

文章编号: 1004-0374(2013)01-0091-09

动物布鲁氏菌病疫苗应用现状及研究进展

丁家波, 冯忠武*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要: 布鲁氏菌病(布病)是由布鲁氏菌引起的一种重要的人兽共患病,近几年在世界范围内呈反弹趋势,我国尤其严重,该病对畜牧业和人类健康均构成严重威胁。疫苗免疫是预防和控制布病的重要措施之一,选择和使用有效的布病疫苗关系到布病防控的成效。迄今国内外已有多个弱毒活疫苗在使用,其中使用最为广泛的有光滑型牛种 S19 株、羊种 Rev.1 株、猪种 S2 株,以及粗糙型牛种 RB51 株。不同疫苗各有其优缺点,科学家们正试图研发更理想的布病疫苗。目前人们正通过基因工程技术构建重组弱毒疫苗、分子标记疫苗、DNA 疫苗以及亚单位疫苗。对布病疫苗的应用及新型疫苗的研究现状作一综述。

关键词: 布鲁氏菌病; 重组疫苗; 亚单位疫苗

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A

Current application of brucellosis vaccines and its research advances

DING Jia-Bo, FENG Zhong-Wu*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Brucellosis is a crucial zoonosis caused by *Brucella*, which has some traits of wide hosts, great infectivity, serious damage and difficulty in cure. In recent years, brucellosis rebounds worldwide, and it is especially serious in China. It causes great losses to farming and people's health. Vaccination is one of the most effective measures used to control the disease, and the application of appropriate vaccine decides the brucellosis controlling effect. Up to now, there are several attenuated vaccines used in domestic and abroad, in which the most widely used vaccines were *B. abortus* strain 19 (S19), *B. melitensis* Rev.1 (Rev.1), *B. suis* strain 2 (S2), and rough strain *B. abortus* 51 (RB51), and each vaccine has its advantages and disadvantages. Scientists are now trying to develop more effective vaccines to deal with increasingly serious brucellosis epidemic situation. They are now constructing recombinant and molecular marker strains, DNA vaccines and subunit vaccines. Some conventional and new-style vaccines were reviewed in this paper.

Key words: brucellosis; recombinant vaccine; subunit vaccine

布鲁氏菌 (*Brucella*) 是革兰氏阴性、兼性胞内寄生菌,能感染牛、羊、猪,引起家畜的流产、高热等,给畜牧业造成严重的经济损失。绝大多数布鲁氏菌都可以感染人,并引起严重的疾病,需要长时间的抗生素治疗,而且往往会留下严重的后遗症^[1]。因此,在布鲁氏菌病(布病)流行的国家,消除布病一直是公共健康计划中最重要的目标之一^[2]。最近,我国也有几起布鲁氏菌感染人的事件发生,根据卫生部网站上公布的布病疫情,2011年我国布病发病人数为 38 151 人,为历年新高。

根据布鲁氏菌流行病学特点、宿主偏嗜性以及基因组结构上的差异,通常可将布鲁氏菌分为 6 个不同的种,包括羊种布鲁氏菌 (*Brucella. abortus*)、牛种布鲁氏菌 (*B. abortus*)、猪种布鲁氏菌 (*B. suis*)、绵羊

收稿日期: 2012-07-03; 修回日期: 2012-08-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2012AA101302)

*通信作者: E-mail: fengzhongwu@ivdc.gov.cn; Tel: 010-62103799

种布鲁氏菌 (*B. ovis*)、沙林鼠种布鲁氏菌 (*B. neotomae*) 和犬种布鲁氏菌 (*B. canis*)^[2-3]。20 世纪 90 年代, 就有关于海洋哺乳动物感染一种新型布鲁氏菌的报道^[4-5], 但其分类尚未最终确定, 可能会被划分为鲸种 (*B. ceti*) 或鳍种 (*B. pinnipedialis*); 2008 年, 又从中欧地区常见的野鼠体内分离到一种田鼠布鲁氏菌 (*B. microti*)^[6-7]。在世界范围内, 引起人发病的主要是牛种布鲁氏菌 (*B. abortus*)、羊种布鲁氏菌 (*B. melitensis*) 和猪种布鲁氏菌 (*B. suis*)。

根据形态差异, 布鲁氏菌可分为粗糙型 (rough, R) 和光滑型 (smooth, S) 两种。S 型细菌细胞壁具有完整的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS); 而 R 型布鲁氏菌的 LPS 中的 O-侧链缺失。山羊种、牛种和猪种布鲁氏菌常见光滑型, 偶见粗糙型菌株, 绵羊种和犬种布鲁氏菌则是天然的粗糙型, 而沙林鼠种目前只有光滑型菌株的报道^[8]。在一定条件下, 光滑型表型可以和粗糙型表型相互转换, 这主要是由于参与 LPS 合成的基因发生突变或缺失造成的^[9]。光滑型菌株的 LPS 参与抑制宿主细胞凋亡, 利于细菌在宿主细胞内生存, 逃避宿主免疫系统, 因此, 在通常情况下, 光滑型菌株突变为粗糙型菌株意味着毒力的下降^[10-12]。当机体感染光滑型布鲁氏菌后, 主要产生针对 O-侧链的抗体, 因此, 布病的血清学检测也主要是针对 O-侧链的抗体。R 型突变菌株既不会刺激机体产生针对 O-侧链的抗体, 也不会和这些抗体发生特异性反应。因此, S 型和 R 型布鲁氏菌在常规血清学诊断上不会相互干扰。

