中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价

作者：李庆妮，陈云丰，刘元浪，唐定，华婉璐，张瑞安，卢佳，李新国

网络首发日期：2022-06-20

引用格式：李庆妮，陈云丰，刘元浪，唐定，华婉璐，张瑞安，卢佳，李新国．非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价[J/OL]．中国比较医学杂志．https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4822.R.20220617.1715.004.html

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

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）

*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

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±0.03）μm，不同浓度气溶胶发生液产生的病毒气溶胶均能到达头罩，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

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 Rui'an[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 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 ± 0.03) μm. 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 results 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.

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
网络首发时间：2022-06-20 10:09:31 网络首发地址：https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4822.R.20220617.1715.004.html

Key words 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、肺脏给药、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。