·论　　著·

抗类鼻疽伯克霍尔德菌多抗血清的制备及评价

方　瑶，顾　江，王海光，于　波，毛旭虎
（第三军医大学临床微生物与免疫学教研室，重庆 400038）

摘　要：目的　制备抗类鼻疽伯克霍尔德菌（Burkholderia pseudoamllei，其抗原简写为 BP）多抗血清，评价不同处理方式对抗原免疫原性的影响。**方法**　采用超声破碎、甲醛灭活、热灭活 3 种方式处理细菌抗原接种新西兰兔和 BALB/C 小鼠，检测不同抗原免疫动物抗血清的 ELISA 效价及凝集试验效价。**结果**　(1)ELISA 方案最佳条件：二抗稀释度为 1/8 000，抗原包被浓度为 4 μg/mL 或 8 μg/mL；凝集反应最佳条件：细菌浓度为 6×10^9 CFU/mL、凝集温度为 37 ℃、观察时刻为 4 h。(2)超声破碎抗原（U-BP）免疫新西兰兔和小鼠的抗血清 ELISA 效价高达 1/64 000，最高血清凝集效价分别为 1/32 和 1/64，甲醛灭活抗原（F-BP）抗血清 ELISA 效价高达 1/16 000，凝集效价为 1/128 和 1/64；热灭活抗原（H-BP）抗血清 ELISA 效价达 1/8 000，凝集效价为 1/16 和 1/64。(3)F-BP 和 H-BP 具有较强的免疫原性，U-BP 在小鼠中的免疫原性较弱（$P<0.05$）。**结论**　建立了抗类鼻疽伯克霍尔德杆菌多克隆抗体的检测方法，制备了高效价的抗类鼻疽伯克霍尔德杆菌多抗血清；甲醛灭活和热灭活细菌具有较好的免疫原性，为下一步类鼻疽伯克霍尔德杆菌的致病机制研究和疫苗研发打下了基础。

关键词：类鼻疽伯克霍尔德菌，类鼻疽；　灭活方式；　多抗血清
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.017　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)03-0292-03

Preparation and evaluation of multi-antibody serum of Burkholderia pseudomallei

Fang Yao, *Gu Jiang*, *Wang Haiguang*, *Yu Bo*, *Mao Xuhu*
(*Teaching and Research Section of Clinical Microbiology and Immunology*, *Third Military Medical University*, *Chongqing* 400038, *China*)

Abstract: Objective　To prepare multi-antibody of Burkholderia pseudomallei (B. pseudomallei) and evaluate the immunogenicity of antigens under different inactivation treatments. **Methods**　Bacterial antigen was inactivated by three different methods, including ultrasound cracking, formaldehyde inactivation and heat inactivation, and inoculated into New-Zealand rabbits and BALB/C mice, followed by quality and specificity evaluation by ELISA and agglutination test. **Results**　1. The optimized condition of ELISA was 1:8000 of the dilution of secondary antibodies, 4 or 8μg/mL of the concentration of coating antigen. The optimized condition of agglutination test was 6×10^9 cfu/mL of bacteria density, 37 ℃ of reaction temperature, and 4 h for observation. 2. ELISA titer of serum from rabbits and mice inoculated by ultrasound-cracked bacteria antigen (U-BP) was up to 1/64 000, with top agglutination test titers of 1/32 and 1/64 respectively. ELISA titer of serum from rabbits and mice, inoculated by formaldehyde-inactivated bacteria antigen (F-BP) was 1/16 000, with top agglutination test titers of 1/128 and 1/64 respectively. For heat-inactivated bacteria antigen (H-BP), ELISA titer was up to 1/8 000, with agglutination test titers of 1/16 and 1/64 respectively. 3. The immunogenicity of H-BP and F-BP antigen was strong, but that of U-BP antigen was weak in mice ($P<0.05$). **Conclusion**　Detection method of polyclone antibody against B. pseudomallei was established and polyclonal antiserum of B. pseudomallei with high titer was prepared. H-BP and F-BP antigen might have stronger immunogenicity, which set substantial basis for future study on B. pseudomallei.

