



研究报告

牛种布鲁氏菌 2308 不同途径小鼠感染模型的建立与评估

蒋卉 冯宇 沈青春 彭小薇 朱良全 丁家波*

中国兽医药品监察所 国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室 北京 100081

摘要:【背景】布鲁氏菌可经口、皮肤、黏膜和呼吸道感染人和动物。小鼠是布鲁氏菌研究中最常用的模型动物。【目的】建立牛种布鲁氏菌 2308 不同途径和剂量感染 BALB/c 小鼠的模型，为布鲁氏菌小鼠感染试验提供参考。【方法】用 10^1 – 10^5 CFU 这 5 个不同感染剂量，分别经注射、口服和点眼方式感染 BALB/c 小鼠。在感染后不同时间点采集小鼠血清，检测 IgG、IgM、IgA 抗体含量、脾脏重量及脾脏含菌量，评价布鲁氏菌经不同途径感染 BALB/c 小鼠的效果。【结果】 10^1 CFU 是注射感染 BALB/c 小鼠的最小感染剂量； 10^5 CFU 是口服感染 BALB/c 小鼠的最小感染剂量。 10^1 – 10^5 CFU 这 5 个不同感染剂量经点眼途径均未能成功感染 BALB/c 小鼠。在 10^5 CFU 感染剂量下，口服与注射感染组小鼠每克脾脏平均含菌量分别为 $10^{5.673}$ CFU/g 和 $10^{5.009}$ CFU/g，无显著差异 ($P>0.05$)，但口服感染组小鼠脾脏平均重量为 0.310 g，显著高于注射感染组 0.165 g ($P<0.01$)。在试验期内，注射感染组和口服感染组小鼠体内 IgG 抗体的滴度均随感染时间延长而持续升高；整体上，口服感染组 IgG 抗体峰值显著高于注射感染组；2 组 IgM 抗体变化趋势一致；口服感染组有 2 只小鼠在感染 28 d 后产生 IgA 抗体，注射感染组均未检测到 IgA 抗体。【结论】建立了牛种布鲁氏菌 2308 通过不同途径感染 BALB/c 小鼠的模型。

关键词：牛种布鲁氏菌，小鼠感染模型，每克脾脏含菌量

Establishment and evaluation of mice model infected *Brucella abortus* strain 2308 by different routes

JIANG Hui FENG Yu SHEN Qingchun PENG Xiaowei ZHU Liangquan DING Jiabo*

National/OIE Reference Laboratory for Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] *Brucella* can infect humans and animals by mouth, skin, mucous and respiratory tract. Mice are the most commonly used model animals in the study of *Brucella*. [Objective] The study aimed to establish the BALB/c mice model infected by *Brucella abortus* strain 2308 with different routes and doses, and to provide reference for mice infection experiments by *Brucella*. [Methods] The BALB/c mice were infected with 5 different doses of 10^1 – 10^5 CFU by injection, mouth and eye droppings respectively. The serum samples were collected at different time points after infection in order to detect IgG, IgM and IgA antibodies. Combined with the results of spleen weight and bacteria content, we evaluated the effect of BALB/c mice model infected with *Brucella* by different routes. [Results] The

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500903)

*Corresponding authors: Tel: 86-10-61255327; E-mail: dingjiabo@126.com

Received: 24-02-2021; Accepted: 28-04-2021; Published online: 31-05-2021

基金项目：国家重点研发计划(2016YFD0500903)

*通信作者：Tel: 010-61255327; E-mail: dingjiabo@126.com

收稿日期：2021-02-24；接受日期：2021-04-28；网络首发日期：2021-05-31

results showed that 10 CFU was the minimum infection dose for injection, and 10^5 CFU was the minimum infection dose for oral administration. The BALB/c mice could not be successfully infected with 5 different doses of 10^1 – 10^5 CFU by eye droppings. At 10^5 CFU infection dose, the average bacteria content per gram spleen of mice in oral and injection groups was $10^{5.673}$ CFU/g and $10^{5.009}$ CFU/g respectively, and there was no significant difference between them ($P>0.05$). However, the average weight of spleen was 0.310 g in the oral group, which was significantly higher than 0.165 g in the injection group ($P<0.01$). During the experimental period, the titers of IgG antibody increased continuously with the increase of infection time in injection and oral groups. Overall, the IgG peak value of oral group was significantly higher than that of injection group. The IgM change trend was coincide between the two groups. Two mice in oral group produced IgA antibody 28 days after infection, but IgA antibody was not detectable in injection group. **[Conclusion]** This study established the BALB/c mice model infected *Brucella abortus* strain 2308 by different routes.

