

## 4 种立克次体病的疫苗研究进展\*

于永慧, 王 涛 综述, 宋立华<sup>△</sup> 审校

(病原微生物生物安全国家重点实验室/军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**关键词:** 立克次体; 流行性斑疹伤寒; 落基山斑点热; 恙虫病; Q 热; 疫苗**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.026**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)22-3162-03

立克次体是一大类专性真核细胞内寄生的原核微生物, 常呈多形性, 革兰阴性。根据第 2 版《伯杰氏系统细菌学手册》, 立克次体目分为 3 个科, 共 16 个属。多种立克次体是重要的人兽共患病原体, 广泛分布于世界各地。立克次体可通过媒介昆虫的叮咬、排泄物、气溶胶进行传播。由于与媒介生物联系密切, 此类传染病通常与战争、贫穷和落后卫生条件相关。随着经济的不断发展, 立克次体病在我国已大幅降低。现在, 立克次体病是一类新发突发传染病, 多种立克次体病如 Q 热、恙虫病等在多个地区仍是临床常见病, 有待引起更多重视。

立克次体病的防治除药物治疗、消除传染源和消灭传染媒介等措施外, 疫苗接种(特别是针对高危人群的免疫接种)也是重要手段。本文简要综述 4 种立克次体病(流行性斑疹伤寒、落基山斑点热、恙虫病和 Q 热)的疫苗研究现状。其中, 流行性斑疹伤寒在我国已基本灭绝, 落基山斑点热仅限于美洲地区, 这 2 种疾病与战争和生物恐怖关系密切, 在我国有新发或重新流行的可能。恙虫病和 Q 热是我国常见病。Q 热的病原体(贝氏柯克斯体)现已归类到军团菌目柯克斯体属, 但在我国传统上仍被称为 Q 热立克次体, Q 热仍然归类到立克次体病范畴。

## 1 流行性斑疹伤寒疫苗

流行性斑疹伤寒的病原体为普氏立克次体(Rp), 以人的体虱为病媒, 在人与人之间进行传播, 往往引起大流行。Rp 致病性强, 常与战争、贫穷、落后卫生条件相关, 是经典的生物战剂。该病主要症状和体征是发热、剧烈头痛和皮疹, 常见中耳炎、腮腺炎及细菌性肺炎等并发症<sup>[1]</sup>。随着杀虫剂的普及和卫生条件的提高, 该病在我国已基本灭绝, 但在世界贫穷落后地区仍然流行。

**1.1 灭活疫苗** 1930 年有学者研制流行性斑疹伤寒虱肠疫苗, 曾在第二次世界大战期间广泛应用, 能减轻症状、降低发病率, 但疫苗生产需要大量培养人虱, 具有一定危险性。1941 年改良了用小鼠肺制备伤寒疫苗的技术, 感染 Rp 的小鼠肺组织经过甲醛灭活、密度梯度离心分离得到疫苗。前苏联科学家应用此法生产疫苗, 但效果不理想, 疫苗尚不足以保护工作人员免于实验室内的接触感染。同期, 采用鸡胚卵黄囊培养 Rp 制成鸡胚疫苗的方法被众多国家采纳, 例如美国曾在第二次世界大战时期大量生产鸡胚疫苗。此种疫苗不能使人免于感染, 但能减轻症状、缩短病程、避免因病死<sup>[2]</sup>, 其在制备方法、立克

