

DOI:10.13350/j.cjpb.220112

• 论著 •

淋病奈瑟菌候选外膜蛋白的免疫原性及膜定位的初步研究*

陈佳琪^{1,2,3}, 刘颖^{1,2,4}, 董凤^{1,2}, 张莉^{1,2}, 李光华^{1,2}, 杨兴^{1,2}, 张雷^{1,2**}

(1. 大理大学病原与媒介生物研究所, 云南大理 671000; 2. 大理大学基础医学院病原生物学综合实验室; 3. 河北省胸科医院分子生物学实验室; 4. 吉林大学第一医院二部检验科)

【摘要】 目的 对淋病奈瑟菌 FA1090 全基因组外膜蛋白进行免疫原性和膜定位的初步分析, 以评价其作为候选疫苗的潜力。方法 采用基因合成的方法构建重组质粒, 转化感受态细胞, 利用大肠杆菌表达系统对重组蛋白进行诱导表达, 通过镍柱层析法纯化重组蛋白; 用重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 制备免疫血清, 通过间接 ELISA 检测抗体效价初步评价蛋白的免疫原性及其在外膜的定位。结果 构建了 15 个重组质粒, 获得了相应的纯化蛋白, 通过免疫小鼠获得了免疫血清。免疫原性分析蛋白 WP_003689500.1 诱导小鼠产生相应 IgG 抗体的能力较强, 膜定位分析显示有 4 个蛋白在外膜表达的可能性较高。结论 蛋白 WP_003689500.1 诱导产生的抗体效价较高, 与全细胞抗原的结合能力较强, 可作为淋病奈瑟菌候选疫苗。

【关键词】 淋病奈瑟菌; 候选外膜蛋白; 免疫原性; 膜定位

【中图分类号】 R378.16

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0055-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan;17(1):55-58, 64.]

A preliminary study on immunogenicity and membrane positioning of *Neisseria gonorrhoeae* candidate outer membrane proteins

CHEN Jia-qi^{1,2,3}, LIU Ying^{1,2,4}, DONG Feng^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, LI Guang-hua^{1,2}, YANG Xing^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2} (1. Laboratory of Pathogenic Biology, Basic Medical College of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China; 2. Institute of Pathogens and Vectors; 3. Laboratory of molecular biology, Hebei provincial Chest Hospital; 4. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Jilin University-the Eastern Division)

【Abstract】 **Objective** A preliminary analysis of immunogenicity and membrane positioning of *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 outer membrane proteins was carried out to evaluate their potential as candidate vaccines. **Methods** Using gene synthesis method to construct recombinant plasmids, transform receptor cells. The recombinant protein was induced by *Escherichia coli* expression system, and the recombinant protein was purified by nickel column tomography. The recombinant protein was obtained from the immune serum in BALB/c mice, and the antibody titer was detected by indirect ELISA to preliminarily evaluate the immunogenicity of the protein and its localization in the outer membrane. **Results** Fifteen recombinant plasmids were constructed, the corresponding purified proteins were obtained, and immune serums were obtained through immune mice. Immunogenic analysis found that protein WP_003689500.1 has a strong ability to induce mice to produce corresponding IgG antibodies, membrane positioning analysis found that 4 proteins in the outer membrane expression is more likely. **Conclusion** The antibody produced by protein WP_003689500.1 induction had high titer and strong binding ability with whole-cell antigens. It can be used as a candidate vaccine for *N. gonorrhoeae*.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; candidate outer membrane protein; immunogenicity; membrane positioning

***淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NG)是淋病的病原菌, 是世界上第二大由细菌引起的性传播感染疾病 (sexually transmitted disease, STD)。该菌通常定植并感染男性和女性的生殖道, 但也可能存在于其他身体部位, 如直肠和口咽粘膜, 可无症状感染, 也可反复感染而不会产生治疗免疫记忆^[1]。目前尚无有效疫苗, 抗生素是控制 NG 感染的唯一有效方法, 但 NG 对其一线治疗药物, 即超广谱头孢菌素(即头孢克肟和头孢曲松)和阿奇霉素已经出现耐药性^[2-3], 且日益严重,