Key words: *burkholderia pseudomallei*;　inactivation antigen;　polyclonal antisera

类鼻疽杆菌，学名类鼻疽伯克霍尔德菌（Burkholderia pseudomallei，抗原简写为 BP），于 1912 年被 Whitmori 和 Krishnaswami 首次分离。类鼻疽杆菌为两端钝圆、两极浓染、无芽孢、有鞭毛和菌毛的革兰阴性杆菌。该细菌主要寄生于土壤和水环境中[1]，恶劣环境下能形成休眠体[2]。细菌通过吸入、黏膜感染、摄入等方式感染机体，初期会出现发烧、寒颤、咳嗽、呼吸不畅等类似普通感冒的症状。一旦病原体侵入肺部，可能造成难治性肺炎、肺部空洞，并快速地造成败血症而死亡，还能导致脑炎、前列腺及肝脾等内脏的脓肿[3]。高耐药、易复发、无有效的治疗手段，致使类鼻疽的临床死亡率高达 40%[4-5]。

类鼻疽杆菌的感染属典型的热带疾病，国内类鼻疽杆菌流行区域主要集中在海南、台湾、广东、福建等地[6-7]。鉴于类鼻疽杆菌的强致病性，加之其易培养、耐药性强，WHO 已将其列为 B 类生物恐怖剂，也已成为严重威胁人民健康的重要致病菌。所以，阐明类鼻疽杆菌的致病机制研究，在类鼻疽杆菌感染的治疗和防控等方面具有重要的意义。

抗血清是研究细菌的重要工具，在细菌的致病机制研究、疫苗研发、治疗性抗体研制等方面发挥重要作用[8-9]。其可用于鉴定重组抗原蛋白的免疫反应性、发现新的治疗靶点、辅助评价单克隆抗体效能等。本文的主要目的是制备抗类鼻疽杆菌多抗血清。用超声、甲醛、高温 3 种方式处理 BP 抗原，进而免疫新西兰和 BALB/C 小鼠，同时建立 BP 多抗血清的检测方法，检测多抗血清的效价[10-11]，比较 3 种不同处理方式对类鼻

疽杆菌免疫原性的影响。

1　材料及方法

1.1　实验材料　成年雌性新西兰兔(体重 2kg),购自第三军医大学实验动物中心;雌性 6 周龄 BALB/C 小鼠,购自第三军医大学试验动物中心;类鼻疽杆菌菌株来自海南省三亚市第一人民医院检验科临床分离标本(经鉴定为类鼻疽伯克霍尔德菌)。

1.2　试剂及仪器　可溶型单组分 TMB(3,3′,5,5′-四甲基联苯胺二盐酸)底物溶液(北京天根公司),BCA protein assay(英国 Thermo 公司),HRP 标记的羊抗新西兰兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗人 IgG(均为进口分装,北京中杉金桥),JY92-Ⅱ超声细胞破碎仪(宁波新芝科研究所),洗板机(美国 bio-rad 公司),酶标仪(美国 bio-rad 公司)。

1.3　方法

1.3.1　细菌的培养　挑取单克隆接种至普通 Luria-Bertani 培养基中,37 ℃培养 5 h,吸光度(OD 值)为 0.8 时收集菌体(离心半径 8 cm,6 000 r/min,4 ℃离心 10 min)。

1.3.2　菌体处理　(1)超声灭活菌体的制备:菌液超声后用终浓度为 0.5%的甲醛处理 24 h,6 000 r/min,4 ℃,离心 10 min,弃沉淀。超滤去除甲醛,BCA 法测蛋白浓度,样品标记为 U-BP。(2)甲醛灭活菌体的制备:OD 值为 0.8 时稀释度(此时细菌浓度约为 1.5×10^9 cfu/mL)的菌液中加入终浓度为 0.5%的甲醛,25 ℃处理 48 h 后 1 000 r/min,4 ℃,离心 5 min,去除甲醛,标记为 F-BP。(3)热灭活菌体的制备[12]:集菌方法同前,沸水浴 15 min,标记为 H-BP。(接种于普通平板上,37 ℃培养 24 h 验证超声破菌是否完全)