次体含量和效力测定标准、抗原成分等方面存在诸多问题, 之后被其他类型疫苗取代。

**1.2 减毒活疫苗** 研究者曾用牛胆汁制备莫氏立克次体(Rt)减毒苗, Rt 与 Rp 有相似性, Rt 免疫人群后能够激发广泛的免疫反应, 对流行性斑疹伤寒和地方性斑疹伤寒能产生交叉保护力, 但不同批次的疫苗功效差异大, 疫苗成分难以定量, 存在毒力恢复的情况<sup>[3]</sup>。第二次世界大战至 20 世纪 70 年代, Rp 减毒株(如 Madrid E 株)曾广泛应用。该减毒株由鸡胚传代强毒株 11 次后分离得到, 不产生内毒素, 对豚鼠和猴不致病且保持免疫原性。94% 的接种者在 14 个月内可免于流行性斑疹伤寒的自然感染。志愿者在接种后 3 年内接受强毒株攻毒, 96% 能够避免感染, 在接种后的 4~5 年内仍有 83% 具有保护力。但个别志愿者的接种部位出现红肿、淋巴结炎, 或出现低热、头痛等不良反应, 此反应有时为速发型, 有时为迟发型。20 世纪 70 年代, 研究者在豚鼠上分离到毒力恢复突变体, 该疫苗逐渐停止应用<sup>[4]</sup>。

**1.3 亚单位疫苗** 由于传统灭活疫苗和减毒活疫苗存在许多不足, 有学者提出利用可溶性表面蛋白与糖蛋白抗原研制亚单位疫苗, 这些可溶性抗原具有免疫原性与保护性。豚鼠实验表明, Rp 可溶性蛋白中的不耐热及种特异组分与保护性有关, 纯化的 Rt 种特异蛋白(不含脂多糖)成为伤寒疫苗的候选。动物实验表明, 纯化的 Rt 可溶性蛋白组分既能预防流行性斑疹伤寒, 也能预防地方性斑疹伤寒, 是一种复合型伤寒疫苗<sup>[5]</sup>。然而, 直接从 Rp 或 Rt 中大量提取种特异性抗原非常困难, 难以控制成本并进行标准化生产, 且危险性高。此外, 不正确的折叠和低甲基化会降低蛋白免疫原性。分子生物学技术出现后, 重组亚单位疫苗成为研究热点, 关注点主要集中在膜蛋白的克隆表达及在动物模型上重组亚单位疫苗的可行性<sup>[6]</sup>。

## 2 落基山斑点热疫苗

落基山斑点热的病原体为立氏立克次体(Rr), 由蜱传播。Rr 在斑点热群立克次体中感染性和致病力最强, 被列入生物战剂清单。落基山斑点热的特征是突然起病、头痛、寒颤、发烧, 四肢出现皮疹并波及躯干部, 严重时可发生昏迷、休克及肾衰竭<sup>[7]</sup>。该病目前仅发生在美洲地区。随着国际交往的逐年增多, 传染病已成为全球的共同威胁, Rr 也有传播到我国的可能性。

**2.1 灭活疫苗** 落基山斑点热灭活疫苗是最早的立克次体疫

\* 基金项目: 病原微生物生物安全国家重点实验室开放课题(SKLPBS1409)。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: songlihua@gmail.com。

苗之一。学者用 Rr 感染蜚,分离蜚的内脏后用苯酚灭活制成疫苗。这种疫苗应用于发病率低、病死率高的地区,可减轻症状、降低病死率;而应用在发病率高、病死率低的地区,则可以降低发病率。随后,有学者用鸡胚卵黄囊法培养 Rr,经苯酚与甲醛灭活后制成疫苗。蜚和鸡胚培养法制备的 2 种疫苗在动物实验中诱导产生相似水平的免疫力;在人体试验中均不能保护接种者免于感染,但延长了疾病的潜伏期,略微缩短了发病期。有学者用鸡胚成纤维细胞培养和蔗糖密度梯度离心法纯化 Rr 菌体,研制甲醛灭活 Rr 疫苗。这种疫苗在动物上有一定免疫效果,接种人后也诱发抗原特异性体液和细胞免疫应答,但在安慰剂对照、双盲试验中发现疫苗产生的保护力不够<sup>[8]</sup>。

