

## 布鲁氏菌病检测技术及检测用靶蛋白抗原筛选的概况

王真<sup>1</sup> 鲁琳<sup>1</sup> 吴清民<sup>2\*</sup>

(1. 北京农学院 动物科学技术学院, 北京 102206;  
2. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100193)

**摘要** 布鲁氏菌病是一种重要的人畜共患病,也是引起动物繁殖障碍的主要疾病之一。近年来,我国人、畜间布鲁氏菌病呈高发态势,严重威胁畜牧业发展和人群身体健康。及时准确诊断对控制和净化布鲁氏菌病具有重要意义。本研究从病原学和血清学两方面对布鲁氏菌病的现有诊断技术进行概述,同时指出布鲁氏菌免疫原性蛋白抗原的筛选和研究,对布病的控制和净化意义重大。

**关键词** 布鲁氏菌病;诊断;细菌学;血清学;分子生物学

中图分类号 S 852.61<sup>+</sup>4

文章编号 1007-4333(2014)06-0168-05

文献标志码 A

## Research progress of brucellosis diagnostic techniques and immunogenic proteins

WANG Zhen<sup>1</sup>, LU Lin<sup>1</sup>, WU Qing-min<sup>2\*</sup>

(1. Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;  
2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** Brucellosis is an important zoonosis and one of significant causes of reproductive losses in animals. Recently, human and animal brucellosis has showed a high incidence trend in our country which seriously threatened the development of animal husbandry and the human health. Prompt and accurate diagnosis for brucellosis plays a key role in disease control and eradication. This review described the antigenic and serological methods used for the diagnosis of human and animal brucellosis. And also this review indicated that the screening and study of *Brucella* immunogenic protein antigens will be of great significance to the control and purification of brucellosis.

**Key words** brucellosis; diagnosis; bacteriology; serology; molecular methods

布鲁氏菌病(简称“布病”)是一种重要的人畜共患病,也是引起动物繁殖障碍的主要疾病之一。临床上动物以流产、胎盘炎、附睾和睾丸炎为主要特征;人群感染多呈慢性型,以全身乏力、多个组织器官受损为主要表现。近年来,我国人、畜间布病呈高发态势,严重威胁畜牧业发展和人群身体健康,被列为“国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020年)”的三大疾病(口蹄疫、高致病禽流感 and 布病)之一。同时,该病在国际上也被列为重要的生物恐怖战剂之一。一直以来,动物群布病的净化困扰着世

界各国政府,许多发达国家不惜成本、历时数十年,通过检疫、阳性动物扑杀-补偿等措施,先后实现了家畜布病净化目标<sup>[1]</sup>。在我国,牛、羊饲养密度相对较高,动物基数大、阳性动物比例高,控制布病主要通过疫苗免疫与检测诊断相结合的方法。理论上,疫苗免疫可以提高动物群对布病的抵抗力,控制疫病的蔓延;检测诊断除可以监测疫苗免疫状态和效果外,还能及时对自然感染动物进行识别,对布病的净化起到促进作用。但是,现有布病疫苗免疫在一定程度上阻止布病蔓延的同时也给布病检测技术提

收稿日期: 2014-02-20

基金项目: 北京农学院“大北农青年教师科研基金”(13ZK005); 国家“973”计划项目(2010CB530202)

第一作者: 王真, 讲师, 主要从事致病性病原菌诊断及致病机制研究, E-mail: wangzhen3355@163.com

通讯作者: 吴清民, 教授, 主要从事布鲁氏菌发病机制及新型防控技术研究, E-mail: wuqm@cau.edu.cn

出挑战。现有布病检测技术不能区分疫苗接种与自然感染动物,致使免疫群内患病动物仍然存在带菌、排菌现象,病原扩散蔓延造成的疫情状态难以消除,时刻威胁着公共卫生安全<sup>[2]</sup>。因此,迫切需要简单、快速、准确、能鉴别诊断的布病检测技术。针对布病诊断和检测技术的研究一直在进行,笔者对当前国内外布病检测技术的研究现状和蛋白抗原的筛选进展进行概述,旨在促进我国布病检测技术的多元化、多用途,尽快推进布病检测技术的研究进程。

