

DOI:10.13350/j.cjpb.220225

· 综述 ·

布鲁氏菌载体介导的疫苗研制现状*

李文桂**，陈雅棠

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘要】 布鲁氏菌引起的布鲁氏菌病是一种严重危害人畜健康的传染性疾病。该菌可诱导感染宿主产生细胞、体液和粘膜免疫应答,利用分子生物学技术可改造为理想的疫苗载体,从而表达寄生虫和细菌的多种抗原,以布鲁氏菌减毒株为载体的疫苗包括:犬新孢子虫(rRB51-SRS-2/GRA7)、刚地弓形虫(rRB51-GRA2/GRA6/SAG2)、结核分枝杆菌(rRB51-hsp60)和布鲁氏菌(rRB51-SOD/GT/BCSP31/OMP)等,本文综述了布鲁氏菌载体疫苗的构建及其免疫机制等方面的研制现状。

【关键词】 布鲁氏菌;疫苗;综述

【中图分类号】 R378.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0240-03

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):240-242,246.]

The status in the research of Brucella_vectored vaccine

LI Wen-gui, CHEN Ya-tang (Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Brucellosis, its pathogen agent is Brucella, is one type of infectious diseases seriously endangering human and animal health, this bacteria may induce the host to produce cellular, humoral and mucosal immune responses, it may become ideal vaccine vector by means of molecular modification and express many antigens of parasites and bacteria. These Brucella_vectored vaccines include *Neospora caninum* (rRB51-SRS-2/GRA7), *Toxoplasma gondii* (rRB51-GRA2/GRA6/SAG2), *Mycobacteria tuberculosis* (rRB51-hsp60) and *Brucella* (rRB51-SOD/GT/BCSP31/OMP). This article reviews the current status of the research on the construction and immune mechanism of Brucella_vectored vaccines.

【Key words】 Brucella; vaccine; review

***布鲁氏菌(*Brucella*)引起的布鲁氏菌病是一种严重危害人畜健康的传染性疾病,常引起感染家禽的流产和不孕,还能引起接触人群的波状热、心内膜炎、关节炎或骨髓炎。常见的致病菌株为羊种马耳他布鲁菌(*B. melitensis*)、牛种流产布鲁菌(*B. abortus*)、猪种布鲁菌(*B. suis*)、绵羊附睾种布鲁菌(*B. ovis*)、犬种布鲁菌(*B. canis*)和沙林鼠种布鲁菌(*B. neotomae*)。常用灭活疫苗、减毒活疫苗、突变株疫苗、亚单位疫苗和DNA疫苗等进行免疫预防^[1-3]。

常见的减毒活疫苗种类有羊种 Rev-1 疫苗、M5 疫苗、RB51 疫苗以及牛种 S19 疫苗和猪种 S2 疫苗等,这些减毒株均可利用分子生物学技术改造为理想的疫苗载体。Vemulapalli 等^[4]发现布鲁氏菌的减毒株 RB51 可以表达外源抗原;Elzer 等^[5-6]报道布鲁氏菌-大肠埃希菌穿梭表达载体 pBBRIMCS 和自杀质粒等,为构建布鲁氏菌载体疫苗提供理论基础。绿色荧光蛋白(GFP)是一种存在于腔肠动物体内的生物发光蛋白,增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是 GFP 的突变体,荧光强度比 GFP 大 6 倍以上,EGFP 和 GFP 都可作为报告基因探究基因的表达和调控^[7-8];Chacon 等^[9]报道了含有 GFP 报道基因的重组布鲁氏菌,董炳梅等^[10]报道含有 EGFP 报道基因的重组布鲁氏菌,这为筛选阳性重组菌提供了有利条件。目前报道了多种表达寄生虫和细菌抗原的布鲁氏菌载体疫苗如犬新孢子虫(rRB51-SRS-2/GRA7)、刚地弓形虫(rRB51-GRA2/GRA6/SAG2)、结核分枝杆菌(rRB51-hsp60)和布鲁氏菌(rRB51-SOD/GT/BC-

