

粗糙型布鲁氏菌与宿主互作机制的研究进展

李林姣^{1,2}, 王倩^{1,2,3}, 邱东旭^{1,2}, 刘铭赫⁴, 冯宇^{1,2}, 范学政^{1,2}, 丁家波^{1,2},
孙石静⁶, 徐发荣^{1,5}, 蒋卉^{1,2*}

- 1 中国农业科学院, 北京畜牧兽医研究所, 北京
- 2 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方), 北京
- 3 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安
- 4 中国兽医药品监察所, 北京
- 5 北京市动物疫病预防控制中心, 北京
- 6 兆丰华生物科技(南京)有限公司北京生物医药科技中心, 北京

李林姣, 王倩, 邱东旭, 刘铭赫, 冯宇, 范学政, 丁家波, 孙石静, 徐发荣, 蒋卉. 粗糙型布鲁氏菌与宿主互作机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 2830-2840.

LI Linjiao, WANG Qian, QIU Dongxu, LIU Minghe, FENG Yu, FAN Xuezheng, DING Jiabo, SUN Shijing, XU Farong, JIANG Hui. Advances in the interaction mechanisms between rough *Brucella* and host organisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 2830-2840.

摘要: 布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患病。布鲁氏菌能够在多种宿主细胞内复制, 并通过逃避免疫系统的杀伤来实现其致病性。粗糙型布鲁氏菌由于其多糖O链抗原的缺乏或不完整, 导致脂多糖结构不完整, 因此无法诱导针对脂多糖的抗体产生, 这使其具有鉴别诊断的潜力, 因而受到广泛关注。粗糙型布鲁氏菌可通过低内毒素活性、溶酶体逃逸以及抵御补体攻击等多种方式逃避和操纵宿主免疫系统, 但目前关于其免疫应答反应、与宿主的互作机制以及毒力基因功能的深入研究仍较少。本文主要概述了粗糙型布鲁氏菌的胞内寄生过程及其与宿主互作的分子机制, 为粗糙型布鲁氏菌疫苗的进一步开发提供了线索。

关键词: 粗糙型布鲁氏菌; 胞内寄生; 先天性免疫; 适应性免疫

资助项目: 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ZDRW202410); 宁夏回族自治区重点研发计划(2024BBF02014); 北京市乡村振兴农业科技课题(NY2502170200)

This work was supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ZDRW202410), the Key Research and Development Plan of Ningxia Hui Autonomous Region (2024BBF02014), and Beijing Rural Revitalization Agricultural Science and Technology Project (NY2502170200).

*Corresponding author. E-mail: 15011216921@163.com

Received: 2024-12-28; Accepted: 2025-02-24; Published online: 2025-05-18

Advances in the interaction mechanisms between rough *Brucella* and host organisms

LI Linjiao^{1,2}, WANG Qian^{1,2,3}, QIU Dongxu^{1,2}, LIU Minghe⁴, FENG Yu^{1,2}, FAN Xuezheng^{1,2}, DING Jiabo^{1,2}, SUN Shijing⁶, XU Farong^{1,5}, JIANG Hui^{1,2*}

1 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

2 Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Prevention and Control (North), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing, China

3 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, China

4 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing, China

5 Beijing Center for Animal Disease Prevention and Control, Beijing, China

6 Beijing Biopharmaceutical Technology Center, Zhaofenghua Biotech (Nanjing) Co., Ltd., Beijing, China

Abstract: Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella*. *Brucella* can replicate within various host cells and evade the host immune system, which underpins its pathogenicity. Rough *Brucella* strains, characterized by the absence or inadequacy of the O-antigen chain, exhibit incomplete lipopolysaccharide structures, precluding the production of anti-lipopolysaccharide antibodies. This distinguishing feature facilitates differential diagnosis and has attracted considerable attention. Rough *Brucella* can invade and manipulate the host immune system *via* low endotoxin activity, lysosomal escape, and resistance to complement attacks. Nevertheless, comprehensive investigations into the host immune responses, rough *Brucella*-host interaction mechanisms, and virulence gene functions of rough *Brucella* remain scarce. This article elucidates the intracellular parasitism process of rough *Brucella* and the molecular mechanisms underlying their interactions with hosts, with the aim of offering insights for the development of effective vaccines against rough *Brucella*.

Keywords: rough *Brucella*; intracellular parasitism; innate immunity; adaptive immunity

自 1896 年布鲁氏菌被发现以来, 布鲁氏菌病(简称布病)仍是世界范围内流行最为广泛的人畜共患病之一。依据致病性和宿主的差异, 布鲁氏菌属(*Brucella*) 被分为 12 个种 24 个生物型; 其中, 马耳他布鲁氏菌(*B. melitensis*)、牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)和猪种布鲁氏菌(*B. suis*)的致病力较强, 均为光滑型菌株, 其光滑型脂多糖(smooth lipopolysaccharide, S-LPS)是主要抗原; 相比之下, 犬种布鲁氏菌(*B. canis*)和绵羊附睾种布鲁氏菌(*B. ovis*)因脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)缺乏 O 抗原, 表现为粗糙型脂多糖(rough

lipopolysaccharide, R-LPS), 其菌株表型为粗糙型^[1]。尽管布鲁氏菌不同种菌株的 LPS 结构存在差异, 但它们在天然宿主中均具有感染性, 并在临床上引起生殖系统病症^[2]。

布鲁氏菌感染动物机体后, 可引发固有免疫应答和适应性免疫应答。固有免疫系统是机体防止病原入侵的关键防御机制, 发挥着重要作用, 细胞的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)能够识别病原体表面的相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 激活胞内信号传导, 诱导炎症因子上

调表达,从而发挥清除体内病原微生物的功能;适应性免疫作为先天性免疫的后援,通过活化树突状细胞和吞噬细胞的抗原递呈能力,进一步产生抗体和细胞毒性淋巴细胞清除入侵的病原微生物^[3]。布鲁氏菌作为一种胞内寄生菌,通过不断适应宿主细胞内环境的变化改变自身PAMPs,从而逃避机体免疫系统的识别和清除^[4]。其中,粗糙型布鲁氏菌还可通过影响细胞炎症反应^[5]、凋亡^[6]和焦亡^[7]等方式实现胞内复制和存活。

