

# 佐剂在牛病疫苗中的应用进展

赵培杰 李文康 谭旭宸 刘镕奇 邓立新\* 王新卫\*

河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

**摘要** 佐剂在使用疫苗防治疾病的过程中发挥重要作用。但因佐剂可导致动物机体组织炎性变化,这使得传统佐剂的应用受到一定影响。近年来,由于细胞通路相关领域的卓越进展,细胞因子以及诸多相关的新型佐剂开始被开发和应用,为许多传染性疾病的疫苗研发提供了新方案。本文就佐剂种类、进展和主要牛病疫苗佐剂进展进行了综述。

**关键词** 疫苗;佐剂;结核;牛支原体;口蹄疫

佐剂(adjutant)是指能增强抗原物质的免疫应答的物质,在一些疫苗中发挥辅助或者辅佐作用。佐剂的出现,是因为许多疫苗不能刺激机体产生良好的免疫应答,有时需要将抗原物质与一类大分子共同使用,以增强免疫反应<sup>[1]</sup>。目前,随着生物技术的进展,新疫苗研发产生了基因工程亚单位疫苗、多肽疫苗、DNA 等疫苗,伴随这些新型疫苗,免疫佐剂逐渐成为众多研究者的焦点,其在实际生产中的应用也更为广泛<sup>[2]</sup>。免疫佐剂在新型疫苗中也起到了增强这些疫苗免疫反应的作用,弥补了该类疫苗抗原性不足的问题。但目前也存在因缺乏相匹配的合适佐剂而影响到诸多重组蛋白、多肽等疫苗开发和研制。所以通过疫苗免疫途径来达到疾控的目的时,相关的免疫佐剂的研发也显得至关重要。佐剂的开发在人和动物疫苗研制中报道的很多,而本文将佐剂在牛病疫苗研发中的应用进展进行综述。

## 1 疫苗佐剂类别

### 1.1 传统的颗粒性佐剂

1) 铝盐佐剂。常见的铝盐佐剂有氢氧化铝胶、明矾、磷酸三钙等,这些佐剂容易制备、价格相对低廉,其安全性好而被广泛用于生产动物或者人类疫苗。但铝盐佐剂也有自己的缺点,如因其不能进行

干冻保存,贮存与运输成为生产中的一大难题<sup>[3]</sup>,另外铝佐剂会在接种部位形成结节,包括无菌性脓肿、红斑、皮下结节、肉芽肿炎症与接触性超敏反应。铝积聚还被认为与老年痴呆症的发生有密切关系<sup>[4]</sup>。此外铝盐佐剂主要激活对象为 Th2 免疫细胞以诱导体液免疫应答,对诱导细胞介导免疫无明显作用。因此其适用于制造以体液免疫为主的疫苗,如用于人类的很多疫苗(白喉、破伤风等疫苗),用于牛出败、口蹄疫灭活疫苗等疫苗。

2) 油乳佐剂。当前,在畜牧生产中最常用的油佐剂当属弗氏佐剂,弗氏佐剂包括完全弗氏佐剂与不完全弗氏佐剂。不完全弗氏佐剂是指将油(石蜡油或矿物油)与乳化剂混合,形成 W/O 型乳化剂,其中白油应用的最为广泛。完全弗氏佐剂是在制作好不完全弗氏佐剂后,添加失活的分枝杆菌而制备得来的。完全弗氏佐剂与不完全弗氏佐剂都能诱导高滴度的抗体产生,完全弗氏佐剂除了能提高体液免疫,还可以增强细胞免疫。但是,弗氏佐剂在具体生产应用中,常造成注射部位组织损伤出现长期炎症反应,且不容易被吸收。

尽管如此,矿物油佐剂得到了广泛应用。水包油(O/W)、油包水(W/O)、水包油包水(W/O/W)等油佐剂已经商品化并用于动物生产实践。O/W 型的油

收稿日期:2020-4-23

基金项目:国家农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-37)

