DOI:10.16016/j.2097-0927.202207117

铜绿假单胞菌重组 PcrV-OprI 疫苗保护小鼠骨折固定术后感染的作用

张译文[1],程 新[2],张 怡[2],张月月[2],邹全明[2],顾 江[2],肖 洪[3],胡仁建[1] 400054 重庆,重庆理工大学药学与生物工程学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系[2];400020 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)958 医院骨科[3]

[摘要] **目的** 构建髓内针固定小鼠开放性股骨骨折后铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)感染模型,评价候选 PA 疫苗重组 PcrV-OprI 的免疫保护效果。**方法** 采用大肠杆菌表达 PcrV-OprI 蛋白,依次经亲和、疏水层析纯化得到目的蛋白。C57BL/6J 小鼠在第 0、14、21 天免疫 PcrV-OprI 蛋白后,使用酶联免疫吸附法检测血清中特异性 IgG 抗体及亚型效价。末次免疫后 14 d,进行髓内针固定小鼠开放性股骨骨折术。术后 PAO1 菌株感染,通过比较免疫组与对照组细菌定植、体质量、组织病理学和 X 线影像表现等差异,评价 PcrV-OprI 抗原保护效果。**结果** PcrV-OprI 免疫组小鼠血清中特异性抗体水平显著升高($P<0.05$),且以 IgG1 亚型为主;PcrV-OprI 免疫组体质量减轻幅度显著低于对照组($P<0.05$),PcrV-OprI 免疫组软组织、骨内、植入物细菌数量显著低于对照组($P<0.05$);PcrV-OprI 免疫组炎症病理损伤小于对照组;在观察期结束时,PcrV-OprI 免疫组骨折线清晰且逐渐闭合,呈愈合趋势而对照组骨折处未见明显愈合。**结论** PcrV-OprI 免疫能有效引起小鼠体液免疫应答,在开放性骨折髓内针固定术后 PA 感染模型中具有显著保护效果。

[关键词] 铜绿假单胞菌;PcrV;OprI;开放性骨折;免疫保护
[中图法分类号] R392.7; R619.3; R683.05 [文献标志码] A

Recombinant protein vaccine PcrV-OprI prevents mice against *Pseudomonas aeruginosa* infection after intramedullary nailing

ZHANG Yiwen[1], CHENG Xin[2], ZHANG Yi[2], ZHANG Yueyue[2], ZOU Quanming[2], GU Jiang[2], XIAO Hong[3], HU Renjian[1] [1]School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing, 400054; [2]Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Orthopaedics, No. 958 Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400020, China

[**Abstract**] **Objective** To establish a model of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection in mice with open fractures after the femur with intramedullary nailing and to explore the immunoprotective effects of recombinant PcrV-OprI. **Methods** PcrV-OprI protein was expressed in *E. coli*, and then the target protein was purified by affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The C57BL/6J mice were immunized with PcrV-OprI protein on Day 0, 14 and 21. After that, the titers of specific IgGs and their subtypes were determined by ELISA. In 14 d after the final vaccination, open femur fractures and intramedullary nailing were performed in mice, which was followed by a challenge with PAO1 strain. The protection of PcrV-OprI was assessed with bacterial colonization, body weight, histology, and X-ray imaging. **Results** The levels of specific antibodies were significantly higher in PcrV-OprI-immunized sera than that of

[基金项目] 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0799);陆军军医大学临床重大领域技术创新项目(CX2019LC121)
[通信作者] 胡仁建,E-mail:hrj@cqut.edu.cn
顾 江,E-mail:jianggu2012@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the control group ($P<0.05$), and the obtained IgG1 was the predominating subtype. The loss of body weight of the immunized mice was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). In addition, a similiar trend was observed in the amount of colonized bacteria in the tissues, bones, and implants ($P<0.05$). Moreover, the histological observation suggested that bacteria caused less damage in the PcrV-OprI-immunized mice. At the end of the observation period, the fracture line in immunized mice was clear, indicating gradual healing. **Conclusion** Vaccination of PcrV-OprI is efficient in causing a humoral immune response and shows significant protective effect on PA infection model in mice after open fractures of the femur with intramedullary nailing.

