

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.6.08

# 疫苗气溶胶免疫技术研究进展

冯志新

(江苏省农业科学院兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,南京 210014)

[收稿日期] 2020-08-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)06-0053-08 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 气溶胶免疫是一种潜在的替代传统注射免疫的新方法,围绕气溶胶免疫的特征、机理、实施方法、影响因素、应用情况及前景作以综述,以期为人类和动物新型疫苗研制及免疫技术创新提供参考。

**[关键词]** 气溶胶;疫苗;免疫技术

## Research Progress of Aerosol Vaccination Technology

FENG Zhi-xin

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Aerosol vaccination is a potential new method to replace traditional parenteral immunization. In this paper, the characteristics, mechanism, implementation method, influencing factors, application and prospect of aerosol vaccination are reviewed to provide information for the development of new vaccines and vaccination technologies.

**Key words:** aerosol; vaccine; vaccination technology

绝大多数的病原体均是利用呼吸道黏膜作为进入体内的入口,因此,呼吸道病毒和细菌的感染是世界范围内人类及动物发病和死亡的主要原因<sup>[1,2]</sup>。疫苗免疫是预防传染病的主要策略。气溶胶免疫是一种潜在的替代传统注射免疫的新方法。整个气道与肺中含有大量的抗原提呈细胞和支气管相关淋巴组织,有利于诱导体液免疫与细胞免疫。将疫苗制备成气溶胶形态,通过模拟自然感染

来诱导免疫,可能是一种潜在的强有力的快速免疫接种方法。但要将疫苗制备成气溶胶形态,并通过吸入方式输送疫苗颗粒,有许多因素需要考虑,包括气溶胶的发生方式、免疫方式、影响因素等。本文将围绕疫苗气溶胶疫苗免疫技术的研究进展作以综述。

### 1 气溶胶的基本概述

气溶胶是以固态或液态的微粒或微滴为分散

**基金项目:** 江苏省农业科技自主创新资金项目“猪用疫苗智能自动化气溶胶免疫技术研制”(CX(20)1006);国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项“非洲猪瘟早期诊断试剂及亚单位疫苗研发”(2019YFE0107300)

**作者简介:** 冯志新,研究员,从事动物黏膜疫苗与黏膜诊断技术研究工作。E-mail: fzxjaas@163.com

相,均匀分散悬浮于空气中,以空气为分散介质所形成的胶态分散系统。气溶胶中微粒或微滴的空气动力学粒径通常在  $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$  之间,其大多在  $10 \mu\text{m}$  以下。根据气溶胶中颗粒物的物理状态不同,可将气溶胶分为三类:(1) 固态气溶胶,如烟和尘;(2) 液态气溶胶,如雾;(3) 固液混合态气溶胶,如烟雾和霾。对于气溶胶的研究已渗入到人类生活的许多领域,如工业气溶胶、农业气溶胶、气象气溶胶、运输业气溶胶、放射性气溶胶、微生物气溶胶等。本文综述的气溶胶免疫重点围绕微生物气溶胶进行讨论。

## 2 微生物气溶胶感染

微生物气溶胶是一群形体微小、构造简单的单细胞或接近单细胞的生物悬浮于空气中所形成的胶体体系。简单地说,指含有病毒或细菌等微生物的气溶胶,按其形成组分可分为病毒气溶胶、细菌气溶胶和真菌气溶胶。大多数微生物气溶胶具有传染性,通过飞沫、飞沫核和尘埃的方式,经空气传播,导致传染病的发生。通过气溶胶传播感染的疾病很多,人类疾病如流感、腮腺炎、麻疹、结核、新型冠状病毒肺炎等;动物疾病如猪瘟、猪丹毒、伪狂犬病、巴氏杆菌病、猪流感、猪支原体肺炎、口蹄疫、牛肺疫、犬瘟热、禽痘、鸡新城疫、鸡传染性喉气管炎等。但不同的病原微生物在气溶胶中的生存能力及传播能力存在较大的差异,如 H1N1 流感病毒可通过空气传播至少  $10 \text{ 米}^{[3]}$ ,猪肺炎支原体在空气中扩散  $4.7 \text{ 公里}$  仍具感染性<sup>[4-5]</sup>。口蹄疫病毒在空气中随风传播存活的最长距离可达  $60 \sim 100 \text{ 公里}^{[6]}$ 。因此,对于微生物气溶胶的研究,首先聚焦于疾病的感染模型,如结核、布病、炭疽等许多疾病已采用气溶胶暴露给动物的方法来模拟自然感染,从而建立动物发病模型<sup>[7-10]</sup>。而对于微生物气溶胶免疫虽然与感染特征相近,但研究角度与机理不尽相同。