Keywords: *Brucella abortus*, mice infection model, the bacteria content per gram of spleen

布鲁氏菌病(Brucellosis)简称布病,是由布鲁氏菌引起的一种变态反应性人畜共患传染病,对畜牧业生产和人类健康危害严重。有统计资料表明,全球每年约有 50 万人感染布病^[1-5],每年因该病造成的经济损失近 30 亿美元^[6]。布鲁氏菌可经口、皮肤、黏膜和呼吸道感染。易感动物主要通过口咽途径接触受感染母畜的流产物或生育物(胎盘、胎儿和羊水)及被污染的饲料和饮水而感染布病,也可以经过呼吸道和皮肤感染,特别是带有伤口的皮肤,通过结膜等黏膜也能感染^[7-8]。

在构建布鲁氏菌感染模型方面,啮齿类动物尤其是小鼠是常用的试验模型^[9],许多不同品系的小鼠均可被布鲁氏菌感染^[10-11]。被布鲁氏菌感染的小鼠表现出许多与大型动物及人类似的症状,包括流产^[12-13]、胎盘感染和组织病变、急性和慢性疾病等^[14]。现有研究中,布鲁氏菌感染小鼠模型的构建多采用腹腔注射^[15]或皮下注射^[16],少有口服、黏膜等感染途径的研究报道。然而临床上家畜感染布鲁氏菌多是通过口服、黏膜感染等途径,而不是通过注射方式形成感染,因此建立布鲁氏菌不同途径感染小鼠模型十分必要。本研究采用牛种布鲁氏菌参考强毒株 2308,分别以 10^1 – 10^5 CFU 等不同剂量经皮下注射、口服、点眼 3 个不同途径感染 BALB/c 小鼠,以脾脏重量、脾脏含菌量、抗体水平等指标评价感染效果,为

布鲁氏菌感染试验提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌种及试剂

牛种布鲁氏菌 2308 (CVCC788)由国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室保存;TSA 和 TSB 培养基均购自 BD 公司;HRP 标记山羊抗鼠 IgG、IgM、IgA 均购自 Sigma 公司;4–6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有涉及布鲁氏菌活菌的试验操作均在生物安全 3 级实验室内完成。

1.2 细菌的培养和计数

将牛种布鲁氏菌菌株 2308 接种至 TSB 培养基,37 °C、180 r/min 条件下培养 24 h。用生理盐水稀释培养菌液至 10^6 、 10^7 、 10^8 这 3 个不同的稀释度,每个稀释度取 100 μ L 涂布在 TSA 平板上,在 37 °C 培养 3 d,取 TSA 平板进行计数。选择合适稀释度的平板计数(一般选择单个菌落数 40–200 个的平板)并计算菌液的细菌含量。

1.3 牛种布鲁氏菌经不同途径感染 BALB/c 小鼠

根据计算的细菌含量,用生理盐水 10 倍比稀释菌液,稀释至 10^2 – 10^8 CFU/mL,共 7 个不同稀释度。取 10^2 – 10^6 CFU/mL 5 个稀释度腹股沟皮下注射小鼠,每只小鼠注射 0.1 mL;取 10^3 – 10^7 CFU/mL 5 个稀释度经口服感染小鼠,每只小鼠口服 10 μ L;取 10^4 – 10^8 CFU/mL 5 个稀释

度经点眼感染小鼠, 每只小鼠点眼 1 μL ; 即不同感染途径每组小鼠的感染量均分别为 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 CFU/只。每个感染途径不同感染剂量组小鼠各 5 只, 同时设立阴性对照小鼠 5 只。

1.4 不同感染时间小鼠体内抗体测定

在布鲁氏菌感染的 2、7、14、21、28、42、56、70、84 d 分别采用颌下静脉采血法采集全部小鼠的静脉血, 分离血清。用本实验室建立的 iELISA 方法检测小鼠体内 IgG、IgM、IgA 抗体水平。具体方法为: 用裂解的布鲁氏菌全菌蛋白包被 96 孔 ELISA 板, 1.5 μg /孔。用含 2% 牛血清白蛋白的 PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 洗板后 -20°C 保存备用。检测小鼠血清时, 用 PBS 将小鼠血清作 1:50 倍稀释。将稀释好的小鼠血清分别加入到 ELISA 板中, 100 μL /孔。加样结束后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。取出反应板, 弃去反应液, 每孔加入 300 μL 磷酸盐吐温缓冲液(Phosphate-Buffered Saline with Tween-20, PBST), 洗涤 3 次, 最后 1 次甩干或拍干。将 HRP 标记山羊抗鼠 IgG、IgM、IgA 分别用 PBS 作 1:10 000 稀释后, 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。洗涤 3 次, 甩干。将底物显色液立即加入到 ELISA 反应板中, 100 μL /孔, 室温避光显色 15 min 后每孔加 50 μL 终止液(1 mol/L H_2SO_4)终止反应。反应终止后, 15 min 内用酶标仪测定 OD_{450} 值。以样品孔 OD_{450} 值/阴性对照平均 OD_{450} 值(S/N) ≥ 2.1 作为阳性判定标准。

