

Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза

В.И.Дятлова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск, Российская Федерация

Бруцеллез остается актуальной проблемой для отечественной ветеринарии и медицины. Это заболевание наносит не только экономический ущерб, обусловленный нарушением репродуктивных функций или гибелью сельскохозяйственных животных, но и приводит к инвалидизации больных людей. Одной из причин распространения бруцеллеза среди животных и заражения от них человека является отсутствие эффективной, безопасной вакцины, обеспечивающей длительную защиту от инфекции. В последние годы в связи с развитием генной инженерии в практику внедряются новые методы производства вакцин. Современные направления в разработке противобруцеллезных вакцин включают создание живых генномодифицированных и векторных вакцин, а также бесклеточных субъединичных и ДНК-вакцин на основе иммунодоминантных антигенов бруцелл. В статье обобщены последние достижения в разработке противобруцеллезных вакцин и оценены перспективы их широкого применения.

Ключевые слова: *Brucella, бруцеллез, антигены, векторные вакцины, ДНК-вакцины, генетически модифицированные вакцины, живые вакцины, субъединичные вакцины*

Для цитирования: Дятлова В.И. Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2019; 4(4): 29–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41

Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines

V.I.Dyatlova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Brucellosis is still a key issue for the national veterinary medicine and public health systems. The disease is responsible not only for economic loss due to reproductive disorders or death of farm animals, but also for disability of sick people. One of the reasons for the spread of brucellosis among animals and associated human infection is the lack of an effective safe vaccine providing long-term protection against the infection. In last years, new vaccine production methods have been put into practice owing to progressing genetic engineering. Current trends in the development of anti-brucellosis vaccines rely on designing live genetically modified and vector-based vaccines, as well as acellular subunit and DNA vaccines based on immunodominant brucella antigens. The article covers the latest advances in designing anti-brucellosis vaccines, and prospects for their wide application.

Keywords: *Brucella, brucellosis, antigens, vector vaccines, DNA vaccines, genetically modified vaccines, live vaccines, and subunit vaccines*

For citation: Dyatlova V.I. Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines. Bacteriology. 2019; 4(4): 29–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41

Бруцеллез является зоонозным заболеванием, которое распространено более чем в 170 странах мира, в том числе и в России. Оно поражает около 60 видов диких животных, создавая резервуары в природе, практически всех домашних животных, нанося значительный экономический ущерб в сельском хозяйстве, а также приводит к хронизации инфекции и инвалидизации зараженных им людей.

Неблагополучная эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации по бруцеллезу людей сохраняется в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах [1]. Одной из причин распространения бруцеллеза среди животных и заражения от них человека является отсутствие эффективной, безопасной вакцины, обеспечивающей длительную защиту от инфекции. Особенно востре-

Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: varya_dyatlova@mail.ru

Статья поступила 06.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, researcher, department of immunobiology of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: varya_dyatlova@mail.ru

The article was received 06.11.2019, accepted for publication 20.12.2019

бована в настоящее время вакцина против бруцеллеза для иммунизации людей. За рубежом до сих пор не существует соответствующей лицензированной вакцины.

Живые противобруцеллезные вакцины

Применяемая в нашей стране живая аттенуированная вакцина, приготовляемая из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 VA, имеет обширный список противопоказаний и побочных эффектов – от постпрививочных местных и общих реакций организма вплоть до развития бруцеллеза. Эта вакцина применяется только у людей старше 18 лет и не ранее чем за месяц до начала работы, связанной с риском заражения *Brucella*. Вакцинацию *B. abortus* 19 VA запрещено проводить беременным и кормящим женщинам, при ряде заболеваний, после лечения некоторыми лекарственными препаратами, а также лицам, переболевшим ранее бруцеллезом или имеющим положительные серологические реакции на бруцеллез. В связи с описанными недостатками применение данной вакцины ограничено использованием ее у животных, ветеринаров, зоотехников, работников мясоперерабатывающих предприятий и бактериологических лабораторий при риске заражения бруцеллезом козье-овечьего вида, вызываемого *B. melitensis*. Это обусловлено тяжелым течением данной формы заболевания [2].

Наиболее распространенные в мире живые вакцины против бруцеллеза для животных (*B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev1) запрещены к применению у людей, так как они могут снова приобрести вирулентность и вызывать заболевание. Вакцинный штамм *B. abortus* S19 применяют для крупного рогатого скота до 8-месячного возраста, так как у взрослых животных его использование может привести к развитию хронической инфекции, сопровождающейся бесплодием, абортными, а также выделением возбудителя с молоком. Кроме того, контакт человека с данными препаратами во время проведения вакцинации животных также представляет угрозу его заражения [3, 4]. Одним из недостатков вакцин *B. abortus* RB51 и *B. melitensis* Rev1 является их антибиотикорезистентность к рифампицину и стрептомицину, которые являются препаратами выбора при лечении бруцеллеза. Вместе с тем применение данных вакцин создает риск передачи генов устойчивости к данным антибиотикам дикому штамму бруцелл [5]. При введении в организм вакцинных штаммов *Brucella* с гладким типом колоний (в S-форме), таких как *B. abortus* S19 и *B. melitensis* Rev1, формируется антительный ответ на О-полисахарид (ОПС) липополисахарида (ЛПС) их клеточных стенок. Следовательно, серодиагностика бруцеллеза, основанная на выявлении диагностического титра анти-ЛПС антител в дальнейшем будет неинформативна. Эти вакцины имеют отрицательный показатель способности к дифференцированию вакцинированных и инфицированных животных (differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA)). Данный показатель рассматривается современными исследователями в качестве важного критерия пригодности разрабатываемых вакцин [5].

Кроме отсутствия стимулирования продукции антител, затрудняющих серодиагностику при выявлении зараженных животных, по мнению J.Ко, E.M.Dorneles и других авторов, «идеальная» вакцина против бруцеллеза должна содержать

живые бактерии, способные генерировать мощный Th1-клеточный ответ в организме хозяина; вызывать длительный протективный эффект после введения единичной дозы вакцины без побочных эффектов; содержать аттенуированные штаммы *Brucella*, не вызывающие заболевание или персистирующую инфекцию у животных; быть стабильной и не реверсировать в вирулентную форму ни *in vivo*, ни *in vitro*; не приводить к сероконверсии при ревакцинации; быть безопасной для людей при случайном заражении при введении вакцины животным; доступной для массового применения, простой в производстве и использовании [6, 7].

Несмотря на все недостатки живых противобруцеллезных вакцин, такие их преимущества, как возможность обеспечения длительной протекции организма против инфекции в сочетании с развитием полноценного иммунного ответа, позволяют рассматривать их в качестве кандидатов для будущих вакцин.

Генетически модифицированные живые вакцины против бруцеллеза

Проблемы остаточной вирулентности и затруднения серодиагностики, связанные с применением живых вакцин, могут быть решены с помощью генно-инженерных методов. В последние годы было разработано и протестировано на модельных животных множество вариантов вакцин на основе генномодифицированных мутантных штаммов бруцелл (таблица).

Все известные на сегодняшний день 12 видов бруцелл имеют близкое генетическое родство (монофилетический род), демонстрируя сходство от 98 до 99% в большинстве кодирующих последовательностей [8]. Однако, несмотря на высокую генетическую гомологию, виды существенно различаются по фенотипическим характеристикам, специфичности хозяина и патогенности [9, 10]. Заболевание у человека вызывают преимущественно *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* и редко *B. canis*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*. Кроме того, относительно недавно из раневого отделяемого грудного импланта у человека был выделен вид *B. inopinata*, который может вызывать бруцеллез [11]. Все виды *Brucella*, кроме *B. canis* и *B. ovis*, имеют гладкий (S) фенотип бактерий. Мутации в генах бруцелл (*per*, *pgm*, *manB*, *wboA*, *wbkA* и др.), участвующие в биосинтезе ОПС ЛПС, могут приводить к формированию шероховатого типа колоний (R-фенотипа) и ослаблению их вирулентности. Усилия исследователей при создании вакцин направлены прежде всего на создание аттенуированных штаммов *Brucella* в R-форме. Многие разработанные вакцины R-типа являются спонтанными мутантами, отобранными после повторного пассажа на среде, содержащей антибиотики. Однако в настоящее время их получают преимущественно с помощью методов генной инженерии [12].