## 1 病原学检测方法

### 1.1 细菌学方法

迄今,细菌学方法依然是病原诊断的主要方法,包括样品涂片显微镜检和细菌分离培养、鉴定。虽然检出率很低,但却是布病诊断的“金标准”<sup>[3]</sup>。在此方面,高敏感选择性培养基及病料样品采集的及时性和处理设备的有效使用直接影响检测结果。针对不同临床病例,应采集合适的病料样品,如流产的胎儿通常采集的样品是胃内容物、肺脏和脾脏;成年动物的样品是胎盘、胎膜、阴道分泌物、奶样、精液和关节液等;死亡动物尸体优先选择的组织为乳腺、颌下、腮腺、肩前、髂内淋巴结和脾脏等。上述所有的样品采集时必须独立包装,并冷藏后立即运送到实验室或者暂时冻存于防漏的冷冻容器内。此外,急性期病人的血液也是较为常用的细菌分离用样品。

### 1.2 分子生物学方法

近年来,分子生物学技术得到快速发展和广泛应用,被逐渐应用于疾病的诊断和其他研究领域,开辟了布病临床诊断和检测的新途径。分子生物学技术在布病诊断中的应用,也经历了从传统 PCR 到荧光定量 PCR 再到环介导等温扩增技术(LAMP)的发展历程。1992年, Baily 等<sup>[4]</sup>根据 *bcs p31* 基因设计引物 B4/B5,建立了一种布鲁氏菌属特异性的 PCR 检测方法。该对引物一直沿用至今,且是目前检测布鲁氏菌应用最广的引物对之一。1994年, Bricker 等<sup>[5]</sup>基于插入序列 IS711 在不同种型布鲁氏菌基因组中的多态性,针对牛种、羊种、猪种和绵羊附睾种布鲁氏菌设计了不同的引物,来鉴定和区分牛种布鲁氏菌生物 1 型、2 型和 4 型、羊种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌和猪种生物 1 型,建立了 AMOS-PCR 方法。另外,钟旗等<sup>[6]</sup>也应用 AMOS-PCR 开展了布鲁氏菌种、型鉴定研究,结果表明该方法的特异性、敏感性均高于细菌分离和血清学诊

断方法,且能区分布鲁氏菌各个种和部分生物型。

除传统 PCR 技术外,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)是新近发展的 PCR 技术。2001年, Redkar 等<sup>[7]</sup>应用 Real-time PCR 鉴别了牛、羊、猪种布鲁氏菌。Probert 等<sup>[8]</sup>根据 *bcs p31* 基因设计引物,使用多重荧光定量 PCR 方法对 122 株布鲁氏菌进行鉴别,证实该方法可以在 2~3 h 内对不同种的布鲁氏菌进行快速、敏感、准确地鉴别。LAMP 扩增方法是一种灵敏性比较高的检测方法,其灵敏性比传统 PCR 高出 10~1 000 倍,达到甚至高于荧光定量 PCR 的检测水平<sup>[9]</sup>。2011年,许邹亮等<sup>[10]</sup>根据布鲁氏菌 *omp25* 基因设计引物,建立的基于颜色判定的布鲁氏菌 LAMP 检测方法可以检出浓度低至 17 fg 的布鲁氏菌基因组 DNA,灵敏性较高;且具有检测特异、设备要求简单等特点,适用于基层兽医部门进行布鲁氏菌的快速检测。

布鲁氏菌分子生物学检测技术依赖于特异性诊断用基因。截止目前,已筛选出多个具有布鲁氏菌属特异性的基因,包括 IS711 遗传片段、16S rRNA、31 和 4 ku 外膜蛋白编码序列、*bcs p31*、*omp2*、*bp26* 和 *per*<sup>[11]</sup>等,此外几乎所有的临床样品如全血、血清、白细胞、组织块、乳汁、关节滑液、阴道拭子、精液、尿液和石蜡切片等均可作为 PCR 方法的检测对象<sup>[12]</sup>。总的来说,基于 PCR 技术形成的布鲁氏菌分子生物学检测方法比细菌学方法简单、快速、实用,并且还在不断发展成熟。然而,该类方法也不同程度的受多个因素的影响,如不同样品 DNA 提取方法、提取质量和浓度、引物特异性和敏感性等都会影响检测结果,并且在疫苗菌株与野毒菌株差异基因未知的情况下,分子生物学方法也不能完全区分疫苗免疫和野毒感染动物。因此,该方法作为布鲁氏菌实验室常规检测方法,其敏感性、特异性、鉴别性、质量控制和质量保证还需用大量临床样品进行全面验证。