1.5 小鼠脾重、脾脏含菌量测定

在布鲁氏菌感染的第 84 天采集小鼠血清后, 将小鼠剖杀, 无菌采集其脾脏、称重。取脾脏放入研磨器中, 按其重量加入生理盐水(每 0.01 g 加入 100 μL 生理盐水), 然后再进行 10、100、1 000、10 000 倍稀释, 取每个稀释度的稀释液 100 μL 涂布 TSA 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 取 TSA 平板进行计数、菌落形态观察^[17]和 AMOS-PCR 鉴定^[18], 根据计数结果计算每克脾脏含菌量。

2 结果与分析

2.1 不同感染时间小鼠体内抗体测定结果

各试验组在 2308 感染实验小鼠后 2、7、14、21、28、42、56、70、84 d 分别采集血清, 经 iELISA 测定的 IgG、IgM、IgA 抗体结果见图 1-3。不同剂量注射感染组(10^1 - 10^5 CFU)小鼠体内 IgG、IgM 抗体均呈阳性, 其中 IgG 抗体的滴度随着感染时间的增加而升高; IgM 抗体的滴度在感染后

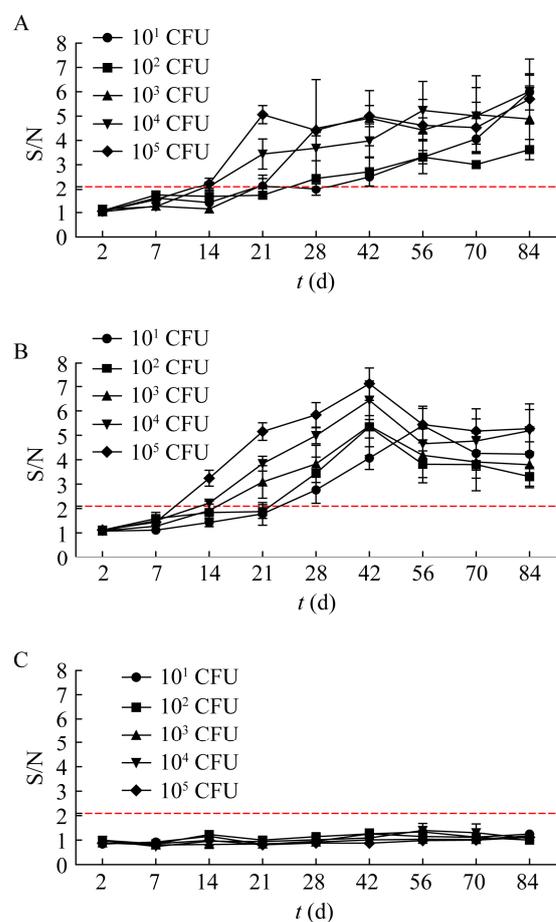


图 1 牛种布鲁氏菌 2308 注射感染组小鼠抗体平均 S/N 值曲线

Figure 1 The average S/N curve of antibody in mice infected with *Brucella abortus* 2308 by injection

注: A: IgG 平均 S/N 值曲线; B: IgM 平均 S/N 值曲线; C: IgA 平均 S/N 值曲线

Note: A: The average S/N curve of IgG; B: The average S/N curve of IgM; C: The average S/N curve of IgA

42 d 达到最高峰, 随后开始下降, 并在 56–84 d 内维持在同一水平; 注射组全部小鼠均未检测到 IgA 抗体(图 1)。

口服感染组, 仅 10^5 CFU 感染剂量组全部小鼠检测到 IgG、IgM 抗体阳性, 10^4 CFU 感染剂量组只有 2 只小鼠检测到 IgG、IgM 抗体阳性, 其余各感染组均检测为阴性(图 2)。检测结果显示, 10^5 CFU 剂量组 IgG 抗体的滴度随着感染时间的增加呈逐步升高趋势, 第 84 天时 IgG 抗体平均 S/N 值为 11, 显著高于注射感染 10^5 CFU 剂量组

IgG 抗体平均 S/N 值(5.7); 10^4 CFU 和 10^5 CFU 感染剂量组小鼠 IgM 抗体在感染 21 d 后升高, 随后在 28–84 d 内维持稳定。仅 10^5 CFU 感染剂量组有 2 只小鼠检测到 IgA 抗体阳性, 其 IgA 抗体的滴度在感染 28 d 后升高, 其余各感染剂量组均未检测到 IgA 抗体阳性。

