

病原菌耐药信号传导机制及多抗原肽疫苗 研究进展与发展趋势

孙爱华¹, 方佳琪², 严杰²

(1. 浙江医学高等专科学校, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江大学医学院病原生物学系, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 细菌耐药性是当前人类面临的重大医学问题之一。接种疫苗是预防各种传染病最为经济和有效的措施,也是预防和控制耐药性病原菌感染相关传染病的有效途径。文中介绍了病原菌耐药相关信号传导机制及新型多抗原肽疫苗研究进展,并分析了其发展趋势,以供相关领域研究者参考。

[关键词] 大肠杆菌;沙门菌,甲型副伤寒;副结核分枝杆菌;细菌菌苗;肽类;抗药性,细菌;药物耐受性;病原菌;耐药性;疫苗

[中图分类号] R 378 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2013)02-0125-06

传染病依然是当前威胁人类健康和生命的主要疾病之一。例如,O139群霍乱、SARS、禽流感、猪链球菌病等新发传染病(emerging infectious diseases)不断出现,结核病、甲副伤寒、手足口病、H1N1流感等再现传染病(re-emerging infectious diseases)重新流行^[1-7]。细菌性再发传染病往往与病原菌耐药性增强密切相关。例如,目前我国临床上分离的结核分枝杆菌对多种抗结核药物的耐药率高达50%~70%^[8],甲型副伤寒沙门菌对临床常用抗生素的耐药率高达60%以上^[9],但其耐药分子机制尚未完全明了。接种疫苗是预防各种传染病最为经济和有效的措施,尤其在预防和控制耐药性病原菌引起的传染病更有实际价值。基因工程疫苗是当前疫苗研发的主要方向,虽然存在产量较低及免疫保护性较弱等缺陷,但采用多抗原肽(multiple antigenic peptide, MAP)疫苗研发策略有可能解决上述问题。因此,作者就近年来二元信号传导系统与病原菌耐药性关系、MAP疫苗研究进展及其发展趋势进行简要论述,供相关领域研究者参考。

1 细菌耐药相关信号传导与调控

1.1 细菌耐药主要机制 目前已知细菌对抗

生素耐药的主要机制是:①产生药物钝化酶;②抗生素受体突变而与抗生素结合(亲和)能力下降;③下调药物膜通道蛋白表达或降低膜通透性,使进入细菌的抗生素减少;④通过细菌特定的分泌系统(药物外排泵)将菌体内的抗生素外排。以往对细菌耐药机制研究大多局限于发现新型药物钝化酶、药物膜通道蛋白和外排泵及耐药相关抗生素受体突变新类型。近年来,细菌信号传导系统调控药物钝化酶与药物膜通道蛋白表达、药物外排泵活化及其在细菌耐药性形成过程的重要作用逐渐引起了人们的关注。

1.2 细菌二元信号传导系统 任何生物必然与其生存环境发生相互联系和影响,实现这种相互联系和影响的最主要方式是通过彼此之间

收稿日期:2013-01-24 修回日期:2013-02-18

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H19002);浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2011KYB006)。

作者简介:孙爱华(1968-),女,教授,主要从事病原菌致病与耐药机制及实验室诊断方法研究。

通讯作者:严杰(1956-),男,医学博士,教授,博导,主要从事病原菌致病机制及基因工程疫苗研究;E-mail:med_bp@zju.edu.cn

的信息交换及反应,感受和应答外界信号物质基础是信号传导系统。与哺乳类动物细胞比较,细菌信号传导系统相对简单,一般由两类分工明确的蛋白组成,故称之二元信号传导系统(two-component signaling system, TCSS):①跨膜传感蛋白(sensor protein, SP):多为具有信号分子受体功能的组氨酸激酶,少数为丝氨酸/苏氨酸激酶;②胞浆内应答调节蛋白(response regulator protein, RRP),通常被跨膜传感激酶磷酸化后激活,具有转录因子样作用,通过调节靶基因产物表达水平对环境信号进行适应性应答^[11]。目前认为,每种细菌至少需要数十个不同的 TCSS,才能具备感受各种环境信号并进行反应的能力,并且在病原菌趋化、黏附与定植、分泌毒力因子、产生耐药性等过程中发挥作用^[12-13]。