## 2 血清学检测方法

尽管细菌分离是布病诊断的金标准,然而血清学诊断方法却是非常有效的布病辅助诊断措施。血清学方法操作方便,几乎无感染风险,不需要特殊的仪器设备,很快便可获得检测结果,因此,血清学检测方法在实际生活中可行性更高,且更经济。虽然单一一种血清学方法检测结果的准确性不能达到 100%,但可以同时采取多种方法进行综合判断。目

前,最有效且节约成本的检测程序是先选择敏感性好、操作简便快速的方法对大批血清样品进行初筛,然后再选用敏感性和特异性均较好的检测方法对阳性血清样品进行确诊。当然,在进行布病血清学诊断的过程中,选用国际认可的检测方法,使用标准化的抗原和参考血清(标准阳性血清和标准阴性血清)是必不可少的。

1897年,Wright等<sup>[13]</sup>初次使用试管凝集试验(SAT)对布病进行诊断。随后,为了提高检测的准确性,研究人员对试管凝集试验进行改良,同时也发展出多个其他的血清学检测方法。如虎红平板凝集试验(RBPT)、试管凝集试验(SAT)、乳汁环状凝集试验、补体结合试验、酶联免疫吸附试验、荧光偏振试验、琼脂免疫扩散试验和荧光免疫分析等<sup>[14]</sup>。其中,虎红平板凝集试验和试管凝集试验是我国布病初筛和确诊的常用血清学方法,但是这2种方法均不能区分疫苗免疫和野毒感染动物。1976年,Cavleson等<sup>[15]</sup>首次将酶联免疫吸附试验(ELISA)方法应用于牛布病的检测,并发现其灵敏性比SAT高10~100倍。临床常用ELISA方法包括间接ELISA(i-ELISA)、竞争ELISA(c-ELISA)和斑点酶联免疫试验(Dot-ELISA)等<sup>[16]</sup>。i-ELISA是以光滑型布鲁氏菌菌体脂多糖(S-LPS)为包被抗原,检测IgGs或IgG亚型,但因其不能分辨疫苗免疫和自然感染动物产生的抗体,只能用于非免疫家畜普查检测而不是免疫家畜的诊断<sup>[17]</sup>。为解决该问题,Nielsen等<sup>[18]</sup>建立了c-ELISA方法,即在ELISA微孔内除包被光滑型布鲁氏菌菌体脂多糖(S-LPS)外,还加入O型多糖(OPS)特异表位单克隆抗体。c-ELISA利用特异性单克隆抗体能有选择地抑制结合疫苗所产生的抗体,因而可消除因接种疫苗而产生的残余抗体所引起的反应<sup>[16]</sup>。2004年,c-ELISA方法以其高特异性和敏感性的优点被OIE列为诊断和清除牛布鲁氏菌病的推荐方法<sup>[14]</sup>。近年来,关于ELISA检测方法的研究报道相当多,然而其检测效果的关键在于抗原的选用。目前广泛使用的抗原主要有脂多糖和外膜蛋白<sup>[19]</sup>,而现用布病疫苗多为光滑型菌,接种后能够产生针对脂多糖的抗体,从而导致上述血清学方法难以区别自然感染和疫苗免疫动物,检疫阳性动物常常被养殖业主称作免疫动物以逃避扑杀政策的实施。此外,由于布鲁氏菌OPS与耶尔森O:9和大肠杆菌O157:H7的抗原结构几乎完全一致<sup>[20]</sup>,血清学检测时经常出现交叉反应,

