

DOI:10.13350/j.cjpb.230324

· 综述 ·

## 布鲁菌病的流行现状及疫苗研究进展\*

张欠欠<sup>1\*\*</sup>, 元航<sup>1</sup>, 张凯玄<sup>1</sup>, 封小川<sup>2</sup>

(1. 延安大学医学院, 陕西延安 716000; 2. 延安市人民医院)

**【摘要】** 布鲁菌病是由布鲁菌感染引起的人畜共患慢性细菌传染病。其流行范围几乎遍布世界各地,且传染性强,严重影响公共健康和动物养殖业。因此,控制布鲁菌病的流行是消除布鲁菌病的关键,使用疫苗免疫是防控布鲁菌病的重要措施之一。本文就布鲁菌病的流行现状及布鲁菌疫苗进行介绍,并对基因工程疫苗以及其它新型布病疫苗的研究进展进行概述。

**【关键词】** 布鲁菌病; 流行病学; 疫苗; 综述

**【中图分类号】** R516.7

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)03-0364-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Mar;18(3):364-368, back cover.]

**Epidemiological status of brucellosis and research progress in vaccine**

ZHANG Qian-qian<sup>1</sup>, YUAN Hang<sup>1</sup>, ZHANG Kai-xuan<sup>1</sup>, FENG Xiao-chuan<sup>2</sup> (1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China; 2. Yan'an People's Hospital)

**【Abstract】** Brucellosis is a chronic zoonotic bacterial infectious disease caused by *Brucella* infection. Its epidemic range is almost all over the world, and it is highly contagious, which seriously affects public health and animal husbandry. Therefore, The key of eliminating brucellosis is to control the epidemic of brucellosis, and vaccination is one of the important measures to prevent and control brucellosis. This article introduces the epidemic status of brucellosis and brucella vaccines, and reviews the research progress of genetic engineering vaccines and other new brucellosis vaccines.

**【Key words】** Brucellosis; epidemiology; vaccine; review

\*\*\*布鲁菌病(Brucellosis,简称布病)是由布鲁菌(*Brucella*)感染引起的世界范围内常见的人畜共患病之一,我国将其列为乙类传染病,动物二类传染病。布鲁菌为革兰阴性兼性胞内寄生菌,使人致病的有羊布鲁菌(*B. melitensis*)、牛布鲁菌(*B. abortus*)、猪布鲁菌(*B. suis*)和犬布鲁菌(*B. canis*),其中羊布鲁菌的侵袭力和致病力最强,易引起人布鲁菌病的暴发和流行,我国90%以上的人布鲁菌病是由羊布鲁菌引起<sup>[1]</sup>。人感染布鲁菌的临床特点多为长期发热、多汗、关节痛及肝脾肿大等,如未及时治疗病情将会转为慢性,数年乃至终身不育,甚至丧失劳动能力<sup>[2]</sup>,严重影响人类健康。动物感染布鲁菌病的特征是生殖系统受侵,母猪发生流产和不孕,公猪引起睾丸炎、腱鞘炎和关节炎等,致家畜繁殖能力和生产能力下降,对畜牧业构成了极大的危害,并影响畜产品的质量和安全。因此,布鲁菌病严重影响公共健康和动物养殖业。

### 1 布鲁菌病的流行现状

布鲁菌病属于人畜共患的慢性细菌传染病,全球有近170个国家和地区的人、畜中存在布鲁菌病,其中地中海地区、亚洲及中南美洲为高发地区<sup>[3]</sup>。近年来,布鲁菌病在世界范围内呈回升趋势,是全球特别是发展中国家面临的公共卫生问题<sup>[4-5]</sup>。在不同国家或同一国家的不同地区布病的发病率存在着差异,有数据显示,在发达国家如德国、美国国内年发病率在0.03/10万~0.09/10万,发展中国家如伊拉克各地区、沙特阿拉伯等地均很高,有些地区年发病率最高达到268.8/10万<sup>[6]</sup>。数据显示,布鲁菌病的流行与国家经济情况存在着一定的联系,文献报道显示<sup>[7]</sup>,国外少数经济发达国家已宣布根除了布病,但在

一些经济欠发达的国家和地区,布病仍然处于高度流行的状态。

在我国,除澳门和台湾布病疫情未知外,其余省级单位均存在布病病例的报道<sup>[8]</sup>。调查显示,我国大陆地区人间布病发病有明显的聚集性,疫情呈现由北方向南方、由牧区向半牧区和农区移动的趋势,而且布病疫情聚集程度逐年上升<sup>[9-10]</sup>。在所报告的传染病中布鲁菌病是发病数和发病率上升速度最快之一<sup>[11-12]</sup>,全国近年的布病病原学监测结果表明<sup>[13]</sup>,预计未来一段时期,全国布病病例报告数持续增加。人间布病的最主要流行菌型为羊种3型,其次为羊种1型、羊种2型<sup>[14-15]</sup>。我国北部畜牧业发达地区是布鲁菌病发病严重地区,如内蒙古、吉林、黑龙江、西藏、新疆、青海、宁夏和河南等<sup>[16]</sup>,其中内蒙古发病率最高,占全国布鲁菌病病例的40%以上<sup>[17]</sup>。

### 2 布鲁菌病疫苗现状

布鲁菌病对畜牧业发展和人畜健康构成较大威胁,目前防控布鲁菌病的一项重要措施是疫苗免疫,尤其是在布病流行形势严峻的地区。布鲁菌病疫苗的研究最早开始于20世纪,早期曾使用灭活疫苗(牛种布鲁菌45/20株、19-B株以及羊种