由于布病带来严重的经济损失和对人类健康的威胁, 研发具有良好安全性和保护性的疫苗已成为科学家的共识。布病疫苗的研发也已由最初的基于以往其他疫病疫苗研发的经验转向追求更为合理的设计。由于目前对布鲁氏菌的致病机制及保护性抗原的了解并不完全, 阻碍了新型疫苗的研发进展。作为细胞内寄生的布鲁氏菌, 当其感染宿主后, 会引起宿主体液免疫和细胞免疫, 而后者对于细胞中细菌的清除起着主要作用, 不同抗原在激活这一系列反应中起着不同的作用^[13]。脂多糖 (LPS) 是激活抗体反应的主要抗原, 虽然 O-侧链激活的抗体可以促进循环中细菌的清除, 但其对机体的保护是非常有限的, 不能激活有效的细胞免疫^[3, 13-14]。细胞免疫最好由活疫苗或者是多种可能的保护性抗原与佐剂联合应用来激活。目前研究认为, 在绝大多数情况下, 使用活疫苗是控制动物布病的有效方法。

本文对布鲁氏菌病疫苗研究和应用现状做一介绍。

1 常规光滑型布病疫苗

由于活疫苗可以激起有效的细胞免疫, 产生良好的保护效果, 迄今为止, 绝大多数成功应用的疫苗都是弱毒疫苗。光滑型布鲁氏菌疫苗株由于其结构中存在 LPS, 能激活机体产生良好的体液免疫和细胞免疫反应效果, 目前仍是被广泛使用的疫苗。

1.1 牛种布鲁氏菌 19 (*B. abortus* strain 19, S19) 疫苗

S19 疫苗是世界上第一个最有效、被广泛使用的疫苗株。该疫苗菌株最初是 1923 年从新泽西一牛场中分离的毒力菌株, 经实验室传代一年以上, 使其毒力变弱而获得^[15-16]。早期使用的 S19 疫苗尽管对牛的毒力非常低, 但仍然可以引起 1%~2.5% 的怀孕母牛流产^[3, 15-17], 并能够传染人。因此, 该株疫苗在公畜中被限制使用, 由于其安全性遭受质疑而被美国农业部 (United States Department of Agriculture, USDA) 禁止使用。随后美国科学家筛选了一株对赤藓糖醇敏感的 S19, 并证实该菌株基因组中编码赤藓糖醇代谢的 *eryABCD* 4 个阅读框 (open reading frame, ORF) 中有一个 702 bp 的缺失, 从而导致 *eryC* 和 *eryD* 基因被破坏。1956 年, USDA 开始使用安全性更高的 S19 疫苗株, 并将其改名为 US19 或 S19^[18-20], 目前世界上大多数使用的 S19 疫苗株均为 *ery* 基因缺失株。作者曾对我国保存的不同时期、不同国家来源 S19 菌株 (即《中国兽药典》中的 A19 株) 进行过鉴定, 均未检测到 *ery* 基因的缺失。可能由于历史的原因, 我国当时未及时引进 *ery* 基因缺失的 S19 株, 目前实际使用的 A19 株应该是 1956 年前被广泛使用的 S19。作者所在实验室曾在小鼠和豚鼠中对 A19 株进行过比较系统的毒力测定, 并未发现其毒力返强。S19 疫苗可以为牛提供较好的保护力, 但其保护效果与接种年龄、剂量、免疫途径、牛场动物群体免疫情况等有关^[25]。另外, 该菌株是光滑型, 其 LPS 含有 O-侧链, 能持续刺激机体产生抗体, 对牛有一定的保护力, 但这也使得常规血清学检测方法无法区分免疫动物和自然感染动物^[16, 20]。到目前为止, 该 S19 仍为各布病疫苗的参考疫苗。

1.2 羊种布鲁氏菌 Rev.1 (*B. melitensis* Rev.1) 疫苗

Rev.1 来源于 *B. melitensis* 分离株, 具有链霉素抗性^[21]。对牛、羊布鲁氏菌均具有免疫保护力, 但此菌株作为疫苗仍具有一定的毒力^[16, 22], 并且在适当的条件下, 毒力可以完全恢复^[16, 23-24]。由 Rev.1

引起的流产率比 S19 高, 而对于某些毒力变异株, 其致流产率可能更高^[1]; 另有一些研究数据表明, Rev.1 对预防牛感染羊种布鲁氏菌具有比 S19 更好的保护力^[16, 25-26]。Rev.1 对链霉素具有抗性, 临床上常将链霉素和四环素配合使用来治疗布病, 因此, 由 Rev.1 引起的人的感染往往治疗效果较差。虽然以 Rev.1 作为疫苗, 还需要更多的数据证实其安全性和效率问题, 但作为羊种布病疫苗株的代表, Rev.1 目前仍被不少亚洲国家用于预防羊种布鲁氏菌。Rev.1 同样属于光滑型菌株, 其诱导机体产生的抗体也会干扰后期的血清学检测。