1.3.3　免疫动物　按照随机数法将新西兰兔随机分成 4 组,每组 3 只;BALB/C 小鼠随机分成 4 组,每组 6 只;各随机取 1 组作为阴性对照。分别用 U-BP、F-BP、H-BP、生理盐水免疫 3 次。超声灭活抗原免疫动物:免疫原浓度为 0.5 mg/mL,新西兰兔注射点于四肢皮下淋巴结及颈背部皮下,剂量为 0.3 mL/点,共 1.5 mL;BALB/C 小鼠注射点于四肢皮下淋巴结及腹腔,剂量为 0.1 mL/点,共 0.5 mL;第 1 次免疫后 20、27 d 进行第 2、3 次免疫。甲醛灭活抗原免疫动物:兔耳缘静脉注射,剂量为 0.5 mL/只;BALB/C 小鼠尾静脉注射,剂量为 0.1 mL/只;同上进行 2 次加强免疫。热灭活抗原免疫方案同甲醛灭活抗原。

1.3.4　动物采血[13]。

1.3.5　ELISA 试验条件的优化　包被抗原浓度和二抗(羊抗小鼠/羊抗新西兰兔)稀释度的条件优化:U-BP 包被抗原稀释度依次为 2、4、8 μg/mL;二抗稀释度依次为 1/1 000、1/2 000/1/5 000、1/8 000。包被抗原 4 ℃,过夜;1%BSA,37 ℃,4 h;洗板机洗板 4 次后加多抗血清,37 ℃,30 min;洗板 4 次后加二抗(羊抗新西兰兔 IgG/羊抗小鼠 IgG),37 ℃,30 min;洗板 4 次;TMB 显色剂显色 10 min;加终止液(2 mmol/L H_2SO_4),450 nm 测 OD 值。

1.3.6　检测多抗血清的 ELISA 效价(以大于阴性对照 OD 值的 2 倍作为阳性-PI>2.0)。

1.3.7　凝集试验条件的优化　反应最佳抗原浓度、温度和观察时间。凝集判断标准:"++++"表示完全凝集,凝块全部平铺于孔底,有卷边,液体澄清;"+++"表示大部分凝集,凝块平铺于孔底,可有卷边,液体几乎完全透明;"++"表示部分凝集,凝块平铺于孔底,液体稍微浑浊;"+"表示少部分凝集,液体浑浊;"−"表示不凝集,细菌沉淀于孔底成一圆点,液体浑浊,与对照孔相似。凝集呈"++"的最高血清稀释度即为该血清的凝集效价。U 型细胞培养板横排做抗血清的稀释度(空白,阴性对照,1,1/2…1/512),纵排做抗原稀释度,于不同时刻(1、2、3、4、6、8 h)观察凝集现象。

1.3.8　比较类鼻疽伯克霍尔德菌活菌与不同多抗间的凝集效果。

1.4　统计学处理　所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,$P<0.05$ 有统计学意义;图表采用 Origin8.0 作图软件进行处理。

2　结　果

2.1　ELISA 的条件优化　经方阵滴定试验,在直接 ELISA 法中,根据不同倍数稀释度的多抗血清吸光度,取 OD_{450} 为 1.0～1.5,得出包被 U-BP 抗原的最适浓度为 4 或 8 μg/mL,羊抗兔/羊抗鼠酶标二抗稀释比为 1∶8 000。凝集试验条件优化:ELISA 吸附板上横排做 F-BP 抗原稀释度,纵列做多抗血清(随机抽取 ELISA 效价较高的鼠源 F-BP 免疫得到的多抗血清)的稀释度后得出,当 F-BP 抗原做 1/8 稀释(细菌数约为6×10^9 cfu/mL)时,抗血清与 F-BP 抗原的凝集效果在反应后 4 h 能达到最稳定的凝集效果,时间过长(超过 12 h)会因为水分蒸发不利于凝集现象的观察,同时多抗血清稀释比大于 1∶256 后凝集现象也不明显。综上,凝集试验的最佳抗原浓度为 6×10^9 cfu/mL,最佳观察时刻在反应后 4 h,多抗血清的稀释比控制在 1∶512 以下。

