

李庆妮,陈云丰,刘元浪,等. 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 80-86.

Li QN, Chen YF, Liu YL, et al. Evaluation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 80-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.012

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价

李庆妮^{1,2}, 陈云丰^{1,2}, 刘元浪^{1,2}, 唐 定^{1,2}, 华婉璐^{1,2}, 张瑞安^{1,2},
卢 佳^{1,2*}, 李新国^{1,2*}

(1. 武汉生物制品研究所有限责任公司新发传染病研究室, 武汉 430207;
2. 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】 目的 利用流感病毒作为模式病毒评价非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统的运行效果, 为非人灵长类动物气溶胶吸入研究奠定实验基础。**方法** 在生物安全三级实验室中, 使用非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统产生流感病毒气溶胶, 以此评价该装置能否正常运行并产生特定粒径大小的气溶胶颗粒, 同时评价装置运行过程中病毒气溶胶输出均一性、稳定性、气密性以及装置的消毒效果。**结果** 该装置产生的气溶胶颗粒中值直径为 $(1.04 \pm 0.03) \mu\text{m}$, 不同浓度气溶胶发生液产生的病毒气溶胶均能达到头罩, 且 6 个头罩间气溶胶浓度无显著性差异 ($P > 0.05$); 流感病毒雾化 30 min 后存活率 $> 50\%$; 病毒气溶胶浓度与发生器病毒浓度的线性相关良好 ($R^2 = 0.9989$); 装置易泄漏处未检测到感染性病毒, 使用过氧化氢消毒剂对气溶胶暴露系统管道及负压柜腔体消毒后无指示菌生长。**结论** 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果良好, 装置管道气密性好, 可消毒完全, 为将来建立 SARS-CoV-2 及其它病毒气溶胶感染非人灵长类动物模型奠定了基础。

【关键词】 非人灵长类动物; 气溶胶; 暴露; 均一性; 稳定性; 气密性; 流感病毒

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0080-07

Evaluation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates

LI Qingni^{1,2}, CHEN Yunfeng^{1,2}, LIU Yuanlang^{1,2}, TANG Ding^{1,2}, HUA Wanlu^{1,2}, ZHANG Ruian^{1,2}, LU Jia^{1,2*}, LI Xinguo^{1,2*}

(1. Laboratory of Emerging Infectious Diseases of Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430207, China.
2. Biosafety Level III laboratory of Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430207)

【Abstract】 Objective To evaluate the operation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primate (NHP) models using influenza virus and establish the experimental basis for aerosol inoculation of NHPs with SARS-CoV-2. **Methods** In a biosafety level 3 laboratory, we generated influenza virus B/Phuket/3073/2013 aerosol using an oral and nasal aerosol exposure system for NHP models and evaluated whether the device could run normally and produce aerosol particles of a specific size. Furthermore, the uniformity of distribution and stability of the aerosol particles

[基金项目] 国家重点研发计划 (2020YFC0842100)。

[作者简介] 李庆妮 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 感染性疾病非人灵长类动物模型制备。E-mail: liqingni@qq.com

[通信作者] 卢佳 (1984—), 女, 博士, 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

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: xyleee@qq.com * 共同通信作者

were analyzed. Influenza virus was collected at sites where leakage could easily occur. A solution of 35% H_2O_2 was run through the nebulizer to disinfect the system. **Results** The mass median aerodynamic diameter of aerosol particles was $(1.04 \pm 0.03) \mu m$. The viral aerosols produced by different concentrations of influenza virus reached the hood. There was no significant difference in aerosol concentration among the 6 hoods ($P > 0.05$). The survival rate of influenza virus was greater than 50% after atomization for 30 min. A linear relationship was observed ($R^2 = 0.9989$) with an average difference of $2.4 \log_{10} CCID_{50}/mL$ between input (Collison Nebulizer) and output (All Glass Impinger-30) virus titers. No influenza virus was detected at potential leakage sites of the device. There was no indication of bacterial growth after sterilizing the pipeline of the aerosol exposure system and the cavity of the negative pressure cabinet with hydrogen peroxide disinfectant. **Conclusions** Our result suggest that the oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates is useable and effective. This study provides a foundation for establishing SARS-CoV-2 and other viral aerosol infection models using NHPs in the future.