\* **【基金项目】** 陕西省重点研发计划项目(No. 2021SF-230); 榆林市科技项目(No. CXY-2020-064);延安大学产学研项目(No. CXY202121)。

\*\* **【通讯作者(简介)】** 张欠欠(1978-),女,陕西富平人,研究生,副教授,从事病原微生物致病与防治研究。E-mail: zhangqianyd@163.com

H38株)用于人和动物的布病防控,但布鲁菌进入机体内主要是在细胞内繁殖,而减毒活疫苗的优点在于能够诱导体液免疫和细胞免疫两种免疫反应、可在机体内长时间起作用而诱导较强的免疫反应且无需佐剂,并且已有实验表明,减毒活疫苗的效果优于灭活疫苗<sup>[18]</sup>。因此,后来减毒活疫苗取代灭活疫苗用于人和动物布病的防控。但至今,尚无国际认可的针对人类的布鲁菌病疫苗,目前用于人布鲁菌病免疫的19-BA疫苗仅在俄罗斯(前苏联)使用,104M疫苗是我国唯一经官方批准用于人的布鲁菌病疫苗<sup>[19]</sup>。由于很多国家对人类使用疫苗免疫存在异议,有关人类临床疫苗试验的信息和相关数据很少<sup>[20-21]</sup>。因此,人类布鲁菌病的预防有赖于其在动物宿主中的控制<sup>[22]</sup>,目前可用于动物布病防控的减毒活疫苗有牛种布鲁菌S19疫苗、羊种布鲁菌Rev.1疫苗、粗糙型牛种布鲁菌RB51疫苗、猪种布鲁菌S2疫苗、羊种布鲁菌M5疫苗和牛种布鲁菌A19疫苗等。国内外使用的布鲁菌病减毒活疫苗主要为A19、S2、Rev.1、M5、RB51<sup>[23]</sup>。

**2.1 牛种布鲁菌S19疫苗** 最初的S19菌株是1923年从奶牛乳汁中分离出并经实验室传代自然减毒,成为一株毒力稳定的弱毒疫苗S19<sup>[24]</sup>。美国科学家筛选出的对赤藓糖醇敏感的S19菌株即国际上广泛使用的S19疫苗,经研究发现<sup>[25]</sup>该菌株基因组中有一个702 bp的缺失,这段缺失是编码赤藓糖醇代谢的eryABCD 4个阅读框(open reading frame, ORF)的基因,此缺失使得eryC和eryD基因被破坏,从而导致菌株对赤藓糖醇敏感,这种菌株相较最初的S19安全性更高,自20世纪30年代初开始广泛应用于牛布鲁菌病的防控,但本疫苗不能接种于孕羊,在20世纪90年代被RB51替代。我国使用的是A19,是50年代从俄罗斯引进的S19疫苗<sup>[26]</sup>,与美国S19菌株比较,A19菌株无赤藓糖醇代谢基因(ery)的702碱基的缺失。

**2.2 牛种布鲁菌RB51疫苗** Schurig等<sup>[27]</sup>于1982年开发,布鲁菌RB51株是通过流产芽孢杆菌2308的连续传代产生自发减毒突变得到的,其毒力较弱、稳定性强,有对牛进行疫苗接种实验数据表明,接种RB51疫苗可防止59.4%的流产、58.6%的奶牛感染和61.0%的胎儿感染<sup>[28]</sup>,接种过RB51疫苗的牛抗感染能力增强并且流产率降低<sup>[29]</sup>。RB51疫苗在牛布鲁菌病防控显示出良好的效果,目前在北美已经得到广泛应用,在美国、墨西哥、智利等地已经作为官方疫苗应用于野生动物<sup>[30]</sup>。但该疫苗对羊的免疫效果有待验证,目前仍然没有用于羊群免疫的高效且能实现鉴别诊断的粗糙型疫苗,我国并未引进该疫苗<sup>[31]</sup>。另外,在使用RB51疫苗的过程中可能会造成人类感染引起疾病<sup>[32]</sup>,并且机体在RB51疫苗的刺激下不能产生针对O侧链的抗体,使用常规的血清学方法无法进行检测,因此缺乏可以检测RB51菌株的免疫反应的血清学检测对诊断带来了额外的挑战。在治疗人类布鲁菌病的抗生素中,利福平是首选的抗生素之一,在体外培养时RB51疫苗具有利福平抗性。根据RB51的特性,疫苗使用过程中要做好防护工作。

**2.3 羊种布鲁菌Rev.1疫苗** Rev.1是一种具有链霉素抗性的光滑型突变株,最初是通过羊种布鲁菌6056野毒株在链霉素抗性培养基上进行多次传代后得到的<sup>[33]</sup>,该疫苗曾在西班牙、意大利、蒙古、以色列等国用于山羊和绵羊布鲁菌病的防治<sup>[34]</sup>。Rev.1作为羊种布鲁菌病疫苗株的代表,在免疫动物的血清学试验中诱导阳性抗体反应,一直保持良好效果。

Rev.1疫苗是目前世界范围内公认的小反刍动物(羊属于小反刍动物)布病防控最有效的疫苗,在多国使用效果非常显著,如希腊、蒙古等国<sup>[35]</sup>。但Rev.1疫苗具有一定的毒力,可能会引起人类感染,因此,需要在特定时间对符合接种条件的动物进行接种。我国并未引进和使用Rev.1疫苗。

