

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.13

布鲁氏菌 S19 疫苗应用及研究进展

叶俊贤^{1,2}, 冯宇¹, 陈瑞爱^{2*}, 丁家波^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

[收稿日期] 2016-11-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 05-0062-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 布鲁氏菌病(布病)是由布鲁氏菌引起的一种重要的人兽共患病,该病对畜牧业和人类健康均构成严重威胁,使用疫苗免疫是防控布病的重要措施之一。光滑型牛种布鲁氏菌 19(S19)活疫苗是世界上第一个被广泛应用且效果良好的布病疫苗,至今为止仍是使用最广泛的疫苗之一。本文主要从应用情况及目前研究进展两大方面对 S19 疫苗进行概述,以期对日后使用该疫苗预防布鲁氏菌病提供借鉴及为疫苗研究提供思路。

[关键词] 布鲁氏菌;布鲁氏菌病;S19 疫苗

Research Progress and Application of *Brucella abortus* Strain 19

YE Jun-xian^{1,2}, FENG Yu¹, CHEN Rui-ai^{2*}, DING Jia-bo^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Corresponding author: CHEN Rui-ai, E-mail: chensa727@yahoo.com; DING jia-bo, E-mail: dingjiabo@ 126.com

Abstract: Brucellosis is a crucial zoonosis caused by brucella, and it causes great losses to farming and threat to health of human being. Vaccination is one of the most effective measures used to control this disease. The first widely effective brucella vaccine was *Brucella abortus* strain 19(S19). Nowadays, *Brucella abortus* strain 19 is still one of the most widely used brucella vaccine in the world and plays an important role in prevention of brucellosis. Both application and research progress which about the *Brucella abortus* strain 19 vaccine were reviewed in this paper in order to provide reference of using this vaccine to control brucellosis in the future and provide ideas for vaccine research.

Key words: *Brucella abortus*; brucellosis; S19 vaccine

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500902)

作者简介: 叶俊贤, 硕士研究生, 从事重要人畜共患病诊断技术研究。

通讯作者: 陈瑞爱, E-mail: chensa727@yahoo.com; 丁家波, E-mail: dingjiabo@ 126.com

Xiao X H, Wang J B, Yan D, Studies and application of biological evaluation in the quality standardization of Chinese medicines[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica -World Science and Technology, 2014, 16(3) :514-518.

(11) :110-112.

Gu J H. Standardization of veterinary traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(11) :110-112.

[16] 顾进华. 兽医中药的标准化之路[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52

(编辑:陈希)

布鲁氏菌病 (Brucellosis, 简称布病) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 感染机体而引起的人兽共患传染病。布鲁氏菌是革兰氏阴性、兼性胞内寄生菌, 根据宿主特异性、生化特性和抗原组成目前大致分为 10 个生物种, 包含 20 个生物分型, 其中常见且危害性较大的是羊种、牛种和猪种^[1]。布鲁氏菌可感染多种野生动物和家畜, 主要侵害机体淋巴系统和生殖系统, 感染后能够导致母畜不孕不育、早产、流产、产奶量下降等; 公畜则出现睾丸炎、机体消瘦等症状^[2]。人类可以通过接触受感染动物及受污染物品而感染。人感染布鲁氏菌后, 表现出波浪热、多汗、全身乏力、关节疼痛甚至变形、睾丸肿大、神经系统及生殖系统功能障碍等, 病情较长且反复, 给病人带来极大痛苦和伤害^[3]。该病一方面给畜牧业造成巨大经济损失, 另一方面对人类健康和社会公共卫生安全有极大的隐患。因此, 在布病流行的国家, 布病防控及消除工作一直是公共健康计划的重要内容。另外, 据统计, 我国动物布病发病率在 2005-2007 年基本保持稳定, 但 2008 年以后发病率开始大幅上升, 2009 年的发病数已达到 2000 年的 18.6 倍^[4], 2011 年全国报告的新发病例数比 2010 年增加了 28.8%^[5]。数据显示目前我国布病疫情形势相当严峻, 有效防控布病刻不容缓。