SP31/OMP)等,本文综述了布鲁氏菌载体疫苗的构建及其免疫机制等方面的研制现状。

1 布鲁氏菌载体疫苗抗犬新孢子虫

犬新孢子虫(*Neospora caninum*)是犬、牛和羊新孢子虫病的病原体,可引起流产等生殖障碍。SRS2 基因编码该虫的速殖子表面蛋白 SRS2, GRA7 基因编码致密颗粒蛋白 7, SRS2 和 GRA7 在该虫粘附宿主和入侵过程中具有重要作用,用该虫的 SRS2 蛋白或 GRA7 的 DNA 疫苗免疫小鼠可有效抵抗犬新孢子虫速殖子的攻击^[11-12]。Vemulapalli 等^[13]提取犬新孢子虫 NC-1 株的 DNA 作为模板克隆 SRS-2/GRA7 基因,插入 pCR2-1TOPO 得 pCR2-1-SRS-2/GRA7,与 pBBGroE 重组得 pBBGroE-SRS-2/GRA7,将其电穿孔转化布鲁氏菌 RB51 株,进行筛选和培养,采取 Western blot 方法显示患者血清可结合重组菌表达的 43 ku 的 SRS-2 和 30 ku 的 GRA7 蛋。借助腹腔注射将 2.5×10^8 CFU 疫苗接种 BALB/c 鼠,在注射后 6 w 显示血清 IgG、IgG1 和 IgG2a 的滴度提升, IgG2a 与 IgG1 比值 >1 ,脾细胞产生大量 IFN- γ ,在注射后 7 周通过腹腔注射将 1×10^6 个

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)。

** **【通讯作者(简介)】** 李文桂(1967-),男,博士,研究员,主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。
E-mail: cqliwengui@163.com

犬新孢子虫 NC-1 株的速殖子进行感染攻击,在攻击后 6 周取脑组织进行荧光定量 PCR,检测犬新孢子虫的 NC5 基因和 28S rRNA 基因,发现 rRB51-SRS2 免疫组和 rRB51-GRA7 免疫组的脑组织虫体 DNA 负荷分别下降 130 和 11 倍左右。

2 布鲁氏菌载体疫苗抗刚地弓形虫

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*, Tg)是弓形虫病的病原体。致密颗粒是一种弓形虫顶端复合体的细胞器,可分泌致密颗粒蛋白(dense granule proteins, GRA),其中 GRA2(P28)是一个毒力相关抗原,在弓形虫入侵宿主后诱导纳虫空泡表面网状结构的形成,GRA6 在修饰和调理纳虫空泡的过程中起重要作用,主要参与虫体在细胞内的存活和复制,将重组 GRA2 蛋白或 pCD-GRA6 接种小鼠或绵羊可有效对抗弓形虫 RH 株的包囊攻击^[14-15];表面抗原 2(surface antigen 2, SAG2)主要参与弓形虫的入侵过程,并且与速殖子向缓殖子的转化有关,高世同等^[16-17]将重组质粒 pBK-SAG2 和 pVAX-SAG2 分别免疫 BALB/c 小鼠均可诱导有效的免疫应答;Bandara 等^[18]提取弓形虫 RH 株的总 RNA 作为模板分别克隆 GRA2、GRA6 和 SAG2 基因,插入 pNSGroE 得 pNSG-GRA2/GRA6/SAG2,将它们分别电穿孔转化布鲁氏菌 RB51 株,氯霉素筛选阳性菌株,培养后经 PCR 证实从相应重组菌株抽提的 DNA 中可扩增出 600 bp 的 GRA2 基因、800 bp 的 GRA6 基因和 700bp 的 SAG2 基因,相关保护力试验正在进行中。