**2.2 减毒活疫苗** 传统上 Rr 的培养和遗传操作比较困难,其减毒疫苗一直是研究空白。改进的 Rr 分离培养方法和新出现的遗传学操作技术为研制 Rr 减毒苗提供了可能。

**2.3 亚单位疫苗** 由于早期的落基山斑点热灭活苗保护力低,不能诱导产生足够的保护性免疫,学者逐渐转向 Rr 亚单位疫苗的研究。Rr 外膜蛋白 OmpA 与 OmpB 是感染初期主要的免疫原,也是主要的 Rr 亚单位疫苗候选,可诱导保护性免疫。重组 OmpA 的 N 末端能够部分保护豚鼠抵抗致死剂量的 Rr。OmpA 与 OmpB 的基因也已用于研制 DNA 疫苗。DNA 初次免疫与相应多肽加强免疫的策略可产生部分对康氏立克次体的保护性,且比单一组分单独免疫更加有效,但产生这种保护性的机制目前尚不清楚<sup>[9]</sup>。尽管如此,这种免疫策略不能诱导长效可靠的免疫力,对落基山斑点热的保护效果有限。

### 3 恙虫病疫苗

恙虫病的病原体为恙虫病东方体(Ot),在恙螨和许多动物中广泛存在,具有典型的自然疫源性。恙虫病临床表现为突发高热、浅表淋巴结肿大、虫咬溃烂、皮疹等,在亚太地区发病率较高,是东南亚地区重要的传染病<sup>[10]</sup>。Ot 不属于生物战剂,但与东南沿海地区的军事行动关系密切,如美国军队在第二次世界大战岛屿作战期间曾因 Ot 感染造成大面积非战斗减员。

**3.1 灭活疫苗** 对于恙虫病疫苗的研究开始较早,研究者曾采用鼻腔、腹腔、静脉接种法将 Ot 适应于小白鼠、棉鼠、大白鼠的蜚、肺及腹膜等组织,以提高 Ot 繁殖量来研制疫苗。有学者取脾、肺组织制成甲醛疫苗;也有学者采用组织培养法加甲醛灭活,经冻融处理制成疫苗。研究发现,Ot 灭活疫苗在动物上可产生对同株 Ot 的免疫力,而对异株的免疫力较低。美国军队曾在缅甸驻军中试验过恙虫病鼠肺疫苗,疫苗接种组与未接种组比较,恙虫病的发病率和病死率没有显著区别<sup>[11]</sup>,说明恙虫病灭活疫苗虽然能对动物产生一定的保护,但人体免疫效果并不理想。

**3.2 减毒活疫苗** 有学者采用  $\gamma$  射线照射获得了一株 Ot 减毒株,此减毒株保留了细胞感染能力,但对 BALB/c 小鼠不具有致病性。与甲醛灭活疫苗比较,射线减毒疫苗在小鼠实验中能够对异株 Ot 产生更好的保护力。在评价疫苗长效保护力的实验中,射线减毒疫苗对同株 Ot 的保护力可持续 1 年,而对异株 Ot 的保护力在 6 个月时就已经不明显<sup>[12]</sup>。射线减毒疫苗

的缺点是难以标准化生产及储存。

**3.3 亚单位疫苗** 对于恙虫病亚单位疫苗的研究,多集中在  $22,47,56,58,110 \times 10^3$  蛋白抗原。 $56 \times 10^3$  蛋白与麦芽糖结合蛋白的重组融合蛋白,既可作为有效的免疫诊断试剂,也能够诱导小鼠产生有效的体液免疫和细胞免疫<sup>[13]</sup>。 $47 \times 10^3$  蛋白的基因与多肽联合免疫小鼠能同时诱导产生抗原特异性体液免疫和细胞免疫<sup>[14]</sup>。已有的动物实验表明,Ot 亚单位疫苗值得进行进一步研究。

### 4 Q 热疫苗

Q 热的病原体为贝氏柯克斯体(Cb),临床一般无显著特征,常与其他热性传染病难以区别。急性 Q 热表现为发热、头痛、肌肉酸痛,常伴有肺炎、肝炎等。慢性 Q 热表现为心内膜炎、肉芽肿性肝炎、骨髓炎等。动物感染后出现食欲不振、体质量下降、不孕、流产、死胎等。虽然抗菌药物治疗对 Q 热有效,但慢性 Q 热治疗周期长,容易复发,疫苗接种是防治 Q 热的最有效手段<sup>[15]</sup>。

