

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.09.002

流产布鲁氏菌疫苗 A19- Δ VirB12 突变株生物学特性研究

易新萍¹, 谷文喜¹, 吴冬玲², 李延涛², 马晓菁¹, 叶 锋¹, 刘丽娅¹, 薛 晶¹, 钟 旗¹

摘要:目的 为了开发布鲁氏菌病新型标记疫苗,对流产布鲁氏菌 A19- Δ VirB12 突变株生物学特性研究。**方法** 以亲本 A19 菌株为参照,对 A19- Δ VirB12 突变株的菌落形态、生物学特性、毒力、遗传稳定性、免疫原性进行实验比较。**结果** A19- Δ VirB12 突变株形态及生化特性同亲本株 A19 基本一致,其毒力弱于 A19。A19- Δ VirB12 突变株遗传稳定性良好且与 A19 具有相似的免疫原性。**结论** 流产布鲁氏菌 A19- Δ VirB12 株毒力较低、遗传性状稳定、并具有良好的免疫保护效力,可作为新型动物布鲁氏菌病标记疫苗研制的候选株。

关键词:流产布鲁氏菌; A19- Δ VirB12 突变株; 稳定性; 毒力; 免疫原性**中图分类号:**S855.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2694(2013)09-0836-05

Biological characteristics of vaccine candidate A19- Δ VirB12 mutant strain of *Brucella abortus*

YI Xin-ping¹, GU Wen-xi¹, WU Dong-ling², LI Yan-tao², MA Xiao-jing¹,
YE Feng¹, LIU Li-ya¹, XUE Jing¹, ZHONG Qi¹

(1. Institute of Veterinary Research, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China;
2. Xinjiang Tiankang Animal Biotechnology Co., Ltd., Urumqi 830032, China)

ABSTRACT: The aim of this study is to determine the biological characteristics and immunogenicity of the candidate vaccine of A19- Δ VirB12 mutant strain for development of a novel marker brucellosis vaccine. Growth characteristics, staining properties, generation stability, virulence, and immunological protection between A19- Δ VirB12 and its parent strain A19 were compared. The results showed that the growth and biochemistry characteristics of A19- Δ VirB12 were similar to the parent strain. In the mice model, A19- Δ VirB12 strain was attenuated and induced the similar immunological protection levels as A19 vaccine strain. Also, it had good heredity stability. The results suggest that A19- Δ VirB12 mutant strain has low virulence, high genetic stability, and good immunogenicity, and could be a new marker vaccines using for the prevention and control of animal brucellosis.

KEY WORDS: *Brucella abortus*; A19- Δ VirB12 mutant strain; stability; virulence; immunogenicity

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201103008), the National Science & Technology Pillar Program (No. 2012BAD13B03), and the High-Tech Development Project of Xinjiang (No. 200911109)

Corresponding author: Zhong Qi, Email: yyyzqok@yahoo.com.cn

布鲁氏菌病(Brucellosis,简称布病)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的以感染家畜为主的人兽共患

传染病。布鲁氏菌具有宿主广泛、传染性强以及感染后根治困难等特点,对畜牧业和人类健康均构成严重威胁。迄今该病已波及到世界各地,许多国家和地区都有人畜布鲁氏菌病的存在和流行^[1-3]。近几年,我国布鲁氏菌病的发病率呈明显上升趋势,而带菌的动物是其他动物和人类布病的主要传染源。因此,加强动物布鲁氏菌病的防控势在必行,这对防控人间布病具有重要的意义^[4]。在正确诊断和捕杀

农业部公益性行业专项(201103008);国家科技支撑项目(2012BAD13B03);新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划(200911109)联合资助

通讯作者:钟旗,Email:yyyzqok@yahoo.com.cn

作者单位:1.新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所,乌鲁木齐 830000;

2.新疆天康畜牧生物技术股份有限公司,乌鲁木齐 830032

患病动物切断传染源的基础上,接种疫苗是公认能够降低动物布病发生和传播的最实际、最有效的方法之一^[5]。用于预防牛布鲁氏菌病的 A19 疫苗在我国使用至今已有 60 余年,为有效地控制牛布病提供了重要保障,但同时也存在一定的缺陷。即 A19 疫苗缺乏鉴别诊断标记,疫苗接种动物与自然患病动物无法甄别,造成布鲁氏菌无法在畜群中根除,严重地影响了布鲁氏菌病的诊断、检疫。因此,研制具有诊断标记的 A19 疫苗是布病疫苗研究的热点之一^[6-9]。