Геном вакцинного штамма *B. abortus* S19 включает 720 нуклеотидных делеций в *egu*-опероне, что обуславливает аттенуацию штамма, но сохранение синтеза ОПС и, следовательно, возникновение связанных с ним побочных эффектов, таких как аборты у животных, вирулентность для людей и затруднение диагностики из-за персистенции анти-ОПС антител [13]. В работе Z.Wang удаление гена *wboA* в геноме *B. abortus* S19 привело к образованию

Таблица. Сравнение противобруцеллезных вакцин	
Тип вакцины	Свойства вакцин
Живые аттенуированные вакцины	<i>B. abortus</i> RB51: шероховатый фенотип (не индуцирует синтез антител к ЛПС и дифференцирует инфицированных от вакцинированных животных (DIVA)), стабильный, менее вирулентный, чем S19, низкий уровень аборт, различный уровень защиты, вирулентный для человека, резистентный к рифампицину. <i>B. abortus</i> S19: гладкий фенотип (интерференция с диагностическим тестом), остаточная вирулентность, вызывает прерывание беременности, снижение продукции молока, высокий уровень защиты, вирулентный для человека. <i>B. melitensis</i> Rev1: гладкий фенотип (интерференция с диагностическим тестом), остаточная вирулентность, резистентный к стрептомицину
Генетически модифицированные живые вакцины <i>B. abortus</i>	Защита, аналогичная классическим живым аттенуированным вакцинам. Δ norD или Δ znuA <i>B. abortus</i> : достаточная аттенуация, повышенный Т-клеточный ответ. Δ pgm <i>B. abortus</i> : шероховатый фенотип, DIVA, иммунитет Th1-типа, подобный S19. Δ GntR <i>B. abortus</i> : достаточная аттенуация, высокий уровень защиты. Δ znuA + чистый <i>B. abortus</i> : сильное ослабление, требуется введение двух доз. Δ vjbR штамма S19: высокий уровень защиты, меньшая воспалительная реакция. Δ cydC или Δ cydD <i>B. abortus</i> : иммунитет типа Th1, высокая эффективность защиты по сравнению со штаммом RB51. Δ Mfr или Δ OMP19 <i>B. abortus</i> : аналогичный уровень защиты по сравнению с S19 и RB51. Δ BAB_RS22915 <i>B. abortus</i> : минимальное патологическое повреждение, эффективный иммунный ответ. Δ htrA + cydL <i>B. abortus</i> : ослабление штамма 2308. Δ wbkC <i>B. abortus</i> : шероховатый мутант, более ослабленный, слабая защита по сравнению с S19
Векторные вакцины	Живые, репликативные в клетке-хозяине, индуцируют клеточный опосредованный иммунитет, хорошее представление иммунной системе, варьирует уровень защиты. <i>Yersinia enterocolitica</i> экспрессирует BFR, P39. <i>Ochrobactrum anthropic</i> – SOD. <i>Lactococcus lactis</i> – SOD, L7/L12. <i>Salmonella typhimurium</i> – 31 кДа, BCSP31, SOD, OMP3b, OMP19, L7/L12, BLS, prpA. <i>Vaccinia viruses</i> – g L7/L12, OMP18 и GroEL. <i>Semliki Forest virus</i> – IF3 и Sod C. <i>Influenza viruses</i> – L7/L12 и OMP16. <i>Adenovirus</i> – p39, BLS. <i>B. abortus</i> RB51 оверэкспрессия – SOD, wboA, L7/L12. <i>Escherichia coli</i> – β -галактозидаза. <i>Mycobacterium bovis</i> – 65кДа-белок теплового шока
Субъединичные вакцины	Авирулентная, DIVA, пригодная для использования для человека, низкий уровень защиты, необходимы адьюванты, требует многократного введения, высокая стоимость. OMP2b, OMP3b, OMP10, OMP16, OMP19, OMP25, OMP28 (BP26), OMP31, Cu/Zn SOD, P39, DnaK, SurA, BCSP31, GroES, L7/L12, P39, AsnC, rE2o, rCysK, rOMP19 + rP39, химерный белок из OMP19 и p39, OMP25-BLS, OMP25 с адьювантом Фрейнда, AspC, Dps, InpB и Ndk
ДНК-вакцины	Безопасная, индуцирующая как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, низкий уровень защиты по сравнению с белковыми вакцинами, отсутствие остаточной вирулентности, требует первичной стимуляции. ДНК-вакцины, кодирующие BAB1_0263, BAB1_0278, BAB1_0278, BAB1_0273, BAB1_0278 + SOD C, 21 эпитоп OPC GI-3 и SOD, слитый белок SOD и IL-2, SOD, BCSP31 и L7/L12 с белками <i>M. bovis</i> (Ag85B, MPT64, MPT83), L7/L12 + OMP16, Bp26 + TF, P39, groEL
Другие вакцины	Непатогенные альфапротеобактерии. Повышение IgG, IgA, защита от <i>B. abortus</i> 2308. Инактивированные вакцины. Gl24-лизат <i>B. abortus</i> – защита коз от <i>B. abortus</i> 544. Хитозановые наночастицы с антигенами OMP31, OMP25-BLS-rHSP60, BLS-OMP31. Повышение IgG1, IgG2a, IgM, ИФН- γ , IL-12, IL-4, IL-17, защита от <i>B. melitensis</i> 16M. Синтетические пептиды. Пептид SOD (GGAPGEKDGKIVPAG). Защита от <i>B. abortus</i> . Везикулы внешней мембраны <i>B. melitensis</i> . Повышение IgG1, IgG2a, цитокинов Th1, Th2, Th17, защита от <i>B. melitensis</i> 16M

Р-фенотипа колоний, а также обеспечило защиту от бруцеллеза у животных после заражения *B. abortus* 2308, не вызывая аборт у беременных овец [14]. В другом исследовании делеция гена *pgm*, отвечающего за синтез фосфоглюкомутазы, в вирулентном штамме *B. abortus* S2308 привела к формированию у него шероховатого типа колоний, авирулентности для мышей, стимуляции клеточного иммунного ответа с уровнем защиты от бруцеллеза, сравнимым с *B. abortus* S19, при этом не выявлялись специфические антитела [15–19].

Кроме того, протективным потенциалом обладают мутантные вакцины, дефектные по генам, отвечающим за синтез компонентов метаболических путей у бруцелл. Среди них гены *purL*, *purD* и *purE* (белки пути биосинтеза пурина), *bacA* (транспортер жирной кислоты липида А), *hemH* (феррохелатаза), *pgk* (фосфоглицераткиназа), оперон *virB* (система секреции IV типа), *znuA* (транспортер цинка), *BAB1_0542* (ABC-транспортер АТФазы) и другие [20–23]. Например, использование в разных работах штамма *B. abortus* 2308, в геноме которого были удалены гены *znuA*, *pgk* или *BAB1_0542*, в качестве противобруцеллезной вакцины обеспечило защиту мышей от заражения вирулентным штаммом бруцелл, сравнимую с *B. abortus* S19 и RB51 [23, 24]. А од-

новременная делеция двух генов (*htrA* и *cydL*) у *B. abortus* 2308 привела к снижению его патогенного действия для коров [25].

Одним из новых подходов в разработке вакцин является внесение дополнительных генов в геном вакцинного штамма *B. abortus* RB51. Так, в работе R.Vemularalli вставка гена, кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу (*sodC*), в *B. abortus* RB51 привела к росту экспрессии данного белка у бруцелл и повышению защитной эффективности данной вакцины против заражения *B. suis* [26]. Кроме того, вакцинирование мышей штаммом *B. abortus* RB51, синтезирующим гетерологичные антигены (β -галактозидазы *Escherichia coli*, 65 кДа белка теплового шока, ESAT-6 и Ag85A *Mycobacterium tuberculosis*), индуцировало повышение продукции IgG2a и интерферона- γ (ИФН- γ), что свидетельствовало об активации клеточного иммунного ответа и возможности создания на основе *B. abortus* RB51 мультивакцины против нескольких возбудителей заболеваний [27].

Снижение риска возникновения остаточной вирулентности живых вакцин может обеспечить применение ослабленных вирусов или бактерий в качестве векторов, экспрессирующих протективные антигены бруцелл непосредственно в организме человека или животных.

Векторные вакцины против бруцеллеза

Применение векторных рекомбинантных вакцин позволяет имитировать естественное инфицирование, модулируя клеточный и гуморальный иммунный ответ у хозяина на растущее число продуцируемых векторным штаммом чужеродных антигенов. В последние годы было разработано множество подобных вакцин как на основе бактерий (*Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi*, *Lactococcus lactis*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*), так и вирусов (*Semliki Forest virus*, *Vaccinia virus*, *Influenza virus*) [28–34].

В работах нескольких авторов была продемонстрирована эффективность использования в качестве векторных вакцин аттенуированных штаммов сальмонелл, продуцирующих различные белки бруцелл (31 кДа, BCSP31, SOD, OMP3b, OMP19, L7/L12, BLS, prp A и другие). Так, в работе С.Неравадуге et al. пероральное применение вакцины на основе мутантного штамма *Salmonella typhimurium*, экспрессирующего SOD и OMP19, совместно с антацидом бикарбонатом натрия индуцировало мукозный и системный иммунный ответ у BALB/с-мышей, а также способствовало формированию протективного иммунитета при заражении их вирулентным штаммом *B. abortus* 544 [29].