**2.4 羊种布鲁菌M5疫苗** 羊种布鲁菌M5菌株是1962年由中国农业科学院哈尔滨研究所开发的,该菌株是从羊体内分离的羊种布鲁菌强毒株M28进行弱化所得的弱毒株,因其毒力较强在给孕畜接种时流产率极高,因此,主要用于未怀孕的羊接种使用<sup>[36]</sup>。该疫苗目前多用于山羊布鲁菌病的防治,最好的接种方式是 $5 \times 10^9$  CFU/mL气雾免疫,可提供一年的免疫保护<sup>[26]</sup>。由于M5疫苗具有毒力强、菌株不稳定的特点,并且经常会出现由S型转为R型的变异,因此,我国对该疫苗的生产已经停止。

**2.5 猪种布鲁菌S2疫苗** S2毒株是1952年中国兽医药品检验所(IVDC)从流产猪胎中分离并经过多次传代得到的光滑型减毒菌株,该菌株具有无毒特性,在接种敏感动物时具有较高的保护力,但到目前为止,S2的减毒机制尚不清楚<sup>[37]</sup>。S2主要通过口服方式对动物进行免疫,有实验表明,S2菌株能够刺激绵羊和山羊的血清凝集素的产生,在将疫苗直接注射到口腔或饮用水中后,S2可以渗透到动物的淋巴和内脏,产生对布鲁菌感染的保护性免疫<sup>[38]</sup>。S2疫苗与S19、Rev.1相比,在机体停留的时间较短,用于刺激机体产生抗体的时间较短,免疫保护力较低,但毒力较弱,有良好的免疫保护效果和较高的安全性,目前在我国广泛使用。但是S2菌株对人存在一定的致病力,在防控布病的过程中,防护的疏忽会使得布病疫苗成了疾病的传染源<sup>[39]</sup>。

**2.6 牛种布鲁菌RA343疫苗** 牛种布鲁菌RA343疫苗是由中国兽医药品监察所开发的一株粗糙型布鲁菌疫苗<sup>[40]</sup>,是中国第一个粗糙型布鲁菌活疫苗。该疫苗是一种具有中等毒力的菌株,毒力稳定,对动物进行免疫是安全的,特别是对孕牛具有安全性,不会造成流产,未出现不良反应,并且该疫苗具有良好的免疫原性<sup>[31]</sup>。但在毒力稳定的同时由于该疫苗毒力可能过度弱化,在免疫过程中不能产生足够的保护力,其免疫效果可能不稳定,易恢复成光滑型菌株,也可能出现免疫后会刺激机体产生少量抗O抗原的抗体,会对诊断结果进行干扰。

### 3 新型布鲁菌病疫苗

目前广泛使用的减毒活疫苗虽然对布病的防控起到了一定的积极作用,但因为减毒活疫苗会出现毒性较大、毒力不稳、常对免疫的人和动物造成伤害、返祖现象严重等情况,导致难以区分是自然状况下感染还是人工接种免疫造成的疾病,从而干扰常规的血清学诊断。20世纪70年代以来,重组DNA技术作为疫苗研究的新手段被应用。由于目前的布鲁菌病疫苗都存在不同程度安全性问题,而基因工程疫苗克服了传统疫苗的易返祖、影响接种动物等缺陷,基因工程疫苗出现的安全问题更容易得到控制和处理。因此,基因工程疫苗已经成为了目前的研究热点,包括基因缺失疫苗、亚单位疫苗、DNA疫苗等。

#### 3.1 基因工程疫苗

**3.1.1 基因缺失疫苗** 基因缺失疫苗是对某些特定基因进行敲除,从而构建出毒力减弱并含基因标记的一种基因缺失株,

毒力得以减弱、传代稳定、不发生突变、安全性增强。因掌握了其遗传背景,使得缺失株免疫后产生的抗体能够在血清学上与野毒株感染进行鉴别诊断,因此,该类疫苗目前获得了迅速的发展。vjbr 基因缺失、bp26 基因缺失、VirB12 基因缺失、多糖 O 链相关编码基因缺失、sodc 基因缺失、Dnak 基因缺失菌株可作为布鲁菌病疫苗的候选疫苗株<sup>[23]</sup>。相信在不久的将来,定能应用于生产,有效控制布鲁菌病。

**3.1.2 亚单位疫苗** 亚单位疫苗(subunit vaccine) 又称生物合成亚单位疫苗或重组亚单位疫苗,是将保护性抗原基因在原核或真核细胞中表达,并以基因产物蛋白质或多肽制成疫苗。亚单位疫苗的有效性取决于目标抗原,重组蛋白疫苗的研究基础是筛选最佳抗原。有研究显示,将纯化的布鲁菌脂多糖(LPS)抗原接种于小鼠皮下,对感染有显著保护作用<sup>[41]</sup>。疫苗制剂是由纯化的布鲁菌脂多糖(LPS)抗原和 4 种减毒沙门菌活疫苗载体菌株的混合物组成,每个菌株携带 4 种重组布鲁菌抗原,即鲁马津合成酶(BLS)、脯氨酸消旋酶亚基 A(PrpA)、脂蛋白外膜蛋白-19(Omp19)和铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn SOD)<sup>[42]</sup>。这种疫苗制剂在怀孕动物中可能更安全,并可能成为布鲁菌减毒活疫苗(如 S19)的替代品<sup>[43]</sup>。亚单位疫苗因其安全性而对疫苗接种目的很有吸引力,并且亚单位疫苗的抗原成分简单、易通过血清学检测,然而此类疫苗通常无法达到引发减毒活疫苗所产生的免疫反应幅度,因此在增加对特定抗原的免疫反应方面需要付出努力,以实现最大效果。为增强其免疫效果,可将几个蛋白或多个有效的多肽进行重组,该方法能够提高其免疫原性并增强其免疫效果。目前关于布鲁菌重组亚单位疫苗免疫动物试验报道不多,研究仍处于初级阶段。

