

动物鼻式气溶胶暴露装置的运行效果评价

郝新彦, 向志光, 高 虹*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨动物鼻式气溶胶暴露装置能否正常运行并产生特定粒径大小的气溶胶颗粒, 探究运行过程中装置气溶胶气密性、分布均匀性及消毒剂对系统的消毒效果。**方法** 使用动物鼻式气溶胶暴露装置产生大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 气溶胶、鼠肝炎病毒 (mouse hepatitis virus) MHV-JHM 气溶胶, 分别用 75% 乙醇、3% 过氧化氢对系统进行消毒, 分别采集暴露舱内、易泄露处及消毒后的 *E. coli*、MHV-JHM。对采集的 *E. coli* 进行微生物培养; 对采集的 MHV-JHM 提取 RNA, 一步法 RT-PCR 检测样本中病毒 RNA。**结果** 装置产生的 *E. coli* 气溶胶颗粒中值直径为 $(1.27 \pm 0.61) \mu\text{m}$, 暴露舱内采样液涂板有菌落生成, 置于暴露舱不同端口的 NC 膜上菌落数一致, 易泄露处的沉降平皿上无菌落生长, 消毒后采样平皿上无菌落生长; 暴露舱内采样液中的 MHV-JHM 病毒 RNA 为阳性, 易发生泄露处采样液中病毒 RNA 为阴性, 消毒后采样液中病毒 RNA 为阴性。**结论** 动物鼻式气溶胶暴露装置能正常运行产生气溶胶; 在运行过程中, 暴露舱各端口有气溶胶通过并分布均匀, 气密性好; 使用相应的消毒剂可对系统进行有效消毒, 消毒效果完全。

【关键词】 动物鼻式气溶胶暴露装置; 气密性; 分布均匀性; 大肠杆菌; 鼠肝炎病毒 MHV-JHM

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0083-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.015

Evaluation of the operational effect of the animal nose-only inhalation exposure device

HAO Xinyan, XIANG Zhiguang, GAO Hong*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether the animal nose-only inhalation exposure device can operate normally and produce aerosol particles of a specific size, to explore the air tightness and uniform distribution of the aerosol during operation, and to examine the disinfection effect of disinfectant on the system. **Methods** *Escherichia coli* (*E. coli*) aerosol and mouse hepatitis virus MHV-JHM aerosol were developed by the nose-only inhalation exposure device, and a solution of 75% ethanol and 3% hydrogen peroxide was run through the nebulizer to disinfect the system. *E. coli* and MHV-JHM were collected respectively in the exposure chamber, at sites where leaking easily occurred, including after disinfection. The sampled *E. coli* was cultured. In addition, RNA from the sampled MHV-JHM was extracted and one-step RT-PCR was then used to test the presence of viral RNA from the samples. **Results** The result showed that the mass median aerodynamic diameter of the *E. coli* aerosol was $1.27 \pm 0.61 \mu\text{m}$, that colonies grew after coating of a plate with sample liquid collected in the exposure chamber, that the numbers of cultured colonies by NC membrane sampling of

【基金项目】“十三五”国家科技重大专项(编号:2018ZX10734401-011); 国家重点研发计划(编号:2016YFD0501003)。

【作者简介】郝新彦(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 感染性疾病动物模型制作。E-mail: 1905133927@qq.com

【通信作者】高虹(1968—), 女, 研究员, 研究方向: 药物临床前安全性评价。E-mail: gaoh@cnilas.org

different ports were similar, and that no colony growth was found on the sedimentation plate at sites where leaking readily occurred or on the sampling plates after disinfection. There was a positive result for MHV-JHM virus RNA of the sampling solution from the liquid impinger, while there were negative results for MHV-JHM virus RNA of the sampling solutions from the sites where leaking easily occurred and after disinfection. **Conclusions** The results show that the animal nose-only inhalation exposure device can operate normally and develop an aerosol that is passed through and distributed evenly in each port of the exposure chamber during operation; moreover, the device was shown to have good air tightness. The system can be effectively disinfected by using the corresponding disinfectant, and the disinfection effect is comprehensive.