## 3 气溶胶免疫的机理

微生物通过气溶胶感染时,首先在呼吸道局部繁殖,然后再扩散至全身。因此,局部黏膜有无免疫力对于抗感染是相当重要的。局部免疫力包括

局部分泌性抗体(SIgA,即分泌性免疫球蛋白 A 为主)和局部免疫活性细胞两个方面,局部黏膜的免疫力可直接杀死入侵的微生物,阻止其繁殖,防止感染。微生物气溶胶免疫的重要机理就表现在这一点。动物实验证明,微生物气溶胶免疫主要涉及头部、气管旁、咽喉后壁、肺门、纵隔等处的局部淋巴结,重点诱导气道中鼻相关淋巴组织(NALT)和支气管相关淋巴组织(BALT)。它可以非选择性地传递细菌、病毒的抗原给巨噬细胞和树突状细胞,由这些细胞提呈抗原,并进一步产生免疫应答:产生特异性淋巴因子、调控 B 细胞的分化、合成和分泌 SIgA,从而在黏膜表面形成一层免疫保护层,既可抑制细菌、病毒粘附于黏膜上皮,还可中和黏膜上皮内的病毒,具有显著的抗菌抗病毒作用;另外,气溶胶免疫在黏膜的局部免疫反应中,还能诱导产生细胞免疫应答,例如对抗原成分应答的 CD8 + 细胞毒性淋巴细胞(CTL),能产生巨噬细胞激活因子及杀伤细胞内病原体的细胞因子等,并且通过呼吸道免疫接种可产生肺记忆 T 细胞,这些肺驻留 T 细胞的表型与外周血中的 T 细胞不同,它们对呼吸道病原的反应更强烈,从而对维持抗原刺激和第二次免疫应答中起重要的作用,提供了额外的感染保护<sup>[11-12]</sup>。同时,当进行气溶胶免疫时, $5 \mu\text{m}$  以下的气溶胶抗原颗粒可随着呼吸运动沉积到细支气管和肺泡表面,成人的肺泡约有 3 亿个,其表面积约为 30 平方米,而且肺泡壁上有长达 2000 公里的毛细血管网,疫苗抗原可以很快进入血液,激活全身的系统免疫,而且由于疫苗抗原的接触面积大、时间长、吸收率高,免疫刺激性也必然增强,机体的防护反应也得以加强。因此简单来说,疫苗以气溶胶形式进入体内后,一方面在呼吸道黏膜局部刺激吞噬细胞分化浆细胞,产生局部抗体和干扰素的作用,增强呼吸道黏膜的保护力;另一方面被吞噬细胞吞噬后转运到淋巴器官或血液,产生全身体液免疫。而常规的肌肉注射免疫,主要是形成全身体液免疫(主要为免疫球蛋白 G),只有在病原微生物繁殖进入血液循环后,才能将其中和或消灭,所以只能在感染后起到控制发展和缩短病程的作用。

为此,人们认为气溶胶免疫途径优于其他免疫途径。

另外,由于禽类与哺乳动物均存在共同黏膜免疫系统(CMIS)<sup>[13-14]</sup>。呼吸道免疫后,机体针对同一抗原致敏的部分淋巴细胞可以回流到胃肠道、生殖道等多个效应部位 SIgA,发挥特异性免疫反应<sup>[15-16]</sup>。因此,呼吸道气溶胶免疫后可对消化道或生殖道的病原感染产生一定的免疫保护。

#### 4 气溶胶免疫的方法

气溶胶免疫与鼻腔免疫均属于呼吸道免疫,但由于两者免疫后疫苗抗原的分布位置不同。鼻腔免疫对疫苗液滴的大小要求不高,疫苗抗原主要分布在鼻道。气溶胶免疫则需要通过特殊的气溶胶发生装置将疫苗分散成 10 微米以下液相或固相的气溶胶形态,随着接种者的呼吸运动,疫苗抗原被输送到从鼻道、气管、支气管甚至肺泡等部位,覆盖整个呼吸道。因此气溶胶免疫相比鼻腔免疫,在免疫设备、免疫方法与免疫参数方面均存在特殊的要求。