1.3 猪种布鲁氏菌 S2 疫苗 (*B. suis* strain 2, S2)

猪种 S2 疫苗株是我国兽医药品监察所于 1952 年从猪的流产胎儿中分离到的, 从 20 世纪 60 年代末进行小规模临床实验, 70 年代开始用于山羊和绵羊的免疫, 80 年代中期, 该疫苗被引入其他国家和地区, 如西班牙、土耳其、利比亚、英国、法国、德国和赞比亚^[27]。小鼠、豚鼠、山羊、绵羊通过口服或结膜免疫与 Rev.1 和 H38 灭活疫苗的免疫效果进行比对, 结果表明, 结膜免疫时 S2 可以提供与 Rev.1 相当的免疫保护力, 对于 *B. ovis* 的感染, S2 则提供更好的保护力^[28-30]。该疫苗毒力比 S19 和 Rev.1 弱, 对猪、牛、羊均能产生良好的免疫, 其突出的优点还在于通过口服方式免疫怀孕母畜不会引起流产。该疫苗可以投入饮水中给药, 1×10^9 CFU 的免疫剂量对山羊和绵羊可以提供 2~3 年的保护。近几年作者用试验动物 (小鼠和豚鼠) 系统比较了 S2、M5 和 A19 三种疫苗株的安全性和免疫保护效果, 结果 1×10^5 CFU/只剂量免疫 18~20 g 的 Balb/c 小鼠后, S2 株在小鼠体内存活时间为 6 周, A19 为 14 周, M5 超过 35 周。S2 和 A19 两种疫苗免疫小鼠 6 个月后, 对同等剂量 (1×10^5 CFU/只) 强毒 2308 株的攻击均能提供 90% 以上的保护; 以 1×10^9 CFU/只剂量免疫 350~400 g 的豚鼠, 15 d 后 S2 免疫组在豚鼠脾脏中的含菌量明显低于 A19 和 M5 试验组。研究结果证实了 S2 疫苗具有良好的免疫保护效果和优越的安全性。

1.4 羊种布鲁氏菌 M5 疫苗

哈尔滨兽医研究所于 1962 年将 *B. melitensis* 强毒株 M28 传代致弱为 M5 疫苗株。 5×10^9 CFU/mL 气雾免疫是其最佳的免疫方式, 可以提供一年的保护, 目前仍用于山羊的免疫。该疫苗最大的弱点是菌株不稳定, 经常会出现从 S 型到 R 型的变异, 菌落大小也不均匀, 它是我国目前使用的疫苗中毒力

最强的菌株。

2 粗糙型布病疫苗的研究现状

由于粗糙型布鲁氏菌毒力较弱, 能够在一定程度上提供对光滑型布鲁氏菌的免疫保护, 而又不干扰临床检测, 因此, 人们尝试通过体外或体内连续传代, 得到粗糙型的变异菌株, *B. abortus* 45/20 和 RB51 就是通过这种方式获得的。人们还通过分子生物学的方法突变或删除与 S-LPS 合成相关的基因来获得粗糙型突变株。S-LPS 主要由三部分构成: O-侧链多糖、核心多糖和类脂 A。O-侧链是主要的抗原成分, 它在细胞质中被单独合成好后, 由 ABC 转运蛋白将其转移到周质空间, 连接酶将 O-侧链多糖连接到类脂 A-核心多糖上。因此, 如果核心多糖的合成被阻断, 合成的 O-侧链将不能被添加到 LPS 表面, 此外还有一些与糖苷前体合成通路相关的蛋白/酶也会影响 LPS 的合成。目前布鲁氏菌 LPS 的合成过程还不完全清楚^[31-32], 但是基因方面的证据表明其合成过程应该与革兰氏阴性菌相类似^[1]。通常认为有四类基因参与了 LPS 的合成^[33]: (1) *lpx** 基因主要参与类脂 A 的早期合成; (2) *wa*** 参与类脂 A 的后期合成; (3) *wb*** 基因参与 O-侧链的合成; (4) *wz*** 基因参与 O 侧链的加工 (例如 *wzm/wzt* 基因负责编码将 O-侧链展示到布鲁氏菌表面的 ABC 转运蛋白)^[1]。目前文献报道的 *B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis* 的粗糙型突变菌株, 与部分 *wa*** 基因、*wb*** 基因、*wzm/wzt* 基因以及一些与核心多糖、O-侧链多糖前体合成通路相关的基因 (例如 *manB_{core}* 和 *per* 基因) 发生突变有关系。

O-侧链的缺失原因不同, 导致 LPS 剩余结构也不相同, 因此, 粗糙型菌株可以大致分为三种^[1, 9, 11, 34-35]: 第一种粗糙型菌株具有完整的类脂 A, 其细胞质也含有 O-侧链, 但是 O-侧链和核心多糖之间的连接被阻断 (例如 *wzm/wzt* 基因和 *waaL* 基因突变), 其 O-侧链不能展示在 LPS 上; 第二种粗糙型菌株具有完整的类脂 A, 但是没有 O-侧链 (例如 *wb*** 基因、*wecA* 基因以及 *manBOAg*、*gmd* 基因突变); 第三种粗糙型菌株的核心多糖存在缺陷, 其细胞中有或无 O-侧链 (例如 *wa** 基因和 *manB_{core}* 基因突变)。这三种粗糙型菌株的减毒水平及其免疫保护力是否一样还有待进一步的研究。