带菌的动物是引起布病发生的主要传染源。因此, 加强动物布病的防控势在必行, 这对防控人间布病同样具有重要的意义。在正确诊断和捕杀患病动物、有效切断传播途径的基础上, 接种疫苗是公认的能够降低动物布病发生和传播的最实际有效的方法之一。牛种布鲁氏菌 19 (*B. abortus* strain 19, S19) 疫苗是世界上第一个被广泛使用的有效预防布病的动物疫苗^[6]。20 世纪 50 年代, 我国从前苏联引进 S19 疫苗株^[7], 用于养殖业中布鲁氏菌的防治, 迄今为止在我国已使用 60 多年, 该疫苗株为我国有效地防控牛布病做出了卓越贡献。本文将对 S19 疫苗的应用及研究进展进行概述。

1 疫苗概况

S19 疫苗株是光滑型牛种布鲁氏菌弱毒活菌株, 最初的 S19 疫苗株是 John Buck 在 1923 年从新西兰西奶牛场的牛奶样品中分离, 并在实验室条件下, 传代培养一年后得到的弱毒光滑型突变株。由于早期该疫苗使用过程中发现能导致部分怀孕母畜流产以及人的感染, 安全性较低, 在美国被禁止使用。目前广泛使用的 S19 疫苗株是 1956 年由美

国科学家筛选得到的对赤藓醇 *ery* 基因敏感的缺失株, 安全性较初期疫苗有所提高^[8]。

S19 疫苗于 20 世纪 30 年代起便在世界范围内被用于预防牛布鲁氏菌病。在美国, 该疫苗一直到 20 世纪 90 年代中期, 才逐渐被粗糙型 RB51 疫苗代替。S19 疫苗目前仍是 OIE 认可的布病参考疫苗, 是印度、阿根廷、巴西等许多国家的布病参考疫苗^[9]。自 2001 起, 巴西为了降低国内布鲁氏菌病患病率和感染率, 已开始实施对雌性犍牛实行强制免疫 S19 疫苗^[10]。在苏丹等非洲国家, S19 疫苗株仍然是布病防控使用的主要疫苗^[11]。可见, S19 疫苗在世界防控布鲁氏菌病工作中被广泛使用, 且一直发挥巨大作用。

在我国, A19 (S19 株在《中国兽药典》中被称为 A19 株) 疫苗已经使用了 60 多年, 在相当长的一段时间里, 对布鲁氏菌防控起到至关重要作用。丁家波等^[12]曾对我国保存的不同时期、不同国家来源 S19 菌株进行过鉴定, 均未检测到 *ery* 基因的缺失。由此推测可能由于历史的原因, 我国当时未引进 *ery* 基因缺失的 S19 株, 目前实际使用的 A19 株应该是 1956 年前被广泛使用的 S19 疫苗株。

2 疫苗的应用

2.1 疫苗临床效果 国外, 美国国家动物疫病实验室关于 S19 疫苗的总结报告指出, 65%~75% 免疫动物不被感染, 25%~35% 免疫动物虽然感染, 但没有流产等明显临床症状^[13]。国内, 河北芦台应用该苗, 能有效防控因布鲁氏菌引起的流产; 对内蒙古的黄牛群接种免疫 A19 后, 布鲁氏菌检出率由免疫前的 86.7% 降低到免疫后的 29.4%; 在青海对母牦牛后免疫, 流产率由免疫前的 28.48% 降低下降为 1.26%; 在新疆的 5 个奶牛养殖小区联合使用 S2 和 A19 疫苗, 经过连续 2 年防控监测, 各个养殖小区能繁母牛流产率明显下降, 流产率最高的小区从超过 10% 下降至 1% 以下^[14]。

S19 (A19) 疫苗的临床效果明显, 能有效防控布鲁氏菌感染, 降低畜群死胎率和流产率, 为畜群健康保健护航, 同时还减少因能繁母牛死胎、流产所导致的经济损失。

2.2 疫苗效果的影响因素 S19 疫苗的免疫保护效力与免疫剂量、免疫途径、动物年龄、动物群体免疫情况等因素有相关。

使用不同免疫剂量, S19 疫苗能对动物提供不同程度的流产保护力^[15]。国外使用强毒 2308 株

攻毒试验研究表明,疫苗有效注射量越高,其保护效果越好;使用低剂量多次免疫,也能得到较好的保护力。临床应用中,应注意根据免疫动物的实际情况,选用合适的免疫剂量。

免疫途径也是影响疫苗效果的重要因素之一。以我国 A19 疫苗临床使用为例,接种对象为育成牛和产后母牛,不能在怀孕牛上使用。怀孕母牛皮下注射免疫剂量 S19 疫苗,能够引起约 3.2% 的流产率;当给孕牛静脉注射相同剂量时,流产率可达 100%^[16]。犍牛 3~8 月龄时进行第一次皮下注射接种,18~20 月龄(第 1 次配种前)进行第二次免疫接种,疫苗产生的免疫有效保护期为 72 个月。一般不免疫 3 月龄以下犍牛,因为一是免疫系统不健全,二是犍牛对布鲁氏菌感染不敏感。该疫苗免疫公畜时,能导致睾丸炎的发生。正确的免疫途径,能更好的发挥疫苗的效果,同时能避免不必要的意外和损失。