近年来,关于光滑型布鲁氏菌与宿主相互作用的研究明显增加,但针对粗糙型菌株的研究和综述仍较少。本文系统综述了粗糙型布鲁氏菌的致病机制,以及其如何拮抗宿主免疫应答以实现自身复制的策略,旨在为研究粗糙型布鲁氏菌的致病机制和开发粗糙型布鲁氏菌疫苗提供理论支持。

1 布鲁氏菌 LPS 的结构和相关基因

布鲁氏菌的细胞膜为3层结构,分别为细胞质膜、外周胞质膜和外膜;其中外膜含有LPS、蛋白质和磷脂层^[8]。布鲁氏菌的LPS可根据其分子结构中是否含有O-多糖(O-polysaccharide, OPS)划分为S-LPS和R-LPS(图1)。光滑型LPS含有O-多糖,是光滑型布鲁氏菌的主要表面抗原;而粗糙型LPS缺少O-多糖^[9]。针对光滑型布鲁氏菌LPS的抗体是血清中的主要抗体成分,因此LPS被认为是布鲁氏菌的主要毒力因子;然而,与肠杆菌属(*Enterobacter*)LPS表现出的强内毒素性不同,布鲁氏菌LPS的内毒素性较弱,无法激活较强的先天免疫反应^[10]。

布鲁氏菌中LPS合成相关基因主要包括以下3类。(1)O-多糖,主要由 *wbo* 和 *wbk* 2个基

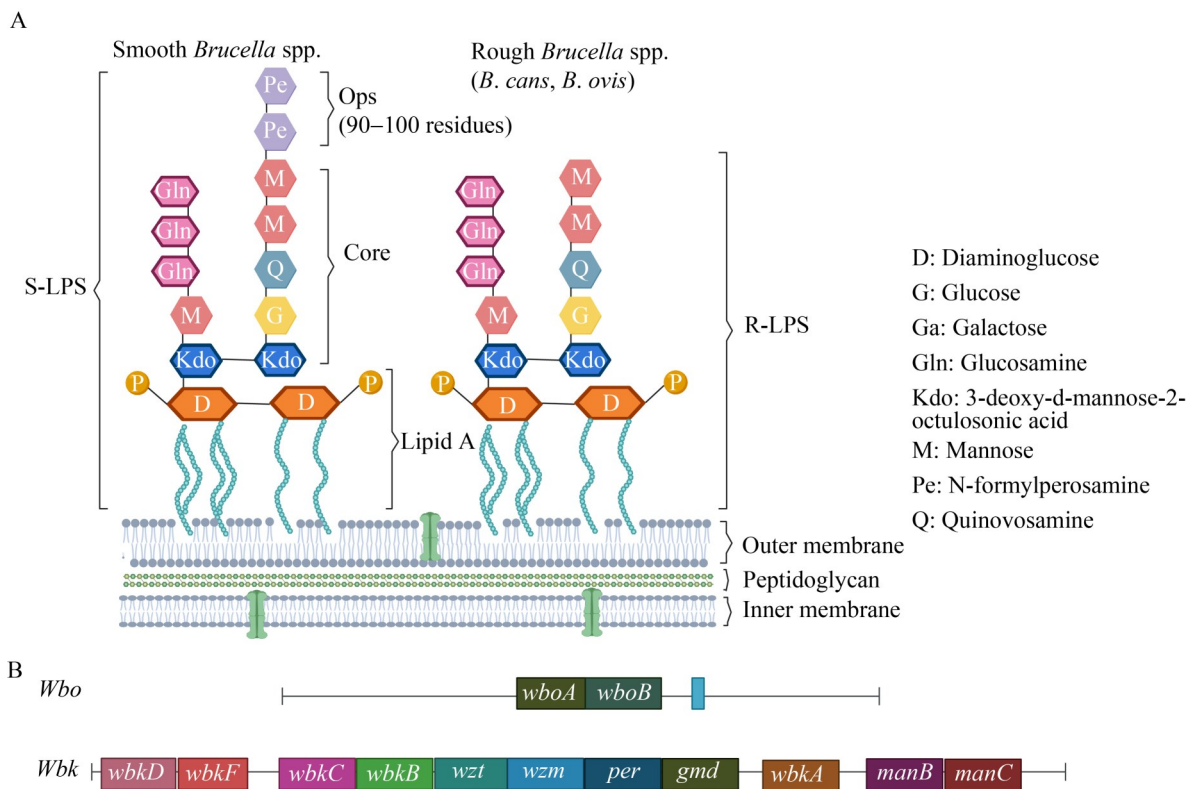


图1 布鲁氏菌LPS结构(A)及OPS合成相关基因(B)

Figure 1 Schematic structure of LPS from *Brucella* spp. (A) and OPS synthesis-related genes (B).

因座编码, 其中 *wbo* 基因座主要包含 *wboA* 和 *wboB* 2 个基因, *wbk* 基因座区域编码过氧化脂合成酶基因(*gmd* 和 *per*)、甲酰转移酶基因(*wbkC*)、糖基转移酶基因(*wbkE* 和 *wbkA*)、细菌烯醇化酶基因(*wbkD* 和 *wbkF*)、ABC 转运蛋白基因(*wzm* 和 *wzt*)、甘露糖合成基因(*manA_{OAg}*、*manB_{OAg}* 和 *manC_{OAg}*)、甘露糖基转移酶基因(*wbdA*、*wbdB* 和 *wbdC*)以及 O 抗原连接酶基因(*wadA* 和 *MsbA*)^[9,11]。(2) 脂质 A 合成相关基因, 包括 3-脱氧-D-甘露糖辛柄糖酸转移酶基因(*kdtA*)、甲酰基转移蛋白-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶基因(*LpxB*)和脂质 A-4-激酶基因(*LpxK*)^[12]。(3) 核心多糖合成基因, 主要为甘露糖基转移酶(*LpsB*)基因^[12]。

由于 LPS 合成相关基因与布鲁氏菌的毒力密切相关, 因此缺失相关基因成为构建新型粗糙型布鲁氏菌疫苗株的主要途径之一。*wboA* 基因缺失株在不同种布鲁氏菌中的毒力表现出一定的差异性。Wang 等^[13]分别在 *B. melitensis* 16M、*B. abortus* 2308、*B. melitensis* NI 和 *B. abortus* S19 中敲除 *wboA* 基因, 结果表明 4 株缺失株的毒力均有所减弱, 其中 *B. abortus* S19- $\Delta wboA$ 不会引起妊娠绵羊流产。*wbk* 基因座区域编码的相关基因缺失也会导致布鲁氏菌毒力不同程度的降低。例如, *B. melitensis* Rev.1 缺失 *wzm* 基因后, 在 BeWo 细胞中的毒力降低, 且接种小鼠和母羊后均可正常妊娠^[14]; *B. abortus* 2308 缺失 *wbkC* 基因以及 *B. abortus* S19 缺失 *wbkC* 基因后, 在 小鼠体内的毒力均显著降低^[15]。

