

C、D 型二价产气荚膜梭菌抗毒素血清的制备及保护效果评价

李 课^{1,2}, 刘雪慧¹, 王海荣^{1*}, 柴同杰^{1*}

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 淄博检验检疫局, 山东淄博 255000)

[收稿日期] 2016-03-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 08-0001-04 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为治疗产气荚膜梭菌感染引起的疾病, 研究制备了产气荚膜梭菌多价高效抗毒素血清。试验采用 C、D 型产气荚膜梭菌标准菌株, 制备了高浓度外毒素和灭活疫苗, 作为免疫原多次免疫绵羊, 通过间接 ELISA 法监测绵羊抗体水平变化, 采用小鼠中和试验检验绵羊抗毒素血清保护效果。结果表明: 制备的高效价抗 C、D 型产气荚膜梭菌毒素血清每 0.1 mL 血清能中和 400 个 C 型毒素对小鼠的 MLD 和 600 个 D 型毒素 MLD, 有良好的应用前景。

[关键词] C、D 型产气荚膜梭菌; 外毒素; 抗血清

Preparation and Evaluation of Bivalent Antisera of *Clostridium perfringens* Type C and D

LI Ke^{1,2}, LIU Xue-hui¹, WANG Hai-rong^{1*}, CHAI Tong Jie^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China;

2. Zibo Inspection and Quarantine Authorities, Zibo, Shandong 255000, China)

Abstract: High effect antiserum was prepared to treat infection caused by *Clostridium perfringens*. An high concentration of exotoxin was produced by standard strains of *Clostridium perfringens* type C and D, and used to prepare the inactivated vaccine. High effective antibody was obtained by immunizing sheep with the exotoxin and inactivated vaccine repeatedly. Indirect ELISA was used to monitor antibody level of the immunized sheep, and neutralization test in mice was used to detect protective effect of the serum. The results showed that 0.1 mL high potency antisera can neutralize 400 units MLD of type C and 600 units of type D in mice. It proved that the prepared antisera had a good application prospect.

Key words: *Clostridium perfringens* type C and D; exotoxin; antisera

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)根据其产生的四种主要外毒素(α 、 β 、 ϵ 、 ι), 将其分成为

A、B、C、D、E五个型^[1]。其中 C 型产气荚膜梭菌能产生 α 和 β 两种毒素, 是引起羊猝狙、仔猪红痢等

基金项目: 山东农业大学青年创新基金

作者简介: 李 课, 从事动物检疫工作。

通讯作者: 王海荣, E-mail: wanghairongtaian@163.com; 柴同杰, E-mail: chaitj@163.com

病的病原;D 型产气荚膜梭菌能产生 α 和 ϵ 两种毒素,能引起绵羊、山羊、牛以及豚鼠的肠毒血症,病死率很高,且两型菌有时混合感染^[2]。上述疾病通常发病急,病程短,给养殖业带来巨大的经济损失。

Haagsma 指出:“产气荚膜梭菌致病是由于它们形成分泌的毒素和代谢产物,无毒素产生就不会出现临床症状”^[3]。Garcia 用基因剔除的方法证实了 D 型产气荚膜梭菌致病主要由其产生的 ϵ 毒素引起的^[4]。因此,疫苗和抗血清的制备应针对细菌产生的主要的致病外毒素。我国目前没有研制针对 C、D 型产气荚膜梭菌病的二价抗毒素血清的报道。本研究旨在短时间制备高效多价产气荚膜梭菌抗毒素血清,以用于紧急治疗产气荚膜梭菌引起的动物疾病。

1 材料与方法

1.1 菌株及主要试剂 C 型产气荚膜梭菌菌株,英国微生物菌种保藏中心保藏,保藏号: NCTC 3180;D 型产气荚膜梭菌菌株,英国微生物菌种保藏中心保藏,保藏号: NCTC 8346;Gordon 汤产毒培养基:2% 蛋白胨、2% 酵母提取物、1% 糊精、1.2% L-精氨酸,PBS 溶解;Enterotoxaemia ELISA kit,购自比利时 BioX Diagnostics Sprl,编号 BIO K₂₉₀;硫乙醇酸盐流体培养基(FT),购自青岛日水生物技术有限公司。

