

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.6.09

动物布鲁氏菌 Rev.1 疫苗研究进展

彭永,张阁,冯宇,丁家波*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-12-29 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2017) 06-0064-05 [中图分类号]S852.61

[摘要] 布鲁氏菌病(布病)是由布鲁氏菌引起的一种重要的人畜共患病,对公共卫生和畜牧养殖业构成严重威胁。布鲁氏菌 Rev.1 疫苗研制于 20 世纪 50 年代中期,并在欧洲、中东和蒙古等地区被广泛应用于小反刍动物的布病防控,一度被认为是防控小反刍动物布病最有效的疫苗。但是,Rev.1 疫苗仍存在毒力偏强及毒力不稳定等现象,其安全性值得关注。从 Rev.1 疫苗背景、生物学特性、疫苗使用情况以及存在的不足等几个方面进行了综述,以期为 Rev.1 疫苗的科学应用和布病相关疫苗的开发提供借鉴。

[关键词] 布鲁氏菌病;Rev.1 疫苗;安全性

Progress of *B. melitensis* Rev.1 Vaccine

PENG Yong, ZHANG Ge, FENG Yu, DING Jia-bo*

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

Corresponding author: DING Jia-bo, E-mail: dingjiabo@126.com

Abstract: Brucellosis is a damaging zoonosis caused by *brucella*, threatening the public health and livestock breeding seriously. *B. melitensis* Rev.1 vaccine was developed by Elberg and Herzberg in the mid-1950s, and has been administrated to control the prevalence of brucellosis in Europe, Middle East, Mongolia and many other regions since it was developed. Rev.1 has ever been considered as the best available vaccine against brucellosis on rams. Though Rev.1 vaccine has been of paramount importance in the control of brucellosis, it still has some disadvantages, such as virulence enhancement. This article review the background, the utilization and the drawbacks of the Rev.1 vaccine to provide reference for the development of brucellosis vaccine.

Key words: brucellosis; *B. melitensis* Rev.1 vaccine; security

布鲁氏菌病(布病)是由布鲁氏菌引起的一种人畜共患病,全球每年大约有 50 多万人感染本病,感染人群主要分布于拉丁美洲、中东、非洲、亚洲以

及地中海沿岸^[1]。布鲁氏菌在动物上主要感染牛、羊、猪,引起家畜的流产、高热等症状,对畜牧业的发展有着巨大的威胁^[2-3]。根据布病流行病学的特

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0500902)

作者简介:彭永,硕士研究生,从事重要人畜共患病诊断技术研究。

通讯作者:丁家波。E-mail: dingjiabo@126.com

点、宿主差异等可以将其分为 10 个不同的种,分别为羊种布鲁氏菌 (*B. melitensis*)、牛种布鲁氏菌 (*B. abortus*)、猪种布鲁氏菌 (*B. suis*)、绵羊附睾种布鲁氏菌 (*B. ovis*)、犬种布鲁氏菌 (*B. canis*)、沙林鼠布鲁氏菌 (*B. neotomae*)、鲸类布鲁氏菌 (*B. cetacean*)、鳍脚目布鲁氏菌 (*B. pinnipedia*)、田鼠布鲁氏菌 (*B. microti*) 和人布鲁氏菌 (*B. inopinata*)^[4]。根据表型差异,布鲁氏菌可分为粗糙型和光滑型 2 种。羊种、牛种和猪种布鲁氏菌通常表现为光滑型;绵羊附睾种和犬种布鲁氏菌则表现为天然的粗糙型;沙林鼠种目前只报道有光滑型出现^[5]。粗糙型布鲁氏菌与光滑型布鲁氏菌之间在血清上没有交叉反应性,但却有交叉保护性。国际上广泛使用的布病活疫苗株通常都是光滑型,到 1991 年,美国科学家开发出粗糙型布病活疫苗 RB51 株^[6]。

当布病流行较为严重时,疫苗是控制布病的重要武器。国际上常用的布病疫苗主要有牛种布鲁氏菌 S19 疫苗、牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗、羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗和猪种布鲁氏菌 S2 疫苗等^[7],其中 Rev.1 疫苗是应用最为广泛的羊种布病活疫苗,可对山羊和绵羊实施有效的免疫,该疫苗也是 OIE 手册中的提及的布病参考疫苗之一,本文将重点介绍 Rev.1 疫苗的基本情况和研究进展。