2 粗糙型布鲁氏菌胞内存活机制

布鲁氏菌作为一种兼性胞内菌, 能够在多种细胞中侵袭、存活和复制。它不仅可引发慢性感染, 还会导致慢性炎症的发生, 与布鲁氏菌病的不同临床表现密切相关; 布鲁氏菌入侵

宿主后主要定殖于巨噬细胞、树突状细胞以及胎盘滋养层细胞, 从而实现持续性存活与增殖^[4]。

布鲁氏菌入侵宿主是一个复杂的多阶段过程。首先, 细菌与宿主细胞表面分子相互作用, 黏附于细胞表面, 并随着感染时间的延长逐渐形成细菌聚集体^[16]。光滑型布鲁氏菌主要通过其 LPS 的多糖 O 链与细胞膜上的脂筏相互作用后进入细胞, 同时依赖于磷酸肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的活性^[17]。天然粗糙型布鲁氏菌(如 *B. canis* 和 *B. ovis*)则通过外膜蛋白 Omp22 和 Omp25d 与脂筏相互作用进入细胞, 这一过程与 PI3K 无关^[18]。这表明脂筏介导的布鲁氏菌内化过程并不依赖于 OPS 的表达^[19]。布鲁氏菌在细胞内形成布氏小体(*Brucella*-containing vacuole, BCV)后, BCV 迅速进入经典的内体途径, 并与溶酶体融合形成液泡吞噬体-溶酶体复合物, 随后被清除^[20]。在人单核细胞中, 含有粗糙型布鲁氏菌的吞噬体相互融合, 最初形成多个含有少量细菌的布氏小体, 随后合并为一个或几个含有大量细菌的 BCV^[21]。然而, 仅有少量布鲁氏菌能够通过大量激活四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS), 在与溶酶体接触前成功逃逸到安全的复制生态位^[22]。与光滑型布鲁氏菌相比, 粗糙型布鲁氏菌的溶酶体逃逸过程出现得更晚^[23]。成功逃逸的布鲁氏菌与溶酶体融合, 获得宿主标记分子(如 Rab7 和 LAMP-1), 并通过 T4SS 介导的效应蛋白与内质网(endoplasmic reticulum, ER)出口位点相互作用。当布鲁氏菌到达内质网并获得内质网标记分子(如 Rab2 和 Sar1)后, 内体 BCV (endosomal BCV, eBCV)转化为复制型布氏小体(replicative *Brucella*-containing vacuole, rBCV)^[24]。内质网作为布鲁氏菌复制增殖的理想场所, 为其提供了必要的物质基础。在感染后期, rBCV 转化为自噬型布氏小体(autophagic BCV, aBCV), 此时不再对宿主细胞造成杀伤^[4]。最终, 布鲁氏菌在内质网内定殖、增殖并释放, 从而启动新一轮的病原感染(图 2)。

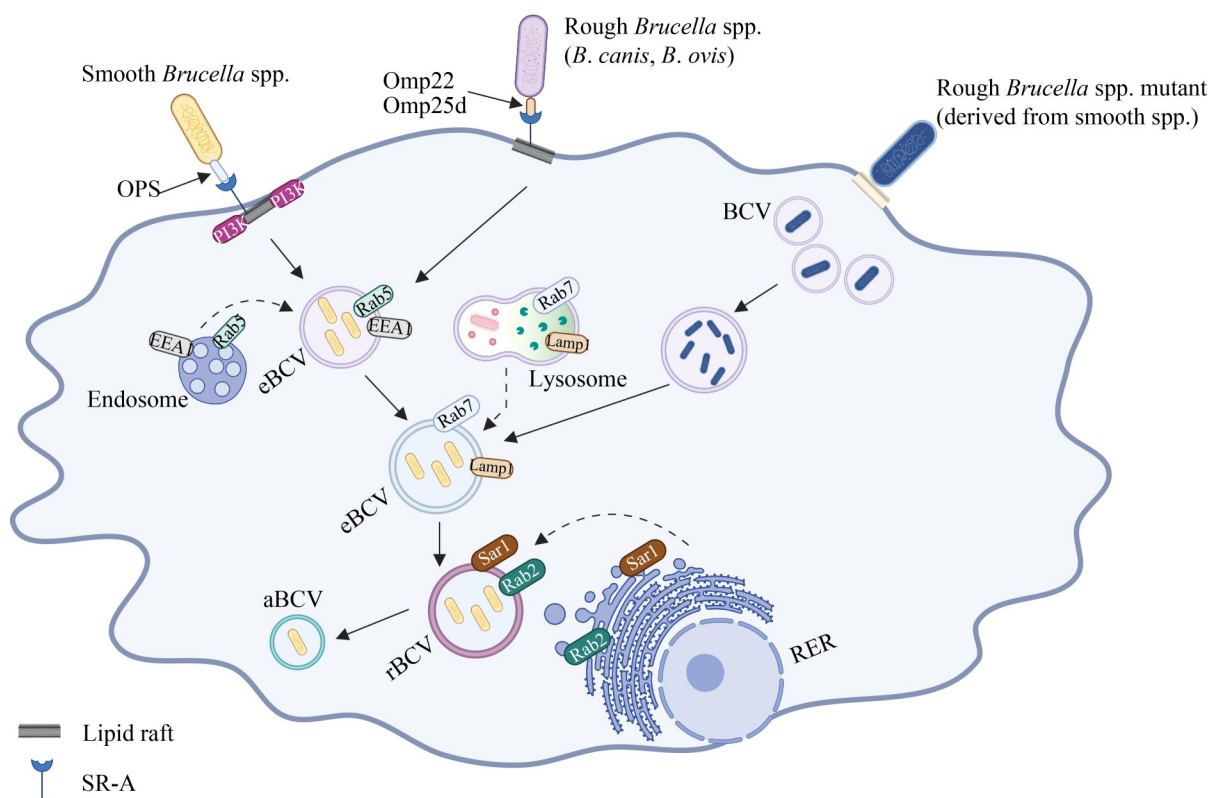


图2 光滑型、天然粗糙型和粗糙突变型布鲁氏菌进入宿主细胞及胞内运输的过程

Figure 2 The processes of smooth, wild-type, and rough mutant *Brucella* entering host cells and intracellular transport.