亟需研发 NG 疫苗。

本研究利用反向疫苗学技术从 NG 菌株 FA1090 中筛选出最有可能表达于外膜表面的候选蛋白, 通过

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81760303); 大理大学临床分子免疫学创新团队项目(No. ZKLX2019105)。

** **【通讯作者】** 张雷, E-mail: leigzhang@163.com

【作者简介】 陈佳琪(1996-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事病原生物学方向的研究。E-mail: 834038704@qq.com

同源性分析得到了 26 个同源性较高的蛋白。对其中的 15 个蛋白通过动物免疫试验分析其免疫原性,通过 ELISA 进行膜定位,并分析各重组蛋白诱导小鼠产生 IgG 抗体的能力,以及免疫血清与 NG 全细胞抗原的结合能力,初步评价该候选蛋白表达于外膜表面的可能性。

材料与方法

1 材料

1.1 蛋白信息 15 个候选外膜蛋白信息见表 1。

表 1 15 个候选外膜蛋白信息

Table 1 Information on 15 candidate outer membrane proteins

序号 Serial number	基因 ID Gene ID	蛋白登录号 Proteinaccession number	蛋白名称 Proteinname
1	3281596	WP_003689377.1	phospholipase A
2	3281181	WP_003688950.1	type IV pilus biogenesis/ stability protein PilW
3	3282808	WP_003705045.1	haemoglobin-haptoglobin-u- tilization protein HupB
4	3281625	WP_003687645.1	MULTISPECIES: outer membrane protein assembly factor BamD
5	3281426	WP_003689500.1	peptidoglycan-binding outer membrane protein RmpM
6	3281158	WP_003698952.1	LPS-assembly protein LptD
7	3282665	WP_003705162.1	autotransporter assembly complex protein TamA
8	3282457	WP_010951247.1	multidrug efflux transporter outer membrane subunit MtrE
9	3282453	WP_010951081.1	DUF560 domain-containing protein
10	3281825	WP_003702005.1	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
11	3282799	WP_010951410.1	VacJ family lipoprotein
12	3282403	WP_003698035.1	type IV pilus secretin PilQ
13	3282122	WP_003706334.1	TonB-dependent receptor
14	3282730	WP_010951392.1	murein transglycosylase A
15	3282867	WP_003688296.1	hypothetical protein

1.2 主要试剂 质粒小提试剂盒和 Pro-Light HRR 化学发光检测试剂购自天根生化科技有限公司;限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 分别购于加拿大 Fermentas 和美国 Thermo 公司;IPTG 和 TMB 双组份显色液购于 Solarbio(北京)公司;Ni-NTA Agarose 购于美国 Thermo 公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于美国 Sigma 公司;鼠源性 His 标签单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体分别购于 Fine Test(北京)公司和美国 Jackson ImmunoResearch 公司。

1.3 实验动物 6~8 周 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达试验动物有限公司。

2 方法

2.1 重组质粒的构建与鉴定 利用基因合成技术构

建含各蛋白基因的 pET32a(+), pET21a(+), 或 pET28a(+), 重组质粒;通过热激法将重组质粒转化入使用 CaCl_2 法制备的感受态细胞;通过双酶切和测序对阳性重组质粒进行鉴定,建立限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切体系,取酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2 重组蛋白的表达与纯化 挑选测序正确的阳性克隆菌落接种至含有相应抗性的 LB 液体培养基中,生长至对数中期后加入不同浓度的 IPTG,在不同温度、不同时间培养条件下各取 1 mL 菌液于 EP 管中,离心收集菌体,进行 Western blot 检测(一抗为 His 标签抗体,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体)。

表达于上清的蛋白使用 Ni-NTA 柱纯化,包涵体形式表达为主的蛋白使用盐酸胍变性、复性后通过 Ni-NTA 柱纯化。

2.3 免疫血清制备 将小鼠分为 17 组,每组 5 只。实验组小鼠每只每次注射 50 μg 相应重组蛋白;阳性对照组小鼠注射相同剂量超声破碎的 NG 全菌蛋白;阴性对照组小鼠注射相同剂量的灭菌生理盐水。免疫分别使用弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,共 2 次,每次间隔两周,采用颈背部皮下和后腿肌肉多点注射免疫。通过眼球摘取法获取免疫血清。