1.3 病原菌耐药相关信号传导及其调控作用

1.3.1 诱导药物钝化酶表达 我们的实验结果显示,在 1/4 最低抑菌浓度(MIC)的青霉素或头孢噻肟刺激下,大肠埃希菌 β -内酰胺类钝化酶基因(TEM、SHV、CTX-M)表达水平迅速,且升高显著,在 1/4 MIC 的链霉素作用下,大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌氨基糖苷类钝化酶基因[aac(6')-I b、aac(3)-II、aph(3')和 aac(6)-I e-aph(2)-I a]表达水平也得到快速上调,但上述钝化酶基因表达水平上调可被组氨酸激酶阻断剂氯氰碘柳胺所抑制,提示亚致死量抗生素可作为外源信号分子,通过 TCSS 上调药物钝化酶基因表达水平,从而表现为对抗生素的耐药性^[14]。

1.3.2 抑制抗生素活化 异烟肼和乙胺丁醇是常用抗结核药物。业已证明,异烟肼须经结核分枝杆菌过氧化氢酶-过氧化物酶氧化后才能形成具有抑制分枝菌酸合成活性的中间产物,结核分枝杆菌编码过氧化氢酶-过氧化物酶的 katG 基因表达上调可使菌株对异烟肼高度敏感^[15];乙胺丁醇能选择性地抑制结核分枝杆菌细胞壁组分阿拉伯半乳糖和阿拉伯甘露聚糖的合成,若编码阿拉伯糖基转移酶的 embA/embB 基因过度表达,可使结核分枝杆菌持续合成上述阿拉伯聚糖而表现为对乙胺丁醇的耐药^[16]。有线索显示,结核分枝杆菌 SenX3/

RegX3 和 PknH/EmbR 可能是分别调控 katG 和 embA/embB 基因的 TCSS^[17-19]。

1.3.3 抑制抗生素受体表达 肺炎链球菌临床菌株有很高的耐药率,但该菌不产生 β -内酰胺酶^[20]。青霉素结合蛋白(PBPs)突变被认为是肺炎链球菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的重要机制,但有证据显示,CiaH/CiaR TCSS 中的 CiaH 失活或跨膜真核型丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶 StkP 发生突变,细菌可产生与 PBPs 突变无关的对青霉素耐药性^[21-23]。我们的实验结果显示,CiaR 可与 PBPs 编码基因启动子结合并显著下调基因表达水平,肺炎链球菌 StkP 胞外区具有 PBPs 功能结构域,StkP 编码基因被敲除后,PBPs 表达水平极显著下降且对青霉素和头孢噻肟耐药性显著增强,提示 StkP 可作为 β -内酰胺类抗生素传感激酶并通过 CiaR 调控 PBPs 表达,从而呈现为对 β -内酰胺类抗生素的高耐药性。

1.3.4 下调细菌膜通透性 细菌对氨基糖苷类抗生素耐药机制依次为药物摄取的减少、药物主动外排、钝化酶作用及核糖体结合位点改变。PhoQ/PhoP 是一种多功能的 TCSS,但可下调鼠伤寒沙门菌膜通透性,减少细菌对氨基糖苷类抗生素摄取量,导致细菌对此类抗生素耐药^[24]。我们以往研究证实,PhoQ/PhoP 介导了铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性,敲除组氨酸激酶 PhoQ 编码基因可使细菌对氨基糖苷类抗生素链霉素、庆大霉素、阿米卡星和妥布霉素的敏感性提高 512 ~ 2048 倍,其机制与该 TCSS 下调氨基糖苷类抗生素膜通道蛋白 OprH 表达水平有直接关系^[25]。

1.3.5 促进药物外排 细菌 I 型分泌系统(T1SS)是由三种蛋白亚单位组成的输出复合物:结合于内膜的 ATP 结合装置(ABC)、在外膜中形成通道的外膜蛋白(OMP)、位于周浆间隙连接 ABC 和通道 OMP 的蛋白(MFP)。除分泌溶血素等细菌毒性蛋白外,进入菌体的多种抗菌药物主要通过 T1SS 外排。有研究显示,大肠埃希菌 EvgA/EvgS TCSS 可调控膜通道 OMP 和 MFP 表达并激活 ABC,从而促进抗菌药物外排,其分子作用机制尚有待于进一步证实^[26]。