[Keywords] non-human primates; aerosol; exposure; uniformity; stability; air tightness; influenza virus

对于呼吸道病原微生物而言,气溶胶吸入是其感染宿主的重要途径^[1-2]。鉴于非人灵长类动物(non-human primates, NHP)与人类密切的基因相关性,因此在候选疫苗、治疗性药物的临床前研究中,NHP 具有独特而重要的作用^[3-9]。非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统可以通过装有细菌、病毒等病原微生物悬浮液的雾化器雾化产生微生物气溶胶,NHP 吸入气溶胶后,在感染过程中避免了消化道、皮肤等其他暴露途径感染,可以模拟呼吸道病原自然感染途径,为致病性病原微生物吸入感染、疫苗气溶胶免疫、肺给药、气溶胶攻毒评价疫苗或药物效果的研究提供了良好的评价技术平台^[10]。本研究选择流感病毒作为模式病毒,在生物安全三级实验室中使用非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统装置产生病毒气溶胶,评价了病毒气溶胶粒径、气溶胶输出均一性、稳定性、气密性等重要参数,以及装置的消毒效果验证,为将来建立 SARS-CoV-2 及其它病毒气溶胶感染 NHP 模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

MDCK 细胞由武汉生物制品研究所有限责任公司国家联合疫苗工程技术研究中心提供。

1.1.2 病毒株

流感病毒 B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)由武汉生物制品研究所有限责任公司国家联合疫苗工程技术研究中心提供。

流感病毒 B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)是 WHO 推荐并经国家药品监督管理部门批准的乙型流行性感冒病毒的疫苗株,属于《人间传染的病原微生物名录》中的第三类病原微生物,

不属于高致病性病原。由于其致病性较弱,属囊膜病毒,对消毒剂较敏感,易于在三级生物安全实验室操作,其细胞培养物病毒滴度较高可达 $10^8 CCID_{50}/mL$,可满足实验需要,因此被本研究选作 SARS-CoV-2 的代替病毒。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青公司);青链霉素(美国 HyClone 公司);TPCK-胰酶(美国 Sigma 公司);1% 鸡红血球(自制)。

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统(北京慧荣和科技有限公司);TSI 3321 气溶胶粒径分析仪(美国 TSI 公司);B2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);汽化过氧化氢灭菌器(杭州美卓生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统如图 1 所示,主要由气溶胶发生模块(过滤器、流量控制器、Collison 气溶胶发生器、正交稀释器)、染毒模块(口鼻罩、头罩、猴椅)、分析模块(AGI-30 采样器)、控制模块(调节阀、流量控制器)、废气处理模块(过滤器)组成。整体采用分布式动态气溶胶口鼻暴露技术。实验室的洁净压缩空气进入系统后分成两路,一路经过流量控制器后进入气溶胶发生器用于气溶胶发生,然后进入正交稀释器,另一路经过流量控制器后作为稀释气流直接进入正交稀释器。两路气流经过涡旋混合后形成特定浓度的气溶胶进入气溶胶静压腔,并经过顶部的 6 路分流管路分别输送到 6 个实验猴口鼻罩的进气口处,实验猴吸入后产生的废气经口鼻罩出气口处排出,汇流过滤后经过流量控制器由抽气泵排出。

