

家兔产气荚膜梭菌(A)型疫苗超纳滤膜浓缩工艺研究^{*}

徐为中^{1,2},薛家宾¹,诸玉梅¹,陈兴祥¹,周永银¹,杨龙圣²,尹秀凤¹

(1 江苏省农科院 兽医研究所,江苏 南京 210014;2 南京农业大学 动物医学院,江苏 南京 210095)

[摘 要] 采用超纳滤技术浓缩家兔产气荚膜梭菌(A)型疫苗,建立家兔产气荚膜梭菌(A)型疫苗浓缩工艺。配制家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗,并对其无菌性、安全性和免疫效力进行了检验。结果显示,该工艺可将家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原浓缩约 7 倍,超纳滤膜用 NaOH 洗后其通量可以恢复;配制的家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗无菌检验合格,安全检验家兔无不良反应,符合动物用生物制品要求;以 2 mL/只的剂量免疫家兔,家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的保护率达 100%,传统铝胶疫苗对照组的保护率平均为 86.7%,表明超纳滤浓缩疫苗免疫效力优于传统铝胶疫苗。确定了家兔产气荚膜梭菌病(A)型疫苗超纳滤膜浓缩的工艺。

[关键词] 家兔;产气荚膜梭菌;膜浓缩;免疫效力

[中图分类号] S858.291

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0039-04

Techniques of ultrafiltration membrane concentration of inactive vaccine against clostridium perfringens type A of rabbits

XU Wei-zhong^{1,2}, XUE Jia-bin¹, ZHU Yu-mei¹, CHEN Xing-xiang¹,
ZHOU Yong-yin¹, YANG Long-sheng², YIN Xiu-feng¹

(1 Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing, Jiangsu 210014, China;

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Studies were made on concentration of inactive vaccine against clostridium perfringens type A of rabbits by ultrafiltration technology, and techniques of ultrafiltration membrane concentration were established. The antigen was condensed 7 times by ultrafiltration membrane. The vaccine made of the condensed antigen was measured safe and effective by asepsis. Results showed that the flux of filter could be resumed after the use of NaOH. The aseptic examination was qualified, and the rabbits behaved well without any bad reaction by safe examination. Besides, the vaccine against clostridium perfringens could provide 100% of protection when injected with 2 mL vaccine, in contrast, the vaccine of control group provided 86.7% of protection, which showed that the vaccine produced by ultrafiltration membrane was better than traditional aluminium vaccine. So the technique of ultrafiltration membrane clostridium perfringens type A is confirmed.

Key words: rabbits; clostridium perfringens; ultrafiltration membrane concentration; mensuration of effectiveness

产气荚膜梭菌(A)型能引起牛^[1]、马^[2]、犬^[3]、兔^[4-5]等多种动物及人^[6]腹泻,其所致的病变主要为

* [收稿日期] 2006-03-15

[基金项目] 江苏省科技成果转化专项(BA2004032)

[作者简介] 徐为中(1973-),男,江苏建湖人,助理研究员,在读博士,主要从事家兔疾病防治研究。

胃肠道病变^[7]。家兔产气荚膜梭菌病(家兔 A 型魏氏梭菌下痢)在国内广泛流行,以急剧水样腹泻为特征,水泻出现前精神、食欲无明显变化;水泻出现后,精神沉郁,不食,粪呈水样,污染臀部及后腿,有特殊腥臭味。该病绝大多数病例属于急性型,各种中、西药物治疗均无效,造成的经济损失很大。产气荚膜梭菌多价灭活疫苗能有效降低产气荚膜梭菌病的发生^[1,8]。董亚芳等^[5,9]对产气荚膜梭菌病作了全面而深入的研究,研制出了有效的高免血清和菌苗,为控制该病发挥了重要作用。Belyi 等^[10]用构建的融合蛋白作为疫苗用于防治肠道梭菌感染。目前使用的兔用产气荚膜梭菌(A)型灭活疫苗是单苗,需要多次注射,费工费时。随着养兔业集约化程度的提高,打一针能够预防多种传染病的多联疫苗已成为规模化养兔场的迫切需求。但由于关键的抗原浓缩技术还不成熟,一直未能研制出兔用的多联疫苗。为此,本试验研究了产气荚膜梭菌抗原超纳滤浓缩工艺,以期为兔用多联疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 3~4 月龄新西兰兔由江苏省农业科学院兽医研究所实验动物中心提供,共 70 只,体重 2~3 kg,公母各半。