2.1 牛种布鲁氏菌 45/20 (*B. abortus* strain 45/20) 疫苗

该疫苗制造用的菌株 *B. abortus* strain 45/20 是

1922年从病牛体内分离,后经豚鼠20次传代后获得的粗糙型的减毒株,并命名为45/20。该疫苗可以对豚鼠和牛提供较好的保护力^[1,16],其优点是LPS结构中无O-侧链,因此,免疫动物后,在其体内检测不到针对O-侧链的抗体,从而可以避免干扰血清学诊断,另外,该菌株不会引起怀孕母畜的流产。45/20株基因缺陷和其作为疫苗的免疫机制仍不清楚,推断认为LPS中残留的小量O-侧链在起作用^[36-37],也有人认为菌体的一些其他有效蛋白刺激了机体的细胞免疫,但是这些猜测都缺乏直接的试验证据。粗糙型的45/20疫苗株最严重的问题是菌株极不稳定,经常会出现从R型到S型的变异,恢复为强毒^[16],不同批次之间的疫苗也存在变异,Alton等^[22]报道不同来源45/20原始菌株在豚鼠上连续传代后,不同来源的菌株会出现半光滑型和粗糙型表型,这表明原始菌种可能含有半光滑型克隆。没有有效的方法可以控制其变异,因此其作为疫苗的安全性存在争议,目前市场上没有该疫苗产品^[1]。

2.2 粗糙型牛种布鲁氏菌株51(rough strain *B. abortus* 51, RB51)疫苗

RB51疫苗株最初由光滑型牛布鲁氏菌2308株经体外反复传代,并经利福平和青霉素的筛选获得,大量实验表明, RB51是非常稳定的R型菌株^[38]。具有利福平抗性的RB51是当前北美应用最为广泛的疫苗,已被美国、墨西哥、智利等国家作为替代S19的官方疫苗,使用于野生动物。RB51的安全性与剂量和免疫途径相关,以全剂量($1 \times 10^{10} \sim 3.4 \times 10^{10}$ CFU) RB51静脉注射试验牛,会导致严重的胎盘感染,引发胎盘炎,并能从牛奶中分离到免疫菌;免疫怀孕奶牛,会导致部分牛流产^[39]。但皮下免疫低剂量(1×10^9 CFU) RB51对怀孕后期的母牛是安全的^[40]。随后有更多试验证实了RB51的不同免疫方式对野牛和奶牛的安全性和保护效果,并且认为该疫苗免疫后能产生良好的粗糙型抗体和较高水平的 γ 干扰素^[41-43],也有研究表明, RB51不能有效预防羊种和猪种布鲁氏菌的传染^[44-45]。动物模型研究表明, RB51所引起的主要是B细胞介导的体液免疫,所产生的抗体虽不能直接杀死病菌,但机体产生的各种细胞因子却具有这样的功能,良好的抗体水平能有效地抵制野毒的感染。基因水平研究发现,相对于2308株, RB51在其基因组*wboA*基因(编码糖基转移酶)中插入了一段IS711序列^[46](大小为842 bp的插入序列,该序列比较保守,经常出现在布鲁氏

菌基因组中,具体功能未知)。在2308株*wboA*基因中插入其他转座基因获得光滑型突变株,能够提供比RB51更好的免疫保护效果,但毒力比RB51强,当RB51菌株加入*wboA*基因后,O-侧链的表达水平会增加,但菌株并未回变为光滑型^[8],这表明RB51菌株还存在除*wboA*基因外其他的基因变异。在目前公布的*B. melitensis*、*B. suis*和*B. abortus*的全基因序列中,*wboA*基因位于*wbk**基因群外侧^[1],RB51菌株可以产生少量M样的O-侧链,但不会刺激机体产生能够达到血清学检测水平的O-侧链抗体^[47]。该疫苗可以提供与S19相当的保护力^[48-50],相比之下,又可鉴别免疫牛和自然感染牛,但其对羊的免疫保护效果并不令人满意^[51]。美国学者Vemulapalli等^[52]构建了超量表达Cu/Zn超氧化物歧化酶的重组布鲁氏菌RB51 SOD株,结果显示其比RB51更好的免疫保护能力。由于知识产权等方面的原因,至今为止我国尚未成功引进RB51疫苗株。

2.3 其他粗糙型突变疫苗株

目前报道的利用*wboA*基因突变获得的粗糙型菌株还有源于*B. melitensis* 16M和*B. suis* 2579的VTRM1和VTRS1菌株。这两个突变株具有卡那霉素抗性,都插入了Tn5元件。VTRM1和VTRS1突变株在小鼠上非常稳定,但是并不清楚其细胞质中是否有O-侧链。小鼠实验表明,这两个突变株对小鼠的保护力低于S19,与RB51相当^[53]。此外人们还针对*wbk*基因区构建了*B. abortus* 2.17和*B. abortus* 9.49突变株,分别在*wbkA*和*per*基因插入了Tn5元件,它们都不表达O-侧链^[32]。*B. abortus* B2211 *pgm*源于*B. abortus* 2308菌株,具有庆大霉素抗性^[34]。还有基于*wa***基因构建的*B. abortus* 80.16菌株和基于*manB_{core}*基因构建的55.30菌株,其疫苗保护效果有待进一步的研究^[35]。