布鲁氏菌是一种胞内寄生菌,如果在牛只疫苗接种前已经感染,即使接种疫苗,抗体持续阳性,但机体一旦免疫机能降低,布鲁氏菌仍能从细胞内释放进入体液循环,引起机体启动记忆反应,发挥细胞和体液免疫,将体液中的病原菌清除,这一过程伴随着动物的发热等体征,随后退热,牛只看似恢复,但在细胞内的病原菌并不能清除,导致机体反复发热,对牛群构成潜在的风险。因此,在免疫接种前必须保证牛只的健康,要对牛群进行检疫,血清学阳性或出现发热、流产等临床指标阳性的可疑奶牛,必须隔离,只接种健康牛群,否则会造成牛群长期隐性带菌。

2.3 疫苗缺点 在长期临床使用过程,人们也发现 S19 疫苗有其局限性。如 S19 疫苗可以对免疫牛群产生较好的保护性,但对山羊免疫效果不太理想,对猪免疫则完全无效。S19 疫苗是中等毒力疫苗,接种后可引起明显局部反应、能导致孕畜流产、公畜睾丸炎等情况,大剂量接触疫苗细菌时,甚至能引起人感染。所以在临床使用时,一方面要注意疫苗的使用方法和免疫对象,另一方面,使用者必须做好自身防护,同时也要注意消毒,防止疫苗在环境扩散。

另外,S19 疫苗是光滑型布鲁氏菌,其 LPS 含有 O-侧链,使用血清学方法检测感染动物时,不能区分动物是自然感染还是疫苗接种,这给布鲁氏菌病的流行病学调查,对疫源地的掌控和疾病净化工

作带来了阻碍。

3 疫苗研究

3.1 毒力评价 国际上通常有 3 种方法反映布鲁氏菌的毒力:对豚鼠的最小感染量、感染豚鼠的脾脏含菌量以及感染小鼠体内的存活时间,其中对豚鼠的最小感染量通常用于对强毒株布鲁氏菌毒力的测定。程君生等^[17]使用小鼠体内存活时间和豚鼠脾脏含菌量两种方法,对我国现有的 3 种布病疫苗(A19、M5、S2)的毒力进行了测定和分析,证明 A19 毒力介于 S2 和 M5 之间,且毒力稳定不返强。同时,A19 疫苗感染的豚鼠每克脾脏含菌量最高不超过 20 万,符合我国《兽用生物制品规程》中对布病疫苗种毒的毒力规定,认为是可安全使用的临床弱毒活疫苗。持续的定殖力可长时间饲养的畜群,如奶牛、种畜等提供持久的保护力。

在分子水平上,鉴于我国 A19 株较目前国际流行使用的 S19 株仍 ery 基因序列,与前期 S19 疫苗株一致,故认为毒力高于国际 S19 疫苗株。但研究发现,布鲁氏菌强毒株也存在 ery 基因序列缺失的情况,却并不会像 S19 一样毒力致弱,所以研究人员认为赤藓醇代谢受影响并不是导致 S19 毒力致弱的主要原因。对牛种布鲁氏菌强毒株和 S19 疫苗株进行了全基因组测序和比较基因组学分析,鉴定了新的可能导致 S19 疫苗株毒力致弱的基因,对这些基因的进一步功能验证有助于阐明 S19 的毒力机制^[18]。

3.2 对疫苗的免疫应答机理 在体液免疫方面,用 S19 接种牛后,LPS 通过激活 B 淋巴细胞,诱导抗体分泌,能产生高滴度的 IgG1、IgG2 和 IgM,以及低浓度的 IgA^[19],接种小鼠则能产生大量 O 链特异性的 IgG1、IgG2b 和 IgM^[20]。IgG2 抗体 Fc 区能结合吞噬细胞上的 Fc 受体,促进细胞的吞噬作用和杀菌作用。^[21]

