管理与使用委员会（IACUC）审查批准后方可实施。操作应符合 GB/T 35892 的审查要求。

5.2 动物质量控制要求

5.2.1 动物基本要求

应选用背景清晰的实验动物，背景信息包括物种、品系、遗传背景与来源、年龄、性别、微生物与寄生虫监测级别、转运记录等。常规甲型流感动物模型制备的动物选择宜符合表 1 要求，特殊模型制备可根据研究目的调整。

表 1 甲型流感动物模型制备背景要求

种类	年龄	性别	体重	微生物和寄生虫级别
小鼠（BALB/c）	4~6 周龄	雌性	13~15g	SPF 级
金黄地鼠	6~8 周龄	雌性	80~100g	SPF 级
鸡（白来航鸡）	4~6 周龄	/	400~600g	SPF 级
雪貂	4~12 月龄	/	1000~1500g（雄），800~1200g（雌）	实验用
恒河猴	3~5 岁	/	5~8kg（雄），4~7kg（雌）	SPF 级

注：小鼠、金黄地鼠推荐选用雌性，其行为更稳定，可规避雄性攻击性干扰。“/”为不做要求。

5.2.2 动物饲养

动物饲养环境同时符合 GB 19489-2022 和 GB 14925-2023 的要求。

- a) 小鼠、金黄地鼠饲养于独立通风笼具（IVC）。
- b) 恒河猴饲养于猴负压饲养柜、雪貂和鸡饲养于猴负压柜中饲养笼中。
- c) 保障动物饮水与饲料供给，按规范开展笼具清洁。

5.2.3 动物微生物的检测

a) 实验动物符合国家标准 GB 14922-2022、GB/T17999.1-2008 以及 DB32/T 2731.3-2015 的 SPF 和实验动物等级要求。

- c) 采集咽/鼻拭子样品，通过核酸检测排除流感病毒隐性或潜伏期感染。

d) 采集动物血液样本，通过抗体检测排除流感病毒既往感染或免疫。

5.2.4 其他监测要求

动物健康监测、环境、饮水、饲料垫料等要求按照 GB/T 39646-2020 执行。

5.3 麻醉操作要求

5.3.1 操作程序

- a) 动物感染操作前应实施麻醉。
- b) 麻醉前宜禁食 8h~12h（小鼠和地鼠可不禁食）。
- c) 不同动物麻醉方案按表 2 执行。

表 2 实验动物麻醉方法

动物种类	麻醉剂种类	麻醉剂量(mg/kg)	麻醉方式
小鼠	三溴乙醇（2.5%）	200~250	腹腔注射
地鼠	三溴乙醇（2.5%）	250~300	腹腔注射
禽类	氯胺酮+塞拉嗪	氯胺酮：30~50、塞拉嗪：10~20	肌肉注射
雪貂	舒泰 50	25	肌肉注射
恒河猴	舒泰 50	5~10	肌肉注射

d) 麻醉后护理

1) 啮齿类动物麻醉后监测呼吸、体温等身体状态，注意保温，实验操作完成后放回笼盒待其自然苏醒。

2) 恒河猴、鸡和雪貂麻醉苏醒期应取侧卧位，监测呼吸、体温、心率、角膜反射、脚趾回缩反射、黏膜颜色等身体状况。

5.3.2 其他要求

a) 恒河猴和雪貂麻醉深度不足时，需要补充麻醉剂量，舒泰 50 补充 2mg 为宜，以动物没有肌张反射为准。

b) 麻醉过量时，应立即实施心脏按压，每 50-60 次/min，5min 内动物可出现自主呼吸，可使用加热灯或毛毯等以维持动物的体温。

c) 麻醉后的动物转运过程应做好防护，避免造成环境污染。

5.4 甲型流感动物模型感染技术要求

5.4.1 感染途径选择

鉴于甲型流感病毒自然感染以呼吸道传播为主要途径，本文实验动物感染仅采用呼吸道感染途径。

- a) 雪貂、鸡、小鼠及金黄地鼠采用滴鼻感染，将病毒液经鼻腔滴注进入呼吸道。
- b) 恒河猴采用气管插管感染，经插管将病毒液直接送至呼吸道。

5.4.2 滴鼻感染

- a) 感染操作应在生物安全柜或负压解剖台中完成。
- b) 固定动物使呼吸道保持垂直体位。
- c) 感染时应将病毒液从一侧鼻孔滴入，待上一滴完全吸收后，再滴入下一滴，两侧鼻孔均匀滴入病毒液。
- d) 感染完成待动物苏醒，观察无异常后放回饲养笼具。
- e) 实验耗材按废弃物处置规范无害化处理。