[**Key words**] *Pseudomonas aeruginosa*; PcrV; OprI; open fracture; immune protection

Supported by the Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0799) and the Innovation Project of Technology Innovation in Major Clinical Fields of Army Medical University (CX2019LC121). Corresponding author: HU Renjian, E-mail: hrj@cqut.edu.cn; GU Jiang, E-mail: jianggu2012@163.com

近年来,随着骨科内固定器械的广泛使用,骨科植入物手术部位的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)感染愈发严重。据研究报道,5%~20%的革兰阴性杆菌骨感染是由 PA 引起[1],其中约 14%的开放性骨折患者会合并 PA 感染[2]。特别是免疫力低下人群,可因 PA 引发的感染而致病[3]。PA 感染导致的耐药问题十分严峻,已发展成为多重耐药菌。抗生素的效果越发难以满足需求,导致临床上抗生素治疗 PA 感染的效果不理想[4]。因此,PA 引起的骨折术后感染的预防和治疗成为亟待解决的医学难题。

疫苗接种是有效预防 PA 感染与流行的重要策略之一。自 20 世纪 60 年代以来,全球共计研发了 60 余种对抗 PA 的疫苗,仅有 11 种进入临床试验,其中 3 种进入Ⅲ期临床阶段,最终均宣告失败,尚无 PA 疫苗上市[5]。抗原是疫苗核心成分,PcrV 作为 PA Ⅲ型分泌系统关键蛋白[6],参与效应蛋白从 PA 到宿主细胞的转移过程。其在结构和功能上保守,87.7%~90.2%的 PA 菌株携带 PcrV 编码基因[7-9]。然而,基于 PcrV 重组表达抗原却未见在 PA 疫苗上应用。有研究表明,PcrV 在大肠杆菌中的表达量低,易沉淀、降解,限制了 PcrV 蛋白作为 PA 的抗原[10]。OprI 作为 PA 的外膜脂蛋白,能激活 Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR),进而启动固有免疫应答发挥免疫佐剂的作用,刺激机体产生多种类型的免疫应答[11]。抗原融合是有效提高保护效果的重要手段。本研究拟将 PcrV 与 OprI 抗原融合,构建 PcrV-OprI 融合蛋白,并在开放性骨折感染模型上评价 PcrV-OprI 抗原免疫保护作用。

1 材料与方法

1.1 菌株

铜绿假单胞菌菌株 PAO1(ATCC, Manassas VA, United States),-80 ℃冻存;PcrV-OprI 的编码序列 $PcrV_{28-294}$-$OprI_{25-62}$ 由上海生工公司合成,连接至载体 pGEX-6P-1,转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,得到 pGEX-6P-1-PcrV-OprI/BL21(DE3)工程菌。

1.2 试剂与仪器

$Al(OH)_3$ 佐剂(CRODA, Denmark),山羊抗小鼠 IgG Fc HRP(北京中杉生物公司),GST 4B 亲和填料和 PreScission Protease 酶(GE 公司),异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(上海生工生物公司),TMB 底物显色液(北京天根生物公司),Avant Pure 150 纯化仪(GE,美国),高效液相色谱仪(Aligent,美国),低温高速离心机(卢湘仪,中国),光学显微镜(永科光学,中国),IVIS Spectrum CT 分析仪(PerkinElmer,美国)。

1.3 PcrV-OprI 抗原表达与纯化

将重组质粒 pGEX-6P-1-PcrV-OprI 转化至 *E. coli* BL21(DE3),抗性平板上挑取单克隆接种至含氨苄抗生素 LB 培养基中,180 r/min、37 ℃培养过夜。取 20 mL 的菌液加入到 2 L 含氨苄的 LB 培养基中,220 r/min、37 ℃培养至 $D(600)$ 约为 0.8 时,加入终浓度 200 μmol/L IPTG 诱导剂,150 r/min、16 ℃培养 12 h。诱导结束后,收集菌体并经超声裂解后上清液与 GST 4B 结合,PreScission Protease 酶切,收集 PcrV-OprI 初纯样品。PcrV-OprI 初纯样品经 Avant pure 150 纯化仪通过阴离子交换层析、疏水层析,内毒素吸附树脂进行精细纯化。通过 SDS-PAGE 及 HPLC 分析 PcrV-OprI 纯化结果,N 端氨基酸测序验证 PcrV-OprI 抗原表达准确性。

1.4 小鼠与免疫

选取 6~8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠(北京维通利华实验动物公司),按随机数字表法分为 2 组,每组 10 只,体质量 18~22 g。免疫组(PcrV-OprI)将 20 μg 的 PcrV-OprI 抗原与 $Al(OH)_3$ 佐剂混合吸附 1 h,经肌肉注射免疫。对照组(PBS)用等体积抗原保存缓冲液 PBS 作为阴性对照。各组小鼠分别在 0、14、