3 粗糙型布鲁氏菌调控宿主先天性免疫应答机制

布鲁氏菌入侵时, 先天性免疫系统是宿主的第一道防线, 其功能是减少入侵、抑制细菌复制以及杀灭细菌, 同时为适应性免疫应答创造条件; 宿主机体主要通过巨噬细胞和树突状细胞吞噬细菌、自然杀伤细胞的杀伤作用、细胞因子和趋化因子的分泌, 以及模式识别受体 (PRRs) 对病原体相关分子模式 (PAMPs) 的识别来参与先天性免疫应答, 此外还通过激活补体系统发挥作用^[3]。

树突状细胞作为抗原递呈细胞, 在先天免疫反应中起着关键作用。光滑型菌株感染后, 树突状细胞的共刺激标志物 (CD80 和 CD86) 表达下调, 并减少促炎细胞因子的产生; 相比之下,

粗糙型菌株 *B. abortus* 45/20 和 *B. suis*- Δ manB 感染后能够增强先天性免疫应答, 诱导树突状细胞表面成熟标志物、抗原递呈分子 CD1b 和共刺激标志物 (CCR7、CD83、CD40 和 CD86) 的上调, 同时诱导肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 的表达^[25]。Jain-Gupta 等研究表明, 粗糙型突变菌株 BNW 在体外可刺激更高水平的树突状细胞活化^[26]。

巨噬细胞是防御布鲁氏菌的前线细胞, 通过吞噬作用和降解入侵微生物在先天免疫中发挥关键作用^[27]。巨噬细胞不仅能杀死病原体并执行非特异性免疫功能, 还参与抗原的摄取和加工, 以启动特异性免疫反应; 巨噬细胞分泌的细胞因子, 如白细胞介素 (interleukin, IL)-6、TNF- α 和干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ), 可调节免疫反应并激活更多的淋巴细胞和巨噬细胞,

在免疫调节和炎症反应中发挥重要作用^[18]。在感染早期光滑型菌株几乎不诱导促炎细胞因子的产生,而粗糙型疫苗株 RB51 可在小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 中诱导高水平的 TNF- α 和 IL-12^[19]。此外,粗糙型猪种突变株 VTRS1 感染 J774A.1 巨噬细胞后,与促炎相关的 40 个基因表达量显著高于光滑型亲本株^[28]。

与其他革兰氏阴性菌相比,布鲁氏菌的 LPS 具有非经典结构,可减少和延迟炎症反应,并且对 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 的刺激活性较低,因此不能引发强烈的先天性免疫反应^[21]。布鲁氏菌的 LPS、脂蛋白、鞭毛等成分缺乏有效的 PAMPs 活性,从而在一定程度上能够逃避 PRRs 的识别;在众多功能独特的 PRRs 中,TLRs 能够特异性识别来自不同病原体的多种 PAMPs^[29]。TLR2 和 TLR4 参与粗糙型菌株 RB51 诱导肥大细胞活化,促进炎症细胞因子和趋化因子的产生^[30]。粗糙型布鲁氏菌因缺乏多糖 O 链,其表面更容易被 TLR4 或甘露糖受体识别,从而表现出更高的侵袭性^[31]。

补体系统由多种可溶性和膜表面结合蛋白组成,共同桥接固有免疫和适应性免疫应答的协同调控^[4]。多糖 O 链已被证明可以阻断补体第 1 成分 q 亚单位 (complement 1q, C1q) 的球状结构域进入外膜靶标,这导致粗糙型缺失株对补体的敏感性增加^[32]。尽管天然粗糙型 *B. canis* 和 *B. ovis* 具有粗糙的表型,但与光滑型相比,它们对补体的杀伤作用表现出较强的抗性^[33]。布鲁氏菌抵御补体杀伤的另一个关键因素是外膜蛋白。在光滑型和粗糙型突变株之间,以及天然粗糙型 *B. canis* 和 *B. ovis* 之间,细菌外膜蛋白的表达水平存在一定的差异^[2]。与许多粗糙型突变菌株相比,尽管缺乏多糖 O 链,但外膜蛋白表达的差异在很大程度上解释了天然粗糙菌株对补体和抗菌肽的抵抗力增强。

4 粗糙型布鲁氏菌调控宿主适应性免疫应答机制

布鲁氏菌感染宿主后,激发的适应性免疫应答主要通过以下机制协同调控:(1) 活化的 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 增强巨噬细胞的杀菌活性,抑制布鲁氏菌在溶酶体内的寄生;(2) CD8⁺ T 细胞通过穿孔素-颗粒酶途径的细胞毒性作用杀伤被感染的巨噬细胞;(3) Th1 型抗体主导的免疫调理,IgG2a 和 IgG3 通过 Fc 受体结合到细胞表面,促进对降解的 BCV 的吞噬作用^[4,34]。

长期以来,CD4⁺ T 淋巴细胞被认为是宿主抵御布鲁氏菌感染中产生 IFN- γ 的最重要来源;然而不同菌株感染机体后,CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞在介导保护方面的作用存在明显差异^[35]。在接种粗糙型牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗后,小鼠上调 CD4⁺ T 淋巴细胞以抵御 *B. melitensis* 的攻击,而在接种光滑型疫苗候选株 *B. abortus* znBAZ 后,则上调 CD8⁺ T 淋巴细胞^[36]。将粗糙型和光滑型布鲁氏菌疫苗株免疫小鼠后发现,粗糙型疫苗株 RA343 在免疫前期诱导的细胞免疫应答强于光滑型疫苗株 A19,且 CD8⁺ T 细胞亚群所占比例的趋势与 CD4⁺ T 细胞亚群基本一致,进一步说明 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞亚群在抗布鲁氏菌活性中起协同作用^[37]。S19 和 RB51 接种犊牛后均可引起 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞增殖,但 S19 免疫后 CD4 记忆细胞持续时间更长,再次免疫后 RB51 免疫组表现出 CD4⁺ 和 CD8⁺ 增殖的显著增加^[38]。