点眼感染组, 10^1 – 10^5 CFU 各感染剂量组均未检测到 IgG、IgM、IgA 抗体阳性(图 3)。

2.2 小鼠脾重、脾脏含菌量测定结果

在牛种布鲁氏菌 2308 感染第 84 天, 剖杀小

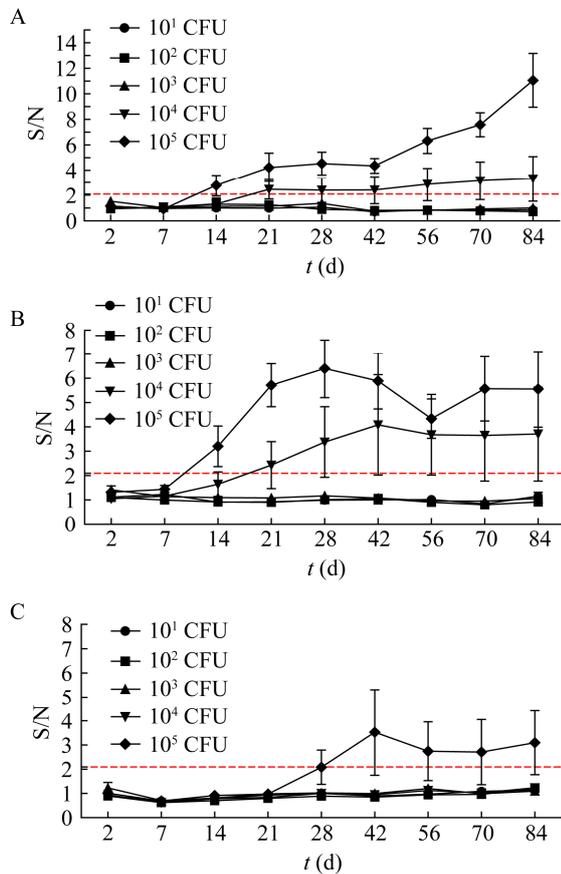


图 2 牛种布鲁氏菌 2308 口服感染组小鼠抗体平均 S/N 值曲线

Figure 2 The average S/N curve of antibody in mice infected with *Brucella abortus* 2308 by mouth

注: A: IgG 平均 S/N 值曲线; B: IgM 平均 S/N 值曲线; C: IgA 平均 S/N 值曲线

Note: A: The average S/N curve of IgG; B: The average S/N curve of IgM; C: The average S/N curve of IgA

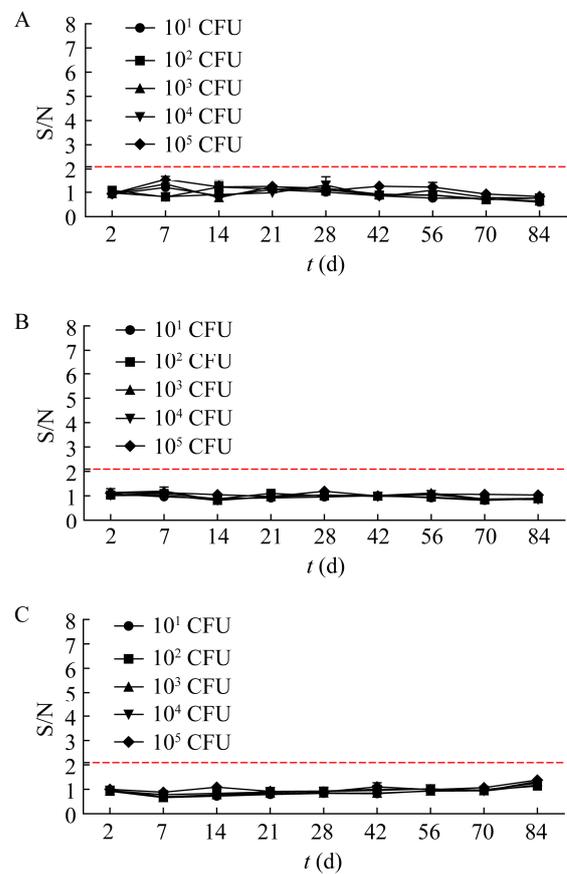


图 3 牛种布鲁氏菌 2308 点眼感染组小鼠抗体平均 S/N 值曲线

Figure 3 The average S/N curve of antibody in mice infected with *Brucella abortus* 2308 by eye droppings

注: A: IgG 平均 S/N 值曲线; B: IgM 平均 S/N 值曲线; C: IgA 平均 S/N 值曲线

Note: A: The average S/N curve of IgG; B: The average S/N curve of IgM; C: The average S/N curve of IgA