\* 通讯作者

赵培杰,女,1997年生。

佐剂其乳状液的安全性相对较高,但因其易扩散而导致实际的免疫增强活性降低;W/O 型油佐剂的乳状液能在免疫组织贮存较长时间,能长期刺激动物机体起到免疫增强作用,其佐剂活性相对较高,但是因其可引起局部组织炎性而存在相对的安全隐患;W/O/W 型油佐剂的乳状液在动物机体的贮存时间久而且其活性介于 O/W 型和 W/O 型之间,缺点是其稳定性相对较差,某些情况下可能转变为 W/O 型。目前,研究者们关注的焦点是安全性和佐剂活性都比较好的新型油佐剂。实际上水包油(O/W)型佐剂因为出色的安全性受到人们的青睐,欧盟和美国已经批准了 MF59 和 AS03 两种 O/W 型佐剂应用于人用疫苗。在牛类疫苗中,还没有发现该类佐剂商品化的使用。

## 1.2 新型非颗粒性佐剂

1) 细胞因子免疫佐剂。细胞因子是动物机体的一些免疫细胞或某些非免疫细胞在受到抗原刺激后而分泌的一类小分子蛋白,其具有良好的生物学活性。细胞因子作为佐剂使用时,细胞因子可以和特异性受体结合,从而加强机体内细胞和体液免疫功能。例如,李世芳等<sup>[5]</sup>的研究显示,IL-2 能诱导 Th2 型细胞的免疫应答并使之向 Th1 型转变,同时上调 CD80、CD83、CD84 等细胞蛋白因子的表达,诱导更多的 IL-12 和 INF- $\alpha$  的表达。Zhang<sup>[6]</sup>的研究发现,联合使用 GM-CSF 与 IL-12 作为口蹄疫病毒 VP1 重组蛋白的佐剂,可刺激机体产生良好的体液与细胞免疫。

目前,据研究报道显示,一些细胞因子,如干扰素(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、INF- $\gamma$ ),淋巴因子(IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10 等),单核因子(IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 等)及 TNF、GM-CSF 等均具有免疫佐剂效应。

2) 天然来源佐剂。目前,研究者也关注到植物提取物具有毒性较小、容易代谢等生物学特点,不断从天然植物中提取能做为免疫佐剂的活性物质并加以研究。其中,主要代表为蜂胶佐剂、皂苷和 QuilA 等。蜂胶是由蜜蜂工蜂采植物芽孢或树干树脂并与自身消化腺和蜂蜡腺分泌物混合产生的一种胶状固体物质。蜂胶具有多种免疫增强的作用,可辅佐疫苗激活补体功能与免疫系统,增强机体免疫效应,提高机体免疫力<sup>[7]</sup>。目前,对蜂胶佐剂研究和应用最为广泛的是中国,其次是巴西、古巴、保加利亚、俄罗斯、埃及等国家<sup>[8]</sup>。曾群辉等<sup>[9]</sup>在牦牛

ETEC 灭活疫苗的研制和免疫效力中比较了氢氧化铝胶、油佐剂、蜂胶 3 种不同佐剂肠毒素性大肠杆菌病灭活苗的免疫效果,发现在分别免疫接种家兔 7 d 后,测得蜂胶苗产生的抗体效价最高,但 3 种佐剂灭活苗均能有效保护家兔免于死亡。某些中草药,其本身就有提高免疫功能的作用,有作为佐剂的潜力,如李瑞丽等<sup>[10]</sup>的研究发现,口服一定剂量的白术能够提高经口蹄疫疫苗免疫的小鼠的体液免疫和细胞免疫,并上调 Th1/Th2 型免疫应答。而杜继红等<sup>[11]</sup>也发现,黄芪多糖粉能够提高奶牛免疫口蹄疫疫苗的免疫效果。这些都提示我们天然来源的免疫活性物质具有巨大应用空间。但是,天然来源的免疫活性物质成分比较复杂,作用机理尚不明确,这些在一定程度上限制其作为佐剂的应用。