Перспективным направлением в разработке векторных вакцин является использование лактобактерий. Они могут применяться перорально, не требуют тщательной очистки, доставляют гетерологичные белки в глубокие слои слизистой оболочки пищеварительного тракта, избегая действия кислотной среды желудка и ферментов, и стимулируют как мукозный, так и системный иммунный ответ. Для этих целей в последние годы наиболее часто применяется *Lactococcus lactis*. После попадания в просвет кишечника рекомбинантные штаммы *L. lactis* проникают через М-клетки слизистой оболочки, размножаются в фагоцитирующих клетках и экспрессируют чужеродные антигены, активируя иммунную систему [35]. В большинстве экспрессионных систем *L. lactis* продукция белка стимулируется антибиотиком низином, используя низин-индуцибельную систему [32, 36]. D.S.Pontes et al. в 2003 г. показали, что рекомбинантный штамм *L. lactis*, продуцирующий бруцеллезный белок L7/L12 под контролем низинового промотора, при пероральном введении мышам BALB/с может индуцировать местный гуморальный иммунный ответ и способствовать значительному повышению уровня анти-L7/L12 IgA в кале [32]. А в 2012 г. D.Sáez et al., трансформировав *L. lactis* геном *sodC*, выявили, что перорально вакцинированные данным штаммом мыши оказались защищены от заражения вирулентным штаммом *B. abortus* 2308 [33].

Среди противобруцеллезных вакцин, созданных на основе мутантных вирусов, несущих гены иммунодоминантных антигенов бруцелл, наибольшую эффективность показали штаммы *Semliki Forest virus*, продуцирующие IF3, SOD, а также *Influenza virus* [31]. Так, вакцинация беременных коз и овец вирусом гриппа, экспрессирующим белки OMP16, OMP19, SOD или L7/L12, с адьювантом Montanide™ Gel 01 защитила 70% животных от бруцеллеза при заражении их вирулентным штаммом *B. melitensis* 16М [30, 34]. Использование *Vaccinia virus* в качестве векторной противобруцеллезной вакцины во многих случаях (например, при экспрессии белков OMP18, L7/L12) оказалось неоправданным.

Критическим свойством данного вируса является способность снижать ИФН-γ-ответ у хозяина, который необходим для защиты от бруцеллеза, что также подтверждает его непригодность для целей вакцинации [28].

К векторным вакцинам можно отнести и мутантные штаммы бруцелл, непатогенные для человека или крупного рогатого скота, но синтезирующие факторы вирулентности. D.Moustafa et al. разработали три вакцинных штамма из *B. neotomae* (гладкий штамм, выделенный от пустынных мышей): *B. neotomae* SOD, *B. neotomae* Bp26 и *B. neotomae*, облученный гамма-лучами, не способный к репликации, но сохраняющий метаболическую активность. Штаммы вводили внутривентриально мышам BALB/с, которые были заражены *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16М и *B. suis* 1330. Лучшую защиту от инфекции обеспечил облученный штамм [37]. Основываясь на данных результатах, N.Dabral et al. сравнили эффективность *B. abortus* RB51 и облученного штамма *B. neotomae*, которыми были перорально вакцинированы мыши. В обеих группах мышей регистрировались повышенные уровни ИФН-γ и фактора некроза опухоли ФНО-α. Заражение мышей как внутривентриально, так и интраназально *B. abortus* 2308 показало, что защита, обеспечиваемая облученным штаммом *B. neotomae*, выше, чем *B. abortus* RB51 [38]. Альтернативой живым вакцинам могут служить бесклеточные генно-инженерные субъединичные и ДНК-вакцины против бруцеллеза.

Субъединичные вакцины против бруцеллеза

Одним из перспективных направлений в борьбе против бруцеллеза является разработка субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков *B. abortus*, обладающих достаточной иммуногенностью для формирования протективного иммунитета у человека и восприимчивых животных. Преимуществом использования данных препаратов, в частности для человека, являются их безопасность, высокая иммуногенность, отсутствие дополнительных балластных белков и нуклеиновых кислот, которые могли бы вызвать перекрестные реакции и нежелательные побочные эффекты при вакцинации, возможность комбинирования с белковыми вакцинами, направленными на защиту от других патогенов. К их недостаткам можно отнести необходимость многократного введения препаратов и использования адьювантов для формирования полноценного иммунного ответа, а также низкую протективность по сравнению живыми вакцинами и высокую стоимость.

Выбор оптимальных антигенов представляет собой краеугольный камень в разработке вакцин. В связи с преимущественно внутриклеточным расположением патогена и блокированием им механизмов фаголизосомального слияния и апоптоза поверхностные компоненты клетки и везикулы внешней мембраны являются практически уникальными структурами, взаимодействующими с иммунной системой хозяина. Многие грамотрицательные бактерии, в том числе бруцеллы, во время нормального роста спонтанно секретуют везикулы наружной мембраны (outer membrane vesicles (OMV)). Они обладают двухслойной мембраной и содержат липопротеины, белки наружной мембраны (outer membrane proteins (OMP)), ЛПС и некоторые периплазматические компоненты. OMV вовлечены во многие процессы, включая вы-

свобождеие факторов вирулентности, таких как протеазы и токсины, передачу сигналов между бактериальными и эукариотическими клетками, перенос ДНК, антибактериальную активность, стимуляцию иммунной системы хозяина и облегчение выживания бактерий во время оболочечного стресса. Иммуномодуляторные свойства этих антигенов позволяют рассматривать их в качестве субъединичных вакцин против бруцеллеза [39, 40]. Протеомный анализ показал, что везикулы наружной мембраны *B. melitensis* 16M содержат белки OMP2b, OMP3b, OMP10, OMP16, OMP19, OMP25, OMP28 (BP26), OMP31, Cu/Zn SOD, P39, DnaK, SurA, BCSP31, GroES и другие [40].

Высокой иммуногенностью обладают бруцеллезные OMP. В исследованиях К.А. Pasquevich перорально или парентерально вводимые мышам рекомбинантные липопротеины OMP16 и OMP19 (как с липидным участком, так и без него) индуцировали одинаково высокие уровни защиты против заражения *B. abortus*, причем без применения адьювантов. Адьювантность данных белков объясняется их способностью активировать дендритные клетки *in vivo*, дендритные клетки и макрофаги *in vitro*, стимулировать как Th1-, так и Th17-иммунные ответы против бруцелл. Пероральное введение OMP19, полученного в растительной экспрессионной системе *Nicotiana benthamiana*, стимулировало мукозный и системный иммунный ответ у мышей без применения адьювантов [41, 42].

Белок пептидогликанового слоя OMP25 является важным фактором вирулентности бруцелл, участвующим в выживании микроорганизма. Делеции гена *omp25* у *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. ovis* приводили к их аттенуации для мышей. Внутриважная иммунизация мышей рекомбинантным белком OMP25 обеспечила защиту от заражения *B. abortus* 544, сравнимую с вакцинным штаммом *B. abortus* S19 [43].

OMP31, который на 34% гомологичен с OMP25, присутствует у всех видов *Brucella*, за исключением *B. abortus*. Среди белков наружной мембраны бруцелл представители семейства OMP25/OMP31 проявляют сильную иммуногенность, стимулируя как клеточный, так и гуморальный иммунитет. В последних исследованиях был обнаружен высокий уровень специфических антител против рекомбинантного OMP31 у большого процента обследованных собак, инфицированных *B. canis*. Таким образом, OMP31 может быть кандидатом для субъединичной вакцины против *B. canis* [44]. Также рекомбинантный белок OMP31 в сочетании с гидроксидом алюминия или неполным адьювантом Фрейна индуцировал значительные уровни защиты от *B. melitensis* в мышинной модели [45, 46]. Слитый белок 3E-IL2, содержащий 27-аминокислотный эпитоп OMP31 и интерлейкин-2 (IL-2), оказал более выраженный протективный эффект против *B. melitensis* M16 у мышей по сравнению с химерным антигеном OMP31-IL2, включающим целую OMP31 [47].

OMP28, также известный как BP26, обнаружен в периплазматическом пространстве бруцелл. Он высококонсервативен среди *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* и *B. neotomae*. OMP28 способен вызывать как гуморальные, так и клеточные реакции в организме хозяина, причем первые, как правило, преобладают. Использование сочетания рекомбинантного rOMP28 с адьювантом CpG (синтетическим олигодезоксирибонуклеотидом, содержащим CpG-мотив) в качестве субъединичной вакцины позволило переключить

тип иммунного ответа на Th1-ответ и индуцировать синтез IgG2a, T-клеточную пролиферацию и повышение экспрессии цитокинов первого типа (ИФН- γ , IL-2, IL-12, ФНО- β), а при заражении мышей, вакцинированных вирулентным штаммом *B. abortus* 544, получить уровень протекции выше по сравнению с нативным антигеном OMP28, хотя и ниже, чем при применении вакцинного штамма *B. abortus* S19 [48].

Периплазматическая Cu/Zn-супероксиддисмутаза (SOD) является ключевым элементом защиты патогена от респираторного взрыва в фагоцитах хозяина. Этот белок (18,5–20 кДа) экспрессируется во всех видах бруцелл и оказывает выраженный протективный эффект при использовании его в качестве вакцины против бруцеллеза в мышинной модели. В работе Н. Singha введение мышам эшерихиосом, содержащих рекомбинантные SOD и провоспалительный цитокин IL-18, оказало выраженный протективный эффект при последующем заражении их *B. abortus* 544 [49].

