

研究报告

布鲁氏菌粗糙型 RA343 株与光滑型 A19 株免疫小鼠后特异性 T 细胞和抗体动态变化分析

杨晓彤^{1,2}, 张莹辉², 李巧玲², 蒋卉², 丁家波², 沈青春², 范学政^{*2}, 秦建华^{*1}

1 河北农业大学, 河北 保定 071000

2 中国兽药药品监察所国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室, 北京 100081

杨晓彤, 张莹辉, 李巧玲, 蒋卉, 丁家波, 沈青春, 范学政, 秦建华. 布鲁氏菌粗糙型 RA343 株与光滑型 A19 株免疫小鼠后特异性 T 细胞和抗体动态变化分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2700-2714

Yang Xiaotong, Zhang Yinghui, Li Qiaoling, Jiang Hui, Ding Jiabo, Shen Qingchun, Fan Xuezheng, Qin Jianhua. Dynamic changes of specific T cells and antibodies in mice immunized with rough-type RA343 and smooth-type A19 of *Brucella*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2700-2714

摘要:【背景】布鲁氏菌病(简称布病)严重威胁着人类健康和畜牧业的发展,使用毒力弱、免疫原性好、不干扰血清学诊断的疫苗是防控布病的有效措施。【目的】比较布鲁氏菌粗糙型 RA343 株与光滑型 A19 株免疫小鼠后机体特异性 T 细胞和抗体的动态变化,评价粗糙型 RA343 株的免疫效果。【方法】采用 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,共分为 3 组,RA343 株免疫组和 A19 株免疫组各 15 只小鼠,空白对照组 5 只小鼠。免疫组的每只小鼠经腹股沟皮下注射 0.1 mL(含菌量为 1×10^8 CFU)菌液。免疫后 1、2 和 3 周各免疫组及空白对照组分别剖杀 5 只小鼠,无菌取脾脏,一部分脾脏研磨分离淋巴细胞,用流式细胞术检测小鼠布鲁氏菌特异性 CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞所占比例的变化趋势;另一部分脾脏称重后分离布鲁氏菌 RA343 株和 A19 株,评估 RA343 株和 A19 株在小鼠脾脏中的定殖情况。在剖杀小鼠的同时取外周血分离血清,用 ELISA 方法检测免疫后小鼠血清中 IgM 和 IgG 抗体的消长规律。采用 GraphPad Prism 8.0 软件作图并进行统计学分析。【结果】与 A19 免疫组相比,免疫后 1 周,RA343 免疫组小鼠脾脏布鲁氏菌特异性 CD4⁺ IFN- γ 所占比例极显著增加($P < 0.01$),CD4⁺ IL-2、CD8⁺ IL-2 和 CD8⁺ TNF- α 所占比例显著增加($P < 0.05$);免疫后 2 周,RA343 免疫组特异性 CD4⁺ TNF- α 所占比例极显著增加($P < 0.01$),CD8⁺ TNF- α 所占比例显著增加($P < 0.05$);免疫后 3 周,CD4⁺ TNF- α 所占比例显著增加($P < 0.05$),CD8⁺ IFN- γ 所占比例极显著增加($P < 0.01$)。免疫后 1–3 周,RA343 免疫组小鼠脾脏含菌量显著低于 A19 免疫组($P < 0.05$),而且 RA343 免疫组脾脏重量低于 A19 免疫组。光滑型 A19 株免疫小鼠的 IgM 和 IgG 抗体水平在免疫后 2 周均

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500903)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500903)

*Corresponding authors: E-mail: FAN Xuezheng: fxz0@sohu.com; QIN Jianhua: qjhqqq@126.com

Received: 2021-10-22; Accepted: 2021-11-29; Published online: 2022-03-25

显著升高; 粗糙型 RA343 株免疫小鼠的 IgM 和 IgG 抗体采用光滑型抗原进行 ELISA 检测结果均为阴性。【结论】与光滑型 A19 株相比, 布鲁氏菌粗糙型 RA343 株诱导的细胞免疫应答较强, 而且 RA343 组小鼠脾脏含菌量显著低于 A19 组, 产生抗体与光滑型布鲁氏菌抗原无交叉血清学反应, 综合表明布鲁氏菌粗糙型 RA343 株毒力弱, 免疫小鼠后可产生良好的细胞免疫反应和体液免疫反应且不干扰血清学诊断, 是理想的布鲁氏菌疫苗候选株。

关键词: 布鲁氏菌; 流式细胞术; 特异性 T 细胞; 抗体

Dynamic changes of specific T cells and antibodies in mice immunized with rough-type RA343 and smooth-type A19 of *Brucella*

YANG Xiaotong^{1,2}, ZHANG Yinghui², LI Qiaoling², JIANG Hui², DING Jiabo², SHEN Qingchun², FAN Xuezheng^{*2}, QIN Jianhua^{*1}

1 Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

2 National/OIE Reference Laboratory for Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] Brucellosis threatens human health and the development of animal husbandry and vaccines with low virulence, good immunogenicity, and no interference of serological diagnosis turn to be a solution. **[Objective]** To compare the dynamic changes of specific T cells and antibodies in mice immunized with rough-type RA343 and smooth-type A19 of *Brucella*, and to evaluate the immune effect of rough-type RA343. **[Methods]** The 6-week-old female BALB/c mice were classified into three groups, 15 in RA343 group, 15 in A19 group, and 5 in blank control group. For RA343 group and A19 group, each mouse was injected (sc) with 0.1 mL (1×10^8 CFU) bacterial solution through into groin. A total of 5 mice in each of the three groups were killed 1, 2, and 3 weeks after immunization, respectively, and their spleens were separated. A part of the spleen was ground, and lymphocytes were separated to detect the proportions of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in mice (flow cytometry). The other part was weighed and then RA343 and A19 of *Brucella* were isolated, to evaluate the colonization of RA343 and A19 in mouse spleen. At the same time, the peripheral blood was collected and the serum was separated. For the determination of IgM and IgG in the serum of immunized mice (ELISA). GraphPad Prism 8.0 was employed for plotting and statistical analysis. **[Results]** The proportion of *Brucella*-specific CD4⁺ IFN- γ in spleens ($P < 0.01$), and the proportions of CD4⁺ IL-2, CD8⁺ IL-2, and CD8⁺ TNF- α ($P < 0.05$) increased in RA343 group compared with those in A19 group 1 week after immunization. Two weeks after immunization, the proportion of specific CD4⁺ TNF- α ($P < 0.01$) and the proportion of CD8⁺ TNF- α ($P < 0.05$) in RA343 group rose compared with those in A19 group. Three weeks after immunization, RA343 group registered increase of the proportion of CD4⁺ TNF- α ($P < 0.05$) and the proportion of CD8⁺ IFN- γ ($P < 0.01$) compared with A19 group. The bacterial content in spleens of RA343 group was lower than that of A19 group ($P < 0.05$), and the spleen weight was also lower than

that of A19 group 1–3 weeks after immunization. IgM and IgG levels of mice in A19 group increased significantly 2 weeks after immunization and no IgM or IgG was detected in the RA343 group. **[Conclusion]** Compared with A19, RA343 induced strong cellular immune response. The bacterial content in spleen of mice in RA343 group was significantly lower than that in A19 group and no serological cross-reaction occurred between antibody and A19 antigen. In summary, RA343 has low virulence, and can induce strong cellular immune response and humoral immune response in mice, with no interfere of serological diagnosis. Thus, it can be used as a candidate strain for the development of vaccine against brucellosis.

Keywords: *Brucella*; flow cytometry; specific T cells; antibody

布鲁氏菌病(Brucellosis, 简称布病)是由布鲁氏菌引起的人畜共患病, 严重影响人类健康和畜牧业的发展。布病可导致雄性动物附睾炎和妊娠母畜流产、胎盘炎和不孕, 人感染后可引起急性炎症并表现出许多类似流感感染的症状, 包括波状发热、盗汗、头痛、关节痛和身体虚弱^[1-5]。布鲁氏菌种型较多, 有光滑型和粗糙型, 一般而言, 粗糙型毒力较弱, 而光滑型毒力较强, 光滑型中又以羊种布鲁氏菌对我国养殖业危害最大且对人的毒力最强^[6]。在布鲁氏菌病流行的国家, 少数国家通过净化扑杀的处理方式, 大多数国家主要通过对患病高发区的牲畜进行动物疫苗免疫来遏制该病的蔓延^[7-10], 所以选择和使用有效的布病疫苗, 对于该病的防控和促进当地畜牧业经济发展有着重要意义。

自 1887 年, 微生物学家 David Bruce 从患波浪热病人脾脏中分离出布鲁氏菌后, 开发布病疫苗的研究工作即展开^[11]。我国常用的布鲁氏菌疫苗主要有 3 种, 分别是牛种 A19 株、猪种 S2 株和羊种 M5 株。牛种 A19 株在国外使用广泛, 免疫保护率达 65%–75%; 猪种布鲁氏菌 S2 株是目前已知毒力最弱的光滑型布鲁氏菌疫苗株; 羊种 M5 株的免疫原性好但毒力强, 易造成大批怀孕动物流产而导致严重的经济损失^[12]。上述 3 种疫苗均为光滑型菌株, 刺激机体产生

的抗体均会干扰临床血清学诊断, 无法鉴别疫苗接种动物和自然感染动物^[13-15], 为我国布病防控中“检测-淘汰”策略的实施造成困难。

鉴于传统疫苗株的种种缺陷, 中国兽医药品监察所国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室通过粗糙型血清诱导获得了一株新型粗糙型布鲁氏菌弱毒株(RA343 株), 但对其免疫后机体所产生的细胞免疫及体液免疫情况尚未进行深入研究。因此, 本研究针对 RA343 菌株免疫小鼠后机体特异性 T 细胞的变化及体液免疫分析展开研究, 以期对粗糙型 RA343 株的疫苗评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

35 只雌性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 重量为 (20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 试验菌株

布鲁氏菌 RA343 株(粗糙型)、布鲁氏菌 A19 株(光滑型)及布鲁氏菌 S2 株、A19 株全菌裂解产物均由中国兽医药品监察所国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室保存。

1.3 主要试剂和仪器

细胞培养基 RPMI1640, HyClone 公司; 青

链霉素混合液(100×)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), Gibco 公司; 红细胞裂解液, 北京索莱宝科技有限公司; Cell Activation Cocktail (with Brefeldin A) (500×), BioLegend 公司; Protein Transport inhibitor (1 000×), Golgi Plug 公司。CO₂ 恒温培养箱, SANYO 公司; 生物安全柜, Nuaire 公司; Countstar 细胞计数仪, 艾利特生物科技有限公司。

1.4 小鼠免疫

取冻干布鲁氏菌菌株 RA343 株和 A19 株, 分别用灭菌的 PBS 复溶, 划线接种于 TSA 平板复苏, 挑取复苏后的单菌落接种于 TSB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养至浑浊进行菌落计数。将计数好的菌液用无菌 PBS 稀释到浓度约为 1×10⁹ CFU/mL。试验采用 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 共分为 3 组: RA343 株免疫组 15 只, A19 株免疫组 15 只, 空白对照组 5 只。免疫组每只小鼠经腹股沟皮下注射 0.1 mL (含菌量为 1×10⁸ CFU), 空白对照组不做任何处理。

1.5 脾脏组织单细胞制备及定殖试验

免疫后 1、2、3 周, 分别取免疫组和空白对照组的小鼠进行剖杀, 无菌摘取小鼠脾脏, 一部分脾脏置于 3 cm 平皿中, 平皿中倒入 1 mL 含 5% FBS 的 RPMI1640, 用弯头剪刀把脾组织剪碎, 然后将剪碎的脾脏组织转移至细胞筛网上(70 μm 孔径), 用研磨棒轻轻研磨, 直至组织可通过细胞筛网; 将细胞悬液再次经过细胞筛网过滤, 去除组织团块, 将细胞悬液收集至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 5 mL 无菌红细胞裂解液, 室温静置 5 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 5 mL 含 5% FBS 的 RPMI1640, 重悬细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入适量含 5% FBS 的 RPMI1640, 调节细胞浓度至 10⁷ 个/mL 备用。另一部分脾脏分别称重, 将其装入已灭菌的含

钢珠的 EP 管中, 加入无菌 PBS 进行匀浆, 将脾脏匀浆后进行 10 倍倍比稀释, 将各梯度稀释液涂布 TSA 平板, 37 °C 培养 72 h 后进行菌落计数, 计算脾脏含菌量。

1.6 抗原特异性 T 细胞检测

将细胞铺至 48 孔细胞板中, 每孔需 2×10⁶ 个细胞, 即每孔加 200 μL 1.5 中制备的脾细胞悬液, 按 8 μg/mL 刺激剂量加入布鲁氏菌 S2 株裂解产物, 对细胞进行刺激, 同时加入 Protein Transport Inhibitor (1 000×) 阻断剂, 5% CO₂ 条件下 37 °C 培养 8 h, 之后将细胞收集至离心管中尽快检测, 通过流式细胞术进行 CD4/CD8/IFN-γ/IL-2/TNF-α 染色上机检测分析, 具体圈门过程如图 1 所示。

1.7 IgM、IgG 抗体消长规律的检测

免疫后 1、2、3 周及空白对照组的小鼠经眼球采血, 每只小鼠取血量约 200 μL, 静置 1 h, 8 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 置 -20 °C 备用。采用布鲁氏菌 A19 株裂解产物作为包被抗原进行 ELISA^[16] 检测所有血清样品中 IgM、IgG 抗体水平, 并绘制其抗体消长曲线。以样品孔 OD₄₅₀ 值/阴性对照平均 OD₄₅₀ 值(S/N)≥2.1 作为阳性判定标准^[17-18]。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件作图并进行统计学分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm SD$), 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠脾 CD4⁺ T 细胞的比例变化

免疫后 1 周, RA343 免疫组小鼠脾特异性 CD4⁺ IFN-γ 所占比例为 1.78%±0.58%, 极显著高于 A19 免疫组 0.68%±0.35% (*P*<0.01); RA343 免疫组特异性 CD4⁺ IL-2 所占比例为 0.54%±0.19%,

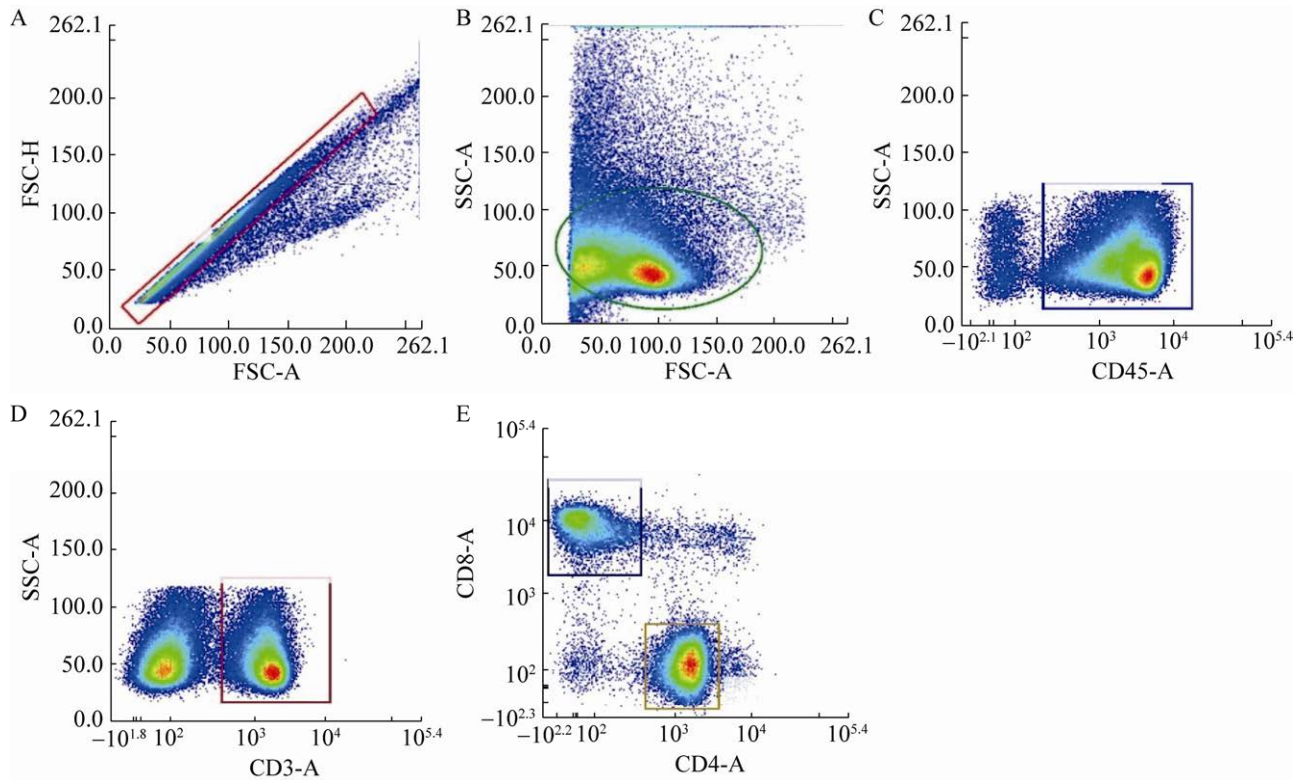


图1 布鲁氏菌粗糙型菌株和光滑型菌株免疫小鼠脾 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞亚群的圈门过程 A、B: 特异性 T 细胞占总淋巴细胞的比例; C: CD45 细胞占特异性 T 细胞的比例; D: CD3 细胞占 CD45 细胞的比例; E: $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞占 CD3 细胞的比例

Figure 1 The circle-gate process of $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells subsets of mouse spleen immunized with rough and smooth strains of *Brucella*. A, B: The proportion of specific T cells in total lymphocytes; C: The proportion of CD45 cells in specific T cells; D: The proportion of CD3 cells in CD45 cells; E: The proportion of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in CD3 cells.

显著高于 A19 免疫组 $0.35\% \pm 0.14\%$ ($P < 0.05$); RA343、A19 免疫组特异性 $CD4^+$ TNF- α 所占比例为 $0.34\% \pm 0.24\%$ 、 $0.27\% \pm 0.14\%$, 两组之间无显著性差异(图 2)。

免疫后 2 周, RA343、A19 免疫组小鼠脾特异性 $CD4^+$ IFN- γ 、 $CD4^+$ IL-2 所占比例无显著性差异; RA343 免疫组特异性 $CD4^+$ TNF- α 所占比例为 $0.81\% \pm 0.44\%$, 极显著高于 A19 免疫组 $0.18\% \pm 0.07\%$ ($P < 0.01$) (图 3)。

免疫后 3 周, RA343、A19 免疫组 $CD4^+$ IFN- γ 、

$CD4^+$ IL-2 所占比例无显著性差异; RA343 免疫组 $CD4^+$ TNF- α 所占比例为 $0.87\% \pm 0.77\%$, 显著高于 A19 免疫组 $0.35\% \pm 0.29\%$ ($P < 0.05$) (图 4)。

上述结果显示, 从时间上看, 免疫后 1-3 周, RA343 免疫组和 A19 免疫组的 $CD4^+$ IFN- γ 、 $CD4^+$ TNF- α 所占比例均呈上升趋势, 两组的 $CD4^+$ IL-2 所占比例呈先上升后下降趋势; 而且免疫后 1 周, RA343 免疫组 $CD4^+$ IFN- γ 所占比例极显著高于 A19 免疫组, $CD4^+$ IL-2 所占比例显著高于 A19 免疫组, 说明 RA343 菌株免疫机

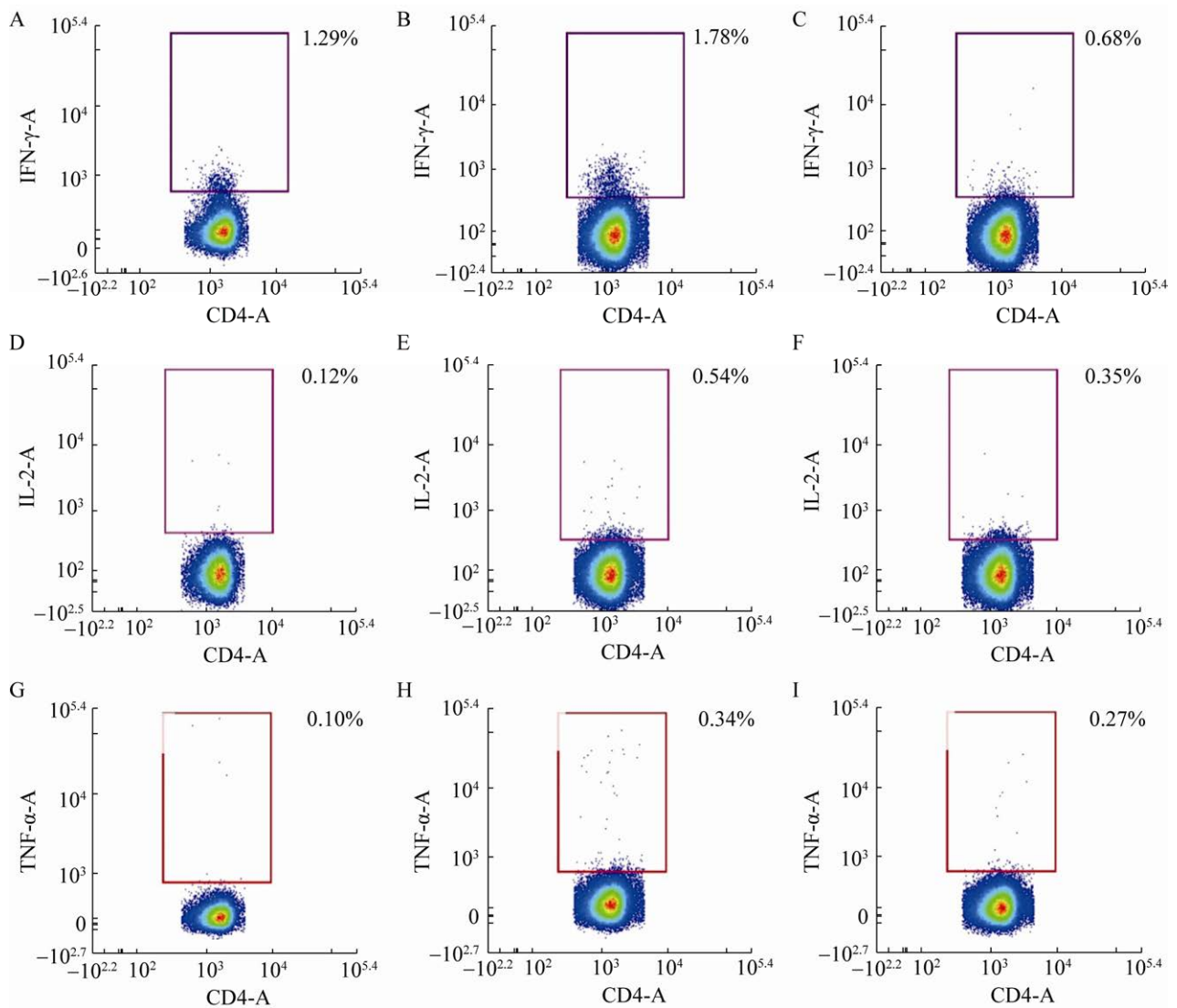


图 2 菌株 RA343 和 A19 免疫小鼠 1 周后 CD4⁺ T 细胞亚群比例 A-C: 空白组、RA343 组、A19 组 IFN- γ 所占比例; D-F: 空白组、RA343 组、A19 组 IL-2 所占比例; G-I: 空白组、RA343 组、A19 组 TNF- α 所占比例。A、D 和 G: 空白组; B、E 和 H: RA343 组; C、F 和 I: A19 组

Figure 2 Proportion of CD4⁺ T cell subsets in mice immunized with strain RA343 and A19 for 1 week. A-C: The proportion of IFN- γ in blank group, RA343 group and A19 group; D-F: The proportion of IL-2 in blank group, RA343 group and A19 group; G-I: The proportion of TNF- α in blank group, RA343 group and A19 group. A, D and G: The blank group; B, E and H: RA343 group; C, F and I: A19 group.

体前期 CD4⁺ IFN- γ 、CD4⁺ IL-2 细胞亚群的免疫应答强于 A19 株。

2.2 小鼠脾 CD8⁺ T 细胞的比例变化

免疫后 1 周, RA343、A19 免疫组小鼠脾特异性 CD8⁺ IFN- γ 所占比例无显著性差异;

RA343 免疫组特异性 CD8⁺ IL-2 所占比例为 0.98%±0.43%, 显著高于 A19 免疫组 0.56%±0.14% ($P<0.05$); RA343 免疫组特异性 CD8⁺ TNF- α 所占比例为 0.57%±0.18%, 显著高于 A19 免疫组 0.30%±0.09% ($P<0.05$) (图 5)。

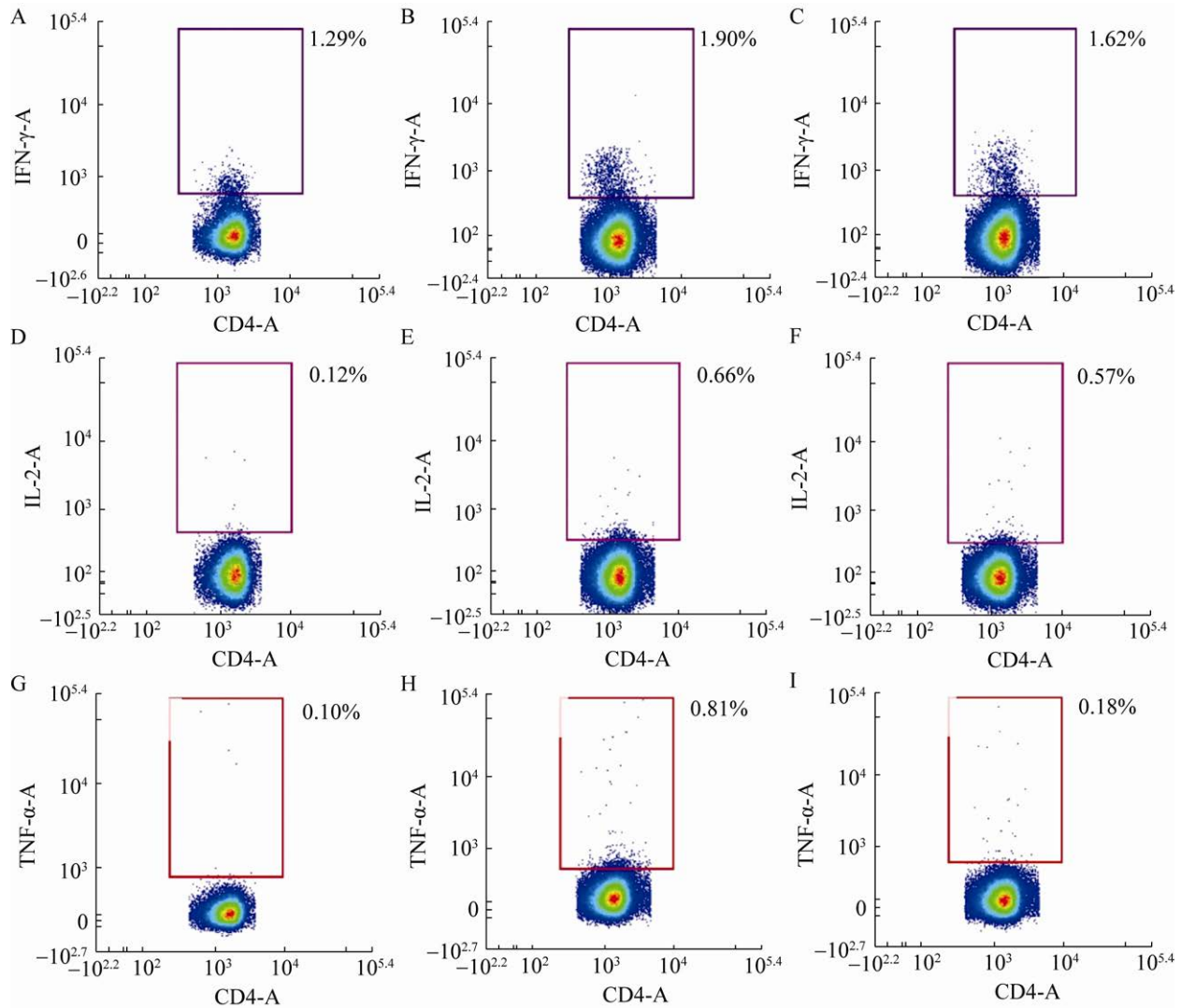


图3 菌株 RA343 和 A19 免疫小鼠 2 周后 $CD4^+$ T 细胞亚群比例 A-C: 空白组、RA343 组、A19 组 IFN- γ 所占比例; D-F: 空白组、RA343 组、A19 组 IL-2 所占比例; G-I: 空白组、RA343 组、A19 组 TNF- α 所占比例。A、D 和 G: 空白组; B、E 和 H: RA343 组; C、F 和 I: A19 组

Figure 3 Proportion of $CD4^+$ T cell subsets in mice immunized with strain RA343 and A19 for 2 weeks. A-C: The proportion of IFN- γ in blank group, RA343 group and A19 group; D-F: The proportion of IL-2 in blank group, RA343 group and A19 group; G-I: The proportion of TNF- α in blank group, RA343 group and A19 group. A, D and G: The blank group; B, E and H: RA343 group; C, F and I: A19 group.

免疫后 2 周, RA343、A19 免疫组特异性 $CD8^+$ IFN- γ 和 $CD8^+$ IL-2 所占比例无显著性差异; RA343 免疫组 $CD8^+$ TNF- α 所占比例为 $1.18\% \pm 0.45\%$, 显著高于 A19 免疫组 $0.75\% \pm 0.16\%$ ($P < 0.05$) (图 6)。

免疫后 3 周, RA343 免疫组小鼠脾特异性 $CD8^+$ IFN- γ 所占比例为 $0.42\% \pm 0.11\%$, 与 A19 免疫组相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$); RA343、A19 免疫组特异性 $CD8^+$ IL-2 和 $CD8^+$ TNF- α 所占比例无显著性差异(图 7)。

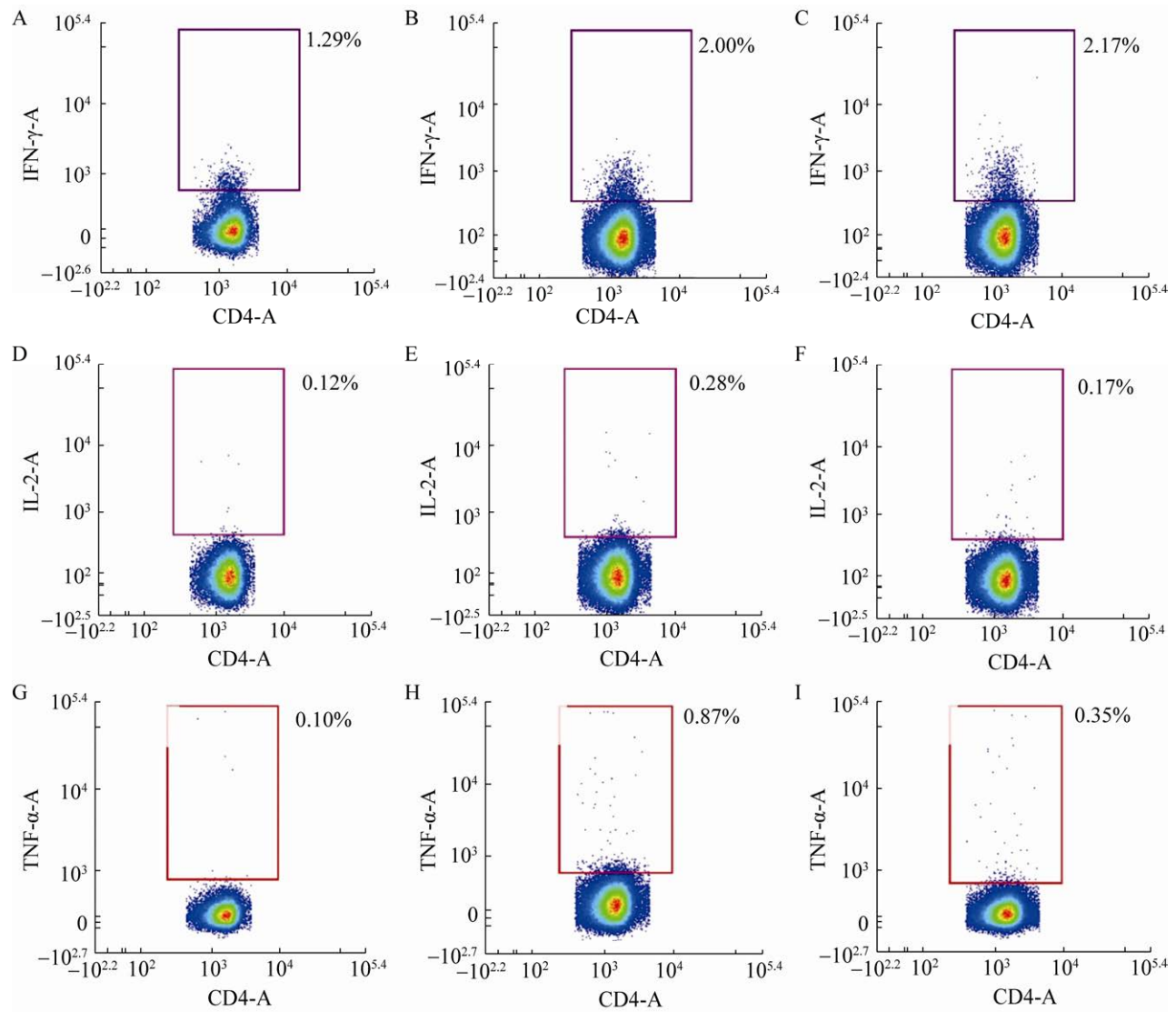


图 4 菌株 RA343 和 A19 免疫小鼠 3 周后 CD4⁺ T 细胞亚群比例 A-C: 空白组、RA343 组、A19 组 IFN- γ 所占比例; D-F: 空白组、RA343 组、A19 组 IL-2 所占比例; G-I: 空白组、RA343 组、A19 组 TNF- α 所占比例。A、D 和 G: 空白组; B、E 和 H: RA343 组; C、F 和 I: A19 组
 Figure 4 Proportion of CD4⁺ T cell subsets in mice immunized with strain RA343 and A19 for 3 weeks. A-C: The proportion of IFN- γ in blank group, RA343 group and A19 group; D-F: The proportion of IL-2 in blank group, RA343 group and A19 group; G-I: The proportion of TNF- α in blank group, RA343 group and A19 group. A, D and G: The blank group; B, E and H: RA343 group; C, F and I: A19 group.

结果显示, 免疫后 1 周, RA343 免疫组的 CD8⁺ IL-2、CD8⁺ TNF- α 所占比例显著高于 A19 免疫组。这说明布鲁氏菌菌株免疫机体后, CD8⁺ T 细胞所占比例的趋势同 CD4⁺ T 细胞基本一致, 进一步说明 CD8⁺ T 与 CD4⁺ T 细胞在

抗布鲁氏菌活性中起协同作用。

2.3 菌株 RA343 和 A19 在小鼠脾脏的定殖情况

脾脏是布鲁氏菌定殖的主要免疫靶器官, 定殖试验是衡量布鲁氏菌残余毒力的重要指标, 也一直

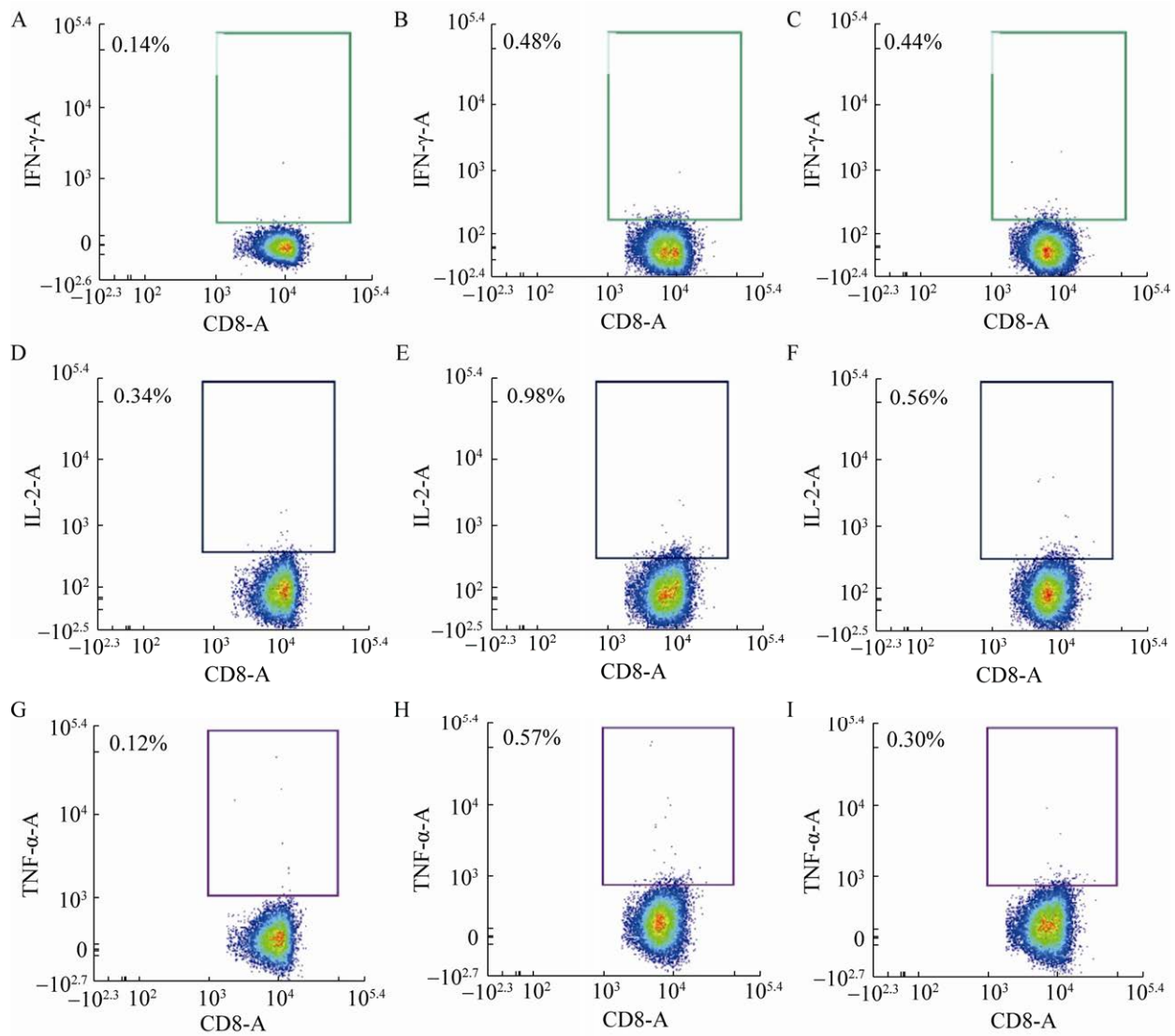


图 5 菌株 RA343 和 A19 免疫小鼠 1 周后 $CD8^+$ T 细胞亚群比例 A-C: 空白组、RA343 组、A19 组 IFN- γ 所占比例; D-F: 空白组、RA343 组、A19 组 IL-2 所占比例; G-I: 空白组、RA343 组、A19 组 TNF- α 所占比例。A、D 和 G: 空白组; B、E 和 H: RA343 组; C、F 和 I: A19 组

Figure 5 Proportion of $CD8^+$ T cell subsets in mice immunized with strain RA343 and A19 for 1 week. A-C: The proportion of IFN- γ in blank group, RA343 group and A19 group; D-F: The proportion of IL-2 in blank group, RA343 group and A19 group; G-I: The proportion of TNF- α in blank group, RA343 group and A19 group. A, D and G: The blank group; B, E and H: RA343 group; C, F and I: A19 group.

被 OIE 所采用。RA343 株和 A19 株免疫小鼠后其脾脏含菌量及脾脏称重结果分别见图 8 和图 9。

从上述的结果得出, RA343 株免疫小鼠 2 周后脾脏内的细菌增殖达到高峰, 随后又直线下降; A19 株免疫小鼠后脾脏含菌量呈逐渐

上升的趋势, 在免疫后 3 周含菌量达到最高。RA343 株免疫小鼠后脾脏重量呈直线下降, 而 A19 株免疫小鼠后 2 周脾脏重量显著升高, 说明与 A19 株相比, RA343 株毒力较弱, 容易被机体免疫系统清除。

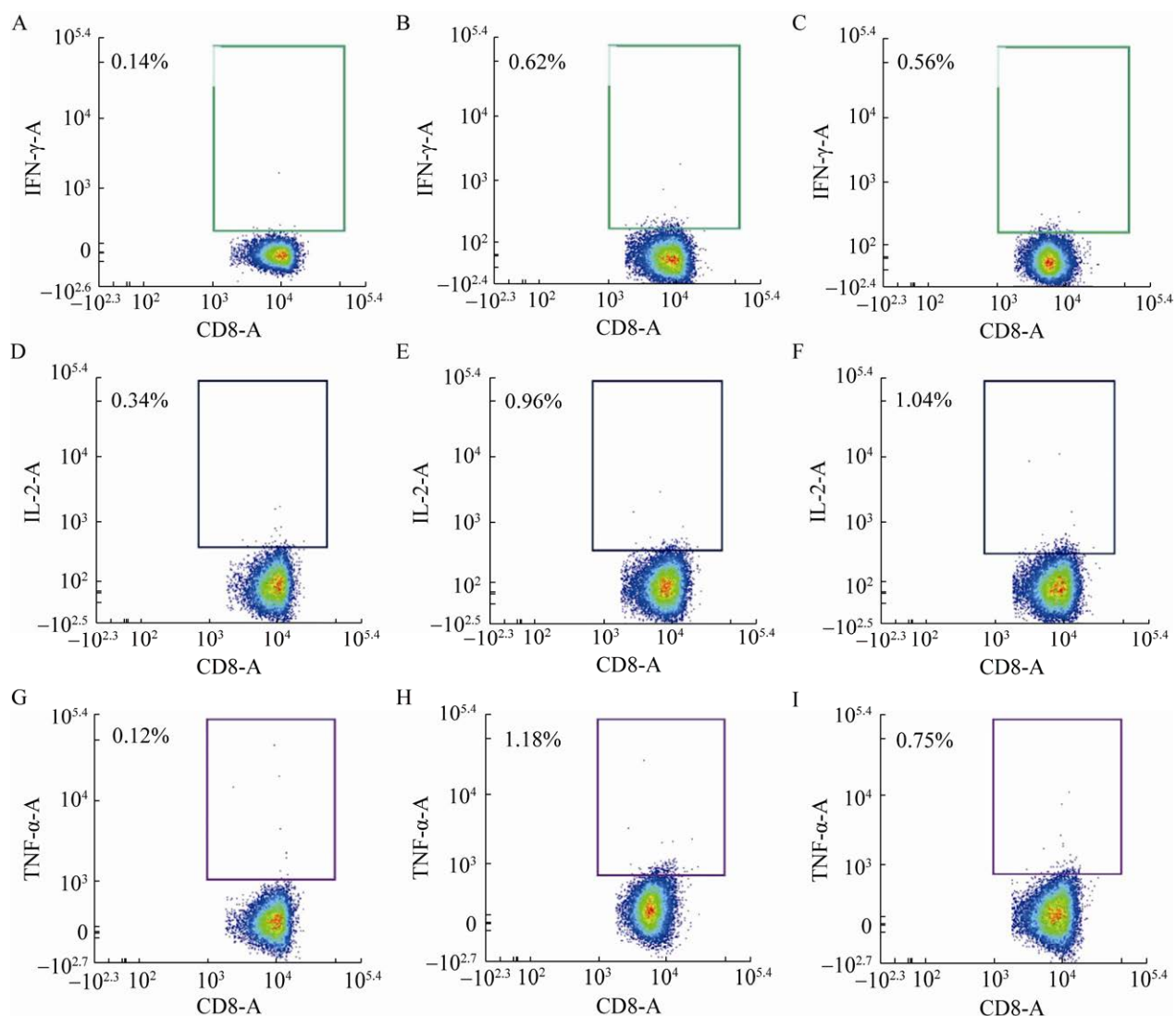


图 6 菌株 RA343 和 A19 免疫小鼠 2 周后 $CD8^+$ T 细胞亚群比例 A-C: 空白组、RA343 组、A19 组 IFN- γ 所占比例; D-F: 空白组、RA343 组、A19 组 IL-2 所占比例; G-I: 空白组、RA343 组、A19 组 TNF- α 所占比例。A、D 和 G: 空白组; B、E 和 H: RA343 组; C、F 和 I: A19 组

Figure 6 Proportion of $CD8^+$ T cell subsets in mice immunized with strain RA343 and A19 for 2 weeks. A-C: The proportion of IFN- γ in blank group, RA343 group and A19 group; D-F: The proportion of IL-2 in blank group, RA343 group and A19 group; G-I: The proportion of TNF- α in blank group, RA343 group and A19 group. A, D and G: The blank group; B, E and H: RA343 group; C, F and I: A19 group.

2.4 IgM、IgG 抗体消长规律检测结果

RA343 和 A19 株免疫小鼠后,经 ELISA 方法检测,当包被光滑型 A19 裂解抗原进行检测时,RA343 组的 IgM 和 IgG 抗体水平均呈阴性,而 A19 组的 IgM 和 IgG 抗体水平均呈阳性,并

且 IgM 和 IgG 抗体的滴度在免疫后 2 周均显著升高(图 10)。

用光滑型抗原进行 ELISA 检测,RA343 株在免疫小鼠后,IgM 和 IgG 抗体水平均呈阴性,表明该菌株不与光滑型抗原产生反应,而且免

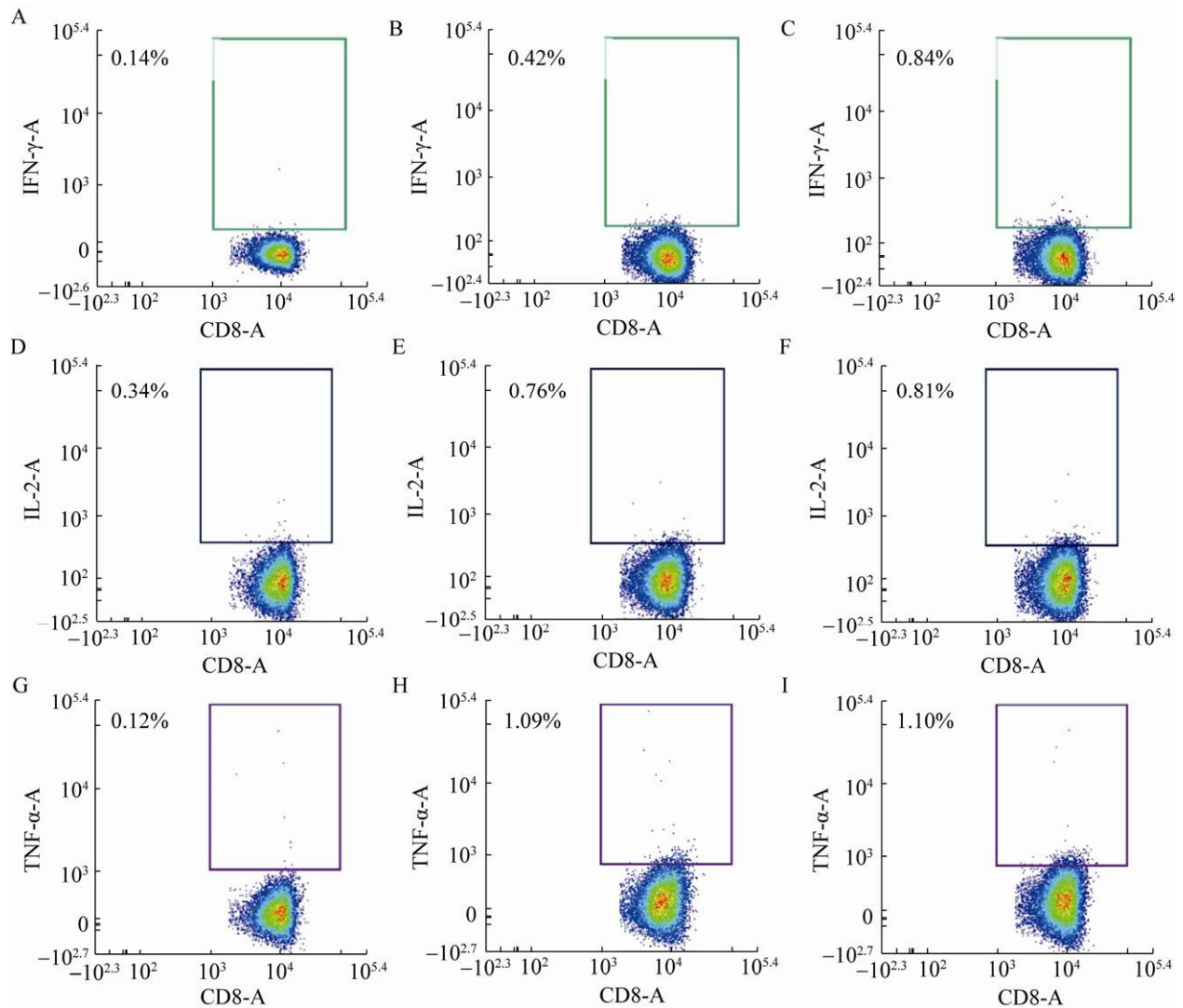


图7 菌株 RA3443 和 A19 免疫小鼠 3 周后 $CD8^+$ T 细胞亚群比例 A-C: 空白组、RA3443 组、A19 组 IFN- γ 所占比例; D-F: 空白组、RA3443 组、A19 组 IL-2 所占比例; G-I: 空白组、RA3443 组、A19 组 TNF- α 所占比例。A、D 和 G: 空白组; B、E 和 H: RA3443 组; C、F 和 I: A19 组

Figure 7 Proportion of $CD8^+$ T cell subsets in mice immunized with strain RA3443 and A19 for 3 weeks. A-C: The proportion of IFN- γ in blank group, RA3443 group and A19 group; D-F: The proportion of IL-2 in blank group, RA3443 group and A19 group; G-I: The proportion of TNF- α in blank group, RA3443 group and A19 group. A, D and G: The blank group; B, E and H: RA3443 group; C, F and I: A19 group.

疫后产生的抗体不会干扰目前基于光滑型抗原开发的血清学诊断。

3 讨论与结论

布鲁氏菌是革兰氏阴性、无芽孢、兼性细

胞内寄生的细菌，其具有独特的胞内生存机制和免疫机制，是一种自然疫源性病菌。动物感染布鲁氏菌后会刺激机体产生免疫应答反应，从而激发细胞免疫和体液免疫。体液免疫是机体适应性免疫应答中的重要组成部分，在防御

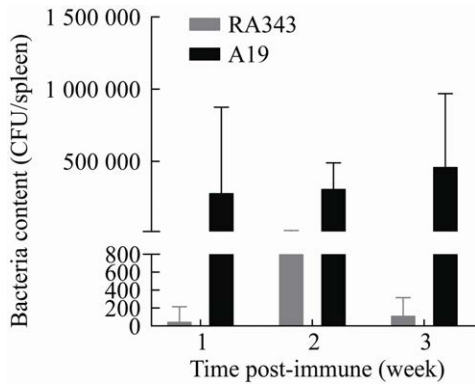


图 8 菌株 RA343 和 A19 免疫后不同时间点小鼠脾脏含菌量图

Figure 8 Diagram of bacteria content in spleen of mice at different time points after immunization with strain RA343 and A19.

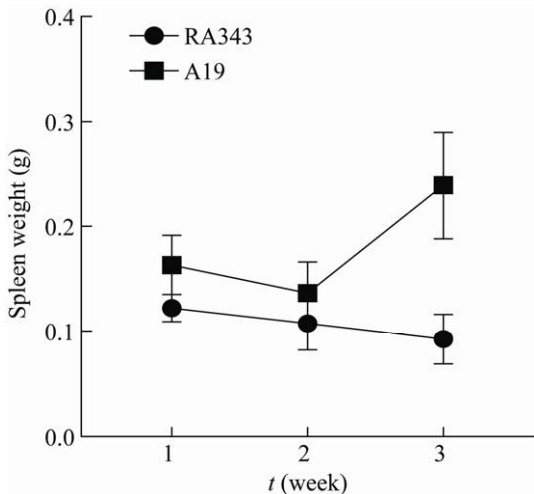


图 9 菌株 RA343 和 A19 免疫后不同时间点小鼠脾脏重量变化

Figure 9 Changes in spleen weight of mice at different time points after immunization with strain RA343 and A19.

外来病原入侵方面发挥着重要的作用, 而细胞免疫对于胞内寄生菌的清除起主要作用^[19]。T 淋巴细胞在细胞免疫中起核心调节作用, 其中 CD4⁺及 CD8⁺ T 细胞是两类主要亚群, 对清除病原体感染有重要作用^[20]。CD4⁺ T 细胞分泌最高水平的 γ 干扰素(gamma interferon, IFN- γ),

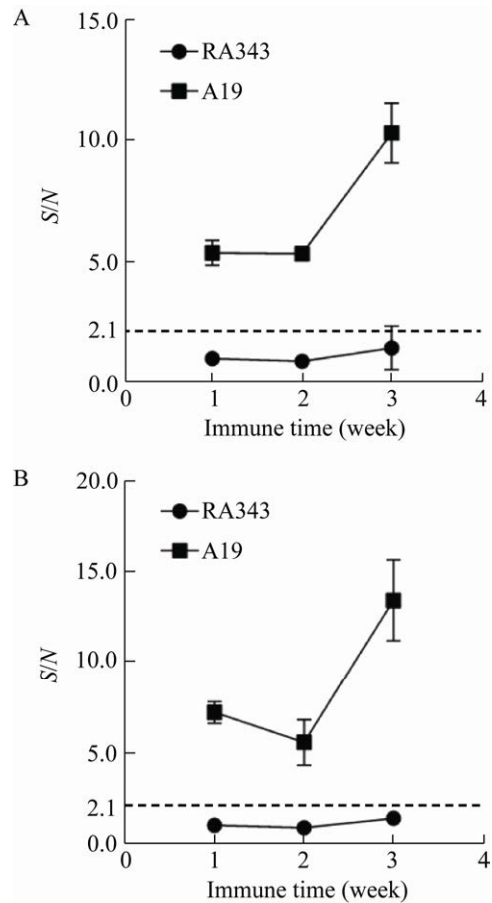


图 10 菌株 RA343 和 A19 免疫后布鲁氏菌 IgM (A)、IgG (B) 抗体消长规律

Figure 10 Changes of IgM (A) and IgG (B) antibody against *Brucella* after immunization with RA343 and A19 strains.

能够对布鲁氏菌感染的巨噬细胞产生特异性裂解, CD4⁺ T 细胞对未感染的巨噬细胞产生低水平的非特异性溶解; 相反地, CD8⁺ T 细胞分泌低水平的 IFN- γ , 但表现出对布鲁氏菌感染的巨噬细胞的高水平特异性裂解, 并无非特异性裂解; 这些发现表明接种布鲁氏菌后机体可诱导特异性细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cells, CTLs), 并且表明 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞在抗布鲁氏菌活性中起协同作用^[21-23]。目前研究认为, 在布鲁氏菌疫苗免疫过程中, 疫苗接种后可通过特异性抗体检测评价免疫效果, 但是

布鲁氏菌病的免疫保护主要体现在细胞免疫水平, 免疫抗体水平的检测只是对疫苗是否免疫成功的一个反应指标, 因此, 抗体水平与畜群机体保护力不呈正相关^[24-26]。研究不同布鲁氏菌疫苗免疫小鼠后机体特异性 T 细胞的动态变化与抗体消长规律, 可为疫苗评价及致病机制的研究提供参考依据。

本试验采用粗糙型和光滑型布鲁氏菌疫苗株对小鼠进行免疫, 通过对 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞亚群的结果分析, 发现免疫后 1 周, RA343 免疫组特异性 CD4⁺ IFN- γ 所占比例极显著高于 A19 免疫组 ($P < 0.01$), CD4⁺ IL-2、CD8⁺ IL-2、CD8⁺ TNF- α 所占比例显著高于 A19 免疫组 ($P < 0.05$); 免疫后 2 周, RA343 免疫组特异性 CD4⁺ TNF- α 所占比例极显著高于 A19 免疫组 ($P < 0.01$), CD8⁺ TNF- α 所占比例显著高于 A19 免疫组 ($P < 0.05$); 免疫后 3 周, CD4⁺ TNF- α 所占比例显著高于 A19 免疫组 ($P < 0.05$), CD8⁺ IFN- γ 所占比例极显著高于 A19 免疫组 ($P < 0.01$)。表明 RA343 菌株免疫前期所诱导的细胞免疫应答强于 A19 株, 而且 CD8⁺ T 细胞亚群所占比例的趋势同 CD4⁺ T 细胞亚群基本一致, 进一步说明 CD8⁺ T 与 CD4⁺ T 细胞亚群在抗布鲁氏菌活性中起协同作用。同时采用小鼠感染模型对 RA343 株和 A19 株的毒力进行了评估, 从图 8 可以看出, RA343 株免疫小鼠的脾脏含菌量显著低于 A19 株免疫小鼠的脾脏含菌量 ($P < 0.05$), 表明 RA343 株毒力较弱。根据 IgM、IgG 抗体消长规律结果分析, A19 株能够有效刺激机体产生较高的光滑型抗体, 而 RA343 株不产生光滑型抗体, 不与光滑型抗原产生交叉反应, 所以不会干扰临床诊断。有研究^[27-28]发现, RA343 菌株毒力低, 而且接种后不会刺激机体产生针对 O 抗原的抗体, 不会干扰临床诊断。由此可见, 本研究与相关报道的结论一致。因此,

RA343 株应用临床后, 可通过血清学检测鉴别疫苗免疫与自然感染, 从而解决我国布病防控所面临的实际难题。

本研究选择目前在牛群中应用最广泛的牛种布鲁氏菌 A19 疫苗株与中国兽医药品监察所国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室开发的粗糙型牛种布鲁氏菌 RA343 株进行免疫效果比较分析, 结果表明 RA343 株毒力更弱、安全性更高, 而且能够刺激机体产生更高水平的细胞免疫反应, 其产生的粗糙型抗体不干扰血清学诊断, 可实现疫苗免疫和自然感染的鉴别诊断。因是初步探索, 所以本研究只设计了一组空白对照, 表明在整个试验过程中研究结果不受外界因素干扰(如环境因素、免疫途径等)。后期若要深入研究粗糙型 RA343 株的免疫学特性, 可相应地增加对照组, 为 RA343 株作为后备疫苗的开发提供更充分的理论依据。

致谢: 感谢北京科悦达生物科技有限公司徐涛博士在流式细胞术检测中提供技术支持。

REFERENCES

- [1] Wattam AR, Inzana TJ, Williams KP, Mane SP, Shukla M, Almeida NF, Dickerman AW, Mason S, Moriyón I, O'Callaghan D, et al. Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway[J]. mBio, 2012, 3(5): e00246-e00212
- [2] Mesureur J, Arend S, Cellière B, Courault P, Cotte-Pattat PJ, Totty H, Deol P, Mick V, Girard V, Touchberry J, et al. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2018, 12(10): e0006874
- [3] Norman SA, Delaney MA, Haman KH, Thomas AC, Godfroid J, Larsen AK, Nymo IH, Robbe-Austerman S, Quance C, Rhyan JC, et al. Application of real-time quantitative PCR assays for detecting marine *Brucella* spp. in fish[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2018, 30(1): 150-154
- [4] Paul S, Peddayelachagiri BV, Gogoi M, Nagaraj S, RamLal S, Konduru B, Batra HV. Genome-wide unique

- insertion sequences among five *Brucella* species and demonstration of differential identification of *Brucella* by multiplex PCR assay[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 6368
- [5] Jacob J, Finke A, Mielke M. Survival of *Brucella abortus* S19 and other *Brucella* spp. in the presence of oxidative stress and within macrophages[J]. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(5): 879-894
- [6] 马帅, 李金积, 赵明, 王媛, 刘枢清, 李超. 布鲁氏菌病研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(7): 73-79
Ma S, Li JJ, Zhao M, Wang Y, Liu SQ, Li C. Research progress on brucellosis[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(7): 73-79 (in Chinese)
- [7] 秦玉明, 冯宇, 蒋卉, 彭小微, 许冠龙, 朱良全, 范学政, 丁家波. 动物布鲁氏菌病活疫苗生产环节生物安全风险分析与对策[J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(6): 67-72
Qin YM, Feng Y, Jiang H, Peng XW, Xu GL, Zhu LQ, Fan XZ, Ding JB. Prevention and control of biosafety risk in the production of animal brucellosis live vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2021, 55(6): 67-72 (in Chinese)
- [8] 冯学明, 冉多良. 布鲁氏菌病的流行特征及动物疫苗的研究进展[J]. *中兽医学杂志*, 2019(05): 90-91
Feng XM, Ran DL. Brucellosis epidemic characteristics and research progress of animal vaccine[J]. *Chinese Journal of Traditional Veterinary Science*, 2019(5): 90-91 (in Chinese)
- [9] De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions[J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(6): 1505-1517
- [10] Zheng RJ, Xie SS, Lu XB, Sun LH, Zhou Y, Zhang YX, Wang K. A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 5712920
- [11] 孙天浩, 马忠臣, 张欢, 程科建, 陈创夫, 王震, 张倩. 家畜布鲁氏菌病相关疫苗的研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2021(7): 80-86
Sun TH, Ma ZC, Zhang H, Cheng KJ, Chen CF, Wang Z, Zhang Q. Progress of research on brucellosis vaccine for livestock[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021(7): 80-86 (in Chinese)
- [12] 程君生, 吴梅花, 赵丽霞, 彭小兵, 丁家波, 王楠, 夏业才, 毛开荣. 三种布鲁氏菌病疫苗株的毒力比较[J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(9): 1-3
Cheng JS, Wu MH, Zhao LX, Peng XB, Ding JB, Wang N, Xia YC, Mao KR. Virulence comparison between three different vaccine strains of brucellosis in mice and Guinea pigs[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012, 46(9): 1-3 (in Chinese)
- [13] Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(s1): 281-290
- [14] Yu DH, Hu XD, Cai H, Li M. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses[J]. *DNA and Cell Biology*, 2007, 26(6): 435-443
- [15] 孙晶晶, 吴锦艳, 曹小安, 陈妍, 尹双辉, 周建华, 兰喜, 李学瑞, 刘永生, 尚佑军. 布鲁氏菌 S2、M5 及 A19 疫苗免疫羊抗体消长规律研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(3): 287-292
Sun JJ, Wu JY, Cao XA, Chen Y, Yin SH, Zhou JH, Lan X, Li XR, Liu YS, Shang YJ. Study on the growth and decline of antibody against *Brucella* S2, M5 and A19 vaccine in immunized sheep[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(3): 287-292 (in Chinese)
- [16] Minas A, Stournara A, Christodoulopoulos G, Katsoulos PD. Validation of a competitive ELISA for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats[J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 177(3): 411-417
- [17] Jindan RA, Saleem N, Shafi A, Amjad SM. Clinical interpretation of detection of IgM anti- *Brucella* antibody in the absence of IgG and vice versa; a diagnostic challenge for clinicians[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2019, 68(1): 51-57
- [18] 蒋卉, 冯宇, 沈青春, 彭小微, 朱良全, 丁家波. 牛种布鲁氏菌 2308 不同途径小鼠感染模型的建立与评估[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(11): 4190-4197
Jiang H, Feng Y, Shen QC, Peng XW, Zhu LQ, Ding JB. Establishment and evaluation of mice model infected *Brucella abortus* strain 2308 by different routes[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4190-4197 (in Chinese)
- [19] Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(2): 134-142
- [20] López-Santiago R, Sánchez-Argáez AB, De Alba-Núñez LG, Baltierra-Urbe SL, Moreno-Lafont MC. Immune response to mucosal *Brucella* infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1759

- [21] Gao N, Jennings P, Guo YH, Yuan D. Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*[J]. *Innate Immunity*, 2011, 17(2): 152-163
- [22] Clapp B, Yang XH, Thornburg T, Walters N, Pascual DW. Nasal vaccination stimulates CD8⁺ T cells for potent protection against mucosal *Brucella melitensis* challenge[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2016, 94(5): 496-508
- [23] Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen[J]. *Immunological Reviews*, 2011, 240(1): 211-234
- [24] 孙晶晶, 吴锦艳, 陈妍, 曹小安, 尹双辉, 周建华, 兰喜, 李学瑞, 刘永生, 尚佑军. 布鲁氏菌 S2、M5 及 A19 疫苗不同免疫程序对细胞因子的影响[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(11): 984-993
Sun JJ, Wu JY, Chen Y, Cao XA, Yin SH, Zhou JH, Lan X, Li XR, Liu YS, Shang YJ. The dynamic effect on cytokines by different immune procedures for *Brucella* S2, M5 and A19 vaccines[J]. *Immunological Journal*, 2020, 36(11): 984-993 (in Chinese)
- [25] Zhu LQ, Feng Y, Zhang G, Jiang H, Zhang Z, Wang N, Ding JB, Suo X. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella* spp. infections[J]. *Vaccine*, 2016, 34(3): 395-400
- [26] 靳红娟, 叶锋, 刘丽娅, 陈雅璐, 张悦, 陈泽辉, 李欣宇, 谷文喜, 钟旗, 姚刚, 等. 布鲁氏菌活疫苗 (M5)免疫试验: 多浪羊抗体消长规律研究[J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(3): 84-86
Jin HJ, Ye F, Liu LY, Chen YL, Zhang Y, Chen ZH, Li XY, Gu WX, Zhong Q, Yao G, et al. Antibody dynamic change in dolang sheep after immunizing with *Brucella* live vaccine (M5)[J]. *China Animal Health Inspection*, 2019, 36(3): 84-86 (in Chinese)
- [27] 孙浩杰, 任小侠, 秦玉明, 朱良全, 蒋卉, 孙石静, 丁家波, 辛凌霄, 王楠, 李晓宁, 等. 一株粗糙型牛种布鲁氏菌诱导株的构建及鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3445-3453
Sun HJ, Ren XX, Qin YM, Zhu LQ, Jiang H, Sun SJ, Ding JB, Xin LX, Wang N, Li XN, et al. Construction and identification of an induced strain of rough *Brucella abortus*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(11): 3445-3453 (in Chinese)
- [28] 孙浩杰, 孙佳丽, 张楠, 张百慧, 刘洋, 李简, 张园园, 韩莹, 李晓宁, 王楠, 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
Sun HJ, Sun JL, Zhang N, Zhang BH, Liu Y, Li J, Zhang YY, Han Y, Li XN, Wang N, et al. Progress on rough *Brucella* and vaccine[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(11): 96-99 (in Chinese)