21 d 免疫,共计免疫 3 次。实验动物遵循 3R 原则,符合伦理标准(动物实验伦理编号:AMUWEC20211289)。

1.5　血清中特异性抗体的检测

末次免疫后 7 d,小鼠尾静脉取血分离血清,通过 ELISA 法测定免疫小鼠血清中抗 PcrV-OprI IgG 的滴度。酶标板每孔 100 μL 将 PcrV-OprI 稀释到 6 μg/mL 的抗原包被液,4 ℃包被过夜,洗涤 3 次。每孔 250 μL 1%BSA 封闭液,37 ℃封闭 2 h,洗涤。将抗 PcrV-OprI 血清(1∶1 000)梯度稀释,37 ℃孵育 1 h,洗涤。将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 抗体(1∶5 000)分别加入酶标板中,37 ℃孵育 40 min,洗涤。加入 100 μL TMB 底物显色液,避光孵育 10 min 并终止,在 450 nm 处读取光密度值。以待测样本(S)与阴性对照(N)比值即 S/N 值≥2.1 作为阳性结果判断标准。

1.6　开放性骨折术后感染模型的构建

参考 OEZEL 等[12]进行开放性骨折模型构建。小鼠腹腔麻醉,待深度麻醉,侧卧固定,剃除腿部毛发并用碘伏消毒。保持小鼠左下肢伸直状态下于前外侧沿股骨从髋关节至膝关节做一纵向切口,长 0.8~1.0 cm,分离股外侧肌和股二头肌,抬起张阔筋膜肌,将股骨充分暴露在手术视野中,使用线锯在股骨骨干中上 1/3 交界处断开股骨。将长度为 0.8 cm 的克氏针置于股骨骨折断端两侧的骨髓腔内,使股骨得以固定,生理盐水冲洗伤口,6-0 蚕丝线缝合切口,用微量注射器于骨折处接种 1.0×10^7 CFU 的铜绿假单胞菌 PAO1。术后常规给水及饮食,观察小鼠切口的愈合情况以及造模前后小鼠体质量的变化数值。

1.7　PcrV-OprI 抗原免疫保护效果及对骨折愈合的影响

PAO1 细菌感染后 3 d,小鼠实施安乐死,从胫骨近端到股骨中段采集组织样本,分离股骨与植入物。软组织样本通过匀浆器研磨,股骨与植入物经 1 mL PBS 25 kHz 超声处理 10 min,涡旋 2 min 后分离细菌。组织匀浆和超声处理溶液进行梯度稀释后,取 10 μL 涂布于 LB 平皿上,37 ℃培养 15 h,进行菌落计数。小鼠骨折术后感染第 1、7、14 天,使用 IVIS Spectrum CT 小动物活体三维成像仪 CT 扫描记录骨折及其愈合情况。

1.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间采用非配对 t 检验,多组间采用单因素方差分析。$P<0.05$ 示差异有统计学意义。

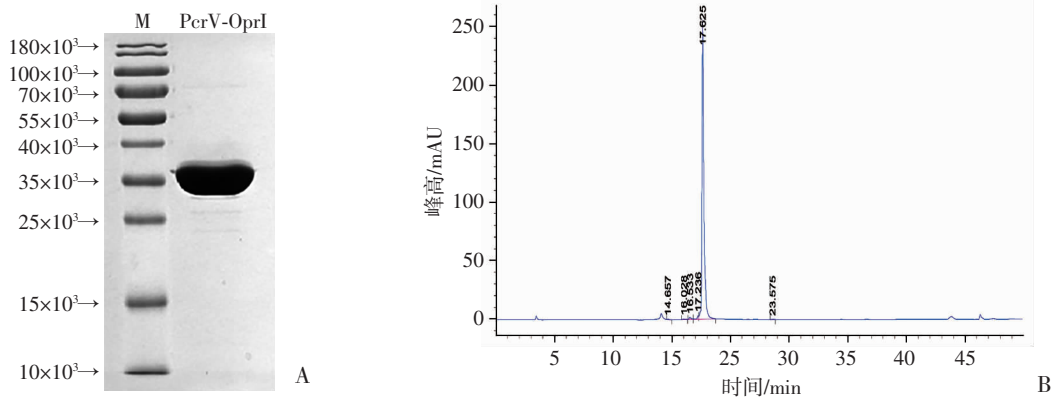
2　结果

2.1　重组 PcrV-OprI 蛋白的纯化与鉴定

pGEX-6P-1-PcrV-OprI/BL21(DE3)工程菌经 200 μmol/L IPTG 诱导,PcrV-OprI 抗原以可溶形式表达。经纯化后,SDS-PAGE 检测结果显示,PcrV-OprI 抗原理论分子量为 35.5×10^3,电泳条带位置与理论值相符且纯度较高(图 1A)。进一步通过 HPLC 检测 PcrV-OprI 抗原的纯度,结果显示其纯度为 98.3%(图 1B)。PcrV-OprI 抗原 N 端氨基酸检测序列与理论氨基酸序列一致。