在免疫设备方面,根据雾化发生的原理以及气溶胶颗粒大小的不同,已有多个装置或设备用于气

溶胶疫苗的发生。通常来说,气溶胶发生装置主要分为三类:液相雾化器、计量式吸入器和干粉吸入器(表 1)。目前用于人类与动物疫苗雾化免疫的装置主要采用液相雾化器和干粉吸入器。其中商业化使用的液相雾化器按气溶胶发生方式又可分为空气喷射式雾化器和超声波雾化器两种。空气喷射式雾化器常用于疫苗的雾化免疫,如德国的 Pari 系列雾化器、加拿大的 Aero Eclipse 雾化器(Trudell Medical International)、英国的 Halolite 雾化器(Medic - Aid Limited)等。但由于鼠类、鸟类和哺乳动物不仅存在种间差异,在呼吸系统的结构方面也存在明显差异,从而导致生物转化率、呼吸模式和组织分布的差异<sup>[17]</sup>。因此,用于气溶胶免疫的雾化发生装置必须针对特定种属动物专门设计<sup>[18]</sup>。国内军事医学科学院将空气喷射式雾化器 DV40 与控制系统结合,设计了可对实验过程实时监测的鼠类动物气溶胶吸入暴露装置<sup>[19]</sup>。笔者根据畜禽养殖现场条件与自动化免疫的需求,设计了适用于猪群体免疫的系列液相雾化设施与装置<sup>[20-23]</sup>。

表 1 气溶胶发生装置比较

Tab1 Comparison of aerosol vaccine or drug delivery devices

发生装置	特征	优点	缺点
液相雾化器	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 适用于可溶性的水相疫苗</li> <li>• 需要泵</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 可适用于儿科、老年和急诊</li> <li>• 可连续长时间递送</li> <li>• 可多次吸入</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 体积大,设备复杂</li> <li>• 疫苗与药液浪费</li> <li>• 易受污染</li> <li>• 雾化中疫苗活性可能存在丢失</li> </ul>
计量式吸入器	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 计量式</li> <li>• 需要推进剂溶液、悬液成份</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 便携、便宜、技术成熟</li> <li>• 剂量准确</li> <li>• 无残留污染</li> <li>• 可使用助溶剂、表面活性剂</li> <li>• 独立包装,不受光照影响</li> <li>• 吸入率高</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 手 - 嘴协调能力差</li> <li>• 需要推进剂</li> <li>• 推进剂使用对疫苗抗原及环境的副作用</li> </ul>
干粉吸入器	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 可计量式</li> <li>• 无推进剂</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 稳定性好</li> <li>• 剂量准确</li> <li>• 高剂量承载能力</li> <li>• 便于吸入剂量的调节</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 设备更复杂</li> <li>• 剂型中辅料的选择较少</li> </ul>

来源:Lu D 等. 2012<sup>[24]</sup>

在免疫方法方面,人用疫苗主要聚焦于麻疹、结核和流感疫苗的气溶胶免疫测试。其中一种可吸入的麻疹干粉疫苗已完成了一期临床,并证实安

全性和高水平抗体的产生<sup>[25]</sup>。对于家禽,由于它们较小的体型和通过肺部的单向气流,有利于气溶胶疫苗在呼吸道的沉积,加上家禽养殖密度大、禽

笼设施较小,实施气溶胶免疫更具可行性。但事实上,对家禽的呼吸道免疫常采用喷雾接种的标准,这里的喷雾接种指的是 1 ~ 200 微米的液体颗粒,这种液体颗粒并不专门用于吸入,同时也能通过眼、口和鼻黏膜诱导免疫。与鸡的喷雾免疫不同,猪用疫苗主要尝试气溶胶免疫,如胸膜肺炎放线杆菌<sup>[26]</sup>、猪瘟疫苗<sup>[27]</sup>、猪流感疫苗<sup>[28]</sup>和猪支原体肺炎活疫苗<sup>[29]</sup>,且以空气喷射式雾化器免疫为主,但目前均在试验阶段,尚无商业化的猪用气溶胶疫苗。

在免疫参数方面,由于个体呼吸速率的变化、免疫期间疫苗的损失以及实际沉积到肺部疫苗的数量,都可能导致诱导的免疫反应具有较高的变动性<sup>[30]</sup>,因此,在气溶胶免疫前需要对疫苗的免疫剂量进行测算。加拿大学者根据气溶胶疫苗的输血量、粒径分布、免疫人群的呼吸参数(潮气量、呼吸频率)等在体外预估了成人与儿童雾化接种麻疹疫苗的免疫剂量<sup>[31]</sup>。我国在 60 年代也根据免疫个体的潮气量、个体数量、免疫空间容积以及气溶胶疫苗单位输血量等因素建立了几个医学气溶胶的计算方法,有的是适应边喷边吸模式,也有的是适合先喷后吸模式<sup>[32]</sup>。但是对于气溶胶免疫剂量的科学计算决非仅在于其计算方法或计算公式,还涉及到对气溶胶发生与存在过程中的很多影响因素。