3 布鲁氏菌载体疫苗抗结核分枝杆菌

结核分枝杆菌(*Mycobacteria tuberculosis*, MTB)引起的结核病是一种常见的呼吸道传染病,可累及全身多个脏器,但以肺结核为常见。热休克蛋白 60(HSP60)是一种在原核和真核细胞中高度保守的蛋白质,在正常细胞的蛋白转位、折叠和装配过程中起着分子伴侣的作用。当 MTB 处于应激状态时,可产生大量 HSP60,是机体免疫系统识别的重要细胞内抗原,将 HSP60 抗原接种小鼠可产生特异性的 CTL 应答^[19-21]。Vemulapalli 等^[22]将结核分枝杆菌的 hsp60 基因插入 pBBSODpro 得 pBBSOD-hsp60,将其电穿孔转化布鲁氏菌 RB51 株,筛选阳性重组菌,通过 Western blot 提示结核病人的血清识别重组菌表达 65 ku 的 hsp60 蛋白。采用腹腔注射将 4×10^8 CFU 疫苗注射 BALB/c 鼠,在注射后 6 周显现血清 IgG 的滴度提升,脾细胞产生高水平的 IFN- γ ,此时通过腹腔注射将 2×10^4 布鲁氏菌 S2308 株进行感染攻击,在攻击后 2 周显示免疫鼠的脾细菌负荷下降 75 倍左右。

4 布鲁氏菌载体疫苗抗布鲁氏菌

4.1 重组 RB51-SOD/GT Cu/Zn 过氧化物歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD)位于布鲁氏菌的胞膜和胞质中,可影响吞噬细胞对该菌的杀灭作用,将 pCD-SOD 或 SOD 蛋白的合成肽注射 BALB/c 鼠可有效对抗布鲁氏菌 S2308 株的攻击^[23-24],WboA 基因编码的糖基转移酶(glycosyl-transferase, GT)与光滑型布菌脂多糖的 O 链合成有关^[25]。Vemulapalli 等^[26]以 pBA II-3 为模板扩增 SOD 基因,插入 pB-BRIMCS 得 pBBR-SOD,将其电穿孔转化布鲁氏菌 RB51 株,筛选重组菌,借助免疫印渍表明布病患者的血清识别重组菌表达 40 ku 的 SOD 蛋白。通过皮下注射将 4×10^8 CFU 疫苗注射 BALB/c 鼠,显示血清 IgG 滴度在接种后 3~6 周提升,在接种后 6 周提升较高,在接种后 6 周显现脾细胞产生大量 IFN- γ ,此

时采用腹腔注射将 2×10^4 CFU 布鲁氏菌 S2308 株进行感染攻击,在攻击后 2 周提示免疫鼠脾的细菌负荷下降 100 倍左右。

Olsen 等^[27]通过皮下注射将 7.4×10^{10} CFU 重组 RB51-SOD/GT 注射怀孕 4 月的野牛,显示血清 IgG 滴度在接种后 4~24 周提升,在接种后 8 周提升较高,在接种后 20 周显现外周血单核细胞(PBMC)增殖,产生大量 IFN- γ ,流式细胞仪(FACS)证实 PBMC 中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的数目增多,在接种后 24 周采用点眼途径将 10^7 CFU 布鲁氏菌 S2308 株进行感染攻击,在攻击后 4 周显现免疫牛淋巴结的细菌负荷下降 150 倍左右。Nol 等^[28]借助口服途径将 1×10^{11} CFU 重组 RB51-SOD/GT 接种驼鹿(*Cervus canadensis*),在初次接种后 6 周重复 1 次,在初次接种后 8 周采用点眼和肌肉注射将 1×10^7 CFU 布鲁氏菌 S2308 株进行感染攻击,提示免疫鹿的血清 IgG 滴度在攻击后 6~14 周提升,在攻击后 8 周提升较高, FACS 发现 PBMC 中 CD4⁺、CD8⁺ 和 $\gamma\delta$ TCR⁺ T 细胞的数目明显增多。

4.2 重组 S19-BCSP31 布鲁氏菌的细胞表面蛋白 31(Brucella cell surface protein 31, BCSP31)与该菌的胞内生存和繁殖相关^[29],Comerci 等^[30]等抽提布鲁氏菌 S19 株的 DNA 作为模板克隆 250bp 的 BCSP31₁₋₃₁ 基因,插入 pUC19 得 pUC19-BC-SP31₁₋₃₁,与 pBBR4mcs 重组得 pBBR-BCSP31₁₋₃₁,将其电穿孔转化布鲁氏菌 S19 株,进行筛选和培养,通过 Western blot 表明布病患者的血清结合重组菌表达 15 ku 的 BCSP31₁₋₃₁ 蛋白。采用腹腔注射将 2×10^7 CFU 疫苗注射 BALB/c 鼠,发现免疫鼠的血清 IgG 滴度在注射后 10~30 d 提升,在注射后 30 d 提升较高。

