

# 动物布鲁氏菌病疫苗的历史及亚单位疫苗的研究概况

王真<sup>1</sup> HAN Gilsu<sup>2</sup> 吴清民<sup>2\*</sup>

(1. 北京农学院 动物科学技术学院, 北京 102206; 2. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100193)

**摘要** 布鲁氏菌病是一种严重危害人和动物健康的人畜共患病, 人群感染主要来源于感染的动物及被污染的畜产品, 目前疫苗免疫仍是控制动物布鲁氏菌病的主要措施。现有国际参考疫苗主要有牛种疫苗株 S19 和羊种疫苗株 Rev. 1, 这些疫苗为动物群布鲁氏菌病控制提供重要保障的同时也存在关键的技术瓶颈问题, 如安全性差, 接种动物出现流产; 血清抗体体内持续时间较长, 干扰常规诊断等。随着布鲁氏菌基因组测序工作的相继完成及 DNA 重组技术的发展, 新型布鲁氏菌病疫苗的开发成为研究的热点。亚单位疫苗本着其较高的安全性和有效性, 在动物群布鲁氏菌病控制过程中具有较大的应用前景。笔者综述了布鲁氏菌病疫苗的发展史, 并对布鲁氏菌病亚单位疫苗的研究进展进行概述。

**关键词** 布鲁氏菌病; 疫苗; 亚单位疫苗; 研究进展

中图分类号 S 652.61<sup>+</sup>4

文章编号 1007-4333(2014)03-0169-06

文献标志码 A

## History of the development of animal *Brucella* vaccines and the research progress for subunit vaccine

WANG Zhen<sup>1</sup>, HAN Gilsu<sup>2</sup>, WU Qing-min<sup>2\*</sup>

(1. Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** Brucellosis is a zoonotic disease that endanger the health of human and animal. The infected animals and contaminated livestock products are the source of human brucellosis. At the present stage, vaccination is the main measure for animal brucellosis prevention and control. The available international reference vaccines are *Brucella abortus* strain S19 and *Brucella melitensis* strain Rev. 1. Although both vaccines are proven to be an effective vaccine against animal brucellosis, they also have some technological bottlenecks which may cause abortion in pregnant animals and interfere with the diagnosis by standard serodiagnostic methods. Along with the completion of the genome sequencing of *Brucella* and the development of DNA recombination technology, the development of novel brucellosis vaccines becomes a hot spot in research. Due to their enhanced safety and efficacy in animal models, subunit vaccines for brucellosis show a great promise for their application in livestock. This review summarizes the history of brucellosis vaccine development and the research progress of brucellosis subunit vaccines.

**Key words** Brucellosis; vaccine; subunit vaccine; research progress

布鲁氏菌 (*Brucella*) 为革兰氏阴性, 兼性细胞内寄生的细菌。根据其致病性和宿主选择性, 可将其分为至少 10 个种, 其中以羊种布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*)、牛种布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) 和猪种布鲁氏菌 (*Brucella suis*) 的感染性

最强<sup>[1]</sup>。该菌可以感染人和牛、羊、猪等多种动物, 称为布鲁氏菌病 (以下简称“布病”)。人群感染可致全身性反应, 初期以发热、多汗、全身乏力、游走性关节痛等为主要特征, 如得不到及时治疗, 可转为慢性型感染, 致肝、脾及睾丸肿大, 关节和脊柱变形, 最终

收稿日期: 2013-09-20

基金项目: 国家“973”计划项目(2010CB530202); 北京农学院大北农青年教师科研基金(13ZK005)