2.2　重组 PcrV-OprI 诱导的体液免疫应答

为了分析小鼠血清中 PcrV-OprI 特异性 IgG 及亚型,末次免疫后 7 d 进行 ELISA 检测。PcrV-OprI 抗原在小鼠体内可诱导产生高效价的特异性抗体,较 PBS 组明显升高($P<0.05$,图 2A);PcrV-OprI 组 IgG 亚型 IgG1、IgG2a、IgG2b 均能检出,IgG1、IgG2b 抗体滴度较 PBS 组明显升高($P<0.05$,图 2B~D),且 IgG1 明显高于 IgG2a、IgG2b。结果提示 PcrV-OprI 能有效刺激 Th1 和 Th2 型体液免疫反应,且主要是 Th2 型应答。



A:纯化后 PcrV-OprI 重组蛋白条带　M:标准;B:PcrV-OprI 重组蛋白的 HPLC 检测

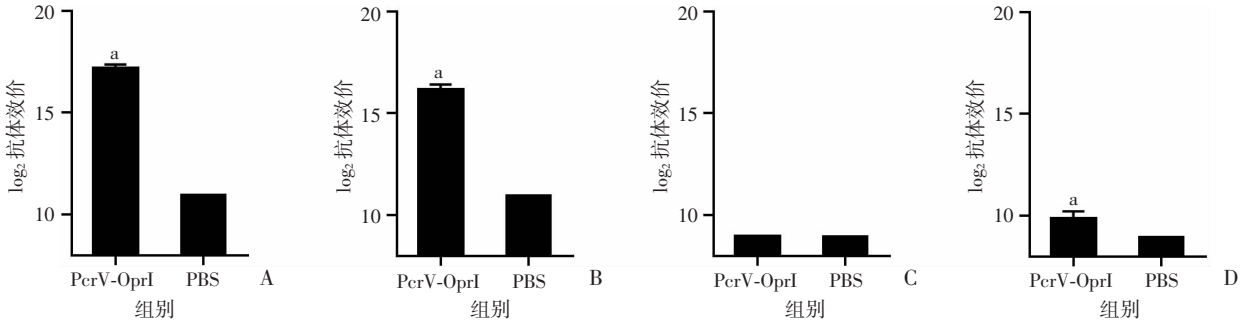
图 1　PcrV-OprI 重组蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳及 HPLC 检测

2.3 重组 PcrV-OprI 抗原免疫保护效果

为了评价 PcrV-OprI 抗原在小鼠体内的保护作用,构建了开放性骨折感染 PA 模型。如图 3A 显示,感染后 3 d,PcrV-OprI 组手术切口逐渐愈合,PBS 组切口未见愈合且伴有少量脓液;第 7 天,PcrV-OprI 组腿部毛发逐渐恢复生长,PBS 组手术切口周围未见生长。此外,PcrV-OprI 组体质量减轻幅度明显低于 PBS 组($P<0.05$,图 3B)。软组织、股骨、植入物细菌定植分析显示,PcrV-OprI 组的细菌负荷显著低于 PBS 组($P<0.05$,图 3C)。结果提示 PcrV-OprI 抗原通过抑制铜绿假单胞菌在软组织、股骨、植入物上的定植而发挥保护作用。