5.4.3 气管插管感染

- a) 气管插管感染操作应在生物安全柜或负压解剖台中完成。
- b) 感染过程中动物声门处于开放状态，对声门会厌部进行局部麻醉。
- c) 局部麻醉后 3min-5 min，动物会厌部对刺激无反应时进行插管操作。
- d) 插管时宜使用直径为 2mm 的、带有长度刻度的硅胶软管进行操作，并固定在上颌处。
- e) 注入病毒时使动物保持坐姿，将装有病毒的注射器连接软管，缓慢注入。
- f) 待病毒吸收后，将动物放回负压笼具，待动物完全苏醒后，操作人员方可离开。
- g) 实验耗材按废弃物处置规范无害化处理。

6 模型评价技术要求

6.1 临床症状观察

动物感染后，连续观察 14 天，每天观察并记录临床症状。

6.1.1 全身性症状观察

观察整体状态，包括但不限于精神沉郁（嗜睡）、活动减少、反应迟钝、被毛粗乱、弓背蜷缩、食欲减退或废绝等。

6.1.2 系统特异性观察

a) 呼吸系统症状：观察是否出现咳嗽、喷嚏、鼻/眼分泌物增多、呼吸急促或呼吸困难等表现。

b) 消化系统症状：观察是否出现呕吐、腹泻、便秘、或腹部膨隆等异常情况。

c) 神经系统症状：观察是否出现震颤、抽搐、共济失调（步态不稳）、肢体麻痹或瘫痪、转圈、角弓反张等异常神经行为或反射。

6.1.3 量化指标监测

a) 体温：每天固定时间测量体温。

b) 体重：每天或隔天固定时间称量体重，计算体重下降率。

c) 临床评分：对上述症状进行量化临床评分。

6.1.4 死亡与濒死终点观察

每天定时检查并记录动物的死亡情况。濒死状态判定与人道终点执行规则依据 RB/T 173-2018 与 GB/T 39760-2021 制定，以体重较初始体重下降 15%~20%、重度呼吸困难、持续性抽搐、等为核心指征，结合临床评分与精神状态综合判定。达到人道终点标准的动物应立即按规范实施安乐死并记录。

6.2 样品采集、处理和保存

6.2.1 样品类型

a) 拭子样品：鼻拭子、咽拭子和/或肛拭子。

b) 血液样品：静脉采集的自凝血。

c) 组织样品：气管、肺、肾、脾、肠、脑等组织脏器。

6.2.2 拭子样品采集和处理

a) 鼻拭子采集：动物麻醉后，用 PBS 润湿的医用鼻咽拭子插入鼻孔，在内壁旋转涂抹至少 3 次，取出放入含采样液的管中。涡旋振荡混匀后弃去拭子，离心取上清液于 4℃ 或 -80℃ 保存备用。

b) 咽拭子采集：动物麻醉后，用 PBS 润湿的医用鼻咽拭子从嘴角插入口腔，在咽部及扁桃体区域旋转涂抹至少 3 次，取出放入含采样液的管中。涡旋振荡混匀后弃去拭子，离心取上清液于 4℃ 或 -80℃ 保存备用。

6.2.3 血液样品采集和处理

动物麻醉后采血。啮齿类动物可采用眼后静脉丛采血，禽类可采用翼根静脉采血，雪貂可采用前腔静脉、心脏采血，恒河猴可采用后肢股静脉、上肢肱静脉或腹股沟静脉丛采血。血液采集后置采血管中，室温静置至血清析出，离心取上清液于 4℃或-80℃保存备用。

6.2.3 组织样品采集和处理

安乐死动物（啮齿类采用脱颈椎法，雪貂、禽类和恒河猴等采用麻醉后放血），组织采集前观察组织是否出现大体异常或病理改变。无菌采集肺、气管等组织，若组织存在异常病变需同时采集病变核心区域及周围邻近正常组织。采集后的组织样品按实验需求分为若干份，一份置于 10%中性福尔马林中固定用于后续病理诊断。其余份加入采样液或组织裂解液，在无菌条件下剪碎，研磨后离心取上清液于 4℃或-80℃保存，用于病毒滴度或载量检测。

