

布鲁氏菌病弱毒活疫苗经不同黏膜途径免疫奶牛的排菌程度及免疫反应

王苗苗¹, 徐磊¹, 王楠¹, 张贺^{1,2}, 张金亚¹, 曹如周³, 郭志刚³, 杨宏军⁴, 毛开荣^{1*}

(1.中国兽医药品监察所,北京 100081;2.北京农学院,北京 102206;

3.现代牧业,安徽马鞍山 243111;4.山东农业科学院奶牛中心,济南 250183)

[收稿日期] 2017-02-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 04-0001-05 [中图分类号] S859.797

[摘要] 为探究布鲁氏菌病疫苗经不同黏膜途径免疫奶牛后对体液免疫与细胞免疫水平及疫苗体外排菌方面的影响,将 80 头 10~12 月龄的奶牛平均分为四组,通过眼部滴注(A 组)、口腔喷注(B 组)、阴道灌注(C 组)三种黏膜免疫途径对奶牛接种布鲁氏菌病弱毒活疫苗(A19 株),并与皮下注射免疫组(D 组)进行比较,测定了免疫后 7 d 内黏膜免疫组的排菌情况,180 d 内四组免疫奶牛的抗体效价和 60 d 内四组免疫奶牛的外周血淋巴细胞细胞因子分泌($\text{IFN-}\gamma$ 、IL-2 和 IL-4)水平。结果显示:黏膜免疫组在免疫后 5 d 内均有不同程度的排菌,以免疫后 1 d 内排菌量为最高,并且在黏膜免疫组中阴道灌注组排菌量最低;各组奶牛在免疫后 20 d 时 MSAT 测定抗体效价平均值均上升至最高,之后持续下降,黏膜免疫组的抗体水平显著低于注射免疫组,且在黏膜免疫组中阴道灌注组的抗体水平最高;A 组和 B 组奶牛在免疫后 120 d RBT 检测无阳性,C 组在免疫后 150 d RBT 检测无阳性,D 组在免疫后 180 d RBT 检测阳性率 35%;B 组、C 组在免疫后 7 d,A 组、D 组在免疫后 20 d $\text{IFN-}\gamma$ 分泌量达到最高值,各组 IL-2 和 IL-4 分泌量未见明显变化,黏膜免疫组中阴道免疫组的 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌量为最高,仅次于注射免疫。结果表明,阴道灌注是一种较优的奶牛布鲁氏菌病黏膜免疫方式。

[关键词] 布鲁氏菌病疫苗;黏膜免疫;排菌;抗体;细胞因子

Immune Effect and Bacterial Excretion of Dairy Cattle Vaccinated with Live Attenuated Brucellosis Vaccine via Different Mucosal Immunization Approaches

WANG Miao-miao¹, XU Lei¹, WANG Nan¹, ZHANG He^{1,2}, ZHANG Jin-ya¹,

CAO Ru-zhou³, GUO Zhi-gang³, YANG Hong-jun⁴, MAO Kai-rong^{1*}

(1.China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;2.Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

3. Modern Farming, Maanshan, Anhui 243111, China;

4.Dairy Cattle Research Center of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250131, China)

Abstract: To investigate the effects of different mucosal immunization approaches on humoral immunity response,

基金项目: 北京市科技计划(Z161100000616009);北京市科技新星计划(Z141107001814013)

