46 卷 5 期
2006 年 10 月 4 日
微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica
46(5):856～859
4 October 2006

布氏杆菌病疫苗的应用和研究现状

丁家波,毛开荣,程君生,戴志红,蒋玉文
(中国兽医药品监察所 北京 100081)

摘 要 布氏杆菌病是由布氏杆菌引起的一种重要的人兽共患病。布氏杆菌具有宿主广泛、传染性强以及感染后根治困难等特点,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氏杆菌病的主要措施。迄今国内外已有多个弱毒活疫苗在使用,但均存在一定的缺陷,因此研究更理想的疫苗一直是控制布氏杆菌病的重点。目前除了常规诱变筛选新的弱毒株外,人们正通过基因工程技术构建重组弱毒疫苗、DNA 疫苗以及亚单位疫苗。本文简述了布氏杆菌病疫苗的应用及新型疫苗的研究现状。

关键词:布氏杆菌;布氏杆菌病;疫苗
中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)05-0856-04

布氏杆菌病(布病)是由布氏杆菌(*Brucella*)引起的以流产和发热为特征的人兽共患病,严重地威胁着人和多种动物的生命健康。人感染布氏杆菌后,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]。因此在布氏杆菌流行的国家,消除布病一直是公共健康计划中最重要的目标之一。

根据宿主差异、生化反应特点及菌体表面的不同结构,可将布氏杆菌分成 6 个不同的种,包括羊种布氏杆菌(*B. melitensis*)、牛种布氏杆菌(*B. abortus*)、猪种布氏杆菌(*B. suis*)、绵羊种布氏杆菌(*B. ovis*)、沙林鼠种布氏杆菌(*B. neotomae*)和犬种布氏杆菌(*B. canis*)。在我国流行的主要是羊、牛和猪种布氏杆菌,其中以羊种布氏杆菌更多见。自然状态下布氏杆菌有粗糙型(Rough,R)和光滑型(Smooth,S)两种,S 型细菌细胞壁中含有 O 链的脂多糖(LPS),而 R 型布氏杆菌 LPS 中的 O 链缺失。LPS 是刺激机体产生抗体的主要有效成分,而 O 链在血清学诊断中起着重要的作用。

目前研究认为,在绝大多数情况下,使用疫苗是控制牛、羊布病的有效方法。布氏杆菌是胞内寄生的革兰氏阴性菌,其感染宿主后激发抗原递呈细胞分泌 IL-2,引起 T_{H0} 细胞分化为 T_{H1} 细胞,T_{H1} 细胞再分泌 INF-γ 从而增强巨噬细胞的吞噬作用;同时,$CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞分泌的 IL-2 和 INF-γ 还能直接杀灭被布氏杆菌感染的巨噬细胞,达到保护宿主的目的[2]。

由于布氏杆菌主要为胞内寄生,抗生素对其效果甚微,机体的细胞免疫对抑制该病起了至关重要的作用。因此对布氏杆菌病疫苗的研究主要集中在筛选弱毒株,构建突变株以及寻找亚单位疫苗等方面。本文对布氏杆菌病疫苗应用和研究现状作一介绍。

1 疫苗的应用现状

1.1 牛种布氏杆菌 19 (*B. abortus* strain 19, S19)疫苗

该疫苗制造用菌株是 1923 年从牛奶中分离获得的,并在实验室培养过程中致弱。菌株中含有 O 链的脂多糖(LPS)能持续刺激机体产生抗体,对牛有一定的保护力,历史上曾将 S19 株广泛应用于牛的免疫接种。但该菌株能传染人,并会引起怀孕母畜的流产,在公畜中也限制使用[3]。

由于布氏杆菌疫苗不具备完全保护作用,免疫后的动物仍然可能感染其它菌株,因此通过血清学方法检测为布氏杆菌阳性的家畜,仍无法判定动物是否被其它菌株感染,从而干扰临床诊断。

1.2 羊种布氏杆菌 Rev.1 (*B. melitensis* Rev.1, Rev.1)疫苗

Rev.1 被认为是一种毒力减弱株,属于光滑型。对牛、羊布氏杆菌均具有免疫保护力。此菌株作为疫苗仍具有一定的毒力,并且在适当的条件下,毒力可以完全恢复[4～6]。和 S19 一样,Rev.1 免疫动物后也会干扰临床诊断。临床上常将链霉素和四环素配合使用来治疗布病,但 Rev.1 对链霉素具有抗性,因此由其引起的感染往往疗效较差[1]。大量的动物试验结果显示,由 Rev.1 引起的流产率比 S19(S19 低于 1%)略高[3],而对于某些毒力变异株,其致流产率可能更高。因此以 Rev.1 作为疫苗,还需有更多的数据证实其安全性和效率问题。

1.3 猪种布氏杆菌 S2 疫苗 (B. *suis* strain 2, S2)

