

布鲁氏菌 104M 液体气溶胶免疫 BALB/c 小鼠的有效性评价和安全性研究

韦超¹ 杨文慧² 侯雪新³ 杨慧盈² 孙丽娜³ 周冬生² 李振军³

¹首都医科大学,北京 100069; ²军事医学研究院,北京 100071; ³中国疾病预防控制中心,北京 102206

通信作者:李振军, Email: lizhenjun@icdc.com; 杨文慧, Email: fionyoung@163.com

【摘要】 目的 评价布鲁氏菌 104M 液体气溶胶肺递送途径免疫 BALB/c 小鼠有效性和安全性。方法 随机选取 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠,分别经肺递送、滴鼻和皮下注射 3 种途径免疫接种布鲁氏菌 104M,于免疫后第 4、8、16、24 周观察并记录小鼠的症状、检测小鼠体重、脾重、脾脏载菌量及肺匀浆、血清的抗体和细胞因子。待鼠脾脏载菌完全清除,用布鲁氏菌 A19 液体气溶胶肺递送途径攻毒。结果 各组实验小鼠均未见异常症状;体重无显著下降;攻毒前,脾重没有明显变化;攻毒后,免疫组小鼠脾重显著低于空白对照组 ($P < 0.05$):液体气溶胶肺递送:实验组 (0.26 ± 0.16)g < 空白对照组 (0.40 ± 0.19)g,滴鼻:实验组 (0.21 ± 0.11)g < 空白对照组 (0.28 ± 0.19)g,皮下注射:实验组 (0.14 ± 0.02)g < 空白对照组 (0.30 ± 0.18)g。随着免疫时间的增长,免疫组小鼠脾脏载菌量呈下降趋势,第 20 周完全清除。攻毒后 2 周(免疫 24 周),所有小鼠脾脏载菌均显著增加,各免疫组脾脏载菌量均显著低于空白对照组 ($P < 0.05$):脾脏载菌量以 \log_{10} 菌落形成单位 (colony-forming units, CFU)/g 计数并统计分析,液体气溶胶肺递送:实验组 (4.49 ± 0.13) < 空白对照组 (6.90 ± 0.46);滴鼻:实验组 (3.59 ± 1.06) < 空白对照组 (7.08 ± 0.14);皮下注射:实验组 (3.00 ± 2.03) < 空白对照组 (6.81 ± 0.34)。布鲁氏菌 104M 激发了 BALB/c 小鼠细胞免疫和体液免疫反应。在免疫后第 4 周,检测到 104M 特异性抗体 IgG、IgM、IgA,第 8 周达到高峰,攻毒后再次显著上升。各免疫组血清和肺匀浆中 IFN- γ 和 IL-18 浓度在攻毒前,均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$),攻毒后,各免疫组血清 IFN- γ 和 IL-18 浓度均低于空白对照组 ($P < 0.05$),而肺匀浆细胞因子浓度在攻毒前后均持续高于空白对照组 ($P < 0.05$)。结论 液体气溶胶肺递送途径是一种有效的免疫途径,表现出有效的保护作用;104M 未引起小鼠体重减轻,相对安全,但在小鼠体内存活时间较长,引起小鼠轻度脾脏肿大,有一定的残余毒力。

【关键词】 布鲁氏菌;气溶胶;免疫;有效性

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX10303401, 2018ZX10734401, 2018ZX10734404); 生物安全重点专项(2017YFC1200303)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20190911-00665

Immunization efficacy and safety of *Brucella* 104M against aerosol challenge in BALB/c mice

Wei Chao¹, Yang Wenhui², Hou Xuexin³, Yang Huiying², Sun Lina³, Zhou Dongsheng², Li Zhenjun³

¹Capital Medical University, Beijing 100069, China; ²Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; ³Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding authors: Li Zhenjun, Email: lizhenjun@icdc.com; Yang Wenhui, Email: fionyoung@163.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the protective efficacy and safety of *Brucella* 104M against aerosol challenge in BALB/c mice and characterize its immunological effects. **Methods** Female mice of 6–8 weeks old were immunized with *Brucella abortus* strain 104M by intratracheal aerosol delivery or intranasal instillation or subcutaneous injection route. Six mice of each group were sacrificed at 4, 8, 16, 24 weeks after immunization. At each time point, the clinical manifestations of mice were investigated, the serum, spleen and lung samples of mice were collected, body weight, spleen weight, bacteria loads in spleens, the anti-*Brucella* antibodies titers in serum and the cytokines concentrations of IFN- γ , IL-18 in serum or lung homogenate of the mice were detected. Twenty two weeks after immunization, all the mice were challenged with *Brucella* A19 through intratracheal aerosol delivery. **Results** Compared with the control group, neither abnormal clinical symptoms nor