1.2 最佳产毒条件摸索 将保存的标准 C 型和 D 型产气荚膜梭菌菌种分别在血琼脂培养基复苏,挑取单个菌落接种于 FT 培养基 38 ℃ 培养过夜,得到浑浊的菌液测量 OD_{600 nm} 处吸光度值,并作为二级种子接种产毒培养基。配制 100 mL Gordon 汤产毒培养基 5 份,分别接种二级种子: I 组 C 型菌 7 mL; II 组 D 型菌 7 mL; III 组 C 型菌 3.5 mL 和 D 型菌 3.5 mL; IV 组 C 型菌 3 mL 和 D 型菌 4 mL; V 组 C 型菌 4 mL 和 D 型 UT6T1 菌 3 mL。44 ℃ 培养 6 h 后,用 Enterotoxaemia ELISA kit 试剂盒检测各组培养后所产毒素,根据试剂盒提供的公式:

$$Val = \frac{(\text{样品光密度} - \text{阴性对照光密度}) \times 100}{\text{试剂盒阳性对照光密度} - \text{阴性对照光密度}}$$

Val 为培养物接种产毒培养基所产毒素的相对

值,计算不同比例 C 型和 D 型培养物接种产毒培养基所产毒素的相对值,将计算值与试剂盒规定的临界值比较,若 $\alpha > 5.95$, $\beta > 6.59$, $\epsilon > 6.39$,则为阳性,反之为阴性,值越高,毒素含量越高。

1.3 外毒素对小鼠致死量测定 使用最佳产毒条件制备的外毒素测定对小白鼠的 LD₅₀,用灭菌生理盐水将产毒培养基培养的上清液除菌后按 2⁻⁴、2⁻⁵、2⁻⁶、2⁻⁷、2⁻⁸ 进行倍比稀释,每只小白鼠腹腔注射 0.5 mL,对照组腹腔注射 0.5 mL 灭菌的生理盐水,观察 72 h,记录死亡情况。按照 Reed - Muench 氏法计算 LD₅₀。

1.4 C、D 型产气荚膜梭菌二价油苗的制备 将产毒培养基最佳条件制备好的外毒素过滤除菌,-20 ℃ 保存,作为第二免疫原。将制备好的除菌外毒素用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2,加入 0.3% 的甲醛,充分振荡混匀,置 37 ℃ 进行灭活。将灭活好的类毒素以 1:1 混入白油佐剂乳化为白油疫苗,并加入 0.01% 的硫柳汞,按《中华人民共和国生物制品规程》^[5] 检验合格,4 ℃ 保存,作为第一免疫原。

1.5 C、D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清的制备 选取体质强健的成年绵羊作为实验动物,按程序免疫进行免疫。抗毒素血清的制备分为两个阶段,基础免疫和加强免疫。基础免疫使用第一免疫原:C、D 型产气荚膜梭菌类毒素二价油苗;加强免疫使用第二免疫原:除菌的外毒素。按表 1 免疫程序肌肉多点注射进行免疫。

表 1 免疫程序

免疫次数	间隔时间/d	注射剂量/mL	抗原种类
I	/	5	第一免疫原
II	7	10	第一免疫原
III	7	2	第二免疫原
IV	7	4	第二免疫原
V	10	7	第二免疫原
VI	10	7	第二免疫原

1.6 绵羊血清中抗体水平检测 从第二次免疫后,每次免疫前颈静脉采血分离血清样品,检测血清中 C 型和 D 型产气荚膜梭菌的抗体变化。按照方法 1.3 中 I、II 组制备将 C、D 型产气荚膜梭菌二级种子分别接种于产毒培养基,44 ℃ 培养 6 h 后,将

除菌的培养物上清用硫酸铵沉淀,使用 Sephadex G-25除盐处理后用 SephadexG-200 纯化处理。将纯化的 C、D 型抗原分别以 2 ug/mL 的浓度包被,采用间接 ELISA 方法^[6],用兔血清作封闭,免疫前采取的血清作阴性对照,从 1:100 倍比稀释样品血清,样品血清的 OD₄₅₀大于阴性血清的 2.1 倍为阳性值,用最大稀释倍数表示抗体阳性水平,监测血清抗体随免疫的变化规律,用作参考。

1.7 小鼠中和试验测定抗体水平

1.8.1 最小致死量的测定(MLD) 将上述 1.7 方法中培养的 C 型和 D 型除菌外毒素分别用生理盐水倍比稀释,腹腔注射 0.5 mL,使全部小鼠死亡的最大稀释倍数时毒素的含量为小鼠的最小致死量。

1.8.2 小鼠中和试验 最后一次加强免疫后 10 d 的血清进行小鼠中和试验^[7]。2 倍致死量毒素与 0.2 mL 1:50、1:100、1:200、1:400、1:600、1:800、1:1000 稀释的绵羊血清混合,用生理盐水定容到 1 mL,放于 37 ℃温箱 2 h,取 0.5 mL 腹腔注射小鼠,观察小鼠存活情况。

1.8 血清制品的检验 最后一次免疫后 10 d 之后颈静脉大量采血,无菌操作,分离血清,加 0.01% 硫柳汞做防腐剂,按《中华人民共和国生物制品规程》^[5]的要求进行疫苗的安全性检验、无菌检验、甲醛和硫柳汞检验。