鼠,测定脾脏重量和含菌量,观察菌落形态,并对脾脏分离细菌进行 AMOS-PCR 鉴定,结果见图 4-6。观察到分离细菌菌落呈圆形,边缘光滑,透射光下菌落呈浅黄色,有光泽,半透明。随机选取 3 块计数平板,用结晶紫染液浸没菌落 15-20 s,然后弃去染液,观察到所有菌落均不着色,为光滑型菌落。从脾脏分离的细菌中随机挑取 5 个单菌落进行 AMOS-PCR 鉴定,结果均扩增出 178 bp 和 498 bp 条带,与牛种布鲁氏菌 2308 PCR 扩增结果一致(图 4)。

点眼感染组, 10^1-10^5 CFU 各感染剂量组小鼠脾脏平均重量分别为 0.088、0.079、0.080、0.080、0.079 g,与阴性对照小鼠脾脏平均重量 0.077 g 没有显著差异($P>0.05$) (图 5),全部小鼠脾脏均未分离到布鲁氏菌。

口服感染组, 10^1-10^3 CFU 各感染剂量组均未分离到布鲁氏菌,小鼠脾脏平均重量分别为 0.078、0.082、0.087 g,与点眼感染组、阴性对照组小鼠脾脏平均重量没有显著差异($P>0.05$); 10^4 CFU 感染剂量组仅 2 只 IgG、IgM 抗体阳性小鼠脾脏分离到了布鲁氏菌,其脾脏重量分别为 0.153 g 和 0.186 g,高于该组小鼠脾脏平均重量 0.117 g,2 只小鼠脾脏平均含菌量 $10^{4.895}$ CFU/g,与同剂量注射感染组脾脏平均含菌量 $10^{5.117}$ CFU/g

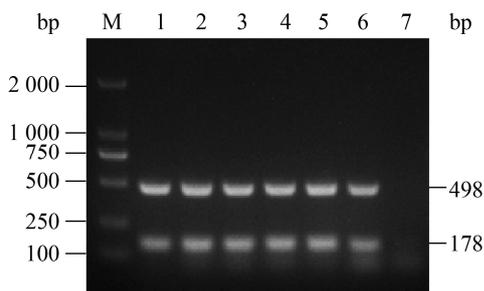


图 4 AMOS-PCR 鉴定

Figure 4 AMOS-PCR identification

注: M: DL2000 DNA Marker; 1-5: 菌落 PCR 扩增产物; 6: 牛种布鲁氏菌 2308 PCR 扩增产物; 7: 阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1-5: Colony PCR amplification products; 6: *Brucella abortus* 2308 PCR amplification product; 7: Negative control

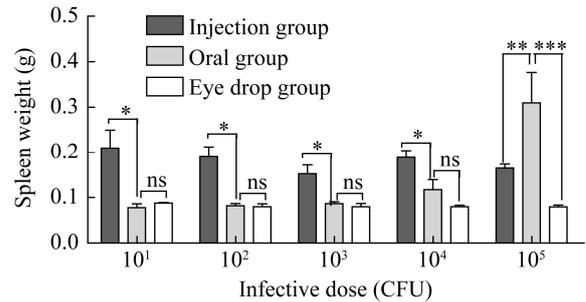


图 5 牛种布鲁氏菌 2308 感染 BALB/c 小鼠的脾脏重量
Figure 5 The spleen weight of BALB/c mice infected with *Brucella abortus* 2308

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No significant difference ($P>0.05$). The same as below

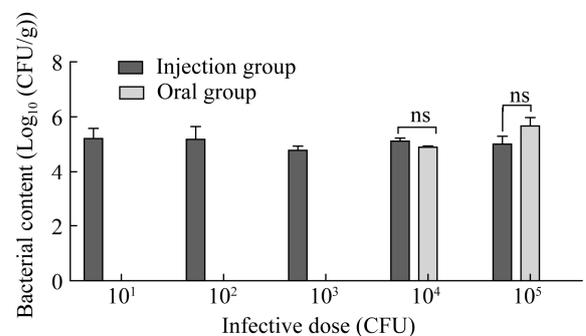


图 6 牛种布鲁氏菌 2308 感染 BALB/c 小鼠的脾脏含菌量
Figure 6 The bacterial content in spleen of BALB/c mice infected with *Brucella abortus* 2308

没有显著差异($P>0.05$); 10^5 CFU 感染剂量组全部小鼠脾脏均分离到布鲁氏菌,脾脏平均重量 0.310 g,显著高于同剂量注射感染组小鼠脾脏平均重量 0.165 g ($P<0.01$)和点眼感染组小鼠脾脏平均重量 0.079 g ($P<0.001$),脾脏平均含菌量为 $10^{5.673}$ CFU/g,与同剂量注射感染组脾脏平均含菌量 $10^{5.009}$ CFU/g 没有显著差异($P>0.05$) (图 5,图 6)。