1.1.2 产气荚膜梭菌(A)型灭活菌液 产气荚膜梭菌病(A)型灭活菌液由江苏省农科院兽医研究所提供,共 3 批,批号分别为 9901,0001 和 0201。

1.1.3 产气荚膜梭菌(A)型疫苗 产气荚膜梭菌(A)型疫苗由江苏省农业科学院兽医研究所提供,批号分别为 9901,0001 和 0201。

1.1.4 试剂及仪器 牛血清清蛋白(BSA),Roehe 公司产品,批号 0408;考马斯亮兰 R-250, Sigma 公司产品,批号 0402;卷式微滤膜设备(孔径 0.1 μm)和卷式超纳滤膜设备(截留分子量 1 000 u),南京凯米科技公司产品;WFZ800-D3B 型分光光度计,北京瑞利分析仪器公司产品。

1.2 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原的浓缩

用微滤膜对家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原菌体进行浓缩后,对微滤液进行超纳滤浓缩,最后收集微滤菌体抗原和超纳滤浓缩的类毒素即为浓缩的家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原。整个过程记录膜通量的变化,并对超纳滤浓缩前后抗原体积进行测量。超纳滤浓缩结束后,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液清洗滤膜。

1.3 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原微滤液和超纳滤浓缩液中蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法,将考马斯亮兰 R-250 在酸性溶液中与微滤液和超纳滤浓缩液中的蛋白质结合后,在分光光度计上测 A_{595} 。根据测量微滤液和超纳滤浓缩液的吸光度值及标准蛋白质浓度的 A_{595} ,计算微滤液和超纳滤浓缩液中的蛋白质含量。

1.4 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的制备及分装

将家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原的浓缩液用 3.5 倍体积的灭菌生理盐水稀释后,按 9:1(体积比)比例加入铝胶中,混匀,分装于 40 mL 瓶中。

1.5 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的无菌检验

按农业部《兽用生物制品制造检验规程》^[11]要求进行无菌性检验,每批疫苗接种硫乙醇酸盐(TG)、培养 3 d 后转接种硫乙醇酸盐(TG)小管、酪胨琼脂(GA)斜面、葡萄糖蛋白胨汤(GP)小管、血斜面和厌气肉肝汤小管,培养 5 d 观察结果。

1.6 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的安全检验

每批家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗均按农业部《兽用生物制品制造检验规程》^[11]要求进行安全性检验。3 批(批号分别为 9901,0001 和 0201)超纳滤工艺苗均接种 2~5 月龄的健康易感家兔 4 只,每只皮下注射 4 mL,观察 10 d。同时设常规铝胶浓缩疫苗对照组和不免疫空白对照组。

1.7 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的免疫效力检验

3 批(批号分别为 9901,0001 和 0201)家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗均按 3 个免疫剂量(2.0,2.5 和 3.0 mL/只),免疫 3~4 月龄的健康易感兔,每组 5 只,颈部皮下注射,同时设同批次常规铝胶浓缩疫苗对照(免疫剂量 2.0 mL/只)。21 d 后攻以致死剂量(1.4 mL/只)产气荚膜梭菌毒素,同时以不免疫健康兔作阴性对照。

2 结果与分析

2.1 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原微滤过程中微滤膜通量的变化

从表 1 可以看出,随微滤过程的进行微滤膜通量不断下降,而用 NaOH 洗后,微滤膜的通量又可逐渐恢复。微滤结束后测量滤出液体积为 1.8×10^5 mL,固形物体积 2×10^4 mL。