4.3 重组 104M-OMP19 外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)是一类布鲁氏菌的脂蛋白,与该菌的毒力密切相关。杨巧玲等^[31]提取布鲁氏菌 104M 株的 DNA 作为模板克隆 500 bp 的 OMP19 基因,插入 pNSGroE2His 得 pNSG-OMP19,将其电穿孔转化布鲁氏菌 104M 株,进行筛选和培养,采用 Western blot 提示布病患者的血清结合重组菌表达 19 ku 的 OMP19 蛋白。通过皮下注射将 1×10^5 CFU 疫苗接种 BALB/c 鼠,在注射后 35 d 显现血清 IgG 滴度提升,脾细胞产生大量 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2,但不产生 IL-10 和 IL-17A 等细胞因子,此时借助腹腔注射将 1×10^6 CFU 布鲁氏菌 A19 株进行感染攻击,在攻击后 1 周提示免疫鼠脾的细菌负荷下降 150 倍左右。

5 结语

布鲁氏菌载体疫苗作为减毒活疫苗能够诱导宿主产生较好的保护力,可改造为疫苗载体来表达外源抗原;所表达的靶抗原不需纯化,可直接用于免疫保护试验,免去了蛋白质后处理的复杂工序;能在感染的细胞中稳定表达外源基因,且不会发生外源基因丢失;是一种胞内寄生菌,存在 MHC-I 类和 MHC-II 类抗原提呈途径,单次接种即可诱导宿主产生较强的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞性免疫应答;同时可诱导宿主产生记忆性的 T 细胞,诱导长期的免疫效应;由于其减毒活疫苗的种类较多,所以布鲁氏菌载体疫苗是初免加强策略的理想选择;易于生产、储存和运输。

目前布鲁氏菌载体疫苗尚存在减毒活疫苗的毒力不稳,毒性较大,返祖现象严重,会对人和动物造成伤害;难区分自然感

染或是人工接种免疫,经常干扰常规的血清学诊断;由于该菌是一种较强的致病菌,因而作为一种疫苗载体可能存在一定的安全性风险;阳性重组菌株的筛选需要较长时间;可供选择的表达载体较少;本身所含有的抗生素抗性基因可能对人体有害;疫苗与宿主之间的相互作用机制的研究尚不深入;疫苗效果的标准化和规范化的评价体系尚未建立;表达产物与天然蛋白存在较大差异;表达产物可能对阳性菌株有害;表达蛋白的水平较低等。

载体疫苗是一种新型疫苗,用于寄生虫和细菌的防治肯定具有较广阔的前景。但将布鲁氏菌载体疫苗发展成为一种理想疫苗亟待解决诸如布鲁氏菌载体疫苗表达蛋白的翻译后修饰及调控;疫苗的免疫途径、剂量、次数和间隔次数的探索;疫苗高效启动子的研究;疫苗的新的选择标志筛选;重组多价疫苗的研制;探索引入纳米微粒技术研制布鲁氏菌载体疫苗能否延长免疫应答的时间,诱导记忆性 T 细胞的产生;布鲁氏菌载体疫苗免疫机制的研究等诸多问题;阐明这些问题有助于拓展布鲁氏菌载体疫苗的应用前景。