significant changes in body weight were found in 104M immunization groups, at each time point when immunized through either nose dropping route, subcutaneous injection or aerosol routes; and the spleen weight of immunization groups were lower than control group after challenge ($P < 0.05$): *M1 (0.26 ± 0.16)g < M2 (0.40 ± 0.19)g; *M3 (0.21 ± 0.11)g < M4 (0.28 ± 0.19)g; *M5 (0.14 ± 0.02)g < M6 (0.30 ± 0.18)g. The spleen bacterium load of the mice in 104M immunization groups decreased until 20 weeks later, the cells were completely clear out, 2 weeks after challenge (24 weeks), the bacterium load increased again, the bacterium load in immunization groups were significantly lower than that in control group ($P < 0.05$): *M1 (4.49 ± 0.13)log₁₀ (Colony-Forming Units) CFU/g < M2 (6.90 ± 0.46)log₁₀CFU/g; *M3 (3.59 ± 1.06)log₁₀CFU/g < M4 (7.08 ± 0.14)log₁₀CFU/g; *M5 (3.00 ± 2.03)log₁₀CFU/g < M6 (6.81 ± 0.34)log₁₀CFU/g. The high titer of *Brucella* 104M specific antibodies were detected at week 4, and the peak was reached at week 8 of immunization groups. At each time point, the serum antibody titers IgG 2a was higher than that of IgG 1; before challenge, the cytokines concentrations of IFN- γ and IL-18 in all immunization groups were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$), after challenge, cytokines concentrations of IFN- γ and IL-18 in the serum were lower in all immunization groups than in control group ($P < 0.05$). At each time point, IFN- γ , IL-1 β and IL-18 concentrations in lung homogenate were higher in immunization groups than in control group ($P < 0.05$). There were no significant differences among the three immunization routes in all sample detection indexes ($P < 0.05$). **Conclusions** Intratracheal aerosol delivery is a safe and effective immunization route in BALB/c mice. Both humoral immunity and cellular immunity were stimulated by *Brucella* 104M, showing obvious protective efficacy against aerosol challenge in BALB/c mice. No significant weight loss was detected. However, the colonizing of *Brucella* 104M in the spleen of mice was too long (20 weeks), and slighter spleen swelling of the mice were detected, which illustrated that the attenuated strain 104M has residual virulence as a vaccine strain in mice.

【Key words】 *Brucella*; Aerosol; Immunization; Efficacy

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10303401, 2018ZX10734401, 2018ZX10734404); Biosafety Key Special Project (2017YFC1200303)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20190911-00665

布鲁氏菌是一种革兰阴性菌,感染机体能导致人兽共患传染病——布鲁氏菌病(布病)。布病对人畜危害较大,但目前尚缺乏有效治疗措施,疫苗的接种是一种预防控制和减少布病流行最有效的办法^[1]。

动物疫苗的使用在很大程度上减少了布病的传播,对布病的预防和控制起到重要作用。其中目前 WHO 和 OIE 推荐并在很多国家使用动物减毒活疫苗有:羊种 Rev.1、牛种 S19 和 RB51,在我国允许使用的有猪种 S2、羊种 M5、牛种 A19^[2],人用减毒活疫苗有 19-B 和 104M,由于 19-B 明显的副作用,1965 年 104M 的引入取代了 19-B^[3]。现有使用的减毒活疫苗有致病风险及干扰血清学诊断等副作用,开展克服这些缺点,研发安全有效的新型疫苗是当前研究的热点。通过对现有菌株本身及免疫途径改进是改善免疫效果,减轻副作用的重要方法。

布鲁氏菌 104M 源于苏联研究者从流产胎牛中分离出来,进行弱化制备的减毒株,曾在我国布病高危人群中使用,该疫苗在实际使用的有关文献发现:104M 对人能提供一定的保护力,但有致敏、致病等毒副作用^[4]。目前尚没有得到国际认可的人用布鲁氏菌疫苗,对于 104M 的动物实验研究报道相对较少。本研究基于 104M 菌株,以 BALB/c 小鼠为研究对象,展开动物实验研究,初步对布鲁氏菌 104M 在小鼠体内的安全性及保护力评价,为寻求布鲁氏菌

104M 疫苗进一步改进措施和对其免疫机制研究奠定基础。

材料与方法

1. 材料:动物和菌株:6~8 周龄 18~24 g 的 BALB/c 雌鼠,购自中国北京维通利华实验动物技术有限公司。实验过程中所有小鼠给予充足的水和食物,每天 12 h 光照。布鲁氏菌 104M 购自中国兰州生物制品研究所;布鲁氏菌 A19 购自中国新疆天牧公司。试剂和材料:BBL™ 和 *Brucella* Agar 培养基、TSA 和 TSB 培养基均购自美国 BD 公司; *Brucella* selective supplement 购自英国 OXOID 公司;泊洛沙姆-PlunronicF68 购自美国 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购自中国深圳达科为生物技术有限公司。

2. 方法:

(1) 菌液制备和动物接种:取 50 μ l 布鲁氏菌 104M 甘油菌加入 100 ml TSB 培养基中,200 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数中期($A_{600} \approx 1.0$),取 1 ml 菌液加入 200 ml 培养基中传代扩大培养到对数中期,离心,集菌,用含 0.05% (体积百分比)泊洛沙姆的生理盐水洗涤两次,重悬,调整 104M 菌液 2×10^7 菌落形成单位(CFU)/ml 免疫接种小鼠。

小鼠随机分 6 组,每组 6 只,实验组:液体气溶胶肺递送(M1)、滴鼻(M3)、皮下注射(M5)途径接种

1 × 10⁵ CFU 的 104M; 空白对照组: 液体气溶胶肺递送(M2)、滴鼻(M4)、皮下注射(M6)接种等体积含 0.05% (体积百分比) 泊洛沙姆的生理盐水。M4 是滴鼻对照组(滴的是生理盐水)。

(2) 症状体征、体重、脾重和脾脏载菌量检测: 所有小鼠分别于接种后第 4、8、16、24 周, 称体重, 采血, 颈椎脱臼处死小鼠, 无菌分离脾脏, 称重, 匀浆, 涂布于布氏选择性培养基, 37 °C 培养 3 ~ 4 d, 计算脾脏载菌量。

(3) 特异性抗体和细胞因子检测: 制备血清和肺匀浆上清, 分别用试剂盒检测血清抗体 IgG、IgM、IgG1、IgG2a 和 IgA 及细胞因子 IFN-γ 和 IL-18, 操作方法按照说明书进行。

(4) 保护力实验: 在小鼠脾脏菌完全清除后, 每组小鼠给予 5 × 10⁹ CFU/ml A19 液体气溶胶肺递送途径攻毒; 在攻毒后 2 周, 收集样品检测, 方法同上。以上所有实验操作均在 BSL-2 实验室完成。

3. 统计学分析: 定性资料以频数、百分数表示, 定量资料体重、脾重、脾脏载菌量及抗体滴度及细胞因子浓度检测, 组间分析, 经正态性检验, 符合正态分布的, 采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 对不服从正态分布, 组间比较采用 χ^2 或 Fisher 确切概率法检验。采用 SAS 9.3 软件进行统计学分析, 采用 Graphpad prism 7.0 软件进行多重比较作图。双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 布鲁氏菌 104M 免疫后毒力检测:

(1) 症状特征和体重变化: 每天观察记录小鼠状态, 所有小鼠状态均良好, 未见耸毛、呼吸困难、精神萎靡、食欲减退、反应迟钝等表现。在检测时间内, 与空白对照组(M2、M4、M6) 比较, 免疫组(M1、M3、M5) 均未出现体重显著下降($P > 0.05$), M1、M3、M5 组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 1。

(2) 脾重变化: 空白对照组在攻毒后, 小鼠脾重均显著增加; 免疫

组在攻毒后无显著升高。在第 4、8、16 周, 与空白对照组小鼠脾重 0.05 ~ 0.10 g 比较, 免疫组脾脏质量 0.10 ~ 0.15 g 轻度增加($P > 0.05$); 在攻毒后 2 周(免疫 24 周), M1 (0.26 ± 0.16) g > M2 (0.40 ± 0.19) g, M3 (0.21 ± 0.11) g > M4 (0.28 ± 0.19) g, M5 (0.14 ± 0.02) g > M6 (0.30 ± 0.18) g, (均 $P < 0.05$)。在攻毒前, 免疫组组间差异无统计学意义, 攻毒后, M1 显著高于 M3、M5 ($P < 0.05$)。见图 2。

(3) 脾脏载菌量变化: 见图 3。攻毒前, 免疫组脾脏载菌量在第 4 周达到高峰 [4.6 ~ 6.3 (\log_{10} CFU/g)], 在第 20 周, 免疫组小鼠脾脏菌完全清除; 攻毒后第 24 周, 脾脏载菌量 *M1 (4.49 ± 0.13) \log_{10} CFU/g < M2 (6.90 ± 0.46) \log_{10} CFU/g, *M3 (3.59 ± 1.06) \log_{10} CFU/g < M4 (7.08 ± 0.14) \log_{10} CFU/g, *M5 (3.00 ± 2.03) \log_{10} CFU/g < M6 (6.81 ± 0.34) \log_{10} CFU/g