## 5 气溶胶免疫的影响因素

气溶胶疫苗颗粒的大小是影响气溶胶免疫成败的首要因素。成功的气溶胶免疫首先需要将疫苗抗原颗粒输送到合适的靶组织。雾化颗粒在人和动物呼吸道中的沉降位置和沉降效率受其粒径(空气动力学参数)、粒径分布、颗粒形状和密度等因素的影响<sup>[33]</sup>。对于人的呼吸道,1 ~ 5  $\mu\text{m}$  气溶胶颗粒可以到达细支气管和肺泡,然而 > 10  $\mu\text{m}$  的颗粒只能存在于上呼吸道鼻腔<sup>[34-35]</sup>。鸡的呼吸道相对短且直,另配有气囊结构,对于不同粒径气溶胶颗粒的沉积没有绝对的范围限定,且 1 日龄鸡由于存在口腔呼吸,会出现大颗粒进入下呼吸道的现象,但总体而言,大于 5  $\mu\text{m}$  的颗粒也较难进入肺和肺泡<sup>[36]</sup>。猪的呼吸道解剖结构又具有特殊性,但

可以参考气溶胶颗粒在人呼吸道的沉积相关性<sup>[29]</sup>。气溶胶疫苗在呼吸道沉积的位置也影响了宿主的免疫应答与保护,因此气溶胶免疫不仅是要将疫苗抗原输送进呼吸道,更重要的是取决于目标病原体和诱导免疫的部位。如流感疫苗沉积到气管/支气管或肺泡深部均可诱导较强的免疫保护。然而,对于乙肝疫苗而言,沉积在气管/支气管并不能产生免疫保护,而在肺泡深部沉积后免疫保护反应却相当明显<sup>[37]</sup>。一般来说,对于预防百日咳博德特氏菌和肺炎衣原体等上呼吸道感染的病毒或细菌需要更大的粒子(> 5  $\mu\text{m}$ )的疫苗,而对于肺炎链球菌、炭疽杆菌等下呼吸道感染的病原则需要小于 3  $\mu\text{m}$  的微粒<sup>[38]</sup>。气溶胶疫苗颗粒的粒径与粒度分布,不仅与疫苗液滴的表面张力、粘度及饱和蒸汽压相关,而且也受不同的雾化方式以及雾化环境中温湿度的影响<sup>[39]</sup>。

另外,气溶胶免疫还需保持疫苗抗原的活性,以保证有效免疫应答的产生。对气溶胶疫苗活性和抗原性的影响来自于整个雾化过程的不同阶段。雾化早期,主要由雾化作用产生的热量、机械和剪切应力,可以快速地降解疫苗蛋白,使其失活。当气溶胶发生后,主要来自于环境压力,包括高盐、干燥和紫外线辐射等<sup>[40-41]</sup>。微生物气溶胶颗粒的大小也影响气溶胶疫苗的活性,更大的颗粒含有更多的细菌聚集在一起,外层的细菌在气溶胶化过程中牺牲,使内层的细菌得以存活<sup>[41-42]</sup>。

免疫个体的宿主因素同样是影响气溶胶免疫成败的关键。制备粒径大小合适的气溶胶疫苗可以将疫苗抗原沉积到动物呼吸道内合适的部位,但仍必须逃避呼吸道的各种防御机制,如黏液、纤毛运动、黏膜抗体、酶类或其他抗菌物质,才能使疫苗抗原靶向接种到呼吸道黏膜表面或上皮组织。因此,气溶胶疫苗接种不仅需要更高剂量的抗原,还需要保证疫苗抗原靶向黏膜组织的递送系统,如减毒活病毒与活细菌载体、共生细菌载体、病毒样颗粒、脂质体、脂肽、免疫刺激复合物、微球、纳米颗粒和树突状细胞等<sup>[43-44]</sup>。另外,适合的黏膜佐剂可以显著提高气溶胶疫苗免疫后的免疫应答能力或