【参考文献】

- [1] Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans[J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34(3):379-394.
- [2] Avila-Calderon ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, et al. A history of the development of the *Brucella* vaccines[J]. Biomed Res Int, 2013, 20(7):1-8.
- [3] Yang X, Skyberg JA, Cao L, et al. Progress in *Brucella* vaccine development[J]. Front Biol(Beijing), 2013, 8(1):60-77.
- [4] Vemulapalli R, He Y, Sriranganathan N, et al. *Brucella abortus* RB51; enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines[J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1-4):521-532.
- [5] Elzer PH, Kovach ME, Phillips RW, et al. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species[J]. Plasmid, 1995, 33(1):51-57.
- [6] Mcquiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, et al. Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids[J]. Methods Mol Biol, 1995, 47(1):143-148.
- [7] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148):802-805.
- [8] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence[J]. Nature, 1995, 373(6516):663-664.
- [9] Chacon-Diaz C, Munoz-Rodriguez M, Barquero-Calvo E, et al. The use of green fluorescent protein as a marker for *Brucella* vaccines[J]. Vaccine, 2011, 29(3):577-582.
- [10] 董炳梅, 王金良, 吕素芬, 等. 表达绿色荧光蛋白猪种布鲁菌的构建[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(6):1098-1102.
- [11] Haldorson GJ, Mathison BA, Wenberg K, et al. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice[J]. Int J Parasitol, 2005, 35(13):1407-1415.
- [12] Liddell S, Parker C, Vinyard B, et al. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*[J]. J Parasitol, 2003, 89(3):496-500.
- [13] Vemulapalli R, Sanakkayala N, Gulani J, et al. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Brucella abortus* RB51 strains expressing *N. caninum* SRS2 and GRA7 proteins[J]. Vet Parasitol, 2007, 148(3-4):219-230.
- [14] Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, et al. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice[J]. Vaccine, 2007, 25(21):4301-4311.
- [15] Hiszczynska SE, Oledzka G, Holec GL, et al. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*[J]. Vet Parasitol, 2011, 177(3):281-289.
- [16] 高世同, 吴少庭, 林敏, 等. 弓形虫 P22 编码基因真核表达质粒接种小鼠后的细胞免疫效果[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 16(6):31-32.
- [17] 高世同, 吴少庭, 龙彩虹, 等. 弓形虫 pVAX1-SAG2 真核表达质粒的构建及其诱导的小鼠免疫应答[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(8):658-661.
- [18] Bandara AB, Selem M, Jordan CN, et al. *Brucella abortus* strain RB51 can be used to express potentially protective antigens of *Toxoplasma gondii*[J]. J Eukaryot Microbiol, 2006, 53(S1):S166-S168.
- [19] Andersen P, Askgaard D, Gottschau A, et al. Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Scand J Immunol, 1992, 36(2):823-828.
- [20] Kaufmann SHE. The cellular immune response to heat shock proteins[J]. Experientia, 1992, 48(3):640-645.
- [21] Charo J, Geluk A, Sundback M, et al. The identification of a common pathogen-specific HLA class IA^{*0201}-restricted cytolytic T cell epitope encoded with the heat shock protein 65[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(12):3602-3611.
- [22] Vemulapalli R, He YQ, Boyle SM, et al. *Brucella abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses[J]. Infect Immun, 2000, 68(6):3290-3296.
- [23] Onate AA, Cespedes S, Cabrera A, et al. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c Mice[J]. Infect Immun, 2003, 71(9):4857-4861.
- [24] Tabatabai LB, Pugh Jr GW. Modulation of immune responses in balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine[J]. Mol Immunol, 2015, 65(3):287-292.
- [25] Carmen M, Mikeljon N, Ramesh V, et al. Deletion of wboA enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*[J]. Infect Immun, 2001, 69(7):4407-4416.
- [26] Vemulapalli R, He YQ, Cravero S, et al. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51[J]. Infect Immun, 2000, 68(6):3286-3289.