以我国 A19 疫苗为亲本株,应用同源重组技术敲除布鲁氏菌 IV 型分泌系统中 VirB12 基因而成功构建了 A19-ΔVirB12 突变株。本研究对 A19-ΔVirB12 突变株菌落形态、毒力、遗传稳定性、免疫原性等生物学特性进行测定,评价了 A19-ΔVirB12 突变株的免疫效果,为动物布鲁氏菌分子标记疫苗株的研制提供数据参考,以期布鲁氏菌病综合防治技术提供支持。

1 材料和方法

1.1 菌株 流产布鲁氏菌标准菌株 2308、流产布鲁氏菌疫苗株 A19(*B. abortus* vaccine A19)和流产布鲁氏菌标记疫苗候选株 A19-ΔVirB12,均由新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所细菌室构建或保存。

1.2 试剂 Brucella Broth 培养基(TSB)和 Brucella Agar(TSA)培养基购自美国 BD 公司。布鲁氏菌抗原及血清购自中国疾病预防控制中心传染病研究所。PCR mix 购自北京庄盟生物技术有限公司。

1.3 实验动物 BALB/c 雌鼠购自新疆实验动物研究中心,许可证号:SCXK(新)2003-0002。BALB/c 雌鼠饲养于新疆天康畜牧生物技术股份有限公司三级生物安全实验室的负压隔离笼具中。

1.4 A19-ΔVirB12 的培养特性 取布鲁氏菌 A19-ΔVirB12 与 A19 纯培养物在 Brucella Agar 培养基上划线培养,肉眼观察菌落形态。革兰氏染色法和柯兹洛夫斯基染色法染色,显微镜下观察细菌形态及染色情况。

1.5 血清凝集试验 分别将 30 μL A19-ΔVirB12 抗原与布鲁氏菌光滑型或粗糙型血清等量混合,反应 1~2 min 观察抗原悬液与光滑型或粗糙型血清因子的凝集反应情况。

1.6 变异检查 对 A19-ΔVirB12 继代菌株做结晶紫染色,同时将制备的 A19-ΔVirB12 抗原与 0.1%

吖啶黄染液各 30 μL 等量混合,37℃ 反应 6 h 后取出置室温,次日观察菌体悬液的凝集情况,鉴定其是否发生变异。

1.7 传代稳定性

1.7.1 体外传代试验 挑取 A19-ΔVirB12 单菌落接种于 5mL TSB 液体培养基中,37℃ 条件下 180 r/min 培养 36 h 后进行变异检查(结晶紫染色和吖啶黄凝集试验)和 PCR 鉴定^[10]。取液体培养菌液按 1:100 比例接种至新的 TSB 液体培养基中振荡培养 36 h,再次对培养菌液进行变异检查及 PCR 鉴定,如此反复在体外传至 25 代,观察菌株 A19-ΔVirB12 的体外传代稳定性。根据 GenBank 序列(AF226278)设计 VirB12 基因鉴别引物,即上游引物(VirB12-F) 5'-CGTCGGAACCG CTCTATA GGTC-3',下游引物(VirB12-R) 5'-GTCAGCT-TCTCGCCAACACAAG-3'。

1.7.2 体内传代试验 选择 6 周龄 BALB/c 鼠 3 只,接种疫苗候选株 A19-ΔVirB12,剂量为 5×10⁴ CFU/只。10 d 剖杀,无菌取其脾脏制备组织匀浆,涂布于 TSA 培养基上,待长出菌落后并制备成菌悬液,将第 2 代接种物以上述方式继代接种第 2 批 BALB/c 鼠。如此反复在 BALB/c 鼠体内进行传代,并对各代次分离菌株与初代接种菌株进行基因型和表型比较。

1.8 毒力测定 取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 20 只,随机分为 2 组,分别以 10 亿 CFU 皮下接种 A19 和 A19-ΔVirB12,15d 剖杀取脾脏匀浆进行细菌分离计数,统计每克脾脏载菌量以评价其毒力。