细胞免疫方面,在小鼠实验中,接种 S19 后,能诱导强烈的 Th1 细胞免疫应答,产生 IL-2、TNF- α 、IFN- γ ,另外还诱导产生高水平抗原特异性的 CD4+ 和粒酶分泌 CD8+T 细胞,但不产生 IL-4 和 IL-10^[22]。有研究表明,牛接种 S19 后,特异性细胞介导的免疫组分被刺激,表现为 IFN- γ 产生和 CD4+ 或 CD8+ T 细胞增加^[23]。接种 S19 后,牛和鼠的淋巴结细胞,在体外用布鲁氏菌特异性蛋白质刺激时,与未接种疫苗的动物相比,增殖速率明显提高^[24]。

S19 疫苗是光滑型布鲁氏菌,其结构中存在 LPS,能刺激机体产生良好的体液免疫。另一方面布鲁氏菌是胞内寄生菌,机体细胞免疫对抑制布鲁氏菌发挥至关重要的作用。S19 疫苗激活机体细胞免疫并诱导产生 IFN- γ ,能有效提高机体对野毒抵抗力。

3.3 疫苗改良 在血清学方法上,S19 疫苗株是光滑型布鲁氏菌,其 LPS 含有 O 侧链,其诱导产生的抗体类型与野毒株诱导的抗体相像,这使得常规血清学检测方法无法区分免疫动物和自然感染动物。分子生物学方法上,目前国际上广泛使用的 S19 存在 *ery* 基因缺失,OIE 将这一特点作为 S19 与野毒株鉴别诊断依据^[25]。但我国使用的 A19 疫苗株较国外使用的 S19 株而言,不存在缺失情况,所以该方法不适用于 A19 株。寻求可鉴别诊断方法、保持良好免疫原性是 S19 疫苗两个重要的研究方向。

在疫苗鉴别方面,有研究发现 *VirB8* 基因上 108 位碱基的 G-T 突变,可作为 A19 疫苗株与野生菌株的鉴别依据之一^[26];利用 A19 赤藓醇代谢基因序列差异,可区分我国疫苗株 A19 和牛 I 型强毒株 2308^[27],但是上述两种方法还未能明确区分出 A19 疫苗株与野毒株。利用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析方法,可鉴别 A19 与野生菌株,但操作复杂^[28]。通过检测比对 SNP 位点可较快速、简便区分 S19 和其它野毒株^[29];Gopaul 等^[30]建立的 S19 鉴别检测荧光定量 PCR 方法,目前同样适用于我国布鲁氏菌 A19 疫苗株的鉴别诊断。

除对传统 S19 疫苗差异性研究,新型疫苗的研究一直在进行。对于 S19(A19)疫苗的改进,在保持其良好免疫源性和遗传稳定性的基础上,可通过加入标记基因等方式,提高鉴别诊断有效性和简便性。目前,多个候选物可用作标记基因,如:bp26 基因,P39 基因和绿色/红色荧光蛋白(GFP/RFP)基因。Bp26 蛋白是有效的免疫原,但有实验证明,在缺乏 Bp26 蛋白的表达的情况下,并不影响 S19 疫苗在小鼠或怀孕母牛中的保护能力^[31]。在小鼠模型中,免疫显示蛋白 P39 的表达缺失不影响 S19 疫苗的保护功效^[32],也可以作为标记基因。具有标记基因 A19- Δ VirB12 突变株^[33]和缺失 *wboA* 基因的 RB6 株^[34],其保护力和稳定性与 A19 株相当,且可以有效区别野毒感染,是 S19 疫苗改进较成功的例子。

4 结 语

布鲁氏菌病是一种严重的人畜共患传染病,在布病的综合防控措施中,至今为止,使用弱毒疫苗仍是控制动物布病的最有效的方法。S19 是光滑型弱毒活疫苗,能有效刺激机体产生足够且持久的保护力,毒力稳定不返强,有效保护畜群,抵御野毒感染,降低流产率。S19 疫苗作为世界范围内第一个广泛使用的布鲁氏菌活疫苗,且一直沿用至今,对全球布病防控具有相当重要的地位和意义,同时也足见该疫苗的效果长期得到认可。在临床上,S19 疫苗有其优越性,但布鲁氏菌分型众多,单一疫苗的使用不足以完全满足布病防控的需求,所以除 S19 外,还有像 S2、RB51、Rev.1 等其他效果良好的疫苗在使用。近些年来,世界范围布病疫情有持续增长的趋势,特别是我国布病疫情呈较明显的反弹,对畜牧生产和公共卫生健康存在重大威胁,加强布病防控和净化势在必行,优秀的疫苗的研发和使用更显得迫在眉睫。随着布鲁氏菌致病性及免疫原性相关的生物分子机制深入研究和当下对疫情控制与净化的要求,新疫苗应兼具安全性、稳定性、高保护性、标记性于一身。