- Parasitol, 2014, 44(7):457-465.
- [29] Burlet P, Deplazes P, Heggin D. Age, season and spatio-temporal factors affecting the prevalence of *Echinococcus multilocularis* and *Taenia taeniaeformis* in *Arvicola terrestris*[J]. Parasit Vectors, 2011(19):4:6.
- [30] Dorjsuren T, Ganzorig S, Dagvasumberel M, et al. Prevalence and risk factors associated with human cystic echinococcosis in rural areas, Mongolia[J]. PLoS One, 2020, 15(7):e0235399.
- [31] Mustapayeva A, Manciuilli T, Zholdybay Z, et al. Incidence rates of surgically managed cystic echinococcosis in Kazakhstan, 2007-2016[J]. Am J Trop Med Hyg, 2020, 102(1):90-95.
- [32] Tamarozzi F, Hou A, Morales ML, et al. Prevalence and risk factors for human cystic echinococcosis in the cusco region of the peruvian highlands diagnosed using focused abdominal ultrasound[J]. Am J Trop Med Hyg, 2017, 96(6):1472-1477.
- [33] Go?? b E, Czarkowski MP. Echinococcosis and cysticercosis in Poland in 2012[J]. Przegl Epidemiol, 2014, 68(2):279-282, 379-381.
- [34] Luo A, Wang H, Li JQ, et al. Epidemic factors and control of hepatic echinococcosis in Qinghai province[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2014, 34(1):142-145.
- [35] Ma L, Chen DC, Zou SY, et al. Epidemiological characteristics of hepatic echinococcosis, concurrent cerebral echinococcosis, and pulmonary echinococcosis in Ganzi County, Sichuan Province, China[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(15):e19753.
- [36] 肖丹, 伍卫平, 雪莲, 等. 阿里地区棘球蚴病流行现状[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018(1):54-57.
- [37] 王东, 冯宇, 李凡, 等. 甘肃省藏区人群棘球蚴病流行现状调查及分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017(2):140-144.
- [38] Uchiumi L, Mujica G, Araya D, et al. Prevalence of human cystic echinococcosis in the towns of orquinco and Ramos Mexia in Rio Negro Province, Argentina, and direct risk factors for infection[J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1):262.
- [39] 马霄, 王虎, 程时磊, 等. 青海省黄南藏族自治州棘球蚴病流行情况调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017(5):512-514.
- [40] Wang Q, Qiu J, Yang W, et al. Socioeconomic and behavior risk factors of human alveolar echinococcosis in Tibetan communities in Sichuan, People's Republic of China[J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 74(5):856-862.
- [41] 张静宵, 马霄, 刘玉芳, 等. 青海省棘球蚴病流行与分布情况调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017(5):460-465.
- [42] Chebli H, Laamrani El Idrissi A, Benazzouz M, et al. Human cystic echinococcosis in Morocco: Ultrasound screening in the Mid Atlas through an Italian-Moroccan partnership[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(3):e0005384.
- [43] Piarroux M, Piarroux R, Knapp J, et al. Populations at risk for alveolar echinococcosis, France[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(5):721-728.
- [44] 王虎, 马淑梅, 曹得苹, 等. 青南高原人群包虫病的调查研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000(1):42-45.
- [45] 白玛央金, 韩帅, 何瑞峰, 等. 西藏自治区4种生产类型地区人群棘球蚴病流行情况[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018(1):26-29, 34.
- [46] Yuan R, Wu H, Zeng H, et al. Prevalence of and risk factors for cystic echinococcosis among herding families in five provinces in western China;a cross-sectional study[J]. Oncotarget, 2017, 8(53):91568-91576.
- [47] Wang Q, Vuitton DA, Qiu J, et al. Fenced pasture: a possible risk factor for human alveolar echinococcosis in Tibetan pastoralist communities of Sichuan, China[J]. Acta Trop, 2004, 90(3):285-293.
- [48] 吴文婷, 伍卫平, 官亚宜, 等. 藏区人群细粒棘球蚴病患病影响因素的病例对照研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018(2):161-164.

【收稿日期】 2021-09-19 【修回日期】 2021-12-03

(上接 242 页)

- [27] Olsen SC, Boyle SM, Schurig GG, et al. Immune responses and protection against experimental challenge after vaccination of Bison with *Brucella abortus* strain RB51 or RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes[J]. Clin Vac Immunol, 2009, 16(4):535-540.
- [28] Nol P, Olsen SC, Rhyan JC, et al. Vaccination of Elk (*Cervus Canadensis*) with *Brucella abortus* strain RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes does not induce adequate protection against experimental *Brucella abortus* challenge[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6:10.
- [29] Bricker BJ, Tabatabai LB, Deyoe BL, et al. Conservation of antigenicity in a 31-kDa *Brucella* protein[J]. Vet Microbiol, 1988, 18(3):313-325.
- [30] Comerci DJ, Pollevick GD, Vigliocco AM, et al. Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccines strain *Brucella abortus* S19[J]. Infect Immun, 1998, 66(8):3862-3866.
- [31] 杨巧玲, 宰晓东, 殷瑛, 等. 布鲁菌 104M:Omp19 过表达株的构建与免疫保护性评价[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(1):1-6.

【收稿日期】 2021-10-05 【修回日期】 2022-01-10