【Keywords】 animal nose-only aerosol exposure device; air tightness; uniformity of distribution; *Escherichia coli*; mouse hepatitis virus MHV-JHM

动物鼻式气溶胶暴露装置(nose-only inhalation exposure device)是可模拟产生药物、毒物等化学物质及病毒、细菌等病原微生物气溶胶、气体或蒸汽的设备,仅将动物鼻部暴露于设定环境中,使动物吸入含有受试物的空气而达到定量攻毒感染^[1-3]。鼻式气溶胶暴露装置可通过装有细菌、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,实验动物吸入气溶胶后,在感染过程中避免了消化道、皮肤等其他暴露途径感染,感染方式与自然环境极为相似^[1-9]。为使用动物鼻式气溶胶暴露装置进行安全有效的病原微生物气溶胶感染,本实验选择大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus)MHV-JHM 作为模式微生物,分别代表细菌和病毒,使用此暴露装置发生细菌、病毒气溶胶,探究装置能否正常运行,同时探讨装置运行过程中产生的气溶胶粒径大小、装置气密性、气溶胶在暴露舱内的分布均匀性及消毒剂对装置的消毒效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

菌种、病毒:大肠杆菌(有氨苄抗性, Amp⁺)、鼠肝炎病毒毒株 MHV-JHM 毒株均引自中国医学科学院医学实验动物研究所。

1.2 主要试剂与仪器

LB 固体培养基(Amp⁺), LB 液体培养基(Amp⁺), DMEM 无血清高糖培养基, RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 9766, 北京宝日医生物技术有限公司), 一步法 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa, RR064A, 北京宝日医生物技术有限公司), 硝酸纤维素(NC)膜(Millipore, 0.45 μm)。ABI 7500 Real-time PCR 扩增仪(USA), 动物鼻式气溶胶暴露装置(美国 In-TOX P.O.BOX2070, NM505-832-5107); 动物鼻式气溶胶暴露装置主要由洁净压缩空气系统、气溶胶输

送管路、净化装置(真空泵、高效过滤器)、气溶胶发生装置(Lovelace 喷雾器、稀释器、混合器)、48 孔鼻式暴露舱、测试动物安置装置(动物固定管)、采样装置(ZR-A02 型安德森六级采样器、In-TOX 液体撞击采样器)和暴露系统控制柜组成(如图 1 所示)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物鼻式气溶胶暴露装置产生大肠杆菌气溶胶

(1)气溶胶粒径大小评价:将 6.5 mL 2×10^9 CFU/mL 大肠杆菌菌液倒入喷雾器小管内,稀释流量为 18.3 L/min,排气流量为 20 L/min,维持暴露舱微负压。设置装置在雾化压力为 5, 10, 15, 20, 25 PSI 下发生气溶胶,安德森六级采样器在总排气管路分别采样 20 min。采样平皿于 37℃ 下培养 12 h,评价在不同压力下采样气溶胶的粒谱分布。将各级采样平皿采集的气溶胶颗粒按级别分为 6 组数据,依据偏态分布 50% 中值直径计算公式算出发生气溶胶总粒子的中值直径。

(2)气溶胶到达暴露舱端口评价:将 6.5 mL 2×10^9 CFU/mL 大肠杆菌菌液倒入喷雾器小管内,稀释流量为 18.3 L/min,排气流量为 20 L/min,雾化压力为 20 PSI,采样流量为 2.2 L/min,维持暴露舱微负压,以 LB 液体培养基作为采样液,液体撞击采样器采样 20 min。分别取采样液 1 mL 涂于两个 LB 固体培养基上,于 37℃ 下培养 12 h,观察采样平皿上是否有菌落生长,评价暴露舱端口是否有气溶胶通过。

(3)气溶胶分布均匀性评价:48 孔动物鼻式暴露舱共 4 层,每层间隔 3 个端口放置一个固定管(如图 2 所示),NC 膜(1 cm × 1 cm)置于小鼠固定器前端端口处采样 20 min。将 NC 膜放于 LB 固体培养基上,于 37℃ 下培养 12 h,观察 NC 膜上是否有菌落生长并计数,评价暴露舱各端口是否都有气溶胶到达,气溶胶分布是否均匀。其他参数设置同 1.3.1 中的(2)。