注射感染组, 10^1-10^5 CFU 各感染剂量组全部小鼠脾脏均分离到布鲁氏菌,脾脏平均重量分别为 0.210、0.190、0.152、0.189、0.165 g,各组小鼠脾脏平均含菌量分别为 $10^{5.212}$ 、 $10^{5.184}$ 、 $10^{4.782}$ 、 $10^{5.117}$ 、 $10^{5.009}$ CFU/g,其中 10^1-10^4 CFU 各感染剂量脾脏平均重量均显著高于同剂量口服感染和点眼感染组($P<0.05$); 10^5 CFU 感染剂量脾

脏平均重量显著低于同剂量口服感染组($P < 0.01$); 10^4 和 10^5 CFU 感染剂量组脾脏平均含菌量与同剂量口服感染组没有显著差异($P > 0.05$) (图 5, 图 6)。

上述结果表明, 以点眼感染方式, 10^1 – 10^5 CFU 剂量均未能成功感染 BALB/c 小鼠。以口服感染方式, 10^4 CFU 剂量只能感染部分小鼠, 10^5 CFU 剂量可成功感染全部小鼠, 所以 10^5 CFU 是牛种布鲁氏菌 2308 口服感染 BALB/c 小鼠的最小感染剂量。以注射感染方式, 10^1 – 10^5 CFU 剂量均能成功感染全部小鼠, 所以 10^1 CFU 是牛种布鲁氏菌 2308 注射感染(腹股沟皮下注射) BALB/c 小鼠的最小感染剂量。

3 讨论与结论

布病是由胞内寄生的布鲁氏菌感染而引起, 动物感染后主要导致流产和不孕, 人类通常是因为接触受感染的动物或动物产品而感染该病, 可引起发热、关节炎、心内膜炎和脑膜炎^[19-20]。由于布病是世界范围内最重要的人兽共患病之一, 因此该病一直是兽医学领域的研究热点。在实验研究中, 考虑到生物安全防护要求和试验成本, 通常选择啮齿类动物作为研究模型替代牛羊等靶动物, 而小鼠是布病研究中最常用试验动物。本研究中采用牛种布鲁氏菌参考强毒株 2308 作为攻毒菌株^[21-22], 建立感染 BALB/c 小鼠的试验模型^[23-24], 与以往小鼠感染模型不同的是, 除了使用注射感染方式外, 本研究还采用了口服感染和点眼感染 2 种方式, 以此模拟家畜的真实感染方式。通过测定不同途径和不同感染剂量下感染小鼠的抗体水平、脾脏重量和脾脏含菌量等指标, 评价感染效果, 为进一步阐明不同感染途径动物机体免疫应答差异提供理论依据。

本研究用 10^1 – 10^5 CFU 这 5 个不同剂量分别通过注射、口服和点眼 3 种方式进行小鼠感染试验。结果在点眼感染方式中, 即便是试验的最高剂量(10^5 CFU/只)也未能实现成功感染。 10^5 CFU 感染组小鼠脾脏平均重量为 0.079 g, 与阴性对照小

鼠脾脏平均重量 0.077 g 没有显著差异($P > 0.05$), 点眼感染的全部小鼠脾脏均未分离到布鲁氏菌, 表明感染失败, 通过点眼方式可能需要更高剂量才能实现感染, 或者眼黏膜不是布鲁氏菌侵染宿主的易感途径。

本研究结果表明, 不同感染途径的最小感染剂量差异显著。对于注射感染, 仅 10^1 CFU 就能成功感染全部试验小鼠, 而口服方式则需要 10 000 倍的注射剂量(10^5 CFU)才可成功感染全部小鼠, 点眼方式则需要更高的剂量。以 10^5 CFU 剂量通过注射或者口服均可实行感染, 而且不同途径感染小鼠的每克脾脏平均含菌量并无显著差异($P > 0.05$), 但口服感染组小鼠脾脏平均重量显著高于注射感染组($P < 0.01$), 表明口服感染方式可引起更强烈的炎症反应, 使得脾脏淋巴组织细胞的急剧增加引起脾脏重量增大。