2 疫苗研究现状与多抗原肽疫苗

2.1 疫苗种类及其优缺点 目前实际使用的疫苗有全菌死疫苗、减毒活疫苗、组分疫苗(如荚膜多糖)和基因工程疫苗。全菌死疫苗安全性好,但免疫保护性较弱、毒副作用较大;减毒活疫苗免疫效果虽好,但毒副作用较大且存在生物安全问题;组分疫苗安全有效,但不是所有病原菌均可产生能用于制备组分疫苗的抗原。目前的基因工程疫苗主要是以单一重组蛋白为抗原的疫苗,抗原成分明确且无明显的毒副作用,但免疫效果不甚理想。病毒表面蛋白抗原种类很少,故单一重组蛋白为抗原的基因工程疫苗预防病毒感染效果较好(如乙型肝炎表面抗原 HBsAg 疫苗)。细菌抗原构造复杂多样,往往需要多靶点攻击才能奏效,故单一抗原的基因工程疫苗预防细菌感染效果较差^[27]。采用多种细菌蛋白抗原的多价基因工程疫苗是提高免疫效果的有效途径,但各基因独立表达无疑将使疫苗成本成倍增加。用柔性肽作为连接序列,可构建含多个抗原编码基因的人工融合基因,但目前的原核表达系统表达大片段基因的效率低下。

2.2 病原菌血清群型与多价疫苗 几乎所有病原菌均存在抗原性并有一定差异的血清群或血清型。为了有效预防某种病原菌感染,往往根据当地优势流行的血清群或血清型来制备多价疫苗。例如,我国目前使用的钩端螺旋体疫苗即为 5~7 个血清群组成的多价全菌死疫苗^[28]。然而,不同血清群或血清型的病原菌往往存在共同的蛋白抗原,因此可用于制备通用性基因工程疫苗^[29]。

2.3 疫苗增强性疾病 一些病原微生物疫苗接种后再感染相应病原微生物时,其致病作用明显增强的现象称为疫苗增强性疾病(Vaccine enhanced disease, VED)。VED 虽非普遍现象,但仍可见于不少病原微生物疫苗中,如人呼吸道合胞病毒、SARS 冠状病毒、肺炎支原体、沙眼衣原体死疫苗或亚单位疫苗。究其原因,是这些病原微生物致病主要机制为引发病理性免疫反应,疫苗接种使机体处于致敏状态,感染相应病原微生物后引发病理性超敏反应而使疾病

明显加重。G 蛋白、S 蛋白、主要外膜蛋白(MOMP)和热休克蛋白 60(HSP60)分别是呼吸道合胞病毒、SARS 冠状病毒、肺炎支原体和沙眼衣原体引起 VED 的主要因子^[30-33]。因此,VED 是此类病原微生物至今尚无疫苗的主要原因。

2.4 MAP 疫苗定义与特点 病原微生物蛋白抗原分子中抗原表位(antigenic epitope)与高分子核心载体人工交联的多价组合式疫苗称为 MAP 疫苗。该疫苗具有能同时提呈多种多个抗原表位、抗原提呈作用强、可通过各抗原肽分支之间相互作用以非共价结合形成构象表位(conformational epitopes)而提高免疫效果、个别氨基酸突变不影响抗原提呈及后继免疫反应、不同表位可组合式装配等特点^[34],因此成为当前新型疫苗研发前沿。