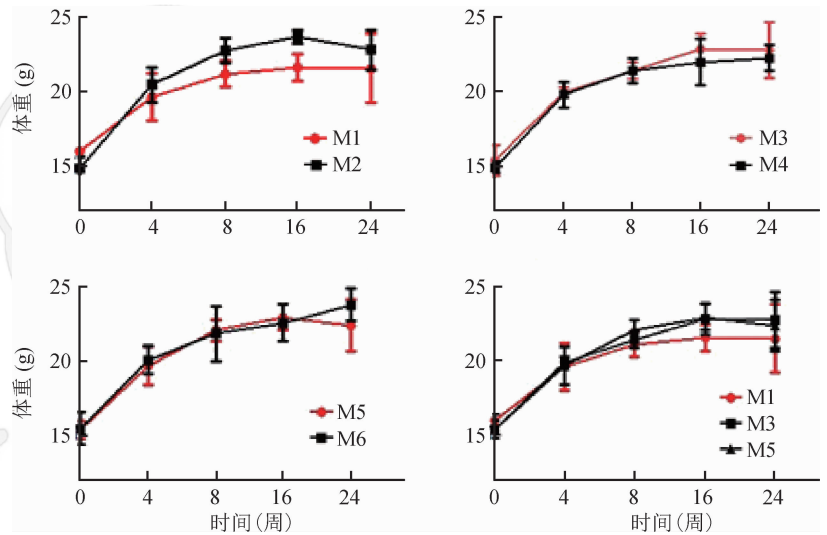
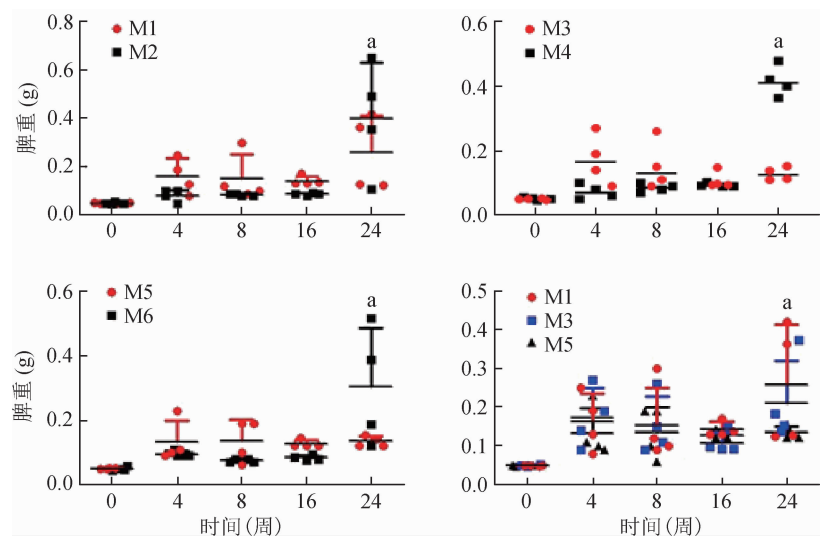
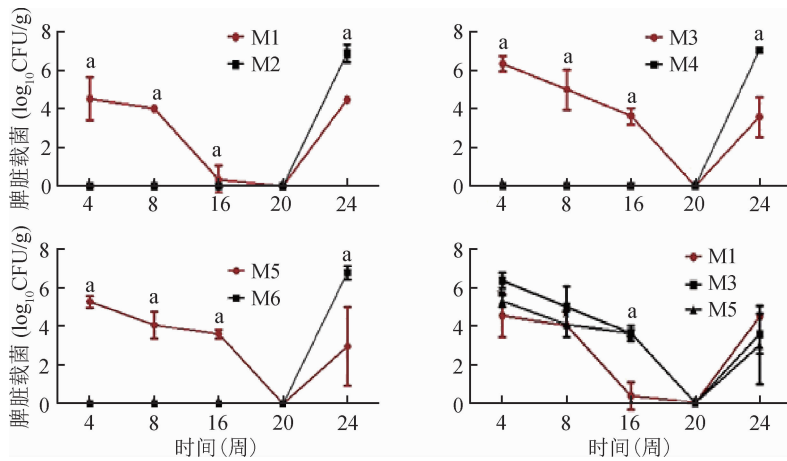


图1 小鼠体重变化



注: *差异有统计学意义($P < 0.05$)

图2 小鼠脾重



注: *组间差异有统计学意义($P < 0.05$)

图3 小鼠脾脏载菌量

g (均 $P < 0.05$); M1、M3、M5 之间比较, $P > 0.05$, 无统计学意义。

2. 免疫指标评价:

(1) 抗体水平检测: 见图 4。攻毒前, 104M 免疫组血清 IgG、IgG2a/IgG1、IgA、IgM 抗体变化趋势基本一致: 第 8 周达到高峰, 之后轻度下降。攻毒后, 免疫组和空白对照组抗体水平都显著升高, IgG、IgG2a/IgG1、IgA 水平: $M1 < M2$ 、 $M3 < M4$ 、 $M5 < M6$ (均 $P < 0.05$); 血清抗体 IgM 水平: 免疫组 (M1、M3、M5) 均低于相应空白对照组 (M2、M4、M6), $P < 0.05$; M1、M3、M5 组间差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。免疫组血清 IgG2a/IgG1 > 1 。

(2) 细胞因子检测: 见图 5, 6。血清细胞因子: 免疫组均在第 4 周达到高峰, 之后持续下降; 攻毒后, IL-18 增加显著, 而 IFN- γ 增加不显著。肺匀浆细胞因子: 免疫组在第 4、8、16 周均检测到高浓度

IFN- γ 和 IL-18。空白对照组细胞因子浓度较低, 均未检出。免疫组组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