3) CpG ODN 疫苗佐剂。CpG ODN 即非甲基化胞嘧啶和鸟嘌呤二核酸的寡核苷酸序列。CpG ODN 是一种 Toll 样受体 9(TLR9)的激活剂,能促进 Th1 免疫应答,同时可以提高疫苗的免疫原性并具有较好的安全性。2017 年 7 月,美国 FDA 批准了 HBsAg-1018 疫苗,该疫苗是使用 CpG 佐剂的乙肝病毒疫苗。这显示了 CpG 佐剂巨大的应用空间。该类佐剂在牛疫苗上的应用罕见报道。

## 2 常见牛病疫苗佐剂

### 2.1 结核杆菌病

牛结核病是一种严重威胁到人类健康和动物生产的主要人兽共患病传染病,其病原为牛结核分支杆菌,该菌宿主范围广,不但感染牛,也感染人、禽类和野生动物等<sup>[12]</sup>。目前防控该病的主要手段是检疫净化和疫苗防控。

卡介苗(bacillus calmette-guerin vaccine, BCG 疫苗)是目前仍被广泛使用且研究最多的疫苗,为控制人类及牛结核病做出了巨大贡献。但其免疫保护存在的局限性激发了研究者开发了新型疫苗的兴趣。如重组卡介苗、减毒结核分枝杆菌疫苗、亚单位疫苗、DNA 疫苗、重组活病毒载体疫苗等<sup>[12]</sup>,但這些疫苗的免疫原性仍然不足,缺少病原相关分子识别模式不能被动物机体的免疫细胞很好地识别,不足以诱导免疫应答的有效信号,往往需要添加佐剂以增强疫苗的免疫保护效应<sup>[13]</sup>。

作为佐剂中最为经典的——铝盐佐剂,在结核病疫苗开发中也受到重视。研究表明,铝盐佐剂具

有激活补体的功能,并且能提高 MHC-II 类分子和共刺激分子的表达,进而提高外周单核细胞 IL-4 的 mRNA 的转录水平以及促进 IL-1、IL-6 和 TNF 的表达。但由于铝盐佐剂只要诱导体液免疫,而结核分枝杆菌主要刺激机体产生细胞免疫,这就使得有利用铝盐佐剂开发结核疫苗的研究。如付丽丽<sup>[14]</sup>研究显示,氢氧化铝佐剂和 PolyIC 佐剂的联合使用可以诱导小鼠免疫应答,2 种佐剂物质能协同增强结核分枝杆菌抗原 Ag85b 和 EC 的细胞免疫反应和体液免疫反应。但是霍宇娟等<sup>[15]</sup>指出,铝盐佐剂可诱导 IgE 介导的超敏反应,可引起注射部位的炎症并刺激局部红斑,肉芽肿和皮下结节。

因铝盐佐剂存在不足,新型佐剂的开发就显得尤为重要。2005 年, Grode 等<sup>[16]</sup>将李斯特单核细菌分泌的膜穿孔素 (membrane-perforating listeriolysin, Hly) 与卡介苗混合使用,结果发现这可增强机体对抗结核杆菌的能力,将 Hly 基因与 BCG 整合构建的重组 BCG (recombinant BCG, rBCG) 具有比亲本 BCG 更具保护性。2011 年, Desel 等<sup>[17]</sup>证明,重组 BCG 除可诱导产生与亲本 BCG 相同的 1 型细胞因子应答外,还可诱导产生 17 型细胞因子应答,这对增强机体抵抗结核杆菌的能力是非常有意义的。但由于 Hly 具有一定的毒副作用,不能广泛应用于临床,所以若能将其改造成无毒又具有佐剂作用,将具有很广的应用前景<sup>[18]</sup>。