第一作者: 王真, 讲师, 主要从事牛羊疾病诊断及细菌耐药机制的研究, E-mail: wangzhen3355@163.com

通讯作者: 吴清民, 教授, 主要从事布鲁氏菌发病机制及新型防控技术研究, E-mail: wuqm@cau.edu.cn

丧失劳动能力和生育能力,此时治愈的可能性很小,并可反复发作<sup>[2]</sup>。动物感染后,幼畜症状不明显,成年畜诱发胎盘炎症,最终引起怀孕母畜流产、早产或胎衣不下。公畜可出现睾丸和附睾肿大,从而影响繁殖和配种<sup>[3]</sup>。此外,流产胎儿、胎衣、阴道分泌物内含有大量的细菌,如未能及时消毒处理,布鲁氏菌可在环境中存留很长时间,从而造成同群动物感染,使得病情扩散。由于布病的严重危害和流行,致使肉、奶等产品存在严重的安全隐患,极大地影响牛、羊、猪等动物产品的对外贸易,并严重威胁人类的健康,被列为“国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020年)”的三大疾病之一(口蹄疫、高致病禽流感和布病)。

## 1 动物布病的防控策略

一直以来,动物群布病的净化或消灭困扰着世界各国政府,许多发达国家如加拿大、新西兰和澳大利亚等不惜成本、历时数十年,通过检疫、患病家畜扑杀-补偿等措施,先后实现了家畜布病净化目标<sup>[4-6]</sup>。在我国,由于牛、羊饲养密度相对较高,动物基数大、阳性动物比例高,因此按发达国家过去的技术方案势必耗时长、成本高,难以在短期内实现布病净化的目标。基于我国的现状,目前主导性的防控策略主要是实施疫苗免疫。在《国家中长期动物疫病防治规划》<sup>①</sup>的指导下,农业部已会同卫生部制订了《全国布病防治计划》(2012—2020)<sup>②</sup>。该计划充分考虑了我国国情,并在一定程度上借鉴了国外布病防控经验;提出布病防控应“注重源头管理和综合防治,强化易感人群宣传教育等干预措施,加强畜牧兽医从业人员职业保护,提高防治水平,降低疫情发生风险,制定牲畜定期检测、分区免疫、强制扑杀政策及布病防治考核标准,强化动物卫生监督和无害化处理等措施”<sup>[7]</sup>。在该计划实施之初,当务之急是在全国各地以县为单位,充分摸清养殖结构和群体流行率,而后在布病流行比较严重的疫区实施大规模、高密度免疫,并持续足够时间,尽快压低或控制流行率。在其他低流行率的地区,要实施“免疫-检疫-扑杀”的联合根除计划,以进一步压低畜群布病流行率<sup>[8]</sup>。

## 2 动物布病疫苗的发展现状

自1887年,微生物学家大卫布鲁斯从患波浪热病人脾脏分离出布鲁氏菌后,开发布病疫苗的研究工作即展开,至今经历了从灭活疫苗、弱毒活疫苗、粗糙型弱毒活疫苗到基因工程疫苗的发展过程。至今得到公认的疫苗主要有牛种布鲁氏菌 S19 和 RB51,羊种布鲁氏菌 Rev. 1 和 M5,猪种布鲁氏菌 S2 等。其中 S19、Rev. 1、M5 和 S2 为光滑型菌株,此类疫苗 LPS 中 O-抗原刺激机体产生的抗体干扰常规血清学诊断,使疫苗接种动物与自然患病动物无法甄别,是其最主要的缺陷和技术瓶颈<sup>[9-10]</sup>。此外,这些光滑型疫苗均存在一定的残余毒力,免疫妊娠动物时,均可不同程度的引起流产和从乳汁排菌,且容易污染环境和感染人<sup>[11-12]</sup>。尽管如此,这些光滑型疫苗在一些国家和地区的布病控制和消灭过程中发挥了关键作用。为解决弱毒活疫苗干扰诊断的缺陷,粗糙型牛种布鲁氏菌 RB51 诞生了<sup>[13]</sup>。自1996年始,该疫苗成为许多国家预防牛布病的正式疫苗,有效的解决了布病疫苗接种动物与临床患病动物的鉴别诊断问题,但由于安全性和免疫效果方面的问题,该疫苗最终未能在国际市场上得到广泛的推广应用。