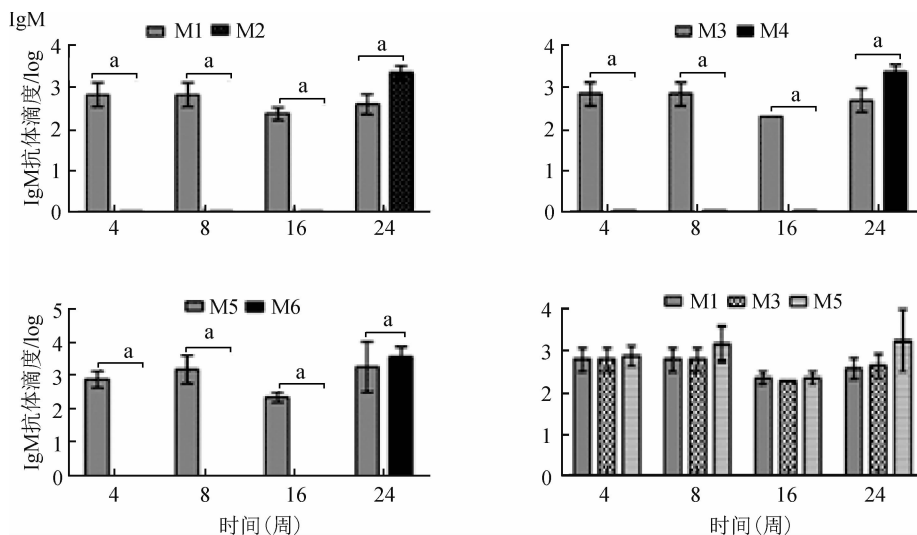
攻毒后, 血清细胞因子: 免疫组 M1、M3、M5 显著低于空白对照组 M2、M4、M6 (均 $P < 0.05$)。肺匀浆 IFN- γ 、IL-18、IL-1 β 浓度: $M1 > M2$ 、 $M3 > M4$ 、 $M5 > M6$ (均 $P < 0.05$) 差异有统计学意义。免疫组组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