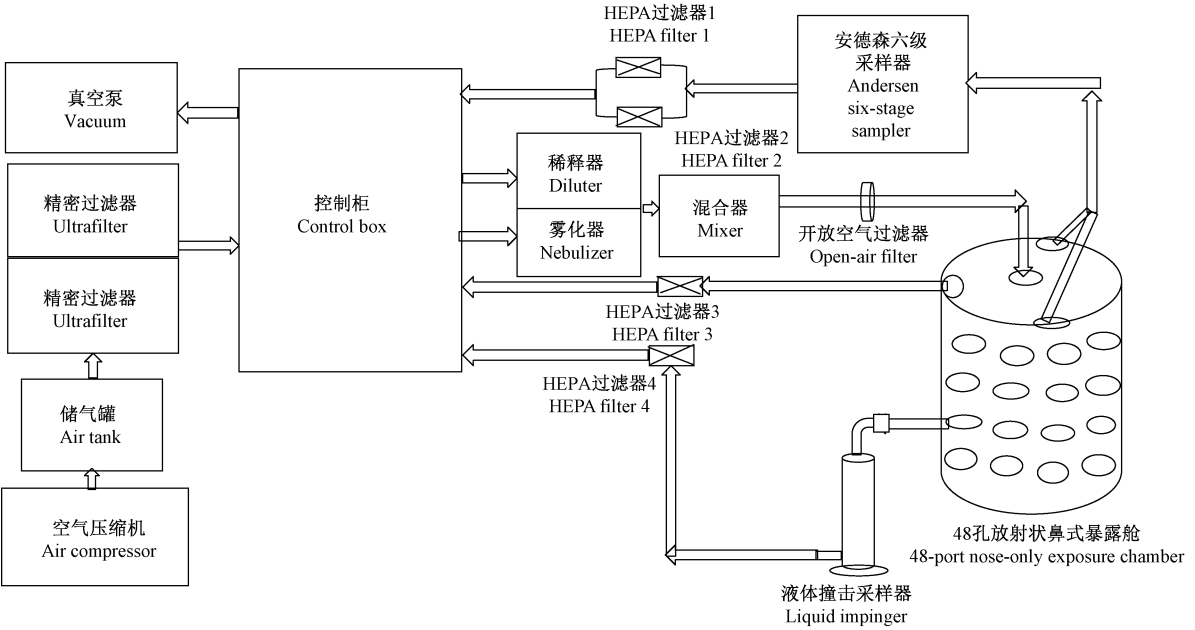
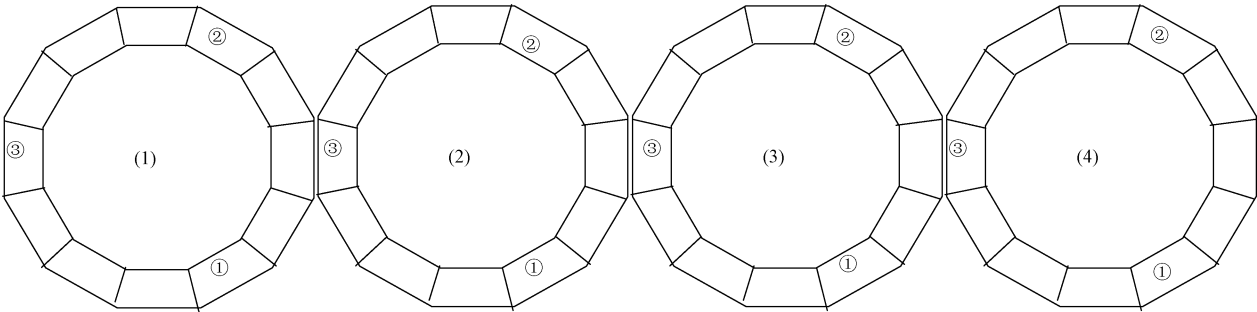


图 1 In-TOX 鼻式气溶胶暴露系统示意图

Figure 1 Schematic figure of the In-TOX nose-only inhalation exposure device



注:图中(1)~(4)分别为暴露舱的从上至下1~4层,在各层①、②、③暴露口放置小鼠固定器,并用NC膜进行采样。

图 2 48 孔鼻式暴露舱各层各端口分布图

Note. Figures (1) – (4) are representative of layers 1 – 4 of the exposure chamber from top to bottom. Animal tubes were placed on port ①, port ②, and port ③ of each layer. The NC membrane placed at the nozzle of animal tubes was used for sampling.

