



梁瑞英, 刘大虎, 汤新明, 梁琳, 李子彬, 蒋卉, 杨晓雯, 杨升, 丁家波. 布鲁氏菌表位疫苗研究进展及其在犬布鲁氏菌病疫苗研究中的思考[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(11): 112-119.

LIANG Ruiying, LIU Dahu, TANG Xinming, LIANG Lin, LI Zibin, JIANG Hui, YANG Xiaowen, YANG Sheng, DING Jiabo. Research progress of *Brucella* epitope vaccine and considerations in the study of canine brucellosis vaccine[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(11): 112-119.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.11.12

## 布鲁氏菌表位疫苗研究进展及其在犬布鲁氏菌病疫苗研究中的思考

梁瑞英<sup>1</sup> 刘大虎<sup>2</sup> 汤新明<sup>1</sup> 梁琳<sup>1</sup> 李子彬<sup>3</sup> 蒋卉<sup>1</sup> 杨晓雯<sup>1</sup> 杨升<sup>2</sup>  
丁家波<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所/农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方)/

农业农村部兽用生物制品与化学药品重点实验室, 北京 100193;

2. 天津农学院 动物科学与动物医学学院/天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392;

3. 大连大学 生命健康学院/大连市动物病毒抗原表位筛选及蛋白质工程药物研发重点实验室, 辽宁 大连 116622)

**摘要** 本研究对近40年来布鲁氏菌表位疫苗领域的研究成果进行系统性回顾和分析,总结了布鲁氏菌免疫抗原筛选的最新研究进展,提出了表位疫苗设计的优化策略,以及多表位疫苗的免疫评估方式,并对犬布鲁氏菌病表位疫苗应用前景进行分析。结果表明:1)布鲁氏菌的外膜蛋白是疫苗设计中的关键候选抗原,可有效激发宿主的免疫保护反应。表位疫苗的构建策略聚焦于能够激发宿主免疫应答的B细胞和T细胞表位。2)布鲁氏菌多表位疫苗的免疫效果评估是一个全面且多维度的科学过程,综合运用了多种生物技术方法来评估体液和细胞免疫反应,同时考虑疫苗的稳定性和免疫原性和安全性。3)鉴于犬布鲁氏菌(*B. canis*)对人类健康构成的潜在风险,开发有效犬布鲁氏菌病表位疫苗尤为迫切。尽管犬布鲁氏菌病表位疫苗因其特异性强、安全性高,展现出广阔应用前景,但仍面临MHC分子多态性、疫苗稳定性和递送系统等技术挑战,为克服这些难题,需要加强基础研究,优化表位鉴定技术,开发新型佐剂和递送系统等。本综述为研制更安全、高效的布鲁氏菌疫苗提供科学依据,进而为人类和犬类健康以及公共卫生安全提供更加有力保障。

**关键词** 布鲁氏菌; 免疫抗原; 抗原表位; 表位筛选; 表位疫苗

中图分类号 S885

文章编号 1007-4333(2024)11-0112-08

文献标志码

## Research progress of *Brucella* epitope vaccine and considerations in the study of canine brucellosis vaccine

LIANG Ruiying<sup>1</sup>, LIU Dahu<sup>2</sup>, TANG Xinming<sup>1</sup>, LIANG Lin<sup>1</sup>, LI Zibin<sup>3</sup>, JIANG Hui<sup>1</sup>,  
YANG Xiaowen<sup>1</sup>, YANG Sheng<sup>2</sup>, DING Jiabo<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Animal Sciences /Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Prevention and Control (North) / Key Laboratory of Veterinary Biological Products and Chemical Drugs of MARA, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine/Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China;

3. College of Life and Health/ The Dalian Gene and Protein Engineering for Drug Screening Key Laboratory, Dalian University, Dalian 116622, China)

收稿日期: 2024-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32302912); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-CSLPDCP-202403); 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2024JC36)

第一作者: 梁瑞英(ORCID: 0009-0005-1356-9671), 副研究员, 主要从事布鲁氏菌细胞免疫应答机制研究, E-mail: liangruiying@caas.cn

通讯作者: 丁家波(ORCID: 0000-0002-8515-9031), 研究员, 主要从事动物布病、牛结核病等重要人畜共患病防控技术研究, E-mail: dingjiabo@caas.cn

**Abstract** This study provides a systematic review and analysis of research advancements in *Brucella* epitope vaccines over the past 40 years, summarizes recent progress in *Brucella* immune antigen screening, proposes optimization strategies for epitope vaccine development, provides immune evaluation methods for multi-epitope vaccines, and examines the potential application of epitope vaccines for canine brucellosis. The findings indicate that: 1) The outer membrane proteins of *Brucella* serve as pivotal candidate antigens in the design of vaccines, capable of eliciting a robust immune response in the host. The development of epitope vaccines centers on the identification of B-cell and T-cell epitopes that can effectively activate the host's immune system. 2) The assessment of the immunological impact of multi-epitope vaccines for *Brucella* is a complex and multifaceted scientific endeavor, involving the utilization of diverse biotechnological techniques to evaluate both humoral and cellular immune responses, while also taking into account factors such as vaccine stability, immunogenicity, and safety. 3) Due to the potential threat of *Brucella canis* to human health, there is an urgent need for the development of effective vaccines targeting canine brucellosis epitopes. Despite the broad potential application of these vaccines due to their specificity and safety, they are hindered by technical challenges including MHC molecule polymorphism, vaccine stability, and delivery systems. To address these obstacles, it is imperative to enhance fundamental research, refine epitope identification methods, and innovate new adjuvants and delivery systems. This review offers a scholarly foundation for the advancement of *Brucella* vaccines that are both safer and more efficacious, thereby enhancing protection for the health of humans and canines, as well as promoting public health safety.