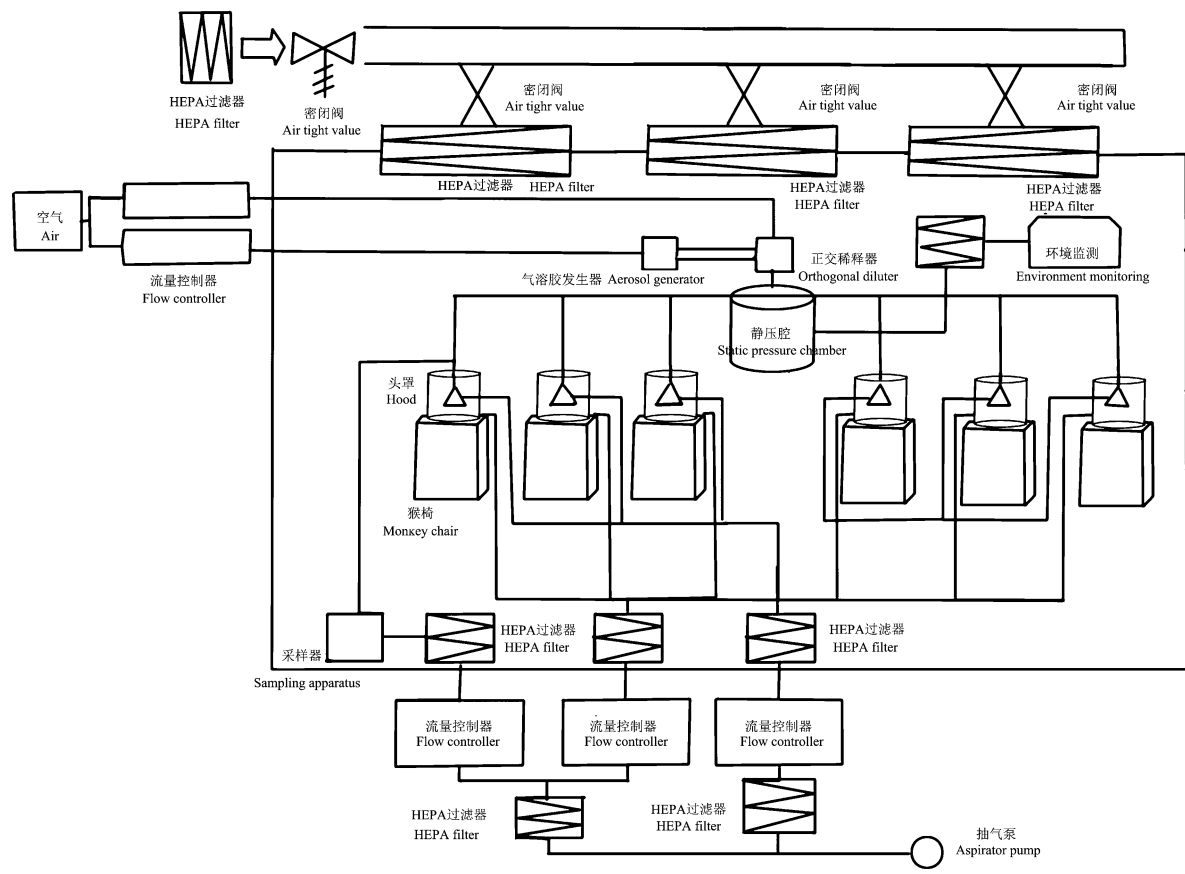


图 1 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统示意图

Figure 1 Schematic figure of the oral and nasal aerosol exposure system in non-human primates

1. 3. 2 流感病毒滴度测定

使用微量细胞病变法进行病毒滴度的测定,胰酶消化 MDCK 细胞制备细胞悬液,接种至 96 孔细胞培养板中,每毫升 $2.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$ 个,每孔 100 μL 。将流感病毒样本 10 倍系列梯度稀释后接种至 96 孔板中,每个稀释度 8 个复孔,33℃ 二氧化碳培养箱中培养 6 d。观察出现细胞病变的孔数,使用 Kaber 法计算病毒滴度。

1. 3. 3 气溶胶发生参数和采样参数设定

将 20 mL 一定浓度的流感病毒加入六孔 Collison 气溶胶发生器中,设置气溶胶发生流量为 12 L/min,稀释流量为 40 L/min,抽气流量为 55 L/min,维持头罩负压,气溶胶稳定发生 5 min 后使用 AGI-30 液体冲击式采样器连接头罩采样口采样,采样溶液为 30 mL 的 DMEM 培养基,采样流量为 10 L/min,采样时间 5 min。

1. 3. 4 气溶胶粒径大小、均一性和稳定性评价

将 30 mL 气溶胶发生液加入六孔 Collison 气溶胶发生器中,按照 1. 3. 3 设定气溶胶发生参数,分别

在静压腔和头罩采样处接入 TSI 3321 气溶胶粒径分析仪检测气溶胶总粒子的中值直径,检测时间点分别为气溶胶发生后 5、10、20、30 和 40 min,评价气溶胶粒径大小、均一性和稳定性。