1.9 免疫保护力测定 取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 30 只,随机分为 3 组,每组 10 只,并分别腹腔接种 A19、A19-ΔVirB12 和 PBS,参照文献^[11],以 5.0×10⁴ CFU/只剂量接种免疫。接种后第 45 d 分别用布鲁氏菌标准菌株 2308 对各组小鼠进行攻毒试验,剂量为 3.0×10⁴ CFU/只。攻毒后 15 d 剖杀各组小鼠,取脾脏匀浆进行细菌分离计数,SPSS 11.5 软件分析比较免疫组及 PBS 对照组中小鼠体内的细菌数量。

2 结 果

2.1 A19-ΔVirB12 的培养特性 在 TSA 培养基平板上划线培养,72 h 则可发现 A19 和 A19-ΔVirB12 菌株均具有淡蓝色、半透明的针尖大小菌落,且二者形态大小基本一致;95%以上的菌落属光滑型,菌落边缘整齐,圆润,露滴状,微带蓝色乳光(图 1)。在 TSB 液体培养基中生长均匀,浑浊,不透明。



图 1 A19-ΔVirB12 菌株的培养

Fig. 1 Culture of A19-ΔVirB12 strain

2.2 菌落染色特性 将 A19-ΔVirB12 菌落涂片, 进行革兰氏和柯兹罗夫斯基染色并镜检鉴定。A19-ΔVirB12 为球杆菌, 单个散在, 无鞭毛, 不形成芽孢和荚膜。A19-ΔVirB12 革兰氏染色呈红色, 柯兹罗夫斯基染色的布鲁氏菌呈红色, 背景为绿色(图 2, 图 3)。

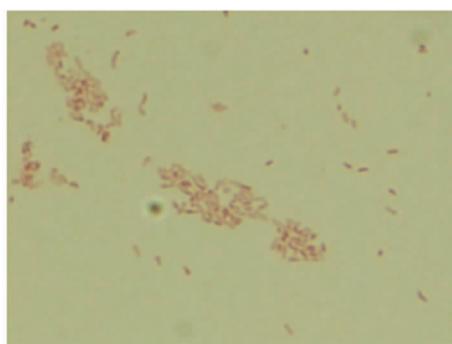


图 2 A19-ΔVirB12 革兰氏染色

Fig. 2 Gram staining of A19-ΔVirB12 strain

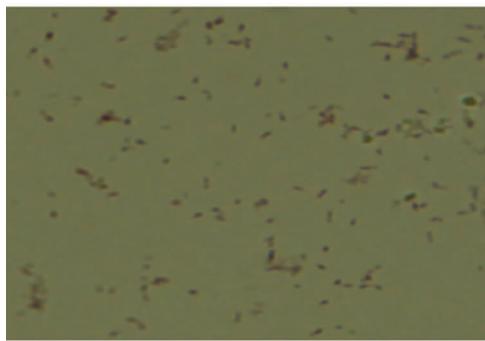


图 3 A19-ΔVirB12 柯兹罗夫斯基染色

Fig. 3 Cozy Roelfs Ki staining of A19-ΔVirB12 strain

2.3 血清凝集实验 疫苗株 A19 与 A19-ΔVirB12 菌与光滑型菌株免疫动物的血清凝集, 与粗糙型菌株免疫血清不凝集反应, 表明 A19 和 A19-ΔVirB12 均具备光滑型布鲁氏菌特性。

2.4 变异检查 A19-ΔVirB12 抗原与 0.1% 吲啶黄染液各 30 μL 等量混合, 37℃ 反应 6 h 后取出置

室温, 次日观察菌体悬液为均匀混浊状态, 表明 A19-ΔVirB12 为光滑型菌液。A19-ΔVirB12 菌落结晶紫染色呈浅黄色, 表明其菌落形态为光滑型。

2.5 传代稳定性

2.5.1 体外传代 将 A19-ΔVirB12 菌株用 TSB 液体培养基体外连续传至 30 代, 取每代菌液及其固体培养基划线接种物, 通过吖啶黄凝集试验和菌落结晶紫染色试验检测, 各代次 A19-ΔVirB12 均不与吖啶黄溶液凝集, 且结晶紫染色的菌落均匀一致, 均呈浅黄色。以布鲁氏菌 VirB12 基因为鉴定引物, 分别每隔 5 代选取部分菌落进行 PCR 鉴定, A19 参考株 PCR 扩增目的片段为 713bp, A19-ΔVirB12 突变株 PCR 扩增目的片段为 236bp。结果表明, A19-ΔVirB12 突变株在体外传代稳定, 缺失的 VirB12 基因没有发生重组而重新恢复获得 VirB12 基因(图 4)。