20世纪70年代以来,迅速发展的重组DNA技术为布病疫苗的研究提供了新的手段。布鲁氏菌基因缺失疫苗、核酸疫苗和亚单位疫苗等成为研究的热点。基因缺失疫苗的靶标主要为毒力相关基因。到目前为止,国内外研究机构鉴定的布鲁氏菌毒力相关基因达300余种。通过体内、外试验证实这些基因缺失后均使布鲁氏菌的毒力降低,从而提高了安全性。但同时也对布鲁氏菌的免疫原性等方面产生了不同程度的影响,如有些毒力基因缺失后布鲁氏菌仍具有较好的免疫保护效果,而有些毒力基因缺失后导致菌株丧失免疫保护作用。因此,为同时保证疫苗菌株具有毒力低、安全性高且免疫效果好的优势,选择哪种基因作为缺失的靶基因还需进一步筛选和鉴定。核酸疫苗候选靶标主要集中在刺激T细胞引起细胞免疫应答的因子,如P39、L7/L12、GroEL和Omp31等。此外,有研究者将Omp、L7/

① 国务院办公厅. 国家中长期动物疫病防治规划. 2012:5

② 卫生部和农业部. 全国布鲁氏菌病防治计划(2012~2020). 2012:3

L12 等具有抗原性的蛋白与质粒等载体重组,导入受体菌或细胞,使之在受体菌或细胞内高效表达,加佐剂后制备成亚单位疫苗。亚单位疫苗与传统疫苗相比,抗原成分单一,可以用血清学方法有效的鉴别,且其抗原为蛋白质不会出现潜在的安全性问题。

21 世纪初期,人类基因组测序计划的完成标志着后基因组时代的到来。布病疫苗的研究也开始改变从表型分析入手的思维方式,开始从全基因组水平来筛选具有保护性免疫反应的候选抗原。这种以基因组为基础的疫苗发展策略,成为反疫苗学。2002 年以来,羊种、牛种和猪种布鲁氏菌基因组测序相继完成,为反疫苗学研究打下基础。此外,布鲁氏菌蛋白质组学的研究也为疫苗研究提供了便利条件。据国内资料报道,赵忠鹏等<sup>[14]</sup>应用免疫蛋白质组学技术从羊种布鲁氏菌 M5 株的可溶性蛋白和膜蛋白中成功鉴定到 61 个免疫反应性蛋白,这将有助于开发布鲁氏菌病新型疫苗和特异性诊断方法。

### 3 布病亚单位疫苗的研究

鉴于现有布病疫苗都不同程度的存在安全性差等方面的问题,无潜在安全隐患的亚单位疫苗的研究成为布病疫苗研究的热点。亚单位疫苗主要包括重组蛋白疫苗、DNA 疫苗、载体疫苗和外膜囊泡等。亚单位疫苗的有效性取决于目标抗原,尽管多数细菌表面和内部的成分都被认为可以作为亚单位疫苗研究的靶抗原,新的保护性抗原的筛选对提高亚单位疫苗的免疫效果仍十分重要<sup>[15]</sup>。但值得一提的是,亚单位疫苗免疫效果的有效发挥,很大程度上还依赖于免疫佐剂和接种途径。

#### 3.1 重组蛋白疫苗

筛选最佳抗原是重组蛋白疫苗研究的基础。首先,细菌表面成分由于代表细菌与宿主最初的接触点成为首选抗原对象。试验结果表明,布鲁氏菌外膜蛋白 Omp-16 和 Omp-19 可以诱导 Th1 型的细胞免疫反应,且能够对小鼠提供与现有疫苗 S19 和 RB51 相当的攻毒保护<sup>[16-17]</sup>。对外膜蛋白 Omp28 和 Omp31 的研究也取得了类似的结果,重组蛋白 Omp28 免疫小鼠后可以诱导产生 IgG1 和 IgG2a,且抗体平均滴度为未免疫小鼠的 20 倍<sup>[18]</sup>。另外,Omp31 与氢氧化铝或弗氏不完全佐剂联合使用,也能对羊种布鲁氏菌的攻毒提供较高的攻毒保护<sup>[19]</sup>。上述研究结果表明,布鲁氏菌外膜蛋白有望成为布病重组蛋白疫苗研究的目标蛋白。近年来,Fu