使用良好的疫苗在布病防控中是有效的措施,但要完全控制布病疫情及净化布病,还必须配合多种外部工作,如提高对高风险群体(特别是养殖户)对疾病的认知、加强预防措施和监测水平、建立完善疫情通报及处理系统等。目前布病疫情广泛且复杂,但随着社会的重视、研究的深入,相信不久的将来,以疫苗为基础的综合防治措施能从根本上降低布病的发生和传播,最终达到布病净化的目标。

参考文献:

- [1] Ahmed W, Zheng K, Liu Z F. Establishment of chronic infection: *Brucella's* stealth strategy[J]. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 2016, 6(83):1-12.
- [2] Gul S T, Khan A. Epidemiology and epizootology of brucellosis: a review[J]. *Pakistan Veterinary Journal*, 2007, 27(3):145-151.
- [3] Atluri V L, Xavier M N, Jong M F D, et al. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts [J]. *Microbiology*, 2011, 65(65):523-41.
- [4] 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.
Man T F, Wang D L, Cui B Y, et al. Analysis on surveillance data of brucellosis in China, 2009 [J]. *Disease Surveillance*,

- 2010, 25(12):944-946.
- [5] 崔步云. 关注中国布鲁杆菌疫情发展和疫苗研究[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(4):105-106.
- Cui B Y. Development of brucellosis in China and vaccine research[J]. Chinese Journal of Endemiology, 2012, 31(4): 105-106.
- [6] Ficht T A, Kahl-Mcdonagh M M, Arenas-Gamboa A M, et al. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines[J]. Vaccine, 2009, 27(4): 40-43.
- [7] 景志刚, 严家瑞, 范伟兴. 布鲁氏菌病疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 02:188-199.
- Jing Z G, Yan J R, Fan W X. Research progress of brucellosis vaccines[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 02:188-199.
- [8] Nan W, Zhang Y, Tan P, et al. A rapid cycleleave PCR method for distinguishing the vaccine strain *Brucella abortus* A19 in China [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016(3): 1-5.
- [9] Wallach J C, Ferrero M C, Delpino M V, et al. Occupational infection due to *Brucella abortus*, S19 among workers involved in vaccine production in Argentina[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2008, 14(8):805-807.
- [10] Miranda K L, Poester F P, Minharró S, et al. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping [J]. Vaccine, 2013, 31(29):3014-3018.
- [11] Osman A E F, Hassan A N, Ali A E, et al. *Brucella melitensis* biovar 1 and *Brucella abortus* S19 vaccine strain infections in milkers working at cattle farms in the Khartoum Area, Sudan[J]. Plos One, 2015, 10(5): e0123374.
- [12] 丁家波, 冯忠武. 动物布鲁氏菌病疫苗应用现状及研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25(1):91-99.
- Ding J B, Feng Z W. Current application of brucellosis vaccines and its research advances[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013, 25(1):91-99.
- [13] Olsen S, Tatum F. Bovine brucellosis[J]. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 2010, 26(1):1-5.
- [14] 蒲敬伟, 袁立岗, 冉多良, 等. 奶牛及犊牛接种布氏杆菌 S2 和 A19 株活疫苗的效果初探[J]. 畜牧与兽医, 2013, 12: 91-93.
- Pu J W, Yuan L G, Ran D L, et al. Effects of live vaccine *Brucella suis* strain 2 and *Brucella abortus* strain 19 on cows and calves[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 12:91-93.
- [15] Confer A W, Hall S M, Faulkner C B, et al. Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus*, strain 19[J]. Veterinary Microbiology, 1985, 10(6):561-575.
- [16] Rhyan J C, Gidlewski T, Ewalt D R, et al. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2001, 13(5):379-382.
- [17] 程君生, 吴梅花, 赵丽霞, 等. 三种布鲁氏菌病疫苗株的毒力比较[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(9):1-3.
- Cheng J S, Wu M H, Zhao L X, et al. Virulence comparison between three different vaccine strains of brucellosis in mice and Guinea pigs[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(9):1-3.
- [18] Sangari F J, Grilló M J, Bagúés M J D, et al. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus*, B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice [J]. Vaccine, 1998, 16(17):1640-1645.
- [19] Hall S M, Confer A W, Patterson J M. *Brucella abortus*-specific immunoglobulin in isotypes in serum and vaginal mucus from cattle vaccinated with strain 19 and challenge exposed with virulent strain 2308 [J]. American Journal of Veterinary Research, 1988, 49(6):840-846.
- [20] Vemulapalli R, He Y, Buccolo L S, et al. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation [J]. Infection & Immunity, 2000, 68(7):3927-3932.
- [21] Baldwin C L, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? [J]. Critical Reviews in Immunology, 2006, 26(5):407-442.
- [22] Dorneles E M S, Teixeira-Carvalho A, Araújo M S S, et al. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination [J]. Vaccine, 2015, 33(31):3659-66.
- [23] Dorneles E M S, Teixeira-Carvalho A, Araújo M S S, et al. T lymphocytes subsets and cytokine pattern induced by vaccination against bovine brucellosis employing S19 calfood vaccination and adult RB51 revaccination [J]. Vaccine, 2014, 32(46): 6034-6038.
- [24] Dorneles E M S, Lima G K, Teixeira-Carvalho A, et al. Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51