Figure 2 Each port of each layer in the 48-port nose-only exposure chamber

(4)装置气密性评价:在进行1.3.1中的(1)、(2)、(3)发生*E. coli*气溶胶操作时,在暴露装置易发生泄露的6处(雾化器旁、暴露舱上端排气处、安德森六级采样器旁、液体撞击采样器旁、高效过滤器旁、真空泵旁)摆放沉降皿,沉降20 min。将沉降皿于37℃下培养12 h,观察沉降皿上是否有菌落生长,评价暴露装置是否发生气溶胶泄露。

(5)装置消毒效果评价:大肠杆菌气溶胶停止运行后,空运行系统10 min,以排出含有大肠杆菌气溶胶的气体;将8 mL 75%乙醇加入喷雾器小管内,系统运行30 min进行消毒;消毒后空运行系统30 min,以排出含有乙醇的空气。消毒结束后,空运行

系统并使用安德森六级采样器采样20 min。采样平皿于37℃下培养12 h,观察平皿上是否有菌落生长,评价在装置产生大肠杆菌气溶胶后,75%乙醇对装置的消毒效果。其他参数设置同1.3.1中的(2)。

1.3.2 动物鼻式气溶胶暴露系统产生MHV-JHM气溶胶

(1)发生MHV-JHM气溶胶:取6.5 mL备好的 1.5×10^8 拷贝数/mL的MHV-JHM病毒液倒入喷雾器小管内,雾化流量为0.6 L/min,稀释流量为18.3 L/min,排气流量为20 L/min,雾化压力为20 PSI,采样流量为2.2 L/min,维持暴露舱微负压,以

DMEM 无血清高糖培养基为采样液,液体撞击采样器在暴露舱单个端口采样 20 min。收集采样液进行后续 RNA 提取[1.3.2 中的(3)]及一步法 RT-PCR 检测病毒 RNA 扩增的荧光值[1.3.2 中的(4)]。评价系统是否发生病毒气溶胶,及单个暴露舱端口是否有气溶胶气流通过。

(2)装置气密性评价:待系统停止气溶胶发生后,灭菌棉签采集易泄露的 5 处(开放空气过滤器处、雾化器小管处、液体撞击采样器处、暴露舱端口处、暴露舱上端进气管路处)MHV-JHM 气溶胶。将采样棉签放于 DMEM 无血清高糖培养基中,对培养基进行后续 RNA 提取[1.3.2 中的(3)]及一步法 RT-PCR 检测病毒 RNA 扩增的荧光值[1.3.2 中的(4)]。评价装置在运行过程中是否发生气溶胶泄露。

(3)提取 RNA:以 DMEM 无血清高糖培养基作为阴性对照,使用 RNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明书提取气溶胶发生液、采样器采样液及 1.3.2 第(2)条中所采集样本的 RNA,并于-30℃保存备用。

(4)一步法 RT-PCR 扩增:病毒 MHV-JHM 一步法 RT-PCR 的引物、探针由赛默飞世尔科技(中国)有限公司设计并合成,其序列见表 1。其中,荧光探针 5'端标记为 FAM,3'端标记为 BQ1。

以 1.3.2 第(3)条中提取的 RNA 为模板,以 ddH₂O 设置阴性对照,使用一步法 RT-PCR 试剂盒,应用 ABI 7500 Real-time PCR 系统进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系如表 2 所示,共 20.0 μL。RT-PCR 反应程序为:反转录反应(42℃,5 min;95℃,10 s),1 个循环;PCR 反应(95℃,5 s;60℃,34 s),共 40 个循环。进行病毒 RNA 检测。

(5)装置消毒效果评价:病毒气溶胶停止运行后,空运行系统 10 min,以排出含有病毒气溶胶的气体;将 6.5 mL 3% 过氧化氢溶液加入喷雾器小管内,系统运行 30 min 进行消毒;消毒后空运行系统 30 min,以排出含有过氧化氢的空气。消毒结束后,空运行系统,以 DMEM 无血清高糖培养基为采样液,液体撞击采样器在暴露舱单个端口采样 20 min。收集采样液进行后续 RNA 提取[1.3.2 中的(3)]及一步法 RT-PCR 检测病毒 RNA 扩增的荧光值[1.3.2 中的(4)],评价在装置产生 MHV-JHM 病毒气溶胶后,3% 过氧化氢溶液对装置的消毒效果。其他参数设置同 1.3.2 中的(1)。

2 结果

2.1 气溶胶粒径大小评价结果

由表 3 和图 3 可知,在雾化压力为 5~25 PSI 条件下,安德森六级采样器所采集的气溶胶颗粒主要集中在分布在 5 级(1.1~2.1 μm)、6 级(0.65~1.1 μm),中值直径在(1.27±0.61) μm。提示鼻式气溶胶暴露装置能正常运行,产生中值直径为(1.27±0.61) μm 气溶胶颗粒。