6.3 病毒载量检测

6.3.1 RNA 提取

使用商品化的 RNA 提取试剂盒，对处理后的拭子或组织进行 RNA 提取。操作按照试剂盒说明书进行。

6.3.2 实时荧光 RT-PCR

参照世界卫生组织（WHO）发布文件《WHO information for the molecular detection of influenza viruses》（2024 年 8 月最新修订版），采用通用甲型流感病毒荧光探针法进行检测。具体步骤、引物探针序列及结果判定方法见附录 B。

6.4 病毒分离及滴度检测

6.4.1 检测步骤

根据病毒特性选用细胞或鸡胚分离病毒和滴度检测。

a) 犬肾上皮细胞系（MDCK）细胞法分离病毒和病毒滴度检测。

- 1) 准备生长状态良好、融合度达 70%~90%的 MDCK 细胞单层 96 孔培养板。
- 2) 待测样品进行梯度稀释，每个稀释度设 4 个~8 个复孔。同时设置细胞对照和病毒对照。
- 3) 将培养板置于 37℃（适用于多数禽源流感病毒）或 35℃（适用于多数人源流感病毒）、5% CO₂培养箱中培养 72 h~96 h。

4) 每天观察并记录细胞病变效应 (CPE)。典型流感病毒 CPE 表现为细胞变圆、皱缩、聚集、脱落。

b) 血凝试验 (HA) 复检。

1) 对于 CPE 不明显的毒株, 进行 HA 复检。

2) 每孔吸取 50 μ L 培养上清液, 移至 96 孔 “V” 形或 “U” 形板中, 加入等体积 1% 火鸡红细胞悬液, 轻微振荡混匀。

3) 室温静置 30 min 后观察结果, 若红细胞均匀分散于孔底或形成边缘不整齐的凝集, 判为 HA 阳性。若红细胞呈圆形沉淀并下滑呈泪滴状, 判为 HA 阴性。记录各稀释度的 HA 阳性孔数。

c) 鸡胚法分离病毒和病毒滴度检测。

1) 选用 9 日龄~11 日龄 SPF 鸡胚, 检查鸡胚活力, 标记气室边界、胚胎位置及尿囊腔发育区域, 避开胚胎及大血管确定接种点。

2) 将鸡胚气室朝上固定, 在气室端距尿囊膜边缘上方约 0.5 cm 处钻一小孔。

3) 待测样品进行 10 倍梯度稀释。每个稀释度接种 4 枚~8 枚鸡胚。无菌注射器吸取稀释液或原液, 从钻孔处垂直进针约 1cm~1.5cm, 注入尿囊腔内。同时设置阴性对照和病毒对照。

4) 接种后立即用熔化的石蜡将针孔封闭。

5) 将鸡胚置于 35 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C (根据毒株特性选择: 高致病性禽源流感病毒用 37 $^{\circ}$ C, 人源流感病毒用 35 $^{\circ}$ C), 培养 24 h~72 h。每天观察鸡胚存活情况。

6) 培养结束后, 将鸡胚置于 4 $^{\circ}$ C 过夜 (或至少 4 h), 使血液凝固。无菌条件下敲破气室端蛋壳并撕除尿囊膜, 用无菌板将胚胎压至一侧, 吸取尿囊液, 置于无菌收集管中。

7) 收获的尿囊液离心取上清进行 HA 试验, 判定病毒阳性。

6.4.2 结果判定

a) 阳性孔/鸡胚判定

1) 细胞检测中, 出现 CPE 阳性或 HA 阳性者, 判定为阳性孔。

2) 鸡胚检测中, 收获的尿囊液 HA 阳性者, 判定为阳性鸡胚。

b) 病毒滴度计算

根据各稀释度的阳性孔数 (或阳性鸡胚数) 占接种总孔数 (或总鸡胚数) 的比例, 采用 Reed-Muench 法计算病毒样品的 50%组织细胞感染剂量 (TCID₅₀) 或 50%鸡胚感染剂量 (EID₅₀)。

