



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111500482 A

(43)申请公布日 2020.08.07

(21)申请号 201910099049.X

(22)申请日 2019.01.31

(83)生物保藏信息

CGMCC No. 16894 2018.11.27

(71)申请人 内蒙古金宇保灵生物技术研究院有限公司

地址 010030 内蒙古自治区呼和浩特市玉泉区鄂尔多斯西街58号金宇保灵生物药品有限公司质检楼1层101、2层201室

(72)发明人 韩四娥 张志丹 刘国英 魏学峰  
范秀丽 郝鹏 黄海碧 徐丽媛  
韩志玲 史文瑞 杨富贵 金鹰

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 鲁兵

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/02(2006.01)

A61K 39/08(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

C12R 1/145(2006.01)

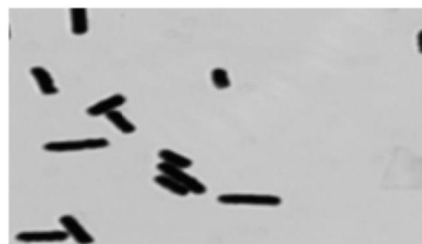
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种羊A型产气荚膜梭菌菌株及其灭活疫苗和疫苗制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种羊A型产气荚膜梭菌菌株及其灭活疫苗和疫苗制备方法,属于生物医药领域。其中经本发明筛选得到的羊A型产气荚膜梭菌菌株产毒水平较高、免疫原性良好、培养特性稳定;并优化了培养该羊A型产气荚膜梭菌菌株的培养基配方及培养条件,提高了培养稳定性和基础抗原效价,获得了高抗原毒素含量的毒素菌液;利用该毒素菌液制备羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗,获得一种免疫效果可靠、低免疫剂量的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗,可用于有效防控目前流行严重的羊A型产气荚膜梭菌所致的猝死症。



1. 一种产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 菌株A/2018/NM/01, 其保藏号为: CGMCC No.16894, 保藏日期为: 2018年11月27日, 保藏单位为: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC。

2. 根据权利要求1所述的菌株A/2018/NM/01, 其特征在于, 所述菌株的筛选方法包括:

S1: 将猝死羊病料接种于10%绵羊脱纤血平板, 将所述血平板置厌氧菌培养盒, 于37℃过夜培养;

S2: 从所述血平板挑选独立、菌落边缘整齐、稍隆起、双溶血环明显、直径大小不同的3-5个菌落接种于新鲜的10%绵羊脱纤血平板, 37℃温箱培养18-24小时;

S3: 从S2中每个血平板同样挑选独立、菌落边缘整齐、稍隆起、双溶血环明显、直径大小不同的3-5个菌落接种于厌氧肉肝汤, 37℃温箱培养18-24小时;

S4: 将S3所得培养物离心 (4℃、3000rpm离心20min)、取上清液过滤 (选用孔径为0.45μm的滤膜), 检测上清液毒素最小致死量, 筛选出毒素含量最高的菌株即为菌株A/2018/NM/01。

3. 根据权利要求1或2所述的菌株A/2018/NM/01, 其特征在于, 所述菌株的涂片镜检形态特征为: 常散在, 粗大革兰氏阳性杆菌;

溶血特性为: 双溶血环, 内层完全溶血, 外层不完全溶血;

培养特性为: 牛乳暴裂发酵: 接种石蕊牛奶培养基6-12小时, 出现颜色变浅、乳酪样物质;

PCR型特异性鉴定和血清中和法鉴定为A型产气荚膜梭菌。

4. 一种由权利要求1-3中任一项所述的菌株A/2018/NM/01制备得到的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗。

5. 权利要求4所述的灭活疫苗的制备方法, 其特征在于, 包括:

T1: 使用专用培养基培养所述菌株, 得到菌液;

T2: 灭活所述菌液并离心, 得到上清菌液;

T3: 浓缩所述上清菌液, 得到抗原毒素含量为 $\geq 320\text{MLD}/\text{ml}$ 的浓缩菌液, 将所述浓缩菌液与氢氧化铝胶混合, 得到所述灭活疫苗;

其中步骤T1中所述专用培养基的配方为:

蛋白胨 2%-3%,

酵母浸粉 0.2%-0.5%,

NaCl 0.2%-0.5%,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.3%-1%,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%-1%,

粗糊精 0.5%-1%,

余量为注射用水。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 步骤T1中, 将所述专用培养基配方中成分用注射用水溶解后, 用2mol/L NaOH调pH值至8.0-8.5, 116℃蒸汽灭菌40分钟, 使用时再加入该培养基体积0.2%-0.5%的0.1g/ml的硫代乙醇酸钠溶液共同对所述菌株进行培养。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤T1中所述菌株的接种量为1%-2%;所述培养的温度为36-37℃;培养的时间为5-6小时;和/或

步骤T2中所述灭活菌液的方法为:使用0.3%-0.5%甲醛溶液,37℃灭活2-3天,期间每日搅拌2-3次;所述离心的条件为4℃、6000-8000rpm离心20-30min。

8. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤T3中所述浓缩上清菌液为使用孔径3-5KD的中空纤维柱浓缩5-10倍。

9. 一种专用培养基,用作权利要求1-3中任一项所述的菌株A/2018/NM/01产 $\alpha$ 外毒素的培养基,其配方为:

蛋白胨	2%-3%,
酵母浸粉	0.2%-0.5%,
NaCl	0.2%-0.5%,
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.3%-1%,
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3%-1%,
粗糊精	0.5%-1%,