2.2 气溶胶到达暴露舱端口评价结果

液体撞击采样器采样 *E. coli* 气溶胶,取采样液 1 mL 分别涂两平板,培养后两平板上均有菌落生长,菌落数分别为 64、84。ABI 7500 Real-time PCR 系统检测到液体撞击器采样样本中的 MHV-JHM RNA 为阳性(如图 4 所示)。提示装置能正常运行发生细菌、病毒气溶胶,且产生的气溶胶可以到达暴露舱端口。

2.3 气溶胶分布均匀性评价结果

NC 膜上有菌落生长,菌落数均在 10 左右,计数结果如表 4 所示,暴露舱各端口菌落数一致。提示产生的气溶胶均到达暴露舱各端口,且气溶胶分布均匀。

表 1 MHV-JHM 病毒 RT-PCR 扩增引物及荧光探针
Table 1 Primers and fluorescent probes for RT-PCR of MHV-JHM

探针/引物名称		序列(5'→3')
Probe/Primer names		Sequences (5'→3')
MHV-JHM F		GGAACCTCTCGTTGGGCATTATACT
MHV-JHM R		ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA
探针	Probe	ACATGCTACGGCTCGTGAACCGAACTGT

表 2 一步法 RT-PCR 反应体系
Table 2 Reaction system of one-step RT-PCR

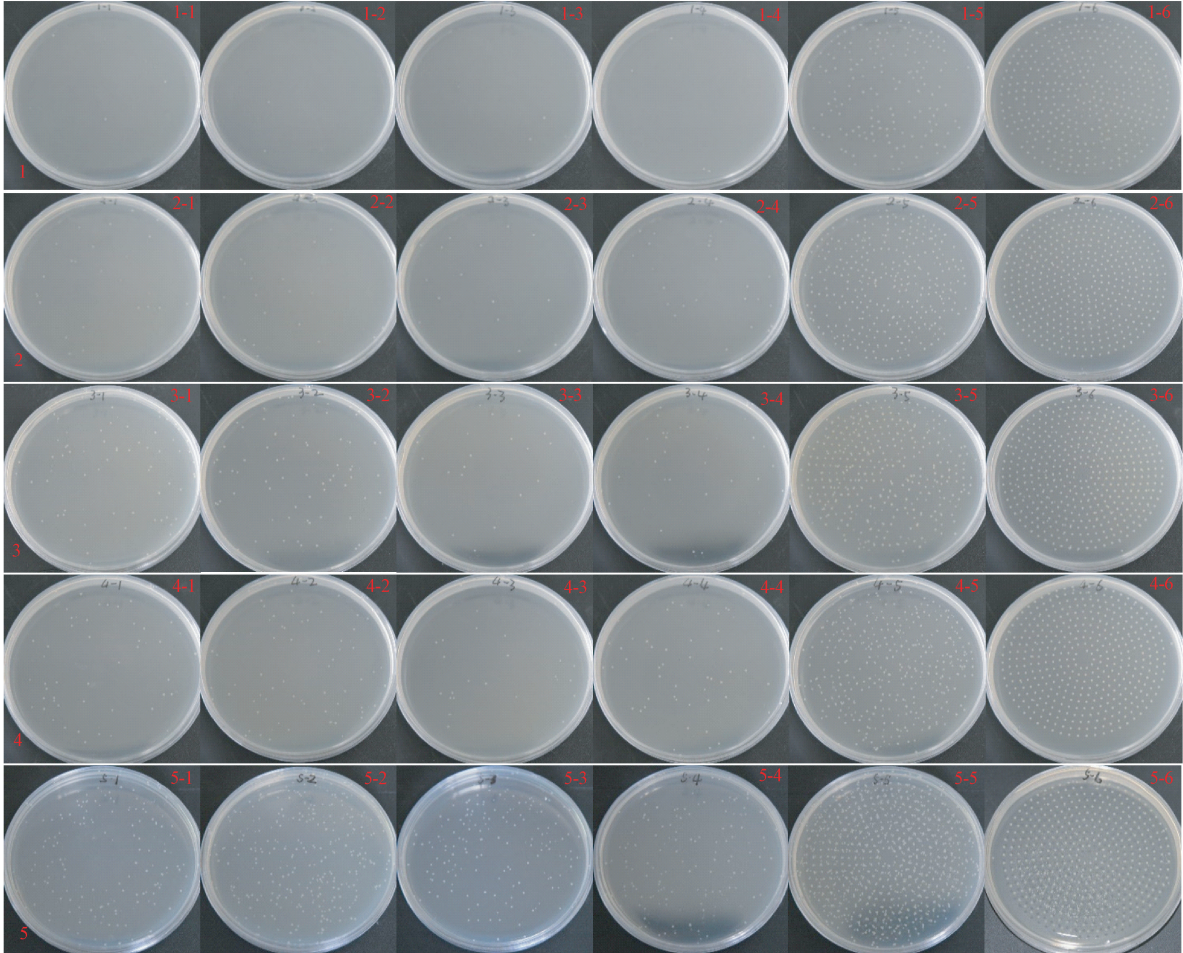
试剂	使用量(μL)
Reagents	Reaction volumes
One step RT-PCR buffer III (2×)	10.0
无 RNA 酶的 ddH ₂ O	
RNase-free ddH ₂ O	5.2
正向 PCR 引物(10 μmol/L)	
PCR forward primer (10 μmol/L)	0.4
反向 PCR 引物(10 μmol/L)	
PCR reverse primer (10 μmol/L)	0.4
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μL)	0.4
PrimeScript RT enzyme mix II	0.4
ROX reference dye II (50×)	0.4
探针	
Probe	0.8
总 RNA	
Total RNA	2.0