2.4 免疫原性分析 通过间接 ELISA 方法分析重组蛋白的免疫原性,包被 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NG 全菌蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后封闭进行 ELISA,一抗为不同稀释倍数的免疫血清,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠抗体,使用 TMB 显色液避光显色,加入 10% H_2SO_4 终止反应,观察颜色反应。用酶标仪测定 450 nm 和 630 nm 处吸光度(A)值并计算 P/N 值($\text{P}/\text{N} = \text{待测孔 } A_{450} \text{ 值}/\text{阴性对照孔 } A_{450} \text{ 值}$)。P/N 值 ≥ 2.1 为阳性,抗体效价以出现阳性血清的最高稀释倍数的一 \log_{10} 值表示。

2.5 膜定位分析 通过 75% 乙醇法制备 NG 全细胞抗原,确保菌体形态完整后进行膜定位试验。使用 5% 戊二醛预先处理酶标板后,包被 NG 全细胞抗原,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,烘干封闭按方法 2.4 进行 ELISA。

结果

1 重组质粒的鉴定

通过酶切和测序对重组质粒进行鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳显示 15 个阳性克隆经双酶切后均与预期大小相符,目的基因片段分别为 1 083、687、717、639、636、708、873、561、915、471、594、1218、1431、813、222 bp,测序结果均正确,成功构建了 15 个重组质粒。

2 重组质粒的表达与纯化

通过 IPTG 诱导重组蛋白表达,其中蛋白 WP_003689377.1 在 1.0 mmol/L IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导

4 h 表达量较高,其余蛋白可通过 0.1mmol/L IPTG, 16 ℃ 条件下过夜诱导表达。7 个重组蛋白为可溶性表达,蛋白登录号分别为 WP_003688296.1、WP_003689500.1、WP_010951410.1、WP_003688950.1、WP_003705045.1、WP_003702005.1 和 WP_010951392.1,其余 8 个重组蛋白以包涵体形式在菌体沉淀中表达,蛋白登录号分别为 WP_010951081.1、WP_003705162.1、WP_003687645.1、WP_003706334.1、WP_003698035.1、WP_003698952.1、WP_003689377.1 和 WP_010951247.1。通过 Ni-NTA 柱,以上蛋白均得到纯化。用 His 标签抗体对纯化的重组蛋白进行 Western blot 检测,各蛋白分子质量大小均与预期相符(图 1)。

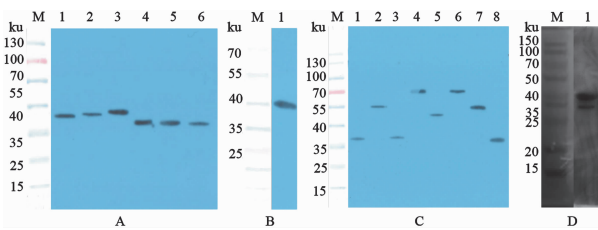


图 1 重组蛋白的 Western blot 检测结果
A:1 蛋白 WP_003687645.1 2 蛋白 WP_003688950.1 3 蛋白 WP_003689500.1 4 蛋白 WP_003702005.1 5 蛋白 WP_010951247.1 6 蛋白 WP_010951392.1 B: 蛋白 WP_010951410.1 C:1 蛋白 WP_003705045.1 2,7 蛋白 WP_010951081.1 3 蛋白 WP_003688296.1 4 蛋白 WP_003698035.1 5 蛋白 WP_003698952.1 6 蛋白 WP_003706334.1 8 蛋白 WP_003705162.1 D: 蛋白 WP_003689377.1

图 1 重组蛋白的 Western blot 检测结果
A:1 Protein WP_003687645.1 2 Protein WP_003688950.1 3 Protein WP_003689500.1 4 Protein WP_003702005.1 5 Protein WP_010951247.1 6 Protein WP_010951392.1 B: Protein WP_010951410.1 C:1 Protein WP_003705045.1 2,7 Protein WP_010951081.1 3 Protein WP_003688296.1 4 Protein WP_003698035.1 5 Protein WP_003698952.1 6 Protein WP_003706334.1 8 Protein WP_003705162.1 D Protein WP_003689377.1