2.2　抗血清 ELISA 检测结果　新西兰兔 U-BP 抗原免疫得到的多抗血清效价均可达 1/64 000,F-BP 免疫的抗血清效价均为 1/16 000,且两种抗血清的效价无变异。H-BP 免疫的抗血清效价最高为 1/8 000,最低为 1/4 000(log10 值:3.75±0.21,如图 1 所示)。BALB/C 小鼠 U-BP 抗血清效价最高为 1/64 000,最低为 1/16 000(log10 值:4.40±0.35);F-BP 抗血清效价最高为 1/16 000,最低为 1/2 000(log10 值:3.9±0.52);H-BP 抗血清效价最高为 1/2 000,最低为 1/1 000(log10 值:3.10±0.17)。统计分析,U-BP 抗原和 F-BP 抗原的免疫原性较好($P<0.05$),而且小鼠来源的抗类鼻疽杆菌多抗血清的效价 ELISA 检测稳定性不如新西兰兔。

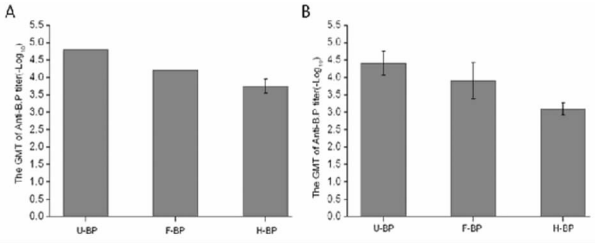

图 1　抗血清 ELISA 效价检测。A. 新西兰兔。BALB/C 小鼠。$P<0.05$

2.3　多抗血清与 F-BP 抗原凝集试验结果　新西兰兔 U-BP 免疫的抗血清效价最高为 1/32,最低为 1/16(log2 值:4.5±0.7);F-BP 效价最高为 1/64,最低为 1/32(log2 值:5.5±0.7);H-BP 效价最高为 1/16,最低为 1/2(log2 值:2.5±2.1)。

BALB/C 小鼠 U-BP 抗血清效价均为 1/64，F-BP 抗血清效价均为 1/128，H-BP 抗血清效价最高为 1/64，最低为 1/16(log2 值：5±1)。统计分析，U-BP 抗原和 F-BP 抗原的免疫原性较好($P<0.05$)，而且 H-BP 抗原免疫动物后抗血清的凝集效价在试验对象之间的波动较大，而且小鼠来源的抗类鼻疽杆菌多抗血清的凝集效价稳定性也不如新西兰兔。

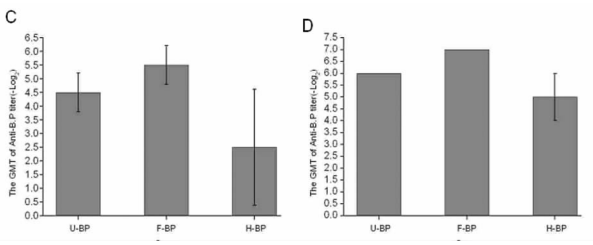

图 2　抗血清凝集试验效价检测，C. BALB/C 小鼠。D. 新西兰兔。$P<0.05$

2.4　新西兰兔、BALB/C 小鼠抗血清与类鼻疽活菌凝集试验　以 alive-BP(类鼻疽杆菌活菌)作为凝集抗原与新西兰兔和 BALB/C 小鼠多抗血清进行凝集试验，新西兰兔 U-BP 免疫的抗血清效价均高达 1/256，F-BP 效价也均为 1/256，H-BP 效价最低为最高为 1/256，1/128(log2 值：7.5±0.7)。BALB/C 小鼠 U-BP 免疫的抗血清效价均为 1/64，F-BP 效价最高为 1/128，最低为 1/64(log2 值：7.0±1.0)；H-BP 效价最高为 1/128，最低为 1/64(log2 值：7.7±1.5)。统计分析，新西兰兔的 3 种抗原免疫后的多抗血清凝集效价之间差异不显著，BALB/C 小鼠 F-BP 和 H-BP 免疫的抗血清效价之间差异不显著($P>0.05$)，但是前两者免疫的抗血清与 U-BP 免疫的抗血清凝集效价之间差异显著($P<0.05$)。提示 F-BP 和 H-BP 抗原的免疫原性要强于 U-BP 抗原。