该疫苗是用中国分离株制造的,其毒力比 S19 和 Rev.1 弱[7],对猪、牛和羊均能产生良好的免疫。由于其毒力较弱,可以通过口服或肌注的方式进行免疫,并且不会导致怀孕母畜的流产,因此在我国被广泛使用。虽然有研究认为,S2 的

基金项目:十五国家重点科技攻关项目资助(2004BA519AZZ)
作者简介:丁家波(1975－),男,江苏泰州人,博士,主要从事微生物与免疫学的研究工作。E-mail:dingjiabo@sohu.com
收稿日期:2005-11-04,接受日期:2005-12-12,修回日期:2006-04-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

保护率较 S19 和 Rev.1 低约 10% ~ 20%[7,8],但大量的动物试验表明,S2 能够提供令人满意的保护率,对超强毒的马尔他型(*B. melitensis*)布氏杆菌的攻击能提供 40% ~ 60%的保护[9]。

1.4 牛种布氏杆菌 45/20 (*B. abortus* strain 45/20, 45/20)疫苗

该疫苗制造用菌株是 1922 年从病牛体中分离,后经豚鼠 20 次传代后获得粗糙型的减毒株。其优点是 LPS 结构中无 O 链,因此免疫动物以后,在其体内检测不到 O 链的抗体,从而可以避免干扰诊断。该菌株作为疫苗的免疫机制仍不清楚,有人推断 LPS 中残留的小量 O 链在起作用,也有人认为菌体的一些其它有效蛋白刺激了机体的细胞免疫,但这些猜测都缺乏直接有效的证据[10]。粗糙型的 45/20 疫苗株最严重的问题是该菌株极不稳定,经常会出现从 R 型到 S 型的变异,使其毒力恢复为强毒,因此其作为疫苗的安全性仍有争议。

1.5 粗糙型牛种布氏杆菌株 51 (Rough strain *B. abortus* 51, RB51)疫苗

该疫苗株最初由光滑型牛布氏杆菌 2308 株经体外反复传代,并经利福平和青霉素的筛选获得。具有利福平抗性的 RB51 是当前应用最为广泛的疫苗。多年的实践证明其免疫力和保护力均优于 S19,并克服了以往疫苗的一些弱点。动物模型表明 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。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 成分(大小为 842bp 的插入序列,该序列比较保守,经常出现在布氏杆菌基因组中,确切功能未知)[11],然而在 2308 株 wboA 基因中插入其它转座基因获得的突变株,能提供比 RB51 更好的免疫保护效果[3],但毒力比 RB51 强。预计不久将会有保护性更好的重组 RB51 问世。

2 疫苗的研究现状

目前对布氏杆菌的疫苗研究主要是利用基因工程技术,对布氏杆菌的部分基因进行各种修饰,以期在现有疫苗的基础上筛选出具有更强免疫保护力、且毒力稳定的弱毒株。另外人们也试图研究布氏杆菌的 DNA 疫苗。

2.1 重组粗糙型布氏杆菌株的研究

菌体中缺失 O 链多糖(O-PS)结构的为粗糙型(R)布氏杆菌,其结构中不含光滑型(S)布氏杆菌的脂多糖(LPS)。除犬布氏杆菌和绵羊布氏杆菌具有天然的 R 型,其它种的 R 布氏杆菌都是通过诱导产生的。一般 R 型的布氏杆菌都被视为弱毒株,可以考虑用作疫苗。真正的 R 型菌因缺失 O-PS 抗原,被其感染的动物体内也无抗 O-PS 的特异性抗体,与 O-PS 相关的其它生物表型与 S 型菌也不一样,根据这些特点可以将其与野毒感染相区分。由于有些菌株在体外反复传代是会发生从 S 到 R 型的变异,目前用作疫苗的牛种粗糙型布氏杆菌都是通过这种方法获得的,包括 S19,45/20 和 RB51[3]。由这种方法获得的菌株具有毒力回强的潜在风险。为了使 S 型菌从根本上变成 R 型菌,科学家们目前主要是利用分子生物学的方法,破坏或缺失 S-LPS 合成酶基因。现已发现与 S-LPS 合成相关的基因包括:*gmd*、*per*、*wbkA*、*wbkC*、*lpx*、*wa*、*wz* 等[3,12],相关的重组菌已构建成功[13~15],其毒力和免疫保护试验结果还需大量的动物试验证实。