不同感染时间小鼠体内抗体测定结果表明, 在 10^5 CFU 感染剂量下, 注射感染方式和口服感染方式小鼠体内 IgG 抗体的滴度随感染时间增加持续升高, 但口服感染方式 IgG 抗体在感染后 84 d 达到的峰值是注射感染方式的 1.9 倍, 同时口服感染组有 2 只小鼠在感染 28 d 后持续检测到 IgA 抗体阳性, 而注射感染各剂量组均未检测到 IgA 抗体阳性, 说明不同感染方式刺激机体产生的抗体类型有所不同, 而口服感染方式可刺激小鼠产生更强的体液免疫反应。由于 IgA 虽然可以结合抗原, 但不能激活补体的经典途径, 因此不像 IgG 那样能发挥许多的生物效应, 但近年的研究发现, 循环免疫复合物的抗体中有相当比例的 IgA, 因而认为血清型 IgA 以无炎症形式清除了大量抗原, 以防止这些抗原诱导的炎症或自身免疫, 是维持机体内环境稳定有益的免疫效应。但在布鲁氏菌相关抗体亚型研究中少有关于血清型 IgA 的研究报道。本研究从口服感染组的 2 只小鼠血清中持续检测到布鲁氏菌特异性 IgA 抗体, 表明血清型 IgA 在布鲁氏菌感染的特定个体中存在免

疫调节作用。已有的研究表明通过消化道或呼吸道进行人工感染/免疫,局部可产生大量的分泌型 IgA (SIgA),在局部免疫反应中发挥重要作用,是机体黏膜表面的一个重要防御因素。因此本研究通过口服方式成功感染的小鼠是否在口腔黏膜存在局部高浓度的 SIgA 抗体及其抗感染的作用值得进一步研究。

本研究的结果表明,在相同感染剂量下,口服方式比注射方式可刺激小鼠机体产生更强的免疫反应。然而在临床上,家畜布病的发生大多不是通过注射感染,通过舔食患病动物的流产物而引起感染是重要的传播方式,据报道患病动物的流产物中布鲁氏菌含量可高达 10^{13} CFU/g,因此极易在群体中形成感染^[25-26]。综上,口服感染方式的小鼠模型比注射感染方式的小鼠模型更接近真实感染状况。因此在布病研究中使用口服感染小鼠模型比使用注射感染小鼠模型更能反映真实感染状态,更具代表性。

本实验室前期在布鲁氏菌天然宿主牛上建立了牛种布鲁氏菌 2308 注射感染模型并持续监测了 IgG、IgM 抗体变化规律,与本研究建立的小鼠注射感染模型 IgG、IgM 抗体变化规律相比较,两者 IgG 抗体的滴度均随感染时间增加持续升高,而注射感染牛的 IgM 抗体滴度在感染 30 d 达到峰值,随后很快下降,90 d 后检测为阴性^[27],注射感染小鼠 IgM 抗体的滴度则在感染 42 d 达到峰值,随后下降,但两者 IgM 抗体变化趋势一致。这一结果表明在感染途径相同的条件下,小鼠感染模型可模拟天然宿主感染布鲁氏菌后的抗体变化规律。

本研究成功建立了牛种布鲁氏菌 2308 经注射、口服途径感染 BALB/c 小鼠的模型。 10^1 CFU 是注射感染(腹股沟皮下注射)BALB/c 小鼠的最小感染剂量; 10^5 CFU 是口服感染 BALB/c 小鼠的最小感染剂量。尽管注射感染方式最敏感,但由于其不是临床家畜感染布鲁氏菌的主要途径,而且

小鼠脾脏重量、脾脏含菌量、抗体变化规律结果表明口服方式比注射方式可刺激小鼠机体产生更强免疫反应,因此在布病研究中口服感染小鼠模型更适用。本研究虽然未能成功建立点眼途径感染 BALB/c 小鼠的模型,但研究结果表明 10^5 CFU 的感染剂量不能经点眼途径成功形成感染,未来在点眼途径感染 BALB/c 小鼠模型的建立中应使用更高的感染剂量。本研究为布鲁氏菌感染小鼠模型的构建与应用提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] Johansen MV, Welburn SC, Dorny P, Brattig NW. Control of neglected zoonotic diseases[J]. *Acta Tropica*, 2017, 165: 1-2
- [2] Olsen SC, Palmer MV. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years[J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(6): 1076-1089
- [3] Byndloss MX, Tsolis RM. *Brucella* spp. virulence factors and immunity[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4(1): 111-127
- [4] Von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(3): 533-562
- [5] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(2): 91-99
- [6] Zhu LQ, Wang F, Jiang H, Feng Y, Zhang JY, Zhang G, Zhang Z, Pi XC, Wang N, Mao KR, et al. A comparative study on the complement fixation test for diagnosis of animal brucellosis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(2): 357-361,368 (in Chinese)
朱良全, 王芳, 蒋卉, 冯宇, 张金亚, 张阁, 张振, 皮向成, 王楠, 毛开荣, 等. 动物布鲁氏菌病补体结合试验诊断方法比较研究[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(2): 357-361,368
- [7] Robi DT, Gelalcha BD. Epidemiological investigation of brucellosis in breeding female cattle under the traditional production system of Jimma zone in Ethiopia[J]. *Veterinary and Animal Science*, 2020, 9: 100117
- [8] Ding JB, Dong H. *Animal Brucellosis*[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020 (in Chinese)
丁家波, 董浩. 动物布鲁氏菌病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020
- [9] Smither SJ, Perkins SD, Davies C, Stagg AJ, Nelson M, Atkins HS. Development and characterization of mouse models of infection with aerosolized *Brucella melitensis* and *Brucella suis*[J]. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 2009, 16(5): 779-783