2.4 重组 PcrV-OprI 抗原免疫对小鼠骨折愈合的影响

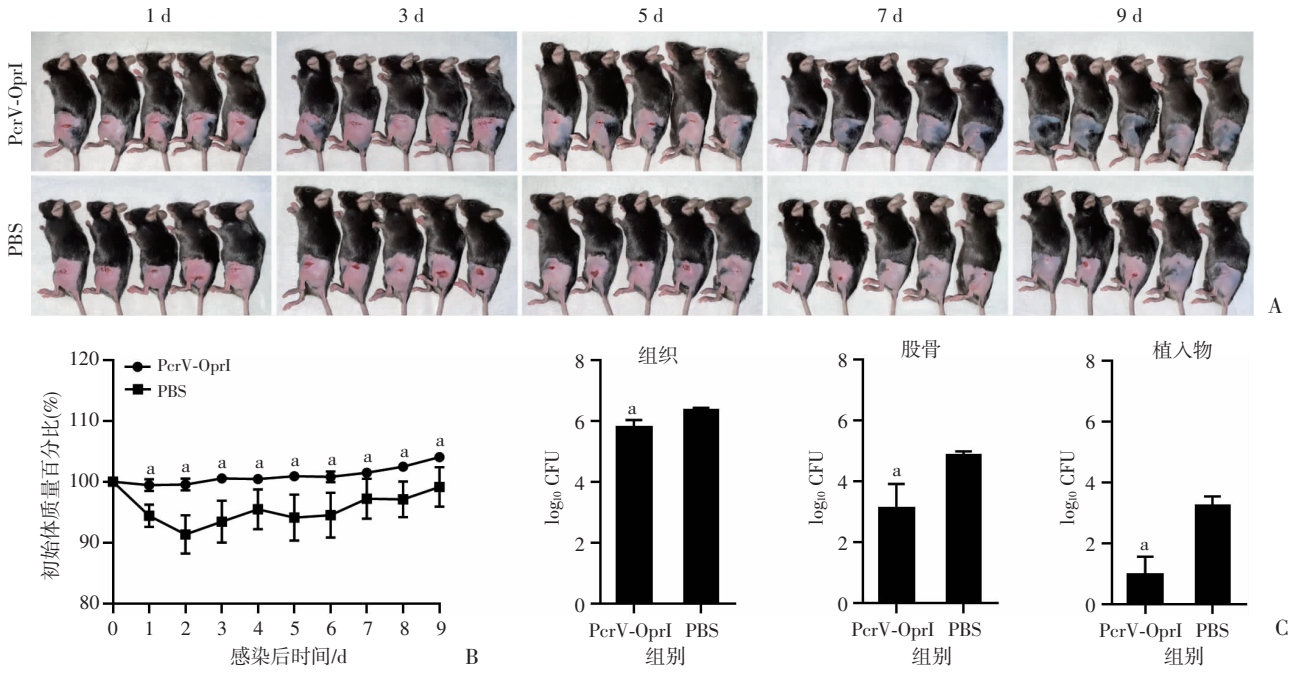
为了在开放性骨折感染 PA 模型中进一步评价 PcrV-OprI 抗原免疫对骨折愈合的影响,对骨组织进行组织病理学观察,结果显示 PcrV-OprI 组的肌肉软组织形态正常,而 PBS 组的软组织被 PAO1 细菌吞噬分解,伴有明显的炎症病理改变,包括炎性细胞浸润和出血。PcrV-OprI 组的股骨仅出现少量炎症细胞浸润,而 PBS 组股骨感染严重且伴有大量出血(图 4A)。CT 扫描结果显示,PcrV-OprI 组骨折处出现丘状钙化骨痂,且随时间增加骨折线逐渐清晰且逐渐闭合,呈愈合趋势;而 PBS 组骨折处钙化骨痂形成较少,感染后出现固定植入物穿透膝关节,未见明显愈合(图 4B)。这些结果提示 PcrV-OprI 抗原免疫对 PA 感染后骨折的愈合具有改善作用。



a:$P<0.05$,与 PBS 组比较

A:抗 PcrV-OprI 抗体的应答水平;B:抗 PcrV-OprI IgG1 的效价分析;C:抗 PcrV-OprI IgG2a 的效价分析;D:抗 PcrV-OprI IgG2b 的效价分析