2.2 重组其它功能基因的布氏杆菌株的研究

美国学者 Vemulapall 等在 RB51 株的基础上,重组进 *wboA* 基因,获得重组菌 RB51Wboa,该重组菌不仅保留了 R 型的培养特性,还能够表达 O 链抗原,明显增强免疫效果[16]。另外 Vemulapall 等又构建了能超量表达 Cu/Zn 超氧化物歧化酶的重组布氏杆菌 RB51SOD,结果也显示了比 RB51 更好的免疫保护能力[17]。随着布氏杆菌全基因组序列的完成[18],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氏杆疫苗株提供了更广泛的资源。在我国,中国兽医药品监察所从事了很多布氏杆菌疫苗株的筛选工作,并获得了世界上已知毒力最弱的 S2 毒株,该株现被广泛我国布氏杆菌病的预防接种。另外作者现已通过同源重组,获得了 S2 和 2308 株来源的重组毒株 $S2^r$ 和 2308^r,相关的动物试验正在进行。

2.3 布氏杆菌 DNA 疫苗的研究

DNA 疫苗是直接将带有目的抗原基因的重组质粒转染或注射到动物细胞中,使之在细胞内持续表达天然的抗原物质。DNA 免疫动物后,可以长期表达目的蛋白,然后以肽的形式递呈给 MHC Ⅰ 类分子,再激活抗原特异性 T 细胞,诱发特定的免疫反应。DNA 疫苗可以克服常规疫苗的一些弱点(如残余毒力等),为控制布氏杆菌提供了一条可行的途径。由于机体的细胞免疫是控制布氏杆菌感染的关键,因此作为研究布氏杆菌 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:

2.3.1 P39(Periplasmic binding protein):P39 是一种良好的 T 细胞抗原,在动物体内能诱发强烈的迟发性超敏反应,Mariri 等研究了 P39 DNA 疫苗在诱发细胞免疫和体液免疫方面的能力,结果发现 P39 能诱发强烈的 T 细胞反应,并产生大量的 INF-γ,但对动物的保护试验远低于 S19 疫苗。但如果在 P39 DNA 疫苗中加入佐剂 CpG,则其免疫原性和保护性均有显著提高,甚至和灭活疫苗相当[19]。

2.3.2 L7/L12:L7/L12 是重要的布氏杆菌免疫优势抗原,在布氏杆菌的几种保护性抗原基因中,以它为基础构建的疫苗对感染具有最显著的抵抗作用。1996 年,Olieria 等研究发现从布氏杆菌中提取的 L7/L12 蛋白,能特异性地刺激感染动物的单核细胞,并上调 INF-γ 的转录和表达,从而起保护作用。1997 年,美国学者 Kurar 首次将 L7/L12 克隆进 pcDNA 载体中制备成 DNA 疫苗,小鼠试验表明,该 DNA 疫苗能够诱导细胞免疫并能在小鼠体内产生特异性的抗体,但抗体维持的时间较短[20]。2004 年我国学者曾政[21]也进行了以 L7/L12 为目的基因的 DNA 疫苗的尝试,认为 DNA 疫苗诱导的细胞免疫效果强于亚单位疫苗。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.3.3 Omp31(Outer membrance protein 31)根据分子量大小，布氏杆菌外膜蛋白可分3个组，Omp31属于31－34kDa组成员，被认为是粗糙型布氏杆菌最重要的保护性抗原蛋白[22]。用该基因和表达载体构建的重组质粒注入Balb/c小鼠体内，可产生大量的IgG，且在攻毒时有一定的保护作用[23]。

2.3.4 GroEL(Heat shock protein):Leclerq等用pCMV真核表达载体构建的GroEL-pCMV DNA疫苗免疫小鼠后，能在体内检测到很高的抗GroEL的活性，同时试验小鼠脾脏T淋巴细胞分泌INF-γ的量远远高于对照组，证实了DNA疫苗的抗体效果[24]，但该疫苗对动物体的保护力还有待进一步的证实。

另外还有诸如*GroES*、*YajC*、*UvrA*、*BA*14等基因编码的蛋白质都具有良好的刺激T细胞，引起细胞免疫活性的能力，这些基因也都是用作布氏杆菌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疫苗能完全代替死苗灭活疫苗或弱毒疫苗。另外根据现有的研究资料，对DNA疫苗的最有效的免疫途径是通过基因枪进行，而一般的实验室很难具备这种条件，临床应用就更困难，因此通过DNA疫苗控制布氏杆菌仍然有很多复杂的工作有待完成。

2.4 布氏杆菌重组亚单位疫苗的研究

由于重组亚单位苗一般以体液免疫为主，对于以细胞内感染为主的布氏杆菌，其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，但仍停留在实验室阶段[25,26]。

3 结束语

布病是一种极其重要的人兽共患病，仅在拉丁美洲布病每年造成至少6亿美元的损失，而九十年代美国这一数字平均为1.5亿美元。在我国，布病造成的损失也相当大，且近几年呈明显的上升趋势。疫苗在布病的防治上发挥了积极的作用，但常规疫苗始终不能有效地控制疾病的发生，并且有干扰诊断的准确性等诸多副反应。布氏杆菌病疫苗的研究和开发伴随着新技术的应用，也正经历着常规疫苗、重组基因工程疫苗和DNA疫苗的发展历程。随着疫苗研究工作的深入，以及对免疫途径、免疫时机、免疫方式等方面的进一步探索，相信不久将会有新一代的布氏杆菌病疫苗造福人类。

参 考 文 献

[1] Ariza J. Brucellosis: an update. The perspective from the Mediterranean basin. *Re Med Microbiol*, 1999, **10**:125－135.