- [10] Silva TMA, Costa EA, Paixão TA, Tsolis RM, Santos RL. Laboratory animal models for brucellosis research[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 2011: 518323
- [11] Zhu LQ, Feng Y, Zhang G, Jiang H, Zhang Z, Wang N, Ding JB, Suo X. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella* spp. infections[J]. *Vaccine*, 2016, 34(3): 395-400
- [12] Kim S, Lee DS, Watanabe K, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice[J]. *BMC Microbiology*, 2005, 5(1): 22
- [13] Narnaware SD, Dahiya SS, Kumar S, Tuteja FC, Nath K, Patil NV. Pathological and diagnostic investigations of abortions and neonatal mortality associated with natural infection of *Brucella abortus* in dromedary camels[J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2017, 26(1): 79-85
- [14] Fu YY. Effect of infection in limited feeding of BALB/c mice challenged by aerosolized *Brucella*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2014 (in Chinese)
付莹莹. 限饲条件下布鲁氏菌气溶胶感染小鼠的感染效果[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2014
- [15] Liu YF, Dong H, Peng XW, Gao Q, Jiang H, Xu GL, Qin YM, Niu JR, Sun SJ, Li P, et al. RNA-seq reveals the critical role of Lon protease in stress response and *Brucella* virulence[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 130: 112-119
- [16] Jiang H, Dong H, Peng XW, Feng Y, Zhu LQ, Niu K, Peng Y, Fan HJ, Ding JB. Transcriptome analysis of gene expression profiling of infected macrophages between *Brucella suis* 1330 and live attenuated vaccine strain S2 displays mechanistic implication for regulation of virulence[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 119: 241-247
- [17] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. National Standard (Recommended) of the People's Republic of China: Diagnostic techniques for animal brucellosis. GB/T 18646-2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese)
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国推荐性国家标准: 动物布鲁氏菌病诊断技术 GB/T 18646-2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018
- [18] Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(11): 2660-2666
- [19] Negrón ME, Kharod GA, Bower WA, Walke H. Notes from the field: human *Brucella abortus* RB51 infections caused by consumption of unpasteurized domestic dairy products—United States, 2017–2019[J]. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2019, 68(7): 185
- [20] Guimarães ES, Gomes MTR, Campos PC, Mansur DS, Dos Santos AA, Harms J, Splitter G, Smith JA, Barber GN, Oliveira SC. *Brucella abortus* cyclic dinucleotides trigger STING-dependent unfolded protein response that favors bacterial replication[J]. *Journal of Immunology*, 2019, 202(9): 2671-2681
- [21] Araiza-Villanueva M, Avila-Calderón ED, Flores-Romo L, Calderón-Amador J, Sriranganathan N, Qublan HA, Witonsky S, Aguilera-Arreola MG, Ruiz-Palma MDS, Ruiz EA, et al. Proteomic analysis of membrane blebs of *Brucella abortus* 2308 and RB51 and their evaluation as an acellular vaccine[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2714
- [22] 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
- [23] Reyes AWB, Vu SH, Huy TXN, Min W, Lee HJ, Chang HH, Lee JH, Kim S. Modulatory effect of linoleic acid during *Brucella abortus* 544 infection in murine macrophage RAW_{264.7} cells and murine model BALB/c mice[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(5): 642-648
- [24] Gutiérrez-Jiménez C, Hysenaj L, Alfaro-Alarcón A, Mora-Cartín R, Arce-Gorvel V, Moreno E, Gorvel JP, Barquero-Calvo E. Persistence of *Brucella abortus* in the bone marrow of infected mice[J]. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018: 5370414
- [25] Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis[J]. *Veterinary Research*, 2005, 36(3): 313-326
- [26] Ferrero MC, Hielpos MS, Carvalho NB, Barrionuevo P, Corsetti PP, Giambartolomei GH, Oliveira SC, Baldi PC. Key role of Toll-like receptor 2 in the inflammatory response and major histocompatibility complex class II downregulation in *Brucella abortus*-infected alveolar macrophages[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(2): 626-639
- [27] Feng Y. Research of diagnostic method for bovine brucellosis[D]. Taian: Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2017 (in Chinese)
冯宇. 牛布鲁氏菌病诊断技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学博士学位论文, 2017