从而不利于布病的正确诊断。这也正是目前布病防控中遇到的瓶颈问题之一。

### 3 检测用布鲁氏菌免疫原性蛋白的筛选

布鲁氏菌感染后,具有免疫原性的蛋白抗原可以刺激机体产生相应的特异性抗体,通过检测该特异性抗体的有无及产生量的情况可以对布病进行诊断。考虑到目前布病检测方法的瓶颈问题,有必要筛选其他特异性蛋白抗原,建立新的诊断方法从而满足临床需要。随着蛋白质组学的发展和应用,科研人员将注意力转移到布鲁氏菌蛋白上来,筛选具有鉴别诊断特性的布鲁氏菌蛋白成为布鲁氏菌病诊断方法研究的重点<sup>[21]</sup>。2009年,顾超慧等<sup>[22]</sup>通过2-D电泳比较了强毒株16M和疫苗株M5的蛋白组成差异,找出13个蛋白差异点,证实布鲁氏菌强毒株和疫苗株在蛋白水平上有差异可寻。现已经发现的布鲁氏菌蛋白上千种,其中外膜蛋白,Ⅳ型分泌系统相关蛋白及胞质蛋白等都是近年来研究的热点。尤其外膜蛋白,因其处于菌体最外层的外膜上,在布鲁氏菌感染过程中始终与宿主细胞成分接触或相互作用,诱导细胞病理变化或免疫学反应,因此外膜相关蛋白在感染和免疫中发挥了重要的生物学作用<sup>[23-24]</sup>。20世纪80年代,布鲁氏菌主要的外膜蛋白(Outer membrane proteins,Omps)被首次确定具有免疫原性和抗原保护作用<sup>[22]</sup>。更为重要的是,截止目前未曾出现关于外膜蛋白存在交叉反应的报道,这些特点正符合布病检测用靶抗原的要求。

Bp26(Omp28)是布鲁氏菌的优势抗原,在感染宿主体内可检测到Bp26蛋白的抗体。2010年,Thavaselvam等<sup>[25]</sup>以重组Bp26蛋白为抗原,建立了i-ELISA和斑点印迹技术。与RBPT相比,这2种方法的敏感性分别为97.50%和82.05%,特异性分别为85.59%和92.41%。2011年,Liu等<sup>[26]</sup>证实Bp26作为检测绵羊附睾种布鲁氏菌的抗原,虽然检测的敏感度不及O-PS,但可以有效的区分自然感染动物和bp26基因突变株免疫的动物。然而,Xin等<sup>[27]</sup>研究发现动物体内Bp26蛋白抗体的产生与感染的布鲁氏菌种型及宿主特异性有关,仅羊种布鲁氏菌16M和M28感染的绵羊、羊种布鲁氏菌16M和流产布鲁氏菌2308感染的山羊体内检测到Bp26蛋白的抗体,因此用Bp26作为抗原建立的ELISA方法具有一定得局限性。有学者将Omp10和Bp26外膜蛋白联合应用于布鲁氏菌的血清学检

测,不仅可以提高检测的敏感性和准确性,也能够区分自然感染与疫苗接种反应,具有良好的应用前景<sup>[28-29]</sup>。另外 Omp31、Omp25、Omp16 和 Omp19 等外膜蛋白,也被证实是布鲁氏菌的免疫原性蛋白,从而用于检测方法的建立<sup>[30]</sup>。除外膜蛋白外, Hortensia 等<sup>[31]</sup>重组了 VirB1、VirB5、VirB11 和 VirB12 4 个 IV 型分泌系统蛋白,结果发现 VirB12 可与感染羊血清发生反应。Tan 等<sup>[32]</sup>以重组的 virB5 蛋白为抗原建立的 ELISA 方法,对 400 份血清样品检测的敏感性为 88.2%,特异性为 97.8%,与 SAT 方法的符合率达 94.8%。VirB8 蛋白是布鲁氏菌感染早期分泌的蛋白,在布鲁氏菌感染后 4 h 即可检测到 VirB8 抗体<sup>[33]</sup>,可以用于布病的早期检测。P39 是一种布鲁氏菌胞质结合蛋白,同属于胞质结合蛋白的还有 P15 和 P17。Letesson 等<sup>[34]</sup>以 P15-P39 作为抗原,建立的 i-ELISE 方法具有很高的敏感性,自然感染的绵羊和山羊血清的检出率分别为 80%和 96%。苹果酸脱氢酶(MDH)是三羧酸循环中的一种非常关键的酶,近来在流布布鲁氏菌中,发现该酶也是一种具有免疫原性的膜相关蛋白,不仅在布鲁氏菌毒力和致病过程中起了重要的作用,重组蛋白还能够与布病阳性血清发生反应,因此,MDH 也有望成为布病血清学诊断用候选蛋白抗原<sup>[35]</sup>。另外, Xu 等<sup>[36]</sup>通过微矩阵的方法,利用 99 份处于不同年龄以及布鲁氏菌不同感染时期的病人血清,从 107 个布鲁氏菌蛋白中筛选出具有较高敏感性的蛋白 BMEII0318、BMEII0513、BMEI0748 和 BMEII1116 等,可以作为布病血清学诊断的候选抗原。其研究结果提示,在对布鲁氏菌蛋白抗原的研究中,不同感染时期的优势抗原的表达是不一样的,研究不同蛋白抗体的消长规律,利用多个蛋白联合建立布病检测方法,将是布病检测方法研究的重要方向。Ciocchini 等<sup>[37]</sup>建立了一种新型的糖蛋白结合物偶联磁珠法,该方法以耶尔森 O:9 的多糖和蛋白结合物为抗原,偶联磁珠后对人临床血清样品进行检测。当检测阈值为 13.20%时,该方法检测的敏感性达 100%,特异性达 98.57%;当阈值为 16.15%时,检测敏感性达 93.48%,特异性达 100%。由此看来,这种新型的糖蛋白结合物偶联磁珠法也未尝不是一种有效的布病诊断方法,但需要大量临床样品的验证。相信随着蛋白质组学等技术的不断成熟,对蛋白的研究也会不断深入,布病检测用靶蛋白抗原的鉴定及检测