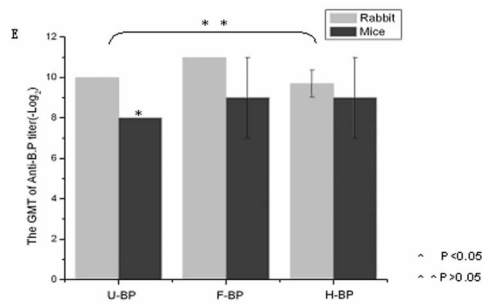

图 3　抗血清凝集试验效价检测，C. BALB/cC 鼠。D. 新西兰兔。$P<0.05$

3　讨　论

类鼻疽是由类鼻疽杆菌感染引起的一种新发传染病，正在全球热带、亚热带范围扩散。中国邻邦泰国、印度、缅甸、越南、菲律宾、马来西亚、文莱都是类鼻疽高发地。现今中国南海局势紧张，南海安全日益重要，类鼻疽这一具有生物威胁的病原体的研究和生物防护的军事意义也就显得尤为重要。反观国内，海南作为类鼻疽的高发地，已经出现多例病例，呈现很高的死亡率(40%以上)。作为一种能耐受恶劣环境[14]、具有广泛自然宿主的土壤菌，类鼻疽杆菌的环境微生态遭到极端气候影响和人为破坏，进而促使疾病的播散和流行[15]。正是在这一形势下本室着手开展类鼻疽杆菌的研究。抗类鼻疽杆菌动物多抗血清的制备正是开展病原研究的基础工作，本室制备的多抗血清具有较高的效价，能够用于后续的实验。

总体来看，新西兰兔多抗的 ELISA 效价和凝集效价要高于小鼠，这从 ELISA 试验结果可以看出，但是本实验并没有将两种动物来源的抗血清做比较，因为种系不同、免疫的方式、抗原剂量都不相同，两者的比较没有意义。从试验数据来看，H-BP 免疫的多抗血清的 ELISA 效价和凝集效价在实验对象之间的均一性不好，这可能与 H-BP 抗原的制备方式有关，也可能与实验者的操作有关。U-BP 和 F-BP 抗原免疫动物多抗血清之间的效价比较也很复杂，这两种抗原的物理性状、注射方式都不同，产生的免疫应答不仅与抗原的免疫原性，还与操作者的实施、注射剂量、抗原的吸收等有关系。从抗体的亲和力来看，小鼠抗血清与抗原的凝集效果总体上要好于新西兰兔抗血清。这与新西兰兔多抗血清效 ELISA 检测效价较小鼠高并不矛盾，因为新西兰兔接触的抗原较多，在土壤中存在与类鼻疽杆菌有交叉反应的其他土壤菌(如鼻疽伯克霍尔德杆菌，非致病性的霍尔德杆菌属细菌，结核分枝杆菌等)。ELISA 试验的敏感性很高，但是缺乏鉴别有交叉反应的病原体的免疫应答的特异性。相反，小鼠虽然效价有限，但是清洁级小鼠接触的抗原有限，特异性的免疫应答更强。

进一步的活菌凝集试验的结果的比较分析得出 H-BP 和 F-BP 抗原的免疫原性要强于 U-BP($P<0.05$)，而 3 种抗原免疫新西兰兔的结果显示免疫原性差异不显著($P>0.05$)。在后续试验中拟通过与多样本的临床患者血清做对比分析来进一步评估本试验制备的动物多抗血清的可用性和特异性。

参考文献

[1] Yordpratum U, Tattawasart U, Wongratanacheewin S, et al. Novel lytic bacteriophages from soil that lyse Burkholderia pseudomallei[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 314(1): 81-88.