增加抗原在靶组织中的停留时间,延长抗原被提呈细胞吸收的机会。已有一些具有潜质的佐剂,如细菌毒素及其衍生物、细菌 DNA 基序、细胞因子、趋化因子、纳米乳液和天然聚合物在呼吸道进行尝试<sup>[34,45,46]</sup>。除了黏膜的防御机制以外,从消化道免疫来看,黏膜上常在微生物群对疫苗的免疫也可能产生影响<sup>[47]</sup>,虽然全基因组测序结果表明,呼吸道同样存在微生物群<sup>[48]</sup>,但其对气溶胶疫苗的免疫是否存在影响尚不清楚。

## 6 气溶胶免疫的应用情况与前景

气溶胶免疫技术已在人类及多种畜禽疫苗的接种上研究或应用。自 20 世纪 50 年代鸡新城疫气雾剂疫苗的研制拉开了动物呼吸道免疫的序幕<sup>[49]</sup>,随后开展的是鸡传染性支气管炎疫苗的喷雾接种<sup>[50]</sup>,目前均已被广泛使用。上世纪 70 年代末,我国将口蹄疫活疫苗、牛巴氏杆菌活疫苗、布鲁氏菌病活疫苗、羊败血性链球菌活疫苗等分别在牦牛和绵羊上进行联合气雾免疫研究,表现出较好的安全性和免疫保护率<sup>[51]</sup>。猪用疫苗的气溶胶免疫研究起步较晚,1999 年奥地利报道用灭活的胸膜肺炎放线杆菌给猪做气雾免疫,证明可以产生良好的细胞和体液免疫保护<sup>[26]</sup>。郭全胜等<sup>[27]</sup>进行了猪瘟气雾免疫实验研究,表明气雾法免疫虽然与注射免疫差异不显著,但是避免了类似注射免疫因漏打、打量不足造成猪抗体水平参差不齐现象的发生。猪流感疫苗采用气溶胶免疫后,比气管注射及其他黏膜途径的免疫提供了更好的保护<sup>[28]</sup>。笔者也开展了猪支原体肺炎活疫苗的气溶胶免疫研究,可将活疫苗颗粒输送到猪下呼吸道并定植,同时使接种猪呼吸道产生良好的黏膜免疫应答<sup>[29]</sup>。对于人用疫苗的气溶胶免疫,报道最多的集中在麻疹疫苗、结核疫苗和流感疫苗。其中麻疹疫苗是目前唯一在临床开展大规模气溶胶免疫研究的试用疫苗<sup>[25]</sup>。但到目前为止,还没有被批准的人用气溶胶疫苗上市。

尽管气溶胶免疫在安全性、高效性和便利性方面具有显著的优势,但肌肉注射或皮下注射疫苗仍是目前的标准接种方式。气溶胶免疫技术的发展

还需对气溶胶疫苗的靶向性选择及免疫后的评价与监测开展研究。对于黏膜免疫首先需要确定适当的靶组织,不同疫苗的靶组织可能有所不同。呼吸道疫苗接种可针对鼻腔、咽部和喉部的上呼吸道或气管、支气管、细支气管和肺的下呼吸道,其中气溶胶疫苗更多地沉积在下呼吸道,以供肺泡巨噬细胞和树突状细胞摄取。但对于如何确定最佳靶组织及其免疫激活机制尚未完全了解,对于如何评价和比较不同靶组织的科学方法也尚未成熟<sup>[52]</sup>。在评价气溶胶疫苗接种途径的同时,需要探索气溶胶疫苗接种的免疫监测新方法。支气管镜检查 and 支气管肺泡灌洗可能是黏膜免疫最有力和有代表性的样本,但仍是一种侵入性方法。在人医领域,诱导痰是一种可用于呼吸道黏膜免疫监测的方法。诱导痰已被用于评估哮喘、囊性纤维化和健康志愿者的气道炎症,也可作为结核患者的免疫分析<sup>[53,54]</sup>。在动物领域,鼻腔拭子已被用于猪肺炎支原体感染监测或免疫后的评价的分析样本<sup>[55]</sup>。此外,筛选血液中与呼吸道黏膜免疫相关的标志物,以及对黏膜归巢受体的研究,将是一种有用的非侵入性免疫监测工具。另外,气溶胶免疫技术要注意个别疫苗和特殊接种个体的使用局限,例如流感疫苗可能由于其人畜共患的潜力而在环境上作气溶胶免疫需考虑潜在的风险;针对存在支气管痉挛或肺部炎症的人群或动物,靶向下呼吸道的气溶胶疫苗免疫也可能诱发或加重病情等。