Применение в работе А. Al-Mariri в качестве вакцины от бруцеллеза у мышей периплазматического белка P39 с адьювантом CpG обеспечило максимальную защиту, сравнимую с *B. abortus* S19, на 4-й неделе после заражения, однако к 8-й неделе этот эффект практически исчез [50].

Очищенные рекомбинантные цитозольные белки SurA и DnaK, вводимые мышам, индуцировали одинаковые невысокие уровни защиты от *B. abortus* по сравнению с контрольной живой вакциной. Иммунизация двумя данными белками не показала синергетического эффекта по сравнению с вакцинацией только одним антигеном [51].

Протективной активностью обладают и некоторые цитоплазматические белки: белки открытой рамки считывания, кодируемой геномным островком GI-3 (29 белков, включая BAV1-0260 (FlgJ), BAV2-0122 (FliN), BAV1-0263 и BAV1-0278 и др.), люмазин синтетаза (BLS), рибосомный белок L7/L12, цитоплазматический шаперон trigger factor (TF) и др. [52].

L7/L12, 12кДа-белок 50S-субъединицы рибосом бруцелл, обладает высокой иммуногенностью и способен оказывать защитный эффект. В работе D.P. Isore рекомбинантный L7/L12, а также ДНК-вакцину, содержащую ген данного белка, и *B. abortus* S19 вводили внутриважно мышам. Через 30 дней после заражения их *B. abortus* 544 были выявлены повышенные уровни пролиферации лимфоцитов и концентрации ИФН- γ , а также сниженная обсемененность селезенки у животных, иммунизированных бесклеточными вакцинами, по сравнению с живой вакциной [53].

Y. Hisham и Y. Ashhab с помощью методов биоинформатики и стратегии обратной вакцинологии анализировали 1939 белков из 90 протеомов трех видов бруцелл (*B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*). В результате сравнения антигенности белков, оценки плотности их B-клеточных эпитопов, а также эпитопов MHC-I и MHC-II был получен окончательный список из 34 потенциальных протективных антигенов для целей вакцинопрофилактики. Большинство из выявленных белков оказались связаны с такими биологическими процессами, как трансмембранный транспорт, сборка мембран, бактериальная адгезия, инвазия, адаптация к внутриклеточной среде макрофагов с дефицитом питательных веществ [54].

Тем не менее, как показывают эксперименты, моновалентная вакцина, основанная на одном антигене, не способна вызвать значительный протективный иммунитет. Более

эффективным для целей вакцинопрофилактики может оказаться комбинация из нескольких белков, экспрессирующихся в разные фазы жизненного цикла бактерий. Перспективным направлением усовершенствования субъединичных вакцин является создание «коктейлей» из иммунодоминантных эпитопов наиболее иммуногенных антигенов бруцелл. В работе M.Golshani et al. применение антигенного коктейля из трех рекомбинантных белков бруцелл (rL7/L12 + rTOmp31 + rSOmp2b) в сочетании с одним из двух вариантов адъювантов (CpG ODN 1826 + Montanide ISA 70VG или Poly I:C) индуцировало сильный иммунный ответ с преобладанием титра IgG2a, Th1-иммунного ответа и уровень защиты от бруцеллеза, сравнимый с живыми вакцинами [55]. В исследовании G.Taderalli внутрибрюшинная иммунизация мышей коктейлем из рекомбинантных белков rOMP19 и rP39 с неполным адъювантом Фрейнда способствовала формированию защитного иммунитета против *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 16M. А применение химерной молекулы rOP, содержащей данные антигены, индуцировало Т-клеточно-опосредованную иммунную защиту у мышей даже в отсутствие дополнительных стимуляторов за счет адъювантности OMP19 [56]. Использование смеси из нескольких рекомбинантных белков *B. abortus* (AspC, Dps, InpB и Ndk) в качестве субъединичной вакцины индуцировало высокий титр IgG2a и обеспечивало эффективность защиты от бруцеллеза, аналогичную эффективности штамма *B. abortus* RB51 [57]. В работе S.Paul был показан потенциал слитого рекомбинантного белка rL7/L12-Omp25 в качестве вакцины против бруцеллеза. При введении его внутрибрюшинно мышам он не только вызвал более выраженные, чем при применении вакцинного штамма *B. abortus* S19, клеточно-опосредованные и гуморальные иммунные реакции в их организме, но и защитил животных при заражении *B. abortus* 544 [58]. Z.Sadeghi et al. с помощью инструментов иммуноинформатики вычислили B-, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные эпитопы трех белков *Brucella* (FliC, 7 α -HSDH, BhuA) и создали из них 2 мультиэпитопные вакцины (poly B и poly T). Иммунизация мышей данными вакцинами с адъювантом poly I:C обеспечила защиту мышей от *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 16M, сравнимую с эффектом от *B. abortus* RB51 и *B. melitensis* Rev1 [59].

Во многих исследованиях были продемонстрированы обнадеживающие результаты применения субъединичных вакцин против бруцеллеза. Однако большинство из них были выполнены на мышинных моделях, а иммунный ответ, наблюдаемый у мышей, может не соответствовать уровню защиты, достигаемому у естественных хозяев после вакцинации. Кроме того, создание комбинации из антигенов, способной индуцировать сильный иммунный ответ, соответствующий естественной инфекции, является сложной и комплексной задачей. Необходимость многократного введения таких препаратов и использования адъювантов значительно повышает стоимость вакцинации, а также ограничивает области ее применения.

ДНК-вакцины против бруцеллеза

Кроме субъединичных противобруцеллезных вакцин, в настоящее время активно разрабатываются ДНК-вакцины. Они дают возможность получить пролонгированную экс-

прессию антигенов, вызывая как клеточные, так и гуморальные реакции в организме. ДНК-вакцины стабильны, не требуют замораживания, безопасны и могут применяться для людей [4].

В последние годы множество исследований было посвящено разработке противобруцеллезных ДНК-вакцин. Среди них – ДНК-вакцины, кодирующие L7/L12, BLS, P39, OMP16 и BAV1_0278, которые продемонстрировали способность обеспечивать защиту от *B. abortus* у мышей [60]. Кроме того, ДНК-вакцина, несущая ген SOD, индуцировала уровень защиты, соответствующий применению *B. abortus* RB51 [61]. Использование в качестве вакцины плазмидной ДНК, содержащей гены BAV1_0263 и бактериоферритин, не обеспечило защиту от вирулентного *B. abortus* у мышей [62].

Считается, что ДНК-вакцины вызывают менее мощные иммунные реакции, чем белковые вакцины [4]. Однако, например, ДНК-вакцина, экспрессирующая OMP31, вызывала такой же уровень защиты, как рекомбинантный белок rOMP31c неполным адъювантом Фрейнда против *B. melitensis* и *B. ovis*, а вакцина, продуцирующая BSL, оказалась более эффективной, чем аналогичный рекомбинантный белок, против заражения *B. abortus* [46, 63].

Разрабатываемые противобруцеллезные ДНК-вакцины уступают по уровню защиты коммерческим живым аттенуированным вакцинам. Применение различных стратегии повышения эффективности ДНК-вакцин может обеспечить возможность их широкого применения, в том числе для людей. Одна из стратегий улучшения ДНК-вакцин против бруцеллеза заключается в изменении экспрессии антигена путем изменения генетической конструкции. Например, в одной из работ замена обычно используемого промотора CMV на промотор MHC I крупного рогатого скота (p6) существенно снизила защитную эффективность ДНК-вакцины, экспрессирующей L7/L12 [64].

С другой стороны, клеточное расположение экспрессируемого белка также может быть изменено путем включения простых целевых последовательностей или сигналов секреции. Например, сигнальная последовательность активатора плазминогена в тканях человека использовалась для выделения бруцеллезного белка GroEL из клеток, трансфицированных продуцирующей его ДНК-вакциной. Однако эта стратегия индуцировала более низкие уровни антител у иммунизированных мышей, чем у несекретированных GroEL [65]. Остается неясным, является ли индукция секреции бруцеллезных белков подходящим методом для повышения эффективности ДНК-вакцин. Альтернативная стратегия, при которой внутриклеточный целевой сигнал, такой как убиквитин, сливается с антигеном бруцеллы, может оказаться более эффективной [66].

Другой подход повышения эффективности ДНК-вакцин заключается в модуляции иммунного ответа путем коэкспрессии цитокинов. Их гены могут располагаться на отдельной плазмиде либо быть слиты генами бруцеллезных белков внутри одной ДНК-вакцины. Например, слияние генов белков SOD с IL-2 или IL-18 в одной ДНК-вакцине обеспечило сохранение цитокинового эффекта в локальной среде на антиген. Однако в обоих этих случаях включение цитокина не привело к повышению защитной эффективности по сравнению с ДНК-вакцинами, экспрессирующими только SOD [67, 68].