粗糙型突变菌株 *B. abortus* S19- Δ p_{gm} 在小鼠体内可诱导高水平的 IFN- γ ,从而引发强烈的 Th1 免疫反应^[39]。在绵羊感染 *B. ovis* 后,研究发现在感染后 30 d 可检测到生殖器官中多种细胞因子上调,如附睾(IL-6、IL-1 β 和 IL-1 α)、睾丸(IFN- γ 和 IL-12)等;但随着感染时间的延长,细胞因子表达水平降低,出现免疫逃逸,这有利于 *B. ovis* 在生殖系统中建立慢性感染^[40]。

RB51 疫苗株感染后通过诱导 IL-12、IFN- γ 等促炎细胞因子和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达激活髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖性途径, 导致核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)从其抑制蛋白 I κ B 中释放。这反过来又引发促炎反应, 促进 T 细胞向 Th1 型分化。在感染 *B. abortus* 2308 和 RB51 后, 检测小鼠腹腔渗出液细胞(peritoneal exudate cells, PEC)中的细胞因子, 结果显示 RB51 株感染的 PEC 中检测到 IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 和 iNOS 的表达, 而光滑型牛种 2308 株感染后未检测到 TNF- α 、IFN- γ 、iNOS 的激活^[41-42]。与 *B. abortus* 和 *B. melitensis* 相比, 小鼠感染 *B. canis* 后激发的炎症反应较低, 但在其天然宿主犬体内可诱导显著的炎症反应^[5]。

5 粗糙型布鲁氏菌调节细胞死亡机制

布鲁氏菌作为一种胞内寄生菌, 其致病性大多取决于其在宿主细胞中复制和繁殖的能力。细胞死亡是宿主与病原体互作后的一种重要生理状态, 操纵细胞程序性死亡是病原体在宿主体内生存的主要机制之一。布鲁氏菌感染的细胞通过诱导自身死亡(如细胞坏死、凋亡、自噬、焦亡等)来清除感染病原体, 在宿主抵御布鲁氏菌感染中发挥着重要作用^[43-45]。

光滑型布鲁氏菌通过抑制感染细胞死亡实现胞内持续性存活, 而粗糙型菌株感染后细胞的存活率持续降低, 诱导宿主细胞死亡^[46]。光滑型 *B. suis* 1330 株侵入巨噬细胞后可阻碍细胞程序性死亡, 而粗糙型突变株 *B. suis* VTRS1 株则诱导高水平的巨噬细胞死亡^[47]。粗糙型牛种疫苗株 RB51 可诱导 caspase-2 介导的、不依赖 caspase-1 的凋亡和细胞坏死^[6]。粗糙型菌株引起巨噬细胞死亡主要通过激活内质网应激的 IRE1 α 通路, 促进了 T4SS 的分泌活性, 这一过程与

Txnip 和 caspase-2 介导的通路无关^[48-49]。

在布鲁氏菌感染过程中, 细胞焦亡对清除感染及激活宿主天然免疫应答发挥了重要作用。细胞焦亡是一种炎性细胞死亡方式, 通常在 caspase-1 被各种炎性小体激活后由 caspase-1 触发^[50]。粗糙型牛种布鲁氏菌 RB51 感染小鼠原代骨髓巨噬细胞后, 可引起内质网应激, 诱导线粒体产生 ROS, 刺激 NLRP3 炎性小体的激活, 进而介导 caspase-1 通路的细胞焦亡^[7]。

铁死亡是一种因脂质过氧化而引起的铁依赖性、非凋亡性细胞死亡形式, 由氧化和抗氧化系统控制^[51]。在多种细菌感染中也发现了铁死亡现象, 例如结核分枝杆菌通过调节 GPX4 以促进其传播并诱导铁死亡^[52-53]。Hu 等^[54]研究发现, 粗糙型牛种布鲁氏菌 RB14 在感染早期可诱导细胞铁死亡以及更强的氧化应激反应。随后的研究表明, 粗糙型牛种疫苗株 RB51 感染时, 其诱导的巨噬细胞铁死亡受 P53-Slc7a11-Gpx4/GSH 信号通路调节, 并在粗糙型布鲁氏菌胞内存活能力下降机制中发挥作用^[55]。

6 总结与展望

宿主细胞的 PRRs 能够精准识别入侵的病原体, 诱发机体产生有效的先天性免疫应答反应, 从而产生多种细胞因子, 进一步激活适应性免疫应答以抵御病原的感染。目前, 许多病原体已经进化出多种逃避宿主免疫系统的致病机制。布鲁氏菌入侵宿主细胞后, 绝大多数会被宿主识别并消灭, 但少数细菌能够避免被 PRRs 识别, 从而逃避免疫监视。由于粗糙型布鲁氏菌更容易进入宿主细胞内, 但无法激活足量的细胞杀菌活性, 生成的免疫反应无法完全清除布鲁氏菌, 却可以引起较强的炎症反应并促进宿主细胞死亡, 最终导致布鲁氏菌和宿主长期处于平衡状态, 使其在胞内长期存活。

目前, 控制布鲁氏菌病最有效的方式仍是接种疫苗, 常见的布鲁氏菌病疫苗主要是减毒活疫苗, 其中亚单位疫苗、DNA 疫苗、载体疫

苗等仍在进一步研发过程中^[56-57]。理想的布鲁氏菌病疫苗应具备以下优势：(1) 可通过单次免疫预防野毒感染；(2) 不会传播给人类和其他动物(包括不污染肉类、牛奶和奶制品)；(3) 菌株稳定性高，在体内和体外均稳定，可大量培养；(4) 可进行鉴别诊断^[58]。目前，RB51 是使用最广泛的粗糙型疫苗株。该菌株感染巨噬细胞后能够强烈激活 NF- κ B 信号通路^[59]，且在感染早期诱导细胞铁死亡，从而减弱其在巨噬细胞内的存活能力^[55]。然而，在临床应用方面，RB51 疫苗仍存在以下问题：(1) 存在利福平耐药性；(2) 疫苗的接种方案尚不统一；(3) 可能导致生殖系统的感染；(4) 会导致一定比例的孕畜流产、早产等问题^[60]。因此，该菌株在实验室和临床应用中仍需进一步研究和完善。目前，粗糙型疫苗株的开发大多聚焦于基因缺失(诱导)株。直接将天然粗糙型菌株(如 *B. canis* 和 *B. ovis*)开发为疫苗存在以下缺点：(1) 在其天然宿主动物(如