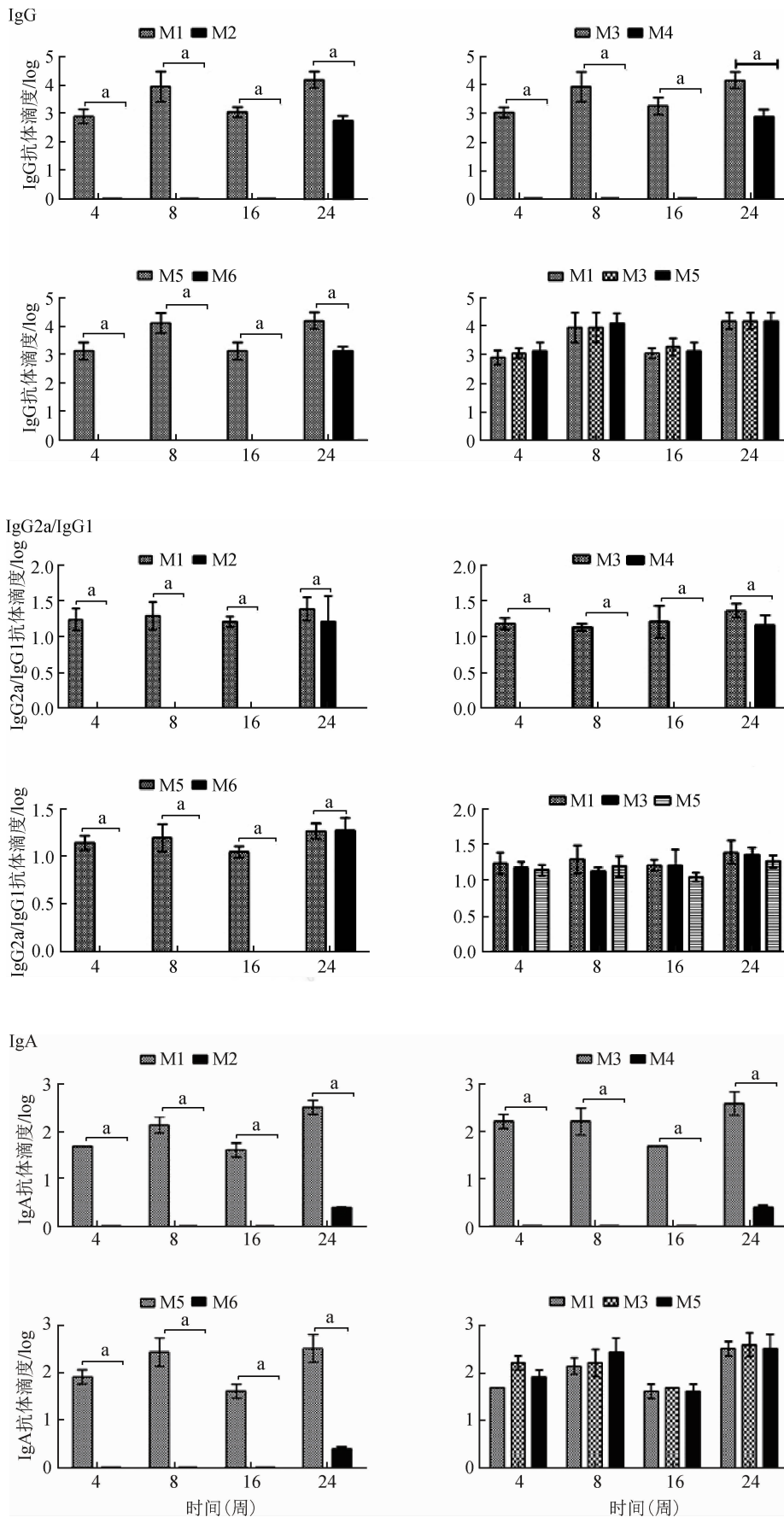
讨 论

本研究基于布鲁氏菌 104M, 以 BALB/c 小鼠为研究对象, 初步探讨不同的接种途径和剂量的 104M 对小鼠的安全性及保护力。

本研究通过前期大量试验探索不同免疫剂量, 结果发现 10^{10} CFU、 10^7 CFU 的 104M 因剂量过高出现明显的毒副作用, 10^4 CFU 剂量过小不能起到有效的保护作用。以 10^5 CFU 免疫小鼠, 显示出较好的免疫反应及保护力作用, 而且未引起小鼠体重显著变化及明显脾肿大, 以 10^5 CFU 为最佳免疫剂量。

BALB/c 小鼠遗传背景清楚, 品系稳定, 是理想的动物实验模型, 也是布鲁氏菌动物实验研究常用的小鼠品系^[5]。有研究显示: 不同种鼠对布鲁氏菌的反应及敏感性不同^[6]。在本研究中, 104M 在 BALB/c 小鼠表现出明显免疫反应, 但有一定的残余毒力——轻度脾肿大, 这与我国曾在人群中使用的反应类似。因此认为, 用 BALB/c 小鼠为动物模型评价 104M 是合理可行的。





注: *两组间抗体水平差异有统计学意义($P < 0.05$)

图4 小鼠血清抗体水平

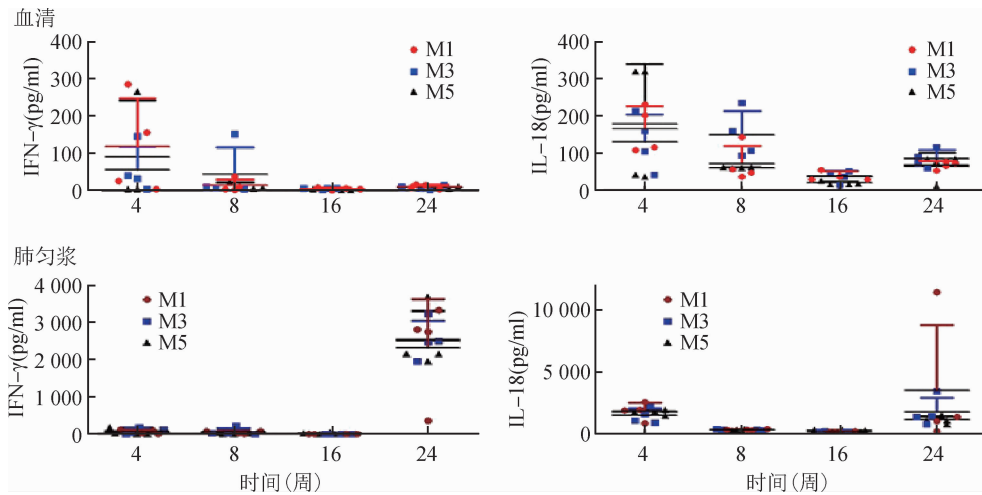
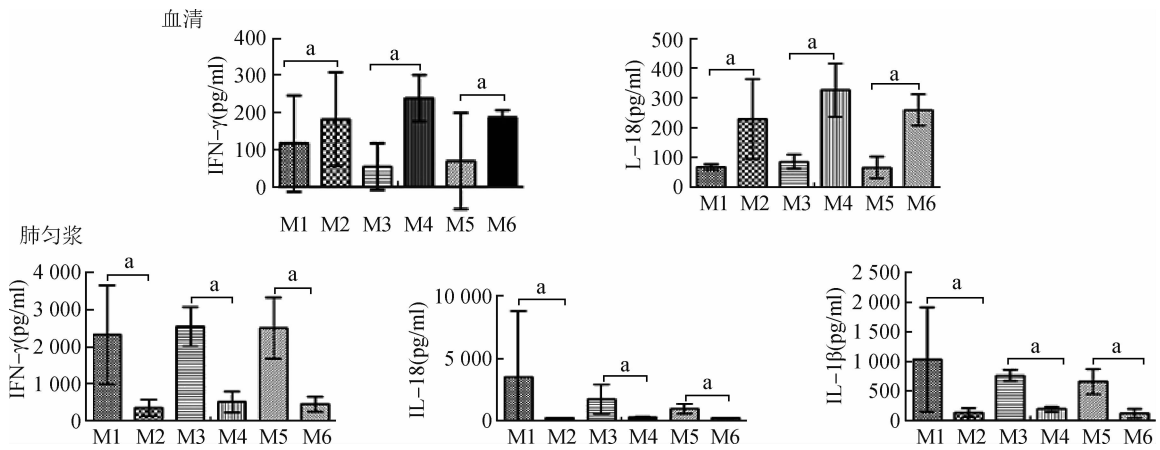