等<sup>[20]</sup>筛选了多个布鲁氏菌保护性抗原,发现 CobB 和 AsnC 能够诱导小鼠产生较强的抗体反应,且能够对小鼠提供与现有疫苗 S19 相当的攻毒保护。此外,胞质蛋白 SurA 和 DnaK 和周质蛋白 Cu-Zn 也被用于重组蛋白疫苗的研究。胞质蛋白 SurA 和 DnaK 均能够刺激机体产生高水平的体液免疫反应,并释放大量的 IFN- $\gamma$ ;但遗憾的是,其提供的攻毒保护效果远远低于现有活疫苗 S19<sup>[21]</sup>。周质蛋白 Cu-Zn 对牛种布鲁氏菌的攻毒保护效果亦有限<sup>[22]</sup>。为提高布鲁氏菌重组蛋白的免疫原性,Mallic 等<sup>[23]</sup>将核糖体蛋白 L7/L12 进行脂化,结果发现脂化后的 L7/L12 能诱导更强的体液和细胞免疫反应,且攻毒保护效果也明显增加。总的来说,单一抗原及不加佐剂的重组蛋白疫苗的效果有待提高。

#### 3.2 DNA 疫苗

以质粒 DNA 携带抗原分子进行免疫的例子,在其他病原中已有报道<sup>[24]</sup>。DNA 免疫不仅可以诱导较强的 Th1 型免疫反应和细胞毒性反应,还可以对多种微生物提供保护,如不同种的布鲁氏菌。DNA 疫苗不存在毒力返强的风险,安全性较高。然而,至今未有能够与现有传统疫苗相媲美的单价 DNA 疫苗问世。目前,研究人员采取多种措施试图提高 DNA 疫苗的免疫效果。

多个抗原的联合表达是其中措施之一。Luo 等<sup>[25]</sup>研制了能同时表达 L7/L12 和 Omp16 的二价 DNA 疫苗,该疫苗能够刺激 T 淋巴细胞的大量增殖及 IFN- $\gamma$  的产生,攻毒保护水平亦明显高于单个抗原。另外,同时表达 BCSP31、SOD 和 L7/L12 的三价 DNA 疫苗,其诱导的免疫保护高于现有疫苗 S19 和 RB51<sup>[26]</sup>。抗原与细胞因子的联合表达是提供 DNA 疫苗免疫效果的又一个措施。联合表达细胞因子能够加强细胞毒性反应,并延长免疫保护期。然而当单一抗原与细胞因子联合表达时,DNA 疫苗的保护效力增加不明显。细胞因子 IL-15 或者 IL-12 与三价 DNA(BCSP31、SOD 和 L7/L12)联合应用时,保护效力大幅提高。该疫苗免疫效力的增加 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性反应的增强是息息相关的<sup>[27]</sup>。改变抗原基因启动子,使目标抗原高效表达;或增加分泌信号,是目标抗原准确定位也是提高 DNA 疫苗免疫效果的有效措施<sup>[28]</sup>。此外,改变免疫程序如首免 DNA 疫苗,加免重组蛋白也可以提高免疫效果<sup>[29]</sup>。在接种途径方面,如肌内注射、基因枪介导的免