## 2.2 牛支原体

支原体 (Mycoplasma), 旧称霉形体, 是自然界中已知的最小、最简单的可以进行自我复制的原核微生物<sup>[19]</sup>。其中有数百种支原体可感染动物体与人体<sup>[20]</sup>, 有超过 20 种可以感染牛, 欧洲 25%~33% 的牛肺炎与牛支原体有关<sup>[21]</sup>。牛支原体可长期在牛体内存在并引起牛发生乳腺炎、角膜结膜炎、肺炎、关节炎、泌尿生殖道炎症等病, 影响牛只健康。其中丝状支原体引起的牛传染性胸膜肺炎即牛肺疫对牛影响最大。在非洲, 该病于 2014 年被世界动物卫生组织 (OIE) 列为对其养殖业影响最大的动物传染病。在我国, 每年牛支原体感染给牛业生产带来巨大经济损失, 甚至影响到牛肉和牛奶制品的销量<sup>[22]</sup>。虽然我国消灭了该病, 但于 2008 年在湖北地区又发现有牛支原体肺炎感染, 此后, 我国的贵州、宁夏、内蒙古、广西、重庆、青海、吉林、新疆等地陆续有该病的报道。因抗生素的治疗效果不佳, 研制出有效的支

原体疫苗成为了免疫防治相关疾病的关键所在。近年来在相关疫苗领域的研究主要集中在弱毒苗、灭活苗以及亚单位疫苗 3 个方面。

至今, 牛肺疫疫苗学界公认最有效的依然是 T1/44 弱毒苗, 即经过鸡胚中 44 代传代半弱毒培养弱毒苗。该苗自研发之日沿用至今已历时近 70 年。T1/44 疫苗具有多种缺陷, 如免疫周期短, 疫苗本身的稳定性较差, 免疫效价较低<sup>[23]</sup>以及运输过程要求全程冷链运输<sup>[24]</sup>等。

在灭活苗方面佐剂的使用更为重要, 早至 30 年前的包括牛支原体、殊异支原体 (Mycoplasma dispar.)、呼吸道合胞体病毒、副流感病毒三型的油乳佐剂乳化的四联灭活苗<sup>[25]</sup>, 2008 年报道了牛支原体、睡眠嗜血杆菌、化脓隐秘杆菌、多杀性巴氏杆菌 A 型、溶血性曼氏杆菌 A 型组成的以氢氧化铝和 ISA25 佐剂制备的五联灭活疫苗<sup>[26]</sup>。后来, Dudek 等<sup>[27]</sup>于 2016 年配合商业化佐剂 Emulsigen<sup>®</sup> 制备出牛支原体灭活苗, Dudek 等<sup>[27]</sup>还将皂苷与 Emulsigen<sup>®</sup> 制成混合佐剂使用。皂苷 (saponin) 广泛分布于陆地高等植物中, 许多中草药如甘草、柴胡、知母、远志、人参和桔梗等都含有皂苷<sup>[28]</sup>, 其中人参皂苷被认为与癌细胞的增生和转移的抑制以及抑制癌细胞功能有关<sup>[29]</sup>。Dudek 等<sup>[27]</sup>通过试验研究皂苷、Emulsigen 双佐剂牛支原体疫苗的免疫效应。试验使用波兰牛支原体菌株 (BankIt1801634 Mbovis KP795974) 在 Eaton 培养基中微震荡培养, 后分别将皂苷和 Emulsigen 加入制成佐剂疫苗。在经过攻毒后存活的小牛安乐死后的尸检中, 可以明显观察到注射皂苷和 Emulsigen 混合佐剂苗的小牛在上呼吸道的病原菌定殖活动 (colonization) 被明显抑制, 鼻腔排毒受抑制以及呼吸道组织损伤减少等现象。该实验证明了皂苷和 Emulsigen 双佐剂牛支原体疫苗可以有效免疫宿主及抑制动物间的传染。另外单次免疫就可引发机体长达 10 月之久的体液免疫, 并且还可以刺激引发粘膜免疫<sup>[27]</sup>。

此外, 2015 年陈颖钰<sup>[30]</sup>将湖北地区得到的临床分离株灭活处理后分别于白油佐剂、免疫刺激复合物 (Immunostimulating Complexes, ISCOM) 以及 Seppic206<sup>®</sup> 配合使用, 在牛体评价其免疫效果。其中免疫刺激复合物主要成分为酯类储存液 (0.1g 的磷脂和 0.1g 的胆固醇溶于 20% 的 Mega-10 中)、灭活菌液以及终浓度为 0.1% 的 QuilA。血清抗体检测结果