图 1 Recombinant protein Western blot test results

3 淋病奈瑟菌全细胞抗原制备

革兰染色后观察,75%乙醇处理 30 min 后的淋病奈瑟菌全细胞抗原菌体形态保持较完整(图 2),适合作为膜定位全细胞抗原。接种于巧克力平板过夜,次日无菌落出现,表明该方法制备的全细胞抗原灭活处理有效。

4 免疫原性分析

用重组蛋白免疫小鼠,制备抗血清,以蛋白 WP_003689500.1 的抗血清效价较高,诱导小鼠产生相应 IgG 抗体的能力较强,蛋白 WP_003689377.1、WP_003705045.1 和 WP_010951392.1 诱导产生抗体的能力较弱(表 2、图 3)。

5 膜定位分析

15 个蛋白均与全细胞抗原原有结合,结合能力较高

的有 WP_003688296.1、WP_003689500.1、WP_003688950.1 和 WP_003702005.1,这 4 个蛋白表达在膜表面的可能性最大(表 3、图 4)。

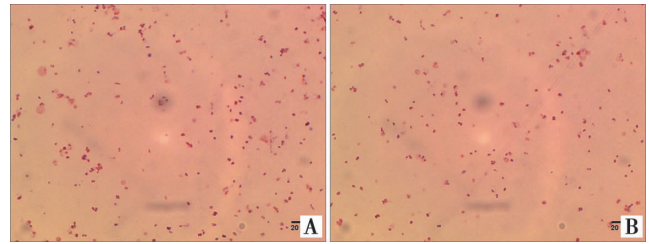


图 2 淋病奈瑟菌的镜下形态(1 000×)
A *N. gonorrhoeae* before 75% ethanol treatment B *N. gonorrhoeae* treated with 75% ethanol

图 2 Microscopic morphology of *N. gonorrhoeae* (1 000×)

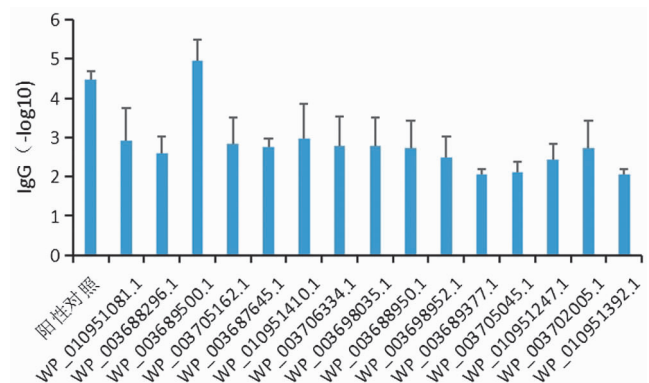


图 3 间接 ELISA 检测免疫血清的抗体效价
图 3 The antibody titer of immune serum was detected by indirect ELISA

表 2 候选蛋白的抗体效价($\bar{x} \pm s, -\log_{10}$)

Table 2 Antibody titer of candidate protein($\bar{x} \pm s, -\log_{10}$)

蛋白抗原 Protein antigen	抗体效价 Antibody titer	蛋白抗原 Protein antigen	抗体效价 Antibody titer
阳性对照	4.46±0.23	WP_003698035.1	2.78±0.72
WP_010951081.1	2.90±0.85	WP_003688950.1	2.72±0.69
WP_003688296.1	2.60±0.43	WP_003698952.1	2.48±0.55
WP_003689500.1	4.95±0.54	WP_003689377.1	2.06±0.13
WP_003705162.1	2.84±0.65	WP_003705045.1	2.12±0.27
WP_003687645.1	2.75±0.21	WP_010951247.1	2.42±0.40
WP_010951410.1	2.96±0.89	WP_003702005.1	2.72±0.69
WP_003706334.1	2.78±0.76	WP_010951392.1	2.06±0.13

讨论

淋病是一个全球性的公共卫生问题。据估计,全世界每年约有 1 亿例淋病,而且近年来病例数呈上升趋势^[4]。有症状的 NG 感染常见于男性的尿道炎和女性的宫颈炎,感染还经常发生于直肠、咽部和眼睛的粘膜。此外,NG 无症状感染较为常见,如果未确诊或未治疗,可导致严重的后遗症,包括盆腔炎、不良妊娠结局、新生儿并发症和不孕症。NG 感染也会增加人类免疫缺陷病毒感染的风险^[5]。目前,NG 的耐药性日