疫<sup>[30]</sup>、体内电击法等也能一定程度上增强 DNA 疫苗的免疫效果。

### 3.3 载体疫苗

当抗原不能有效的转运到特定部位或者呈递给免疫系统时抗原递送系统显得尤为重要。多种布鲁氏菌重组蛋白抗原已经利用大肠杆菌(*E. coli*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、牛痘病毒(*Vaccinia virus*)、克林病毒(*Semliki Forest virus*)等作为载体成功地递送到小鼠体内,并产生较好的免疫效果。布鲁氏菌 BP26 蛋白通过大肠杆菌递送后能够诱导淋巴细胞的大量增殖并释放 IFN- $\gamma$ <sup>[31]</sup>。Cu-Zn SOD 通过大肠杆菌递送后可以刺激机体产生 Th1 型的细胞免疫反应,并对小鼠提供较高的攻毒保护效果<sup>[32]</sup>。另外布鲁氏菌 L7/L12 和 Cu-Zn SOD 蛋白通过乳酸乳球菌和克林病毒表达后,亦可诱导攻毒保护<sup>[33]</sup>。然而,病毒载体并非全部有效,如布鲁氏菌 GroEL 和 L7/L12 蛋白通过牛痘病毒递送后,并不能产生免疫保护<sup>[34]</sup>。研究表明,牛痘病毒可以下调宿主 IFN- $\gamma$  活性,而 IFN- $\gamma$  在机体抗感染免疫过程起了重要的作用。此外,保护性抗原 BCSP31 也在沙门氏菌中得到表达,尽管这种载体疫苗的保护效果未被测定,但该疫苗免疫小鼠和猪后,均刺激机体产生免疫应答<sup>[35]</sup>。

### 3.4 外膜囊泡

早在 50 年以前就有报道称革兰氏阴性细菌能够释放外膜囊泡(OMVs)<sup>[36]</sup>。当细菌正常生长或在不同的环境中如土壤、营养丰富培养基或感染宿主的过程中,会自发的从细菌外膜释放 OMVs。研究表明 OMVs 包含多种成分如外膜蛋白、磷脂、脂多糖及其他的周质成分。此外,细菌外膜囊泡被证明与细菌毒力因子的释放、机体免疫调节、毒素转运、信号分子的转导密切相关<sup>[37-38]</sup>。利用 OMVs 的免疫调节功能,革兰氏阴性细菌的外膜囊泡逐渐被开发成无细胞疫苗。近年来,研究表明布鲁氏菌也可以成功的释放外膜囊泡<sup>[39]</sup>,许多研究人员也对布鲁氏菌 OMVs 作为疫苗的潜力进行了测定。结果表明,自羊种布鲁氏菌 16 M(光滑型菌株)和 VTRM1(粗糙型菌株)纯化的 OMVs 均能对小鼠提供较好的攻毒保护效果,保护率与现有疫苗 Rev. 1 相当<sup>[40]</sup>。将布鲁氏菌外膜囊泡与佐剂联合使用时,免疫保护效果明显增加<sup>[41]</sup>。与其他的亚单位疫苗相比,外膜囊泡作为疫苗具备很多优势,如外膜囊泡

复杂的组成使得其同时含有多种抗原,其中含有的磷脂成分还可以作为天然的佐剂。近期,又有研究表明,细菌外膜囊泡可与宿主细胞相互作用,并以内吞途径进入细胞内部<sup>[42]</sup>。此外,随着布鲁氏菌基因组测序工作的相继完成,及分子生物学的发展,对布鲁氏菌 OMVs 成分的解析和改造愈发容易,如选择性的过表达 OMVs 中的保护性抗原来提高免疫效果。然而,外膜囊泡作为无细胞疫苗的前景及利弊仍需进一步研究。