Применение комбинированных ДНК-вакцин может обеспечить более эффективную протекцию от инфекции. Например, ДНК-вакцины, кодирующие BCSP31, SOD и L7/L12, стимулировали более высокий цитотоксический ответ у мышей по сравнению с *B. abortus* S19 [54]. Аналогичным образом, двухвалентная ДНК-вакцина, кодирующая гены L7/L12 и OMP16, также оказалась более эффективной и способной вызывать сильный пролиферативный Т-клеточный ответ, индуцировать большое количество ИНФ- γ -продуцирующих Т-клеток [69, 70]. Кроме того, было показано, что ДНК-вакцина, содержащая шесть генов, кодирующих иммунодоминантные антигены *B. abortus* (BCSP31, SOD и L7/L12) и *Mycobacterium bovis* (Ag85B, MPT64 и MPT83), индуцирует защиту, сравнимую с *B. abortus* S19 и БЦЖ у крупного рогатого скота, что позволяет рассматривать ее в качестве перспективной вакцины против обоих заболеваний [71].

В большинстве случаев иммунизация ДНК-вакциной против бруцеллеза проводится внутримышечно. Однако этот способ требует большого количества ДНК и может создать трудности для исследований на более крупных моделях животных, таких как человек. Такие методы, как опосредованная частицами эпидермальная доставка и прямое введение ДНК-вакцин в селезенку, были тестированы на мышах против других инфекций и показали многообещающие результаты [72]. Существующая схема иммунизации ДНК-вакцинами в несколько этапов (prime-boost) показала свою эффективность при применении ее для профилактики разных инфекций. Она позволяет инициировать иммунный ответ на антиген прежде, чем рекомбинантные белки или вирусные векторы будут использованы в качестве дополнительного его усиления. Однако в работе J.Cassataro введение мышам рекомбинантного белка OMP31 незначительно усилило иммунный ответ на первично вводимую ДНК-вакцину, экспрессирующую данный антиген [73–76].

Несмотря на преимущества ДНК-вакцин для профилактики бруцеллеза, такие как безопасность, простота производства и применения, длительная персистенция иммуногена, стимуляция клеточного и гуморального иммунитета, у них есть ряд недостатков, в частности, вероятность атипичного процессинга белка, синтез антител к ДНК, риски воздействия на гены, контролирующие рост клеток, или передачи генов устойчивости к антибиотикам бактериям и другие.

Другие перспективные противобруцеллезные вакцины

Поскольку было доказано, что существует перекрестная реактивность между антигенами бруцелл и непатогенными альфа-протеобактериями (АПБ), то вакцинация с помощью АПБ может защитить животных от бруцеллезной инфекции. Исследовательской группой M.V.Delpino был проведен ряд экспериментов, в которых мышам подкожно иммунизировали термически убитыми *Ochrobactrum anthropi*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens*, а также *Brucella melitensis* H38 в качестве стандартного положительного контроля. Наиболее выраженный иммунный ответ после внутривенного введения *B. abortus* 2308 наблюдался у мышей, иммунизированных *O. anthropi*, *M. loti* и *B. melitensis* H38, по сравнению с вводимым цитозольным экстрактом бруцелл. Кроме того, пероральное введение живых *O. anthropi* и последующее заражение мышам *B. abortus*

2308 индуцировало повышенные уровни IgA в сыворотке в крови и кале, а также показателей активации клеточного иммунитета по сравнению с неиммунизированными животными (но меньшие, чем выявлены у мышам, вакцинированных инактивированным *B. abortus* 2308) [77].

Инактивированные противобруцеллезные вакцины, как правило, демонстрируют низкую протективную эффективность и при этом требуют применения адъювантов и введения нескольких ревакцинирующих (бустер) доз препарата. Однако в работе Won-Kyong Kim 2019 г. было показано, что использование клеток *B. abortus*, лизированных GI24 (фрагментом свиного миелоидного антимикробного пептида), для внутрикожной иммунизации коз стимулировало повышенные уровни IL-4, ФНО- α , ИНФ- γ , анти-ЛПС антител по сравнению с контрольными животными и при последующем субконъюнктивальном заражении их вирулентным штаммом *B. abortus* 544 три из пяти коз оказались защищены от инфекции [78].

Одним из вариантов доставки антигенов в организм является применение наночастиц. M.Abkar et al. было показано, что пероральное введение мышам N-триметил-хитозановых наночастиц с OMP31 индуцирует Th1- и Th17-ответы и обеспечивает значительный уровень защиты от *B. melitensis* 16M через 4 недели после вакцинации [79]. Применение слитого белка OMP25-BLS, помещенного в хитозановую наночастицу, для иммунизации мышам выявило преобладание гуморального ответа на данный антиген в организме хозяина. При этом внесение дополнительно рекомбинантного бруцеллезного белка теплового шока rHSP60 способствовало переключению иммунного ответа на клеточный ответ [80]. Иммунизация слизистых оболочек (интраназально и субконъюнктивально) двумя полимерными антигенами (BLSOmp31-ChM в хитозановой микросфере и BLSOmp31-P407-Ch в терморезистивном и мукоадгезивном геле Poloxamer 407-Ch), содержащими слитый белок BLS-Omp31, стимулировала местный и системный иммунитет и обеспечила сниженный уровень бактериальной нагрузки в селезенке у овец при заражении *B. ovis* [81].

В качестве альтернативы существующим живым вакцинам разными авторами предпринимались попытки использовать синтетические пептиды эпитопов иммунодоминантных белков бруцелл. Например, L.B.Tabatabai и G.W.Pugh синтезировали 3 пептида белка Cu-Zn SOD *B. abortus*, один из которых, пептид 3 (GGAPGEKDGKIVPAG), продемонстрировал протективную активность при заражении вирулентным штаммом бруцелл. Однако в целом этот класс вакцин обладает относительно низкой степенью защиты от инфекции, что затрудняет их эффективное применение [82].

Везикулы внешней мембраны (OMV), секретируемые бруцеллами, содержат компоненты, ассоциированные с вирулентностью бактерий, и обладают иммуномодулирующими свойствами. Белки OMV могут проникать в эукариотические клетки путем эндоцитоза и индуцировать не только мембранные рецептор-зависимые пути, но и цитоплазматические рецепторы, такие как NOD (рецептор связывания нуклеотидов и олигомеризации), стимулируя иммунный ответ [6, 40]. В работе E.D.Avila-Calderón OMV два штамма *B. melitensis* (гладкий 16M и шероховатый мутант VTRM1) вводили внутримышечно мышам с последующим заражением

ем их вирулентным штаммом *B. melitensis* 16M. При этом OMV из *B. melitensis* VTRM1 индуцировали существенно более высокие показатели экспрессии генов IL-12, ФНО- α и ИФН- γ в дендритных клетках костного мозга, чем OMV из гладкого штамма *B. melitensis* 16M. Иммунизация мышей OMV как из гладкого, так из шероховатого штаммов обеспечило уровни защиты мышей от бруцеллеза, сравнимые с уровнями, полученными в группе мышей, вакцинированных живым штаммом *B. melitensis* Rev1 ($p < 0,005$). Кроме того, у мышей, вакцинированных OMV из *B. melitensis* VTRM1, наблюдалось повышение уровня IgG2a в сыворотке крови, что свидетельствует о стимуляции клеточного иммунитета [39]. В настоящее время в нескольких странах мира (Куба, Норвегия, Новая Зеландия) уже доступна для массового применения вакцина, основанная на OMV, против *Neisseria meningitidis* серогруппы В. Следовательно, допустимо предположить, что подобная противобруцеллезная вакцина также может быть эффективной, в том числе для защиты людей от инфекции [6, 83].

Заключение

Необходимость создания новых эффективных и безопасных противобруцеллезных вакцин в настоящее время стоит особенно остро. Естественные резервуары бруцеллеза в дикой природе являются постоянным источником инфицирования домашних животных, которые заражают человека. Кроме того, в связи с аэрогенным распространением и стойкостью бруцелл в окружающей среде существует риск использования их в качестве биологического оружия. Поздняя диагностика и малоэффективное лечение заболевания могут приводить к хронизации инфекции и инвалидизации пациентов [84].

Несмотря на значительные усилия, предпринимаемые учеными всего мира, до сих пор не существует международной лицензированной противобруцеллезной вакцины для человека. Идеальная противобруцеллезная вакцина для использования на людях должна быть безопасной, эффективной, обеспечивать долговременную защиту, не должна вызывать заболевание и выраженные местные или системные реакции и, желательнее, должна стимулировать формирование противоинфекционного иммунитета после ее однократного применения.