表 3 安德森六级采样器捕获粒径分布情况及中值直径结果

Table 3 Particle size distribution and mass median aerodynamic diameter of aerosol sampled by Andersen six-stage sampler											
		雾化压力 (PSI) Nebulizer pressure									
分级 Stage	粒径大小 分布 (μm) Particle size distribution	5		10		15		20		25	
		菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	累积频数 Cumulative frequency	菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	累积频数 Cumulative frequency	菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	累积频数 Cumulative frequency	菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	累积频数 Cumulative frequency	菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	累积频数 Cumulative frequency
1 级	Stage 1	> 7.0	3	3	26	26	81	81	57	57	159
2 级	Stage 2	4.7 ~ 7.0	2	5	19	45	77	158	76	133	324
3 级	Stage 3	3.3 ~ 4.7	2	7	16	61	22	180	26	159	176
4 级	Stage 4	2.1 ~ 3.3	4	11	26	87	34	214	53	212	151
5 级	Stage 5	1.1 ~ 2.1	150	161	303	390	346	560	353	565	487
6 级	Stage 6	0.65 ~ 1.1	336	497	402	792	401	961	407	972	405
P_{50}		0.77		0.66		1.87		1.88		1.18	

注:中值直径: $P_{50} = L + i/f(50\% n - c)$, 其中, L 为中位数所在组段的下限; i 为该组段的组距; f 为中位数所在组段的频数; n 为总的累积频数; c 为小于 L 各组段的累积频数。

Note. Mass median aerodynamic diameter (MMAD): $P_{50} = L + i/f(50\% n - c)$. In the formula, L: lower limit of group segment with median; i: the group range of the group segment with median; f: frequency of the group segment with median; n: total cumulative frequency; c: cumulative frequency of each group less than L.

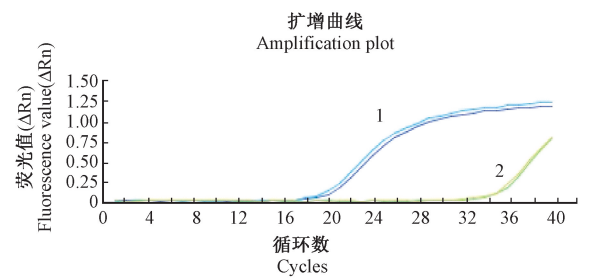


注:标号 1~5:分别是 In-TOX 动物鼻式气溶胶暴露系统在雾化压力为 5,10,15,20,25 PSI 条件下所产生的 *E. coli* 气溶胶结果图。第一行(标号 1):1-1 至 1-6 分别是雾化压力为 5 PSI 条件下,安德森六级采样器从 1 级到 6 级采样平皿的菌落数;第二行至第五行(标号 2~5):每行内各标号与第一行同理,分别是雾化压力为 10,15,20,25 PSI 条件下,安德森六级采样器从 1 级到 6 级采样平皿的菌落数。

图 3 安德森六级采样器采样气溶胶分布结果

Note. Labels 1~5: The distribution of *E. coli* aerosol sampled by the In-TOX animal nose-only inhalation exposure system under the conditions of 5, 10, 15, 20, and 25 PSI nebulizer pressure. In the first row (label 1), 1-1 to 1-6 represent the numbers of colonies from stage 1 to stage 6 of the Andersen six-class sampler under the condition of 5 PSI nebulizer pressure. For the second to the fifth rows (labels 2~5), equivalent values are presented for nebulizer pressures of 10, 15, 20, and 25 PSI, respectively.

Figure 3 The distribution result of aerosol sampled by the Andersen six-stage sampler



注:1;MHV-JHM 病毒发生液;2;液体撞击器采集 MHV-JHM 病毒气溶胶。

图 4 实时荧光定量 PCR 实验

Note. 1; MHV-JHM virus liquid; 2; MHV-JHM aerosol sampled by liquid impinger.

Figure 4 Test of real-time fluorescence quantitative PCR

表 4 NC 膜上的菌落数
Table 4 Number of colonies on NC membrane

暴露舱层数 The layer of the exposure chamber	暴露舱各层端口 The port of each layer			均值 Mean
	①	②	③	
1	10	9	10	9.7
2	11	10	10	10.3
3	10	10	11	10.3
4	10	9	9	9.3

2.4 装置气密性评价结果

放置在暴露装置易发生泄露部位的 6 个沉降平板上大肠杆菌菌落计数为 0;一步法 RT-PCR 检测易泄露处(开放空气过滤器处、雾化器小管处、液体撞击采样器处、暴露舱端口处、暴露舱上端进气管路处)采样样本中的病毒 RNA 为阴性。提示鼻式气溶胶暴露装置在发生气溶胶过程中未发生气溶胶泄露,气密性良好。

2.5 装置消毒效果评价结果

对系统进行消毒后,放置在安德森六级采样器上的 6 个采样平皿上大肠杆菌菌落计数为 0;一步法 RT-PCR 检测装置进行消毒后的采样样本中的病毒 RNA 为阴性。表明 *E. coli* 气溶胶、MHV-JHM 气溶胶分别在 75% 乙醇、3% 过氧化氢运行后可被彻底杀灭,提示使用相应的消毒剂可对系统进行有效的消毒,消毒效果完全。

3 讨论

本实验选择大肠杆菌和鼠肝炎病毒分别代表细菌和病毒发生气溶胶,使用安德森六级采样器、液体撞击采样器、NC 膜进行采样。安德森六级采样器采集粒谱范围广、采样效率高、微生物失活率低、敏感性高^[10-11],故采样平皿培养后的菌落计数

结果明显;液体撞击采样器采样时间通常为 1 ~ 10 min 时采样效率较高^[12-13],之前研究表明,采样流量多设置为 10 L/min 左右^[11];但在此鼻式气溶胶暴露装置中,液体撞击采样器所在采样管路本身采样流量小,最大为 2.2 L/min,为增加采样量,实验中采样时间长,为 20 min,存在微生物粒子撞击时的损伤、微生物粒子逃逸和再次气溶胶化、收集介质蒸发等问题,采样效率低,故采集到的细菌气溶胶经培养后活菌菌落数较少^[11, 14]。对液体撞击采样器采集到的病毒气溶胶,使用灵敏度高、高效快速的实时荧光定量 RT-PCR 法进行检测。本次实验因 NC 膜易于裁剪、使用方便,故使用 NC 膜进行采样;LB 液体培养基浸润的 NC 膜(1 cm × 1 cm)放在动物固定管喷嘴处,面积较小,且不宜长时间采样、采样效率低^[11],故菌落计数较少。

对于安德森六级采样器 1 级(> 7.0 μm)、2 级(4.7 ~ 7.0 μm)相当于人体的鼻、咽、喉等上呼吸道;3 ~ 6 级相当于人体的下呼吸道;3 级(3.3 ~ 4.7 μm)相当于人体的气管、支气管,4 级(2.1 ~ 3.3 μm)相当于人体的二级支气管,5 级(1.1 ~ 2.1 μm)相当于人体的终末细支气管,6 级(0.65 ~ 1.1 μm)相当于人体的肺泡^[15]。研究表明,气溶胶粒子在人体呼吸器官的沉积分节与其粒子大小有关,5 ~ 10 μm 的易沉着于气管和支气管,而 1 ~ 5 μm 的粒子可直接侵入肺泡^[16-20]。现已评价 In-TOX 鼻式气溶胶暴露装置能正常运行,产生中值直径为(1.27 ± 0.61) μm 的气溶胶颗粒,颗粒大小可直接侵入肺泡,所发生的气溶胶满足气溶胶吸入感染实验的要求;产生的气溶胶可以到达且均匀分布到暴露舱各个端口,运行过程中未发生气溶胶泄露,暴露装置气密性良好,使用相应的消毒剂可对系统进行有效的消毒,消毒效果完全。在实验过程中,用以发生气溶胶的悬浮液用量较少;鼻式暴露舱能同时感染多只动物,安全性、准确性提高,动物鼻式气溶胶暴露装置在微生物气溶胶感染中受到越来越多的关注。本研究为动物鼻式气溶胶暴露装置安全有效地用于实验动物高致病性病原微生物气溶胶的吸入感染研究提供依据。