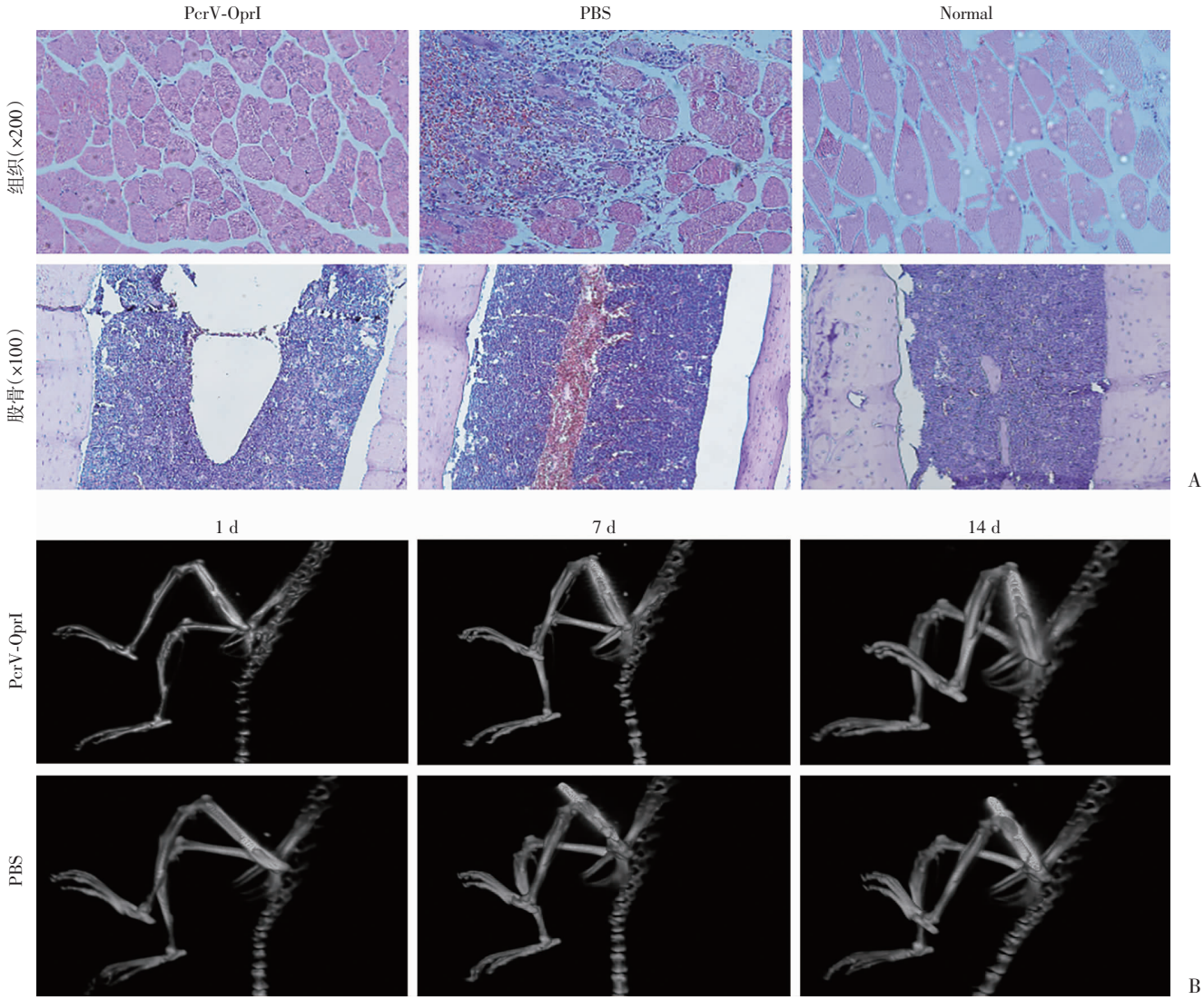
图 2 ELISA 法检测抗 PcrV-OprI 抗体效价及抗体亚型分析



a:$P<0.05$,与 PBS 组比较

A:PAO1 感染后小鼠大体观察;B:PAO1 感染后小鼠体质量变化;C:PAO1 感染后小鼠组织、股骨、植入物细菌定植量变化

图 3 PcrV-OprI 重组蛋白对小鼠骨折固定术后感染铜绿假单胞菌的免疫保护效果



A:HE 染色观察 PAO1 感染后小鼠组织、股骨形态变化;B:PAO1 感染后小鼠左侧股骨(左股骨骨干中部骨折)X 线表现

图 4 HE 染色和 X 线观察 PcrV-OprI 重组蛋白免疫对小鼠股骨骨折愈合的影响

3 讨论

抗原筛选和优化是成功研制 PA 疫苗的核心环节。将 PcrV 与 OprI 抗原通过柔性 Linker(Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly)融合,有助于融合蛋白的正确折叠[13-14]。所以,本研究中的 PcrV、OprI 抗原经融合后,抗原稳定且可溶性较好,避免了 PcrV 抗原溶解性差和易降解的问题。本研究证实 PcrV-OprI 抗原能诱导机体产生较强的 Th1 和 Th2 免疫应答,其中以 Th2 型应答为主。这可能取决于本研究采用 $Al(OH)_3$ 佐剂,该佐剂主要倾向于 Th2 型免疫应答[15]。有研究表明,PcrV 抗原能够诱导 Th17 应答反应,细胞因子 IL-17 在 PA 感染早期表达迅速升高,并持续存在从而发挥保护效果[16]。PcrV-OprI 蛋白所诱导的免疫效应物主要是 B 淋巴细胞产生的抗 PcrV-OprI 特异性 IgG 抗体,它可能通过以下途径发挥其功能:第一,抗 PcrV-OprI 抗体结合毒素的酶活性位点,阻断毒素的释放[17];第二,调理吞噬和抗 PcrV-OprI 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用[18];第三,抗 PcrV-OprI 抗体通过经典途径激活补体系统[19],产生多种效应功能,有效杀伤铜绿假单胞菌。