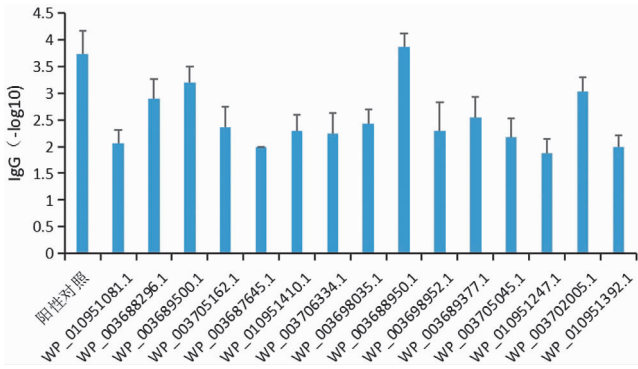


图4 间接ELISA检测重组蛋白与淋病奈瑟菌全细胞抗原的结合能力
Fig. 4 Indirect ELISA detects the binding ability of recombinant proteins to *N. gonorrhoeae* whole-cell antigens

表3 候选蛋白与全细胞抗原的结合能力($\bar{x} \pm s, -\log_{10}$)
Table 3 Binding ability of candidate proteins to whole cell antigens($\bar{x} \pm s, -\log_{10}$)

蛋白抗原 Protein antigen	抗体效价 Antibody titer	蛋白抗原 Protein antigen	抗体效价 Antibody titer
阳性对照	3.72 ± 0.45	WP_003698035.1	2.42 ± 0.27
WP_010951081.1	2.06 ± 0.25	WP_003688950.1	3.87 ± 0.25
WP_003688296.1	2.90 ± 0.37	WP_003698952.1	2.30 ± 0.52
WP_003689500.1	3.20 ± 0.30	WP_003689377.1	2.54 ± 0.39
WP_003705162.1	2.36 ± 0.39	WP_003705045.1	2.18 ± 0.34
WP_003687645.1	2.00 ± 0.00	WP_010951247.1	1.88 ± 0.27
WP_010951410.1	2.30 ± 0.30	WP_003702005.1	3.02 ± 0.27
WP_003706334.1	2.24 ± 0.39	WP_010951392.1	2.00 ± 0.21

益严重。因此,亟需研发NG疫苗。由于NG的免疫逃避机制、缺乏模拟自然感染的动物模型以及对诱导保护性免疫反应所需条件的了解有限等,导致NG的疫苗研发受限^[6]。研究中的15个候选蛋白均被预测为同源性较高的NG外膜蛋白,通过免疫原性和膜定位分析确定了3个蛋白免疫原性较低,分别为磷脂酶A(WP_003689377.1)、血红蛋白结合珠蛋白利用蛋白B(WP_003705045.1)和胞壁质转糖基酶A(WP_010951392.1);获得了1个有较大潜力成为NG候选疫苗蛋白:结合肽聚糖的外膜蛋白RmpM(WP_003689500.1)。Troncoso等^[7]报道,除致病性奈瑟菌属物种外,乳酰胺奈瑟球菌(*N. lactamica*)和干燥奈瑟菌(*N. sicca*)菌株中也存在RmpM蛋白,说明RmpM在奈瑟菌属物种中应该相当保守。脑膜炎奈瑟菌的RmpM蛋白负责结合肽聚糖,它包含1个N端结构域和1个单独的球状C端结构域^[8]。RmpM蛋白N-末端片段与主要的外膜孔蛋白PorA和PorB结合,使其保持天然寡聚状态。

OMV作为疫苗的开发和使用在B型脑膜炎(MenB)的防治中备受关注^[9]。Rmp蛋白是OMV的组成部分,在表达RmpM截短N-末端片段的脑膜炎奈瑟菌菌株中,外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMV)的产量显著增高^[10-11]。控制B组脑膜炎奈瑟