[2] Chua KH, See KH, Thong KL, et al. SpeI Restriction Enzyme Displays Greater Discriminatory Power than XbaI Enzyme Does in a Pulsed-Field Gel Electrophoresis Study on 146 Clinical Burkholderia pseudomallei Isolates[J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(3): 228-233.

[3] Pandey V, Rao SP, Rao S, et al., Burkholderia pseudomallei musculoskeletal infections (melioidosis) in India[J]. Indian J Orthop, 2010, 44(2): 216-220.

[4] Sam IC, See KH, Puthucheary SD. Susceptibility of Burkholderia pseudomallei to tigecycline and other antimicrobials[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 67(3): 308-309.

[5] Hamad MA, Austin CR, Stewart AL, et al. Adaptation and antibiotic tolerance of anaerobic burkholderia pseudomallei[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(7): 3313-23.

[6] Chen YS, Lin HH, Mu JJ, et al. Distribution of melioidosis cases and viable Burkholderia pseudomallei in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1432-1434.

[7] Ma G, Zheng D, Cai Q, et al. Prevalence of Burkholderia pseudomallei in Guangxi, China[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(1): 37-39.

[8] Norville IH, O'Shea K, Sarkar-Tyson M, et al. The structure of a Burkholderia pseudomallei immunophilin-inhibitor complex reveals new approaches to antimicrobial development[J]. Biochem J, 2011, 437(3): 413-422

(下转第 296 页)

表 2　SLE 组与健康对照组血清免疫球蛋白及补体结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IgG	IgA	IgM	C3	C4
SLE 组	64	17.07±4.86*	3.21±1.52*	2.33±1.21*	0.55±0.22*	0.18±0.09*
健康组	53	11.65±3.09	1.77±0.68	1.45±0.51	1.15±0.34	0.35±0.10

*：$P<0.05$，表示与健康组对照差别具有统计学意义。

3　讨　论

清蛋白是由肝实质细胞合成，是血浆中含量最多的蛋白质，占血浆总蛋白的 57%～68%。本次试验中，SLE 组比健康组低，可能因为 SLE 是一种慢性疾病，病程较长，患者与疾病的抗争过程中引起清蛋白的消耗，而 SLE 又是一种多器官侵犯的疾病，在造成患者的肝肾脏器损害时会引起肝脏对清蛋白的合成不足或从尿中丢失使得 Alb 减少。α1-球蛋白的主要成分有 α1-抗胰蛋白酶(AAT)、α1-酸性糖蛋白、甲胎蛋白、高密度脂蛋白，其中 AAT、α1-酸性糖蛋白作为急性时相蛋白，在炎症、感染、肝病时均显著增加。在 SLE 中，α1-球蛋白在一定程度的增加，可能存在炎症、感染以及肝损伤。α2-球蛋白中包含触珠蛋白、α2-巨球蛋白、血浆铜蓝蛋白，其中 α2-巨球蛋白占血浆总蛋白的 8%～10%。在肾脏出现损伤时，尤其是肾病综合征，α2-巨球蛋白含量会显著增高。在本次试验中，α2-球蛋白增高可能与部分患者存在肾脏损害有关。存在于 β-球蛋白中的是 C3、C4、β2-微球蛋白、纤维蛋白原。其中 C3、C4 在 SLE 中会因为疾病活跃期被大量消耗，其明显减低，与健康组有明显差异，与有关文献一致[1]。补体对疾病的诊断和病情活动的判断都有很大帮助，SLE 患者经过治疗后血清中原来含量降低的补体逐步恢复正常，这说明该治疗是有效的；反之，如补体含量持续下降，则说明病情活动加重[2]。而 SLE 患者在出现肾病改变时，β2-微球蛋白往往增高，两组的 β-球蛋白值没有显著差异。γ-球蛋白主要是免疫球蛋白，包括 IgG、IgA、IgM、C-反应蛋白(CRP)。SLE 是具有代表性的典型的自身免疫性疾病，机体免疫功能紊乱，出现多种自身抗体[3]，故血清中免疫球蛋白 G、A、M 含量均高于健康对照组，IgG 表现更为明显，与相关文献一致[4-6]，但也有作者报道 IgA、IgM 在疾病的不同阶段，有不同的变化，病程的延长使 IgM 有下降的趋势[7]。CRP 是急性时相反应蛋白之一，在 SLE 并发感染时升高，但其特异性较差，不能作为 SLE 活动的指标之一[8]。免疫球蛋白含量的波动与 SLE 的病情活动存在一定的相关性[1]。