本研究构建的小鼠铜绿假单胞菌开放性骨折感染模型,可为 PA 疫苗临床试验候选模型提供理论指导。对于 PA 开放性骨折感染模型,国内外鲜有报道。大多数骨折感染模型动物多选择家兔、羊、犬等[20],但对于疫苗评价需大批量的模型进行保护性验证。因此,

构建小鼠开放性骨折感染模型具有十分重要的意义。THOMPSON 等[21]通过小鼠股骨关节植入携带 PA 的克氏针造成感染。SHIELS 等[22]将克氏针置入鼠双侧股骨骨髓腔内,于鼠尾静脉中注入细菌。细菌感染方式也是影响模型稳定的重要因素,植入物携带细菌以及尾静脉注射细菌等方式依然存在诸多局限性。细菌感染剂量不准确、细菌定植部位不精确是造成模型失败的主要原因之一。本研究骨折感染模型在参考 THOMPSON 等[21]基础上,模拟临床上骨折病理症状,股骨中处折断,并用克氏针固定,微量注射器精准定植 PA。模型构建简便,易操作,感染剂量可控。然而该模型不足之处在于髓内植入物单一固定未有钛固定材料稳定。需进一步了解小鼠股骨髓腔的形态结构、皮质厚度以及髓内针的直径或长度是否会影响骨愈合。

铜绿假单胞菌易感染复发,难以清除[23]。研究报道,铜绿假单胞菌感染定植主要在皮肤软组织、肺部、创口处[24-28]。临床上抗生素治疗 PA 感染愈发困难,患者感染 PA 后治疗周期长。疫苗等免疫学方法是防控 PA 感染的重要手段。本研究初步探索了 PcrV-OprI 抗原免疫能有效减少 PA 骨折感染细菌定植,对 PA 骨折感染后愈合具有改善作用。

综上所述,PcrV-OprI 免疫能有效引起小鼠体液免疫应答,在开放性骨折髓内针固定术后 PA 感染模型中具有显著保护效果。

参考文献:

[1] BASSETTI M, VENA A, CROXATTO A, *et al*. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. Drugs Context, 2018, 7: 212527. DOI:10.7573/dic.212527.

[2] TRIFFAULT-FILLIT C, FERRY T, LAURENT F, *et al*. Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(3): 353-358. DOI:10.1016/j.cmi.2018.04.035.

[3] CHEVALIER S, BOUFFARTIGUES E, BODILIS J, *et al*. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins[J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(5): 698-722. DOI:10.1093/femsre/fux020.

[4] PELEGRIN A C, PALMIERI M, MIRANDE C, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomics update[J]. FEMS Microbiol Rev, 2021, 45(6): fuab026. DOI:10.1093/femsre/fuab026.

[5] HOGGARTH A, WEAVER A, PU Q Q, *et al*. Mechanistic research holds promise for bacterial vaccines and phage therapies for *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 909-924. DOI:10.2147/DDDT.S189847.

[6] THANABALASURIAR A, SUREWAARD B G, WILLSON M E, *et al*. Bispecific antibody targets multiple *Pseudomonas aeruginosa* evasion mechanisms in the lung vasculature[J]. J Clin Invest, 2017, 127(6): 2249-2261. DOI:10.1172/JCI89652.

[7] BORKAR D S, FLEISZIG S M, LEONG C, *et al*. Association between cytotoxic and invasive *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in bacterial keratitis[J]. JAMA Ophthalmol, 2013, 131(2): 147-153. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2013.778.

[8] FELTMAN H, SCHULERT G, KHAN S, *et al*. Prevalence of type Ⅲ secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology (Reading), 2001, 147(Pt 10): 2659-2669. DOI:10.1099/00221287-147-10-2659.

[9] GAREY K W, VO Q P, LAROCCO M T, *et al*. Prevalence of type Ⅲ secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia[J]. J Chemother, 2008, 20(6): 714-720. DOI:10.1179/joc.2008.20.6.714.