作为一种潜在的替代传统注射免疫的新方法,气溶胶疫苗接种是一种安全、非侵入性、非创伤性的抗原传递方法,不仅可以避免因不适当的注射操作而传播疾病和其他血源性病原体的风险,也降低了注射可能产生的刺激<sup>[56]</sup>。同时,气溶胶免疫因遵循病原体感染的自然途径,可模拟诱导呼吸道免疫应答,并可能导致更广泛的全身免疫。在动物疫苗领域,随着养殖规模的不断扩大,气溶胶免疫在节约人力成本方面将表现出更显著的优势。2014 年世界卫生组织(WHO)已将气溶胶免疫技术列入可指导和促进世界公共卫生战略的优先开发技术领域之一<sup>[57]</sup>。

## 参考文献:

- [1] Brandtzaeg P. Humoral immune response patterns of human mucosae; induction and relation to bacterial respiratory tract infections[J]. *The Journal of infectious diseases*, 1992, 165 Suppl 1: S167 - 176.
- [2] Breiman R F, Butler J C, McInnes P M. Vaccines to prevent respiratory infection: opportunities on the near and far horizon[J]. *Current opinion in infectious diseases*, 1999, 12(2):145 - 152.
- [3] 李庆雷. 大肠杆菌气溶胶和新甲型 H1 N1 病毒气溶胶发生和传播的鉴定[D]. 山东农业大学, 2011.
- Li Q L. Identification of the occurrence and transmission of *E. coli* aerosols and new A (H1 N1) virus aerosols[D]. Shandong Agricultural University, 2011.
- [4] Dee S, Otake S, Oliveira S, *et al.* Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Veterinary research*, 2009, 40(4):39.
- [5] Otake S, Dee S, Corzo C, *et al.* Long - distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 145(3 - 4):198 - 208.
- [6] 崔显义. 兽医气溶胶免疫 第一讲 气溶胶基本知识和气溶胶感染[J]. *兽医科技杂志*, 1981, (07):57 - 61.
- Cui XY. Veterinary Aerosol Immunization Lecture 1 Aerosol Fundamentalities and Aerosol Infections[J]. *Journal of Veterinary Science*, 1981, (07):57 - 61.
- [7] Sharpe S A, McShane H, Dennis M J, *et al.* Establishment of an aerosol challenge model of tuberculosis in rhesus macaques and an evaluation of endpoints for vaccine testing[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17(8):1170 - 1182.
- [8] Hensel M E, Garcia - Gonzalez D G, Chaki S P, *et al.* Characterization of an intratracheal aerosol challenge model of *Brucella melitensis* in guinea pigs [J]. *PloS One*. 2019, 14(3):e0212457.
- [9] Olsen S C, Waters W R, Stoffregen W S. An aerosolized *Brucella* spp. challenge model for laboratory animals[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2007, 54(8):281 - 285.
- [10] Loving C L, Kennett M, Lee G M, *et al.* Murine aerosol challenge model of anthrax[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(6):2689 - 2698.
- [11] Steinert E M, Schenkel J M, Fraser K A, *et al.* Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance[J]. *Cell*, 2015, 161(4):737 - 749.
- [12] de Bree G J, van Leeuwen E M, Out T A, *et al.* Selective accumulation of differentiated CD8 + T cells specific for respiratory viruses in the human lung[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, 202(10):1433 - 1442.
- [13] Wilson H L, Obradovic M R. Evidence for a common mucosal immune system in the pig[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 66(1):22 - 34.
- [14] Bienenstock J, McDermott M, Befus D, *et al.* A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1978, 107:53 - 59.
- [15] El - Kamary S S, Pasetti M F, Mendelman P M, *et al.* Adjuvanted intranasal Norwalk virus - like particle vaccine elicits antibodies and antibody - secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 202(11):1649 - 1658.
- [16] Gallichan W S, Woolstencroft R N, Guarasci T, *et al.* Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus - 2 in the genital tract [J]. *Journal of immunology ( Baltimore, Md: 1950)*, 2001, 166(5):3451 - 3457.
- [17] Rathbone M J, Martinez M N. Modified release drug delivery in veterinary medicine [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(15):823 - 829.
- [18] Rothen - Weinholt A, Gurny R, Dahn M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals[J]. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2000, 3(7):222 - 231.
- [19] 李劲松, 杨文慧, 何春雷. 动物气溶胶吸入暴露装置的研制 [J]. *中国医学装备*, 2016, 13(09):1 - 5.
- Li J S, Yang W H, He C L. Development of animal aerosol inhalation exposure device[J]. *China Medical Equipment*, 2016, 13(09):1 - 5.
- [20] 冯志新, 邵国青, 林家彬. 一种动物疫苗与药物的呼吸道自动给药设施:中国, 9280378[P]. 2019 - 08 - 23.
- Feng Z X, Shao G Q, Lin J B. The utility model relates to a respiratory automatic drug delivery facility for animal vaccines and drugs; China, 9280378[P]. 2019 - 08 - 23.
- [21] 冯志新, 邵国青, 林家彬, 等. 一种适用于畜禽场大群化自动化的疫苗免疫及给药装置:中国, 7592655 [P]. 2018 - 07 - 13.
- Feng Z X, Shao G Q, Lin J B, *et al.* The invention discloses a vaccine immunization and drug delivery device suitable for large group automation in livestock and poultry farms; China, 7592655 [P]. 2018 - 07 - 13.
- [22] 冯志新, 邵国青, 林家彬. 一种气流式气雾免疫装置:中国,