表 1 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原微滤过程中微滤膜通量的变化

Table 1 Change of flux in the process of tiny ultrafiltration of clostridium perfringens type A of rabbits mL/ s				
时 间 Time	清水通量/ Flux of clear water	料量通量/ Flux of stuff	清水洗后水通量/ Water flux after wash of water	NaOH 洗后水通量/ Water flux after wash of NaOH
初期 First	80.21 ±2.36	75.12 ±0.86	55.65 ±3.65	80.25 ±5.46
中期 Midist	80.21 ±3.21	53.36 ±0.35	58.36 ±2.45	80.30 ±2.54
末期 Telophase	80.00 ±3.32	38.64 ±2.56	60.25 ±3.85	80.10 ±4.39

2.2 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原超纳滤过程中膜通量的变化

超纳滤过程中超纳滤膜通量的变化见表 2。从

表 2 可以看出,用 NaOH 洗后,超纳滤膜的通量又可逐渐恢复。浓缩前体积为 1.8×10^5 mL,浓缩后体积为 2.8×10^4 mL,抗原浓缩约 7 倍。

表 2 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原超纳滤过程中超纳滤膜通量的变化

Table 2 Change of flux in the process of na ultrafiltration of clostridium perfringens type A of rabbits mL/ s				
时 间 Time	清水通量/ Flux of clear water	料量通量/ Flux of stuff	清水洗后水通量/ Water flux after wash of water	NaOH 洗后水通量/ Water flux after wash of NaOH
初期 First	30.21 ±2.26	28.20 ±1.56	20.25 ±3.65	30.25 ±3.65
中期 Midist	30.12 ±3.01	21.37 ±1.45	21.16 ±2.35	30.16 ±2.35
末期 Telophase	30.06 ±3.75	13.64 ±2.36	22.15 ±3.86	30.15 ±3.86

2.3 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原微滤液和超纳滤液的蛋白质含量

由表 3 可知,家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原微滤液和超纳滤液的平均蛋白质含量分别为 0.030 7和 0.305 7 mg/ mL。

表 3 家兔产气荚膜梭菌(A)型灭活抗原微滤液和超纳滤浓缩液中的蛋白质含量

Table 3 Mensuration of the content of protein of clostridium perfringens type A of rabbits		
批号 Number	微滤液蛋白含量/ (mg · mL ⁻¹) Content of protein of of tiny filter	超纳滤液蛋白含量/ (mg · mL ⁻¹) Content of protein of na ultrafiltration
9901	0.03	0.305
0001	0.029	0.302
0201	0.033	0.310

2.4 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的无菌检验结果

结果显示,培养 3 d 的 TG 及培养 5 d 天的 TG 小管、GA 斜面、GP 小管、血斜面和厌气肉肝汤小管均无细菌生长,表明无菌检验合格。

2.5 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的安全性和免疫效力

试验组和对照组家兔均精神状态良好、食欲正常,注射部位无坏死,均健活。表明,家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗安全性良好。

从表 4 可以看出,在相同的免疫剂量(2.0 mL/ 只)下,3 批家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的保护率均为 100 %,3 批常规铝胶浓缩苗的保护率平均为 86.7 %。

表 4 家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的免疫效力

Table 6 Results of the experiment about immunation of na ultrafiltration condensed vaccine with the different treatment							
批 号 Number	抗原处理方法 Disposal methods of antigen	免疫剂量 (mL · 只 ⁻¹) Dose of injection	免疫组 Immunity group		对照组 Control group		保护率 Protection rates
			攻毒数 Injected No.	存活数 Live No.	攻毒数 Injected No.	存活数 Live No.	
0901	超纳滤 Process of na ultrafiltration	2.0	5	5	5	0	100 %
0901	超纳滤 Process of na ultrafiltration	2.5	5	5	5	0	100 %
0901	超纳滤 Process of na ultrafiltration	3.0	5	5	5	0	100 %
0901	铝胶苗 Aluminium vaccine	2.0	5	4	5	0	80 %
0001	超纳滤 Process of na ultrafiltration	2.0	5	5	5	0	100 %
0001	超纳滤 Process of na ultrafiltration	2.5	5	5	5	0	100 %