[10] WAN C, GAO C, XIE Q, *et al*. Flagella hook protein FlgE is a novel vaccine candidate of *Pseudomonas aeruginosa* identified by a genomic approach[J]. Vaccine, 2021, 39(17): 2386-2395. DOI:10.1016/j.vaccine.2021.03.051.

[11] 刘潇, 李文桂. 铜绿假单胞菌外膜蛋白I(OprI)疫苗的研制现状[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(6): 590-595. DOI:10.13350/j.cjpb.170625.
LIU X, LI W G. Status of research on the outer membrane protein I of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Pathog Biol, 2017, 12(6): 590-595. DOI:10.13350/j.cjpb.170625.

[12] OEZEL L, BÜREN C, SCHOLZ A O, *et al*. Effect of antibiotic infused calcium sulfate/hydroxyapatite (CAS/HA) insets on implant-associated osteitis in a femur fracture model in mice[J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0213590. DOI:10.1371/journal.pone.0213590.

[13] GU J, LIU Y Q, YU S, *et al*. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice [J]. Microbes Infect, 2009, 11(10/11): 835-841. DOI:10.1016/j.micinf.2009.04.024.

[14] GU H, LIAO Y L, ZHANG J, *et al*. Rational design and

evaluation of an artificial *Escherichia coli* K1 protein vaccine candidate based on the structure of OmpA[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 172. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00172.

[15] LUO M, SHAO B, YU J Y, *et al*. Simultaneous enhancement of cellular and humoral immunity by the high salt formulation of Al(OH)3 adjuvant[J]. Cell Res, 2017, 27(4): 586-589. DOI:10.1038/cr.2017.14.

[16] WANG Y, CHENG X, WAN C, *et al*. Development of a chimeric vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* based on the Th17-stimulating epitopes of PcrV and AmpC[J]. Front Immunol, 2020, 11: 601601. DOI:10.3389/fimmu.2020.601601.

[17] SAWA T, ITO E, NGUYEN V H, *et al*. Anti-PcrV antibody strategies against virulent *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(10): 2843-2852. DOI:10.4161/21645515.2014.971641.

[18] WARRENER P, VARKEY R, BONNELL J C, *et al*. A novel anti-PcrV antibody providing enhanced protection against *Pseudomonas aeruginosa* in multiple animal infection models[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(8): 4384-4391. DOI:10.1128/AAC.02643-14.

[19] MEYER S, LEUSEN J H W, BOROSS P. Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer[J]. mAbs, 2014, 6(5): 1133-1144. DOI:10.4161/mabs.29670.

[20] WONG R M Y, LI T K, LI J, *et al*. A systematic review on current osteosynthesis-associated infection animal fracture models[J]. J Orthop Translat, 2020, 23: 8-20. DOI:10.1016/j.jot.2020.03.002.

[21] THOMPSON J M, MILLER R J, ASHBAUGH A G, *et al*. Mouse model of Gram-negative prosthetic joint infection reveals therapeutic targets[J]. JCI Insight, 2018, 3(17): 121737. DOI:10.1172/jci.insight.121737.

[22] SHIELS S M, BEDIGREW K M, WENKE J C. Development of a hematogenous implant-related infection in a rat model[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16: 255. DOI:10.1186/s12891-015-0699-7.

[23] HALL-STOODLEY L, STOODLEY P. Evolving concepts in biofilm infections[J]. Cell Microbiol, 2009, 11(7): 1034-1043. DOI:10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.

[24] SHORTRIDGE D, PFALLER M A, STREIT J M, *et al*. Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against contemporary (2015-2017) *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a global surveillance programme[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 21: 60-64. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.10.009.

[25] BASSETTI M, VENA A, CROXATTO A, *et al*. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. Drugs Context, 2018, 7: 212527. DOI:10.7573/dic.212527.

[26] BURROWS L L. The therapeutic pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. ACS Infect Dis, 2018, 4(7): 1041-1047. DOI:10.1021/acsinfecdis.8b00112.

[27] NGUYEN L, GARCIA J, GRUENBERG K, *et al*. Multidrug-resistant Pseudomonas infections: hard to treat, but hope on the horizon? [J]. Curr Infect Dis Rep, 2018, 20(8): 23. DOI:10.1007/s11908-018-0629-6.

[28] PARKINS M D, SOMAYAJI R, WATERS V J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4): e00019-e00018. DOI:10.1128/CMR.00019-18.

(收稿:2022-07-18;修回:2022-08-23)

(编辑 邓强庭)