При разработке вакцины для людей необходимо учитывать ряд требований, необходимых для ее лицензирования. Эффективность такого препарата должна быть подтверждена по крайней мере на двух моделях животных. Испытания вакцины проводятся как на небольших (например, на мышах), так и на более крупных животных (предпочтительно на нечеловеческих приматах). Для лицензирования препарата также необходимо подтверждение его безопасности, иммуногенности и эффективности на людях. Хотя живые аттенуированные вакцины против бруцеллеза обладают потенциальными преимуществами с точки зрения иммуногенности и защитной эффективности, лицензирование такой вакцины для людей может оказаться затруднительным. Производство вакцин на основе живых бруцелл, как правило, является дорогостоящим в связи с необходимостью использования лабораторий с высоким уровнем защиты, постоянного контроля качества препаратов, соблюдения усло-

вий их хранения и транспортировки [4]. Субъединичные вакцины считаются безопасными для человека, однако для достижения высокого уровня защиты от бруцеллеза, как правило, необходимо создание комбинации из нескольких антигенов и адьюванта, а также многократное введение препарата. Кроме того, вакцина, основанная на очищенных белках, вероятно, потребует охлаждения, которое трудно соблюсти в некоторых районах мира, где распространен бруцеллез. В данном случае ДНК-вакцина будет обладать преимуществами, так как она безопасна, стабильна во внешней среде, может обеспечить экспрессию нескольких антигенов и их длительную персистенцию в организме, проста и недорога в производстве. Реализация различных стратегий улучшения качества противобруцеллезных ДНК-вакцин может помочь в разработке препаратов, пригодных для применения для людей.

Литература

1. Лямкин ГИ, Пономаренко ДГ, Худолеев АА, Вилинская СВ, Зайцев АА, Куличенко АН. Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах – участниках Содружества Независимых Государств. Инфекционные болезни. Новости. Лечение. Обучение. 2016;1(14):68-74.
2. Профилактика бруцеллеза: Санитарно-эпидемиологические правила. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010, 27 с.
3. Охалкина ВЮ, Пяткова НВ, Павлов ДЛ, Суслопаров АА. Эпидемическая опасность бруцеллеза в современных условиях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(3):15-22.
4. Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans. Review. FEMS Microbiol Rev. 2010 May;34(3):379-94. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x
5. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. Review. J Vet Sci. 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
6. Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. Veterinary research. 2015;46(1):76.
7. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin Microbiol Rev. 2003 Jan;16(1):65-78. DOI: 10.1128/cmr.16.1.65-78.2003
8. El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. Int J Vet Sci Med. 2018 Mar 21;6(Suppl):S31-S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
9. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. Rev Sci Tech. 2013 Apr;32(1):149-62. DOI: 10.20506/rst.32.1.2189
10. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Review. Infect Genet Evol. 2009 Dec;9(6):1168-84. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001
11. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol. 2010 Apr; 60(Pt 4):801-8. DOI: 10.1099/ij.s.0.011148-0
12. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system Review. Microb Cell Fact. 2006 Mar 23;5:13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
13. Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS Microbiol Lett. 1994 Sep 1;121(3):337-42. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07123.x
14. Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. Clin Vaccine Immunol. 2013 Feb;20(2):174-80. DOI: 10.1128/CVI.00573-12

15. Comerci DJ, Ugalde JE, Ugalde RA. Development of a New Live Rough Vaccine Against Bovine Brucellosis. In: Makkar H.P., Viljoen G.J. (eds). Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer, Dordrecht, 2005, p. 743-749.
16. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. Infect Immun. 2003 Jun;71(6):3261-71. DOI: 10.1128/iai.71.6.3261-3271.2003
17. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet Res. 2004 Jan-Feb;35(1):1-38. DOI: 10.1051/vetres:2003037
18. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6264-9. DOI: 10.1128/iai.71.11.6264-6269.2003
19. Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, Enright FM, et al. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. Am J Vet Res. 1996 May;57(5):677-83.
20. Alcantara RB, Read RD, Valderas MW, Brown TD, Roop RM 2nd. Intact purine biosynthesis pathways are required for wild-type virulence of *Brucella abortus* 2308 in the BALB/c mouse model. Infect Immun. 2004 Aug;72(8):4911-7. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4911-4917.2004
21. Almirón M, Martínez M, Sanjuan N, Ugalde RA. Ferrochelataze is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. Infect. Immun. 2001;69(10):6225-30.
22. Den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA, Tsolis RM. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5143-9. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5143-5149.2004
23. Trant CG, Lacerda TL, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, et al. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. Infect Immun. 2010 May;78(5):2283-91. DOI: 10.1128/IAI.01433-09
24. Zhang M, Han X, Liu H, Tian M, Ding C, Song J, et al. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. Vet Microbiol. 2013 Jun 28;164(3-4):322-9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.017
25. Edmonds M, Booth N, Hagius S, Walker J, Enright F, Roop RM 2nd, Elzer P. Attenuation and immunogenicity of a *Brucella abortus* htrA cycL double mutant in cattle. Vet Microbiol. 2000 Sep 15;76(1):81-90. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00225-x
26. Vemulapalli R, He Y, Cravero S, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. Infect Immun. 2000 Jun;68(6):3286-9. DOI: 10.1128/iai.68.6.3286-3289.2000
27. Vemulapalli R, He Y, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. Vet Microbiol. 2002 Dec 20;90(1-4):521-32. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00232-8
28. Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. Vet Microbiol. 2005 Aug 10;109(1-2):11-7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.011
29. Hewawaduge C, Senevirathne A, Lee JH. Enhancement of host infectivity, immunity, and protective efficacy by addition of sodium bicarbonate antacid to oral vaccine formulation of live attenuated *Salmonella* secreting *Brucella* antigens. Microb Pathog. 2020 Jan;138:103857. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103857
30. Mailybayeva A, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Sansyrbay A, Renukaradhya GJ, et al. Improved influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant sheep and goats. PLoS One. 2017 Oct 12; 12(10):e0186484. DOI: 10.1371/journal.pone.0186484
31. Oñate A, Donoso G, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Andrews E. An RNA vaccine based on recombinant *Semliki Forest* virus particles expressing the Cu, Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun. 2005 Jun;73(6):3294-300. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3294-3300.2005
32. Pontes DS, Dorella FA, Ribeiro LA, Miyoshi A, Le Loir Y, Gruss A, et al. Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. J Drug Target. 2003;11(8-10):489-93. DOI: 10.1080/10611860410001670035
33. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. Vaccine. 2012 Feb 8;30(7):1283-90. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.088
34. Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Syrymkyzy N, et al. Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle. Vaccine. 2014 Apr 11;32(18):2034-41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.058
35. Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N. *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. Avicenna J Med Biotechnol. 2017 Oct-Dec;9(4):163-168.
36. Azizpour M, Jafari P, Hoseini SD, Behrozikhah AM. Cloning and expression of *B. melitensis* bp26 Gene in *Lactococcus lactis* as a food grade vaccine. Avicenna J Med Biotechnol. 2019 Jul-Sep;11(3):264-267.
37. Moustafa D, Garg VK, Jain N, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. Vaccine. 2011 Jan 17;29(4):784-94. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.018
38. Dabral N, Moreno-Lafont M, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. PLoS One. 2014 Sep 16;9(9):e107180. DOI: 10.1371/journal.pone.0107180
39. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. Clin Dev Immunol. 2012;2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493
40. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. PLoS One. 2012;7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214
41. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS One. 2011 Jan 14;6(1):e16203. DOI: 10.1371/journal.pone.0016203
42. Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. J Immunol. 2010 May 1;184(9): 5200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.0902209
43. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. Mol Immunol. 2012 Jun;51(2):159-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.02.126