显示在免疫后第 14 天, 免疫组的抗体水平出现大幅度升高, 且之后一直处于较高水平, 3 个免疫组之间无较大差异。通过观察临床症状以及病理学观察可以看出 3 组佐剂免疫组相比对照组对牛保护作用明显, 其中白油组和 ISCOM 组观察到轻微病理变化, 免疫保护率(PE)分别为 73%和 68%, 而 Seppic 组几乎无法观察到病理变化, 免疫保护率最高, 为 100%。

### 2.3 口蹄疫

口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是偶蹄兽的、一种危害很大的、急性传染性疾病<sup>[31]</sup>。其病原有多型、易变异、对外界环境抵抗力强且易感动物品种多<sup>[32]</sup>, 不仅严重威胁人类健康, 也严重威胁我国养牛业的发展<sup>[33]</sup>。开发预防和控制口蹄疫的疫苗也成为研究的热点, 为此, 世界各国进行了探索。考虑到活毒的散毒和毒力返祖现象, 以及口蹄疫病毒毒株致弱结果和致弱时间都不能确定性、变异和亚型多样性, 1964 年欧洲口蹄疫防治委员会决定欧洲国家不用弱毒疫苗免疫, 停止了弱毒疫苗的研究<sup>[34]</sup>。而在实际应用中, 新型基因工程疫苗在临床保护效率、诱导机体产生免疫应答能力等方面仍然不如常规疫苗。因此目前世界上绝大多数国家和地区在应对口蹄疫(FMD)疫情爆发时仍然以全病毒灭活疫苗(inactivated whole virus vaccines)为主进行免疫预防或应急免疫。Dar 等<sup>[35]</sup>研究 Montanide ISA-201、ISA-206 (Seppic<sup>®</sup>, 法国)以及 GAHOL 这 3 种油佐剂对 FMD 灭活疫苗的免疫增强效应, 实验结果显示配合 Montanide ISA-201 佐剂的 FMD 灭活苗对牛体的免疫保护效应和免疫刺激效应明显提高。

研究通过改进疫苗佐剂以达到更有效的免疫保护作用, 以及减少抗原的用量。传统上常使用矿物油佐剂配合 FMD 疫苗使用, 包括弗氏不完全佐剂(IFA)<sup>[36]</sup>以及近年来在亚洲以及美洲国家广泛用到的 Montanide ISA 系列油乳佐剂(Seppic<sup>®</sup>)。尽管油乳佐剂在刺激细胞免疫方面效果显著, 但也存在诸如矿物油残留牲畜体内的肉品安全隐患, 在注射疫苗部位发生肿胀坏死等不良反应, 更有研究表明其对肝脏功能具有影响<sup>[37]</sup>。研究显示油乳佐剂中矿物油的分子结构对佐剂效果与安全性有决定性作用。短碳链型矿物油效果好但可能激发局部反应, 而长碳链更加安全但效果稍有下降<sup>[38]</sup>, 寻找碳链长度适中的高生物适应性(bio-compatible)的矿物油作为油乳剂改良的首要目标。Chen 等<sup>[39]</sup>研发构建的口蹄

疫纳米油乳佐剂以异丙基豆蔻酸酯作为油相, 以 PGPR 与 Tween 80 作为表面活性剂, 与 ISA-206 相比, 这种新型纳米油乳佐剂在与口蹄疫病毒与卵抗原两种抗原制成疫苗时具有在细胞免疫激活、特异性抗体激活、生物相容性及安全性等各方面的优势, 可以作为传统 ISA-206 矿物油基佐剂的替代产品。目前商品化的口蹄疫灭活疫苗多利用 ISA 206 佐剂, 还未见适合的乳化佐剂用于新型的口蹄疫基因工程疫苗制造, 而刘斌等<sup>[40]</sup>研究发现 SA201VG 佐剂比 ISA 206 油佐剂更适合口蹄疫基因工程疫苗生产。