1 Rev.1 疫苗背景及其菌株的生物学特性

1.1 Rev.1 疫苗背景 在 20 世纪初,世界上普遍应用的动物布病疫苗是牛种布鲁氏菌 S19 疫苗。早期 S19 疫苗使用过程中发现其可能导致部分怀孕母畜流产和人的感染,安全性较低^[8-9],后来美国科学家对原 S19 毒株进行筛选得到 *ery* 基因缺失株,安全性较早期 S19 疫苗有了较大的提升,但却无法对小反刍动物提供有效的安全保护^[10]。20 世纪 50 年代中期,美国学者 Elberg 教授和 Herzberg 教授通过将羊种布鲁氏菌 6056 毒株在链霉素抗性培养基上不断传代得到带有链霉素抗性的光滑型突变菌株,并将此菌株研制开发成为布鲁氏菌羊种 Rev.1 疫苗^[11]。Rev.1 疫苗在研制之初对小鼠和豚鼠展现出了良好的保护力,但是对山羊和猿猴产生的保护水平却较低^[12]。随后 Elberg 教授等对初代

30 余株链霉素抗性菌株在无链霉素培养基上进行了二次筛选,成功得到一株理想弱毒株,实验证明该弱毒株在不同品系小鼠脾脏中存活时间在 6~12 周不等,证明其可以对动物产生良好的保护力^[13]。1957 年,Rev.1 疫苗首次通过临床实验被证实对山羊具有良好的保护作用^[14],此后开始大规模应用于欧洲多个国家的布病防控。

1.2 Rev.1 疫苗菌株生物学特性 Rev.1 疫苗菌株为光滑型羊种布鲁氏菌弱毒活菌株,菌落大小为 1~2 mm。不同于其他羊种布鲁氏菌的是,Rev.1 疫苗菌株对高浓度的品红以及硫堇敏感,这一特点常被用于其生物型鉴别。同时由于 Rev.1 疫苗菌株是通过链霉素筛选获得,所以对链霉素具有一定的抗性。由于目前 Rev.1 疫苗毒株的致弱机制仍未完全阐明,分子鉴别方法尚未确立^[15],所以上述特性的存在使得可以通过常规细菌培养方法对 Rev.1 和其他羊种布鲁氏菌菌株进行鉴别,这在疫苗生产和 Rev.1 疫苗评价中有着重要作用^[16]。

2 Rev.1 疫苗的使用情况

2.1 Rev.1 疫苗在小反刍动物中使用 Rev.1 疫苗在研制成功后即在许多国家进行试验性应用,试验的主要对象包括不同年龄、怀孕情况的山羊、绵羊、奶牛等,结果表明 Rev.1 疫苗可以显著保护免疫动物,并减少乳汁中布鲁氏菌的排菌量。随后不同国家地区的科研人员对 Rev.1、RB51 以及 S19 疫苗的保护力进行了比较性研究,证明 Rev.1 对于小反刍动物的保护力优于 RB51 和 S19 活疫苗^[17-19]。

随着 Rev.1 疫苗在越来越多的试验中表现出的良好保护作用,Rev.1 疫苗开始被多个国家和地区应用于小反刍动物布病的防控,但是不同国家和地区使用 Rev.1 疫苗对布病的防控成果却不尽相同。在意大利,通过与强制淘汰政策的配合,1967-1978 年间约有 1200 万头份 Rev.1 疫苗被用于羊场布病的净化,意大利畜间和人间布病发病率由此大大降低。土耳其在单纯通过“检测+淘汰”策略控制布病无效后,采用免疫 Rev.1 疫苗和检测淘汰并行的办法,成功降低了布病在土耳其的发病率。南非也曾经在反刍动物中大规模使用 Rev.1 疫苗来抵抗

绵羊布鲁氏菌的侵袭^[20]。各国统计数据表明,在大规模免疫 Rev.1 疫苗后,免疫动物的流产率大大下降,人间布鲁氏菌感染率也同期下降,显示了动物布病防控对人间布病预防的积极意义^[21]。

Rev.1 疫苗在意大利、土耳其等国家取得成功的同时,在以色列、西班牙等国家对布病的防控中却不尽如人意。1963-1978 年期间,以色列使用 Rev.1 疫苗免疫绵羊和山羊总数达到 30 万只,但以