作者简介: 王苗苗,硕士研究生,从事布鲁氏菌病疫苗研究。

通讯作者: 毛开荣。E-mail:13621394758@163.com

cellular immunity response and brucella excretion situation of dairy cattle vaccinated with live brucellosis vaccine, 80 cows (10~12 months old) were divided into four groups (20 for each group). The cows were inoculated with *Brucella* A19(*B. abortus*) by eye infusion (group A), oral injection (group B), vaginal perfusion (group C) and subcutaneous injection (group D) respectively with same full standard dose. The brucella excretion situation within 7 days after immunization for group A, B and C, the antibody changes within 180 days and cytokines secretion (IFN- γ , IL-2, IL-4) within 60 days for group A, B, C and D were checked. The results showed that brucella excretions of three mucosal immunization approaches were lasted for 5 days and reached highest within the first day; the brucella excretion of group C was the lowest compared to group A and B; the antibody titer and the duration of antibody positive rates of group A, B, C were significantly lower than group D, for all the cows the antibody titer reached the peak on 20 dpi, furthermore group C had the highest antibody level compared to other two mucosal immunization groups; the antibody positive rates of group A, B, C were all 0% on 120 dpi, 120 dpi, 150 dpi respectively while the antibody positive rate of group D was 35% on 180 dpi; tested groups' IFN- γ excretions reached the peak on 7 dpi (group B and group C) or 20 dpi (group A and group D) while the IL-2 and IL-4 secretion had no significantly change, IFN- γ excretion of group C was the most among all the mucosal immunization groups and a little lower than group D. Our results indicate that vaginal perfusion is a much better approach for vaccination of dairy cattle with live attenuated brucellosis vaccine.

Key words: Brucellosis vaccine; mucosal immunization; brucella excretion; antibody titer; cytokines secreting

布鲁氏菌病(布病)是由布鲁氏菌寄生在哺乳动物体内所引起的一种严重的人畜共患病,现今,根据寄生活宿主不同和不同致病性,布鲁氏菌可分为八个陆地型和两个海洋型^[1]。其中牛布病在世界各地广为分布,可导致牛的繁殖障碍,造成严重的经济损失。病原还可通过未经消毒的牛奶、奶制品、内脏及淋巴组织等感染人类,导致严重的社会公共卫生问题。因此,奶牛场布病的防控显得十分重要^[2]。疫苗免疫是预防和控制布病的重要措施之一,选择适当的布病疫苗免疫途径关系到布病防控的效果。传统奶牛布病免疫以注射免疫为主,但是注射免疫对怀孕牲畜不安全,且抗体在体内存在的时间较长,影响对布病的监测和诊断^[3]。黏膜免疫是近年国际上研究布病免疫的一个焦点,因其一方面可以改善疫苗对动物的安全性,另一方面能够有效模拟布鲁氏菌入侵机体的方式,被认为更有针对性。布病常用的黏膜免疫方式为点眼和口服,其优点是免疫抗体持续时间短,对监测等防控措施的影响小,并且对怀孕动物的安全性也更高;但其存在免疫后疫苗活菌易于排向体外,可能污染周边环

境、感染操作人员和有效成分流失的问题^[4]。

为初步探究奶牛布病的最佳免疫方式,本试验观察了三种不同的黏膜途径(眼部滴注、口腔喷注、阴道灌注)和皮下注射途径免疫奶牛后,对奶牛体液免疫和细胞免疫反应的影响,并通过分析黏膜免疫后不同时间免疫部位的排菌量,比较不同黏膜免疫途径排菌量的差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用动物 布病阴性群的10~12月龄的奶牛80头。

1.1.2 试验用试剂 布鲁氏菌病活疫苗A19购自中牧股份有限公司(1602001批);虎红平板凝集试验抗原(201601批);试管凝集试验抗原(201601批);布鲁氏菌病阳性血清(201601批);布鲁氏菌病阴性血清(201601批)均由中国兽医药品监察所制备;布鲁氏菌选择性培养基,购于青岛海博生物,货号HB7027;淋巴细胞分离液购于Stemcell公司,货号为07801;IFN- γ 、IL-2、IL-4细胞因子检测试剂盒均购于Mabtech公司,货号分别为3119-1H-6、

3111-1H-6、3118-1H-6。

1.2 试验方法 将试验牛分为眼部滴注(A组)、口腔喷注(B组)、阴道灌注(C组)、皮下注射(D组)四组,每组20头,用布鲁氏菌活疫苗A19对各组动物按各自途径进行免疫。