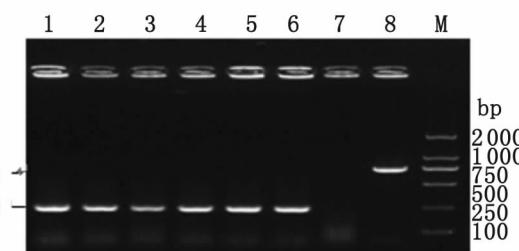


图 4 A19-ΔVirB12 体外传代的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of A19-ΔVirB12 *in vitro* by PCR

- 1: The first generation of A19-ΔVirB12 strain;
- 2: The fifth generation of A19-ΔVirB12 strain;
- 3: The tenth generation of A19-ΔVirB12 strain;
- 4: The fifteen generation of A19-ΔVirB12 strain;
- 5: The twentieth generation of A19-ΔVirB12 strain;
- 6: The twenty-fifth generation of A19-ΔVirB12 strain;
- 7: Negative control; 8: A19; M: DL2000 DNA marker.

2.5.2 体内传代 将剖杀的 BALB/c 鼠脾脏分离布鲁氏菌, 按照 2.5.1 中 PCR 方法对各代次分离的细菌进行 PCR 鉴定, 结果表明从 BALB/c 鼠脾脏分离的每代 A19-ΔVirB12 株扩增目的条带为 236 bp, 均缺失 VirB12 部分基因, 结果见图 5。

2.6 毒力测定 表 1 结果表明 A19-ΔVirB12 突变株每克脾脏含菌量低于 1.0×10^6 CFU, 为弱毒株。相比较于 A19 株, A19-ΔVirB12 在 BALB/c 鼠的克脾菌数低于 A19, 表明 A19-ΔVirB12 标记株毒力稍弱于 A19 株。

2.7 免疫保护力测定 将 A19 和 A19-ΔVirB12 菌株培养增殖计数, 以 5.0×10^4 CFU/只剂量免疫

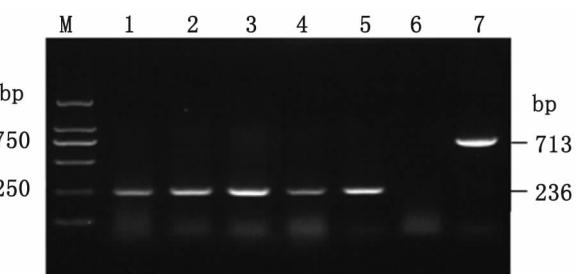


图 5 A19-ΔVirB12BALB/c 鼠体内传代的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of A19-ΔVirB12 *in vivo* with BALB/c mice by PCR

M: DL2000 DNA marker; 1: The first generation of A19-ΔVirB12 strain; 2: The second generation of A19-ΔVirB12 strain; 3: The third generation of A19-ΔVirB12 strain; 4: The fourth generation of A19-ΔVirB12 strain; 5: The fifth generation of A19-ΔVirB12 strain; 6: Negative control; 7: A19

表 1 A19 株和 A19-ΔVirB12 株毒力测定
Tab. 1 Determination on virulence of A19 and A19-ΔVirB12 strains

Strain	CFU of inoculation	Days post-challenge /d	Mean weight of spleen /g	No. bacteria per gram spleen(CFU/g)
A19	1.0×10^9	10	0.27 ± 0.02	$2.37 \pm 0.22 \times 10^5$
A19-ΔVirB12	1.0×10^9	10	0.25 ± 0.01	$2.01 \pm 0.16 \times 10^5$

表 2 A19 和 A19-ΔVirB12 对 BALB/c 鼠免疫保护力

Tab. 2 Protection of immunized mice against 2308 strain challenging

Group	No. BALB/c mice	Brucella of 2308 load (CFU/ spleen)
A19 group	10	3.15 ± 0.18^a
A19-ΔVirB12 group	10	2.99 ± 0.22^a
PBS control group	10	5.77 ± 0.34^b

注:同行数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),肩标相同字母标注表示差异不显著($P > 0.05$)。

Note: The difference between data with the different small letter within a column is significant ($P < 0.05$), and the difference between data with the same small letter within a column is not significant ($P > 0.05$).