2 结果

2.1 最佳产毒条件 用 Enterotoxaemia ELISA 试剂盒检测不同比例接种产毒培养基产生的毒素,结果表明,V 组产毒效果最好,当 C 型菌与 D 型菌接种比例为 4:3 时,各种毒素相对值(Val)最高,产毒效果最佳(表 2)。

表 2 BIO-X 试剂盒检测接种不同比例 C 型菌与 D 型菌的产毒效果

组别	α	β	ε
I 组	111.3±0.6	172.2±1.3	1.9±0.2
II 组	142.5±0.7	1.8±0.4	173.6±1.1
III 组	116.5±1.1	123.6±0.9	170.7±0.4
IV 组	116.9±0.9	151.0±1.1	153.6±2.1
V 组	125.5±1.4	164.2±0.6	169.0±0.9

2.2 C、D 型二价产气荚膜梭菌外毒素对小白鼠的 LD₅₀的测定 经最佳产毒条件制备的外毒素对小白鼠的 LD₅₀在 2⁻⁶和 2⁻⁷之间(表 3),LD₅₀=2^{-6.6}/mL,即培养的毒素上清做 1:97.09 倍稀释,腹腔注射 0.5 mL,能使 50% 小鼠死亡。

表 3 外毒素的 LD₅₀ 试验检测结果

毒素稀释倍数	小鼠只数	死亡分数(死亡率)
2 ⁻⁴	10	10/10(100%)
2 ⁻⁵	10	10/10(100%)
2 ⁻⁶	10	8/10(80%)
2 ⁻⁷	10	3/10(30%)
2 ⁻⁸	10	0/10(0)
生理盐水	10	0/10(0)

2.3 血清中抗体变化结果 间接 ELISA 检测显示:从第二次免疫后,免疫绵羊血清中 C 型和 D 型产气荚膜梭菌的抗体呈一直上升水平(表 4)。

表 4 血清中抗体 ELISA 监测结果

采血时间	C 型抗体	D 型抗体
第二次基础免疫后	1:200	1:400
第一次加强免疫后	1:800	1:800
第二次加强免疫后	1:1600	1:1600
第三次加强免疫后	1:3200	1:6400
第四次加强免疫后	1:6400	1:12800

2.4 小鼠中和试验测定抗毒素血清的保护效果

2.4.1 毒素对小鼠的最小致死量测定结果 测得制备的 C 型外毒素对小鼠的 MLD 为 10 uL,D 型外毒素对小鼠的 MLD 为 50 uL。

2.4.2 小鼠中和试验测定结果 稀释的血清与毒素混匀,腹腔注射小鼠,测得经过 4 次加强免疫后,0.1 mL 血清能中和 400 个 C 型毒素对小鼠的最小致死量,能中和 600 个 D 型毒素对小鼠的最小致死量。

2.5 血清检验 分离的血清为淡黄色,无菌检验 无菌生长,安全性检验、甲醛和硫柳汞检验结果均符合《中华人民共和国生物制品规程》^[5]要求。

3 讨论

选择具有良好的反应原性和免疫原性的抗原,是制备优质抗血清的基础。为了制备高效抗原,本研究通过将 C、D 型二级种子以 4:3 接种于同一培养基混合培养,制备高浓度毒素。我国成品多联疫苗大多是将不同细菌分别培养后混合制成,则各型菌的毒素浓度均下降,疫苗的效果受到影响。若以 C 型菌和 D 型菌按 1:1 接种,则 C 型菌产生 β 毒素受到抑制,因而选择 4:3 接种比例。经试验,若 C 型菌接种比例继续增加,则 D 型菌产生 ε 毒素的量明显下降,因而该比例为最佳接种比例,α、β、ε 毒素产量均达到较高水平。通过小鼠致死性试验,测得 C、D 型产气荚膜梭菌外毒素对小鼠的半数致死量为 2^{-6.6}/mL,混合产毒效果极佳。

免疫血清的质量直接影响抗原抗体反应的特异性和敏感性,制备高效价的免疫血清不仅与抗原的自身性质有关,同时与抗原的剂量、剂型、注射途径、注射次数、间隔时间、佐剂应用等因素有关^[8]。本研究参照快速制备血清法、羔羊痢疾血清制备方法^[9-10]及绵羊的免疫反应,制定了制备高免血清的免疫程序。为了增强机体免疫应答的强度,疫苗制备中常加入佐剂,尤其在使用可溶性抗原时,使用佐剂后可增加抗原的免疫原性和延长抗原在机体内存留的时间,从而改变了抗原原有的免疫原性^[11]。本试验基础免疫采用 C、D 型产气荚膜梭菌类毒素白油疫苗,油乳佐剂能在注射部位形成抗原储存库,使抗原缓慢释放刺激浆细胞产生抗体,使动物长时间维持较高的抗体水平。