图5 免疫后小鼠血清、肺匀浆细胞因子IFN-γ、IL-18水平



注: *组间差异有统计学意义(P<0.05)

图6 攻毒后小鼠血清、肺匀浆细胞因子IFN-γ、IL-18、IL-1β水平

按照1997年WHO确定的评估突变株免疫保护能力的标准,在攻毒后特定的时间内小鼠脾脏或/和肝脏菌数量的减少来衡量^[7]。本研究根据前期的研究结果,发现A19作为减毒株,增加接种剂量具有较强的毒性反应,能达到有效的感染,因此本实验选用A19攻毒实验菌株。实验中,我们用A19攻毒后脾脏载菌清除时间作为本研究评价疫苗毒力的标准之一。

毒力是评估疫苗安全性重要方法,国际上通用3种检测布鲁氏菌毒力方法:豚鼠的最小感染量、豚鼠脾脏载菌量及感染后布鲁氏菌在小鼠体内的存活时间^[8]。强毒株具有在体内持续感染的特性,弱毒株在与宿主免疫反应对抗中持续繁衍,存在毒力增强的风险。研究显示16M强毒株在小鼠体内清除时间为16周^[8]。本研究结果发现10⁵CFU的104M免疫小鼠后,脾脏载菌清除时间长达20周,说明104M残余毒力明显。

布鲁氏菌减毒活疫苗株比亚单位疫苗、DNA疫

苗和基因工程疫苗能提供更好的保护^[9-12]。104M是前苏联研究者从流产胎牛分离出来,在实验室弱化减毒而成^[13-14]。布鲁氏菌在小鼠脾脏定植数量和时间是评估布鲁氏菌疫苗效力的一种手段。为了检测104M液体气溶胶在小鼠体内免疫有效性,本研究通过用不同免疫途径免疫BALB/c小鼠,待脾脏中的菌完全清除,液体气溶胶肺递送攻毒,测定小鼠脾脏载菌量、脾重、载菌时间,结果表明104M对BALB/c小鼠有保护力,3种免疫途径无显著差异。但是,气溶胶途径不但克服滴鼻不耐受、剂量不稳定及皮下注射引起局部皮肤溃疡和超敏反应等缺点,而且能在短时间快速免疫大面积人群,对疾病的暴发和流行能起到快速预防和控制作用,具有皮下注射和滴鼻途径无可比拟的优势。

抗布氏菌感染,体液免疫和细胞免疫都发挥重要作用^[15],作为胞内菌,细胞免疫发挥更重要的作用^[16],但是体液免疫也是必不可少^[17]。本研究发现104M

免疫后小鼠血清出现高水平特异性抗体 IgG、IgM、IgG1、IgG2a 和 IgA, 第8周达到高峰, 攻毒后再次升高。在小鼠体内, Th1 细胞会产生 IgG2a 型抗体, Th2 细胞会产生 IgG1 型抗体。本检测结果 IgG1 < IgG2a, 说明 Th1 免疫作用显著, 细胞免疫反应通过细胞因子的参与^[18]。Kahl-McDonagh 和 Ficht^[19]通过布鲁氏菌感染敲除 IFN- γ 基因的小鼠很快死亡, 说明 IFN- γ 对抗布鲁氏菌感染中发挥重要作用。IFN- γ 是巨噬细胞释放有助于清除胞内菌的 Th1 细胞因子^[20]。本研究检测肺匀浆细胞因子 IFN- γ 、IL-18 均在攻毒后显著升高, 说明攻毒后, 诱发局部较强的细胞因子介导的免疫反应; 而血清细胞因子显著低于空白对照组, 可能是由于免疫组小鼠攻毒后快速激发了细胞免疫反应, 攻毒后细胞因子大量消耗, 免疫组低于对照组, 与攻毒前比较仍显著升高。