44. Clause M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c Mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2014 Dec;21(12):1689-94. DOI: 10.1128/CVI.00527-14
45. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovsky CA, de la Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):8079-88.
46. Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, Ding J. The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Sci Rep.* 2019 Mar 5;9(1):3512. DOI: 10.1038/s41598-019-40084-w
47. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah AM. *In vivo* immunogenicity assessment and vaccine efficacy evaluation of a chimeric tandem repeat of epitopic region of OMP31 antigen fused to interleukin 2 (IL-2) against *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *BMC Vet Res.* 2019 Nov 8;15(1):402. DOI: 10.1186/s12917-019-2074-7
48. Kaushik P, Singh DK, Kumar SV, Tiwari AK, Shukla G, Dayal S, Chaudhuri P. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet Res Commun.* 2010 Feb;34(2):119-32. DOI: 10.1007/s11259-009-9337-x
49. Singha H, Mallick AI, Jana C, Fatima N, Owais M, Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2011 Jun 24;29(29-30):4720-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.088
50. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 2001 Aug;69(8):4816-22. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4816-4822.2001
51. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine.* 2007 Sep 17;25(37-38):6721-9.
52. Yang X, Walters N, Robison A, Trunkle T, Pascual DW. Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. *Vaccine.* 2007 Mar 8;25(12):2261-8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.004
53. Isore DP, Goswami TK, Chaudhury P, Mukhopadhyay SK, Ganguly S. Recombinant protein and DNA vaccine construct of *Brucella abortus* L7/L12 gene elicits immune response. *Asian Pac J Health Sci.* 2014;1(4):425-437.
54. Hisham Y, Ashhab Y. Identification of Cross-protective potential antigens against pathogenic *Brucella* spp. through combining pan-genome analysis with reverse vaccinology. *J Immunol Res.* 2018 Dec 9;2018:1474517. DOI: 10.1155/2018/1474517
55. Golshani M, Amani M, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Arsang A, Bouzari S. Comparison of the protective immunity elicited by a *Brucella* cocktail protein vaccine (rL7/L12 + rTOmp31 + rSOmp2b) in two different adjuvant formulations in BALB/c mice. *Mol Immunol.* 2018 Nov;103:306-311. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.10.002
56. Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19 + rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. *Mol Immunol.* 2016 Mar;71:34-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.01.001
57. Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Min W, et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2018 May 17;36(21):3027-3033. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.04.019
58. Paul S, Peddayalachagiri BV, Nagaraj S, Konduru B, Batra HV. Protective and therapeutic efficacy study of divalent fusion protein rL7/L12-Omp25 against *B. abortus* 544 in presence of IFN γ . *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Oct;102(20):8895-8907. DOI: 10.1007/s00253-018-9314-9
59. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Bouzari S. Evaluation of immunogenicity of novel multi-epitope subunit vaccines in combination with poly I:C against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. *Int Immunopharmacol.* 2019 Oct;75:105829. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105829
60. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun.* 2001 Oct;69(10):6264-70.
61. Onate A, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2003 Sep;71(9):4857-61. DOI: 10.1128/iai.71.9.4857-4861.2003
62. Sisilema-Egas F, Céspedes S, Fernández P, Retamal-Díaz A, Sáez D, Oñate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1_0263 and BAB1_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine.* 2012 Nov 26;30(50):7286-91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.09.039
63. Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2002 May;70(5):2507-11. DOI: 10.1128/iai.70.5.2507-2511.2002
64. A Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine.* 1997;15:1851-7.
65. Leclercq S, Harms JS, Rosinha GMS, Azevedo V, Oliveira SC. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J Med Microbiol.* 2002 Jan;51(1):20-26. DOI: 10.1099/0022-1317-51-1-20
66. Brandsma JL, Shlyankevich M, Zelterman D, Su Y. Therapeutic vaccination of rabbits with a ubiquitin-fused papillomavirus E1, E2, E6 and E7 DNA vaccine. *Vaccine.* 2007 Aug 14;25(33):6158-63. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.06.012
67. Gonzalez-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. *Immunobiology.* 2006;211(1-2):65-74.
68. Singha H, Mallick AI, Jana C, Isore DP, Goswami TK, Srivastava SK, et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 2008 Aug-Sep;10(10-11):1089-96. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.05.007
69. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2006 May;74(5):2734-41. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2734-2741.2006
70. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol.* 2007 Jun;26(6):435-43. DOI: 10.1089/dna.2006.0552
71. Hu XD, Yu DH, Chen ST, Li SX, Cai H. A combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. *DNA Cell Biol.* 2009 Apr;28(4):191-9. DOI: 10.1089/dna.2008.0790
72. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, Jones S, Haynes JR, Dean HJ. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine.* 2006 May 22;24(21):4475-81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.012
73. Cassataro J, Velikovsky CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Jul;14(7):869-74. DOI: 10.1128/CVI.00472-06
74. Leung L, Srivastava IK, Kan E, Legg H, Sun Y, Greer C, et al. Immunogenicity of HIV-1 Env and Gag in baboons using a DNA prime/protein boost regimen. *AIDS.* 2004 Apr 30;18(7):991-1001. DOI: 10.1097/00002030-200404300-00006

75. McConnell MJ, Hanna PC, Imperiale MJ. Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax. *Mol Ther.* 2007 Jan;15(1):203-10. DOI: 10.1038/sj.mt.6300034
76. Perkins SD, O'Brien LM, Phillpotts RJ. Boosting with an adenovirus-based vaccine improves protective efficacy against Venezuelan equine encephalitis virus following DNA vaccination. *Vaccine.* 2006 Apr 24;24(17):3440-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.020
77. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC. Partial protection against brucella infection in mice by immunization with nonpathogenic alphaproteobacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1296-301. DOI: 10.1128/CVI.00459-06
78. Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR, Park BY, Hur J. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. *Can J Vet Res.* 2019 Jan;83(1):68-74.
79. Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Lotfi AS. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. *Int J Nanomedicine.* 2017 Dec 13;12:8769-8778. DOI: 10.2147/IJN.S149774
80. Yousefi S, Abbassi-Dalooi T, Sekhavati MH, Tahmoorespur M. Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25-BLS *Brucella* antigen. *Microb Pathog.* 2018 Feb;115:50-56. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.045
81. Díaz AG, Quinteros DA, Paolicchi FA, Rivero MA, Palma SD, Pardo RP, et al. Mucosal immunization with polymeric antigen BLS-Omp31 using alternative delivery systems against *Brucella ovis* in rams. *Vet Immunol Immunopathol.* 2019 Mar;209:70-77. DOI: 10.1016/j.vetimm.2019.02.005
82. Tabatabai LB, Pugh GW Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine.* 1994;12:919-924.
83. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2009 Jun 24;27 Suppl 2:B3-12. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071
84. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Oct;63(19-20):2229-36. DOI: 10.1007/s00018-006-6311-4
8. El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int J Vet Sci Med.* 2018 Mar 21;6(Suppl):S31-S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
9. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev Sci Tech.* 2013 Apr;32(1):149-62. DOI: 10.20506/rst.32.1.2189
10. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Review. *Infect Genet Evol.* 2009 Dec; 9(6):1168-84. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001
11. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Apr;60(Pt 4):801-8. DOI: 10.1099/ijs.0.011148-0
12. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system Review. *Microb Cell Fact.* 2006 Mar 23;5:13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
13. Sangari FJ, García-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Sep 1;121(3):337-42. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07123.x
14. Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2013 Feb;20(2):174-80. DOI: 10.1128/CVI.00573-12
15. Comerci DJ, Ugalde JE, Ugalde RA. Development of a New Live Rough Vaccine Against Bovine Brucellosis. In: Makkar H.P., Viljoen G.J. (eds). Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer, Dordrecht, 2005, p. 743-749.
16. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun.* 2003 Jun;71(6):3261-71. DOI: 10.1128/iai.71.6.3261-3271.2003
17. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res.* 2004 Jan-Feb;35(1):1-38. DOI: 10.1051/vetres:2003037
18. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6264-9. DOI: 10.1128/iai.71.11.6264-6269.2003
19. Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, Enright FM, et al. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res.* 1996 May;57(5):677-83.
20. Alcantara RB, Read RD, Valderas MW, Brown TD, Roop RM 2nd. Intact purine biosynthesis pathways are required for wild-type virulence of *Brucella abortus* 2308 in the BALB/c mouse model. *Infect Immun.* 2004 Aug;72(8):4911-7. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4911-4917.2004
21. Almirón M, Martínez M, Sanjuan N, Ugalde RA. Ferrochelatase is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. *Infect Immun.* 2001;69(10):6225-30.
22. Den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA, Tsolis RM. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5143-9. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5143-5149.2004
23. Trant CG, Lacerda TL, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, et al. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. *Infect Immun.* 2010 May;78(5):2283-91. DOI: 10.1128/IAI.01433-09
24. Zhang M, Han X, Liu H, Tian M, Ding C, Song J, et al. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. *Vet Microbiol.* 2013 Jun 28;164(3-4):322-9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.017

References

- Lyamkin GI, Ponomarenko DG, Khudoleev AA, Vilinskaya SV, Zaytsev AA, Kulichenko AN. The epidemiological situation of brucellosis in the Russian Federation and the member states of the Commonwealth of Independent States. *Infectious Diseases. News, Opinions, Training.* 2016;1(14):68-74. (In Russian).
- Prevention of brucellosis: Sanitary and epidemiological rules. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2010, 27 p. (In Russian).
- Okhapkina VYu, Pyatkova NV, Pavlov DL, Susloparov AA. Epidemic Risk of Brucellosis in Modern conditions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2016;15(3):15-22. (In Russian).
- Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans. Review. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 May;34(3):379-94. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x
- Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. Review. *J Vet Sci.* 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
- Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary research.* 2015;46(1):76.
- Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jan;16(1):65-78. DOI: 10.1128/cmr.16.1.65-78.2003