2.4.1 抗原表位 是抗原分子中能诱导机体免疫应答的短肽片段,与抗原决定簇(antigen determinant)的含义基本相似,但抗原表位一般含有与 MHC 分子和 B 细胞表位结合位点。抗原表位可分为 T 细胞和 B 细胞表位,分别引发细胞和体液免疫应答。在实际研究中,通常先采用生物信息学软件预测蛋白抗原分子中的 B 细胞表位(<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.bp?#forms:antigenic>)和 T 细胞表位(<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>),此类表位称为预测表位,其功能有待于实验证明。尽管预防性疫苗主要是通过诱生抗体达到保护作用,但 T 表位可激活 T 细胞应答而有利于提高抗体水平,故目前倾向于采用 T 和 B 联合表位(T-B)肽制备 MAP 疫苗^[35]。通常采用噬菌体展示系统表达含 T-B 联合预测表位的重组 PIII 蛋白,然后采用该蛋白抗原重组表达产物及全菌抗血清进行 Western Blot 反应,根据杂交信号有无或强弱,分为无效表位、有效表位和优势表位。优势表位体现该蛋白分子主要抗原性,可用于制备 MAP 疫苗^[36-37]。

2.4.2 核心载体 为人工合成的寡聚或多聚高分子^[34]。抗原表位肽通过分子交联法连接于核心载体,形成以核心载体为中心、外展多种抗原表位树状臂(dendritic arms)的交联体,也

即 MAP 疫苗。抗原表位与核心载体交联后成为完全抗原,其免疫原性显著增强。核心载体需具备如下基本条件:①无毒性;②有较多表面基团用于交联抗原表位肽;③分子大小可控;④能生物降解。

2.5 MAP 疫苗应用前景 上述 MAP 疫苗的优点和特点,决定了该疫苗有广泛的应用前景。

2.5.1 克服现有表达系统效率的限制 以 300 个氨基酸组成的抗原分子为例,一个 T-B 联合抗原表位(通常为 30 个氨基酸的短肽)若有完整抗原分子 50% 免疫原性,10 个表位效果相当于完整分子 5 倍,但长度相似。因此,可利用基因工程技术构建含特定蛋白酶(如肠激酶)酶切位点的重复串联 T-B 联合抗原表位序列,然后再经过常规重组表达、通过蛋白酶酶切及分离获得大量目的表位,从而克服现有表达系统效率的限制而提高产量。

2.5.2 制备有 VED 现象的病原微生物疫苗 业已发现,同一蛋白抗原中可分别存在诱导正常抗感染免疫力或病理性免疫应答的不同抗原表位,通过抗原表位筛选和免疫学鉴定,可分辨诱导正常抗感染免疫应答或病理性免疫应答的抗原表位^[38]。例如,沙眼衣原体诱导的 Th1 型细胞免疫应答有免疫保护作用,Th2 型细胞因子 IL-10 则介导病理性免疫反应^[39]。因此,首先确定有 VED 现象的病原微生物主要蛋白抗原,从中筛选出能诱导正常抗感染免疫力的抗原表位,然后制备 MAP 疫苗。

2.5.3 制备通用性病原菌基因工程疫苗 如前所述,细菌是原核细胞,抗原构造复杂多样,多价基因工程疫苗才能有较好的免疫保护效果^[27]。尽管病原菌常有不同血清群或血清型,但往往存在数种共同蛋白抗原^[29]。因此为了提高基因工程疫苗效果、避免多次表达而降低生产成本,采用 MAP 疫苗研发策略是制备通用性病原菌基因工程疫苗的有效途径。

3 展 望

耐药性是一些细菌感染性疾病再次流行的主要原因,接种疫苗是预防传染病最有效的措施。因此深入探讨细菌耐药新机制、研发更为有效的细菌新型疫苗具有重要医学意义。感染

是病原微生物与宿主相互作用过程,这个观念已被普遍接受,但耐药也是细菌针对环境中抗生素杀菌或抑菌作用的反应性抵抗行为。因此,阐明细菌感受抗生素分子信号的受体、抗生素信号菌体内传递途径、调控耐药相关基因(药物钝化酶、抗生素受体、药物活化酶、药物膜通道蛋白及外排系统)表达的应答调节蛋白(RRP)及其工作机制,将是今后细菌耐药性研究的新领域,其研究成果将为研发以干扰细菌耐药相关信号通路为原理的新型抗耐药细菌药物提供科学依据。同时,适用范围广、高效无毒、多价组合式新型病原菌基因工程疫苗也将是今后疫苗研发的主攻方向,这不仅需要研发出更为便利高效的基因表达新系统及相关生物工程新技术,同时也要求人们对病原菌对抗宿主免疫力机制以及宿主抗感染免疫机制本质有更为深入的认识与了解。