方法的建立也将取得很大的突破。

## 4 小 结

通常情况下,布病的确诊相对较为容易,但也不乏比较特殊的病例。细菌分离是布病诊断的“金标准”,但是细菌分离也存在一些固有的问题,如样品采集繁琐、分离困难、耗材耗时和生物安全等。因此,很多机构倾向于选择其他的更为简单、有效的诊断方法。如分子生物学方法在布病诊断中得到广泛应用,其快速、安全和有效,但在诊断特异性方面有待提高;血清学诊断技术为国际贸易和许多发展中国家布病检疫、监测提供了重要的手段,但现有成熟的血清学方法不能区分疫苗免疫动物和自然感染动物,不利于布病净化措施的实施。布鲁氏菌感染后,具有免疫原性的蛋白抗原可以刺激机体产生相应的特异性抗体,通过检测该特异性抗体的产生情况可以对布病进行诊断。因此,免疫原性蛋白的筛选和研究将是解决现有检测方法难以鉴别诊断的一个突破口,比如可以找到一种或几种靶蛋白抗原,通过检测其特异性抗体来区分自然感染和疫苗接种动物,从而利于布病的控制和净化。

## 参 考 文 献

- [1] Rubach M P, Halliday J E, Cleaveland S, et al. Brucellosis in low-income and middle-income countries[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2013, 26(5):404-412
- [2] 吴清民. 动物布鲁氏菌病防控技术及策略的探讨[C]//中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会论文集,徐州:中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会、解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 2013
- [3] Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in livestock and wildlife[J]. *Croat Med J*, 2010, 51(4):296-305
- [4] Baily G G, Krahn J B, Drasar B S, et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification[J]. *J Trop Med Hyg*, 1992, 95(4):271-275
- [5] Bricker B J, Halling S M. Differentiation of *Brucella abortus* by 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:2660-2666
- [6] 钟旗, 范伟兴, 何倩妮, 等. 用 AMOS-PCR 对布鲁氏杆菌种型鉴定的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(7):683-686
- [7] Redkar R, Rose S, Bricker B, et al. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* [J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15(1):43-52
- [8] Probert W S, Schrader K N, Khuong N Y, et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp, *B abortus*, and *B melitensis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3):1290-1293
- [9] Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, et al. Rapid detection of *Brucella* spp by the loop-mediated isothermal amplification