余量为注射用水。

10. 根据权利要求9所述的专用培养基,其特征在于,所述专用培养基在使用时再加入该培养基体积0.2%-0.5%的0.1g/ml的硫代乙醇酸钠溶液。

## 一种羊A型产气荚膜梭菌菌株及其灭活疫苗和疫苗制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域中的疫苗及其制备方法,特别是涉及一种羊A型产气荚膜梭菌菌株及其灭活疫苗和疫苗制备方法。

### 背景技术

[0002] 产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*),又称魏氏梭菌,是一种存在于人和动物肠道中的条件致病菌。目前已发现产气荚膜梭菌至少可以产生16种毒力因子,包括12种毒素( $\alpha$ -v)和多种侵袭性酶类,其中 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 毒素是产气荚膜梭菌最重要的致死性毒素,其余的毒素为次要致死性和非致死性毒素。而 $\alpha$ 毒素是最为主要的一种毒素,虽各个菌型的产气荚膜梭菌都能产生,但以A型产气荚膜梭菌产生的 $\alpha$ 毒素量最多,不同菌型的产气荚膜梭菌可以引起不同的疾病。根据该菌分泌四种主要致死性外毒素的基因型不同,分为A、B、C、D、E型。

[0003] 当饲养和环境条件改变时,易引起畜禽的产气荚膜梭菌病。尤其对于牧区,轮牧式放养,春夏、秋冬季,因放牧草场的突变,猝死羊明显增多。且发病死亡羊大都是青壮年,营养比较好。临床症状表现为:羊只在放牧途中或正在吃草时即突然倒地,挣扎几下就死亡,有的羊向前猛冲,腾空而起然后倒地,四肢出现强烈的划动;随后头颈显著抽搐,半小时左右死亡。有的羊晚上进圈时没有任何症状,凌晨或第2天早晨死于羊圈内。病势稍缓的,早期表现为步态不稳,以后卧倒,继以昏迷,在2~3小时内安静地死去(刘江涛,“一起羊A型魏氏梭菌病的诊治”,今日畜牧兽医,2007,7:47)。因此,一旦发病,往往在未得到有效治疗前便死亡。

[0004] 2000年以前,报道羊A型产气荚膜梭菌病于季节交替期持续20天左右。近年,因自然环境及饲养条件的改变,羊A型产气荚膜梭菌病呈现全年散发性,引起高达10%的死亡率,给农牧区养殖户带来重大经济损失。基于A、B、C、D型产气荚膜梭菌均产生 $\alpha$ 外毒素,长期以来,养殖户一般选择使用市场上可获得的用于预防羊B、C、D型产气荚膜梭菌病的羊三联四防或羊四联灭活苗预防羊猝死病,短期内对防控羊B、C、D型产气荚膜梭菌病效果良好,但对于防控A型产气荚膜梭菌病效果并不理想。

[0005] 近两年来,在猝死羊中,A型产气荚膜梭菌的检出率远远高于B、C、D型,但目前国内外缺乏对羊A型产气荚膜梭菌病防控的有效疫苗。基于A型产气荚膜梭菌病发病急、死亡率高、发病后用药治疗效果不明显,为有效预防和控制羊A型产气荚膜梭菌病的发生,研制安全、有效的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗刻不容缓。

### 发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题的一个或多个,本发明的一个方面提供一种产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)菌株A/2018/NM/01,其保藏号为:CGMCC No.16894,保藏日期为:2018年11月27日,保藏单位为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC。

[0007] 上述菌株A/2018/NM/01的筛选方法包括：

[0008] S1:将猝死羊病料接种于10%绵羊脱纤血平板,将所述血平板置厌氧菌培养盒,于37℃过夜培养;

[0009] S2:从所述血平板挑选独立、菌落边缘整齐、稍隆起、双溶血环明显、直径大小不同的3-5个菌落接种于新鲜的10%绵羊脱纤血平板,37℃温箱培养18-24小时;

[0010] S3:从S2中每个血平板同样挑选独立、菌落边缘整齐、稍隆起、双溶血环明显、直径大小不同的3-5个菌落接种于厌氧肉肝汤,37℃温箱培养18-24小时;

[0011] S4:将S3所得培养物离心(4℃、3000rpm离心20min)、取上清液过滤(选用孔径为0.45μm的滤膜),检测上清液毒素最小致死量,筛选出毒素含量最高的菌株即为菌株A/2018/NM/01。

[0012] 上述菌株A/2018/NM/01的涂片镜检形态特征为:常散在,粗大革兰氏阳性杆菌;溶血特性为:双溶血环,内层完全溶血,外层不完全溶血;培养特性为:牛乳暴裂发酵:接种石蕊牛奶培养基6-12小时,出现颜色变浅、乳酪样物质;PCR型特异性鉴定和血清中和法鉴定为A型产气荚膜梭菌。

[0013] 本发明的另一方面提供一种羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗。

[0014] 上述灭活疫苗的制备方法包括:

[0015] T1:使用专用培养基培养所述菌株,得到菌液;

[0016] T2:灭活所述菌液并离心,得到上清菌液;

[0017] T3:浓缩所述上清菌液,得到抗原毒素含量为 $\geq 320$ MLD/ml的浓缩菌液,将所述浓缩菌液与氢氧化铝胶混合,得到所述灭活疫苗;

[0018] 其中步骤T1中所述专用培养基的配方为:

[0019]	蛋白胨	2%-3%,
	酵母浸粉	0.2%-0.5%,
	NaCl	0.2%-0.5%,
[0020]	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.3%-1%,
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3%-1%,
	粗糊精	0.5%-1%,
	余量为注射用水。	