除传统油佐剂外, 因细胞因子可使体内免疫活性细胞分化增殖且对机体没有明显毒副作用, 并且其对基因工程疫苗具有佐剂作用, 研究也表明 IL-2、IL-6、IL-18、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF 作为分子佐剂均能够增强疫苗的免疫效果, 且能同时提高机体的体液免疫水平和细胞免疫水平<sup>[41]</sup>。此外, 脊椎动物 DNA 中存在一种被称作 CPG 抑制的现象, 是脊椎动物免疫系统辨别自身和细菌 DNA 等外源性 DNA 并对其产生免疫应答的机制。因此 CPG-ODN (Oligodeoxy-nucleotides, 寡聚脱氧核苷酸)可用作一新型的免疫佐剂, 其免疫协调增强作用更强, 并能同时促进体液免疫和细胞免疫。如孙龙等<sup>[42]</sup>研究表明 CPG 佐剂的参与能更快地刺激机体的免疫反应并产生保护性抗体, 且在低剂量时即可发生强烈的佐剂效应<sup>[43]</sup>。刘燕瑜等<sup>[44]</sup>在 2010 年添加 Quil A 作为猪 O 型口蹄疫疫苗佐剂, 通过提高免疫后 VP1 结构蛋白抗体、细胞因子的水平及 T 淋巴细胞增殖率以提高免疫保护作用, 但目前暂时没有相关研究将 Quil A 应用于牛口蹄疫疫苗。近年来, 随着中药功效的国际认可度的不断提高, 解慧梅<sup>[45]</sup>用常用补气中药人参和黄芪的主要有效成分: 人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖为代表, 发现其均能提高小鼠及猪的口蹄疫抗体效价。徐巨<sup>[46]</sup>实验用人参皂甙 Rb1、黄芪多糖、丹参素、硫酸软骨素为代表制成复方佐剂, 溶解到口蹄疫疫苗中, 证明中药有效成分作为疫苗佐剂是可行的。此外, 将来自同源抗原编码基因的合成肽作为基因疫苗的免疫刺激佐剂也有着广阔的研究前景<sup>[47]</sup>。

## 3 展望

佐剂一直以来都是临床和基础免疫学领域研究的热点, 理想中的佐剂应该是安全、广谱、有效,

同时还便于生产和使用。尽管这些年我们对于免疫学的认知有了很大的进展,但目前使用最为广泛的佐剂依然为铝盐佐剂及其复合物。过去十几年在理解先天免疫方面的进展,使人们对了解现有佐剂如何发挥作用以及如何改善这些机制产生了更广泛的兴趣。这些研究有利于我们对新型佐剂进行研发和应用。研发更为安全、高效、廉价的新型免疫佐剂应用于动物疫苗的生产是未来的趋势,也为新型免疫佐剂用于牛病或者其他动物疫病疫苗的开发提供了更多的选择性。

(致谢:在本文写作中,赵培杰、李文康、谭旭宸具有同样贡献。)