**Keywords** *Brucella*; immunogenic antigen; antigenic epitope; epitope screening; epitope vaccine

布鲁氏菌病(Brucellosis),简称布病,是一种广泛存在于动物与人之间的人畜共患病,对全球公共卫生构成了重大威胁<sup>[1]</sup>。基于流行病学特征,宿主特异性以及基因组差异,布鲁氏菌被分为6个经典种,包括羊种布鲁氏菌(*B. melitensis*)、牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)、猪种布鲁氏菌(*B. suis*)、绵羊布鲁氏菌(*B. ovis*)、沙林鼠布鲁氏菌(*B. neotome*)和犬种布鲁氏菌(*B. canis*)。羊种布鲁氏菌致病性最强,其次是猪种布鲁氏菌。犬类对不同种布鲁氏菌均表现出易感,特别是犬布鲁氏菌对犬类具有高度的感染性。自1967年首次报道人感染犬布鲁氏菌的病例以来,全球多地均有病例报道<sup>[2]</sup>。表明犬布鲁氏菌对人类健康的潜在风险不容忽视。

疫苗接种是预防和控制布病的重要手段。目前,动物布鲁氏菌病的疫苗接种主要使用减毒的光滑型布鲁氏菌株,如牛种布鲁氏菌19(*B. abortus* stain 19, S19)和羊种布鲁氏菌Rev. 1(*B. melitensis* Rev. 1, Rev. 1)以及一些国家如美国、阿根廷、墨西哥等国家使用的非光滑型牛种布鲁氏菌RB51(*B. abortus* RB51, RB51)疫苗,这些疫苗已被证实能有效预防特定宿主的布鲁氏菌感染<sup>[3]</sup>。然而,迄今为止,成功应用的疫苗均为弱毒疫苗,现有疫苗存在安全性缺陷,例如可能导致怀孕动物流产和对人类具有致病性。此外,布鲁氏菌的传播途径多样、缺乏适

用于人类的疫苗、现有疫苗株的安全性问题、气溶胶传播风险以及疾病的非典型症状,都使得布鲁氏菌的防控工作复杂化。鉴于这些因素,布鲁氏菌的分离、培养和鉴定必须在生物安全三级实验室中进行,并且布鲁氏菌被也认为是潜在的生物战剂。

治疗布鲁氏菌感染通常依赖于多西环素和利福平等抗生素,但由于布鲁氏菌能在巨噬细胞内复制,常导致慢性感染,患者需长期服用抗生素,并面临复发的风险<sup>[4]</sup>。Th1免疫反应,特别是 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )的产生,在免疫保护中扮演着关键作用,对调控布鲁氏菌的天然适应性免疫至关重要<sup>[5]</sup>。鉴于现有疫苗的安全性问题,研究学者探索新的疫苗研发策略,如亚单位重组疫苗和载体疫苗<sup>[6]</sup>,以提升疫苗的安全性和有效性。特别是,针对保护性B/T细胞表位的靶向策略,被认为是一种安全且高效的疫苗开发途径。合成表位或基于肽的疫苗由于不存在突变或毒力返强风险,在疫苗设计和生产过程中提供了快速途径,目前,布鲁氏菌表位疫苗的研究仍处于探索性阶段,主要集中于筛选和鉴定具有免疫保护力的布鲁氏菌免疫抗原和关键抗原表位,并开发创新疫苗设计和构建策略,以提高疫苗的效力和安全性,这对于有效应对布鲁氏菌病对全球公共卫生的挑战至关重要。

本综述系统回顾了布鲁氏菌免疫抗原表位筛选

的最新研究进展和多表位疫苗的设计策略,同时对犬布鲁氏菌的表位疫苗研究进行了深入分析。通过识别布病表位疫苗研发中的技术瓶颈并提出相应的解决策略,旨在为布鲁氏菌疫苗的研究提供新视角,并为开发安全、高效的布病疫苗奠定基础。

1 表位疫苗的概念与分类

抗原表位根据其识别受体类型,分为B细胞抗原表位和T细胞抗原表位,B细胞通过B细胞表面受体(B cell receptor, BCR)直接识别抗原肽。

T细胞通过T细胞受体(T cell receptor, TCR)识别主要组织相容性复合体I/II类分子(Major histocompatibility complex I/II, MHC-I/II)递呈的短肽,T细胞表位进一步细分为细胞毒性T细胞(CTL)表位和辅助性T细胞(Th)表位,CTL识别MHC-I类分子递呈的内源性T细胞表位,直接杀伤靶细胞。Th细胞识别由MHC-II类分子递呈的外源性抗原表位,它们在激活体液免疫、细胞免疫过程中发挥重要作用。TCR或BCR识别的抗原表位存在差异(表1)。

表1 T/B细胞抗原表位的差异<sup>[7]</sup>  
Table 1 Differences in T/B cell epitopes

| 内容<br>Content | T细胞识别的抗原表位<br>Antigenic epitopes recognized by T cell | B细胞识别的抗原表位<br>Antigenic epitopes recognized by B cell |
|---------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 表位识别的受体       | TCR                                                   | BCR                                                   |
| MHC分子递呈       | 必需                                                    | 不必需                                                   |
| 表位化学成分        | 主要是线性短肽                                               | 多肽、多糖、脂多糖、有机化合物                                       |
| 表位大小          | CD8 <sup>+</sup> T细胞识别8~11个氨基酸                        | B细胞识别5~15个氨基酸或5~7个单糖、核苷酸                              |
| 表位类型          | CD4 <sup>+</sup> T细胞识别13~18个氨基酸                       | 构象表位、线性表位                                             |
| 表位位置          | 抗原分子任意部位                                              | 抗原分子表面(功能性决定簇)                                        |

表位疫苗可以根据多个维度进行分类:根据抗原来源,它们可以分为天然表位疫苗和合成表位疫苗;根据包含的表位数量,可以分为单一表位疫苗和多表位疫苗;根据免疫机制的不同,可分为T细胞表位疫苗、B细胞表位疫苗和T-B细胞联合表位疫苗;根据抗原的结构特性,可以进一步分为线性表位疫苗和构象表位疫苗;最后,根据应用目的,表位疫苗可分为预防性表位疫苗和治疗性表位疫苗。

抗原表位的多样性及其通过B细胞和T细胞受体的特异性识别,为疫苗设计提供了丰富的分类基础,从而可以根据抗原来源、表位数量、免疫机制、结构特性和应用目的,开发出适应不同需求的预防性或治疗性表位疫苗。

2 布鲁氏菌重要免疫抗原的研究进展

2.1 免疫抗原的筛选与鉴定方法

随着转录组学、蛋白质组学、生物信息学等技术的发展,免疫抗原的筛选与鉴定更加高效和精准。Jiang等<sup>[8]</sup>利用转录组分析技术,对比*B. suis*1330株与减毒活疫苗S2株感染的巨噬细胞进行

了基因表达差异分析,筛选出潜在编码免疫抗原的基因。除此之外,通过比较蛋白质组学和抗体谱分析,He等<sup>[9]</sup>还鉴定出了候选疫苗株A18BG的特征抗原。蛋白质微阵列等高通量血清学筛选技术,也被用于筛选山羊血清中感染和未感染布鲁氏菌的差异识别抗原。生物信息学分析在布鲁氏菌潜在免疫抗原筛选中发挥重要作用。通过分析蛋白质序列,寻找与抗原性相关的特征,如亲水性和序列保守性等。这些筛选出的候选抗原,需要经过功能鉴定,以评估它们作为疫苗靶点的潜力<sup>[5-10]</sup>。综合运用这些方法对布鲁氏菌免疫原进行筛选鉴定,不仅有助于布鲁氏菌病的发病机制的研究,而且对于疫苗设计和开发具有重要意义。

2.2 重要免疫抗原

选择精确的抗原表位是开发有效表位疫苗的基石。在小鼠模型的研究中,鉴定出多种布鲁氏菌的免疫抗原,这些抗原具备激发免疫保护的潜力<sup>[10-11]</sup>。特别是布鲁氏菌的外膜蛋白,作为感染初期最先与宿主接触的抗原,它们是疫苗设计和免疫治疗中的关键候选抗原<sup>[11-12]</sup>。例如,Gouran等<sup>[12]</sup>证

实以重组流产布鲁氏菌 Omp25 活疫苗能够编有效激活 T 细胞免疫应答,并促进 IFN- $\gamma$  的产生,表明其引发以 Th1 型免疫应答为主的反应。Ghasemi 等<sup>[13]</sup>进一步证实,Omp31 和 BP26 蛋白能够激发小鼠对布鲁氏菌的免疫反应,由这 2 个蛋白嵌合表达所产生的表位能有效激活 B 细胞和 T 细胞的免疫反应。此外,Omp16 和 Omp19 这 2 种重组脂蛋白也在免疫研究中显示出保护作用,即使不依赖佐剂,通过注射或口服途径免疫,这些蛋白也能显著增强机体对布鲁氏菌感染的抵抗力,同样,当 Omp16 或 Omp19 蛋白通过植物源疫苗的形式<sup>[10]</sup>,以纯化蛋白或转基因烟草植物的形式给小鼠口服时,也能诱导显著的保护性免疫反应<sup>[13-15]</sup>。Omp25 作为一种肽聚糖膜蛋白,对布鲁氏菌的存活至关重要,并且是其重要的毒力因子;*B. melitensis*、*B. abortus* 和 *B. ovis* Omp25 的缺失会减弱其致病性。作为重组蛋白,*B. abortus* S19 的 Omp25 通过皮内或腹腔途径免疫小鼠,已被证实能有效抵抗 *B. abortus* 544 菌株的感染<sup>[16]</sup>。

相比之下,来自 *B. abortus* 的周质蛋白 Cu-Zn 超氧化物歧化酶的 3 个肽段在小鼠中的保护效果较差,仅有一个肽段可显著抵抗 *B. abortus* 2308 的感染<sup>[17]</sup>。此外,胞质蛋白 SurA 和 DnaK 作为重组蛋白免疫小鼠时,其保护效果并不明显,与活疫苗对照相比,差异显著。研究表明在疫苗设计中选择具有良好免疫原性的抗原,对抗原表位的筛选至关重要。

### 3 表位疫苗的设计与优化

#### 3.1 表位的筛选方法

##### 3.1.1 B 细胞表位筛选方法

B 细胞表位的鉴定是免疫学研究的一个关键领域,它对于疫苗开发和疾病诊断具有重要意义。目前,研究学者采用多种方法来筛选 B 细胞表位,主要包括重叠多肽法、X 衍射技术或核磁共振技术、噬菌体展示肽库技术以及表位预测法<sup>[18-19]</sup>。

重叠多肽法是一种基于序列相似性的筛选技术,通过合成一系列短重叠多肽,并利用 ELISA 等免疫学方法分析它们与特异性抗体的反应性,来预测可能的线性表位<sup>[20]</sup>。X 衍射技术或核磁共振技术作为表位鉴定的金标准,能够提供精确的抗原-抗体复合物结构,揭示构象表位<sup>[21]</sup>。噬菌体展示肽技术

通过将外源多肽的编码基因插入噬菌体结构蛋白的编码基因中,实现外源多肽在噬菌体外壳表面的展示,从而快速鉴定线性和构象表位<sup>[22]</sup>。表位预测法则利用计算生物学方法,基于序列和结构数据来预测表位。Hopp 等<sup>[23]</sup>在 1981 年提出了一种 B 细胞线性表位的预测方法,Kulkarni-Kale 等<sup>[24]</sup>在 2005 年开发了基于结构生物信息学的构象表位预测服务器(CEP)。这些方法各有其优势和局限性,重叠多肽法适合于线性表位的鉴定,而 X 衍射技术、核磁共振技术和噬菌体展示技术适用于构象表位的识别。噬菌体展示技术成本低和操作速度快。表位预测法可以减少工作量,预测结果需进一步验证。近年来,布鲁氏菌表位疫苗的研究中,研究者更加倾向于选择表位预测的方法筛选 B 细胞表位<sup>[5]</sup>,随着技术的发展和数据库的完善,预计未来的表位鉴定方法将更加高效和准确,为疫苗设计和疾病治疗提供更有力的支持。

##### 3.1.2 T 细胞表位筛选方法

T 细胞表位是激发宿主抗布鲁氏菌 T 细胞免疫反应的关键。目前,在 IEDB 数据库已收录了 542 个布鲁氏菌 T 细胞表位,其中 151 个 T 细胞表位已进行功能验证,尚有大量表位待发掘和验证。随着研究策略和技术的不断进步,更多的 T 细胞表位被发现。T 细胞表位筛选方法与 B 细胞表位筛选方法类似,主要包括 X 衍射技术和核磁共振技术、噬菌体展示肽技术、生化及功能验证、质谱分析和表位预测。X 衍射技术和核磁共振技术通过高分辨率结构分析 T 细胞表位的精确结构特征<sup>[25]</sup>;噬菌体展示技术利用噬菌体展示肽库筛选与 MHC 分子高亲和的肽段<sup>[26]</sup>;生化及功能验证包括 MHC 的重链和轻链体外共复性、肽-MHC 亲和力测定、T 细胞增殖检测、细胞因子释放测定等。通过体外共复性鉴定多肽是否能够辅助 MHC 的重链和轻链正确折叠<sup>[27-28]</sup>;肽-MHC 亲和力测定是利用 SPR 技术等试验方法测定肽段与 MHC 分子的亲和力<sup>[29]</sup>;T 细胞增殖通过多肽体外刺激 T 细胞并测量其增殖反应来筛选表位;细胞因子释放则通过测定肽段刺激 T 细胞释放 IFN- $\gamma$  等细胞因子的量<sup>[10]</sup>;质谱分析:通过温和酸洗的方法将淋巴细胞悬浮液在低 pH 缓冲液中孵育以破坏细胞表面 MHC I 多肽复合物并将 MHC I 类分子结合肽释放到上清液中,脱酸后进行质谱鉴定<sup>[30]</sup>。或者通过免疫共沉淀方法,利用

MHC 抗体进行免疫沉淀,洗脱多肽,质谱分析鉴定与 MHC 结合的肽段;生物信息学预测,使用算法如 SYFPEITHI、NetMHC 和 NetCTL 等,基于 MHC 分子结合特性和已知表位数据库进行预测<sup>[10]</sup>。

这些方法可以单独使用,也可以结合使用,以提高 T 细胞表位筛选的准确性和效率。通过这些筛选方法,可以鉴定出具有免疫原性的 T 细胞表位,为疫苗设计和免疫治疗提供重要信息。

### 3.2 布鲁氏菌表位疫苗的构建策略

布鲁氏菌表位疫苗的构建策略聚焦于识别和利用能够激发宿主免疫应答的特定 B 细胞和 T 细胞表位。这些策略通常基于筛选到的优势 B 细胞和 T 细胞表位,进而设计出包含多个表位的疫苗。近年来,布鲁氏菌表位疫苗构建的策略是多表位融合蛋白的设计,即将多个已知具有免疫原性的表位肽融合表达,这些表位通常与结核分枝杆菌的肝素结合血凝素(Heparin-binding adhesin, HBHA)、非天然的泛 DR 表位(Pan-DR epitope, PADRE)、人防御素 3(Human-defensin 3, hBD 3)

或破伤风毒素 C 片段(Tetanus toxin C fragment, TTFRC)等融合表达,HBHA 是一种新型的 Toll 样受体(TLR4)激动剂,可促进树突状细胞成熟;PADRE 和 TTFRC 作为通用辅助 T 细胞表位,能够诱导 Th 细胞反应;而人类防御素 3(hBD 3)是一种小分子抗菌肽,对先天性和获得性免疫反应都具有免疫调节作用,并且能够增强疫苗的免疫原性<sup>[31-32]</sup>。这些片段因此可以作为多表位疫苗的佐剂。此外,融合蛋白通过 KK、GP GPG、EAAAK 和 AAY 等连接子进行连接。EAAAK、GP GPG 和 AAY 用于连接 B 细胞、T 细胞和辅助表位。这些连接子有助于减少新表位的形成,EAAAK 连接子作为佐剂接头,GP GPG 用于增强 HTL 激发免疫反应,而 AAY 则用于连接 CTL 表位<sup>[33]</sup>。疫苗构建策略示意图见图 1。已有多种布鲁氏菌表位疫苗采用相同或相似的构建策略,并通过 ELISPOT、布鲁氏菌感染等方法进行了验证,证实了重组表位疫苗能够引起较强的体液及细胞免疫应答反应<sup>[34-36]</sup>。



EAAK、AAY、GP GPG 和 KK 是接头。红色的“hBD3”是人防御素 3。黄色的“PADRE”是非天然的泛 DR 表位。深绿色“CTL”代表所选细胞毒性 T 细胞的优势表位。深蓝色的“HTL”代表所选择的辅助性 T 细胞的优势表位。“BES”代表所选线性和构象 B 细胞的优势表位。“6×H”表示多组氨酸标签<sup>[37]</sup>。

EAAAK, AAY, GP GPG and KK are linkers. "hBD3" in red is human-defensin 3. The Yellow "PADRE" is the PADRE sequence. Dark green "CTL" represents the dominant epitope of the selected cytotoxic T cells. The dark blue "HTL" represents the dominant epitope of the selected helper T cells. "BES" represents the dominant epitope of the selected linear and conformational B cells. The "6×H" indicates a polyhistidine tag<sup>[37]</sup>。

图 1 布鲁氏菌多肽疫苗的构建策略

Fig. 1 Construction strategy of *Brucella* peptide vaccine

### 3.3 布鲁氏菌多表位疫苗免疫效果评估

布鲁氏菌多表位疫苗的免疫效果评估是一个多维度的过程,它不仅包括了体液免疫和细胞免疫两大关键维度,还融入了针对多表位疫苗特性的评估方式。

具体而言,在小鼠完成最终免疫剂量后的第 8 周,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体水平。其中 IgG1 与 Th2 免疫应答相关,促进 B 细胞的活化和抗体的产生,而 IgG2a 则与 Th1 免疫应答相关,有助于 CTL 活化<sup>[37]</sup>。细胞免疫应答的评估则通过细胞因子分析方法,如 ELISA 或细胞因子芯片技术,测定血清中 IFN- $\gamma$ 、

IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$  等关键细胞因子,从而评估细胞免疫应答的强度和类型<sup>[37]</sup>。淋巴细胞增殖试验和 ELISPOT 技术分别用于评估 T 细胞的增殖反应和特异性细胞免疫应答的诱导<sup>[11]</sup>。流式细胞术进一步分析免疫细胞类型,包括 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例,以及其他免疫细胞亚群,以了解免疫应答的免疫细胞组成。

此外,多表位疫苗的评估还包括分子动力学模拟,用以评估疫苗分子的稳定性和免疫受体的相互作用;计算免疫模拟,预测疫苗激发的免疫反应,包括细胞因子产生和免疫细胞活化水平,以及交叉保护能力的评估,分析所选表位在不同种布鲁氏菌之

间的保守性,从而评估疫苗的广泛保护效果。多表位疫苗独特的评估方式为多表位疫苗的开发和优化提供了更加精确和全面的科学依据。

攻菌保护试验是评估疫苗免疫保护效果的关键方法,通过在免疫后的小鼠中注射布鲁氏菌,观察存活率、细菌负荷量、病理变化等指标,评价疫苗的保护效果<sup>[10-11]</sup>。除了上述方法外,还可以考虑使用基因芯片或 RNA 测序技术分析免疫相关基因的表达情况,深入理解疫苗诱导的免疫应答机制。采用免疫组化或组织病理学方法评估免疫后的组织损伤和炎症反应。安全性评估:在评估免疫效果的同时,对疫苗的安全性进行评估,监测局部和全身的不良反应,以及疫苗对小鼠生长和行为的影响。长期免疫效果监测:除了在免疫后的第 8 周进行初步评估后,进一步在更长时间点(如 12 周、16 周等)监测免疫效果,评价疫苗诱导的免疫记忆和长期保护能力。目前,布鲁氏菌多表位疫苗免疫效果评估主要在小鼠模型上进行,尚未见其他布鲁氏菌宿主的免疫保护验证报道。

#### 4 表位疫苗在犬布鲁氏菌病疫苗研究中的应用前景

犬类不仅是现代家庭的重要成员,还在搜救、导盲、治疗辅助等专业领域扮演着重要角色。随着宠物犬数量的增长,犬类健康问题逐渐成为公共卫生领域关注的焦点。犬布鲁氏菌病作为一种重要的人畜共患病,其防控工作的重要性日益凸显。然而,目前尚无安全可用的商业化犬布鲁氏菌疫苗。现有减毒活疫苗存在诸多局限性,包括毒力返强、怀孕犬只的垂直传播风险,免疫失败可能性以及在血清学检测中造成感染。此外使用减毒活疫苗还可能增加病原体传播给其他动物或人类的风险。

面对这些挑战,表位疫苗的研发为犬布鲁氏菌病的防控提供新思路。表位疫苗是基于病原体特定免疫原性区域设计的,具有高特异性、高安全性和高效性的特点。与传统疫苗相比,表位疫苗不使用完整的病原体,从而无毒力返强和垂直传播的风险。同时,由于其针对性强,表位疫苗在减少非特异性免疫激活方面具有明显优势,有助于提高疫苗的安全性和减少副作用。

表位疫苗的设计需要综合考虑病原体的生物学特性、宿主的免疫应答机制以及疫苗的生产工

艺。研究人员首先通过生物信息学分析和试验验证,筛选出布鲁氏菌中具有高度保守性和稳定性的表位,以确保疫苗的广泛适用性和长期有效性。接着,对选定的表位进行合理设计和优化,以提高其免疫原性并激发宿主产生有效的免疫反应。此外,疫苗的递送系统和佐剂的选择也是影响表位疫苗效果的重要因素,需要通过科学的方法进行筛选和配伍,以实现最佳的免疫效果。

因此,表位疫苗在犬布鲁氏菌病疫苗研究中的应用前景广阔,有望为犬类和人类健康提供更为安全有效的预防手段。

#### 5 犬布鲁氏菌病表位疫苗研究面临的技术瓶颈及解决方案

在犬布鲁氏菌病表位疫苗的研究与开发中,面临一系列挑战,这些瓶颈问题需要被逐一克服以实现疫苗的有效性和实用性。首先,免疫原性预测的准确性是关键,尽管生物信息学在表位预测上取得了一定进展,但其准确性和覆盖范围仍有待提高。其次,MHC 分子的多态性对疫苗的免疫原性有显著影响,而目前犬类 MHC 分子数据库的不完善限制了疫苗设计的普适性和有效性。此外,表位疫苗的免疫原性相对较低,通常需要依赖佐剂来增强免疫反应。疫苗的稳定性和递送也是一大挑战,新型疫苗递送系统的研究尚处于初期阶段。长期保护效果的提升和疫苗安全性的评估同样重要,同时,生产成本和经济性也是决定疫苗实际应用可行性的关键因素。

为解决这些问题,本研究团队提出了一系列解决方案。首先,加强 MHC 分子分析,建立更全面的犬类 MHC 分子数据库,以指导表位疫苗的精准设计。其次,提高预测技术,结合高通量试验技术如质谱分析,对预测结果进行验证和优化,以提高表位筛选的准确性和覆盖率。开发新型佐剂,以诱导强烈的先天免疫反应,从而提高表位疫苗的免疫效果。研究新型疫苗递送系统,利用纳米技术等提高疫苗的稳定性和免疫效果。建立标准化评估体系,包括体液免疫和细胞免疫的多维度分析,以监测长期免疫保护能力。进行安全性评估,确保疫苗不引发不良反应,并进行长期免疫效果监测。

总之,在犬布鲁氏菌病表位疫苗的研究中,不仅要面对现有的挑战,更要积极寻求创新的解决方

案。通过加强基础研究、优化技术手段、提高疫苗设计的精准度,并结合新型佐剂和递送系统的研究,有望克服这些瓶颈,最终实现疫苗的有效性和实用性。

## 6 展望

犬布鲁氏菌病作为一种严重威胁公共卫生和动物健康的重要人畜共患病,其防控工作的重要性日益凸显。面对传统疫苗的局限性,表位疫苗以其高安全性、强特异性和潜在高效性,成为疫苗研究的新趋势,为犬布鲁氏菌病的防控提供了新思路。然而,要实现表位疫苗在犬布鲁氏菌病上的应用,还需解决多项挑战。表位疫苗研发需免疫学、分子生物学、生物信息学和兽医学等多学科紧密合作。跨学科研究团队可综合前沿技术,推动表位疫苗创新。展望未来,表位疫苗在犬布鲁氏菌病疫苗研究中具有广阔前景。通过科学研究和技术进步,预期开发出安全、有效、经济的犬布鲁氏菌病表位疫苗,为犬类健康和公共卫生安全提供保障。未来的研究将聚焦于提高表位疫苗设计的精准性、增强免疫原性、确保安全性,并推动其在实际防控工作中的应用。这不仅将为犬类健康提供有力保障,也将为公共卫生安全做出重要贡献。

## 参考文献 References

- [1] Byndloss M X, Tsois R M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity [J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4:111-127
- [2] Sebzda M K, Kauffman L K. Update on *brucella* canis: Understanding the past and preparing for the future [J]. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2023, 53(5):1047-1062
- [3] Avila- Calderón E D, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle S M, Contreras- Rodriguez A. A history of the development of *brucella* vaccines [J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013:743509
- [4] Qureshi K A, Parvez A, Fahmy N A, Abdel Hady B H, Kumar S, Ganguly A, Atiya A, Elhassan G O, Alfadly S O, Parkkila S, Aspatwar A. Brucellosis: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment-a comprehensive review [J]. *Annals of Medicine*, 2023, 55(2):2295398
- [5] Wen J, Li Z H, Lv Y X, Ding S Q, Zhu Y Z, Yang J H, Tang J, Zhu M X, Zhao Y Q, Zhao W. A subunit vaccine based on *brucella* rBP26 induces Th1 immune responses and M1 macrophage activation [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2024, 56(6):879-891
- [6] Lalsiamthara J, Lee J H. *Brucella* lipopolysaccharide reinforced *salmonella* delivering *Brucella* immunogens protects mice against virulent challenge [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 205:84-91
- [7] 郑世军. 动物分子免疫学 [M]. 北京: 中国农业出版社. 2015  
Zheng S J. *Veterinary Molecular Immunology* [M]. Beijing: China Agricultural Press. 2015
- [8] Jiang H, Dong H, Peng X W, Feng Y, Zhu L Q, Niu K, Peng Y, Fan H

- J, Ding J B. Transcriptome analysis of gene expression profiling of infected macrophages between *Brucella suis* 1330 and live attenuated vaccine strain S2 displays mechanistic implication for regulation of virulence [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 119:241-247
- [9] He C Y, Yang J H, Ye Y B, Zhao H L, Liu M Z, Yang Q L, Liu B S, He S, Chen Z L. Proteomic and antibody profiles reveal antigenic composition and signatures of bacterial ghost vaccine of *Brucella abortus* A19 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13:874871
- [10] Yazdani Z, Rafiei A, Ghoreyshe M, Abediankenari S. In silico analysis of a candidate multi-epitope peptide vaccine against human brucellosis [J]. *Molecular Biotechnology*, 2024, 66(4):769-783
- [11] Wang Y L, Wu A D, Xu Z Y, Zhang H L, Li H H, Fu S, Liu Y J, Cui L J, Miao Y H, Wang Y, Zhumanov K, Xu Y M, Sheng J L, Yi J H, Chen C F. A multi-epitope subunit vaccine based on Cu/Zn-Sod, Omp31 and Bp26 against *Brucella melitensis* infection in BALB/C mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 127:111351
- [12] Gouran S T, Doosti A, Jami M S. *Brucella abortus* antigen Omp25 vaccines: development and targeting based on *lactococcus lactis* [J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2023, 9(4):1908-1922
- [13] Ghasemi A, Jeddi-Tehrani M, Mautner J, Salari M H, Zarnani A H. Simultaneous immunization of mice with Omp31 and Tf provides protection against *brucella melitensis* infection [J]. *Vaccine*, 2015, 33(42):5532-5538
- [14] Pasquevich K A, Garcia Samartino C, Coria L M, Estein S M, Zwerdling A, Ibanez A E, Barrionuevo P, Oliveira F S, Carvalho N B, Borkowski J, Oliveira S C, Warzecha H, Giambartolomei G H, Cassataro J. The protein moiety of *brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis [J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 184(9):5200-5212
- [15] Pasquevich K A, Ibanez A E, Coria L M, Garcia Samartino C, Estein S M, Zwerdling A, Barrionuevo P, Oliveira F S, Seither C, Warzecha H, Oliveira S C, Giambartolomei G H, Cassataro J. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. Abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1):e16203
- [16] Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/C mice from virulent *B. Abortus* 544 [J]. *Molecular Immunology*, 2012, 51(2):159-168
- [17] Tabatabai L B, Jr Pugh G W, Jr. Modulation of immune responses in BALB/C mice vaccinated with *brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine [J]. *Vaccine*, 1994, 12(10):919-924
- [18] Gershoni J M, Roitburd-Berman A, Siman-Tov D D, Tarnovitski Freund N, Weiss Y. Epitope mapping: The first step in developing epitope-based vaccines [J]. *Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 2007, 21(3):145-156
- [19] Van Regenmortel M H V. What is a B-cell epitope [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 524:3-20
- [20] du Plessis D H, Wang L F, Jordaan F A, Eaton B T. Fine mapping of a continuous epitope on VP7 of bluetongue virus using overlapping synthetic peptides and a random epitope library [J]. *Virology*, 1994, 198(1):346-349
- [21] Corti D, Voss J, Gamblin S J, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, Vachieri S G, Pinna D, Minola A, Vanzetta F, Silacci C, Fernandez-Rodriguez B M, Agatie G, Bianchi S, Giacchetto-Sasselli I, Calder L, Sallusto F, Collins P, Haire L F, Temperton N, Langedijk J P M, Skehel J J, Lanzavecchia A. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza a hemagglutinins [J].

- Science*, 2011, 333(6044):850-856
- [22] Jiang L, Zhou J M, Yin Y, Fang D Y, Tang Y X, Jiang L F. Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2 [J]. *Virus Research*, 2010, 150(1/2):49-55
- [23] Hopp T P, Woods K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(6):3824-3828
- [24] Kulkarni-Kale U, Bhosle S, Kolaskar A S. CEP: A conformational epitope prediction server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(2): W168-W171
- [25] Liu Y, Chen R, Liang R, Sun B, Wu Y, Zhang L, Kaufman J, Xia C. The combination of CD8  $\alpha\alpha$  and peptide-MHC-I in a face-to-face mode promotes chicken  $\gamma\delta$ T cells response [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11:605085
- [26] Guevarra L A, Jr, Boado K J O, Cenidoza F B B, Imbao M R L, Sia M J G, Dalmacio L M M. A synthetic peptide analog of in silico-predicted immunogenic epitope unique to dengue virus serotype 2 Ns1 antigen specifically binds immunoglobulin g antibodies raised in rabbits [J]. *Microbiology and Immunology*, 2020, 64(2):153-161
- [27] Liang R Y, Sun Y P, Liu Y J, Wang J Y, Wu Y N, Li Z B, Ma L Z, Zhang N, Zhang L J, Wei X H, Qu Z H, Zhang N Z, Xia C. Major histocompatibility complex class I (Fla-E\*01801) molecular structure in domestic cats demonstrates species-specific characteristics in presenting viral antigen peptides [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(6): e01631-e01617
- [28] Ma L Z, Zhang N Z, Qu Z H, Liang R Y, Zhang L J, Zhang B, Meng G, Dijkstra J M, Li S, Xia M C. A glimpse of the peptide profile presentation by xenopus laevis MHC class I: crystal structure of *p Xela*-UAA reveals a distinct peptide-binding groove [J]. *Journal of Immunology*, 2020, 204(1):147-158
- [29] Kim A, Ishizuka I E, Hartman I Z, Poluektov Y, Narayan K, Sadegh-Nasseri S. Studying MHC class II peptide loading and editing in vitro [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 960:447-459
- [30] Sturm T, Sautter B, Wörner T P, Stevanović S, Rammensee H G, Planz O, Heck A J R, Aebersold R. Mild acid elution and MHC immunoaffinity chromatography reveal similar albeit not identical profiles of the HLA class I immunopeptidome [J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(1):289-304
- [31] Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan M J, Loch C, Menozzi F D. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination [J]. *Nature*, 2001, 412(6843):190-194
- [32] Lei Y, Shao J J, Ma F F, Lei C L, Chang H Y, Zhang Y G. Enhanced efficacy of a multi-epitope vaccine for type A and O foot-and-mouth disease virus by fusing multiple epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin (HBHA), a novel TLR4 agonist [J]. *Molecular Immunology*, 2020, 121:118-126
- [33] Yazdani Z, Rafiei A, Irannejad H, Yazdani M, Valadan R. Designing a novel multiepitope peptide vaccine against melanoma using immunoinformatics approach [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2022, 40(7):3312-3324
- [34] Rahimnahl S, Yousefzadeh S, Mohammadi Y. Novel multi-epitope vaccine against bovine brucellosis: Approach from immunoinformatics to expression [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2023, 41(24):15460-15484
- [35] Wang Y L, Li H H, Xu Z Y, Yi J H, Li W, Meng C, Zhang H, Deng X Y, Ma Z C, Wang Y, Chen C F. Exosomes released by brucella-infected macrophages inhibit the intracellular survival of brucella by promoting the polarization of M1 macrophages [J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16(7):1524-1535
- [36] Wu A D, Wang Y L, Ali A, Xu Z Y, Zhang D S, Zhumanov K, Sheng J L, Yi J H. Design of a multi-epitope vaccine against brucellosis fused to IgG-fc by an immunoinformatics approach [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10:1238634
- [37] Li Z Q, Wang S L, Wei S J, Yang G L, Zhang C M, Xi L, Zhang J L, Cui Y Y, Hao J F, Zhang H, Zhang H. Immunization with a combination of recombinant proteins induces T helper immune response and confers protection against wild-type challenge in BALB/C mice [J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(6):1811-1823

责任编辑：秦梅



**第一作者简介：**梁瑞英，中共党员，博士研究生，副研究员，主要从事动物疫病病原学、免疫学、诊断和分子流行病学、重要免疫分子结构生物学研究。研究重点动物重要传染病的致病机理，病原与免疫系统相互作用关系，快速诊断试剂研发，抗体和疫苗研发。主要研究方向包括布鲁氏菌、宠物冠状病毒等重要传染病。利用分子生物学、免疫学和结构生物学的最新手段，最大限度诱导动物机体产生保护性免疫反应，提高疫苗安全性和保护性。主持国家自然科学基金项目、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金等项目4项，发表论文30余篇，其中SCI论文20余篇；授权国家发明专利7件。



**通讯作者简介：**丁家波，中共党员，博士研究生，研究员，专注于人畜共患病防控技术与兽医生物制品开发。突破了布鲁氏菌病检测的关键技术，提供了精准诊断方案。担任中国微生物学会常务理事，副秘书长；中国微生物学会兽医微生物学专业委员会主任委员；全国动物标准化委员会委员；全国动物防疫专家委员会委员；农业农村部第七届新兽药评审专家库专家；农业农村部第六届中国兽药典委员会委员；《微生物学通报》副主编；*Frontier*子刊 *Veterinary Bacterials Zoonoses* 栏目主编；扬州大学\吉林农业大学兼职教授。荣获国务院特殊津贴、中国青年科技奖、全国农业科研杰出人才、科技部中青年科技创新领军人才、国家高层次人才特殊支持计划科技领军人才、全国农业先进个人、农业部十佳青年、全国农业先进工作者等。主持国家重点研发计划发表学术论文200余篇，其中SCI论文49篇，授权国家发明专利13件（第一发明人），主编中英文专著3部。