犬、绵羊等)中，这些菌株仍具有较强的毒力^[2]；(2) 犬感染 *B. canis* 后可通过尿液、精液等排菌，从而造成人类感染^[61]。本实验室通过粗糙型血清诱导出一株粗糙型疫苗株 RA343，其毒力较弱，且免疫小鼠和绵羊后可产生良好的免疫效果^[37,62-63]。RA343 株和 A19 株分别感染 RAW264.7 细胞后，通过转录组学分析发现 RA343 株感染后差异表达基因主要与炎症反应、脂多糖、TNF- α 等细胞反应相关。

尽管已对粗糙型布鲁氏菌开展了多项研究(表 1)，包括细菌的毒力因子、细胞内运输、逃避宿主免疫系统以及基因多态性等，但关于粗糙型布鲁氏菌通过何种方式入侵宿主细胞、如何调控编码毒力基因的表达以抵御胞内免疫系统的杀伤，以及如何调整其自身代谢以适应宿主胞内代谢变化等问题仍不清晰。布鲁氏菌在宿主体内诱导的炎症反应较弱，其逃避宿主免疫监视的机制依旧是控制布鲁氏菌病面临的最大挑战。

表1 本文涉及的粗糙型菌株信息

Table 1 The rough *Brucella* strain information presented in this article

Rough <i>Brucella</i>	Parent strain	Missing (mutated) genes	Antibiotic resistance
<i>B. canis</i>	—	—	—
<i>B. ovis</i>	—	—	—
RB51	<i>B. abortus</i> 2308	<i>wboA</i>	Rifampicin
<i>B. abortus</i> 2308-SB6	<i>B. abortus</i> 2308	<i>wboA</i>	—
<i>B. abortus</i> 2308- $\Delta wbkC$	<i>B. abortus</i> 2308	<i>wbkC</i>	—
RB14	<i>B. abortus</i> 2308	<i>ATP</i> (BAB1_0542)	—
<i>B. abortus</i> S19-RB6	<i>B. abortus</i> S19	<i>wboA</i>	—
<i>B. abortus</i> S19- $\Delta wbkC$	<i>B. abortus</i> S19	<i>wbkC</i>	—
<i>B. abortus</i> S19- $\Delta mglA$	<i>B. abortus</i> S19	<i>mglA</i>	—
<i>B. abortus</i> S19- Δpgm	<i>B. abortus</i> S19	<i>pgm</i>	—
<i>B. abortus</i> 45/20	<i>B. abortus</i> 45/0	—	—
RA343	<i>B. abortus</i> 343	—	—
<i>B. melitensis</i> 16M-MB6	<i>B. melitensis</i> 16M	<i>wboA</i>	—
<i>B. melitensis</i> Rev.1- Δwzm	<i>B. melitensis</i> Rev.1	<i>wzm</i>	Streptomycin
<i>B. melitensis</i> NI-NB6	<i>B. melitensis</i> NI	<i>wboA</i>	—
VTRS1	<i>B. suis</i> S1330	<i>wboA</i>	Kanamycin
<i>B. suis</i> - $\Delta manB$	<i>B. suis</i> S1330	<i>manB</i>	Kanamycin
BNW	<i>B. neotomae</i>	<i>wboA</i>	Kanamycin

作者贡献声明

李林姣：论文撰写和设计；王倩、邱东旭、刘铭赫：文献收集；冯宇：论文审阅；范学政、丁家波、徐发荣：文章构思、框架设计；孙石静：论文审阅；蒋卉：论文审阅与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] MORGAN WJ. *Brucella* classification and regional distribution[J]. Developments in Biological Standardization, 1984, 56: 43-53.
- [2] MORENO E, JONES LM, BERMAN DT. Immunochemical characterization of rough *Brucella lipopolysaccharides*[J]. Infection and Immunity, 1984, 43(3): 779-782.
- [3] HU MM, SHU HB. Cytoplasmic mechanisms of recognition and defense of microbial nucleic acids[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2018, 34: 357-379.
- [4] 谢士杰, 彭小微, 冯宇, 许冠龙, 丁家波, 范学政. 布鲁氏菌逃避宿主免疫机制的研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(9): 871-878.
XIE SJ, PENG XW, FENG Y, XU GL, DING JB, FAN XZ. Mechanism of *Brucella* evading from host immune response[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(9): 871-878 (in Chinese).
- [5] STRANAHAN LW, GARCIA-GONZALEZ DG, HENSEL ME, ARENAS-GAMBOA AM. Primary and memory immune responses against rough *Brucella canis* are less robust compared to smooth *B. abortus* and *B. melitensis* following intratracheal infection in mice[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 959328.
- [6] CHEN F, HE YQ. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6830.
- [7] BRONNER DN, ABUAITA BH, CHEN XY, FITZGERALD KA, NUÑEZ G, HE YQ, YIN XM, O'RIORDAN MXD. Endoplasmic reticulum stress activates the inflammasome via NLRP3- and caspase-2-driven mitochondrial damage[J]. Immunity, 2015, 43(3): 451-462.
- [8] SMITH JA. *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: the core of the matter[J]. Virulence, 2018, 9(1): 379-382.
- [9] MANCILLA M. Smooth to rough dissociation in *Brucella*: the missing link to virulence[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 5: 98.
- [10] LAPAQUE N, MORIYON I, MORENO E, GORVEL JP. *Brucella lipopolysaccharide* acts as a virulence factor[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(1): 60-66.
- [11] SERVAIS C, VASSEN V, VERHAEGHE A, KÜSTER N, CARLIER E, PHÉGNON L, MAYARD A, AUBERGER N, VINCENT S, de BOLLE X. Lipopolysaccharide biosynthesis and traffic in the envelope of the pathogen *Brucella abortus*[J]. Nature Communications, 2023, 14: 911.
- [12] 孙天浩, 易德武, 张倩, 李楠, 苗玉和, 王震, 陈创夫. 布鲁氏菌LPS合成相关重要蛋白的生物信息学分析及 *per* 基因的克隆表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(4): 789-800.
SUN TH, YI DW, ZHANG Q, LI N, MIAO YH, WANG Z, CHEN CF. A bioinformatics analysis of important proteins related to *Brucella LPS* synthesis as well as cloning and expression of *per* gene[J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(4): 789-800 (in Chinese).
- [13] WANG Z, NIU JR, WANG SS, LV YL, WU QM. *In vivo* differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of *wboA* mutants from genetically different parent *Brucella spp*[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2013, 20(2): 174-180.
- [14] MENA-BUENO S, POVEDA-URKIXO I, IRAZOKI O, PALACIOS L, CAVA F, ZABALZA-BARANGUÁ A, GRILLÓ MJ. *Brucella melitensis* wzm/wzt system: changes in the bacterial envelope lead to improved Rev1Δ wzm vaccine properties[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 908495.
- [15] SANTOS LACERDA TL, CARDOSO PG, AUGUSTO de ALMEIDA L, da CUNHA CAMARGO ILB, ALMEIDA FREITAS AFONSO D, TRANT CC, MACEDO GC, CAMPOS E, CRAVERO SL, SALCEDO SP, GORVEL JP, OLIVEIRA SC. Inactivation of formyltransferase (*wbkC*) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice[J]. Vaccine, 2010, 28(34): 5627-5634.
- [16] CASTAÑEDA-ROLDÁN EI, AVELINO-FLORES F, Dall'AGNOL M, FREER E, CEDILLO L, DORNAND J, GIRÓN JA. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues[J]. Cellular Microbiology, 2004, 6(5): 435-445.
- [17] STRANAHAN LW, ARENAS-GAMBOA AM. When the going gets rough: the significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host-pathogen interactions[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 713157.
- [18] ND RMR, BARTON IS, HOPERSBERGER D, MARTIN DW. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2021, 85(1): e00021-19.
- [19] MARTÍN-MARTÍN AI, VIZCAÍNO N, FERNÁNDEZ-LAGO L. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages[J]. Microbes and Infection, 2010, 12(3): 246-251.
- [20] GRILLÓ MJ, BLASCO JM, GORVEL JP, MORIYÓN I, MORENO E. What have we learned from brucellosis in the mouse model?[J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 29.
- [21] RITTIG MG, KAUFMANN A, ROBINS A, SHAW B, SPRENGER H, GEMSA D, FOULONGNE V, ROUOT