References:

- [1] SHAKHNOVICH E A, STURTEVANT D, MEKALANOS J J. Molecular mechanisms of virstatin resistance by non-O1/non-O139 strains of *Vibrio cholerae* [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 66(6): 1331-1341.
- [2] KAN B, WANG M, JING H, et al. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms [J]. *J Virol*, 2005, 79(18): 11892-11900.
- [3] GAMBOTTO A, BARRATT-BOYES S M, DE JONG M D, et al. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus [J]. *Lancet*, 2008, 371(9622): 1464-1475.
- [4] HUANG Y T, TENG L J, HO S W, et al. *Streptococcus suis* infection [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005, 38(5): 306-313.
- [5] MATHEMA B, KUREPINA N E, BIFANI P J, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(4): 658-685.
- [6] WILDE H. Enteric fever due to *Salmonella typhi* and *paratyphi* A: A neglected and emerging problem [J]. 2007, 25(29): 5246-5247.
- [7] CALORE E E, UIP D E, PEREZ N M. Pathology of

- the swine-origin influenza A (H1N1) flu [J]. **Pathol Res Pract**, 2011, 207(2): 86-90.
- [8] SUN A H, FAN X L, LI L W, et al. Rapid detection of *rpoB* gene mutations in Rif-resistant *M. tuberculosis* isolates by oligonucleotide microarray [J]. **Biomed Environ Sci**, 2009, 22(3): 253-258.
- [9] GUPTA S K, MEDALLA F, OMONDI M W, et al. Laboratory-based surveillance of paratyphoid fever in the United States: travel and antimicrobial resistance [J]. **Clin Infect Dis**, 2008, 46(11): 1656-1663.
- [10] SMITH P A, ROMESBERG F E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation [J]. **Nat Chem Biol**, 2007, 3(9): 549-556.
- [11] CASINO P, RUBIO V, MARINA A. The mechanism of signal transduction by two-component systems [J]. **Curr Opin Struc Biol**, 2010, 20(6): 763-771.
- [12] READING N C, RASKO D A, TORRES A G, et al. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2009, 106(14): 5889-5894.
- [13] LOU Hongqiang, GE Yumei, ZHANG Jinliang, et al(楼宏强, 葛玉梅, 张金良, 等). Role of *fliY* gene in pathogenicity-associated chemotaxis and colonization of *Campylobacter jejuni* [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences**(浙江大学学报医学版), 2013, 42(2): 141-148. (in Chinese)
- [14] WU Yifei, SUN Aihua, ZHAO Jinfang, et al(吴亦斐, 孙爱华, 赵金方, 等). Distribution of bacterial drug inactive enzyme-encoding genes and expression-inducing and -inhibiting mechanism of the genes [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences**(浙江大学学报医学版), 2013, 42(2): 131-140. (in Chinese)
- [15] CABUSORA L, SUTTON E, FULMER A, et al. Differential network expression during drug and stress response [J]. **Bioinformatics**, 2005, 21(12): 2898-2905.
- [16] PAPA VINASASUNDARAM K G, CHAN B, CHUNG J H, et al. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* *pknH* gene confers a higher bacillary load during the chronic phase of infection in BALB/c mice [J]. **J Bacteriol**, 2005, 187(16): 5751-5760.
- [17] ORTIZ de ORU -LUCANA D, ZOU P J, NIERHAUS M, et al. Identification of a novel two-component system SenS/SenR modulating the production of the catalase-peroxidase CpeB and the haem-binding protein HbpS in *Streptomyces reticuli* [J]. **Microbiology**, 2005, 151(11): 3603-3614.
- [18] PARISH T, SMITH D A, ROBERTS G, et al. The senX3 regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence [J]. **Microbiology**, 2003, 149(6): 1423-1435.
- [19] RICKMAN L, SALDANHA J W, HUNT D M, et al. A two-component signal transduction system with a PAS-domain containing sensor is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2004, 314(1): 259-267.
- [20] SONG J H, JUNG S I, KO K S, et al. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia [J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2004, 48(6): 2101-2107.
- [21] CHESNEL L, CARAPITO R, CROIZÉ J, et al. Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance [J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2005, 49(7): 2895-2902.
- [22] MASCHER T, HEINTZ M, Z HNER D, et al. The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in *pbp2x* involved in beta-lactam resistance [J]. **J Bacteriol**, 2006, 188(5): 1959-1968.
- [23] DIAS R, F LIX D, CANICA M, et al. The highly conserved serine threonine kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* contributes to penicillin susceptibility independently from genes encoding penicillin-binding proteins [J]. **BMC Microbiol**, 2009, 9: 121-129.
- [24] MURATA T, TSEBG W, GUINA T, et al. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. **J Bacteriol**, 2007, 189(20): 7213-7222.