c) 病毒分离判定

若无 CPE 或 HA 阳性，则收取样品原液接种的细胞上清或鸡胚尿囊液进行盲传，最多盲传 3 代。若仍无 CPE 或 HA 阳性，则认为病毒分离阴性。

6.5 血清抗体测定（血凝抑制试验）

6.5.1 检测步骤

a) 血清的处理

1) 待测血清与 3 倍体积受体破坏酶溶液 RDE 混合，37 °C 孵育 16 h~20 h，56 °C 水浴灭活 30 min。

2) 加入 1/10 体积浓缩火鸡红细胞，4 °C 吸附 1 h，900×g 离心 5 min。取上清，加入 6 倍血清体积的 PBS 作为工作血清。

b) 血凝试验（HA）测定抗原效价

1) 于 96 孔“V”或“U”孔板中用 PBS 对抗原进行 2 倍系列稀释，每孔 50μL，加入等体积 1% 火鸡红细胞悬液，室温静置 30 min。

2) 垂直持板观察，以红细胞下滑速度明显低于下一稀释孔时所对应稀释度倒数为血凝效价（HAU/50μL）。

3) 用 PBS 稀释抗原至 4HAU/25μL，并进行滴定验证。

a) 血凝抑制（HI）试验

1) 于 96 孔“V”或“U”孔板中用 PBS 将工作血清进行 2 倍系列稀释，每孔 25 μL，加入等体积 4 HAU 抗原，混匀后室温静置 1 h。设血清对照（工作血清+PBS）。

2) 每孔加入 50 μL 1% 火鸡红细胞悬液，室温静置 30 min。

3) 垂直持板观察，从血清低稀释度向高稀释度观察，以红细胞下滑速度明显低于上一个稀释孔时所对应稀释度即为 HI 滴度。

6.5.2 结果判定

HI 滴度>1:20 时，判定为抗体阴性。HI 滴度≤1:20 判定为抗体阳性。实验结果应结合阳性与阴性对照进行综合判断。

6.6 病理诊断要求

6.6.1 修块

取中性福尔马林固定后的组织（主要为气管和肺组织），清水清洗。肺组织取材：小鼠 5 叶肺置于一包埋盒。大鼠每叶各取一块，左叶与右副叶共一盒，右上、右中和右下共另一盒。猴、雪貂和鸡肺每叶横切一块，放入对应标记盒内，修块时遇病变部位需取病变区及其周围正常组织。气管取材：大小鼠含食管、甲状腺横切取一块。大动物（猴、雪貂、鸡）横切取一块。

6.6.2 脱水、透明和浸蜡

梯度脱水：70%、80%、90%、95%、100%乙醇各 2h，二甲苯各 2h，石蜡 3h。

6.6.3 包埋

浸蜡完成后将组织放入包埋盒，注入已熔化的石蜡进行包埋。包埋时肺组织修切面/病变部位朝下，气管垂直包埋。

6.6.4 切片与脱蜡复水

切片厚度为 4~5 μm 。二甲苯 I、II 和 III 中各脱蜡 20min，梯度乙醇（100%、95%、90%、80%、70%）各复水 2min，流水冲洗 5min 水化。

6.6.5 H&E 染色

苏木素染色 5min，流水洗 2 次（5min/次），1%盐酸酒精分化液分化数秒，自来水洗 5min。氨水返蓝数秒，自来水洗 5min。伊红染色 50s-1min，自来水洗 5min。梯度脱水（90%、95%乙醇各 2min，100%乙醇 I/II 各 5min）。二甲苯 I、II 和 III 各透明 10 min。中性树胶封片，光镜检查。

6.6.6 结果判定

由病理阅片人员对 H.E 染色切片进行光学显微镜评估。主要观察内容包括：呼吸道黏膜上皮损伤、肺间质肺泡隔的增宽程度、肺泡腔内渗出物与透明膜形成、血管及支气管周围的炎性细胞浸润。根据病变程度分为五级：

- a) 阴性 (-)：无明显病变；
- b) 轻度 (+)：病灶呈散发性，小灶状或局灶性；
- c) 中度 (++)：病灶呈多灶性或片灶状；
- d) 重度 (+++)：病灶呈弥漫性、大片状或大片多灶状；
- e) 极重度 (++++): 病灶呈弥漫性、大片状或大片多灶状，病变累及整个组织。

6.7 免疫组织化学染色

6.7.1 抗原修复

切片浸没于 0.01M 柠檬酸钠缓冲液 (pH6.0)，微波炉高火加热 3min、中火 5min、低火 3min，室温冷却 30min。（全程保持修复液充足，防止切片干涸）。冷却后 PBS 洗 3 次，每次 3~5min。