- B, DORNAND J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 74(6): 1045-1055.
- [22] KÖHLER S, MICHAUX-CHARACHON S, PORTE F, RAMUZ M, LIAUTARD JP. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? [J]. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(5): 215-219.
- [23] CHACÓN-DÍAZ C, ALTAMIRANO-SILVA P, GONZÁLEZ-ESPINOZA G, MEDINA MC, ALFARO-ALARCÓN A, BOUZA-MORA L, JIMÉNEZ-ROJAS C, WONG M, BARQUERO-CALVO E, ROJAS N, GUZMÁN-VERRI C, MORENO E, CHAVES-OLARTE E. *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(12): 4861-4870.
- [24] SILVA TMA, MOL JPS, WINTER MG, ATLURI V, XAVIER MN, PIRES SF, PAIXÃO TA, ANDRADE HM, SANTOS RL, TSOLIS RM. The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114532.
- [25] BILLARD E, DORNAND J, GROSS A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(12): 5916-5923.
- [26] JAIN-GUPTA N, WALDROP SG, TENPENNY NM, WITONSKY SG, BOYLE SM, SRIRANGANATHAN N. Rough *Brucella neotomae* provides protection against *Brucella suis* challenge in mice[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 239: 108447.
- [27] JACOB J, MAKOU P, FINKE A, MIELKE M. Inflammatory response of TLR4 deficient spleen macrophages (CRL 2471) to *Brucella abortus* S19 and an isogenic Δ mgla deletion mutant[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2016, 306(3): 141-151.
- [28] CHEN F, DING XC, DING Y, XIANG ZS, LI XN, GHOSH D, SCHURIG GG, SRIRANGANATHAN N, BOYLE SM, HE YQ. Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(6): 2460-2469.
- [29] YU H, GU XY, WANG DF, WANG ZL. *Brucella* infection and Toll-like receptors[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1342684.
- [30] DOMÍNGUEZ-FLORES A, RODRÍGUEZ LÓPEZ GM, SORIA-CASTRO R, LÓPEZ-SANTIAGO R, RODRÍGUEZ-CORTÉS O, PÉREZ-TAPIA SM, CHÁVEZ-BLANCO AD, ESTRADA-PARRA S, FLORES-MEJÍA R, CHACÓN-SALINAS R. *Brucella abortus* induces mast cell activation through TLR-2 and TLR-4[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 176: 106005.
- [31] OLSEN SC, PALMER MV. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years[J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(6): 1076-1089.
- [32] MORENO E, BERMAN DT, BOETTCHER LA. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides[J]. *Infection and Immunity*, 1981, 31(1): 362-370.
- [33] MARTÍN-MARTÍN AI, SANCHO P, TEJEDOR C, FERNÁNDEZ-LAGO L, VIZCAÍNO N. Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species[J]. *Veterinary Journal*, 2011, 189(1): 103-105.
- [34] MARTIROSYAN A, GORVEL JP. *Brucella* evasion of adaptive immunity[J]. *Future Microbiology*, 2013, 8(2): 147-154.
- [35] MARTIROSYAN A, MORENO E, GORVEL JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen[J]. *Immunological Reviews*, 2011, 240(1): 211-234.
- [36] WANG HB, HOFFMAN C, YANG XH, CLAPP B, PASCUAL DW. Targeting resident memory T cell immunity culminates in pulmonary and systemic protection against *Brucella* infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(1): e1008176.
- [37] 杨晓彤, 张莹辉, 李巧玲, 蒋卉, 丁家波, 沈青春, 范学政, 秦建华. 布鲁氏菌粗糙型 RA343 株与光滑型 A19 株免疫小鼠后特异性 T 细胞和抗体动态变化分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(7): 2700-2714.
- YANG XT, ZHANG YH, LI QL, JIANG H, DING JB, SHEN QC, FAN XZ, QIN JH. Dynamic changes of specific T cells and antibodies in mice immunized with rough-type RA343 and smooth-type A19 of *Brucella*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(7): 2700-2714 (in Chinese).
- [38] DORNELES EMS, LIMA GK, TEIXEIRA-CARVALHO A, ARAÚJO MSS, MARTINS-FILHO OA, SRIRANGANATHAN N, AL QUBLAN H, HEINEMANN MB, LAGE AP. Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136696.
- [39] UGALDE JE, COMERCI DJ, LEGUIZAMÓN MS, UGALDE RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(11): 6264-6269.
- [40] de PAULA ANTUNES JMA, ALLENDORF SD, APPOLINÁRIO CM, CAGNINI DQ, FIGUEIREDO PR, JÚNIOR JB, BAÑOS JV, KOCAN KM, deLa FUENTE J, MEGID J. Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro- and anti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 161(3/4): 339-343.
- [41] 易继海, 张俊波, 李爽, 王熙楚, 张辉, 陈创夫. NF- κ B 信号通路调控布鲁氏菌胞内存活分子机制的初步研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(3): 592-600.
- YI JH, ZHANG JB, LI S, WANG XC, ZHANG H, CHEN CF. Preliminary study on NF- κ B signaling pathway regulating *Brucella intracellular* survival molecular mechanisms[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(3): 592-600 (in Chinese).
- [42] MARIBEL CFAM, GUADALUPE RVE, LETICIA SM, MARTHA ML, RUBÉN LS, IRIS EG, VIRGILIO MM. Regulation of cytokine gene expression during *Brucella abortus* infection[J]. *Scientific Research and Essays*,