[0021] 上述步骤T1中,将所述专用培养基配方中成分用注射用水溶解后,用2mol/L NaOH调pH值至8.0-8.5,116℃蒸汽灭菌40分钟,使用时再加入该培养基体积0.2%-0.5%的0.1g/ml的硫代乙醇酸钠溶液共同对所述菌株进行培养。

[0022] 上述步骤T1中,所述菌株的接种量为1%-2%;所述培养的温度为36-37℃;培养的时间为5-6小时。

[0023] 上述步骤T2中,所述灭活菌液的方法为:使用0.3%-0.5%甲醛溶液,37℃灭活2-3天,期间每日搅拌2-3次;所述离心的条件为4℃、6000-8000rpm离心20-30min。

[0024] 上述步骤T3中,所述浓缩上清菌液为使用孔径3-5KD的中空纤维柱浓缩5-10倍。

[0025] 本发明的又一方面提供一种专用培养基,用作上述菌株A/2018/NM/01产α外毒素

的培养基,其配方为:

	蛋白胨	2%-3%,
	酵母浸粉	0.2%-0.5%,
	NaCl	0.2%-0.5%,
[0026]	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.3%-1%,
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3%-1%,
	粗糊精	0.5%-1%,
	余量为注射用水。	

[0027] 上述专用培养基在使用时再加入该培养基体积0.2%-0.5%的0.1g/ml的硫代乙醇酸钠溶液。

[0028] 基于以上技术方案,本发明提供的羊A型产气荚膜梭菌菌株免疫原性良好、培养菌液毒素含量高,且培养稳定,对羊、兔及小鼠均具有致死性。其作为制苗用菌种,使用专用培养基在适宜条件下培养,可以获得毒素水平高的A型产气荚膜梭菌培养菌液,菌液经灭活后离心、使用膜孔径3-5KD的中空纤维柱浓缩菌液中α毒素,制苗,可以得到安全性好、低免疫剂量、效力可靠的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗。相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0029] 1) 本发明通过筛选培养菌液毒素含量高的菌株,获得一种免疫原性良好、培养稳定、且培养菌液毒素含量高、基础抗原效价高的羊A型产气荚膜梭菌菌株。

[0030] 2) 本发明提供的专用培养基配方简单,使用原料廉价易得,约为肉肝胃酶消化汤生产成本的30%,且培养时间短,大大降低了培养成本;使用本发明提供的专用培养基可于500L、1000L反应罐中配制以扩大培养,而使用传统厌气肉肝胃酶消化汤,因制备程序的繁琐性,影响其制备量,扩大规模培养困难;并且使用本发明提供的专用培养基获得的菌液不仅抗原毒素含量高,而且浊度明显降低,对于后期处理例如浓缩、纯化等具有明显有益的效果。

[0031] 3) 在制备上述羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗中摸索出适宜的灭活、离心及过滤除菌参数,核定了疫苗中有效抗原毒素含量,获得了一种安全性好、低免疫剂量、效力可靠的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗。该疫苗免疫山羊及绵羊后,于一免后21天即获得可靠的中和抗体效价,安全性良好,且较免疫常规羊三联四防灭活疫苗(含B型、D型产气荚膜梭菌),A型抗体明显提高。同时,免疫羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗的实验动物,抗A型毒素攻毒保护效果也明显优于常规免疫羊三联四防灭活疫苗。

[0032] 可见,本发明提供的羊A型产气荚膜梭菌菌株以及基于该菌株的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗的开发可以为我国羊A型产气荚膜梭菌病的防控提供有力保障,大大降低农牧区羊群因季节转换、饲养管理条件改变所致的猝死率,应用前景广阔。

## 附图说明

[0033] 图1是本发明分离的产气荚膜梭菌菌株的涂片镜检形态特征图;

[0034] 图2是本发明分离的产气荚膜梭菌菌株的血平板菌落溶血特性图。

### 具体实施方式

[0035] 为了有效预防羊A型产气荚膜梭菌病,本发明的一个目的在于提供一种安全性好、低免疫剂量、效力可靠的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗,为实现该目的,本发明筛选出一种产毒水平较高、免疫原性良好、培养特性稳定的羊A型产气荚膜梭菌菌株。同时使用一种羊A型产气荚膜梭菌专用培养基,培养获得的A型产气荚膜梭菌菌液毒素含量高,且产毒效果稳定,由此获得的灭活疫苗免疫保护能力更强。

[0036] 以下结合具体实施方式详细说明本发明。

[0037] 在下文中,仅简单地描述了某些示例性实施例。正如本领域技术人员可认识到的那样,在不脱离本发明的精神或范围的情况下,可通过各种不同方式修改所描述的实施例。因此,附图和描述被认为本质上是示例性的而非限制性的。

[0038] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

[0039] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和道德伦理能够获取的生物材料都可以按照实施例中的提示替换使用。

[0040] 本发明中提及的厌气肉肝汤按《中华人民共和国兽用生物制品规程》二000年版的组成及制备方法制备,组成如下表1所示:

[0041] 表1:厌气肉肝汤组成

	组成	含量
	牛肉	250g
	牛肝	250g
[0042]	蛋白胨	10g
	氯化钠	5g
	葡萄糖	2g
	蒸馏水	1000ml

[0043] 制备方法:

[0044] 1.取牛肉除去脂肪和筋膜,用绞肉机绞碎,与切成100g左右的肝块混合,加蒸馏水,充分搅拌后,冷浸20-24小时。

[0045] 2.煮沸20-60分钟,补足失去的水分,用白布滤过,弃去肉渣,取出肝块。

[0046] 3.滤液加入蛋白胨和氯化钠,加热溶化,用氢氧化钠溶液调整pH 7.8-8.0,加热煮沸10-20分钟。

[0047] 4.用滤纸或绒布滤过,加入葡萄糖搅拌,使其溶化。

[0048] 5.将煮过的肝块洗净,切成小方块,用蒸馏水充分冲洗后,分装于试管或中性玻璃瓶内,其量约为预计分装肉肝汤量的1/10。

[0049] 6.将滤液分装于含有肝块的中性容器中(如为试管,还应加入适量液体石蜡),以116℃高压蒸汽灭菌30-40分钟。

[0050] 7.用途:供一般厌气菌培养及检验用。

[0051] 本发明中所提及的稀释液(蛋白胨水)根据《中华人民共和国兽用生物制品规程》二000年版的组分及制备方法制备,组分如下表2所示:

[0052] 表2:蛋白胨水组分

	组成	含量
[0053]	蛋白胨	10g
	氯化钠	5g
	蒸馏水	1000ml

[0054] 制备方法:

[0055] 1.将以上材料混合,加热溶解,用氢氧化钠溶液调整pH值6.8-7.2。

[0056] 2.煮沸滤过,分装于中性容器中。

[0057] 3.116℃高压蒸汽灭菌20分钟。

[0058] 4.用途:供无菌检验稀释液(含蛋白胨1g),及细菌计数稀释液和糖发酵(含蛋白胨10g)。

[0059] 本发明中所提及的厌气肉肝胃酶消化汤根据《中华人民共和国兽用生物制品规程》二000年版的组成及制备方法制备,组成如下表3所示:

[0060] 表3:厌气肉肝胃酶消化汤组成

	组成	含量
	牛肉	200g
	牛肝	50g
[0061]	盐酸	10-11ml
	胃蛋白酶(1:3000)	3-4g
	蛋白胨	10g
	糊精	10g
	水(去离子水或蒸馏水)	1000ml

[0062] 制备方法:

[0063] 1.在65℃左右温水内加入盐酸和绞碎的牛肉、肝,充分搅匀,再加入胃蛋白酶充分搅拌,混合后的温度应在56-58℃。

[0064] 2.置53-55℃条件下消化22-24小时,前10小时每小时充分搅拌一次。

[0065] 3.提取上清液,加热至80℃,然后加入蛋白胨煮开,调pH至7.6-7.8。煮沸10分钟,滤过或经沉淀后取上清液,按量加入糊精溶解后分装。

[0066] 4.116℃高压蒸汽灭菌40分钟。

[0067] 实施例1:羊A型产气菌荚膜梭菌菌株分离、鉴定和筛选

[0068] 1、羊A型产气菌荚膜梭菌菌株分离、鉴定及毒素最小致死量检测

[0069] 将内蒙古某羊场2只猝死羊进行病理解剖,采集出血明显肠段、肺脏、肾脏等部位病料,无菌接种于10%绵羊脱纤血平板,将血平板置厌氧菌培养专用培养盒、并放置1个反



应包(培养盒型号为:MGC AnaeroPack 2.5L c-31;反应包型号为:AnaeroPack-Anaero C-1),于37℃过夜培养;第二天在每个血平板挑选独立、菌落边缘整齐、稍隆起、双溶血环明显、直径大小不同的3-5个菌落(经PCR型特异性鉴定及血清学鉴定为A型产气荚膜梭菌)继续接种于新鲜的10%绵羊脱纤血平板,进行第二代纯化,37℃温箱培养18-24小时,然后在每个血平板同样挑选独立、菌落边缘整齐、稍隆起、双溶血环明显、直径大小不同的各3-5个菌落接种于厌氧肉肝汤进行增菌培养,37℃温箱培养18-24小时。将每支纯化菌株培养物离心(4℃、3000rpm离心20min)、取离心上清液过滤(用孔径为0.45μm的滤膜),使用敏感的KM小白鼠分别检测菌液毒素最小致死量,进行菌株毒素对比筛选。具体方法为:将每支菌株培养物过滤上清液,用1%蛋白胨水进行适宜滴度稀释,尾静脉接种小白鼠,每个滴度接种2只,0.2ml/只,观察24小时,以使小鼠2/2死亡的最低剂量组,为该菌株最小致死量。通过对数个脏器病料、多个菌株分别纯化两代后,选取30个菌株的菌液培养物测定毒素最小致死量,筛选出培养菌液毒素含量最高的菌株,以下称A/2018/NM/01菌株。

#### [0070] 1.1、涂片镜检形态特征、溶血特性和培养特性的鉴定

[0071] 经鉴定,如图1所示,示出了A/2018/NM/01菌株的涂片镜检(100倍油镜观察)形态特征,可见该菌株的涂片镜检形态特征为常散在,粗大革兰氏阳性杆菌。如图2所示,示出了该菌株的血平板菌落溶血特性,可见该菌株的溶血特性为双溶血环,内层完全溶血,外层不完全溶血。A/2018/NM/01菌株的培养特性为牛乳暴裂发酵:接种石蕊牛奶培养基(依据《中华人民共和国兽用生物制品规程》二000年版中公开的组成进行制备)6-12小时,出现颜色变浅、乳酪样物质;上述涂片镜检形态特征、溶血特性以及培养特性符合产气荚膜梭菌特性。