**4.1 灭活疫苗** 最早研制的 Q 热疫苗是为了控制 Cb 在动物中的感染流行。澳大利亚学者用甲醛灭活 Cb 作为疫苗,免疫豚鼠后能抵御其他 Cb 菌株的感染,免疫牛羊后可防止实验室和自然感染 Cb。澳大利亚甲醛灭活疫苗 Q-Vax 是唯一被许可的人用 Q 热疫苗,可有效保护动物接触者等 Q 热高危人群。但该疫苗会引起较重不良反应,包括皮疹、发热、头痛、接种部位肿块等,曾感染或接种过 Q 热疫苗者的不良反应更严重,因此接种前需要做皮试筛选<sup>[16]</sup>。此外,该疫苗的生产需要在生物安全三级以上实验室内进行,这与皮试筛选共同增加了该疫苗大范围免疫的难度。

**4.2 减毒活疫苗** 通过在豚鼠和小鼠中反复传代,俄罗斯学者获得了 CbGrita 减毒株 M-44,免疫豚鼠、小白鼠、家兔后可产生牢固的免疫力,能承受强毒的攻击。口服、划痕或皮下一次免疫人体均能产生较高的抗体滴度,且不良反应发生率低,即使患过 Q 热或血清学呈阳性反应,接种疫苗后也不出现变态反应。然而,动物实验中发现毒株在组织中长期存在,有毒力恢复的风险<sup>[17]</sup>。

**4.3 亚单位疫苗** Q 热亚单位疫苗主要有氯仿-甲醇提取后的 I 相 Cb 残存物(CMR)、I 相 Cb 的三氯乙酸提取物(TCAE)和 I 相 Cb 脂多糖(LPSI)。CMR 不仅能诱导产生抗 Cb 特异性保护免疫,还能刺激产生高水平的非特异性免疫<sup>[18]</sup>。与灭活疫苗比较,CMR 具有相同水平的免疫保护力,不良反应发生率显著降低。TCAE 与 LPSI 免疫小鼠后,都能产生较高滴度的抗体,且 LPSI 抗体主要出现于急性患者的恢复期和慢性患者中,提示 LPSI 可能适用于预防慢性 Q 热<sup>[19]</sup>。随着基因重组技术的发展,基因工程重组亚单位疫苗自 20 世纪末起成为研究热点。研究较多的 Cb 保护性抗原 27、30、34、 $67 \times 10^3$  及热休克蛋白等,上述均为 Q 热亚单位疫苗成分候选。

### 5 小结

自 1916 年普氏立克次体被首次命名,已过去近 1 个世纪,立克次体学家对安全高效人用立克次体疫苗的研究仍在探索中。对 3 个专性细胞内寄生立克次体——Rp、Rr、Ot 的灭活疫苗研究一致发现,不论采用何种培养方法,高度纯化的全菌抗

原虽然在动物上有时可诱导坚固的保护性免疫,但是仅能刺激人体产生部分保护,不能诱导无菌保护性免疫。对这 3 个菌种的亚单位疫苗研究受限于菌体的培养纯化。对三者的重组亚单位疫苗研究在动物模型上已取得了可喜进展,但还没有相关临床试验研究。尽管还没有理想的疫苗,前期研究已发现 Rp 与 Ot 的减毒活疫苗可诱导坚固的保护性免疫,这与其他病原减毒活疫苗的高效性相一致。随着立克次体遗传操作技术的发展,定向改造的减毒活疫苗有望成为新的研究热点。