与诊断方法不能将其与自然感染相区分,这对我国布鲁氏菌病防治与净化是不利的。解决该难题的方法之一是寻找具有抗原性的蛋白抗原,然后敲除相应的基因,建立相应的检测方法。本研究以牛流产布鲁氏菌 A19 弱毒疫苗株为亲本株,通过同源重组技术将四型分泌系统中 VirB12 基因敲除,PCR 证实了构建的标记疫苗株 VirB12 基因被敲除,获得了具有诊断标记抗原的 A19-ΔVirB12 突变株。

布鲁氏菌的Ⅳ型分泌系统(T4SS)由一个含有

BALB/c 鼠,在第 45 d 分别对每组 BALB/c 鼠攻毒强毒菌株 2308,攻毒后 15 d 剖杀并无菌采集脾脏匀浆进行攻毒菌株分离。通过比较免疫接种组和对照组小鼠每克脾脏中攻毒菌株 2308 的载菌量(克脾指数),评价各菌株的免疫保护效果,结果见表 2。由表 2 可知,与 PBS 对照组相比, A19 和 A19-ΔVirB12 均对 BALB/c 鼠有一定程度的免疫保护,且 A19 和 A19-ΔVirB12 之间差异无统计学意义($P > 0.05$),A19-ΔVirB12 株并没有因为缺失 VirB12 基因而使其免疫保护力下降。

3 讨 论

我国应用牛布鲁氏菌 A19 疫苗株在防治牛布鲁氏菌病方面取得明显的效果,但常规血清学检测

12 个可跨越细菌被膜的多蛋白复合物家族组成,并由同一启动子调控,是继脂多糖之后又一个关键的致病力因子^[12]。VirB1~12 是细菌在细胞内复制和形成持续感染所必须的,与其在宿主细胞内生存、复制有关^[13~16]。其中 VirB12 基因由 519 bp 组成,编码 173 个氨基酸,VirB12 蛋白分子量约 17 kDa。相关研究证实 VirB12 在牛种布鲁氏菌感染中是一种免疫原性蛋白,在小鼠感染布鲁氏菌的过程中均有表达,但在 T4SS 中并不是必需蛋白,它可作为一种布鲁氏菌血清学检测标记抗原^[17]。因此,本研究中将成功构建的缺失 VirB12 基因的 A19-ΔVirB12 突变株为研究对象,对该突变株毒力和免疫保护力进行评价,实验进一步证实 VirB12 基因的缺失对该菌株毒力有所减弱,但对其免疫保护力基本无影响。同时,以 VirB12 蛋白作为标记诊断抗原可建立布鲁氏菌血清学检测方法,这为鉴别区分 A19-ΔVirB12 疫苗免疫与自然感染的血清学方法奠定了基础。

与布鲁氏菌传统实验鉴定方法相对比,PCR 检测方法具有快速、特异,并能降低实验室操作者的感染风险等优点,对鉴别区分布鲁氏菌牛流产野毒株和疫苗株有重要的实际应用价值^[18]。本研究以 VirB12 基因作为鉴别诊断标记,建立了区分鉴定布病 A19-ΔVirB12 疫苗株与野毒流行菌株的 PCR 鉴

定方法,该诊断方法弥补了传统布鲁氏菌鉴定方法的不足,为布病的流行病学调查及防控措施的制定提供科学的技术支撑。

综上所述,对 A19- Δ VirB12 突变株的基本特性、小鼠毒力和免疫保护效力测定,初步确定该菌株遗传背景清晰、遗传性状稳定,具备布鲁氏菌病新型标记疫苗的基本特性。动物实验结果初步显示,布鲁氏菌分子标记 A19- Δ VirB12 疫苗株毒力弱于亲本株 A19,但其免疫保护力在 BALB/c 鼠体内与亲本菌株 A19 无显著差异,有望开发成为布鲁氏菌病标记疫苗。以敲除的 VirB12 基因为诊断标记,可建立区分病 A19- Δ VirB12 疫苗株与流行菌株的病原学 PCR 鉴定方法。以 VirB12 基因编码表达的 VirB12 蛋白作为标记抗原,可建立鉴别区分 A19- Δ VirB12 疫苗免疫与自然感染动物的血清学方法,明显提升了原有 A19 疫苗的功能,但究竟 A19- Δ VirB12 突变株在靶动物体内的免疫效力如何还需进一步评价。