#### [0072] 1.2、PCR型特异性鉴定

[0073] 下表4列出了产气荚膜梭菌PCR分型判定的标准,经α、β、ε、ι毒素特异性引物(参照田冬青,“产气荚膜梭菌的多重PCR定型α、β、和ε毒素基因的克隆、表达和抗血清的制备”中公开的特异性引物序列,由北京华大基因有限公司合成)进行产气荚膜梭菌多重PCR分型鉴定,同时设立A、B、C、D、E型产气荚膜梭菌标准阳性对照,检测结果显示,上述分离的A/2018/NM/01菌株泳道仅有402bp大小的一个α条带,与A型产气荚膜梭菌相符,因此A/2018/NM/01菌株的PCR分型结果为A型产气荚膜梭菌。

[0074] 表4:产气荚膜梭菌PCR分型判定标准

菌型	α	β	ε	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

[0076] 备注:“+”表示出现相应目的条带,“-”表示无相应目的条带。

#### [0077] 1.3、血清学鉴定

[0078] 下表5列出了血清中和试验结果判定标准,使用中国兽药监察所的产气荚膜梭菌

A、B、C、D型定型血清,分别中和上述分离的A/2018/NM/01菌株毒素1个MLD,同时设毒素对照小鼠2只,结果如下表6所示。

[0079] 表5:血清中和试验结果判定标准

[0080]

血清型 毒素型	A	B	C	D
A	+	+	+	+
B	-	+	+	-
C	-	+	+	-
D	-	+	-	+

[0081] 备注:“+”表示小鼠2/2健活,可以中和。“-”表示小鼠死亡,不能中和。

[0082] 表6:血清学鉴定结果

[0083]

定型血清 检测组	A	B	C	D
分离菌株毒素	+	+	+	+
毒素对照	小鼠 2/2 死亡			

[0084] 备注:“+”表示小鼠2/2健活,可以中和。

[0085] 由上表6数据可知,上述分离的A/2018/NM/01菌株毒素与A、B、C、D型定型血清均可以中和,并且毒素对照组小鼠均死亡,根据血清中和试验结果判定标准可知上述分离的A/2018/NM/01菌株毒素型为A型,结合上述涂片镜检形态特征、溶血特性、培养特性以及PCR分型鉴定结果,判定上述分离的A/2018/NM/01菌株为A型产气荚膜梭菌菌株。

[0086] 上述菌株A/2018/NM/01已经由金宇保灵生物药品有限公司于2018年11月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC,北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏号为:CGMCC No.16894,分类命名为:产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)。

[0087] 2、A/2018/NM/01菌株免疫原性评价

[0088] 将上述筛选出的菌株A/2018/NM/01,经繁殖菌种(繁殖方法为:菌种含量2%,37℃静置过夜培养)、培养菌液(培养方法及培养条件为:菌种含量1-2%,37℃静置培养4-5小时)、使用0.3%-0.5%(V/V)甲醛溶液灭活,37℃灭活2-3天,每日振摇2-3次、4℃、6000-8000rpm离心20-30min(优选4℃、8000rpm离心30min)、再使用膜孔径3-5KD的中空纤维柱膜浓缩离心上清液5-10倍,用浓缩后的上述菌株的离心上清液液配制氢氧化铝胶苗,配制方法为:将氢氧化铝胶高压灭菌后,浓缩上清液与无菌氢氧化铝胶按体积比5:1混合,充分摇匀至无可见性铝胶颗粒,无菌分装。将氢氧化铝胶疫苗肌肉免疫接种1.5-2.0kg新西兰大耳白兔4只,2mL/只,同时设两只未免疫空白兔做对照组。于免疫后21天,免疫组及空白对照组均耳静脉攻击羊A型1个致死量毒素,观察120小时,免疫组4只兔均健活,空白对照兔2只均

死亡。说明,利用该菌株制备得到的疫苗对实验动物兔免疫原性试验符合规定。

[0089] 3、A/2018/NM/01菌株稳定性评价

[0090] 将菌株A/2018/NM/01培养5-10代,将每代培养物离心,取上清液过滤后,用1%蛋白胨水进行适宜滴度稀释,尾静脉接种小白鼠,每个滴度接种2只,0.2ml/只,观察24小时,以使小鼠2/2死亡的最低剂量组,为该代菌株最小致死量。结果显示,每代菌株的毒素水平无下降趋势,表明该菌株传代稳定性良好,可用于疫苗用菌株。

[0091] 实施例2:优化羊A型产气菌荚膜梭菌的培养条件

[0092] 本实施例优化羊A型产气菌荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01的培养过程中的培养基配方,及培养菌液收获时间,以获得产 $\alpha$ 毒素水平较高的菌液。

[0093] 用于培养产气荚膜梭菌的产毒素培养基,其传统培养基是肉肝胃酶(膜)消化汤,该培养基培养厌氧菌效果好,毒力强,但在实际生产中存在以下问题:成分复杂,难以标准化,其主要成分牛肉等受动物品种、年龄、新鲜程度影响大,造成培养基批次间质量不稳定;制作繁琐,牛肉预处理、煮沸及滤过、胃酶(膜)的活力及消化程度判断,均需要较高的经验值(朱良全等,“A型产气荚膜梭菌合成培养基使用参数及培养毒素浓缩工艺研究”,中国兽药杂志,2012,47(9):34-37)。

[0094] 针对上述缺点,已有文献报导产气菌荚膜梭菌培养基配方(蒋玉文等,“羊快疫、猝狙(或羔羊痢疾)肠毒血症灭活疫苗复合培养基的研究”,中国兽药杂志,1994,28(1):3-8),该培养基配方(配方1)如下表7所示:

[0095] 表7:培养基配方1组分及含量

成分	含量(%单位为 g/100mL)
蛋白胨	1.5%
酵母浸出粉	0.25%
氯化钠(NaCl)	0.25%
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	1%
粗糊精	1%
活性炭	0.1%
余量为蒸馏水	

[0097] 将上述成分用蒸馏水溶解后,用2mol/LNaOH调pH值至8.0-8.5后,分装,116℃蒸汽灭菌40分钟,使用时按培养基总量加入2%营养液(为维生素、微量元素、葡萄糖的混合无菌滤液)(蒋玉文等,“羊快疫、猝狙(或羔羊痢疾)肠毒血症灭活疫苗复合培养基的研究”,中国兽药杂志,1994,28(1):3-8)。

[0098] 本实施例在上述培养基配方1的基础上,适当优化获得培养基配方2,见下表8所示。

[0099] 表8:培养基配方2组分及含量

[0100]

成分	含量 (%单位为 g/100mL)	来源
蛋白胨	2-3%	北京奥博星生物技术有限责任公司
酵母浸出粉	0.2%-0.5%	OXOID
氯化钠 (NaCl)	0.2%-0.5%	天津北联公司
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	0.3%-1%	天津申泰公司
粗糊精	0.5%-1%	天津市科盟化工工贸有限公司
磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.3%-1%	山东聊城
余量为注射用水		

[0101] 将上述成分用注射用水溶解后,用2mol/L NaOH调pH值至8.0-8.5,分装,116℃蒸汽灭菌40分钟,使用时加入培养基体积0.2%-0.5%的10倍稀释的硫代乙醇酸钠溶液(0.1g/ml),目的是为了在培养中提供更好的厌氧环境。

[0102] 使用培养基配方1、传统厌气肉肝胃酶消化汤、培养基配方2(具体如表9所示),于相同培养条件(培养方法及培养条件为:菌种含量1-2%,37℃分别静置培养5、6、7小时)下,进行羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01产毒培养基筛选及不同收获时间对比试验。将得到的培养菌液,分别用KM小鼠测定菌液毒素最小致死剂量(测定方法为:将菌液4℃、3000rpm离心20min、取离心上清过滤(用孔径为0.45μm的滤膜)、毒素液稀释至适宜滴度,采用小白鼠尾静脉注射,测定对小白鼠的最小致死剂量),并计算菌液毒素含量(由毒素最小致死量换算为菌液毒素含量计算公式为:每毫升菌液毒素含量(MLD/ml)=1/毒素最小致死量(ml))。试验结果见下表10,其中批号S2017001、S2017002、S2017003为不同时间的3批试验,其中每批“-1”所用培养基为配方1培养基,“-2”所用培养基为配方2培养基,“-3”所用培养基为传统厌气肉肝胃酶消化汤。

[0103] 表9:培养基配方2具体组分及含量

成分	含量 (%单位为 g/100mL)
蛋白胨	2.5%
酵母浸出粉	0.3%
氯化钠 (NaCl)	0.5%
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	0.6%
粗糊精	1.0%
磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.6%
余量为注射用水	

[0105] 表10:三种配方培养基不同培养时间菌液毒素含量对比试验结果

批号及编号	不同收获时段菌液毒素含量(MLD/ml)		
	5h	6h	7h
[0106] S2017001-1	20	10	10
S2017001-2	40	40	20
S2017001-3	40	40	40
S2017002-1	20	20	10
S2017002-2	80	40	20
S2017002-3	40	40	20
[0107] S2017003-1	20	20	10
S2017003-2	80	40	20
S2017003-3	40	20	20

[0108] 表10结果显示,于培养时间5小时收获,使用肉肝胃酶消化汤与培养基配方2,菌液毒素含量明显优于使用培养基配方1。且于5小时收获,使用培养基配方2,菌液毒素含量会略高于肉肝胃酶消化汤。使用培养基配方2,于5-6小时收获菌液毒素含量明显高于7小时收获时段的菌液毒素含量。

[0109] 另外,专利文献CN104623651A中公开了一种家兔魏氏梭菌病的A型产气荚膜梭菌灭活疫苗的制备方法,虽然其中也提及一种培养基配方:

[0110] 每1000mL去离子水中含:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.29g,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.02g,

$\text{NaCl}$  8.0g,

[0111] 蛋白胨 20g,

糊精 10g,

酵母提取物 20g,

L-精氨酸 12g。

[0112] 但使用该培养基配方在与前述相同培养条件下培养羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01,培养菌液毒素含量较低,测定菌液毒素含量仅达10-20MLD/mL。

[0113] 基于上述试验结果,使用优化的培养基配方2培养羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01,制备得到菌液毒素效价优于现有技术中存在的其他种类的培养基配方,并且培养基配方2与目前推广使用的肉肝胃酶消化汤比较而言,具有以下有益效果:1)制作程序更加简便;2)配方2培养基使用原料成本明显降低,约为肉肝胃酶消化汤生产成本的30%;3)使用配方2培养基于500L、1000L反应罐中配制可行,而使用肉肝胃酶消化汤,因制备程序的繁琐性,影响其制备量,扩大规模培养困难;4)使用配方2培养基制备菌液,其菌液浊度明