续表 4 Continued of table 4

批 号 Number	抗原处理方法 Disposal methods of antigen	免疫剂量 (mL · 只 ⁻¹) Dose of injection	免疫组 Immunity group		对照组 Control group		保护率 Protection rates
			攻毒数 Injected No.	存活数 Live No.	攻毒数 Injected No.	存活数 Live No.	
0001	超纳滤 Process of na ultrafiltration	3.0	5	5	5	0	100 %
0001	铝胶苗 Aluminium vaccine	2.0	5	5	5	0	100 %
0201	超纳滤 Process of na ultrafiltration	2.0	5	5	5	0	100 %
0201	超纳滤 Process of na ultrafiltration	2.5	5	5	5	0	100 %
0201	超纳滤 Pprocess of na ultrafiltration	3.0	5	5	5	0	100 %
0201	铝胶苗 Aluminium vaccine	2.0	5	4	5	0	80 %

3 讨 论

目前,家兔产气荚膜梭菌(A)型氢氧化铝胶疫苗采用氢氧化铝胶吸附法浓缩,即加入氢氧化铝胶振摇,静置1周以上,然后去掉一半上清进行简易的抗原浓缩^[11]。氢氧化铝胶吸附浓缩法存在抗原成分吸附不完全,去上清液时会造成抗原损失的缺点。本试验建立的超纳滤浓缩抗原制备动物疫苗工艺具有样品处理快速、量大,超纳滤膜重复利用率高等特点,适合于规模化生产。该工艺可有效地用于产气荚膜梭菌(A)型抗原浓缩,适合于家兔产气荚膜梭菌(A)型疫苗工业化生产,解决了产气荚膜梭菌(A)型菌体及类毒素抗原的浓缩难题,为批量制备含兔产气荚膜梭菌(A)型抗原的多联疫苗奠定了基础。

本试验结果显示,家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的无菌性和安全性均符合动物用生物制品要求,超纳滤液不能检出抗原蛋白,浓缩后的抗原蛋白几乎没有损失;在相同的免疫剂量下,家兔产气荚膜梭菌(A)型超纳滤浓缩疫苗的保护率高于传统的氢氧化铝胶疫苗。本试验建立的超纳滤浓缩工艺可以将抗原浓缩约7倍,为动物多联疫苗的研制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Changqing Q,Xueli Y. Clostridium infection (jisizheng) in yaks in Qinghai,China[J]. Vet Res Commun. 2001 ,25(7) :555-563.

[2] Bueschel D,Walker R,Woods L ,et al. Enterotoxigenic clostridium perfringens type A necrotic enteritis in a foal[J].J Am Vet Med Assoc ,1998 ,213(9) :1305-1307 ,1280.

[3] Sasaki J ,Goryo M ,Asahina M ,et al. Hemorrhagic enteritis associated with clostridium perfringens type A in a dog[J].J Vet Med Sci ,1999 ,61(2) :175-177.

[4] Sherman S ,Klein E ,McClane B A. Clostridium perfringens type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum[J].J Diarrhoeal Dis Res ,1994 ,12(3) :200-207.

[5] 董亚芳,沈惠芬,王庆熙,等. 家兔梭形菌下痢的病原菌鉴定和防治研究初报[J]. Diarrhoeal Dis Res ,江苏农业科学 ,1980 ,6: 46-57.

[6] Brynestad S ,Granum P E. Clostridium perfringens and food-borne infections[J]. Int J Food Microbiol ,2002 ,74 (3) :195-202.

[7] Songer J A. Clostridium enteric disease of domestic animals [J]. Clin Microbiol Rev ,1995 ,9:1-19.

[8] Schoepe H ,Pache C ,Neubauer A ,et al. Naturally occurring clostridium perfringens nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin-associated diseases [J]. Infect Immun , 2001 ,69(11) :7194-7196.

[9] 董亚芳,沈惠芬. 提高家兔 A 型魏氏梭菌苗效力的研究[J]. 江苏农业科学 ,1984 , 9:35-37.

[10] Belyi I F,Varfolomeeva N A. Construction of a fusion protein carrying antigenic determinants of enteric clostridial toxins [J]. FEMS Microbiol Lett ,2003 ,225(2) :325-329.

[11] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程 2000 年版[S]. 北京:化学工业出版社 ,2000 :101-102.