### 参 考 文 献

- [1] AIYER H P,ASHOK K HG,GUPTA P K,et al.An overview of immunologic adjuvants –a Review[J].Vaccines vaccin,2013,4(1):1–5.
- [2] HEERLINCK J Y.Genetics adjuvants for DNA vaccines[J].Vaccine,2001,19(17):2647–2656.
- [3] SIVAKUMAR S M,SAFHI M M,KANNADASAN M,et al.Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity[J].Saudi pharm J,2011,19(4):197–206.
- [4] EXLEY C.Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by human exposure to aluminum in neurodegenerative diseases, including alzheimer’s disease[J].Front neurol,2014(5):212.
- [5] 李世芳,刘泽众,常惠芸.细胞因子佐剂研究进展[J].中国畜牧兽医,2017,44(1):296–301.
- [6] ZHANG C,WANG B,WANG M.GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease[J].Virology,2011(8):7.
- [7] 王茹,谢印乾,沈志强,等.蜂胶的免疫增强作用及其在疫苗中的应用[J].中国畜牧兽医,2007(2):93–95.
- [8] ASHRY E L,AHMAD T A.The use of propolis as vaccine’s adjuvant[J].Vaccine,2012,31(1):31–39.
- [9] 曾群辉,张冰,陈明勇,等.牦牛 ETEC 灭活疫苗的研制及免疫效力试验[J].中国预防兽医学报,2001(3):38–40.
- [10] 李瑞丽.白术、玉屏风散和增液汤的口服免疫佐剂作用研究[D].杭州:浙江大学,2009.
- [11] 杜继红,韩志帅,王海良,等.黄芪多糖粉对奶牛口蹄疫疫苗免疫效果的影响[J].中国畜牧杂志,2013,49(24):64–66.
- [12] 杜凤林,张秀玲.牛结核病疫苗研究进展[J].畜牧兽医科技信息,2016(9):7–8.
- [13] 李萍,吴利先.免疫佐剂在抗结核疫苗中的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2016,11(11):1060–1062.
- [14] 付丽丽.佐剂铝和 PolyIC 在结核亚单位疫苗中的佐剂效应[C]//中国药学会.2013 年中国药学会大会暨第十三届中国药师周论文集.北京:中国药学会,2013:359.
- [15] 霍宇娟,郑源强,崔正荣,等.铝盐佐剂的安全性思考[J].中国免疫学杂志,2019,35(6):753–759.
- [16] GRODE L,SEILER P,BAUMANN S,et al.Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Gu é rin mutants that secrete listeriolysin[J].J clin invest,2005,115(9):2472–2479.
- [17] DESEL C,DORHOI A,BANDERMANN S,et al.Recombinant BCG  $\Delta$ ureC hly+ Induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses[J].J infect dis,2011,204(10):1573–1584.
- [18] 刘春生,唐权,窦骏.佐剂在结核疫苗研制中的应用进展[J].微生物学免疫学进展,2007(4):51–54.
- [19] RICHARD L S,RONALD S G.Infectious diseases of the female genital tract[M].Lippincott Williams & Wilkins,2009.
- [20] LARSEN B,HWANG J.Mycoplasma, ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look [J].Infect dis obstet gynecol, 2010(2010):521–526.
- [21] KHAN F A,RASHEED M A,FAISAL M,et al.Proteomics analysis and its role in elucidation of functionally significant proteins in *Mycoplasma bovis*[J].Microb pathog,2017(111):50–59.
- [22] 梁文能.牛支原体病的病因分析及防治措施[J].中国畜牧兽医文摘,2015,31(4):91–98.
- [23] THIAUCOURT F,YAYA A,WESONGA H,et al.Contagious bovine pleuropneumonia.A reassessment of the efficacy of vaccines used in Africa[J].Ann N Y acad sci,2000,9(16):71–80.
- [24] RWEYEMAMU M M,LITAMOI J,PALYA V,et al.Contagious bovine pleuropneumonia vaccines: the need for improvements[J].Rev sci tech,1995,14(3):593–601.
- [25] HOWARD C J,STOTT E J,THOMAS L H,et al.Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parainfluenza type 3 virus, *Mycoplasma bovis* and *M. dispa*[J].Vet rec,1987,121(16):372–376.
- [26] CHO Y S,LEE H S,LIM S K,et al.Safety and efficacy testing of a novel multivalent bovine bacterial respiratory vaccine composed of five bacterins and two immunogens [J].J vet med sci, 2008,70(9):959–964.
- [27] DUDEK K,BEDNAREK D,AYLING R D,et al.An experimental vaccine composed of two adjuvants gives protection against mycoplasma bovis in calves[J].Vaccine,2016,34(27):3051–3058.
- [28] XU R,ZHAO W,XU J,et al.Studies on bioactive saponins from Chinese medicinal plants [J].Adv exp med biol,1996(404): 371–382.
- [29] GILLIS C N.Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link? [J].Biochem pharmacol,1997,54(1):1–8.
- [30] 陈颖钰.不同佐剂对牛支原体灭活疫苗的牛体评价[C]//中国畜牧业协会.第十届(2015)中国牛业发展大会论文汇编.北京:中国畜牧业协会,2015:349–355.
- [31] 龚团莲,孙立杰,毛景东,等.口蹄疫研究概述[J].内蒙古民族大