## 4 展望

布鲁氏菌病是一种全球性的疾病,全球约有 170 个国家和地区存在和流行此病,每年新发病例约 50 万人<sup>[43]</sup>。尽管人布病可以多种抗生素联合治疗,但治疗疗程长、效果差,使得布病仍为严重威胁人类健康的重要疾病之一。由于布病很少在人群内传播,人群感染主要来源于感染的动物及被污染的畜产品。因此,只有做好动物群布病的控制才能从根本上解决人群布病的问题。然而在一些发展中国家,由于缺少资源实施检疫-扑杀的策略,只能采取疫苗免疫的措施,考虑到现有布病疫苗均不同程度的存在安全性差、干扰诊断的技术瓶颈问题,因此急需开发具有较高安全性且能鉴别诊断的新型布病疫苗。除弱毒活疫苗外,具有较高安全性的亚单位疫苗的研究也成为布病疫苗开发的一个重要方向<sup>[15]</sup>。亚单位疫苗只含有产生保护性免疫应答所必需的免疫原成分,减少或消除了常规活疫苗或死疫苗难以避免的热原、变应原、免疫抑制原和其他有害的反应原,安全性较高、副作用小<sup>[24]</sup>。此外,亚单位疫苗产生的免疫应答可以与感染产生的免疫应答相区别,因此更适合于疫病的控制和消灭计划。当然,机体对不同保护性抗原的免疫应答与抗原的基因背景有关,因此开发有效的亚单位疫苗,应筛选合适的保护性抗原,并针对特定的抗原分子寻找合适的载体、佐剂及递呈系统等,以期最大限度的发挥亚单位疫苗的免疫效果。

## 参 考 文 献

- [1] Yang X H, Skyberg J A, Cao L, et al. Progress in *Brucella* vaccine development[J]. Front Biol (Beijing), 2013, 8(1): 60-77
- [2] Dean A S, Crump L, Greter H, et al. Clinical manifestations of human brucellosis: A systematic review and meta-analysis [J].

- PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(12): e1929
- [3] Megid J, Mathias L A, Robles C A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans [J]. The Open Veterinary Science Journal, 2010, 4: 119-126
- [4] Cousins D V, Roberts J L. Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: The battle for freedom and beyond [J]. Tuberculosis (Edinb), 2001, 81: 5-15
- [5] Lewis A E. Brucellosis eradication in Canada [J]. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc, 1978, 82: 137-138
- [6] Davidson R M. Control and eradication of animal diseases in New Zealand [J]. N Z Vet J, 2002, 50: 6-12
- [7] 吴清民. 动物布鲁氏菌病防控技术及策略的探讨[C]//中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会论文集, 徐州: 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会、解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 2013
- [8] 范伟兴, 狄栋栋, 田莉莉. 当前家畜布鲁氏菌病防控策略与措施的思考[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(3): 64-71
- [9] Schurig G G, Sriranganathan N, Corbel J. Brucellosis vaccines: Past, present and future [J]. Vet Microbiol, 2002, 90: 479-496
- [10] Stevens M G, Hennager S G, Olsen S C, et al. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51 [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(4): 1065-1066
- [11] Alton G G, Elberg S S. Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine: A review of ten years of study [J]. Vet Bull, 1967, 371: 793-800
- [12] Verger J M, Grayon M, Zundel E. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes [J]. Vaccine, 1995, 13(2): 191-196
- [13] Moriyón I, Grilló M J, Monreal D, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status [J]. Vet Res, 2004, 35: 1-38
- [14] 赵忠鹏, 同芳, 吉文汇, 等. 运用免疫蛋白质组学方法筛选羊种布鲁氏菌免疫反应性蛋白[J]. 中国科学生命科学辑, 2011, 41(9): 739-747
- [15] Gomez G, Adams L G, Rice-Ficht A, et al. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 17
- [16] Pasquevich K A, García Samartino C, Coria L M, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis [J]. J Immunol, 2010, 184(9): 5200-5212
- [17] Pasquevich K A, bañez A E, Coria L M, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16203
- [18] Jeong Ju Lim, Dong Hyeok Kim, Jin Ju Lee, et al. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice [J]. J Vet Sci, 2012, 13(3): 287-292
- [19] Cassataro J, Estein S M, Pasquevich K A, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4 + T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection [J]. Infect Immun, 2005, 73(12): 8079-88
- [20] Fu Simei, Xu Jie, Li Xianbo, et al. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* Infection [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e29552
- [21] Delpino M V, Estein S M, Fossati C A, et al. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice [J]. Vaccine, 2007, 25(37/38): 6721-6729
- [22] Tabatabai L B, Pugh G W. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine [J]. Vaccine, 1994, 12(10): 919-924
- [23] Mallick A I, Singha H, Chaudhuri P, et al. Liposomised recombinant ribosomal L7/L12 protein protects BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 infection [J]. Vaccine, 2007, 25(18): 3692-704
- [24] Palma P, Romiti ML, Montesano C, et al. Therapeutic DNA vaccination of vertically HIV-Infected children: Report of the first pediatric randomised trial (PEDVAC) [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79957
- [25] Luo D, Ni B, Li P, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice [J]. Infect Immun, 2006, 74(5): 2734-2741
- [26] Yu D H, Hu X D, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses [J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(6): 435-443
- [27] Hu X D, Chen S T, Li J Y, et al. An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against *Brucella* by increasing the CD8 + cytotoxic T cell response [J]. Vaccine, 2010, 28(12): 2408-2445
- [28] Leclercq S, Harms J S, Rosinha G M, et al. Induction of a th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene [J]. J Med Microbiol, 2002, 51(1): 20-26
- [29] Cassataro J, Velikovskiy C A, Bruno L, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting [J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(7): 869-874
- [30] Ramsay A J, Kent S J, Strugnelli R A, et al. Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal

- immunity[J]. *Immunol Rev*,1999,171:27-44
- [31] Gupta V K, Radhakrishnan G, Harms J, et al. Invasive *Escherichia coli* vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic protein BP26 confer protection in mice challenged with *B Melitensis* [J]. *Vaccine*, 2012,30(27):4017-4022
- [32] Onate A A, Vemulapalli R, Andrews E, et al. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B abortus* [J]. *Infect Immun*,1999,67:986-988
- [33] Sáez D, Fernández P, Rivera A, et al. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity [J]. *Vaccine*,2012,30(7):1283-1290
- [34] Baloglu S, Toth T E, Schurig G G, et al. Humoral immune response of BALB/c mice to a vaccinia virus recombinant expressing *Brucella abortus* GroEL does not correlate with protection against a *B. abortus* challenge [J]. *Vet Microbiol*, 2000,76:193-199
- [35] Stabel T J, Mayfield J E, Morfitt D C, et al. Oral immunization of mice and swine with an attenuated *Salmonella choleraesuis* [delta cya-12 delta (crp-cdt) 19] mutant containing a recombinant plasmid [J]. *Infect Immun*,1993,61(2):610-618
- [36] Beveridge T G. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles [J]. *Journal of Bacteriology*,1999, 181 (16):4725-4733
- [37] Ellis T N, Kuehn M J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,2010,74:81-94
- [38] Kuehn M J, Kesty N C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction [J]. *Genes and Development*, 2005,19:2645-2655
- [39] Boigegrain R A, Salhi I, Alvarez-Martinez M T, et al. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25 [J]. *Infect Immun*,2004,72,5693-5703
- [40] Avila-Calderon E D, Lopez-Merino A, Jain N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice [J]. *Clinical and Developmental Immunology*,2012, Article ID 352493
- [41] Jain-Gupta N, Contreras-Rodriguez A, Vemulapalli R, et al. Pluronic P85 enhances the efficacy of outer membrane vesicles as a subunit vaccine against *Brucella melitensis* challenge in mice [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*,2012, 66:436-444
- [42] Pollak C N, Delpino M V, Fossati C A, et al. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response [J]. *PLoS One*,2012,7(11):e50214
- [43] Franco M P, Mulder M, Gilman R H, et al. Human brucellosis [J]. *Lancet Infect Dis*,2007,7(12):775-786

责任编辑: 苏燕