6.7.2 封闭

免疫组化笔圈定组织区域，滴加 3% 过氧化氢溶液室温封闭 15min，PBS 洗 3 次，每次 3~5min。滴加 5% 羊血清/BSA 溶液，室温封闭 15~20min。

6.7.3 抗体孵育

弃封闭液，滴加稀释的一抗，湿盒中 4℃ 过夜。次日室温复温 30min，PBS 洗 3 次，每次 5min。滴加二抗室温孵育 1h，PBS 洗 3 次，每次 5min。

6.7.4 DAB 显色

滴加 DAB 显色液，镜下观察至平滑肌变黄（或计数 60 个/计时 1min），立即水洗终止显色。

6.7.5 苏木素染核

苏木素复染 5min，盐酸酒精溶液快速脱色 5 次，自来水冲洗 10min 返蓝。

6.7.6 脱水、透明与封片

梯度脱水 50%、70%、80%、95% 乙醇各 2min，100% 乙醇 5min。二甲苯 I、II、III 各透明 5min。中性树胶封片，光镜检查。

6.7.7 结果判定

由病理阅片人员对染色切片进行光学显微镜评估。组织或细胞中可以观察到明显的染色，其分布模式可能是全细胞膜、核、细胞质等，判断为抗原阳性。组织或细胞中观察不到染色或染色非常弱，或不符合阳性的染色模式，判断为抗原阴性。

7 甲型流感模型建立的判定

甲型流感模型建立成功的判定，需综合评估病毒复制、组织病理损伤及临床量化指标。判定指标分为主要指标和次要指标。

7.1 主要指标

主要指标是模型判定的决定性依据，典型发病模型需同时满足以下三项：

a) 病原学指标：甲型流感病毒在靶器官内有效复制。感染急性期（如感染后 3 d~7 d），鼻咽部、气管或肺组织中可分离到感染病毒。且损伤部位可检测到病毒抗原；

- b) 病理学指标：靶器官出现甲型流感病毒感染所致的特征性病理损伤；
- c) 临床量化指标：动物表现出与感染相关的全身性疾病特征，至少符合以下一项：
 - 1) 体重呈进行性下降；
 - 2) 体温出现与物种特性、毒株毒力相符的异常改变，表现为发热（较基线升高 $\geq 1^{\circ}\text{C}$ ）、持续性高热或体温节律紊乱；
 - 3) 致死性感染模型中出现感染特异性死亡，或达到人道终点。（非致死性模型此项不作要求）

7.2 次要指标

次要指标作为辅助依据，用于判断疾病转归及宿主免疫应答水平：

- a) 临床症状评分：采用标准化临床评分体系，对动物精神状态、活动能力、呼吸道症状、肠道症状等进行量化评估；
- b) 血清学转换：感染后 14d~28d，恢复期血清特异性抗体滴度较感染前升高 4 倍及以上。