1. 3. 5 流感病毒气溶胶达到头罩评价

将 20 mL 3.5×10^6 CCID₅₀/mL 流感病毒液加入到六孔 Collison 气溶胶发生器中产生气溶胶,将 AGI-30 液体冲击式采样器连接至头罩采样口处进行采样,测定样品中流感病毒滴度,评价气溶胶是否能到达供气静压腔和头罩。

1. 3. 6 流感病毒气溶胶头罩分布均一性评价

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统染毒模块共包含 6 个头罩,分别向六孔 Collison 气溶胶发生器中分别加入 20 mL 低浓度 (3.5×10^6 CCID₅₀/mL) 和高浓度 (7.1×10^7 CCID₅₀/mL) 流感病毒液产生气溶胶,并将 AGI-30 液体冲击式采样器连接头罩采样口进行采样,测定样品中流感病毒滴度,评价不同病毒浓度的气溶胶发生液产生的气溶胶能否均匀分布达到至 6 个头罩。

1.3.7 流感病毒的耐雾化能力评价

向六孔 Collison 气溶胶发生器中加入 20 mL 7.1×10^7 CCID₅₀/mL 的流感病毒液产生气溶胶,分别在气溶胶发生 0、3、5、8、10、15、20、25、30、35 和 40 min 时采集发生器中流感病毒样品,测定样品中流感病毒滴度,测定气溶胶发生状态下流感病毒存活率。

1.3.8 气溶胶发生器和采样器中流感病毒浓度的线性关系

将 1.3×10^7 CCID₅₀/mL 的流感病毒液 10 倍系列梯度稀释,分别取 1.3×10^7 CCID₅₀/mL、 1.3×10^6 CCID₅₀/mL、 1.3×10^5 CCID₅₀/mL、 1.3×10^4 CCID₅₀/mL 各 20 mL 加入到六孔 Collison 气溶胶发生器中产生气溶胶,用 AGI-30 液体冲击式采样器采集头罩处的气溶胶样品,测定样品中流感病毒滴度,评价 Collison 发生器 (Input) 和 Impinger 采样器 (Output) 中流感病毒浓度的线性关系。

1.3.9 装置气密性评价

在 1.3.6 中使用高滴度流感病毒作为气溶胶发生液产生气溶胶时,在非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统易发泄露的管道连接处(如气溶胶发生器出口、静压腔入口、6 个口鼻罩出口、预实验采样器进口、预实验采样器出口、采样器进气口、采样器出气口)使用拭子涂抹采样 30 s,将采样拭子放入 2 mL DMEM 培养基中,充分混匀后,加入到生长致密的 MDCK 细胞中,33℃ 二氧化碳培养箱培养 72 h,观察是否发生细胞病变,评价装置在运行过程中是否发生气溶胶泄露。

1.3.10 装置消毒效果评价

采用 35% 过氧化氢及气体发生器分批次对气溶胶暴露系统管道及负压柜腔体进行消毒,使用嗜热脂肪芽孢杆菌菌片 (ATCC 7953, 菌种浓度为每片 $5\times10^5\sim5\times10^6$ cfu) 作为生物指示剂。消毒前,分别在管道和负压柜腔体布置生物指示剂。消毒完成后,及时取出指示剂,放入加有 0.5% 中和剂硫代硫酸钠的溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基中,56℃ 培

养 7 d 后进行结果判定。

1.4 统计学方法

本研究数据采用 GraphPad Prism 9.0.0 统计分析软件,对结果进行 *t* 检验和方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义, $P<0.001$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 气溶胶粒径大小、均一性和稳定性评价

气溶胶发生后,使用 TSI 3321 气溶胶粒径分析仪在不同时间点分别检测静压腔和头罩处的气溶胶总粒子的中值直径,结果如表 1 所示,非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统产生的气溶胶颗粒中值直径为 $(1.04\pm0.03)\mu\text{m}$,对应安德森采样器的 6 级 $(0.65\sim1.1)\mu\text{m}$,气溶胶发生后 40 min 内,静压腔和头罩处的气溶胶的中值直径的均一性和稳定性良好。