**3.1.3 DNA 疫苗** DNA 疫苗是含有保护性抗原的重组质粒,能够表达多种抗原,具有代表性是 L7/L12、Omp16。构建表达布鲁菌核糖体蛋白 L7/L12 或 Omp16 的 H5N1 和 H1N1 亚型重组甲型流感病毒,在动物实验中能够诱导抗原特异性体液免疫和 T 细胞免疫反应<sup>[44]</sup>,特别是能够诱导 Th1 应答反应,在实验对象受到细菌攻击时能够起到良好的保护作用,比如可以诱导细胞毒性反应以防止布鲁菌的感染<sup>[45]</sup>。Cu/Zn SOD 能够刺激小鼠引起体液免疫和细胞免疫,攻毒保护性试验结果显示,以 Cu/Zn SOD 构建的 DNA 疫苗能起到良好的保护效果<sup>[46]</sup>。DNA 疫苗安全性高、稳定性好、易于生产、运输方便,但在动物体内表达量较低或出现基因沉默不表达的情况,因此,其用于人和动物的具体效果还需要试验进行验证,目前并没有能完全取代弱毒疫苗的 DNA 疫苗。

## 3.2 外膜蛋白疫苗

**3.2.1 重组 Omp25 蛋白疫苗** OMP25 是布鲁菌主要外膜蛋白之一,已被证明能够抑制野生型布鲁菌的 TNF- $\alpha$  和 IL-12 的释放,阻止人类树突状细胞成熟和抗原呈递<sup>[47]</sup>。有研究使用 Omp25 设计的 DNA 疫苗对羊巴氏杆菌 16M 的攻击有较为显著的保护性<sup>[48]</sup>。该重组疫苗是通过用 PCR 扩增 Omp25 基因片段,克隆到表达载体 Pet102/D-Topo 中,利用原核表达系统进行蛋白表达,用亲和层析和凝胶渗透层析对重组 Omp25 蛋白进行纯化,采用 MTS 法和细胞因子释放法分别检测细胞活性和炎症反应,结果显示,0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量对细胞活力无明显影响,并能显著增加原始细胞的炎症反应<sup>[49]</sup>。

**3.2.2 重组 Omp19 蛋白疫苗** Omp19 存在于 6 种布鲁菌

中,通过扩增 OMP19 抗原编码基因,将其克隆到原核表达载体 pT1NX 中,通过电穿孔技术转化干酪乳杆菌,再通过免疫印迹和免疫荧光实验等免疫学筛选试验,用抗重组蛋白的特异性抗体证实了重组蛋白的表达,最后将重组干酪乳杆菌以口服方式给小鼠,结果表明,通过干酪乳杆菌疫苗接种 OMP19 的小鼠与阴性对照组比较,能够很好的抵抗 *B. abortus* 544 强毒株攻击的全身和粘膜免疫应答<sup>[50]</sup>,重组干酪乳杆菌 OMP19 免疫小鼠可诱导 Th1/Th2 混合免疫应答,此类疫苗可能被用来保护包括人和动物在内的宿主中的六种布鲁菌,也是作为预防布鲁菌病的良好候选疫苗。

**3.2.3 重组 Omp31 蛋白疫苗** Omp31 是存在于羊布鲁菌表面的外膜蛋白,是良好的保护性抗原。Harzandi 等<sup>[51]</sup>构建了以真核 DNA pcDNA3.1 和 pVAX1 作为载体分别融合 Omp31 基因构成 pcDNA-omp31 和 pVAX-omp31 并对小鼠进行免疫实验,结果表明,两种疫苗均能产生较高水平的细胞因子和免疫球蛋白的 Th1 型反应。重组羊种布鲁菌 31ku 外膜蛋白(rOmp31)在不完全弗氏佐剂作用下的免疫原性和免疫保护效果均较好。rOmp31 免疫 BALB/c 小鼠对绵羊布鲁菌和羊布鲁菌感染有保护作用,rOmp31 可诱导较强的免疫球蛋白 G 应答,且 IgG1 效价高于 IgG2 效价<sup>[52]</sup>。Shirdast 等<sup>[53]</sup>设计的融合了 usp45 信号肽和 M6 细胞壁锚定的 omp31 基因,并将其克隆到 pNZ7021 表达载体中,构建了表达 Omp31 的重组乳酸杆菌,用表达 Omp31 的乳酸杆菌活菌分别口服和腹腔免疫动物,检测特异性细胞因子和抗体,结果显示,表达 Omp31 的重组乳链球菌免疫小鼠的 sIgA、血清 IgA、IgM 和总免疫球蛋白抗体显著升高,表明重组乳酸杆菌可以诱导机体的体液免疫与细胞免疫。