基础免疫两次后,使用除菌未灭活 C、D 型产气荚膜梭菌外毒素进行加强免疫,有一定风险,但有利于抗体水平快速提升;因基础免疫后,机体 B 细胞接受免疫原刺激形成效应 B 细胞,效应 B 细胞产生具有特异性的抗 C、D 型毒素的抗体,用未灭活的毒素进行加强免疫,高强度抗原再度入侵,机体能更快地做出反应,产生大量抗体(二次反应),因而抗体水平快速升高^[12]。D 型毒素对 40 kg 绵羊的最小致死量为 9 mL^[13],而且在使用未灭活的毒素前,绵羊已经过两次基础免疫,因而免疫程序中使用一定剂量未灭活毒素加强免疫,不会致死绵羊。加强免疫剂量逐渐增加,当加强免疫 7 mL 时,绵羊出现腿部轻微不适,不宜增加免疫剂量。与以前的抗羔羊痢疾血清相比,本试验用时短,且不使用菌液进行免疫,因菌液会引起羔羊局部溃疡等不良反应,而由于产气荚膜梭菌毒素致病,无需用菌液进行免疫即可治疗产气荚膜梭菌病。

在羔羊痢疾及仔猪红痢抗血清制备中使用小鼠中和试验测定血清中抗体,但小鼠中和试验成本高,误差大,为了随时监测绵羊血清抗体变化,本试验采用了间接 ELISA 法检测血清中 C、D 型产气荚膜梭菌抗体,市场上可购买的检测产气荚膜梭菌抗体的试剂盒只能检测 ϵ 毒素抗体且价格昂贵,不能检测 β 毒素抗体;本研究建立的抗体检测方法可靠、简便、成本低,为 C、D 型二价抗血清抗体的制备提供了支持。

为了监测抗体水平变化,每次免疫后使用间接 ELISA 方法检测,测得两型抗体水平均逐渐上升,四次加强免疫后,血清中 C 型抗体效价为 1:6400,

D 型抗体效价为 1:12800,根据 D 型菌对绵羊的免疫攻毒保护试验,当间接 ELISA 检测 D 型产气荚膜梭菌抗体效价为 1:800 时,能抵抗 D 型产气荚膜梭菌一个最小致死量的攻毒^[13],可知该血清保护效果极佳。小鼠中和试验表明:经过 4 次加强免疫后,0.1 mL 血清能中和 400 个 C 型毒素对小鼠的绝对致死量,能中和 600 个 D 型毒素对小鼠的绝对致死量,优于《中华人民共和国兽用生物制品规程》中 C 型血清及 D 型血清的要求^[14]。由以上实验结果可知:本研究制备的 C、D 型二价抗血清抗体效价高,能特异性治疗由 C、D 型产气荚膜梭菌引起的疾病,有良好的应用前景。

参考文献:

- Petit L, Gibert M, Popoff M R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype[J]. Trends Microbiol, 1999, 7:104 - 110.
- Songer J G. Clostridial diseases of animals [M]. San Diego: Academic Press; 1997.
- Haagsma J. Pathogenetic anaerobic bacteria and the environment [J]. Rew Sci Tech Off Int Eqiz, 1991, 10(3):749 - 764.
- Garcia J P, Adams V. Epsilon toxin is essential for the virulence of *Clostridium perfringens* typed infection in sheep, goats, and mice[J]. Infection and Immunity, 2013,81: 2405 - 2414.
- 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国生物制品质量标准[S]. 二〇〇一年版. 北京:中国农业科技出版社.
- Uzal F A. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA [J]. Veterinary Microbiology, 1997, 51:223 - 231.
- Jin Zeng, Guangcun Deng. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* $\alpha - \beta_2 - \beta_1$ fusion toxin in mice, sows and cows[J]. Vaccine,2011 ,29:5459 - 5466.
- 张振兴,陈 闻,李玉峰,等. 兽用抗体制品制造技术与应用[J]. 经济动物学报,2007,11(2): 63 - 67.
- 马玉红,江新泉,高佩安,等. 快速制备免疫血清方法研究[J]. 泰山医学院学报,2008,29(9):675 - 677.
- 周兆祥. 抗羔羊痢疾血清的试制及其应用[J]. 内蒙古畜牧科学,1977,(1):50 - 55.
- 李 娜,周伟芳,刘慧敏,等. 疫苗佐剂的研究现状和发展趋势[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(1): 81 - 86.
- 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000: 18 - 22.
- 王方山. D 型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的研制及保护效果的评价[D]. 山东农业大学,2014.
- 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程[S]. 二〇〇〇年版. 北京:化学工业出版社,2000: 332 - 335.