2.2 流感病毒气溶胶达到头罩评价

使用 AGI-30 冲击式采样器采集静压腔和头罩处的气溶胶,通过微量细胞病变法检测静压腔和头罩处病毒气溶胶浓度,结果如图 2 所示,静压腔和头罩中都能检测到一定滴度的流感病毒,表明该装置能正常运行并能产生病毒气溶胶,产生的气溶胶能经静压腔途径管道到达头罩处,且传递过程中气溶胶浓度无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 流感病毒气溶胶头罩分布均一性评价

分别使用低浓度 (3.5×10^6 CCID₅₀/mL) 和高浓度 (7.1×10^7 CCID₅₀/mL) 流感病毒进行气溶胶发生,使用 AGI-30 冲击式采样器收集 6 个头罩气溶胶并进行病毒滴度检测,结果见图 3 所示。实验结果表明同一滴度流感病毒产生的气溶胶在 6 个头罩的浓度无显著差异 ($P>0.05$),说明气溶胶在 6 个头罩分布均匀,且气溶胶浓度与发生器病毒滴度有关。

2.4 流感病毒的耐雾化能力评价

为评价气溶胶发生过程中流感病毒的耐雾化能力,分别检测气溶胶发生 3、5、8、10、15、20、25、30、35 和 40 min 时气溶胶发生器中流感病毒存活

表 1 气溶胶粒子中值直径、均一性和稳定性
Table 1 Median diameter, uniformity and stability of aerosol particles

采样时间点 Sampling time points	T5 5 th minute	T10 10 th minute	T20 20 th minute	T30 30 th minute	T40 40 th minute	平均中值直径 (μm) Mean median diameter
静压腔 (μm) Air supply static pressure chamber	1.00±0.04	1.03±0.02	1.03±0.01	1.04±0.01	1.05±0.01	1.04±0.03
头罩 (μm) Hood	1.02±0.01	1.03±0.01	1.04±0.01	1.07±0.03	1.06±0.01	

率,见图 4。实验结果表明气溶胶发生 0~5 min,流感病毒存活率迅速下降,5~30 min 流感病毒存活率较为稳定,存活率高于 50%,30 min 后流感病毒活性继续迅速下降。根据上述结果,气溶胶发生后 5~30 min 可作为 NHP 感染的窗口期,约为 25 min。

2.5 发生器和采样器中流感病毒气溶胶浓度的线性关系

根据“2.3 流感病毒气溶胶头罩分布均一性评价”实验结果,流感病毒气溶胶浓度和气溶胶发生器中流感病毒滴度有关。为进一步确定二者之间的关系,在气溶胶发生器中加入不同滴度的流感病毒溶液,检测对应流感病毒气溶胶浓度,结果如图 5 所示,实验结果表明流感病毒气溶胶浓度与发生器病毒滴度的对数值具有良好的线性关系,标准曲线方程为 $y=0.8625x-2.4173(R^2=0.9989)$ 。

2.6 装置气密性评价

使用拭子在非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴

露系统中病毒气溶胶易发生泄露部位(气溶胶发生器出口、静压腔入口、6 个头罩出口、预实验采样器进口、预实验采样器出口、采样器进气口和采样器出气口)涂抹采样,将采集样本接种到 MDCK 细胞中,培养后 12 个采样点样本接种的细胞均未发生病变。提示非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统在气溶胶发生过程中未发生气溶胶泄露,装置气密性良好。

2.7 装置消毒效果评价

嗜热脂肪芽孢杆菌生物指示剂培养 7 d 后,对指示剂逐支进行检查,实验组接种生物指示剂的培养基均未变色(呈现紫色),阳性对照培养基颜色变色(紫色变黄色),阴性对照培养基未变色(呈现紫色)。实验结果表明使用 35%过氧化氢采用汽化方式对非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统可以有效地消毒,消毒效果完全。