- 2013, 8: 983-991.
- [43] GUO F, ZHANG H, CHEN CF, HU SW, WANG YZ, QIAO J, REN Y, ZHANG K, WANG Y, DU GQ. Autophagy favors *Brucella melitensis* survival in infected macrophages[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2012, 17(2): 249-257.
- [44] LI TS, XU YF, LIU LZ, HUANG ML, WANG Z, TONG ZX, ZHANG H, GUO F, CHEN CF. *Brucella melitensis* 16M regulates the effect of AIR domain on inflammatory factors, autophagy, and apoptosis in mouse macrophage through the ROS signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167486.
- [45] CERQUEIRA DM, GOMES MTR, SILVA ALN, RUNGUE M, ASSIS NRG, GUIMARÃES ES, MORAIS SB, BROZ P, ZAMBONI DS, OLIVEIRA SC. Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(12): e1007519.
- [46] PEI JW, FICHT TA. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(1): 440-450.
- [47] HE YQ. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, 2: 2.
- [48] TIAN MX, YIN Y, LIAN ZM, LI ZC, SONG MY, HU H, GUAN X, DING C, WANG SH, LI T, QI JJ, YU SQ. A rough *Brucella* mutant induced macrophage death depends on secretion activity of T4SS, but not on cellular Txnip- and Caspase-2-mediated signaling pathway[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 244: 108648.
- [49] LI P, TIAN MX, BAO YQ, HU H, LIU JM, YIN Y, DING C, WANG SH, YU SQ. *Brucella* rough mutant induce macrophage death via activating IRE1 α pathway of endoplasmic reticulum stress by enhanced T4SS secretion[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 422.
- [50] SHI JJ, GAO WQ, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(4): 245-254.
- [51] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, SKOUTA R, ZAITSEV EM, GLEASON CE, PATEL DN, BAUER AJ, CANTLEY AM, YANG WS, MORRISON B, STOCKWELL BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [52] AMARAL EP, COSTA DL, NAMASIVAYAM S, RITEAU N, KAMENYEVA O, MITTEREDER L, MAYER-BARBER KD, ANDRADE BB, SHER A. A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(3): 556-570.
- [53] MA RN, FANG L, CHEN L, WANG XN, JIANG J, GAO LZ. Ferroptotic stress promotes macrophages against intracellular bacteria[J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2266-2289.
- [54] HU H, ZHANG GD, TIAN MX, GUAN X, YIN Y, DING C, YU SQ. *Brucella abortus* rough-type mutant induces ferroptosis and more oxidative stress in infected macrophages[J]. *Pathogens*, 2023, 12(10): 1189.
- [55] HU H, ZHANG GD, TIAN MX, YIN Y, BAO YQ, GUAN X, DING C, YU SQ. *Brucella* rough RB51 infection activates P53-Slc7a11-Gpx4/GSH pathway to induce ferroptosis to attenuate the intracellular survival on macrophages[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 298: 110224.
- [56] QURESHI KA, PARVEZ A, FAHMY NA, ABDEL HADY BH, KUMAR S, GANGULY A, ATIYA A, ELHASSAN GO, ALFADLY SO, PARKKILA S, ASPATWAR A. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment: a comprehensive review[J]. *Annals of Medicine*, 2023, 55(2): 2295398.
- [57] LI P, JIANG H, FENG Y, ZHANG GZ, BANAI M, DING JB. The advances of the Chinese *Brucella suis* strain 2 vaccine[J]. *Animal Research and One Health*, 2023, 1(1): 115-126.
- [58] AHAMMAD I, LIRA SS. Designing a novel mRNA vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 820-837.
- [59] 王月丽, 易继海, 王震, 陈创夫. NF- κ B 信号通路对布鲁氏菌介导的细胞凋亡的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(19): 180-184, 296.
- [60] BLASCO JM, MORENO E, MUÑOZ PM, CONDE-ÁLVAREZ R, MORIYÓN I. A review of three decades of use of the cattle brucellosis rough vaccine *Brucella abortus* RB51: myths and facts[J]. *BMC Veterinary Research*, 2023, 19(1): 211.
- [61] DJOKIC V, FREDDI L, de MASSIS F, LAHTI E, van den ESKER MH, WHATMORE A, HAUGHEY A, FERREIRA AC, GAROFOLO G, MELZER F, SACCHINI F, KOETS A, WYLLIE S, FONTBONNE A, GIRAULT G, VICENTE AF, McGIVEN J, PONSART C. The emergence of *Brucella canis* as a public health threat in Europe: what we know and what we need to learn[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(2): 2249126.
- [62] 丁家波, 王芳, 杨宏军, 王楠, 朱良全, 顾进华, 张广川, 王海光, 赵鹏, 程君生, 毛开荣, 冯宇. 一株中等毒力牛种布鲁氏菌的鉴定和毒力测定[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2652-2658.
- DING JB, WANG F, YANG HJ, WANG N, ZHU LQ, GU JH, ZHANG GC, WANG HG, ZHAO P, CHENG JS, MAO KR, FENG Y. Identification and virulence assessment for a strain of *Brucella abortus*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(13): 2652-2658 (in Chinese).
- [63] LI LJ, ZHANG GZ, LIU MH, LV L, PENG XW, FENG Y, YANG XT, DING JB, LIU CH, QIN JH, LI P, JIANG H, FAN XZ. The induction and characterization of a potential rough-type *Brucella* vaccine candidate strain RA343, and its safety, protective efficacy in mouse and guinea pig models[J]. *Animal Research and One Health*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/aro2.70001>.