我国学者在粗糙型布鲁氏菌疫苗株方面的研究也取得了一定的成果。作者所在实验室以氯霉素抗性基因替代*WbkC*基因和*WboA*基因,分别获得了粗糙型布鲁氏菌rS2-WbkC和rS2-WboA株,并显示其良好的安全性和免疫保护性^[54-55]。随后,该实验室又通过自杀性质粒介导的非抗性筛选技术,构建获得了*WboA*基因缺失的rS2- Δ wboA粗糙型重组菌,并成功将口蹄疫病毒(FMDV)*vp1*基因替换了S2基因组中的*WboA*基因,获得了能表达AsiaI型FMDV *vp1*基因的rS2-JS株,以及能表达O型FMDV *vp1*基因的rS2-Mya株,以上3个粗糙型菌株均已获得专利保护,并有望开发成为口蹄疫-布

病重组疫苗。王真等^[56]也筛选到了 *WboA* 基因缺失的 RB6 株粗糙型流产布鲁氏菌疫苗株, 在小鼠上能提供与 A19 疫苗相似的保护效果。

当然, 粗糙型疫苗株也有一些缺陷, 一般粗糙型布鲁氏菌可能过度弱化, 不能产生足够的保护力。另外, 有些粗糙型疫苗株免疫动物后, 仍能产生微弱地针对 O- 侧链的抗体, 从而干扰用 ELISA 方法对布病的检测, 使粗糙型布病的实际应用价值遭受质疑^[57-58]。随着布鲁氏菌全基因组序列测序的完成, 越来越多的基因功能将被发现, 将会有更多可以修饰或改造的基因被利用, 为构建具有应用前景的重

组布鲁氏菌株提供了更广泛的资源。

3 布鲁氏菌分子标记疫苗的研究

由于粗糙型布鲁氏菌疫苗单次免疫往往不能提供理想的保护效果, 为了研制安全有效又能与临床感染相区分的布鲁氏菌疫苗株, 科学家们试图构建分子标记疫苗, 其最常采用的方法是缺失与布病毒力相关的基因。Grillo 等^[59]为了解决 Rev.1 疫苗株免疫后干扰后期血清学检测的问题, 在 *B. melitensis* Rev.1 疫苗株的基础上分别构建了删除 *bp26* 基因的 CGV26 菌株和删除 *bp26* 与 *Omp31* 基因的 CGV2631

表1 目前世界主要国家广泛使用的疫苗(主要优缺点)

疫苗名称	S19	Rev.1	RB51	S2
优点	Ery-, 安全性提高, 免疫力持久, 免疫效果好。是 OIE 认可的布病参考疫苗。	可用于牛和羊, 对羊种布病免疫效果好。	具有与 S19 相似的保护效果。	安全性高。可用于猪、牛和羊, 口服免疫可用于怀孕母畜和种公畜。
缺点	毒力稍偏强, 种公畜慎用。光滑型, 干扰临床诊断。	毒力偏强, 安全性和免疫效果有争议。光滑型, 干扰临床诊断。	安全性有争议。粗糙型, 不干扰临床诊断。	免疫原性相对偏弱。口服免疫操作相对繁琐。
使用国家/地区	中国、印度、巴西等	希腊、约旦、塔吉克斯坦等	美国、墨西哥、智利等	中国、苏丹、赞比亚等

菌株, 其结果 CGV26 与 Rev.1 的免疫保护力相当, 并且显著高于 CGV2631。我国学者胡森、汪舟佳等均成功构建了 *bp26* 基因缺失的 M5 疫苗株, 该菌株免疫动物后产生的抗体中不含有 *bp26* 蛋白的抗体, 从而可以与自然感染相区分^[60-61]。刘文兴^[62]的研究证实了 *bp26* 基因缺失的重组菌具有良好免疫原性, 但是发现布鲁氏菌 *bp26* 蛋白作为诊断抗原存在假阳性现象, 因此, *bp26* 蛋白作为诊断用抗原的抗原特异性有待提高; 另外, 不同宿主动物对不同毒力菌株 *bp26* 基因编码蛋白的免疫原性差异, 也会影响该蛋白作为鉴别诊断用抗原的实际应用效果。段小宇^[63]构建了细胞周质蛋白 p39 缺失的重组布鲁氏菌疫苗株, 通过建立针对 p39 的 ELISA 检测方法, 也能实现疫苗免疫与自然感染相区分。