**3.2.4 载体介导的外膜蛋白疫苗** 载体疫苗是通过将布鲁菌保护性抗原导入病毒或细菌基因组内制备所得,该疫苗的优点在于能够一次导入多种抗原从而同时对多种病原菌进行免疫。细菌和病毒的减毒株经过改造作为载体的布鲁菌外膜蛋白疫苗,接种小鼠可有效对抗该菌有毒株的攻击<sup>[54]</sup>。Tabynov 等<sup>[55]</sup>将布鲁菌 L7/L12 或 Omp16 重组到 H5N1 或 H1N1 构建了一种新型载体疫苗,通过在牛身上进行实验,结果显示,通过皮下免疫接种疫苗后实验对象的流产率和感染率保护情况均与 RB51、S19 保护情况相似。有研究对以流感病毒作为载体的疫苗进行了安全性和有效性评估,该种疫苗对母牛、幼龄母牛加强免疫后是安全的,妊娠母牛未出现流产情况,所有实验年龄组的牛对布鲁菌 Omp16、L7/L12 的免疫球蛋白抗体反应增强,并且该疫苗对小牛、小母牛和成年奶牛抵抗牛布鲁菌 544 感染的有效率均高于 50%,数据结果表明,以流感病毒作为载体的布鲁菌疫苗对牛是安全的<sup>[56]</sup>。

Saez 等<sup>[57]</sup>将 SOD 与 pSEC 重组的 pSEC-SOD 表达载体克隆到乳酸乳球菌 NZ9000 株,筛选阳性菌株后乳菌肽诱导,经口免疫 BALB/c 小鼠,用间接 ELISA 检测 SOD 特异性 IgM、IgG1、IgG2 或 sIgA。实验结果表明,该种疫苗能够诱发体液免疫和细胞免疫,以乳球菌作为活载体的疫苗是一种有前景的预防布鲁菌感染的干预措施。Lalsiamthara 等<sup>[58]</sup>分别将布鲁菌 SOD、BLS、OMP19 和 PRPA 蛋白与沙门菌进行重组,通过腹腔注射的方式对豚鼠进行免疫,检测其免疫应答及安全性,结果显示,免疫豚鼠产生了特异性抗体,并且接种该疫苗的妊娠

豚鼠未发生流产情况,表明该疫苗或许对怀孕动物使用时的安全性高于其他类型疫苗。

### 3.3 其他新型疫苗

**3.3.1 外膜囊泡疫苗** 外膜囊泡(outermembranevesicles, OMVs)是由双脂膜和球形组成的纳米结构,大小从25 nm到250 nm不等,主要由革兰阴性菌分泌并外排出细菌外,可以作为多抗原复合物刺激机体产生免疫应答反应<sup>[59-60]</sup>。Solanki等<sup>[61]</sup>从B. abortus S19及其LPS突变体B. abortus S19 $\Delta$ per的培养上清液中分别分离到OMVs S19和OMVs S19 $\Delta$ per,将OMVs S19 $\Delta$ per和OMVs S19加或不加加强剂对小鼠进行免疫,然后用2 $\times$ 10<sup>5</sup>CFU流产布鲁菌544强毒株(S544)攻毒,结果显示,OMVs免疫后小鼠脾脏重量指数和S544计数均低于未免疫小鼠,说明OMVs具有良好的保护作用。同时检测结果显示,免疫球蛋白滴度高,Th1型(IgG2a)和Th2型(IgG1型)相关抗体产生,IL-2、肿瘤坏死因子(Th1)和IL-4、IL-6、IL-10(Th2)细胞因子刺激,诱导T细胞应答,提示OMVs S19 $\Delta$ per可以诱导小鼠Th1和Th2型免疫应答,对S544攻击具有一定的保护作用。通过对OMVs提取的标准化,OMVs疫苗是已经获得官方许可的用于脑膜炎奈瑟菌病的疫苗,充分说明其具有很好的实际应用价值<sup>[62]</sup>。有研究表明,在小鼠模型上布鲁菌OMVs可以提供与Rev.1相近的免疫保护力,并可以通过应用佐剂进一步提高保护力<sup>[63-64]</sup>。因此,外膜囊泡作为亚单位疫苗其优势在于OMVs是非细胞实体,安全性更高。

**3.3.2 菌壳疫苗** 菌壳技术是一种新型的灭活疫苗制备方法,通过非变性的灭活方式保存细菌表面多个抗原表位,所制备的菌壳可作为预防细菌病的理想疫苗。革兰阴性菌通过表达噬菌体裂基因E造成细胞壁形成跨膜孔道,从而引起菌体内内容物外流而形成菌壳(Bacterialghost)。菌壳无传染风险,但是保留与活菌相似的细胞膜结构以及抗原蛋白等,因此可以作为载体递呈药物、多肽或者疫苗等。研究表明,粗糙型布鲁菌菌壳疫苗能有效地激发体液免疫和细胞免疫,但仍需要大量的研究来评估菌壳疫苗对靶动物产生的保护力<sup>[65]</sup>。

**3.3.3 纳米颗粒疫苗** DNA、蛋白质、多糖等生物分子均为纳米级大小,1~1 000 nm不同直径的纳米颗粒通过运输不同的生物活性物质进入机体达到预防和治疗疾病的目的,但布病纳米颗粒疫苗相关的研究鲜有报道。Karevan等<sup>[66]</sup>利用甘氨酸纳米粒作为有效的佐剂和递送系统,对重组嵌合抗原Tf/Bp26/Omp31的特异性免疫应答进行评价。将含有抗原的纳米颗粒通过不同方式免疫BALB/c小鼠,结果显示,纳米配方免疫的小鼠血清中重组嵌合抗原抗体(免疫球蛋白G)水平较高,口服组小鼠的粘膜抗体(免疫球蛋白A)水平也较高,对布鲁菌有较好的免疫力,说明嵌合抗原甘氨酸纳米粒可作为布鲁菌病细胞免疫和体液免疫的候选疫苗。因此,纳米颗粒疫苗是具有良好前景的新型疫苗。