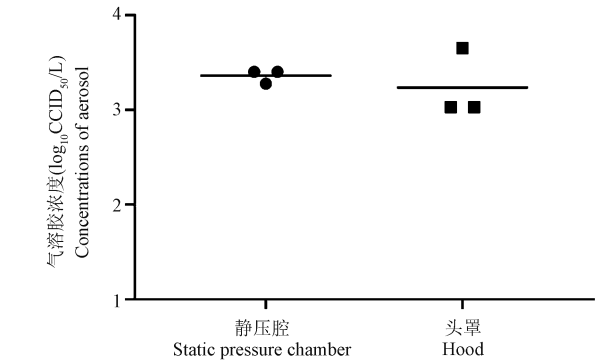


图 2 采样器采集静压腔和头罩处的气溶胶浓度
Figure 2 Aerosol concentrations of samplers which collect in the static pressure chamber and the hood

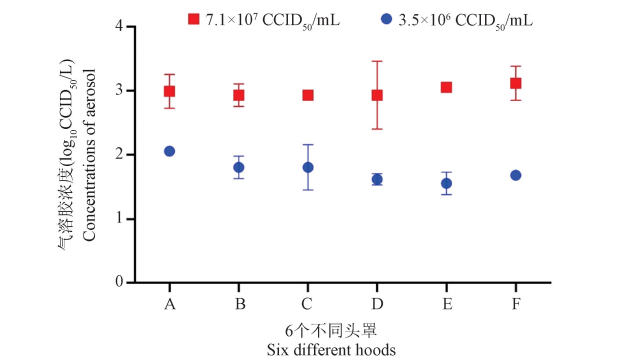


图 3 不同头罩处的流感病毒气溶胶浓度
Figure 3 Aerosol concentrations of samplers which collect in the six hoods

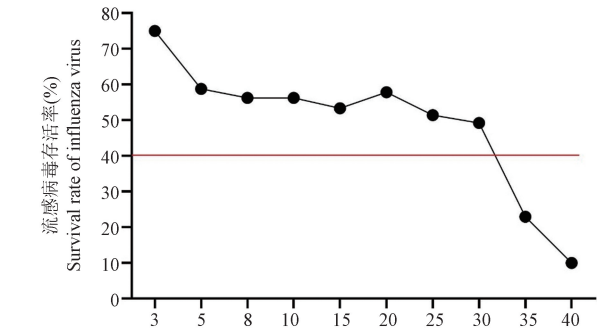


图 4 流感病毒的耐雾化能力
Figure 4 Atomization resistance of influenza virus

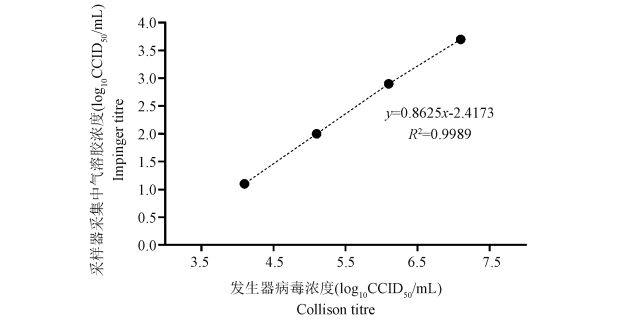


图 5 流感病毒 Input (Collision) 和 Output (Impinger) 的线性关系
Figure 5 Correlation between input (Collision) and output (Impinger) virus titres of influenza virus when aerosolized using the oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates

3 讨论

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统能正常运行,产生具有感染性的气溶胶颗粒,气溶胶颗粒的中值直径为 $(1.04 \pm 0.03) \mu\text{m}$,颗粒大小可直接进入肺泡。

在气溶胶暴露感染实验动物时,基于动物的氧气消耗,推荐气溶胶气体流量为每分钟呼吸体积的 1.5 倍,使用动物呼吸量 2.5~4 倍的气溶胶气体流量可将气溶胶浓度保持在目标浓度的 90%^[11]。2~4 岁恒河猴呼吸量为 $1.5 \sim 3.8 \text{ L/min}$ ^[12]。美国陆军传染病医学研究所和匹兹堡大学疫苗研究中心进行不同种类的 NHP 气溶胶暴露感染时,提供给每只 NHP 的气体流量为 7.5 L/min 左右^[13-14]。本系统装置可同时进行 6 只 NHP 的气溶胶暴露感染,在本研究中使用 6 孔 Collison 气溶胶发生器,将气溶胶流量设为 12 L/min ,稀释流量设为 40 L/min ,提供给每只试验猴的气溶胶气体流量为 8.7 L/min 左右,为恒河猴呼吸量的 2.3~5.8 倍,同时本生物安全三级实验室前期进行恒河猴适应性模拟气溶胶感染时,采用此染毒程序参数进行气溶胶感染,恒河猴在整个 20 min 感染过程中呼吸均匀状态良好。