显低于使用肉肝胃酶消化汤制备的菌液,对于后期处理,配方2的浓缩、纯化处理量、浓缩倍数、纯化质量参数均明显高于肉肝胃酶消化汤。同时,培养基配方2的三个不同时间批次培养基(配方中各组分用量相同)均能够实现较好的培养效果,制备得到的菌液不仅毒素含量较高,而且批次间效果基本保持稳定,显示培养基配方2具有优异的稳定性和产毒性能。

[0114] 因此,优选培养基配方2为羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01制备疫苗用专用培养基,并且优选培养时间为5-6小时收获培养菌液。下表11列出了培养基配方2不同组分含量的配方。

[0115] 表11:培养基配方2组分及含量(%单位为g/100mL)

[0116]

配方	蛋白胨	酵母浸出粉	氯化钠(NaCl)	磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	粗糊精	磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
配方 2-1	2%	0.5%	0.2%	1%	1%	1%
配方 2-2	2.5%	0.35%	0.3%	0.6%	0.75%	0.65%
配方 2-3	2.5%	0.2%	0.25%	0.3%	1%	0.3%

[0117] 使用上表11所列培养基在与前述相同培养条件下培养羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01时,结果表明,上表11所列的配方2培养基均可以达到与表9所列配方2的培养基基本相同的效果,即5-7h收获的菌液毒素含量与表10所列配方2毒素含量数据相当。

[0118] 实施例3:羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗的制备

[0119] 选择免疫原性良好的羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01作为制苗用菌种,具体采用以下方法制备得到羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗:

[0120] 1、羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01的培养

[0121] 使用上述实施例2中培养基配方2培养羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01,培养条件为36-37℃下静置培养5-6小时,得到α毒素含量高的羊A型产气荚膜梭菌培养菌液。

[0122] 2、菌液灭活,并进行无菌、脱毒检验

[0123] 将培养获得的羊A型产气荚膜梭菌培养菌液灭活的方法为:0.3%-0.5% (V/V) 甲醛溶液灭活,37℃灭活2-3天,每日振摇2-3次。

[0124] 无菌检验方法:参照《中华人民共和国兽用生物制品规程二000版》操作。

[0125] 脱毒检验方法:用体重16-20g小白鼠4只,其中2只,每只腹腔注射灭活脱毒后的菌液0.4mL,观察3-5日,另2只尾静脉注射经离心、过滤后灭活毒素液0.4mL/只,观察24小时,应全部健活。

[0126] 结果显示,该实施例中所获得的经灭活脱毒处理后的菌液无菌检验合格,脱毒检验的4只小白鼠均健活,脱毒检验合格。

[0127] 3、菌液离心

[0128] 对经灭活的羊A型产气荚膜梭菌培养菌液进行离心,离心条件为:4℃、6000-8000rpm离心20-30min,优选4℃、8000rpm离心30min,获得上清菌液。

[0129] 4、上清菌液浓缩,制备灭活疫苗

[0130] 本实施例通过优选3-5KD的中空纤维柱浓缩上清菌液,提高抗原有效毒素回收率达80%以上,可以制备高效价抗原。在羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗的使用过程中,实现提

高免疫效力,降低免疫剂量的目标。

[0131] 使用两批不同抗原效价的半成品菌液,分别浓缩相同倍数,根据高毒素回收率(80%)设计,以浓缩菌液与高压灭菌后的氢氧化铝胶按体积比为5:1混合,充分摇匀后,无菌分装,制备两批羊A型不同毒素含量氢氧化铝胶疫苗,如下表12所示:

[0132] 表12:两批不同毒素含量疫苗配制

[0133]

疫苗批号	批号及编号	半成品抗原批号	菌液毒素含量(MLD/ml)	浓缩倍数	浓缩菌液:氢氧化铝胶
S2018002	S2018002-1	I18005	40	5倍	5:1
	S2018002-2	I18008	80	5倍	5:1
S2018003	S2018003-1	I18005	40	10倍	5:1
	S2018003-2	I18008	80	10倍	5:1

[0134] 将制备的以上两批试验苗,分别免疫易感兔(体重1.5-2.0kg,非免兔)及易感绵羊(1岁以内,A型产气荚膜梭菌毒素中和抗体阴性),于免疫后21日,试验兔采血检测中和抗体(每组免疫4只兔等量血清混合,检测血清中和抗体效价),并分别攻击1个致死量的羊A型毒素,同时设空白对照兔2只。于免疫后21日,试验羊采血检测中和抗体(免疫4只羊分别检测血清中和抗体效价)。免疫剂量及试验结果见下表13:

[0135] 表13:两批试验苗免疫效果对比

[0136]

批号及编号	兔检验			羊检验		
	免疫剂量	中和抗体	攻毒结果	免疫剂量	中和抗体	接种抗原毒素含量
S2018002-1	0.5ml	n<1	保护	1ml	n<1	133.4MLD/ml(按毒素浓缩回收率80%计算)
			死亡		n<1	
			死亡		n<1	
			死亡		n≥1	
S2018002-2	0.5ml	n≥1	保护	1ml	n≥1	266.7MLD/ml(按毒素浓缩回收)
			保护		n≥1	

[0137]

			保护		n<1	率 80%计算)
			死亡		n≥1	
S2018003-1	0.5ml	n≥1	保护		n≥1	266.7 MLD/ml (按毒素浓缩回收 率 80%计算)
			保护	1ml	n≥1	
			保护		n≥1	
			保护		n≥1	
S2018003-2	0.5ml	n≥1	保护		n≥1	533.3MLD/ml (按毒素浓缩回收 率 80%计算)
			保护	1ml	n≥1	
			保护		n≥1	
			保护		n≥1	