4 DNA疫苗的研究现状

考虑到人畜共患病活疫苗在运输、存储及使用安全性等方面的因素, 以及可能出现的毒力返强等弱点, 开发 DNA 疫苗将是解决上述问题的有效途

径^[64]。由于机体的细胞免疫是控制布鲁氏菌感染的关键, 因此, 作为研究布鲁氏菌 DNA 疫苗的候选分子主要集中在刺激 T 细胞引起的细胞免疫的几个分子: L7/L12 核糖体蛋白^[65]、细胞周质蛋白 p39^[66]、Cu-Zn 超氧化物歧化酶^[67]、热休克蛋白 GroEL^[68]、外膜蛋白 Omp31(outer membrane protein 31)^[69]、Omp25^[70-71]等。这些蛋白都可以激活 T 细胞反应, 包括活化巨噬细胞和 CD8 细胞毒性 T 细胞。虽然清除细胞内布鲁氏菌的具体机制仍然不是很清楚, 但是穿孔素、IFN- γ 、TNF- α 起着重要的作用^[13-14], 因此, 有效的疫苗株也必须激活这些因子^[16]。

4.1 p39 (periplasmic binding protein)

p39 是一种良好的 T 细胞抗原, 主要诱导 Th1 型细胞免疫^[66], 在动物体内能诱发强烈的迟发型超敏反应, 并产生大量的 IFN- γ , 但对动物的保护效果远低于 S19 疫苗。p39 基因单独免疫, 用野生型菌株 *B. abortus* 544 攻毒时, 可以产生中等程度保护效果, 但是如果在 p39 DNA 疫苗中加入佐剂 CpG, 则其免疫原性和保护性均显著提高^[72]。

4.2 L7/L12

L7/L12 是布鲁氏菌重要免疫优势抗原, 以其为基础构建的 DNA 疫苗对布鲁氏菌感染具有最显著的抵抗作用^[73]。1996 年, Oliveira 等^[74] 研究发现, 从布鲁氏菌提取的 L7/L12 蛋白能特异性地刺激感染动物的单核细胞, 并上调 IFN- γ 的转录和表达, 从而起保护作用。1997 年, 美国学者 Kurar 和 Splitter^[75] 首次将 L7/L12 克隆进 pcDNA3 和 p6 载体中制备成 DNA 疫苗, 小鼠试验表明, 两种 DNA 疫苗都可以刺激体液免疫和细胞免疫, 小鼠实验表明只有 pCDNA3-L7/L12 可以引起高水平的针对 L7/L12 蛋白的抗体, 引起强烈的免疫反应, 然而抗体的维持时间非常短 (大约 4 周)。

4.3 Omp31

根据相对分子质量大小, 布鲁氏菌外膜蛋白可分为 3 个组, Omp31 属于 31 000~34 000 组成员, 被认为是粗糙型布鲁氏菌最重要的保护性抗原蛋白^[76-77]。2007 年, Gupta 等^[78] 构建了表达 Omp31 蛋白的真核表达载体 pTargetOmp31, 将重组质粒肌肉注射免疫 6 周龄小鼠, 每隔 3 周免疫一次。实验发现该重组质粒可以刺激机体产生针对 Omp31 蛋白的抗体, 并且刺激 T 细胞增殖, 当用 Omp31 蛋白或 *B. melitensis* 16M 提取物再刺激时, 可以释放大量的 IFN- γ 。另外, 该质粒可以刺激机体产生良好、持久的免疫记忆, 通过 IgG 亚型分析, 发现该质粒主要激起 Th1 型免疫反应, 且在攻毒时有一定的保护作用。最近, Gupta 等^[79] 将 Omp31 克隆进大肠杆菌载体中构成的质粒免疫小鼠后, 能抵抗羊种强毒布鲁氏菌的攻击, 显示了其良好的应用前景。

另外, 还有 GroES、YajC、UvrA、BA14 等基因编码的蛋白都具有良好的刺激 T 细胞, 具有激发细胞免疫活性的能力, 这些基因也都是用作布鲁氏菌 DNA 疫苗的候选基因。DNA 疫苗研究虽然取得了一些有意义的成果, 但至今尚未发现一种 DNA 疫苗能完全替代灭活疫苗或弱毒疫苗。另外, 不同 DNA 疫苗可能需要采用不同的免疫途径才能获得理想的效果。目前通过 DNA 疫苗控制布病仍有很多复杂的工作有待完成。

5 布鲁氏菌重组亚单位疫苗的研究

由于重组亚单位疫苗一般以体液免疫为主, 对于细胞内感染为主的布鲁氏菌, 其是否能达到的保护效果还需要进一步的探讨。目前有少量的这方面的研究, 上述以 Omp31 重组蛋白、Cu-Zn 超氧

化物歧化酶、L7/L12、p39 等蛋白免疫小鼠, 均有一定的免疫原性和保护力, 但其仍停留在实验室阶段^[65, 67, 72, 76, 80]。

6 展望

就全球范围而言, 布病疫情呈反弹趋势, 而我国情况尤为严重。在布病的综合防控措施中, 疫苗起着不可替代的作用。针对我国牛、羊养殖情况及布病流行特点, 逐步建立无布病的种群对布病的防控和净化具有十分重要的意义, 而疫苗在这一过程中也必将发挥其应有的作用; 但现有疫苗都各有缺陷, 难以有效地控制疫病的发生, 并且部分广泛使用的疫苗会干扰后期的诊断, 给疫病防控带来困难。在对布鲁氏菌致病性及免疫原性相关的分子生物学机制进一步开展深入研究的基础上, 研发安全性更高、更稳定、保护性免疫活性更好的新型疫苗, 特别是研发有助于建立无布鲁氏菌种畜场的净化规划实施的标记疫苗, 将具有十分重要的意义。相信不久的将来, 新一代布病疫苗将会造福人类。