本文涵盖的 4 种立克次体病中,Cb 导致的 Q 热是特例。目前,Cb 仍被认为是专性胞内寄生菌,但无生命培养基的出现已使 Cb“专性胞内寄生”的标签受到质疑。与 Rp、Rr 和 Ot 不同,Cb 灭活疫苗和亚单位疫苗均可以诱导人体产生长效保护性免疫,此疫苗的主要缺点是 Cb 培养纯化离不开高级别生物安全实验室。目前,有 2 种策略可望解决 Cb 疫苗大规模生产的难点:重组表达保护性抗原或保护性抗原表位,采用遗传学方法将 Cb 减毒以解除其高级别生物安全的要求。总之,Cb 与 Rp、Rr、Ot 代表了一大类生物学性状相似的专性胞内寄生菌,对它们的疫苗研究不仅有助于疾病防控,也有可能为其他疾病防控提供工具或思路,新近发展迅速的立克次体遗传学改造技术将在立克次体疫苗研制中发挥重要作用。

#### 参考文献

[1] Gillespie JJ, Kaur SJ, Rahman MS, et al. Secretome of obligate intracellular Rickettsia [J]. FEMS Microbiol Rev, 2015, 39(1): 47-48.

[2] Merhej V, Angelakis E, Socolovschi C, et al. Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species [J]. Infect Genet Evol, 2014, 25(7): 122-137.

[3] Walker DH. The realities of biodefense vaccines against Rickettsia [J]. Vaccine, 2009, 27(4): 52-55.

[4] Chao CC, Chelius D, Zhang T, et al. Proteome analysis of Madrid E strain of Rickettsia prowazekii [J]. Proteomics, 2004, 4(5): 1280-1292.

[5] Richards AL. Rickettsial vaccines: the old and the new [J]. Expert Rev Vaccines, 2004, 3(5): 541-555.

[6] Palmer GH, Brown WC, Noh SM, et al. Genome-Wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 64(1): 115-119.

[7] Badiaga S, Brouqui P. Human louse-transmitted infectious diseases [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(4): 332-337.

[8] Lacz NL, Schwartz RA, Kapila R. Rocky Mountain spotted fever [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2006, 20(4): 411-417.

[9] Díaz-Montero CM, Feng HM, Crocquet-Valdes PA, et al. Identification of protective components of two major outer membrane proteins of spotted fever group rickettsiae [J]. Am J Trop Med Hyg, 2001, 65(4): 371-378.

[10] Balcells ME, Rabagliati R, García P, et al. Endemic scrub typhus-like illness [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17: 1659-1663.

[11] Valbuena G, Walker DH. Approaches to vaccines against Orientia tsutsugamushi [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 2(2): 170.

[12] Paris DH, Shelite TR, Day NP, et al. Unresolved problems related to scrub typhus: a seriously neglected life-threatening disease [J]. Am J Trop Med Hyg, 2013, 89(2): 301-307.

[13] Balraj P, Renesto P, Raoult D, et al. Advances in Rickettsia pathogenicity [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1166(1): 94-105.

[14] Ge Y, Rikihisa Y. Subversion of host cell signaling by Orientia tsutsugamushi [J]. Microbes Infect, 2011, 13(7): 638-648.

[15] Wielders CC, Morroy G, Wever PC, et al. Strategies for early detection of chronic Q fever: a systematic review [J]. Eur J Clin Invest, 2013, 43(6): 616-639.

[16] Honarmand H. Q Fever: an old but still a poorly understood disease [J]. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2012, 2012: 131932.

[17] Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, et al. Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of neglected zoonosis [J]. Int J Microbiol, 2011, 2011: 248418.

[18] El-Mahallawy HS, Lu G, Kelly P, et al. Q fever in China: a systematic review, 1989-2013 [J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(4): 673-681.

[19] Gurtler L, Bauerfeind U, Blumel J, et al. Coxiellaburnetii Pathogenic agent of Q (Query) Fever [J]. Transfus Med Hemother, 2014, 41(1): 60-72.

(收稿日期: 2016-07-05 修回日期: 2016-09-11)

## 医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。