因为血清蛋白电泳成分无特异性，所以无法作为 SLE 确诊指标之一，但是可以通过对血清蛋白电泳的检测一定程度上对 SLE 病程的发展进行监控。免疫球蛋白、补体的联合检测，对 SLE 的诊断治疗具有一定的临床参考意义[7]。

参考文献

[1] 巫翠云，邱梅花. 多种抗核抗体、免疫球蛋白、补体联合检测对 SLE 的临床意义[J]. 海南医学，2005，16(11)：111.

[2] 李丽. 实验室检查辅助诊断 SLE 的意义[J]. 当代医学，2009，15(173)：24.

[3] 陈红清. 混合性结缔组织病：是不是一种独立疾病[J]. 国外医学：皮肤性病学分册，1999，25(5)：294.

[4] 郭小兵，王豹，刘红春. SLE 患者血清免疫球蛋白及补体 C3 含量检测[J]. 河南职工医学院学报，2007(19)，481-482.

[5] 龚晓彬，姚海林，贺爱民. SLE 患者自身抗体、免疫球蛋白、补体检测分析[J]. 江西医学检验，2006，24(增刊)：597-598.

[6] Ho A，Ban SG，Magder LS，et al. A decrease in complement is a88ociated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum，2001，44(10)：2350-2357.

[7] 胡大雁，邓丹琪，张佩莲，等. SLE 患者血清 C3、C4 及免疫球蛋白水平与疾病活动性的关系[J]. 皮肤病与性病，2009，1(31)：8.

[8] 龙武彬，朱静. SLE 患者 4 种炎症指标检测的临床意义[J]. 西部医学，2009，21(7)：1103-1104，1107.

(收稿日期：2011-10-09)

(上接第 294 页)

[9] Kim HY，Tsai S，Lo SC，et al. Production and characterization of chimeric monoclonal antibodies against burkholderia pseudomallei and B. mallei using the DHFR expression system[J]. PLoS One，2011，6(5)：e19867.

[10] Harris PN，Williams NL，Morris JL，et al. Evidence of Burkholderia pseudomallei specific immunity in persistently indirect hemagglutination assay non-reactive patients[J]. Clin Vaccine Immunol，2011，18(8)：1288-1291.

[11] Peacock SJ，Cheng AC，Currie BJ，et al. The Use of Positive Serological Tests as Evidence of Exposure to Burkholderia pseudomallei[J]. Am J Trop Med Hyg，2010，84(6)：1021-1022.

[12] Whitlock GC，Lukaszewski RA，Judy BM，et al. Host immunity in the protective response to vaccination with heat-killed Burkholderia mallei[J]. BMC Immunol，2008，9(1)：55.

[13] 钟丹，易维京，李淑慧，等. 1 种改良的高效单特异性兔多克隆抗体的制备方法[J]. 国际检验医学杂志，2010，31(4)：315-317.

[14] Mima T，HP Schweizer，ZQ Xu. In vitro activity of cethromycin against Burkholderia pseudomallei and investigation of mechanism of resistance[J]. J Antimicrob Chemother，2010，66(1)：73-78.

[15] Wiersinga WJ，T van der Poll. Burkholderia pseudomallei tropism and the melioidosis road map[J]. J Infect Dis，2009，199(12)：1720-1722.

(收稿日期：2011-10-09)