## 4 展望

布鲁菌病属于人畜共患传染病,近年来其发病率呈明显上升趋势,不仅给畜牧养殖业造成巨大损失,而且还时刻威胁着人类生命健康。随着对布鲁菌致病机制的深入研究以及相关分子生物学技术的发展与应用,新型疫苗的研制不断取得新进展,而且不同疫苗研究理论技术的发展,也为布鲁菌新型疫苗的研制提供了新的思路。

## 【参考文献】

- [1] 黄超. 石河子部分规模化牛场布鲁氏菌病流行病学调查以及病原分离和生物型鉴定[D]. 石河子大学,2019.
- [2] 韩常新,秦世娟,李雨婷,等. 156例布鲁氏菌病流行病学和临床特征分析[J]. 中国实用医药,2020,15(7):116-118.
- [3] 王晓欢,姜海. 全球人布鲁氏菌病流行特征[J]. 中华流行病学杂志,2020,41(10):1717-1722.
- [4] Zhang X, Wang Z, Mu G, et al. Brucellosis control in northeast China: a long way to go[J]. Public Health, 2015, 129(8): 1132-1134.
- [5] Doni NY, Gurses G, Simsek Z, et al. Investigation of brucellosis in a female agricultural population in Turkey[J]. Tropical Doctor, 2017, 47(2): 132-136.
- [6] Anna S, Lisa C, Helena G. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency[J]. PLo S Negl Trop Dis, 2012, 6(10): 1-9.
- [7] 张宁,梁凤,刘静,等. 国外动物布鲁氏菌病监测系统研究进展[J]. 医学动物防制,2017,33(11):1117-1121.
- [8] 张晓晨,王赢,张萌,等. 2013-2018年人间布鲁菌病流行特征及空间自相关性分析[J]. 中国地方病防治,2022,37(1):17-18.
- [9] 廖伟斌,孙建国,于国伟,等. 中国大陆2006-2012年人和牲畜布鲁氏菌病空间分布特征及相关性[J]. 中国公共卫生,2015,31(10):1289-1293.
- [10] 李德强,李明月,刘静,等. 2004-2013年全国布鲁氏菌病发病重心迁移轨迹研究[J]. 中国卫生统计,2016,33(6):967-968.
- [11] 李兰娟,任红. 传染病学[M]. 9版. 北京人民卫生出版社,2018:187-190.
- [12] Dadar M, Shahali Y, Fakhri Y, et al. The global epidemiology of *Brucella* infections in terrestrial wildlife: A meta-analysis[J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 68(2): 715-729.
- [13] 王赢. 2020年全国布鲁菌病监测结果分析[J]. 中国地方病防治,2021,36(6):565-569.
- [14] 刘志国,王妙,李月玺,等. 羊种布鲁菌鉴别方法研究[J]. 中华地方病学杂志,2017,36(9):653-656.
- [15] 王会敏,张洪军,李秀慧,等. 布鲁氏菌病流行菌株的鉴定与分析[J]. 今日畜牧兽医,2018,34(12):14-15.
- [16] Dequ S, Donglou X, Jiming Y. Epidemiology and control of brucellosis in China[J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1-4): 165-182.
- [17] Zhou L, Fan M, Hou Q, et al. Transmission dynamics and optimal control of brucellosis in Inner Mongolia of China[J]. Math Biosci Eng, 2018, 15(2): 543-567.
- [18] AvilaCalder n ED, LopezMerino A, Sriranganathan N, et al. A history of the development of *Brucella* vaccines[J]. Biomed Res Int, 2013(2013): 743509.
- [19] Yu D, Hui Y, Zai X, et al. Comparative genomic analysis of *Brucella abortus* vaccine strain 104M reveals a set of candidate genes associated with its virulence attenuation[J]. Virulence, 2015, 6(8): 745-754.
- [20] 张俊敏,韩文瑜,雷连成,等. 布鲁氏菌强毒株与弱毒株基因组DNA差异基因筛选与鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2009,31(7):513-518.
- [21] Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*[J]. J Vet Sci, 2017, 18(S1): 281-290.
- [22] Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, et al. Brucellosis at the

- animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century[J]. *Prev Vet Med*,2011,102(2):118-131.
- [23] 冯生,刘宝山,陈泽良,等.布鲁菌基因缺失疫苗候选株研究进展[J].*动物医学进展*,2020,41(3):110-113.
- [24] Thomas EL, Bracewell CD, Corbel MJ. Characterisation of *Brucella abortus* strain 19 cultures isolated from vaccinated cattle[J]. *Vet Rec*,1981,108(5):90-93.
- [25] Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (5): e2193.
- [26] 丁家波,冯忠武. 动物布鲁氏菌病疫苗应用现状及研究进展[J].*生命科学*,2013,25(1):91-99.
- [27] Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus* [J]. *Vet Microbiol*,1991,28(2):171-188.
- [28] Poester FP, Gonçalves VS, Paixão TA, et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis [J]. *Vaccine*,2006,24(25):5327-5334.
- [29] Olsen SC, Jensen AE, Stoffregen WC, et al. Efficacy of calfhood vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 in protecting bison against brucellosis[J]. *Res Vet Sci*,2003,74(1):17-22.
- [30] 郭佳怡. 布鲁氏菌病疫苗应用现状与防控措施[J].*中国畜牧业*,2021(6):42-43.
- [31] 孙浩杰,孙佳丽,张楠,等. 粗糙型布鲁菌及其疫苗研究进展[J].*动物医学进展*,2020,41(11):96-99.
- [32] Negron ME, Kharod GA, Bower WA, et al. Notes from the field: Human *Brucella abortus* RB51 infections caused by consumption of unpasteurized domestic dairy products-United States, 2017-2019[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*,2019,68(7):185.
- [33] 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]. *J Bacteriol*,1957,73(2):211-217.
- [34] Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations [J]. *Vet Microbiol*,2002,90(1-4):497-519.
- [35] 彭永,张阁,冯宇,等. 动物布鲁氏菌 Rev. 1 疫苗研究进展[J].*中国兽药杂志*,2017,51(6):64-68.
- [36] Deqiu S, Donglou X, Jiming Y. Epidemiology and control of brucellosis in China [J]. *Vet Microbiol*,2002,90(1-4):165-182.
- [37] Di DD, Jiang H, Tian LL, et al. Comparative genomic analysis between newly sequenced *Brucella suis* vaccine strain S2 and the virulent *Brucella suis* strain 1330 [J]. *BMC Genomics*,2016,17(1):741.
- [38] Xin X. Orally administrable brucellosis vaccine; *Brucella suis* strain 2 vaccine [J]. *Vaccine*,1986,4(4):212-216.
- [39] 辛艳辉. 布氏杆菌病的防治 [J]. *中国畜牧兽医文摘*,2016,32(12):99.
- [40] 丁家波,王芳,杨宏军,等. 一株中等毒力牛种布鲁氏菌的鉴定和毒力测定 [J]. *中国农业科学*,2014,47(13):2652-2658.
- [41] Bhattacharjee AK, Izadjoo MJ, Zollinger WD, et al. Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal immunization of mice with a *Brucella melitensis* lipopolysaccharide subunit vaccine [J]. *Infect Immun*,2006,74(10):5820-5825.
- [42] Lalsiamthara J, Lee JH. *Brucella* lipopolysaccharide reinforced *Salmonella* delivering *Brucella* immunogens protects mice against virulent challenge [J]. *Vet Microbiol*,2017(205):84-91.
- [43] Lalsiamthara J, Senevirathne A, Lee JH. Partial protection induced by *Salmonella* based *Brucella* vaccine candidate in pregnant guinea pigs [J]. *Vaccine*,2019,37(7):899-902.
- [44] Tabynov K, Sansyrbay A, Kydyrbayev Z, et al. Influenza viral vectors expressing the *Brucella* OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection [J]. *Virology*,2014(11):69.
- [45] Cassataro J, Velikovsky CA, et al. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response [J]. *Infect Immun*,2005,73(10):6537-6546.
- [46] Gee JM, Valderas MW, Kovach ME, et al. The *Brucella abortus* Cu, Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice [J]. *Infect Immun*,2005,73(5):2873-2880.
- [47] Billard E, Dornand J, Gross A. *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion [J]. *Infect Immun*,2007,75(10):4980-4989.
- [48] 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 [J]. *Vaccine*,2007,25(1):43-54.
- [49] Atabay T, Acar T, Derman S, et al. *In vitro* evaluation of immunogenicity of recombinant OMP25 protein obtained from endemic *Brucella abortus* biovar 3 as vaccine candidate molecule against animal brucellosis [J]. *Protein Pept Lett*,2021,28(10):1138-1147.
- [50] Mohammadi E, Golchin M. High protection of mice against *Brucella abortus* by oral immunization with recombinant probiotic *Lactobacillus casei* vector vaccine, expressing the outer membrane protein OMP19 of *Brucella* species [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*,2020(70):101470.
- [51] Harzandi N, Aghababa H, Khoramabadi N, et al. Efficient immunization of BALB/c mice against pathogenic *Brucella melitensis* and *B. ovis*: Comparing cell-mediated and protective immune responses elicited by pCDNA3. 1 and pVAX1 DNA vaccines coding for Omp31 of *Brucella melitensis* [J]. *Iran J Biotechnol*,2021,19(1):e2618.
- [52] Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4<sup>+</sup> T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection [J]. *Infect Immun*,2005,73(12):8079-8088.
- [53] Shirdast H, Ebrahimzadeh F, Taromchi AH, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* displaying Op31 antigen of *Brucella melitensis* can induce an immunogenic response in BALB/c mice [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*,2021,13(1):80-89.
- [54] 李文桂,陈雅棠. 载体介导的布鲁菌外膜蛋白疫苗研制现状 [J]. *生物技术通讯*,2019,30(4):543-548.
- [55] Tabynov K, Yespembetov B, Sansyrbay A. Novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on influenza A viruses expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins: evaluation of protection in pregnant heifers [J]. *Vaccine*,2014,32(45):5889-5892.
- [56] Ryskeldinova S, Zinina N, Kydyrbayev Z, et al. Registered influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine for cattle in Kazakhstan: age-wise safety and efficacy studies [J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2021(11):669196.
- [57] Saez D, Fernandez P, Rivera A, et al. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity [J]. *Vaccine*,2012,30(7):1283-1290.
- [58] Lalsiamthara J, Senevirathne A, Lee JH. Partial protection induced by *Salmonella* based *Brucella* vaccine candidate in pregnant guinea pigs [J]. *Vaccine*,2019,37(7):899-902.
- [59] Bonnington KE, Kuehn MJ. Protein selection and export via outer membrane vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*,2014,1843(8):1612-1619.

Res,2020(157):104820.