1.2.1 免疫部位排菌量检测 A、B、C三组在免疫后10 min、30 min、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d,用一次性无菌拭子对奶牛免疫部位进行擦拭,接种布鲁氏菌选择性培养基,37℃培养3~5 d,对长出的菌落进行计数,统计分析。

1.2.2 抗体效价的测定 分别采集和分离四组试验牛免疫前和免疫后7 d、20 d、30 d、60 d、90 d、120 d、150 d、180 d的血清,参照国家标准GB/T 18646-2002^[5]进行虎红平板凝集试验(RBT)检测抗体阳性率,微量试管凝集试验(MSAT)测定抗体效价,并对检测结果进行统计分析。

1.2.3 外周血淋巴细胞的细胞因子水平测定 分别采集四组试验牛免疫前和免疫后7 d、20 d、30 d、60 d的抗凝血,用淋巴细胞分离液分离奶牛的外周血淋巴细胞,计数后,以 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 的浓度平铺在24孔细胞培养板板内,每孔1 mL。待细胞贴壁后,每孔加入100 μL $1.0 \times 10^9/\text{mL}$ 的灭活布鲁氏菌A19,37℃5% CO_2 恒温培养箱刺激48~72 h,收集细胞上清^[6],按Mabtech检测试剂盒使用说明书检测IFN- γ 、IL-2、IL-4水平。

2 结果

2.1 不同时间各组免疫部位排菌率和排菌量比较

A、B、C三组黏膜免疫奶牛的排菌持续至免疫后第五天,从免后10 min到免后5 d,排菌率持续下降,免疫后1 d内为排菌高峰期,免疫5 d后未检测到排菌情况;以排菌率来看,由高到低依次为A>B>C,各组排菌率(排菌奶牛头数/奶牛总头数 $\times 100\%$)见图1;从免疫后10 min到免后5 d,排菌量持续下降,免疫后1 d内为排菌量最高时期,之后排菌量急剧下降,各组排菌量由高到低依次为A>B>C,见图2;将排菌率和排菌量综合分析来看,眼部滴注(A组)排菌最强、口腔喷注(B组)次之、阴道灌注(C组)排菌最弱。

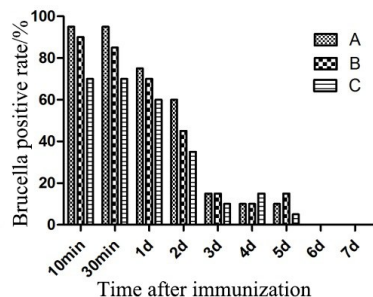


图1 免疫后不同时间奶牛免疫部位的排菌率分析

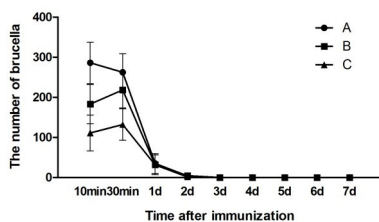


图2 免疫后不同时间奶牛免疫部位的排菌量分析

2.2 不同时间抗体效价水平和抗体阳性率比较

各组试验牛在免疫后20 d抗体效价平均值升至最高(A组:1:8;B组:1:38;C组:1:141;D组:1:336),之后,除D组一直持续高效价到180 d才略有下降外,黏膜免疫组均在免后90 d抗体水平下降至1:20以下,其中黏膜免疫的抗体水平均低于注射免疫,而阴道灌注免疫组的抗体水平高于其它黏膜免疫组,差异显著。三组黏膜免疫牛的抗体水平从高到低依次为阴道灌注(C)、口服喷注(B)、眼部滴注(A),各组抗体水平见图3。

各组抗体阳性率(抗体检出奶牛头数/奶牛总头数 $\times 100\%$)参照RBT结果,在免疫后20 d和30 d达到最高值,除D组一直保持最高阳性率在60 d后略有下降,黏膜免疫组A组(最高抗体阳性率55%)、B组(40%)、C组(100%)均在30 d后下降,与D组差异显著。免后120 d时A、B两组抗体阳性率0%,C组10%,与D组55%差异显著,C组在免后150 d抗体阳性率为0%,而D组在免后180 d时抗体阳性率仍为35%,从抗体阳性率的结果来看三组黏膜免疫组从高到低依次为C>B>A;在免疫后180 d内,抗体阳性率的变化趋势如图4。

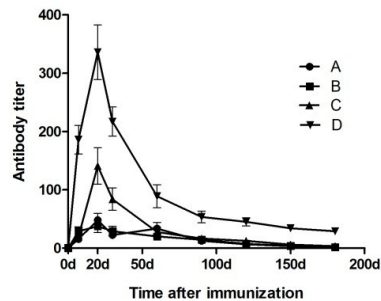


图3 免疫后不同时间各组奶牛的抗体效价变化

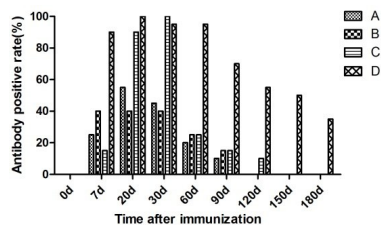


图4 免疫后不同时间各组奶牛的布病虎红
平板凝集试验抗体阳性率

综合抗体阳性率和抗体效价,三种黏膜免疫方式中以阴道灌注的抗体反应最强,显示其是最佳的激发抗体免疫反应的黏膜免疫途径。

2.3 不同时间细胞因子水平的比较 四组试验牛在试剂盒所能检测到的范围内 IL-2、和 IL-4 的水平未发生变化,仅 IFN- γ 有显著变化,由图 5 可知, B 组、C 组在免疫后 7 d, A 组、D 组在免疫后 20 d IFN- γ 分泌量达到最高值,之后持续下降,黏膜免疫组中阴道免疫组的 IFN- γ 分泌量为最高,仅次于注射免疫。从 IFN- γ 分泌量上来看,三组黏膜免疫牛由高到低依次为 C>B>A。

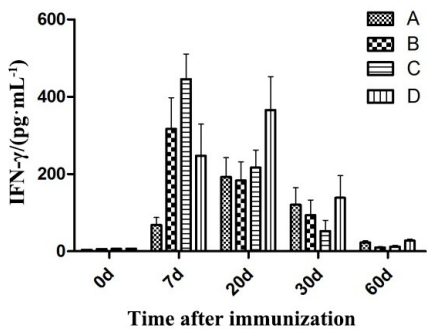


图5 免疫后不同时间各组奶牛外周血淋巴细胞
IFN- γ 分泌量的变化

3 讨论

眼部滴注、口腔喷注、阴道灌注三种黏膜免疫方式皆存在不同程度的排菌情况。阴道灌注是 3 种黏膜免疫方式中排菌最少的,因此,阴道灌注可作为奶牛黏膜免疫的首选方式。若想进一步降低或消除黏膜免疫的排菌问题,可探索更加安全的布病疫苗如凝胶剂型等,液态疫苗接触动物黏膜后相变为凝胶态,可能消除或降低疫苗经黏膜免疫后的排菌风险,进一步提高疫苗的利用率和免疫对从业人员的安全性。

从抗体阳性率和抗体效价变化曲线上看,注射免疫组抗体阳性率和抗体效价均最高,但由于抗体长期持续,最长可持续 18 个月^[7]。因此选择免疫抗体反应弱的黏膜免疫途径就受到国内外研究者的普遍关注。从本研究结果分析,黏膜免疫与注射免疫相比,抗体阳性率存在显著差异。阴道灌注的免疫抗体反应整齐,抗体效价较高,表明其体液免疫反应略强于其它的黏膜免疫途径,而抗体持续时间却无明显延长,三种黏膜免疫抗体对临床布病检测的时间影响无明显差异。据文献报道,羊点眼免疫后 180 d 可作为免疫与感染鉴别诊断的一个分水岭^[8],从本试验结果来看,180 d 黏膜免疫组 RBT 检测的阳性率为 0%,与报道一致。

从细胞因子 IL-2、IL-4、IFN- γ 的分泌情况分析,布氏菌疫苗免疫后细胞因子 IL-2、IL-4 无明显变化,但 IFN- γ 的分泌量显著提高,表明 IFN- γ 在抵抗布鲁氏菌感染中可能发挥重要作用。三种黏膜免疫方式中以阴道灌注免疫激发的 IFN- γ 水平最高,预示其对细胞免疫的激发作用最强。据报道,布鲁氏菌感染 IFN- γ 缺陷小鼠后,促使小鼠很快发生死亡,这证实了 IFN- γ 在机体抗布鲁氏菌感染中的重要性^[9]。布鲁氏菌在侵入机体后首先在巨噬细胞内存活^[10],并激发机体先天性免疫系统反应^[11],但有研究表明,先天性免疫应答并不能有效抵抗布鲁氏菌在体内的感染和复制^[12]。获得性细胞免疫应答主要是通过 IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 等细胞因子通过增强 M1 巨噬细胞的杀菌和抗菌活性从而在抵抗布鲁氏菌感染中起主要作

用^[13]。本试验的细胞因子分泌水平主要监测至免疫后 60 d,60 d 时 IFN- γ 水平显著下降后未进行后续追踪, Elaine M S Dorneles 等^[6]监测 S19 免疫小牛后 0 d、28 d、210 d、365 d、393 d、575 d 的 IFN- γ 水平,在 28 d 达到最高后降低,之后又在 393 d 有一次小升高,这充分揭示了细胞免疫应答在布鲁氏菌感染中的重要作用,也为疫苗免疫后保护力持续存在提供了一个参考。

本试验从免疫排菌、免疫激发抗体与几种细胞因子水平三个方面来评价布鲁氏菌疫苗 3 种黏膜免疫途径的效果,结果表明,阴道灌注是奶牛布病黏膜免疫的较优方式。与注射免疫相比,阴道灌注后奶牛免疫抗体水平下降快,持续时间短,对检测感染抗体的干扰时间短,有利于布病监测与诊断的开展。研究提示,有必要进一步开展布病疫苗阴道灌注保护力和安全性研究,以充分证实布病疫苗阴道灌注免疫的价值。

参考文献:

- [1] Olsen S C. Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination.[J]. Revue Scientifique Et Technique, 2013, 32(1):207-217.
- [2] Shumilov K V. Designing vaccines against cattle brucellosis[J]. Vaccine, 2010, 28(5): F31.
- [3] Wang Z, Wu Q. Research progress in live attenuated *Brucella* vaccine development.[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14(10):887.
- [4] Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, *et al.* Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations[J]. Plos Medicine, 2007, 4(12): e317.
- [5] GB/T 18646-2002. 动物布鲁氏菌病诊断技术[S].
- [6] Dorneles E M, Lima G K, Teixeira-carvalho A, *et al.* Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51 [J]. Plos One, 2015, 10(9): e0136696.
- [7] Gwida M, Dahouk S A, Melzer F, *et al.* Brucellosis-regionally emerging zoonotic disease? [J]. Croatian Medical Journal, 2010, 51(4): 289.
- [8] 赵兵,彭传真,张志新,等. 布鲁氏菌弱毒疫苗粘膜免疫及检测方法的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(8): 658-661.
- [9] Baldwin C L, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? [J]. Critical Reviews in Immunology, 2006, 26(5): 407.
- [10] Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella* [J]. Research in Microbiology, 2006, 157(2):93-98.
- [11] Zwerdling A, Delpino M V, Pasquevich K A, *et al.* *Brucella abortus* activates human neutrophils[J]. Microbes & Infection, 2009, 11(6/7): 689-697.
- [12] Chavesolarte E, Weiss D S, Rucavado A, *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection[J]. Plos One, 2007, 2(7): e631.
- [13] Golding B, Scott D, Scharf O, *et al.* Immunity and protection against *Brucella abortus*[J]. Microbes & Infection, 2001, 3(1): 43.

(编辑:李文平)