色列境内布病的发病率并未显著下降。最重要的是,在以色列使用 Rev.1 疫苗控制本国布病的同时,其境内出现了免疫牧场场主因免疫过程中感染 Rev.1 疫苗菌株而致病的案例。研究人员还从免疫动物的奶制品中也分离得到 Rev.1 菌株,表明 Rev.1 疫苗免疫动物存在向乳液中排菌的危险。表 1 列举了部分以色列从人血液和母羊乳液中分离到的 Rev.1 疫苗株^[21-22]。

表 1 以色列 Rev.1 疑似菌株分离及来源

Tab 1 Rev.1-like isolates and source of isolation

分离菌株 Strain designation	表型 O-chain phenotype	分离样本 Sample	样本来源 Source	流行病学情况 Epidemiological status
5000- I	光滑型	血液	人	Rev.1 菌株感染
58151	光滑型	乳汁	免疫母羊	Rev.1 菌株感染
64945/6	光滑型	乳汁	未免疫母羊	Rev.1 菌株水平传播感染
94/54805	光滑型	乳汁	免疫母羊	Rev.1 菌株及野毒感染
96/118295/1	光滑型	乳汁	免疫母羊	Rev.1 菌株感染
93/44457	粗糙型	乳汁	未免疫母羊	Rev.1 菌株水平传播感染
71036	粗糙型	乳汁	免疫母羊	Rev.1 菌株及野毒感染

同样,在西班牙强制性使用 Rev.1 疫苗防控该国布病长达的 6 年时间后,西班牙境内羊种布鲁氏菌流行率仍然高达 6.5%。且在这期间,西班牙布病新增感染数量高达 8000 人,这也意味着西班牙政府使用 Rev.1 疫苗防控本国布病的计划宣告失败^[20]。

2.2 Rev.1 疫苗在其他动物上的使用 Rev.1 疫苗在牛群中的实验结果表明其对牛的保护力低于 S19 疫苗,在牛群中大规模免疫使用的案例较少^[23]。OIE 在 20 世纪 70 年代曾在蒙古大规模组织使用 Rev.1 疫苗代替 S19 疫苗对牛群进行免疫,但是因 Rev.1 疫苗存在接种后免疫动物乳汁中出现排菌现象,而最终放弃使用。在其他经济动物上,有文献报道非洲以及中东地区使用 Rev.1 疫苗免疫骆驼,并且有着良好的保护力^[24]。

3 Rev.1 疫苗存在的不足

在 Rev.1 疫苗大规模应用的同时也出现了多种安全性问题。

第一,临床上 Rev.1 疫苗在接种母羊后,研究

人员从母羊的阴道分泌物中分离出 Rev.1 菌株,而这可能导致种群间布病的水平传播;同时,研究人员还证实无论通过皮下还是粘膜接种 Rev.1 疫苗,母羊阴道分泌物带菌状况始终存在^[25]。

第二,Rev.1 疫苗虽然是弱毒疫苗,但是其毒力相较于其他布病疫苗仍然较强。虽然一定的毒力可以对羊产生相当的保护力,但在使用过程中易导致怀孕母羊的流产。研究表明,使用标准剂量(1×10^9)接种后,母羊流产状况严重;减毒($10^5 \sim 10^7$)剂量接种怀孕期在 2~3 个月的母羊时,流产状况仍然存在;半剂量(5×10^4)接种免疫虽可降低母羊流产概率,但是却不能为动物提供足够的保护力^[26]。

第三,Rev.1 疫苗毒株存在严重的毒力不稳定现象,对密切接触菌株的人员有一定的潜在的安全威胁^[27-28]。同时,由于 Rev.1 疫苗毒株是光滑型菌株,动物在免疫接种后产生的抗体会干扰临床上对自然感染和疫苗免疫的区分^[29],对布病防控造成极大的困难。

最重要的是,Rev.1 疫苗在应用过程中多采用

点眼免疫接种的方法,此法被实践证实具有比皮下免疫接种更好的安全性^[25](提供充足保护力的同时降低流产概率),但由于粘膜免疫的开放性,对接种操作人员带来潜在的危险,免疫成功率也较皮下接种略低。

值得一提的是,不同国家 Rev.1 疫苗生产企业所用的种子批并不是来源于同一菌株^[31],导致不同国家生产出的疫苗存在差异^[31-32],从而使 Rev.1 疫苗的评价变得困难重重。有报道发现,临床上使用虎红凝集实验方法检测 Rev.1 免疫的羊群较其他疫苗免疫的羊群具有更高概率的假阳性现象^[33],推测与 Rev.1 毒力有关,过高的残余毒力使 Rev.1 在免疫动物体内存活更长的时间,延长了其抗体在体内的消退时间。由于 Rev.1 使用过程中出现的多种问题,在许多羊种布病已被消灭的国家,Rev.1 疫苗已经被禁止使用^[34]。

4 Rev.1 疫苗的改进

科研人员曾尝试通过突变 Rev.1 菌株来改进 Rev.1 疫苗的安全性,目前尚未取得良好效果。科学家曾尝试通过阻断布鲁氏菌 LPS 基因的表达来获得无血清学诊断干扰的突变菌株。通过突变 wbkF、per、wa 三个不同的基因位点均能获得无诊断干扰的突变菌株,但是三者和保护效力上均低于 Rev.1 疫苗原始菌株,而保护效力最强的 wbkF 突变株却能使母羊引起流产的概率高达 38%^[35]。

除通过突变获得粗糙型菌株外,科研人员曾尝试突变布鲁氏菌外膜蛋白 bp26 及 omp31 基因,以 Rev.1 菌株为模板,获得两个突变菌株:GGV26(不表达 bp26 外膜蛋白)和 GGV2631(不表达 bp26 及 omp31 两种蛋白)。在保护性试验中,GGV26 突变菌株表现出与 Rev.1 等同的保护力,并且强于 GGV2631 菌株,并且在遗传稳定性上优于 Rev.1 菌株,表明其可作为 Rev.1 的潜在替代菌株^[36]。

5 结语

在 Rev.1 疫苗问世以来的几十年时间里,Rev.1 疫苗对世界范围内的布病防控发挥了重要的作用,但同时也存在较明显的安全性问题。因此对 Rev.1 疫苗的科学使用在于寻找其安全性和免疫保护性之间的平衡,将其用于大规模国家性布病防控计划中的风险仍需进一步评价。当前世界范围内使用的各种布病疫苗各有其优缺点。长期以来,我国普遍使用 S2、A19 和 M5 疫苗用于对动物布病的防控,上述疫苗株和 Rev.1 疫苗一样,均为光滑型表型,免

疫动物后存在干扰临床诊断的现象,部分疫苗株同样存在毒力偏强的问题。开发出对人类无感染力、不干扰临床诊断的新型布病疫苗迫在眉睫。随着分子生物学的发展和布病免疫致病机制的研究深入,相信将会有更多的新型疫苗造福于社会。

参考文献:

- [1] Schurig G G, Sriranganathan N, Corbel M J. Brucellosis vaccines: past, present and future[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 90(1-4):479-496.
- [2] Galińska E M, Zagórski J. Brucellosis in humans—etiology, diagnostics, clinical forms[J]. *Annals of Agricultural & Environmental Medicine*, 2013, 20(2):233-238.
- [3] 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.
Ding J B, Feng Z W. Current application of brucellosis vaccines and its research advances[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(1):91-99.
- [4] Ahmed W, Zheng K, Liu Z F. Establishment of chronic infection: *Brucella*'s stealth strategy[J]. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 2016, 6:30.
- [5] Cloeckaert A, Grayon M, Verger J M, et al. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp[J]. *Research in Microbiology*, 2000, 151(3):209-216.
- [6] Schurig G G, Roop R M I, Bagchi T, et al. Biological properties of RB51: A stable rough strain of *Brucella abortus*[J]. *Veterinary Microbiology*, 1991, 28(2):171-188.
- [7] Avilacalderón E D, Lopezmerino A, Sriranganathan N, et al. A history of the development of *Brucella* vaccines[J]. *Biomed Research International*, 2013, 2013(2):743509.
- [8] Crasta O R, 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.
- [9] Nan W, Zhang Y, Tan P, et al. A rapid cycleleave PCR method for distinguishing the vaccine strain *Brucella abortus* A19 in China[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(3):214-218.
- [10] Miranda K L, Dorneles E M S, Poester F P, et al. Different resistance patterns of reference and field strains of *Brucella abortus*[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(1):265-269.
- [11] Elberg S S, Faunce K. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1957, 73(2):211-217.
- [12] Elberg S S, Steiner P E, Doll J P. Immunization against *Brucella* infection. V. Histopathologic appraisal of immunity induced in mice by a streptomycin-dependent mutant of *Brucella melitensis*

- [J]. American Journal of Pathology, 1954, 31(6):1065-1075.
- [13] Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: Laboratory aspects and field observations[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1-4):497-519.
- [14] Herzberg M, Elberg S S. Immunization against *Brucella* infection. III. Response of mice and guinea pigs to injection of viable and nonviable suspensions of a streptomycin - dependent mutant of *Brucella melitensis*[J]. Journal of Bacteriology, 1955, 69(4):432-435.
- [15] Issa M N, Ashhab Y. Identification of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine - strain genetic markers: Towards understanding the molecular mechanism behind virulence attenuation[J]. Vaccine, 2016, 34(41):4884-4891.
- [16] Herzberg M, Elberg S. Immunization against *Brucella* infection. I. Isolation and characterization of a streptomycin-dependent mutant [J]. Journal of Bacteriology, 1953, 66(5):585-599.
- [17] Alton G G, Elberg S S. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study[J]. Veterinary Bulletin, 1967.
- [18] Verger J M, 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[J]. Vaccine, 1995, 13(2):191-196.
- [19] Bagtiés M P J D, Barberán M, Marín C M, et al. The *Brucella abortus*, RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams[J]. Vaccine, 1995, 13(3):301-304.
- [20] Blasco J M. A review of the use of *B. melitensis*, Rev 1 vaccine in adult sheep and goats [J]. Preventive Veterinary Medicine, 1997, 31(3/4):275-283.
- [21] Nielsen K, Duncan J R. Animal brucellosis[M]. Animal Brucellosis, 1990.
- [22] Banai M, Mayer I, Cohen A. Isolation, identification, and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(5):1057-1059.
- [23] Crowther R W, Orphanides A, Polydorou K. Vaccination of adult sheep with reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1: Safety and serological responses[J]. Tropical Animal Health & Production, 1977, 9(2):85-91.
- [24] Benkirane A, El-Idrissi A H, Doumbia A, et al. Innocuity and immune response to *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine in camels (*Camelus dromedaries*) [J]. Open Veterinary Journal, 2014, 4(2):96-102.
- [25] Mp J D B, Marin C M, Barberán M, et al. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy[J]. Annales De Recherches Veterinaires Annals of Veterinary Research, 1989, 20(2):205-213.
- [26] Ebrahimi M, Nejad R B, Alamian S, et al. Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant Iranian fat-tailed ewes[J]. Veterinaria Italiana, 2012, 48(4):405-412.
- [27] Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht T A, et al. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstII site polymorphism of its omp2 gene [M]. Graham & Trotman, The pollution control policy of the European Communities, 1983:1475-1480.
- [28] Blasco J M, Marín C M, Barberán M, et al. Immunization with *Brucella melitensis*, Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams [J]. Veterinary Microbiology, 1987, 14(4):381-392.
- [29] Soler-Lloréns P, Gil-Ramírez Y, Zabalza-Baranguá A, et al. Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice [J]. Veterinary Research, 2014, 45(1):1-11.
- [30] Gardner I. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines : International Committee of the OIE (Edited), Office International Des Epizooties, Paris, 1992 [J]. Preventive Veterinary Medicine, 1994, 19(3/4):295-296.
- [31] Bossery N. Quality control of four Rev 1. antibrucella vaccines [M]. Current Topics in Veterinary Medicine & Animal Science, 1985.
- [32] Bossery N. *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: Stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice[J]. Biologicals Journal of the International Association of Biological Standardization, 1991, 19(4):355-363.
- [33] Gunes H, Dogan M. False-positivity in diagnosis of brucellosis associated with Rev-1 vaccine[J]. Libyan Journal of Medicine, 2013, 8(1):59-60.
- [34] Martins R D C, Irache J M, Blasco J M, et al. Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams[J]. Vaccine, 2010, 28(17):3038-3046.
- [35] Barrio M B, Grillo M J, Muñoz P M, 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 [J]. Vaccine, 2009, 27(11):1741-1749.
- [36] Grilló M J, Marín C M, Barberán M, et al. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams[J]. Vaccine, 2008, 27(2):187-191.