[参 考 文 献]

- [1] Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res*, 2004, 35: 1-38
- [2] Cheers C. Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. *Dev Biol Stand*, 1984, 56: 237-46
- [3] Mingle CK, Manthei CA, Jasmin AM. The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus*. *Am Vet Med Assoc*, 1941, 99: 203
- [4] Clavareau C, Wellemans V, Walravens K, et al. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology*, 1998, 144 (Pt12): 3267-73
- [5] Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, et al. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 1258-62
- [6] Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, et al. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14 (8): 1316-7
- [7] Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, et al. *Brucella microti* sp. nov, isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58 (2): 375-82
- [8] Cloeckert A, Grayon M, Verger JM, et al. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Res Microbiol*, 2000, 151: 209-16
- [9] Alton GG, Jones LM, Angus RD, et al. Techniques for the brucellosis laboratory[M]. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988: 190
- [10] Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a

- pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol*, 2008, 129: 1-4
- [11] McQuiston JR, Vemulapalli R, Inzana TJ, et al. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect Immun*, 1999, 67: 3830-5
- [12] Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res*, 2004, 35(1): 1-38
- [13] Zhan Y, Yang J, Cheers C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect Immun*, 1993, 61: 2841-7
- [14] Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, et al. Interferon γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*, 2001, 103: 511-8
- [15] Buck JM. Studies of vaccination during calfhood to prevent bovine infectious abortus. *Agric Res*, 1930, 41: 67-85
- [16] Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, 2002, 90: 479-96
- [17] Beckett FW, MacDiarmid SC. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *Br Vet J*, 1985, 141: 507-14
- [18] Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS One*, 2008, 14 (5): e2193
- [19] Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(6): 1640-2
- [20] Nicoletti P. Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes*, 1990, 13: 147-68
- [21] Elberg SS, Faunce K, Jr. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *J Bacteriol*, 1957, 73: 211-7
- [22] Alton GG, Elberg SS, Crouch D. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. The stability of the degree of attenuation. *J Comp Pathol*, 1967, 77: 293-300
- [23] Blasco JM, Marin CM, Barberan M, et al. Immunization with *Brucella melitensis* Rev. 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Vet Microbiol*, 1987, 14: 381-92
- [24] Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, et al. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its *omp2* gene. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 1475-80
- [25] Horwell FD, van Drimmelen GG. *Brucella melitensis* strain Rev I as a vaccine for cattle. *J S Afr Vet Med Assoc*, 1971, 42: 233-5
- [26] Garcia-Carrillo C. Comparison of *Brucella melitensis* Rev.1 and *B. abortus* strain 19 as vaccine against brucellosis in cattle. *Zentralbl Veterinaermedizin*, 1980, 27: 131-8
- [27] Shang DQ, Xia DL, Yin JM. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Vet Microbiol*, 2002, 90: 165-82
- [28] 尚德秋. 布鲁氏菌病免疫制剂现状. *地方病通报*, 2000, 15: 70-3
- [29] 丁家波, 毛开荣, 程君生, 等. 布鲁氏菌病疫苗的应用和研究现状. *微生物学报*, 2006, 46: 856-9
- [30] Verger JM, Grayon M, Zundel E, et al. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 1995, 13: 191-6
- [31] DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 443-8
- [32] Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13148-53
- [33] Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, et al. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol*, 1996, 4: 495-503
- [34] Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, et al. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun*, 2000, 68: 5716-23
- [35] Monreal D, Grillo MJ, Gonzalez D, 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, 71: 3261-71
- [36] Freer E, Pizarro-Cerda J, Weintraub A, et al. The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun*, 1999, 67: 6181-6
- [37] Corbel MJ, Bracewell CD. The serological response to rough and smooth *Brucella* antigens in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 45/20 adjuvant vaccine. *Dev Biol Stand*, 1976, 31: 351-7
- [38] Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, 1991, 28: 171-88
- [39] Palmer MV, Chevillie NF, Jensen AE. Experimental infection of pregnant cattle with vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet Pathol*, 1996, 33: 682-91
- [40] Palmer MV, Olsen SC, Chevillie NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res*, 1997, 58: 472-7
- [41] Olsen SC, Johnson CS. Efficacy of dart or booster vaccination with strain RB51 in protecting bison against experimental *Brucella abortus* challenge. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(6): 886-90
- [42] Olsen SC, Johnson C. Immune responses and safety after