[2] Murphy A, Sathiyaseelan J, Parent MA, *et al*. Interferon gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible Balb/c mice. *Immunology*, 2001, **103** (4):511－518.

[3] Ignacio M, María JG, Daniel M, *et al*. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Vet Res*, 2004, **35**:1－38.

[4] Davis DS, Elzer PH. *Brucella* vaccines in wildlife. *Vet Microbiol*, 2002, **90** (11):533－544.

[5] Bosseray N. *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*, 1991, **19**:355－363.

[6] Grilló MJ, Bosseray N, Blasco JM, *et al*. In vitro markers and biological activity in mice of seed lot strains and ommercial *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, 2000, **28**:119－127.

[7] 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** (2):191－196.

[8] Blasco JM, Marin C, Jimenez de Bagues MP, *et al*. Efficacy of *Brucella suis* strain 2 vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, 1993, **11** (13):1291－1294.

[9] Mustafa AA, Abusowa MF. Field-oriented trial of the Chinese *Brucella suis* strain 2 vaccine on sheep and goats in Libya. *Vet Res*, 1993, **24** (5):422－429.

[10] Schurig GG, Sriranganathan N. Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, 2002, **90** (1－4):479－496.

[11] Vemulapalli R, McQuiston JR., Schurig GG, *et al*. Identification of and 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 Immuno*, 1999, **6**:760－764.

[12] Godfroid F, Cloeckaert A, Taminiau B, *et al*. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (wbk). *Res Microbiol*, 2000, **151**(8):655－668.

[13] Allen CA, Adams LG, Ficht TA. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun*, 1998, **66**:1008－1016.

[14] Godfroid F, Taminiau B, Danese I, *et al*. Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun*, 1998, **66**: 5485－5493.

[15] McQuiston JR, Vemulapalli R, Inzana TJ, *et al*. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homologue in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect Immun*, 1999, **67**:3830－3835.

[16] Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, *et al*. Complementation of *rucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in Oantigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun*, 2000, **68**:3927－3932.

[17] 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**: 3286－3289.

[18] DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, *et al*. The genome of Brucella melitensis. *Vet Microbiol*, 2002, **90** (1－4):587－592.

[19] 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** (8):

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

4816-4822.

[20] Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of Brucella abortus ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine*, 1997, **5** (17-18): 1851-1857.

[21] 曾 政,王 英,赵光宇,等. 布氏杆菌 pcDNA3.1-L7/L12 核酸疫苗的构建及其免疫学评价. 免疫学杂志,2004,**20**(3): 208-212.

[22] Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, *et al*. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol*, 2002, **90** (1-4): 229-47.

[23] 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** (2): 85-93.

[24] Leclerq 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 Microbio*, 2002, **51** (1): 20-26.

[25] Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, *et al*. Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect Immun*, 1996, **64** (7): 2490-2499.

[26] He Y, Vemulapalli R, Schurig GG. Recombinant Ochrobactrum anthropi expressing *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase protects mice against B. abortus infection only after switching of immune responses to Th1 type. *Infect Immun*, 2002, **70** (5): 2535-2543.

The application and research advances of *Brucella* vaccines

DING Jia-bo* , MAO Kai-rong, CHENG Jun-sheng, DAI Zhi-hong, JIANG Yu-wen

(*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 and difficulty in cure. Brucellosis caused great losses to farming and people's health. Vaccination is the main measure used to control Brucellosis, and some attenuated *Brucella* strains were often used as vaccines. To find more effective vaccines, Scientists are now constructing recombinant strains, DNA vaccines and subunit vaccines, as well as inducing new attenuated strains from isolations. The present applications of *B*. *abortus* strain 19 (S19), *B*. *melitensis* Rev.1 (Rev.1), *B*. *suis* strain 2 (S2), *B*. *abortus* strain 45/20 (45/20) and rough strain *B*. *abortus* 51 (RB51) were discussed. And some recent research work on *Brucella* vaccines, such as *Brucella* recombinant vaccines, DNA vaccines and so on, were reviewed in this paper.

Keywords: *Brucella*; Brucellosis; Vaccine

Foundation item: the 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA519AZZ)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62158844-3261; E-mail: dingjiabo@sohu.com

Received: 4 November 2005/Accepted: 12 December 2005/Revised: 6 April 2006

journals.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn