

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2020.03.001

• 特约专稿 •

鼠疫疫苗研究的现状与展望

魏东,赵爱华,王国治,徐苗

中国食品药品检定研究院结核病和过敏原产品室, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,
北京 102629

摘要:鼠疫(plague)是由鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, *Y. pestis*)(简称鼠疫菌)引起的一种烈性传染病,属甲类传染病,具有高度传染性和致病性。在过去的鼠疫大流行中有近2亿感染者死亡。疫苗接种是疾病预防控制的重要方法。现就鼠疫疫苗的研究进展作一综述,为新疫苗的研制提供参考。

关键词:鼠疫;鼠疫耶尔森菌;疫苗;抗原

中图分类号: R183.9

文献标识码: A

Current research and prospects of plague vaccine

WEI Dong, ZHAO Aihua, WANG Guozhi, XU Miao

Division of Tuberculosis Vaccines and Allergen, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China

Abstract: Plague is a category A infectious disease caused by *Yersinia pestis*, which is highly infectious and pathogenic. Three great plague pandemics resulted in nearly 200 million deaths in human history. Prophylactic vaccination is an important method of disease prevention and control. In this review, we summarize the current advances in research and development of plague vaccines and provide a reference for the study of new vaccines.

Keywords: Plague; *Yersinia pestis*; Vaccine; Antigens

鼠疫(plague)是由鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, *Y. pestis*)(简称鼠疫菌)引起的一种烈性传染病,属国际检疫传染病,也是我国法定传染病中的甲类传染病。鼠疫为自然疫源性传染病,原发于啮齿动物(鼠间鼠疫),并能引起人间流行(人间鼠疫,简称鼠疫)。鼠疫的传染源主要是啮齿动物,传播媒介主要是鼠蚤。人间鼠疫包括腺鼠疫、败血型鼠疫及肺鼠疫3种形式。腺鼠疫由经感染的鼠蚤叮咬而发病,如未及时治疗会引起败血型鼠疫及继发性肺

鼠疫,肺鼠疫可通过气溶胶在人与人之间传播,引起原发性肺鼠疫的流行。抗生素能有效治疗腺鼠疫,但由于肺鼠疫和败血型鼠疫病情进展迅速,即使使用抗生素,患者仍有较高的病死率。历史上3次鼠疫大流行中有近2亿感染者死亡。现在人间鼠疫已不多见,但鼠间鼠疫还很猖獗^[1]。世界范围内鼠疫自然疫源地并未缩小,加上经济差异造成各国卫生条件参差不齐,因此不能排除局部地区暴发鼠疫的可能性^[2]。2017年,非洲马达加斯加暴发了严重鼠

基金项目:重大新药创制国家科技重大专项(2014ZX09304311-002)

通信作者:徐苗

Correspondence to: XU Miao E-mail: xumiaobj@126.com

疫疫情,8月1日—11月26日共感染2417人,77%为肺鼠疫^[3-4]。

鼠疫菌具有内在遗传可塑性^[5],可以获得耐药性^[6-11],也可作为一种致死性生物武器,其危害性不可估量^[12-14]。

我国于1954年从苏联引进鼠疫减毒活疫苗,经皮下注射免疫。但由于不良反应严重,于1960年起改为皮上划痕接种,一直沿用至今。该疫苗在鼠疫的预防控制中发挥了重要作用,但皮上划痕接种操作复杂,不能准确定量。而且紧急状况下暴露的高危人群可能会服用抗生素进行预防性治疗,如果此时给予活疫苗接种,很可能造成接种无效。所以现用活疫苗可能无法满足紧急状态下高危人群实施预防的需要。因此,需要研制安全、有效的鼠疫疫苗。

本文就鼠疫灭活疫苗、减毒活疫苗、活载体疫苗、亚单位疫苗和DNA疫苗的研究进展进行论述。

1 灭活疫苗

鼠疫全菌体灭活疫苗为美国从1942年开始生产〔killed plague vaccine(USP)〕,即由鼠疫菌195/P强毒株经甲醛灭活处理制备而成。该疫苗有效性的间接证据是在越南战争中预防了美军士兵腺鼠疫的发生^[15]。但该灭活疫苗不良反应较大,而且对肺鼠疫无预防作用^[16],1999年美国停用了该疫苗^[17]。

Baca-Estrada等将全菌体灭活疫苗与脂质体配伍后经鼻腔免疫小鼠,并与单纯的全菌体灭活疫苗进行比较,结果显示新疫苗能显著提高肺部的黏膜免疫应答,脾脏淋巴细胞的抗原特异性增殖反应和γ干扰素(interferon γ, IFN-γ)分泌细胞均有显著增加。新疫苗对经鼻腔攻击的免疫小鼠具有明显的保护作用^[18]。

2 减毒活疫苗

1929年Girard和Robic在马达加斯加从一名鼠疫患者分离到一株鼠疫菌,在16~20℃中传代培养5年后获得减毒EV株。1936年苏联开始使用该减毒株作为疫苗,现在许多前苏联国家、中国及蒙古等一直使用EV株减毒活疫苗^[19-20]。

Russell等将USP灭活疫苗与EV76减毒活疫苗的保护效果进行了比较,经EV76疫苗免疫的小鼠可抵抗皮下和鼻腔的攻击^[16]。Zauberman等对EV76减毒活疫苗是否能够诱导产生快速的保护效果开展了相应研究。用100个半数致死量(median

lethal dose, LD₅₀)的鼠疫菌强毒KIM53株皮下感染C57BL/6小鼠,然后,以10⁷菌落形成单位(colony-forming units, CFU)的鼠疫EV76减毒活疫苗立即进行皮下免疫,保护率为91%;但如果在感染5 h后进行免疫,保护率仅为34%。在肺鼠疫的保护效果评价中,C57BL/6小鼠皮下免疫10⁷CFU的鼠疫EV76减毒活疫苗,然后立即或免疫后第2天用10 LD₅₀的鼠疫菌强毒KIM53株滴鼻感染。结果发现,免疫后立即感染的小鼠,存活时间延长了3~6.8 d,最后全部死亡;免疫后第2天感染的小鼠,存活率为60%^[21]。

虽然减毒活疫苗具有较好的保护效果,但疫苗的安全性问题限制了它的广泛使用。近年来,分子生物学技术被广泛用于鼠疫减毒活疫苗的研制。脂多糖在鼠疫菌的免疫逃避中起重要作用,鼠疫菌在28℃培养条件下产生六酰化脂质A,但在人体内仅产生四酰化脂质A。由于四酰化脂质A不能活化Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR-4),使鼠疫菌容易侵犯宿主的天然免疫系统^[22]。Feodorova等将鼠疫菌EV株编码酰基转移酶的lpxM基因敲除,改造后的鼠疫菌能产生毒力较弱的五酰化脂质A,其可对小鼠和豚鼠提供较好的保护作用^[23-24]。

此外,也有研究者用其他的鼠疫菌株进行基因改造来构建减毒活疫苗。Sun等利用鼠疫菌KIM5⁺株构建了一株突变菌株(即χ10017(pCD1Ap)株),该菌株为阿拉伯糖依赖性调控表达cAMP受体蛋白基因(cAMP receptor protein, crp)的鼠疫菌,crp基因能够调节37种基因的表达。突变菌株在含有阿拉伯糖的培养基中能表达crp基因,但接种体内后因无法获得阿拉伯糖,crp基因表达终止。野生型鼠疫菌KIM5⁺株皮下途径接种的毒力水平是突变菌株的10 000倍。用该菌株经皮下免疫小鼠,其保护率在抗鼠疫菌强毒株皮下感染中为100%,在抗滴鼻感染中为70%^[25]。

Montminy等报道,表达大肠埃希菌后期酰基转移酶编码基因lpxL的鼠疫菌在37℃条件下产生能活化TLR-4的六酰化脂质A,细菌毒力明显降低^[26]。在该研究基础上,Sun等将大肠埃希菌lpxL基因整合到先前构建的鼠疫菌χ10017(pCD1Ap)株基因组中,构建了χ10030(pCD1Ap)株鼠疫菌。该菌株在37℃条件下能产生六酰化脂质A,同时携带受阿拉伯糖调控的crp基因。在小鼠模型中,其原始菌株经皮下及滴鼻接种途径的毒力水平分别是新构建菌株的1.5×10⁷倍和3.4×10⁴倍。鼠疫菌

χ10030(pCD1Ap)株经皮下及滴鼻免疫小鼠后均能产生抗腺鼠疫及肺鼠疫的良好保护效果,而且疫苗接种的不良反应小。但该构建鼠疫菌株仍能在接种早期诱导产生白细胞介素 10 (interleukin 10, IL-10), 研究者认为应继续对该鼠疫菌进行减毒, 使其在接种早期不再诱导产生 IL-10, 以进一步提高疫苗的安全性^[27]。

3 活载体疫苗

Boyer 等构建了由鼠疫菌 F1 荚膜抗原 (F1 capsular antigen, F1) 及低钙反应抗原 (low calcium response V antigen, LcrV 或 V) 分别与衣壳蛋白 pIX 融合表达的重组复制缺陷 5 型腺病毒 (human type 5 adenovirus, Ad5) 疫苗。小鼠肌内注射重组腺病毒疫苗后, 用鼠疫强毒株滴鼻感染, 经 2 次免疫的保护效果明显好于单次免疫, 而且其保护效果明显好于相应单独的 F1 或 LcrV 抗原免疫^[28]。Sha 等以复制缺陷的 Ad5 为载体, 分别构建了表达 LcrV 抗原或鼠疫菌外膜蛋白分泌蛋白 F (Yop secretion protein F, YscF)、F1、LcrV 3 种融合抗原的重组腺病毒 rAd5-LcrV 和 rAd5-YFV, rAd5-YFV 的保护效果显著好于 rAd5-LcrV。在小鼠模型中, rAd5-YFV 皮下免疫及滴鼻免疫对于抗鼠疫强毒株皮下感染均有较好的保护效果; 对滴鼻感染, 仅滴鼻免疫具有较好的保护效果。在食蟹猴模型中, Ad5-YFV 滴鼻免疫在抗鼠疫强毒株呼吸道感染中的保护率为 80%, 如用 YscF-F1-LcrV 融合蛋白进行加强免疫后, 保护率可达 100%。在 2 种动物模型中, 免疫前动物体内存在的腺病毒抗体不会影响疫苗的保护效果^[29]。

草原犬鼠对鼠疫菌高度敏感, 是北美地区鼠疫的潜在传染源。Rocke 等构建了表达鼠疫菌 F1 抗原和 LcrV 抗原的痘病毒, 并作为诱饵疫苗用于草原犬鼠的鼠疫防治。首先将重组的痘病毒经肌内注射免疫小鼠, 初次免疫 4 周后加强免疫一次, 加强免疫后第 56 天用鼠疫强毒株皮内注射感染, 其中表达 F1-LcrV 融合抗原的痘病毒疫苗保护率为 67%, 而分别表达 F1 抗原和 LcrV 抗原的联合痘病毒疫苗保护率仅为 33%。随后对目标动物——草原犬鼠开展了免疫效果评价, 将表达 F1-LcrV 融合抗原的痘病毒疫苗分为单次和两次食物诱饵免疫(第 0 和 240 天), 第 270 天进行皮下注射感染, 单次免疫及两次免疫动物的存活率分别为 60% 和 85%^[30]。近期, 该疫苗的田间试

验研究结果表明, 在确定发生过鼠疫的地区, 诱饵疫苗免疫过的草原犬鼠存活率要高于未免疫过的动物^[31-32]。

Sanapala 等构建了表达鼠疫菌 LcrV196 (131~326 位氨基酸)、Psn 及 F1 抗原的减毒鼠伤寒沙门菌。这些外源蛋白的表达对细菌的生长未见不良影响。小鼠分别在 0 d 和 10 d 口服 10⁹ CFU 该疫苗, 能诱导产生较高的特异性抗体。末次免疫 4 周后, 分别皮下感染 5 700 CFU (约 570 LD₅₀) 和滴鼻感染 5 000 CFU (约 50 LD₅₀) 的鼠疫菌 CO92 强毒株, 保护率分别为 100% 和 60%^[33]。

Jia 等分别构建了由 ΔcapB 基因缺失的土拉热弗朗西斯菌活疫苗株 (live vaccine strain, LVS) LVSΔcapB 和减毒的产单核细胞李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, Lm) 作为载体表达鼠疫菌 F1 和 LcrV 融合抗原、炭疽芽胞杆菌致死因子 (lethal factor, LF) 及保护性抗原 (protective antigen, PA) 融合抗原。在对表达炭疽 LF-PA 融合抗原的 2 种重组活载体疫苗 rLVS ΔcapB/Ba 和 rLm/Ba 的保护效果评价中, 无论初次免疫及加强免疫均使用同种载体疫苗, 还是初次免疫使用 rLVS ΔcapB/Ba 疫苗、加强免疫使用 rLm/Ba 疫苗, 免疫后对强毒的炭疽芽胞杆菌呼吸道攻击都具有较好的保护效果, 而且新构建疫苗的保护效果均明显好于人用炭疽吸附疫苗 (anthrax vaccine adsorbed, AVA)。在对表达鼠疫 F1-LcrV 融合抗原的 2 种重组活载体疫苗 rLVS ΔcapB/Yp 和 rLm/Yp 的保护效果评价中, 无论初次免疫及加强免疫均使用同种载体疫苗, 还是初次免疫使用 rLVS ΔcapB/Yp 疫苗、加强免疫使用 rLm/Yp 疫苗, 对肺鼠疫的保护率均 <50%, 而 EV76 对照疫苗单次免疫保护率为 100%。用之前构建的表达土拉热弗朗西斯菌 3 种毒力岛蛋白 Igla、Iglb、Iglc 融合抗原的 LVSΔcapB 载体疫苗 rLVS ΔcapB/iglABC 及 LVSΔcapB 空载体本身进行单次免疫, 抗土拉热弗朗西斯菌的保护效果均不及 LVS 疫苗, 但加强免疫后保护效果接近或好于单次免疫的 LVS 疫苗^[34]。

假结核耶尔森菌和鼠疫菌同为耶尔森菌属, 其基因组的同源性超过 95%。因此, 有研究者将减毒的假结核耶尔森菌用于鼠疫的预防。Blisnick 等用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 从 41 株假结核耶尔森菌中筛选出 1 株无强毒力岛的 IP32680 菌株。小鼠经灌胃免疫该菌株后用鼠疫菌

CO92 株皮下感染,动物存活率为 75%,而 EV76 对照疫苗的存活率仅为 50%^[35]。

除了直接筛选无毒的假结核耶尔森菌外,还有研究者如 Singh 等,用重组技术构建了 1 株假结核耶尔森菌 χ 10069 重组株。将该菌株的 $\Delta yopK$ 、 $\Delta yopJ$ 和 Δasd 3 个基因进行突变,同时表达鼠疫菌外膜蛋白 E (*Yersinia outer protein E*, YopE) 和 LcrV 前 138 个氨基酸的融合抗原,其在动物体内无毒力表现。小鼠单次经口服免疫,在抗腺鼠疫和肺鼠疫中的保护率分别为 80% 和 90%,而且对致死剂量的小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌的攻击均具有完全保护作用^[36]。也有研究者构建了表达鼠疫菌 F1 抗原的减毒假结核耶尔森菌,该疫苗给小鼠单次口服后有较好的抗腺鼠疫和肺鼠疫的保护效果,同时也能在抗 F1 抗原阴性鼠疫菌中具有完全的保护作用^[37]。

4 亚单位疫苗

近年来,鼠疫亚单位疫苗一直是研究的热点。由 F1 抗原和 V 抗原构成的双组分疫苗或 F1-V 融合抗原疫苗是当前鼠疫亚单位疫苗的主要形式。在小鼠、大鼠、豚鼠、雪貂、食蟹猴等多种动物模型中,该类疫苗在抗腺鼠疫及肺鼠疫中均具有很好的保护效果^[38-45]。

为提高鼠疫疫苗的免疫原性,许多研究者开展了相关佐剂的研究。Tao 等将 F1 抗原进行了突变使其不形成多聚体,突变的 F1 抗原与 V 抗原组成的融合抗原具有良好的可溶性,将该融合抗原与 T4 噬菌体结合形成纳米颗粒疫苗。该疫苗具有较好的免疫原性,在小鼠和大鼠模型中抗肺鼠疫的保护率均为 100%^[46]。SA-4-1BBL 是 4-1BB 共刺激分子的重组激动剂,以 SA-4-1BBL 为佐剂的 rF1-V 融合抗原疫苗能诱导 Th1 型细胞免疫应答。以 SA-4-1BBL 和铝为复合佐剂的 rF1-V 融合抗原疫苗抗鼠疫菌感染的保护效果要好于单一佐剂疫苗。研究者推测这可能是因为 2 种佐剂能诱导产生更加平衡的 Th1 型细胞免疫应答与体液免疫应答^[47]。

Moore 等研制了一种新型鼠疫疫苗 VypVaxDuo,它由重组的 F1 抗原与 V 抗原组成,设计了不同剂型。该疫苗的免疫方式为经皮下注射初次免疫和口服加强免疫。口服免疫后第 25 天,用 2×10^4 LD₅₀ 鼠疫菌感染,小鼠能够获得完全保护。双途径免疫的疫苗能够诱导产生针对 F1 抗原和 V 抗原的血清免疫球蛋白 G (immunoglobulin G,

IgG) 抗体以及血清和粪便中免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 抗体。设计该疫苗的思路是使其适于中低收入的偏远鼠疫疫源地人群使用,初次免疫要在医疗机构进行注射免疫,口服加强免疫可以自我给药^[48]。

Frey 等已经完成了由鞭毛抗原、F1 抗原和 V 抗原组成的融合抗原鼠疫疫苗 Flagellin/F1/V 的 I 期临床研究,受试者为 60 名 8~45 岁健康人群。0、28 d 各免疫一次,分别设置了 1 μ g、3 μ g、6 μ g 或 10 μ g 抗原剂量组。免疫后未出现严重不良反应,能产生 F1、V 及鞭毛抗原的特异性抗体,具有较好的量效关系。但免疫后未检测到细胞免疫应答,且加强免疫后鞭毛抗原的特异性 IgG 抗体效价未见明显增长,研究者认为可能与免疫剂量略低有关^[49]。

国内有单位研制由天然提取的 F1 抗原和重组 V 抗原组成的鼠疫疫苗,已经完成 II a 期临床研究。受试者为 240 名 18~55 岁健康人,分为 15 μ g 及 30 μ g 抗原 2 个免疫剂量组。第 0、28 天各免疫一次,免疫后均未出现严重不良反应。F1 抗体在免疫后 6 个月达到高峰,免疫后 12 个月抗体水平仍高于第 56 天。免疫后 6 个月及 12 个月,30 μ g 剂量组的 F1 抗体水平显著高于 15 μ g 剂量组。V 抗体在免疫后 6 个月显著降低,2 个剂量组的抗体水平及阳转率无显著差异^[50]。焦等对该鼠疫疫苗 II a 期临床血清被动保护力水平与抗体效价的相关性进行分析。将 BALB/c 小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,其中 5 组为不同效价 F1 抗体和 V 抗体血清免疫组,另一组为阴性对照。血清注射 3 h 后,各实验组分别用 6 个最小致死量(minimum lethal dose, MLD) 的强毒鼠疫菌 141 株皮下攻击,对照组用 2 个 MLD 攻击。结果表明,血清可对小鼠提供被动保护,而且保护率与 F1、V 抗体效价有显著相关性^[51]。

5 DNA 疫苗

大量研究表明 DNA 疫苗免疫后可产生保护性免疫应答。DNA 疫苗有许多优点,如疫苗较易构建、生产成本低、疫苗稳定性好、能同时诱导产生体液和细胞免疫等。

Wang 等将 V 抗原基因进行修饰后与人组织纤维蛋白溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA) 的信号肽序列结合,制备了 DNA 疫苗(tRA-V)。该疫苗能诱导 BALB/c 小鼠产生高效价的抗 V 抗体,经免疫后的小鼠能抵抗鼠疫强毒

株经鼻腔的攻击。与之相比,表达原始 V 抗原的 DNA 疫苗保护率较低。经 tPA-V 免疫的小鼠可产生抗 V 抗原的高效价 IgG2a 抗体,说明诱导了 Th1 型细胞免疫反应^[52]。

Li 等^[53]构建了表达鼠疫菌 V 抗原的 DNA 疫苗,评价了 DNA 疫苗及重组 V 抗原疫苗免疫小鼠所产生的特异性 B 细胞应答水平。根据初次免疫-加强免疫所用疫苗种类分别设置了 DNA-DNA 疫苗组、重组 V 抗原-重组 V 抗原疫苗组以及 DNA-重组 V 抗原疫苗组,所有组别小鼠第 0 周初次免疫、第 4 周加强免疫。加强免疫 3 个月后,从小鼠中分离脾脏细胞。经重组 V 抗原刺激后,用 酶联免疫斑点实验 (enzyme linked immunospot assay, ELISPOT) 检测脾脏细胞中特异性抗体分泌 B 细胞水平。结果表明,DNA 疫苗初次免疫后重组 V 抗原加强免疫组的脾脏特异性抗体分泌 B 细胞水平高于其他组,能诱导较强的特异性 B 细胞应答。

Albrecht 等分别将炭疽芽孢杆菌 PA、鼠疫菌 V 和 F1 基因克隆到 pVAX1 质粒,构建了 3 种 DNA 疫苗。将 3 种 DNA 疫苗单独或联合免疫小鼠,单独免疫产生的特异性 IgG 抗体水平高于联合免疫。pVAX-PA 疫苗单独或与鼠疫疫苗联合免疫,在抗炭疽芽孢杆菌感染中均具有完全保护作用。pVAX-V 和 pVAX-F1 联合免疫具有协同作用,在抗鼠疫菌感染中的保护率要高于单独免疫或与 pVAX-PA 疫苗联合免疫^[54]。

6 结语

当前,进入临床研究阶段的疫苗主要是由鼠疫菌 F1 和 V 抗原组成的亚单位疫苗。虽然亚单位疫苗在除非洲绿猴外的各种动物模型中有较好的保护效果,但对人的保护效果还需要进一步综合评估^[42]。这些疫苗主要诱导体液免疫应答,难以产生细胞免疫应答^[49,55]。随着对鼠疫疫苗机制的深入研究,新一代的疫苗将不但能诱导体液免疫,还应能诱导细胞免疫^[56-57]。

生物技术快速发展,如果该技术被用于鼠疫菌的基因改造,很可能制造出某些抗原(如 F1 抗原)的缺失或某些抗原(如 V 抗原)被重新编辑的鼠疫强毒株。这将使现有的以 F1 和 V 抗原为主要成分的亚单位疫苗无法预防这类经改造过的鼠疫菌所致的感染,但鼠疫减毒活疫苗恰能弥补这一缺陷。虽然鼠疫减毒活疫苗具有一定的残余毒力,但它含有多种抗原成分,理论上具有更广的保护范围,特别是

经基因改造后进一步减毒的活疫苗将是一种极具希望的候选疫苗。此外,在重组蛋白基础上补充天然组分共同组成复合疫苗以提高抗原谱可能也是新疫苗的一个研究方向。DNA 疫苗及活载体疫苗,特别是口服免疫疫苗也将是有潜力的下一代鼠疫疫苗。

国内新研制的鼠疫疫苗已经完成 II a 期临床研究,有望成为新一代鼠疫疫苗。现有研究表明,初次免疫和加强免疫使用不同种类疫苗的保护效果要好于同种疫苗免疫^[58-59]。结合我国鼠疫疫苗现状,对高危人群也可考虑使用鼠疫活疫苗进行基础免疫,然后用亚单位疫苗加强免疫,或许这也是一种有效方式。

综上所述,目前虽然世界上鼠疫发病率很低,但其有广泛的疫源地难以在短期内被彻底消灭,仍是一个危害人类的重要致病因素,且具有潜在的散播流行特性。另外,为应对生物恐怖和细菌战争威胁之需,研究预防鼠疫的安全、有效疫苗实属当务之急。

参考文献

- [1] Perry RD, Fetherston JD. Yersinia pestis-etiologic agent of plague [J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(1): 35-66.
- [2] Mead P. Epidemics of plague past, present, and future [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(5): 459-460.
- [3] Mead PS. Plague in Madagascar - a tragic opportunity for improving public health [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 106-108.
- [4] Tsuzuki S, Lee H, Miura F, Chan YH, Jung SM, Akhmetzhanov AR, Nishiura H. Dynamics of the pneumonic plague epidemic in Madagascar, August to October 2017 [J/OL]. Euro Surveill, 2017, 22 (46). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.46.17-00710>.
- [5] Radnedge L, Agron PG, Worsham PL, Andersen GL. Genome plasticity in Yersinia pestis [J]. Microbiology, 2002, 148 (Pt 6): 1687-1698.
- [6] Filippov AA, Sergueev KV, Nikolich MP. Can phage effectively treat multidrug-resistant plague? [J]. Bacteriophage, 2012, 2(3): 186-189.
- [7] 张贵军, 贵军, 刘振才. 鼠疫菌的耐药趋势及抗生素应用研究概况 [J]. 中国地方病防治杂志, 2004, 19(1): 23-25.
- [8] Guiyoule A, Gerbaud G, Buchrieser C, Galimand M, Rahalison L, Chanteau S, Courvalin P, Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of Yersinia pestis [J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7 (1): 43-48.
- [9] Galimand M, Carniel E, Courvalin P. Resistance of Yersinia pestis to antimicrobial agents [J]. Antimicrob

- Agents Chemother, 2006, 50(10): 3233-3236.
- [10] Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, Rahalison L, Leclerc JE, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk [J]. PLoS One, 2007, 2 (3): e309. doi: 10.1371/journal.pone.0000309.
- [11] Cabanel N, Bouchier C, Rajerison M, Carniel E. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a *Yersinia pestis* strain isolated from a rat [J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 51 (2): 249-254.
- [12] Zilinskas RA. The anti-plague system and the Soviet biological warfare program [J]. Crit Rev Microbiol, 2006, 32(1): 47-64.
- [13] Carus WS. The history of biological weapons use: what we know and what we don't [J]. Health Secur, 2015, 13(4): 219-255.
- [14] 杨彦君. 日本细菌战准备阶段的细菌实验—基于《陆军军医学校防疫研究报告Ⅱ部》的研究 [J]. 医学与哲学, 2017, 38 (7): 82-85.
- [15] Cavanaugh DC, Elisberg BL, Llewellyn CH, Marshall JD Jr, Rust JH Jr, Williams JE, Meyer KF. Plague immunization. V. Indirect evidence for the efficacy of plague vaccine [J]. J Infect Dis, 1974, 129 (Suppl 1): S37-S40.
- [16] Russell P, Eley SM, Hibbs SE, Manchee RJ, Stagg AJ, Titball RW. A comparison of Plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model [J]. Vaccine, 1995, 13(16): 1551-1556.
- [17] Morris SR. Development of a recombinant vaccine against aerosolized plague [J]. Vaccine, 2007, 25 (16): 3115-3117.
- [18] Baca-Estrada ME, Foldvari MM, Snider MM, Harding KK, Kournikakis BB, Babiuk LA, Griebel PP. Intranasal immunization with liposome-formulated *Yersinia pestis* vaccine enhances mucosal immune responses [J]. Vaccine, 2000, 18(21): 2203-2211.
- [19] Feodorova VA, Sayapina LV, Corbel MJ, Motin VL. Russian vaccines against especially dangerous bacterial pathogens [J]. Emerg Microbes Infect, 2014, 3(12): e86. doi: 10.1038/emi.2014.82.
- [20] Titball RW, Williamson ED. *Yersinia pestis* (plague) vaccines [J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(6): 965-973.
- [21] Zaiberman A, Vagima Y, Tidhar A, Aftalion M, Gur D, Rotem S, Chitlaru T, Levy Y, Mamroud E. Host iron nutritional immunity induced by a live *Yersinia pestis* vaccine strain is associated with immediate protection against plague [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 277. doi: 10.3389/fcimb.2017.00277.
- [22] Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (5): 2163-2167.
- [23] Feodorova VA, Pan'kina LN, Savostina EP, Sayapina LV, Motin VL, Dentovskaya SV, Shaikhutdinova RZ, Ivanov SA, Lindner B, Kondakova AN, Bystrova OV, Kocharova NA, Senchenkova SN, Holst O, Pier GB, Knirel YA, Anisimov AP. A *Yersinia pestis* lpxM-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs [J]. Vaccine, 2007, 25 (44): 7620-7628.
- [24] Feodorova VA, Pan'kina LN, Savostina EP, Kuznetsov OS, Konnov NP, Sayapina LV, Dentovskaya SV, Shaikhutdinova RZ, Ageev SA, Lindner B, Kondakova AN, Bystrova OV, Kocharova NA, Senchenkova SN, Holst O, Pier GB, Knirel YA, Anisimov AP, Motin VL. Pleiotropic effects of the lpxM mutation in *Yersinia pestis* resulting in modification of the biosynthesis of major immunoreactive antigens [J]. Vaccine, 2009, 27 (16): 2240-2250.
- [25] Sun W, Roland KL, Kuang X, Branger CG, Curtiss R 3rd. *Yersinia pestis* with regulated delayed attenuation as a vaccine candidate to induce protective immunity against plague [J]. Infect Immun, 2010, 78(3): 1304-1313.
- [26] Montminy SW, Khan N, McGrath S, Walkowicz MJ, Sharp F, Conlon JE, Fukase K, Kusumoto S, Sweet C, Miyake K, Akira S, Cotter RJ, Goguen JD, Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response [J]. Nat Immunol, 2006, 7 (10): 1066-1073.
- [27] Sun W, Six D, Kuang X, Roland KL, Raetz CR, Curtiss R 3rd. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* KIM as a vaccine against plague [J]. Vaccine, 2011, 29 (16): 2986-2998.
- [28] Boyer JL, Sofer-Podesta C, Ang J, Hackett NR, Chiuchiolo MJ, Senina S, Perlin D, Crystal RG. Protective immunity against a lethal respiratory *Yersinia pestis* challenge induced by V antigen or the F1 capsular antigen incorporated into adenovirus capsid [J]. Hum Gene Ther, 2010, 21 (7): 891-901.
- [29] Sha J, Kirtley ML, Klages C, Erova TE, Telepnev M, Ponnusamy D, Fitts EC, Baze WB, Sivasubramani SK, Lawrence WS, Patrikeev I, Peel JE, Andersson JA, Kozlova EV, Tiner BL, Peterson JW, McWilliams D, Patel S, Rothe E, Motin VL, Chopra AK. A replication-defective human type 5 adenovirus-based trivalent vaccine confers complete protection against plague in mice and nonhuman primates [J]. Clin Vaccine Immunol, 2016, 23 (7): 586-600.
- [30] Rocke TE, Kingstad-Bakke B, Berlier W, Osorio JE. A recombinant raccoon poxvirus vaccine expressing both *Yersinia pestis* F1 and truncated V antigens protects animals against lethal plague [J]. Vaccines (Basel), 2014, 2 (4): 772-784.

- [31] Rocke TE, Tripp DW, Russell RE, Abbott RC, Richgels KLD Matchett MR, Biggins DE, Griebel R, Schroeder G, Grassel SM, Pipkin DR, Cordova J, Kavalunas A, Maxfield B, Boulerice J, Miller MW. Sylvatic plague vaccine partially protects Prairie dogs (*Cynomys spp.*) in field trials [J]. *Ecohealth*, 2017, 14 (3): 438-450.
- [32] Tripp DW, Rocke TE, Runge JP, Abbott RC, Miller MW. Burrow dusting or oral vaccination prevents plague-associated prairie dog colony collapse [J]. *Ecohealth*, 2017, 14 (3): 451-462.
- [33] Sanapala S, Rahav H, Patel H, Sun W, Curtiss R. Multiple antigens of *Yersinia pestis* delivered by live recombinant attenuated *Salmonella* vaccine strains elicit protective immunity against plague [J]. *Vaccine*, 2016, 34 (21): 2410-2416.
- [34] Jia Q, Bowen R, Dillon BJ, Masleša-Galić S, Chang BT, Kaidi AC, Horwitz MA. Single vector platform vaccine protects against lethal respiratory challenge with Tier 1 select agents of anthrax, plague, and tularemia [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7009. doi: 10.1038/s41598-018-24581-y.
- [35] Blisnick T, Ave P, Huerre M, Carniel E, Demeure CE. Oral vaccination against bubonic plague using a live avirulent *Yersinia pseudotuberculosis* strain [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(8): 3808-3816.
- [36] Singh AK, Curtiss R 3rd, Sun W. A recombinant attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine delivering a *Y. pestis* YopE_{nt138}-LcrV fusion elicits broad protection against plague and Yersiniosis in mice [J]. *Infect Immun*, 2019, 87(10): e00296-19. doi: 10.1128/IAI.00296-19.
- [37] Demeure CE, Derbise A, Carniel E. Oral vaccination against plague using *Yersinia pseudotuberculosis* [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 267: 89-95.
- [38] Williamson ED, Vesey PM, Gillhespy KJ, Eley SM, Green M, Titball RW. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 116(1): 107-114.
- [39] Glynn A, Freytag LC, Clements JD. Effect of homologous and heterologous prime-boost on the immune response to recombinant plague antigens [J]. *Vaccine*, 2005, 23(16): 1957-1965.
- [40] Jones SM, Griffin KF, Hodgson I, Williamson ED. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig [J]. *Vaccine*, 2003, 21(25-26): 3912-3918.
- [41] Rocke TE, Mencher J, Smith SR, Friedlander AM, Andrews GP, Baeten LA. Recombinant F1-V fusion protein protects black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) against virulent *Yersinia pestis* infection [J]. *J Zoo Wildl Med*, 2004, 35(2): 142-146.
- [42] Quenee LE, Ciletti NA, Elli D, Hermanas TM, Schneewind O. Prevention of pneumonic plague in mice, rats, guinea pigs and non-human primates with clinical grade rV10, rV10-2 or F1-V vaccines [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (38): 6572-6583.
- [43] Cornelius CA, Quenee LE, Overheim KA, Koster F, Brasel TL, Elli D, Ciletti NA, Schneewind O. Immunization with recombinant V10 protects cynomolgus macaques from lethal pneumonic plague [J]. *Infect Immun*, 2008, 76 (12): 5588-5597.
- [44] Williamson ED, Packer PJ, Waters EL, Simpson AJ, Dyer D, Hartings J, Twenhafel N, Pitt ML. Recombinant (F1 + V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (29-30): 4771-4777.
- [45] Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, Ervin S, Lees CJ, Lively MO, Hantgan RR, Thomas MJ, Wood J, Bell B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(1): 21-28.
- [46] Tao P, Mahalingam M, Kirtley ML, van Lier CJ, Sha J, Yeager LA, Chopra AK, Rao VB. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (7): e1003495. doi: 10.1371/journal.ppat.1003495.
- [47] Dinc G, Pennington JM, Yolcu ES, Lawrenz MB, Shirwan H. Improving the Th1 cellular efficacy of the lead *Yersinia pestis* rF1-V subunit vaccine using SA-4-1BBL as a novel adjuvant [J]. *Vaccine*, 2014, 32(39): 5035-5040.
- [48] Moore BD, New RRC, Butcher W, Mahood R, Steward J, Bayliss M, MacLeod C, Bogus M, Williamson ED. Dual route vaccination for plague with emergency use applications [J]. *Vaccine*, 2018, 36(34): 5210-5217.
- [49] Frey SE, Lottenbach K, Graham I, Anderson E, Bajwa K, May RC, Mizel SB, Graff A, Belshe RB. A phase I safety and immunogenicity dose escalation trial of plague vaccine, Flagellin/F1/V, in healthy adult volunteers (DMID 08-0066) [J]. *Vaccine*, 2017, 35(48 Pt B): 6759-6765.
- [50] Hu J, Jiao L, Hu Y, Chu K, Li J, Zhu F, Li T, Wu Z, Wei D, Meng F, Wang B. One year immunogenicity and safety of subunit plague vaccine in Chinese healthy adults: an extended open-label study [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(11): 2701-2705.
- [51] 焦磊, 吴智远, 王婷, 杨晓燕, 张婷婷, 高明, 张青雯, 祁芝珍, 王秉翔. 鼠疫疫苗Ⅱa期临床血清对小鼠的被动保护水平及其与抗体效价的相关性分析 [J]. 微生物学免疫学进展, 2017, 45(6): 9-12.
- [52] Wang S, Heilman D, Liu F, Giehl T, Joshi S, Huang X, Chou TH, Goguen J, Lu S. A DNA vaccine producing LcrV antigen in oligomers is effective in protecting mice from lethal mucosal challenge of plague [J]. *Vaccine*, 2004, 22 (25-26): 3348-3357.
- [53] Li W, Wang S, Lu S. Pilot study on the use of DNA priming immunization to enhance *Y. pestis* LcrV-specific B cell responses elicited by a recombinant LcrV protein vaccine

- [J]. Vaccines (Basel), 2014, 2(1): 36-48.
- [54] Albrecht MT, Livingston BD, Pesce JT, Bell MG, Hannaman D, Keane-Myers AM. Electroporation of a multivalent DNA vaccine cocktail elicits a protective immune response against anthrax and plague [J]. Vaccine, 2012, 30(32): 4872-4883.
- [55] Williamson ED, Flick-Smith HC, Lebott C, Rowland CA, Jones SM, Waters EL, Gwyther RJ, Miller J, Packer PJ, Irving M. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens [J]. Infect Immun, 2005, 73 (6): 3598-3608.
- [56] Parent MA, Berggren KN, Kummer LW, Wilhelm LB, Szaba FM, Mullarky IK, Smiley ST. Cell-mediated protection against pulmonary Yersinia pestis infection [J]. Infect Immun, 2005, 73(11): 7304-7310.
- [57] Philipovskiy AV, Smiley ST. Vaccination with live Yersinia pestis primes CD4 and CD8 T cells that synergistically protect against lethal pulmonary Y. pestis infection [J]. Infect Immun, 2007, 75(2): 878-885.
- [58] Lu S. Heterologous prime-boost vaccination [J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21 (3): 346-351.
- [59] Vordermeier HM, Rhodes SG, Dean G, Goonetilleke N, Huygen K, Hill AV, Hewinson RG, Gilbert SC. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guérin [J]. Immunology, 2004, 112 (3): 461-470.

(收稿日期: 2020-02-01)