- dart or booster vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(5): 642-8
- [43] Singh R, Basera SS, Tewari K, et al. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in cross bred cattle calves in India. Indian J Exp Biol, 2012, 50(3): 239-42
- [44] Herrera E, Rivera A, Palomares EG, et al. Isolation of *Brucella melitensis* from a RB51-vaccinated seronegative goat. Trop Anim Health Prod, 2011, 43(6): 1069-70
- [45] Olsen SC, Hennager SG. Immune responses and protection against experimental *Brucella suis* biovar 1 challenge in nonvaccinated or *B. abortus* strain RB51-vaccinated cattle. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(12): 1891-5
- [46] Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, et al. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6: 760-4
- [47] Olsen SC, Evans D, Hennager SG, et al. Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. J Vet Diagn Invest, 1996, 8: 451-4
- [48] Elzer PH, Smith J, Roffe T, et al. Evaluation of *Brucella abortus* strain RB51 and strain 19 in pronghorn antelope. Ann N Y Acad Sci, 2002, 969: 102-5
- [49] Caporale V, Bonfini B, Di Giannatale E, et al. Efficacy of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine *Brucella abortus* strain 19 in water buffalo. Vet Ital, 2010, 46(1): 13-9
- [50] Lord VR, Schurig GG, Cherwonogrodzky JW, et al. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. Am J Vet Res, 59(1998): 1016-20
- [51] Herrera E, Rivera A, Palomares EG, et al. Isolation of *Brucella melitensis* from a RB51-vaccinated seronegative goat. Trop Anim Health Prod, 2011, 43(6): 1069-70
- [52] Vemulapalli R, He Y, Cravero S, et al. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. Infect Immun, 2000, 68: 3286-9
- [53] Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, 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, 7: 677-83
- [54] 毛开荣, 丁家波, 程君生, 等. 带有氯霉素抗性基因标记的重组布氏杆菌S2的构建及其生物学特性. 微生物学报, 2007, 47(6): 978-81
- [55] 丁家波, 程君生, 牟巍, 等. 布鲁氏菌S2 WboA基因缺失株的构建及免疫效果. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2448-53
- [56] 王真, 吕艳丽, 吴清民. 流产布鲁氏菌疫苗候选株RB6生物学特性研究. 中国畜牧兽医, 2012, 39(4): 174-7
- [57] Barrio MB, Grilló MJ, Muñoz PM, et al. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. Vaccine, 2009, 27(11): 1741-9
- [58] González D, Grilló MJ, De Miguel MJ, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. PLoS One, 2008, 3(7): e2760
- [59] Grillo MJ, Marin CM, Barberan M, et al. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. Vaccine, 2009, 27: 187-91
- [60] 胡森, 郑孝辉, 王加兰, 等. 马耳它布氏杆菌bp26基因缺失株的构建及鉴定. 中国预防兽医学报, 2009, 31(8): 583-6
- [61] 汪舟佳. 布鲁氏菌基因标记疫苗株的构建及鉴别PCR方法研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008
- [62] 刘文兴. 布鲁氏菌标记疫苗(M5-90-26)的鉴别诊断及其bp26蛋白的免疫原性分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2011
- [63] 段小宇. 布鲁氏菌分子标记疫苗株的构建及鉴别诊断方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2007
- [64] Menzies PI. Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. Anim Reprod Sci, 2012, 130(3-4): 162-72
- [65] Cespedes S, Andrews E, Onate A, et al. Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*. J Med Microbiol, 2000, 49: 165-70
- [66] Al-Mariri A, Tibor A, Mertens 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, 69: 6264-70
- [67] Tabatabai LB, Pugh GW, Jr, Stevens MG, et al. Monophosphoryl lipid A-induced immune enhancement of *Brucella abortus* salt-extractable protein and lipopolysaccharide vaccines in BALB/c mice. Am J Vet Res, 1992, 53: 1900-7
- [68] Leclercq S, Harms JS, Rosinha GM, et al. 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, 51: 6
- [69] Cloeckert A, Verger JM, Grayon M, et al. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. FEMS Microbiol Lett, 1996, 145(1): 1-8
- [70] Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, et al. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. Vaccine, 2007, 25(1): 43-54
- [71] Commander NJ, Brewer JM, Wren BW, et al. Liposomal delivery of p-ialB and p-omp25 DNA vaccines improves immunogenicity but fails to provide full protection against *B. melitensis* challenge. Genet Vaccines, 2010, 8: 5
- [72] Al-Mariri A, Tibor A, Mertens 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, 69: 4816-22
- [73] Bachrach G, Banai M, Bardenstein S, et al. *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in *Brucella*-sensitized guinea pigs. *Infect Immun*, 1994, 62: 5361-6
- [74] Oliveira SC, Zhu Y, Splitter GA. Recombinant L7/L12 ribosomal protein and γ -irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4⁺ T cells. *Immunology*, 1994, 83: 659-4
- [75] Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine*, 1997, 15: 1851-7
- [76] Guilloteau LA, Laroucau K, Vizcaino N, et al. Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *Vaccine*, 1999, 17: 353-61
- [77] Estein SM, Cassataro J, Vizcaino N, et al. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect*, 2003, 5: 85-93
- [78] Gupta VK, Rout PK, Vihan VS. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res Vet Sci*, 2007, 82: 305-13
- [79] Gupta VK, Radhakrishnan G, Harms J, et al. Invasive *Escherichia coli* vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic protein BP26 confer protection in mice challenged with *B. Melitensis*. *Vaccine*, 2012, 30(27): 4017-22
- [80] 周丽丽. 布鲁氏菌BLS-L7/L12重组亚单位疫苗的初步研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2007