- [52] Zhang Y, Gu X, Zhou Y, et al. An integrative analysis of Qingfei Paidu Decoction for its anti-HCoV-229E mechanism in cold and damp environment based on the pharmacokinetics, metabolomics and molecular docking technology [J]. *Phytomedicine*, 2022 (108):154527.
- [53] 赵静, 田赛赛, 杨健, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨 [J]. *中草药*, 2020, 51(4):829-835.
- [54] 沈爱明, 张伟, 吴卓, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(3):106-108.
- [55] Ren JL, Zhang AH, Wang XJ. Traditional Chinese medicine for COVID-19 treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2020(155):104743.
- [56] Cao P, Wu S, Wu T, et al. The important role of polysaccharides from a traditional Chinese medicine-Lung Cleansing and Detoxifying Decoction against the COVID-19 pandemic [J]. *Carbohydr Polym*, 2020(240):116346.
- [57] Huang F, Li Y, Leung EL, et al. A review of therapeutic agents and Chinese herbal medicines against SARS-COV-2 (COVID-19) [J]. *Pharmacol Res*, 2020(158):104929.
- [58] Liu Z, Li X, Gou C, et al. Effect of Jinhua Qinggan granules on novel coronavirus pneumonia in patients [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40(3):467-472.
- [59] 彭文潘, 徐泳, 韩迪, 等. 基于网络药理学和分子对接探究金花清感颗粒治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(12):1992-2002.
- [60] Zhang Y, Yao YF, Yang YF, et al. Investigation of anti-SARS, MERS, and COVID-19 effect of Jinhua Qinggan Granules based on a network pharmacology and molecular docking approach [J]. *Nat Prod Commun*, 2021, 16(5):529-539.
- [61] Wang Z, Zhang J, Zhan J, et al. Screening out anti-inflammatory or anti-viral targets in Xuanfei Baidu Tang through a new technique of reverse finding target [J]. *Bioorg Chem*, 2021 (116):105274.
- [62] 冯利民, 刘晓亚, 张磊. 宣肺败毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(奥密克戎)的临床疗效观察 [J]. *天津中医药*, 2022, 39(5):545-550.
- [63] Song S, Peng H, Wang Q, et al. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2 [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9):7415-7420.
- [64] Kwon PS, Oh H, Kwon SJ, et al. Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro [J]. *Cell Discov*, 2020, 6 (1):50.
- [65] Jang Y, Shin H, Lee MK, et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. *Sci Rep*. 2021, 11(1):821.
- [66] Ho TY, Wu SL, Chen JC, et al. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction [J]. *Antiviral Res*, 2007, 74(2):92-101.
- [67] Muhseen ZT, Hameed AR, Al-Hasani HMH, et al. Promising terpenes as SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD) attachment inhibitors to the human ACE2 receptor: Integrated computational approach [J]. *J Mol Liq*, 2020(320):114493.
- [68] Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors [J]. *Science*, 2020, 368(6489):409-412.
- [69] Maiti BK. Can Papain-like Protease Inhibitors Halt SARS-CoV-2 Replication? [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(5):1017-1019.
- [70] Steuten K, Kim H, Widen JC, et al. Challenges for Targeting SARS-CoV-2 Proteases as a Therapeutic Strategy for COVID-19 [J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7(6):1457-1468.
- [71] Swaim CD, Dwivedi V, Perng YC, et al. 6-Thioguanine blocks SARS-CoV-2 replication by inhibition of PLpro [J]. *iScience*, 2021, 24(10):103213.
- [72] Tian L, Qiang T, Liang C, et al. RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors: The current landscape and repurposing for the COVID-19 pandemic [J]. *Eur J Med Chem*, 2021(213):113201.
- [73] Ahmad M, Dwivedy A, Mariadasse R, et al. Prediction of Small Molecule Inhibitors Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 RNA-dependent RNA Polymerase [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(29):18356-18366.
- [74] 何黎黎, 龚普阳, 封玥, 等. 中药在抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)引起的细胞因子风暴中的应用分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(6):1375-1385.
- [75] 孙倩, 于小勇. 中医药治疗新型冠状病毒肺炎述评 [J]. *河南中医*, 2020, 40(7):983-986.

【收稿日期】 2022-10-17 【修回日期】 2023-01-03

(上接 368 页)

- [60] Manning AJ, Kuehn MJ. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2013, 23(1-2):131-141.
- [61] Solanki KS, Varshney R, Qureshi S, et al. Non-infectious outer membrane vesicles derived from *Brucella abortus* S19 $\Delta$ per as an alternative acellular vaccine protects mice against virulent challenge [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021(90):107148.
- [62] Acevedo R, Fernandez S, Zavas C, et al. Bacteria I outer membrane vesicles and vaccine applications [J]. *Front Immunol*, 2014, 5(121):2-6.
- [63] Eric D, Ahide L, Neeta J, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice [J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2012(2):1-13.
- [64] Neeta JG, Araceli CR, Ramesh V, et al. Pluronic P85 enhances the efficacy of outer membrane vesicles as a subunit vaccine against *Brucella melitensis* challenge in mice [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 66(3):436-444.
- [65] 张瑞安. 粗糙型布鲁氏菌菌壳的制备及其免疫学特性研究 [D]. 长春:吉林农业大学, 2013.
- [66] Karevan G, Ahmadi K, Taheri RA, et al. Immunogenicity of glycine nanoparticles containing a chimeric antigen as *Brucella* vaccine candidate [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2021, 10(1):35-43.

【收稿日期】 2022-10-13 【修回日期】 2022-01-06