参考文献:

[1] Belser JA, Gustin KM, Katz JM, et al. Influenza virus infectivity and virulence following ocular-only aerosol inoculation of ferrets [J]. J Virol, 2014, 88(17): 9647 - 9654.
[2] Bowen LE, Katie R, Trombley JE, et al. Development of a

- murine nose-only inhalation model of influenza; comparison of disease caused by instilled and inhaled A/PR/8/34 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 74.
- [3] 郝新彦, 张元慧, 高虹. 动物气溶胶暴露装置的特点及其应用 [J]. 中国医学装备, 2018, 15(1): 127–130.
- [4] 杨玉琴, 徐春华, 朱召芹, 等. 三个品系小鼠流感病毒气溶胶感染模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 145–149.
- [5] Tuttle RS, Sosna WA, Daniels DE, et al. Design, assembly, and validation of a nose-only inhalation exposure system for studies of aerosolized viable influenza H5N1 virus in ferrets [J]. Virol J, 2010, 7: 135.
- [6] Wong BA. Inhalation exposure systems: design, methods and operation [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(1): 3–14.
- [7] McDonald RS, Sambol AR, Heimbuch BK, et al. Proportional mouse model for aerosol infection by influenza [J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(4): 767–778.
- [8] Lednicky JA, Hamilton SB, Tuttle RS, et al. Ferrets develop fatal influenza after inhaling small particle aerosols of highly pathogenic avian influenza virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) [J]. Virol J, 2010, 7: 231.
- [9] Stone BR, Heimbuch BK, Wu CY, et al. Design, construction and validation of a nose-only inhalation exposure system to measure infectivity of filtered bioaerosols in mice [J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(4): 757–766.
- [10] ElHansy MHE, Boules ME, Farid H, et al. *In vitro* aerodynamic characteristics of aerosol delivered from different inhalation methods in mechanical ventilation [J]. Pharm Dev Technol, 2017, 22(6): 844–849.
- [11] 王彦杰, 李琳, 许光素, 等. 微生物气溶胶采集技术的特点及应用 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 701–709.
- [12] Paul D, Kristin B, Brandi D, et al. Recovery efficiencies for *Burkholderia thailandensis* from various aerosol sampling media [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 78.
- [13] Zhen H, Han T, Fennell DE, et al. Release of free DNA by membrane-impaired bacterial aerosols due to aerosolization and air sampling [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(24): 7780–7789.
- [14] Haddrell AE, Thomas RJ. Aerobiology: experimental considerations, observations, and future tools [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(17): e00809-17.
- [15] 张松乐, 童咏仪, 姜黎, 等. 国产六级安德森空气微生物采样品的简化使用效果观察 [J]. 中国公共卫生, 1994, 10(10): 454–455.
- [16] Nave R, Mueller H. From inhaler to lung: clinical implications of the formulations of ciclesonide and other inhaled corticosteroids [J]. Int J Gen Med, 2013, 6: 99–107.
- [17] Lewis DA, O'Shea H, Church TK, et al. Exploring the impact of sample flowrate on *in vitro* measurements of metered dose inhaler performance [J]. Int J Pharm, 2016, 514(2): 420–427.
- [18] Alonso C, Raynor PC, Davies PR, et al. Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135675.
- [19] Gustin KM, Belser JA, Wadford DA, et al. Influenza virus aerosol exposure and analytical system for ferrets [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2011, 108(20): 8432–8437.
- [20] Bohannon JK, Lackemeyer MG, Kuhn JH, et al. Generation and characterization of large-particle aerosols using a center flow tangential aerosol generator with a non-human-primate, head-only aerosol chamber [J]. Inhal Toxicol, 2015, 27(5): 247–253.

[收稿日期]2018–05–17