本研究首次使用液体气溶胶肺递送装置进行 104M 液体气溶胶对小鼠的免疫研究, 以 BALB/c 小鼠为实验动物模型, 通过 3 种不同的免疫途径, 从免疫和攻毒后体重、脾重、脾载菌量、脾载菌时间等, 综合评估 104M 气溶胶对 BALB/c 小鼠的最佳免疫剂量、气溶胶免疫途径的安全性和保护力。结果表明 104M 能激发小鼠免疫反应和保护力, 但有一定的残余毒力, 缺乏安全性, 说明 104M 作为候选人用疫苗, 有待进一步改进。本研究为 104M 菌株的进一步改进奠定实验基础。目前, 对 104M 的毒力因子和保护机制尚不清楚, 有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Davos DE, Cargill CF, Kyrkou MR, et al. Outbreak of brucellosis at a South-Australian abattoir. 2. Epidemiological investigations[J]. Med J Aust, 1981, 2(12/13):657-660.
- [2] 付湘云, 马晓菁, 谷文喜, 等. 羊种布鲁氏菌 16M 感染 BALB/c 鼠模型的建立[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 239-241. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.075.
Fu XY, Ma XJ, Gu WX, et al. Establishment of BALB/c mouse model infected with brucella melitensis 16M[J]. Jiangsu Agric Sci, 2015, 43(12): 239-241. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.075.
- [3] Zhu LQ, Feng Y, Zhang G, et al. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella* spp. infections[J]. Vaccine, 2016, 34(3): 395-400. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.116.
- [4] 李嫣红, 谢灿茂. Th1/Th2 免疫应答系统在结核性胸膜炎患者中的表达[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(5): 324-327. DOI: 10.3760/j.issn:1001-0939.2004.05.012.
Li YH, Xie CM. A study on the Th1/Th2 cytokines in the pathogenesis of human tuberculous pleuritis[J]. Chin J Tubercul Respir Dis, 2004, 27(5): 324-327. DOI: 10.3760/j.issn: 1001-0939.2004.05.012.
- [5] Dorneles EMS, Teixeira-Carvalho A, Araújo MSS, et al. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination[J]. Vaccine, 2015, 33(31): 3659-3666. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057.
- [6] 罗家琴, 李富祥, 张以芳. 抗胞内菌感染免疫及其治疗[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(2): 46-49. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2004.02.015.
- [7] Luo JQ, Li FX, Zhang YF. Advancements on intracellular infection[J]. J Microbiol, 2004, 24(2): 46-49. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2004.02.015.
- [8] 满腾飞, 王大力, 崔步云, 等. 2009 年全国布鲁氏菌病监测数据分析[J]. 疾病监测, 2010, 25(12): 944-946. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2010.12.005.
- [9] Man TF, Wang DL, Cui BY, et al. Analysis on surveillance data of brucellosis in China, 2009[J]. Dis Surveill, 2010, 25(12): 944-946. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2010.12.005.
- [10] Guzmán-Verri C, González-Barrios R, Hernández-Mora G, et al. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2:3. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00003.
- [11] 易新萍, 谷文喜, 李金平, 等. 评价牛型布鲁氏菌疫苗免疫保护力 BALB/c 鼠模型的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(6): 73-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7236.2013.06.016.
Yi XP, Gu WX, Li JP, et al. Establishment of BALB/c mouse Model for evaluation of protective immunity in *Brucella abortus* [J]. Chin Anim Husband Vet Med, 2013, 40(6): 73-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7236.2013.06.016.
- [12] Carvalho TF, Haddad JPA, Paixão TA, et al. Meta-analysis and advancement of brucellosis vaccinology[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166582. DOI: 10.1371/journal.pone.0166582.
- [13] Cheemarla NR, Guerrero-Plata A. Immune response to human metapneumovirus infection: what we have learned from the mouse model[J]. Pathogens, 2015, 4(3): 682-696. DOI: 10.3390/pathogens4030682.
- [14] Cloeckert A, Verger JM, Grayon M, et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella* [J]. Microbiology, 1995, 141(9): 2111-2121. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2111.
- [15] Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts[J]. Immunology, 1993, 80(3): 458-464.
- [16] Vitry MA, Mambres DH, de Trez C, et al. Humoral immunity and CD4⁺ Th1 cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with *Brucella melitensis* [J]. J Immunol, 2014, 192(8): 3740-3752. DOI: 10.4049/jimmunol.1302561.
- [17] Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW, et al. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308[J]. Infect Immun, 1994, 62(8): 3206-3212. DOI: 10.1128/IAI.62.8.3206-3212.1994.
- [18] Jiménez de Bagüés MP, Dudal S, Dormand J, et al. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation[J]. Clin Immunol, 2005, 114(3): 227-238. DOI: 10.1016/j.clim.2004.07.010.
- [19] Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? [J]. Crit Rev Immunol, 2006, 26(5): 407-442. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v26.i5.30.
- [20] Kahl-McDonagh MM, Elzer PH, Hagius SD, et al. Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis[J]. Vaccine, 2006, 24(24): 5169-5177. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.005.
- [21] Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice[J]. Infect Immun, 2006, 74(7): 4048-4057. DOI: 10.1128/IAI.01787-05.
- [22] de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions[J]. Am J Pathol, 2015, 185(6): 1505-1517. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.

(收稿日期: 2019-09-11)

(本文编辑: 斗智)