- and revaccinated with RB51 [J]. *Plos One*, 2015, 10(9): e0136696.
- [25] Garofolo G. Multiple - locus variable - number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis; application to the genotyping of *Brucella*, species [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1247:335-347.
- [26] 谷文喜, 吴冬玲, 范伟兴, 等. 布鲁氏菌病 VirB8-PCR 诊断试剂盒的特异性评价 [J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(7): 48-49.
- Gu W X, Wu D L, Fan W X, *et al.* Sequence analysis on VirB8 genes of 7 different *Brucella* [J]. *Chinese Animal Health Inspection*, 2009, 26(7):48-49.
- [27] 吴冬玲, 钟 旗, 谷文喜, 等. 3 株牛布鲁氏菌 19 疫苗株赤藓醇代谢基因的克隆与序列分析 [J]. *新疆农业大学学报*, 2008, 31(2):59-62.
- Wu D L, Zhong Q, Gu W X, *et al.* Sequence analysis on erythritol catabolic genes of 3 different *B.abortus* strain 19 [J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2008, 31(2):59-62.
- [28] 钟 旗, 易新萍, 李 博, 等. 布鲁氏菌 PCR 鉴定方法的研究与应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(3):241-245.
- Zhong Q, Yi X P, Li B, *et al.* Study and application of polymerase chain reaction assay on *Brucella* identification [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(3):241-245.
- [29] 谭鹏飞, 南文龙, 彭大新, 等. 中国牛种布鲁氏菌疫苗株 A19 位点的研究 [J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48(7):1-5.
- Tan P F, Nan W L, Peng D X, *et al.* SNP Research on *Brucella abortus* vaccine strain A19 [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2014, 48(7):1-5.
- [30] Gopaul K K, Sells J, Bricker B J, *et al.* Rapid and reliable single nucleotide polymorphism - based differentiation of *Brucella* live vaccine strains from field strains [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(4):1461-1464.
- [31] Fiorentino M A, Campos E, Cravero S, *et al.* Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus*, M1- luc, and INTA 2 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 132(3/4):302-311.
- [32] Tibor A, Jacques I, Guilloteau L, *et al.* Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and protective activity in mice [J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(11):5561-5564.
- [33] 易新萍, 谷文喜, 吴冬玲, 等. 流产布鲁氏菌疫苗 A19- Δ VirB12 突变株生物学特性研究 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(9):836-840.
- YI X P, Gu W X, Wu D L, *et al.* Biological characteristics of vaccine candidate A19- Δ virb12 mutant strain of *Brucella abortus* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2013, 29(9):836-840.
- [34] 王 真, 吕艳丽, 吴清民. 流产布鲁氏菌疫苗候选株 RB6 生物学特性研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(4):174-177.
- Wang Z, Lv Y L, Wu Q M. Biological Characteristics of vaccine candidate RB6 of *Brucella abortus* [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 39(4):174-177.

(编辑:李文平)