7.3 判定规则

- a) 同时满足 7.1 规定的三项主要指标，判定为典型发病模型。
- b) 仅满足病原学指标，无显著特征性病理损伤与临床量化指标变化，判定为无症状感染模型。

附录 A

（资料性）

生物安全风险控制要求

A.1 生物安全风险识别和评估

A.1.1 样品处理和检测风险

A.1.1.1 咽拭子挤压、血液离心、组织研磨、振荡混匀过程中气溶胶的产生、液体的溅出或溢洒。

A.1.1.2 病毒及病毒样品接种、吹打混匀，离心操作产生气溶胶、液体溅出或溢洒。

A.1.1.3 离心过程中发生离心管的破裂。

A.1.2 动物感染实验可能产生的风险

A.1.2.1 动物感染操作中病毒的暴露。

A.1.2.2 动物抓咬导致人员暴露，或体表带毒造成环境污染。

A.1.2.3 动物呼吸产生的携带病毒的气溶胶造成人员暴露。

A.1.2.4 采样和解剖时，动物含病毒的体液飞溅造成人员暴露。

A.1.2.5 锐器扎伤。

A.1.2.6 动物转移造成气溶胶外溢。

A.1.2.7 污染笼具、食物、水、排泄物，以及清理、高压处理过程中造成的环境污染。

A.1.2.8 动物逃逸造成实验室污染。

A.1.3 人员相关风险

实验人员身体状态、操作能力、工作负荷等因素导致的操作失误与暴露风险。

A.2 风险控制

A.2.1 样品处理和检测风险防控

- 1) 甲型流感病毒（高致病性禽流感病毒和 H2N2 流感病毒）应在生物安全三级实验室的 II 级或 II 级以上生物安全柜内进行，其他流感病毒应在生物安全二级实验室的 II 级或 II 级以上生物安全柜内进行。
- 2) 实验人员上岗前应接受严格的生物安全以及相应病毒实验技术的培训。
- 3) 实验结束后用 5500mg/L 有效氯溶液擦拭工作台面、生物安全柜内壁与器材表面。

4) 废弃物需要经过 121℃ 高压处理 30 min 后移出实验室。

A.2.2 动物实验操作风险防控

A.2.2.1 对感染动物的操作

1) 动物感染或操作（高致病性禽流感病毒和 H2N2 流感病毒）应在生物安全三级实验室的生物安全柜或负压解剖台内进行，其他流感病毒动物感染或操作应在生物安全二级实验室的生物安全柜或负压解剖台内进行。

2) 动物操作人员上岗前应接受严格的生物安全以及相应病毒动物实操技术的培训。

3) 实验操作中保证照明充足，防止锐器刺伤或者划伤，使用后放入利器盒中，禁止回套针帽。

4) 大动物操作应充分麻醉后进行，动作轻柔，减少气溶胶产生。

A.2.3 生物安全实验室内废弃物处理

A.2.3.1 动物尸体、排泄物等装入防渗漏的专用容器。

A.2.3.2 针头、一次性注射器、手术刀片等锐器应放入利器盒。

A.2.3.3 一次性防护服、手套、啮齿类笼等应装入生物安全垃圾袋。

A.2.3.4 分类后的废弃物经表面消毒后进行高压灭菌。标注废弃物类别、处理时间、处理人员等基本信息。

A.2.3.5 废物容器装载量不超过设计容量的 3/4。

A.2.3.6 高压灭菌后，对可复用器具（如笼具）清洗消毒，不可用废弃物按医疗废物交由专业机构处理，建立废弃物处理台账。

A.2.4 生物安全实验室人员防控

A.2.4.1 生物安全实验室实验人员应确保身体状况良好，出现下列情况，禁止进入：

- a) 患发热性疾病；
- b) 上呼吸道感染或其他导致抵抗力下降的情况；
- c) 妊娠、连续工作 4h 以上，或其他原因造成的疲劳状态；
- d) 皮肤有伤口和擦伤。

A.2.4.2 实验过程中个人防护

1) 甲型流感病毒（高致病性禽流感病毒和 H2N2 流感病毒）应在生物安全三级实验室内进行。穿戴 2 层手套和 2 层防护服，里层为洁净服，外层为一次性防护服。戴 N95 口罩，穿一次性鞋套和胶靴。猴、雪貂、鸡感染和解剖时戴正压防护面罩。猴、雪貂、鸡日常饲养时佩戴一次性面罩或护目镜，猴确认麻醉状态及转移时戴防咬手套，雪貂和禽类可选择性佩戴。猴、雪貂和禽类解剖时戴防割手套。

2) 其他流感病毒应在生物安全二级实验室内进行。

实验人员穿戴工作服、手套、口罩，必要时佩戴护目镜。

3) 退出实验室时按流程逐级消毒、脱卸防护用品，避免污染。

A.2.4.3 人员健康监测

1) 监测期自实验开始至结束后 14 天，每日早晚测量体温并观察流感样症状。

2) 人员监测期出现发热等类似症状，应应立即报告实验室负责人，按要求隔离并至定点医院就诊。

3) 建立可疑症状报告制度，保证及时被定点医院收治。

4) 建立感染控制与医疗监测方案，包括禁忌人群、实验室症状监测、感染控制、特殊情况（意外事故事件、水灾、火灾等自然灾害）和误用的控制措施。

附录 B

(规范性)

荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息及反应体系信息

B.1 荧光 RT-PCR 引物和探针序列

荧光 RT-PCR 引物和探针序列见表 B.1。

表 B.1 荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息

病毒型/亚型	基因片段	引物/探针	序列
甲型流感病毒	基质蛋白 (M)	上游引物	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
		下游引物	TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
		探针	5'-(FAM)-ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG-(MGB)-3'