- [25] WANG Zhejiong, XIA Xiaoping, LOU Hongqiang, et al (夏肖萍, 楼宏强, 孙爱华, 等). Deletion of phoQ gene decreases the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycoside antibiotics [J]. **Chinese Journal of Microbiology and Immunology** (中华微生物学和免疫学杂志), 2009, 29 (9): 801-806. (in Chinese)
- [26] EGUCHI Y, OSHIMA T, MORI H, et al. Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in *Escherichia coli* [J]. **Microbiology**, 2003, 149 (10): 2819-2828.
- [27] RUAN P, XIA XP, SUN D, et al. Recombinant SpaO and H1a as immunogens for protection of mice from lethal infection with *Salmonella paratyphi* A: Implications for rational design of typhoid fever vaccines [J]. **Vaccine**, 2008, 26 (51): 6639-6644.
- [28] ZHANG C L, WANG H, YAN J. Leptospirosis prevalence in Chinese populations in the last two decades [J]. **Microbes Infect**, 2012, 14 (4): 317-323.
- [29] LUO D J, XUE F, OJCIUS D M, et al. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity [J]. **Vaccine**, 2010, 28 (1): 243-255.
- [30] JOHNSON T R, VARGA S M, BRACIALE T J, et al. Vbeta14 (+) T cells mediate the vaccine-enhanced disease induced by immunization with respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein but not with formalin-inactivated RSV [J]. **J Virol**, 2004, 78 (16): 8753-8760.
- [31] YANG Z Y, WERNER H C, KONG W P, et al. Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2005, 102 (3): 797-801.
- [32] NICHOLAS R A J, AYLING R D, MCAULIFFE L. Vaccines for *Mycoplasma* diseases in animals and man [J]. **J Comp Path**, 2009, 140 (2-3): 85-96.
- [33] BRUNHAM R C, REY-LADINO J. Immunology of *Chlamydia* infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine [J]. **Immunology**, 2005, 5 (2): 149-161.
- [34] MOZDZANOWSKA K. Induction of influenza type A virus-specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2 [J]. **Vaccine**, 2003, 21 (19-20): 2616-2626.
- [35] LIN X A, SUN A H, RUAN P, et al. Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira interrogans* major outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 [J]. **BMC Microbiol**, 2011, 11 (1): 21-26.
- [36] WANG Xuehai, MAO Yafei, YAN Jie (王学海, 毛亚飞, 严杰). Prediction of urease subunit B epitopes of *Helicobacter pylori* and epitope screening by phage display technique [J]. **Chinese Journal of microbiology and Immunology** (中华微生物学和免疫学杂志), 2007, 27 (5): 432-437. (in Chinese)
- [37] LIN X A, ZHAO J F, YAN J. Identification of immunodominant B- and T-cell combined epitopes in outer membrane lipoprotein LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans* [J]. **Clin Vaccine Immunol**, 2010, 17 (5): 778-783.
- [38] WELSH R M, FUJINAMI R S. Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design [J]. **Nat Microbiology**, 2007, 5 (7): 555-563.
- [39] YANG X. Role of cytokines in *Chlamydia trachomatis* protective immunity and immunopathology [J]. **Curr Pharm Des**, 2003, 9 (1): 67-73.

[责任编辑 张荣连]