- method[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104(6): 1815-1823
- [10] 许邹亮, 南文龙, 周洁, 等. 布鲁氏菌环介导等温扩增(LAMP)可视化检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28(8): 37-40
- [11] Bounaadja L, Albert D, Chenais B, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: A comparative study of IS711, bcspl1 and per target genes[J]. *Vet Microbiol*, 2009, 137(1/2): 156-164
- [12] Queipo-Ortuño N O M I, Colmenero J D, Bravo M J, et al. Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14(12): 1128-1134
- [13] Wright A E, Smith F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever [J]. *Lancet*, 1897(1): 656-659
- [14] Office International des Epizooties. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [M]. 5th ed. Paris: Office International des Epizooties, 2004
- [15] Burriel A R, Christodoulouopoulos G, Bisiás G, et al. Comparison of fluorescence polarization assay, indirect ELISA and competitive ELISA methods for diagnosis of *Brucella melitensis*-infection in small ruminants [J]. *Small Ruminant Research*, 2004, 54(3): 243-247
- [16] 解新霞, 刘日宏, 刘志国, 等. 酶联免疫吸附试验在布鲁杆菌病检测中的研究进展[J]. *中国地方病防治杂志*, 2013, 28(3): 181-183
- [17] Kashiwazaki Y, Ecewu E, Imaligat J O, et al. Epidemiology of bovine brucellosis by a combination of rose bengal test and indirect ELISA in the five districts of Uganda [J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(11): 1417-22
- [18] Nielsen K, Smith P, Yu W L, et al. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 125(3/4): 246-250
- [19] Cloeckaert A, de Wergifosse P, Dubray G, et al. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: Immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(12): 3980-3987
- [20] See W, Edwards W H, Dauwalter S, et al. *Yersinia enterocolitica*: An unlikely cause of positive brucellosis tests in greater yellowstone ecosystem bison (*Bison bison*) [J]. *J Wildl Dis*, 2012, 48(3): 537-541
- [21] Connolly J P, Comerci D, Alefantis T G, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development [J]. *Proteomics*, 2006, 6(13): 3767-80
- [22] 顾超慧, 崔步云, 关平原. 蛋白质组学在布鲁氏菌病研究中的应用[J]. *疾病监测*, 2009, 24(5): 373-378
- [23] Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet J Y, et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp: Past, present and future [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 90(1/2/3/4): 229-247
- [24] Salhi I, Boigegrain R A, Machold J, et al. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(8): 4326-4332
- [25] Thavaselvam D, Kumar A, Tiwari S, et al. Cloning and expression of the immunoreactive *Brucella melitensis* 28 kD outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis [J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 4): 421-428
- [26] Liu W X, Hu S, Qiao Z J, et al. Expression, purification, and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: A potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 58(1): 32-38
- [27] Xin T, Yang H, Wang N, et al. Limitations of the BP26 protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(9): 1410-1417
- [28] Tibor A, Wansard V, Bielartz V, et al. Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(10): 5540-5546
- [29] 陈瑶, 李明. 布鲁氏菌 bp26 和 OMP10 基因的原核表达和鉴定 [J]. *中国人畜共患病学报*, 2006, 22(4): 313-317
- [30] Tiwari S, Kumar A, Thavaselvam D, et al. Development and comparative evaluation of a plate enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant outer membrane antigens Omp28 and Omp31 for diagnosis of human brucellosis [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(8): 1217-1222
- [31] Rolán H G, den Hartigh A B, Kahl-McDonagh M, et al. VirB12 is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(2): 208-214
- [32] Tan W, Wang X R, Nie Y, et al. Recombinant VirB5 protein as a potential serological marker for the diagnosis of bovine brucellosis [J]. *Mol Cell Probes*, 2012, 26(3): 127-131
- [33] Rouot B, Alvarez-Martinez M T, 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
- [34] Letesson J J, Tibor A, van Eynde G, et al. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997, 4(5): 556-64
- [35] Han X, Tong Y, Tian M, et al. Characterization of the immunogenicity and pathogenicity of malate dehydrogenase in *Brucella abortus* [J/OL]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014 (2014-03-08) [2014-03-19]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-014-1631-2>
- [36] Xu J, Qiu Y, Cui M, et al. Sustained and differential antibody responses to virulence proteins of *Brucella melitensis* during acute and chronic infections in human brucellosis [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, 32(3): 437-47
- [37] Ciocchini A E, Rey Serantes D A, Melli L J, et al. Development and validation of a novel diagnostic test for human brucellosis using a glyco-engineered antigen coupled to magnetic beads [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(2): e2048