Collison 气溶胶发生器使用压缩空气使液体雾化产生气溶胶颗粒,雾化过程由于剪切力、撞击力、浓缩作用等的影响,会导致部分微生物衰亡或失去活性^[15];同时 AGI-30 液体撞击式采样器在采样过程中存在微生物粒子撞击时的损伤、逃逸及再次气溶胶化等问题^[16],因此本研究中采集到的气溶胶中流感病毒滴度比气溶胶发生液中滴度低 $2.4 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ 。采用 Collison 发生器 (Input) 发生 SARS-CoV-2 气溶胶或东方马脑炎病毒,采用 AGI-30 液体撞击式采样器 (Output) 采集病毒气溶胶,Input 和 Output 病毒滴度之间具有良好的线性关系,分别损失 $2 \log_{10} \text{pfu}$ ^[17] 和 $3.4 \log_{10} \text{pfu}$ ^[18],这与本研究的实验结果相一致。

本研究中,在气溶胶发生 30 min 内,Collison 气溶胶发生器中流感病毒的存活率高于 50%,这与噬菌体 D29 的存活率基本相符^[19],Mainelis 等^[20]也报道了荧光假单胞菌经 Collison 气溶胶发生器雾化 90 min 后,活力损伤了 50%,然而 Hermann 等^[21]指出病毒在机械上比细菌更容易雾化,Ibrahim 等^[22]研究显示用 Collison 气溶胶发生器连续雾化 60 min 的过程中,H1N1 流感病毒活力出现轻微的损失,Kim

等^[23]报道有囊膜的冠状病毒在雾化 30 min 后,病毒存活率仅下降了 15%。高致病性禽流感、SARS-CoV-2、尼帕病毒、埃博拉病毒等重大呼吸道病毒性传染病有可能通过气溶胶传播,SARS-CoV-2 气溶胶吸入暴露剂量在 $3.7 \sim 4.2 \log_{10} \text{pfu}$ 可以感染非洲绿猴^[17], $2.6 \sim 4.7 \log_{10} \text{pfu}$ 的埃博拉病毒可以通过气溶胶感染恒河猴^[24], $2.0 \sim 3.0 \log_{10} \text{pfu}$ 的尼帕病毒可以通过气溶胶感染非洲绿猴^[25],这些呼吸道病毒对 NHP 的气溶胶暴露剂量在 $2.0 \sim 4.7 \log_{10} \text{pfu}$ 即可成功建立感染模型,因此尽管本研究中使用的我国自主研发的气溶胶暴露系统在气溶胶发生过程中流感病毒存活率方面与先进国际水平相比仍然存在较大差距,但若使用高浓度 ($10^7 \text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 以上) 病毒发生液产生气溶胶时,在 5~30 min 的感染窗口期内,实验猴吸入气溶胶 10~20 min,可以达到 10^4CCID_{50} 左右的感染剂量,理论上可以成功建立病毒气溶胶 NHP 感染模型。

使用高浓度流感病毒液产生气溶胶进行装置气密性测试评价时,未检测到具有感染性的流感病毒,表明该暴露装置没有发生气溶胶泄露,对生物安全三级实验室保护良好。嗜热脂肪芽孢杆菌对各种消毒方式具有较强的抵抗力,可以作为消毒效果验证的直接指标^[26]。以嗜热脂肪芽孢杆菌作为消毒指示菌的效果验证,表明使用 35% 过氧化氢采用汽化方式可对该系统进行有效地消毒,消毒效果完全。

综上所述,本研究在生物安全三级实验室中以流感病毒评价了非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行中病毒气溶胶的重要参数,包括气溶胶粒径、气溶胶输出气密性、均一性、稳定性等。这些广泛的基础性数据使我们能够对非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统的基本情况有客观深入的认识,并为有效地利用这一系统建立 SARA-CoV-2 和其它病毒气溶胶感染 NHP 模型提供了可能。

参考文献:

- [1] Wimer-Mackin S, Hinchcliffe M, Petrie CR, et al. An intranasal vaccine targeting both the Bacillus anthracis toxin and bacterium provides protection against aerosol spore challenge in rabbits [J]. Vaccine, 2006, 24(18): 3953-3963.
- [2] 郝新彦, 向志光, 高虹. 动物鼻式气溶胶暴露装置的运行效果评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 83-89.
- [3] 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.