菌引起的流行病而研制的含有OMV的MeNZB疫苗有较高的安全性和免疫原性^[12]。Petousis等^[13]报道,接种MeNZB疫苗后可降低淋病的发病率,但该疫苗已经停产。目前,多组分重组脑膜炎球菌疫苗4CMenB(Bexsero)已在许多国家获得许可和使用,Bexsero疫苗中也含有与MeNZB疫苗相同的OMV蛋白,该疫苗中的奈瑟菌肝素结合抗原(Neisserial Heparin Binding Antigen, NHBA)和因子H结合蛋白(factor H binding protein, fHbp)以及配方中的辅助融合蛋白GNA1030和GNA2091也能够诱导机体产生针对淋病奈瑟菌的免疫反应^[14-15]。Semchenko等^[16]报道,淋病奈瑟菌的OMV亦可作为候选疫苗之一,但尚未在人体中进行过测试。本研究中RmpM蛋白诱导小鼠产生IgG抗体的能力较高,也可能表达于外膜表面,有望作为NG候选疫苗或分子诊断的靶点。

【参考文献】

- [1] Jefferson A, Smith A, Fasinu PS, et al. Sexually transmitted *Neisseria gonorrhoeae* Infections-update on drug treatment and vaccine development[J]. Medicines (Basel), 2021, 8(2): 11.
- [2] Yuan Q, Li Y, Xiu L, et al. Identification of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined resistance to both ceftriaxone and azithromycin, China, 2017-2018[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 1546-1549.
- [3] Mlynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, et al. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century[J]. Med Microbiol Immunol, 2020, 209(2): 95-108.
- [4] Gala RP, Zaman RU, DSouza MJ, et al. Novel whole-cell Inactivated *Neisseria Gonorrhoeae* microparticles as vaccine formulation in microneedle-based transdermal immunization[J]. Vaccines (Basel), 2018, 6(3): 60.
- [5] Suay-Garcia B, Perez-Gracia MT. *Neisseria gonorrhoeae* Infections[J]. Pathogens, 2020, 9(8): 647.
- [6] Lin EY, Adamson PC, Klausner JD. Epidemiology, treatments, and vaccine development for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: current strategies and future directions[J]. Drugs, 2021, 81(10): 1153-1169.
- [7] Troncoso G, Sanchez S, Kolberg J, et al. Analysis of the expression of the putatively virulence-associated neisserial protein RmpM (class 4) in commensal *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis* strains[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199(2): 171-176.
- [8] Grizot S, Buchanan S K. Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis* [J]. Mol Microbiol, 2004, 51(4): 1027-1037.
- [9] van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology[J]. Biotechnol J, 2015, 10(11): 1689-1706.
- [10] Maharjan S, Saleem M, Feavers I M, et al. Dissection of the function of the RmpM periplasmic protein from *Neisseria meningitidis* [J]. Microbiology (Reading), 2016, 162(2): 364-375.

(下转 64 页)