参考文献:

- [1]Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis-new aspects of an old disease[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98: 1270-1281. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02622.x
- [2]Gul ST, Khan A. Epidemiology and epizootiology of brucellosis: a review [J]. Palaeostom Vet J, 2007, 27(3): 145-151.
- [3]Cui BY. Brucellosis epidemic monitoring and control in China [J]. Dis Surveill, 2007, 22(10): 649-651. (in Chinese).
崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制[J]. 疾病监测, 2007, 22(10): 649-651.
- [4]Xu JP, Liu LJ, Li X, et al. Epidemiological survey of brucellosis of cattle and sheep[J]. Chin J Vet Med, 2008, 44(8): 78-79. (in Chinese)
徐建平, 刘丽洁, 李霞, 等. 牛羊布鲁氏菌病流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(8): 78-79.
- [5]Gerhardt G, Schurig NA, Michael J. Brucellosis vaccines: past, present and future[J]. Vet Microbiol, 1990, 20(20): 479-496.
- [6]Eleonora C, Silvio LC, Laura D, et al. *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19- Δ bp26: luc Δ bmp18 double mutant lacking drug resistance markers[J]. Vet Microbiol, 2002, 87: 1-13. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00016-0
- [7]Boschirol M, Cravero S, Arese A, et al. Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant[J]. Infect Immun, 1997, 65(2): 798-800.
- [8]Yan GM, Wang XL, Ren LZ, et al. Construction of molecular marker and virulence deleted vaccine strain Δ S19-2 of *B. abortus* [J]. Chin J Vet Sci, 2007, 27(5): 690-694, 699. (in Chinese)
闫广谋, 王兴龙, 任林柱, 等. 布鲁氏菌分子标记、毒力缺失疫苗株 Δ S19-2 的构建[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(5): 690-694, 699.
- [9]Zheng XH, Hu S, Wang JL, et al. Construction of mutant *S. Brucella Abortus* S19 strain and evaluation of immunization in mice[J]. Chin J Prev Vet Med, 2009, 31(11): 887-891, 913. (in Chinese)
- 郑孝辉, 胡森, 王加兰, 等. 流产布氏杆菌 S19 突变株构建及在小鼠感染模型中的免疫保护评估[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(11): 887-891, 913.
- [10]Zhong Q, Yi XP, Wang LJ, et al. Determination of marker vaccine of *Brucella abortus* A19 strain and virulence and immunity[P]. China, 201210190126.0.
- 钟旗, 易新萍, 王力俭, 等. 布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗株的构建及毒力和免疫原性测定[P]. 中国, 201210190126.0.
- [11]Yi XP, Gu WX, Li JP, et al. Establishment of BALB/c mouse model for evaluation of protective immunity in *Brucella abortus* [C]. Beijing: The Fourth Veterinary Conference, 2012: 221-225. (in Chinese)
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[C]. 北京: 第四届兽药大会论文集, 2012: 221-225.
- [12]David OC, Chantal C, Allardet S, et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*[J]. Mol Microbiol, 1999, 33(6): 1210-1220. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x
- [13]Rouot B, Alvarez-Martinez MT, Marius C, et al. Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5 and VirB8 Specific antisera[J]. Infect Immun, 2003, 71(3): 1075-1082. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1075-1082.2003
- [14]Huppner C, Carle A, Sivanesan D, et al. The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11[J]. Microbiology, 2005, 151: 3469-3482. DOI: 10.1111/j.1467-9396.2009.00845.x
- [15]Patey G, Qi Z, Bourg G, et al. Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and a pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation[J]. Infect Immun, 2006, 74(8): 4945-4949. DOI: 10.1111/1.2172950
- [16]den Hartigh AB, Sun YH, Sonderman D, et al. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection[J]. Infect Immun, 2004, 72(9): 5143-5149. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5143-5149.2004
- [17]Rolan HG, den Hartigh AB, Kahl MM, et al. VirB12 is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(2): 208-214. DOI: 10.1128/CVI.00374-07
- [18]Zhong Q, Yi XP, Li B, et al. Study and application of polymerase chain reaction assay on *Brucella* identification[J]. Chin J Zoonoses, 2011, 27(3): 241-245. (in Chinese)
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.