B.2 荧光 RT-PCR 反应体系

使用 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher) 或 QuantiTect® Probe RT-PCR kit (QIAGEN) 试剂, 反应体系见表 B.2。

表 B.2 荧光 RT-PCR 反应体系

试剂	体积 (μl)
无酶分子生物学级水	2.9~3.65
预混液	12.5
上游引物 (10μmol/L)	1.5
下游引物 (10μmol/L)	1.5
探针 (5pmol/μl)	0.5
核糖核酸酶抑制剂 (20U/μl)	0.1
酶混合液	0.25~1
预混液总体积	20
RNA 模板	5
反应体系总体积	25

B.3 荧光 RT-PCR 反应程序

B.3.1 使用 LightCycler 480 PCR 仪, 不同试剂的荧光 RT-PCR 反应程序见表 B.3 和 B.4。

表 B.3 使用 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents 试剂时, 荧光 RT-PCR 反应程序
(LightCycler 480)

温度 (°C)	时间 (分: 秒)	循环数	升温速率 (°C/秒)
50	10: 00	1	4.4
95	10: 00	1	4.4
95	0: 15	45	4.4
56	0: 30		2.2
72	0: 15		4.4

表 B.4 使用 QuantiTect® Probe RT-PCR kit 试剂时, 荧光 RT-PCR 反应程序 (LightCycler 480)

温度 (°C)	时间 (分: 秒)	循环数	升温速率 (°C/秒)
50	30: 00	1	Max
95	15: 00	1	Max
94	0: 15	45	1.5
56	1: 15		1

B.3.2 使用 ABI QuantStudio 5 或 ABI 7500 Fast PCR 仪, 不同试剂的荧光 RT-PCR 反应程序
见表 B.5 和 B.6。

表 B.5 使用 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents 试剂时, 荧光 RT-PCR 反应程序 (ABI
系列)

温度 (°C)	时间 (分: 秒)	循环数
50	10: 00	1
95	10: 00	1
95	0: 15	45
56	0: 30	
72	0: 15	

表 B.6 使用 QuantiTect® Probe RT-PCR kit 试剂时, 荧光 RT-PCR 反应程序 (ABI 系列)

温度 (°C)	时间 (分: 秒)	循环数
50	30: 00	1
95	15: 00	1
94	0: 15	45
56	1: 15	

B.4 结果判定

有效性要求: 阴性对照无扩增, 阳性对照 Ct 值在预期范围。

阳性: 样本 Ct 值 < 40, 且扩增曲线典型。

阴性: 样本 Ct 值 ≥ 40 或无扩增曲线。

参考文献

- [1] World Organisation for Animal Health (WOAH). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.3.4 Avian influenza[S]. Paris: WOAH, 2024
- [2] Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Ichiko Y, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Hasegawa H, Kawaoka Y. Syrian Hamster as an Animal Model for the Study of Human Influenza Virus Infection. *J Virol*. 2018 Jan 30;92(4):e01693-17. doi: 10.1128/JVI.01693-17. PMID: 29212926; PMCID: PMC5790951.
- [3] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, Gustin KM, Pearce MB, Viswanathan K, Shriver ZH, Raman R, Cox NJ, Sasisekharan R, Katz JM, Tumpey TM. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):484-7. doi: 10.1126/science.1177238. Epub 2009 Jul 2. PMID: 19574347; PMCID: PMC2953552.
- [4] Styles TM, Akhtar A, Gu C, Neumann G, Muramatsu H, McPartlan JS, Talukder P, Gratz D, Stokdyk K, Turner HL, Ferguson JA, Rodriguez AJ, Loganathan M, Francis B, Abbad A, Chikh G, Tam YK, Qin ZS, Han J, Carreño JM, Ward AB, Chahal JS, Mandl CW, Pardi N, Kawaoka Y, Krammer F, Ahmed R, Amara RR. Chimeric hemagglutinin-based universal influenza mRNA vaccine induces protective immunity and bone marrow plasma cells in rhesus macaques. *Cell Rep Med*. 2025 Oct 21;6(10):102369. doi: 10.1016/j.xcrm.2025.102369. Epub 2025 Sep 25. PMID: 41005301; PMCID: PMC12629808.