- 5329611 [P]. 2016 - 06 - 29.
- Feng Z X, Shao G Q, Lin J B. The utility model relates to an air - flow aerosol immune device; China, 5329611 [P]. 2016 - 06 - 29.
- [23] 冯志新, 邵国青, 林家彬. 自动水位控制的超声波雾化气雾免疫喷头: 中国, 5201597 [P]. 2016 - 05 - 11.
- Feng Z X, Shao G Q, Lin J B. Automatic water level control ultrasonic atomized aerosol immune sprinkler; China, 5201597 [P]. 2016 - 05 - 11.
- [24] Lu D. Recent development in aerosol devices for pulmonary vaccine delivery [J]. Journal of Peking University Health sciences, 2012, 44 (5) : 683 - 687.
- [25] Griffin D E. Current progress in pulmonary delivery of measles vaccine [J]. Expert Review of Vaccines, 2014, 13 ( 6 ) : 751 - 759.
- [26] Katinger A, Lubitz W, Szostak M P, *et al.* Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated Actinobacillus pleuropneumoniae are protected against a homologous aerosol challenge despite differing in pulmonary cellular and antibody responses [J]. Journal of Biotechnology, 1999, 73 (2 - 3) : 251 - 260.
- [27] 郭全胜, 刘深庭, 于春叶. 猪瘟气雾免疫实验研究 [J]. 畜禽业, 2004 (06) : 39.
- Guo Q S, Liu S T, Yu C Y, *et al.* Experimental study on aerosol immunity of swine fever [J]. Livestock and Poultry Industry, 2004 (06) : 39.
- [28] Morgan S B, Hemmink J D, Porter E, *et al.* Aerosol Delivery of a Candidate Universal Influenza Vaccine Reduces Viral Load in Pigs Challenged with Pandemic H1 N1 Virus [J]. Journal of immunology ( Baltimore, Md; 1950) 2016, 196 (12) : 5014 - 5023.
- [29] Feng Z X, Wei Y N, Li G L, *et al.* Development and validation of an attenuated Mycoplasma hyopneumoniae aerosol vaccine [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167 (3 - 4) : 417 - 424.
- [30] Sidler - Moix A L, Dolci U, Berger - Gryllaki M, *et al.* Albuterol delivery in an *in vitro* pediatric ventilator lung model: comparison of jet, ultrasonic, and mesh nebulizers [J]. Pediatric critical care medicine: a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies, 2013, 14 (2) : e98 - 102.
- [31] Coates A L, Tipples G, Leung K, *et al.* How many infective viral particles are necessary for successful mass measles immunization by aerosol? [J]. Vaccine, 2006, 24 (10) : 1578 - 1585.
- [32] 辛钧. 气溶胶感染与免疫 [M]: 长春生物制品研究所; 1973.
- Xin J. Aerosol infection and immunity [M]: Changchun Institute of Biological Products; 1973.
- [33] Gupta P K, Hickey A J. Contemporary Approaches in Aerosolized Drug Delivery to the Lung [J]. J Control Release, 1991, 17 (2) : 127 - 147.
- [34] Stylianou E, Paul M J, Reljic R, *et al.* Mucosal delivery of tuberculosis vaccines; a review of current approaches and challenges [J]. Expert review of vaccines, 2019, 18 ( 12 ) : 1271 - 1284.
- [35] Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery [J]. Proceedings of the American Thoracic Society, 2004, 1 (4) : 315 - 320.
- [36] Corbanie E A, Matthijs M G, van Eck J H, *et al.* Deposition of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens [J]. Avian Pathol, 2006, 35 (6) : 475 - 485.
- [37] Tomar J, Tonniss W F, Patil H P, *et al.* Pulmonary immunization; deposition site is of minor relevance for influenza vaccination but deep lung deposition is crucial for hepatitis B vaccination [J]. Acta pharmaceutica Sinica B, 2019, 9 (6) : 1231 - 1240.
- [38] Reynolds H Y. Modulating airway defenses against microbes [J]. Current opinion in pulmonary medicine, 2002, 8 (3) : 154 - 165.
- [39] Steckel H, Eskandar F. Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers [J]. European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 2003, 19 (5) : 443 - 455.
- [40] Lighthart B. The ecology of bacteria in the al fresco atmosphere [J]. Fems Microbiol Ecol, 1997, 23 (4) : 263 - 274.
- [41] Tong Y Y, Lighthart B. Effect of simulated solar radiation on mixed outdoor atmospheric bacterial populations [J]. Fems Microbiol Ecol, 1998, 26 (4) : 311 - 316.
- [42] Lighthart B, Shaffer B T. Increased airborne bacterial survival as a function of particle content and size [J]. Aerosol Sci Tech, 1997, 27 (3) : 439 - 446.
- [43] Pizzurro G A, Barrio M M. Dendritic cell - based vaccine efficacy: aiming for hot spots [J]. Frontiers in immunology, 2015, 6 : 91.
- [44] Kersten G, Hirschberg H. Antigen delivery systems [J]. Expert review of vaccines, 2004, 3 (4) : 453 - 462.
- [45] Moyle P M, McGeary R P, Blanchfield J T, *et al.* Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems [J]. Current drug delivery. 2004, 1 (4) : 385 - 396.
- [46] Read R C, Naylor S C, Potter C W, *et al.* Effective nasal influ-