25. Edmonds M, Booth N, Hagius S, Walker J, Enright F, Roop RM 2nd, Elzer P. Attenuation and immunogenicity of a *Brucella abortus* htrA cycL double mutant in cattle. *Vet Microbiol.* 2000 Sep 15;76(1):81-90. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00225-x
26. Vemulapalli R, He Y, Cravero S, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3286-9. DOI: 10.1128/iai.68.6.3286-3289.2000
27. Vemulapalli R, He Y, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet Microbiol.* 2002 Dec 20;90(1-4):521-32. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00232-8
28. Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet Microbiol.* 2005 Aug 10;109(1-2):11-7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.011
29. Hewawaduge C, Senevirathne A, Lee JH. Enhancement of host infectivity, immunity, and protective efficacy by addition of sodium bicarbonate antacid to oral vaccine formulation of live attenuated *Salmonella* secreting *Brucella* antigens. *Microb Pathog.* 2020 Jan;138:103857. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103857
30. Mailybayeva A, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Sansyzybay A, Renukaradhya GJ, et al. Improved influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant sheep and goats. *PLoS One.* 2017 Oct 12; 12(10):e0186484. DOI: 10.1371/journal.pone.0186484
31. Oñate A, Donoso G, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Andrews E. An RNA vaccine based on recombinant *Semliki Forest* virus particles expressing the Cu,Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2005 Jun;73(6):3294-300. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3294-3300.2005
32. Pontes DS, Dorella FA, Ribeiro LA, Miyoshi A, Le Loir Y, Gruss A, et al. Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. *J Drug Target.* 2003;11(8-10):489-93. DOI: 10.1080/10611860410001670035
33. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine.* 2012 Feb 8;30(7):1283-90. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.088
34. Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Syrymkyzy N, et al. Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle. *Vaccine.* 2014 Apr 11;32(18):2034-41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.058
35. Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N. *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2017 Oct-Dec;9(4):163-168.
36. Azizpour M, Jafari P, Hoseini SD, Behrozikhah AM. Cloning and expression of *B. melitensis* bp26 Gene in *Lactococcus lactis* as a food grade vaccine. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2019 Jul-Sep;11(3):264-267.
37. Moustafa D, Garg VK, Jain N, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. *Vaccine.* 2011 Jan 17;29(4):784-94. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.018
38. Dabral N, Moreno-Lafont M, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. *PLoS One.* 2014 Sep 16;9(9):e107180. DOI: 10.1371/journal.pone.0107180
39. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493
40. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012;7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214
41. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS One.* 2011 Jan 14;6(1):e16203. DOI: 10.1371/journal.pone.0016203
42. Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):5200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.0902209
43. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol.* 2012 Jun; 51(2):159-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.02.126
44. Clausse M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c Mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2014 Dec;21(12):1689-94. DOI: 10.1128/CVI.00527-14
45. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Veikovskiy CA, de la Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12): 8079-88.
46. Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, Ding J. The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Sci Rep.* 2019 Mar 5;9(1):3512. DOI: 10.1038/s41598-019-40084-w
47. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah AM. *In vivo* immunogenicity assessment and vaccine efficacy evaluation of a chimeric tandem repeat of epitopic region of OMP31 antigen fused to interleukin 2 (IL-2) against *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *BMC Vet Res.* 2019 Nov 8;15(1):402. DOI: 10.1186/s12917-019-2074-7
48. Kaushik P, Singh DK, Kumar SV, Tiwari AK, Shukla G, Dayal S, Chaudhuri P. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet Res Commun.* 2010 Feb;34(2):119-32. DOI: 10.1007/s11259-009-9337-x
49. Singha H, Mallick AI, Jana C, Fatima N, Owais M, Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2011 Jun 24;29(29-30):4720-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.088
50. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 2001 Aug;69(8):4816-22. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4816-4822.2001
51. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine.* 2007 Sep 17;25(37-38):6721-9.
52. Yang X, Walters N, Robison A, Trunkle T, Pascual DW. Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. *Vaccine.* 2007 Mar 8;25(12):2261-8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.004
53. Isore DP, Goswami TK, Chaudhury P, Mukhopadhyay SK, Ganguly S. Recombinant protein and DNA vaccine construct of *Brucella abortus* L7/L12 gene elicits immune response. *Asian Pac J Health Sci.* 2014;1(4):425-437.
54. Hisham Y, Ashhab Y. Identification of Cross-protective potential antigens against pathogenic *Brucella* spp. through combining pan-genome analysis with reverse

- vaccinology. J Immunol Res. 2018 Dec 9;2018:1474517. DOI: 10.1155/2018/1474517
55. Golshani M, Amani M, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Arsang A, Bouzari S. Comparison of the protective immunity elicited by a *Brucella* cocktail protein vaccine (rL7/L12 + rTOmp31 + rSOmp2b) in two different adjuvant formulations in BALB/c mice. Mol Immunol. 2018 Nov;103:306-311. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.10.002
 56. Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19 + rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. Mol Immunol. 2016 Mar;71:34-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.01.001
 57. Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Min W, et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. Vaccine. 2018 May 17;36(21):3027-3033. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.04.019
 58. Paul S, Peddayalachagiri BV, Nagaraj S, Konduru B, Batra HV. Protective and therapeutic efficacy study of divalent fusion protein rL7/L12-Omp25 against *B. abortus* 544 in presence of IFN γ . Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Oct;102(20):8895-8907. DOI: 10.1007/s00253-018-9314-9
 59. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Bouzari S. Evaluation of immunogenicity of novel multi-epitope subunit vaccines in combination with poly I:C against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. Int Immunopharmacol. 2019 Oct;75:105829. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105829
 60. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. Infect Immun. 2001 Oct;69(10):6264-70.
 61. Onate A, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4857-61. DOI: 10.1128/iai.71.9.4857-4861.2003
 62. Sisilema-Egas F, Céspedes S, Fernández P, Retamal-Díaz A, Sáez D, Oñate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1_0263 and BAB1_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. Vaccine. 2012 Nov 26;30(50):7286-91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.09.039
 63. Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun. 2002 May;70(5):2507-11. DOI: 10.1128/iai.70.5.2507-2511.2002
 64. A Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. Vaccine. 1997;15:1851-7.
 65. Leclercq S, Harms JS, Rosinha GMS, Azevedo V, Oliveira SC. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. J Med Microbiol. 2002 Jan;51(1):20-26. DOI: 10.1099/0022-1317-51-1-20
 66. Brandsma JL, Shlyankevich M, Zelterman D, Su Y. Therapeutic vaccination of rabbits with a ubiquitin-fused papillomavirus E1, E2, E6 and E7 DNA vaccine. Vaccine. 2007 Aug 14;25(33):6158-63. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.06.012
 67. Gonzalez-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. Immunobiology. 2006;211(1-2):65-74.
 68. Singha H, Mallick AI, Jana C, Isore DP, Goswami TK, Srivastava SK, et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. Microbes Infect. 2008 Aug-Sep;10(10-11):1089-96. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.05.007
 69. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. Infect Immun. 2006 May;74(5):2734-41. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2734-2741.2006
 70. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. DNA Cell Biol. 2007 Jun;26(6):435-43. DOI: 10.1089/dna.2006.0552
 71. Hu XD, Yu DH, Chen ST, Li SX, Cai H. A combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. DNA Cell Biol. 2009 Apr;28(4):191-9. DOI: 10.1089/dna.2008.0790
 72. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, Jones S, Haynes JR, Dean HJ. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. Vaccine. 2006 May 22;24(21):4475-81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.012
 73. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. Clin Vaccine Immunol. 2007 Jul;14(7):869-74. DOI: 10.1128/CVI.00472-06
 74. Leung L, Srivastava IK, Kan E, Legg H, Sun Y, Greer C, et al. Immunogenicity of HIV-1 Env and Gag in baboons using a DNA prime/protein boost regimen. AIDS. 2004 Apr 30;18(7):991-1001. DOI: 10.1097/00002030-200404300-00006
 75. McConnell MJ, Hanna PC, Imperiale MJ. Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax. Mol Ther. 2007 Jan;15(1):203-10. DOI: 10.1038/sj.mt.6300034
 76. Perkins SD, O'Brien LM, Phillipotts RJ. Boosting with an adenovirus-based vaccine improves protective efficacy against Venezuelan equine encephalitis virus following DNA vaccination. Vaccine. 2006 Apr 24;24(17):3440-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.020
 77. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC. Partial protection against brucella infection in mice by immunization with nonpathogenic alphaproteobacteria. Clin Vaccine Immunol. 2007 Oct;14(10):1296-301. DOI: 10.1128/CVI.00459-06
 78. Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR, Park BY, Hur J. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. Can J Vet Res. 2019 Jan;83(1):68-74.
 79. Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Lotfi AS. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. Int J Nanomedicine. 2017 Dec 13;12:8769-8778. DOI: 10.2147/IJN.S149774
 80. Yousefi S, Abbassi-Dalooi T, Sekhavati MH, Tahmoorespur M. Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25-BLS *Brucella* antigen. Microb Pathog. 2018 Feb;115:50-56. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.045
 81. Diaz AG, Quinteros DA, Paolicchi FA, Rivero MA, Palma SD, Pardo RP, et al. Mucosal immunization with polymeric antigen BLS-Omp31 using alternative delivery systems against *Brucella ovis* in rams. Vet Immunol Immunopathol. 2019 Mar;209:70-77. DOI: 10.1016/j.vetimm.2019.02.005
 82. Tabatabai LB, Pugh GW. Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. Vaccine. 1994;12:919-924.
 83. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. Vaccine. 2009 Jun 24;27 Suppl 2:B3-12. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071
 84. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. Cell Mol Life Sci. 2006 Oct;63(19-20):2229-36. DOI: 10.1007/s00018-006-6311-4