- [4] 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.
- [5] Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model [J]. *Science*, 2020, 368(6494): 1012–1015.
- [6] Shan C, Yao YF, Yang XL, et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques [J]. *Cell Res*, 2020, 30(8): 670–677.
- [7] Pandrea I, Apetrei C, Dufour J, et al. Simian immunodeficiency virus SIVagm. sab infection of Caribbean African green monkeys; A new model for the study of SIV pathogenesis in natural hosts [J]. *J Virol*, 2006, 80(10): 4858–4867.
- [8] Deng W, Bao L, Liu J, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 818–823.
- [9] Deng W, Bao L, Gao H, et al. Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in rhesus macaques [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4400.
- [10] 温占波, 李娜, 李劲松, 等. 动物口鼻动态气溶胶暴露系统的建立与效果评价 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2012, 30(6): 402–405.
- [11] Wong BA. Inhalation exposure systems: design, methods and operation [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(1): 3–14.
- [12] 许定泽, 石伟平, 许宏伟, 等. 猕猴体温、心率和呼吸率的测定结果 [J]. *上海实验动物科学*, 1992, 12(4): 230–231.
- [13] Reed DS, Bethel LM, Powell DS, et al. Differences in aerosolization of Rift Valley fever virus resulting from choice of inhalation exposure chamber; implications for animal challenge studies [J]. *Pathog Dis*, 2014, 71(2): 227–233.
- [14] Totura A, Livingston V, Frick O, et al. Small particle aerosol exposure of African green monkeys to MERS-CoV as a model for highly pathogenic coronavirus infection [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(12): 2835–2843.
- [15] May KR. The Collison nebulizer: description, performance, and application [J]. *J Aerosol Sci*, 1973, 4(3): 235–243.
- [16] Haddrell AE, Thomas RJ. Aerobiology: experimental considerations, observations, and future tools [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(17): e00809–e00917.
- [17] Hartman AL, Nambulli S, McMillen CM, et al. SARS-CoV-2 infection of African green monkeys results in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal tracts [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(9): e1008903.
- [18] Phelps AL, O'Brien LM, Eastaugh LS, et al. Aerosol infection of Balb/c mice with eastern equine encephalitis virus; susceptibility and lethality [J]. *Virol J*, 2019, 16(1): 2.
- [19] 温占波. 分枝杆菌噬菌体 D29 气溶胶特性和动物气溶胶暴露系统的初步研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [20] Mainelis G, Berry D, An HR, et al. Design and performance of a single-pass bubbling bioaerosol generator [J]. *Atmos Environ*, 2005, 39(19): 3521–3533.
- [21] Hermann JR, Hoff SJ, Yoon, KJ, et al. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7): 4811–4818.
- [22] Ibrahim E, Harnish D, Kinney K, et al. An experimental investigation of the performance of a Collison nebulizer generating H1N1 influenza aerosols [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015, 29(6): 1142–1148.
- [23] Kim SW, Ramakrishnan MA, Raynor PC, et al. Effects of humidity and other factors on the generation and sampling of a coronavirus aerosol [J]. *Aerobiologia*, 2007, 23(4): 239–248.
- [24] Johnson E, Jaax N, White J, et al. Lethal experimental infections of Rhesus monkeys by aerosolized ebola virus [J]. *Int J Exp Pathol*, 1995, 76(4): 227–236.
- [25] Sarji SA, Abdullah BJ, Goh KJ, et al. MR imaging features of Nipah encephalitis [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2000, 175(2): 437–442.
- [26] 中华人民共和国卫生部. 消毒与灭菌效果的评价方法与标准: GB 15981–1995 [S]. 1995.

[收稿日期] 2021–08–06