- enza vaccine delivery using chitosan [J]. *Vaccine*, 2005, 23 (35):4367-4374.
- [47] Lex J R, Azizi A. Microbiota, a forgotten relic of vaccination [J]. *Expert review of vaccines*, 2017, 16(12):1171-1173.
- [48] Man W H, Piters WAAD, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5):259-270.
- [49] Villegas P, Kleven S H. Aerosol Vaccination against Newcastle - Disease. 1. Studies on Particle - Size [J]. *Avian Dis*, 1976, 20 (1):179-190.
- [50] 赵先铭, 李万猛, 唐顺发. 威士灵喷雾免疫的应用报告 [J]. *中国家禽*, 2007(07):46-47.  
Zhao X M, Li W M, Tang S F. A report on the application of Avinew + H120 spray immunization [J]. *China Poultry*, 2007 (07):46-47.
- [51] 祁文光, 胡平, 陈友信. 四种疫(菌)苗对牦牛联合气雾免疫的研究——1. 口蹄疫弱毒 IB—RS2 猪肾传代细胞疫苗对牦牛气雾免疫试验 [J]. *青海畜牧兽医杂志*, 1982 (04): 39-45.  
Qi W G, Hu P, Chen Y X. Study on Immune of Four Kinds of Epidemic (Bacteria) Vaccines to Yak Combined with Aerosol - 1. Immune test of Yak Aerosol with Porcine Renal Subpassage Cell Vaccine Ib - - RS2 of Foot - and - Mouth Disease attenuated virus [J]. *Qinghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1982(04):39-45.
- [52] Papania M J. Technologies to Improve Immunization [M]; 2018.
- [53] Brown M, Varia H, Bassett P, *et al.* Prospective study of sputum induction, gastric washing, and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients who are unable to expectorate [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(11):1415-1420.
- [54] Vieira M O, Pizzichini E, Steidle LJM, *et al.* Sputum induction in severe exacerbations of asthma; safety of a modified method [J]. *Eur Respir J*, 2011, 38(4):979-980.
- [55] Bai Y, Gan Y, Hua L Z, *et al.* Application of a sIgA - ELISA method for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* infected from vaccinated pigs [J]. *Veterinary microbiology*, 2018, 223: 86-92.
- [56] Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations [J]. *Nature reviews Immunology*, 2012, 12(8):592-605.
- [57] Organization W H. Next - Generation Vaccine Delivery Technology Meeting [C]. In: Meeting report. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.

(编辑:陈希)