- Saude Colet, 2017, 22(11):3645-3652.
- [12] 郑辉烈,王忠旭,王增珍. Meta分析中发表偏倚的 Begg's 检验、Egger's 检验及 Macaskill's 检验的 SAS 程序实现[J]. 中国循证医学杂志, 2009, 9(8):910-916.
- [13] Sun WW, Liu XB, Li W, et al. Effects and interaction of meteorological factors on hemorrhagic fever with renal syndrome incidence in Huludao City, northeastern China, 2007-2018[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(3):e0009217.
- [14] Xiang JJ, Hansen A, Liu QY, et al. Impact of meteorological factors on hemorrhagic fever with renal syndrome in 19 cities in China, 2005-2014[J]. Sci Total Environ, 2018(636):1249-1256.
- [15] Zhang WY, Guo WD, Fang LQ, et al. Climate variability and hemorrhagic fever with renal syndrome transmission in North-eastern China[J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(7):915-920.
- [16] Joshi YP, Kim EH, Cheong HK. The influence of climatic factors on the development of hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis during the peak season in Korea: an ecologic study[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1):406-416.
- [17] Xu QQ, Li RZ, Rutherford S, et al. Using a distributed lag non-linear model to identify impact of temperature variables on haemorrhagic fever with renal syndrome in Shandong Province[J]. Epidemiol Infect, 2018, 17(1):406-414.
- [18] 孙琬琬,刘小波,吴海霞,等. 基于分布滞后非线性模型的葫芦岛和丹东市环境温度对肾综合征出血热的效应研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(3):272-277.
- [19] 许勤勤,李润滋,刘娅飞,等. 基于分布滞后非线性模型的青岛市温度与肾综合征出血热的剂量反应关系[J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(1):90-96.
- [20] 肖洪,田怀玉,张锡兴,等. 气候变化对长沙市肾综合征出血热发病的影响与预警模型[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(10):881-885.
- [21] 劳家辉,刘志东,刘言玉,等. 气温对不同特征人群肾综合征出血热发病影响的研究[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(6):483-486.
- [22] 郭雪艳,周健,范俊杰,等. 潍坊市肾综合征出血热与气象因素相关性研究[J]. 预防医学论坛, 2020, 26(12):888-890, 894.
- [23] 王金娜,劳家辉,侯娟,等. 气象因素对鼠密度的影响研究[J]. 预防医学, 2018, 30(9):870-873, 878.
- [24] Lin HL, Zhang ZT, Lu L, et al. Meteorological factors are associated with hemorrhagic fever with renal syndrome in Jiaonan County, China, 2006-2011[J]. Int J Biometeorol, 2014, 58(6):1031-1037.
- [25] Cao LN, Huo XY, Xiang JJ, et al. Interactions and marginal effects of meteorological factors on haemorrhagic fever with renal syndrome in different climate zones: Evidence from 254 cities of China[J]. Sci Total Environ, 2020(721):137564.
- [26] Fang LQ, Wang XJ, Liang S, et al. Spatiotemporal trends and climatic factors of hemorrhagic fever with renal syndrome epidemic in Shandong Province, China[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(8):e789.
- [27] 孙倩莱,张苏蕾,曾舸,等. 2009-2019年湖南省肾综合征出血热病例及宿主动物监测分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(4):351-355.
- [28] 曹丽娜. 中国不同气候带肾综合征出血热的影响因素及预测模型研究[D]. 济南:山东大学, 2020.
- [29] Tamerius J, Nelson MI, Zhou SZ, et al. Global influenza seasonality: reconciling patterns across temperate and tropical regions[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(4):439-445.
- [30] 胡文穗,刘伟,刘远,等. 广州市 2010-2019年肾综合征出血热流行特征及时空分布动态变化[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(12):2087-2092.
- [31] 刘晓冬. 中国肾综合征出血热时空分布及气候因素对辽宁省 HFRS 影响的研究[D]. 济南:山东大学, 2012.
- [32] 梁小洁,严延生,张智芳,等. 肾综合征出血热[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(10):858-863.
- [33] 康德英,洪旗,刘关键,等. Meta分析中发表性偏倚的识别与处理[J]. 中国循证医学杂志, 2003, 3(1):45-49.

【收稿日期】 2021-10-23 【修回日期】 2021-12-21

(上接 58 页)

- [11] Prinz T, Tommassen J. Association of iron-regulated outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* with the RmpM (class 4) protein[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(1):49-53.
- [12] Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, et al. MeNZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain[J]. Vaccine, 2005, 23(17-18):2191-2196.
- [13] Petousis-Harris H, Paynter J, Morgan J, et al. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study[J]. Lancet, 2017, 390(10102):1603-1610.
- [14] Petousis-Harris H, Radcliff F J. Exploitation of *Neisseria meningitidis* group B OMV vaccines against *N. gonorrhoeae* to inform the development and deployment of effective gonorrhoea vaccines[J]. Front Immunol, 2019(10):683.
- [15] Leduc I, Connolly KL, Begum A, et al. The serogroup B meningococcal outer membrane vesicle-based vaccine 4CMenB induces cross-species protection against *Neisseria gonorrhoeae*[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(12):e1008602.
- [16] Semchenko EA, Tan A, Borrow R, et al. The Serogroup B meningococcal vaccine bexsero elicits antibodies to *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Clin Infect Dis, 2019, 69(7):1101-1111.

【收稿日期】 2021-09-23 【修回日期】 2021-12-03