[0138] 注:上表10中“接种抗原毒素含量”为理论计算值,计算公式:接种抗原毒素含量=菌液毒素含量×浓缩倍数×80%(验证浓缩回收率结果)×每毫升疫苗中抗原量比。

[0139] 上表13数据显示:当免疫羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗用于防控羊的A型猝死症时,如使用接种抗原毒素含量133.4MLD/ml的疫苗免疫羊1ml时,即接种抗原毒素量(接种抗原毒素含量×免疫剂量)不超过133.4MLD时,免疫羊只中和抗体效价达1以上的比例仅达25%,而使用抗原毒素含量达266.7MLD/ml以上的疫苗免疫羊1ml时,即免抗原毒素量达266.7MLD以上时,免疫羊只中和抗体效价达1以上的比例可达75%-100%,有效防控该疫病。同样,使用兔进行攻毒保护试验,结果基本一致,当使用抗原毒素含量133.4MLD/ml的疫苗免疫兔0.5ml时,攻毒保护率仅达25%,使用抗原毒素含量达266.7MLD/ml以上的疫苗免疫兔0.5ml时,免疫保护率可达75%以上。

[0140] 上表12和上表13数据显示:使用上述浓缩方法,即通过使用3-5KD的中空纤维柱浓缩离心后的上清液,按抗原有效毒素回收率80%计算,对于毒素含量为40MLD/ml的上清菌液,浓缩5倍即可得到接种抗原毒素含量为133.4MLD/ml的试验苗,即浓缩菌液中毒素含量为160MLD/ml,浓缩10倍即可得到接种抗原毒素含量为266.7MLD/ml的试验苗,即浓缩菌液中毒素含量为320MLD/ml,浓缩5倍时免疫羊的抗体阳性率及免疫兔的保护率仅达25%左右,浓缩10倍时免疫羊的抗体阳性率及免疫兔的保护率可达75%以上;对于毒素含量为80MLD/ml的上清菌液,浓缩5倍即可得到接种抗原毒素含量为266.7MLD/ml的试验苗,即浓缩菌液中毒素含量为320MLD/ml,免疫羊的抗体阳性率及免疫兔的保护率可达75%以上,当浓缩10倍时,甚至达到接种抗原毒素含量为533.3MLD/ml的试验苗,即浓缩菌液中毒素含量为640MLD/ml,免疫羊的抗体阳性率及免疫兔的保护率更是达到100%。

[0141] 因此,基于以上免疫效果对比结果,使用孔径为3-5KD的中空纤维柱浓缩使用上述实施例2的配方2培养基培养羊A型产气荚膜梭菌菌株A/2018/NM/01制备得到的高毒素含量(40-80MLD/ml)基础菌液。根据基础菌液毒素含量测定结果,确定菌液浓缩倍数,对于毒素含量为40-80MLD/ml的基础菌液,浓缩倍数达10-5倍,即可获得毒素含量适当的浓缩菌液,进而制备得到质量可靠的灭活疫苗,免疫羊只抗体阳性率达75%以上。

[0142] 实施例4:羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗与传统羊三联四防灭活苗(干粉苗)效果对



比

[0143] 用传统羊三联四防灭活苗(干粉苗)与羊A型试验苗进行免疫试验,其中羊三联四防灭活苗为两个市售疫苗(羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症四联干粉灭活疫苗1和2,以下简称羊三联四防1和羊三联四防2),羊A型试验苗为本发明制备羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗。每种疫苗免疫羊(1岁以内,A、B、C、D型产气荚膜梭菌毒素中和抗体阴性)各4只,其中羊A型试验苗免疫剂量1ml,羊三联四防灭活苗(干粉),按说明书要求,用氢氧化铝胶盐水稀释后,免疫量1ml。于免后21天,分别采血,分离血清,4只羊血清等量混合检测抗体中和效价,其中羊三联四防苗检测A型、B型、C型、D型中和抗体效价,而羊A型试验苗免疫羊检测A型抗体中和效价。免疫剂量及免疫后中和抗体效价结果见下表14:

[0144] 表14:羊三联四防灭活苗与羊A型试验苗中和抗体效价检测结果

[0145]

疫苗名称	疫苗批号(或来源)	不同型别中和抗体效价检测结果			
		A 型	B 型	C 型	D 型
羊 A 型试验苗	S2018003-1	1 以上	-	-	-
	S2018003-2	1 以上	-	-	-
羊三联四防灭活苗(干粉苗)	羊三联四防 1	0	1 以上	1 以上	3 以上
	羊三联四防 2	0	1 以上	1 以上	3 以上

[0146] 上表14数据显示,市售的羊三联四防1和羊三联四防2灭活苗免疫羊后,检测B型、C型、D型中和抗体效价均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程二000版》质量要求,但A型中和效价低于1。而免疫羊A型试验苗两个批号中A型中和效价均达1以上。即已有的羊三联四防灭活疫苗(羊三联四防1和羊三联四防2)尚不能防控目前流行严重的羊A型产气荚膜梭菌所致的猝死症,而本发明制备得到的羊A型产气荚膜梭菌灭活疫苗可以用于有效防控目前流行严重的羊A型产气荚膜梭菌所致的猝死症。

[0147] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

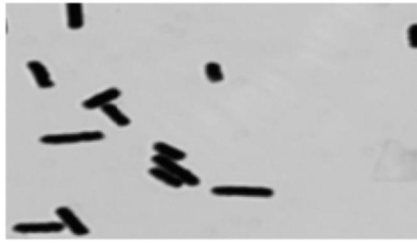


图1

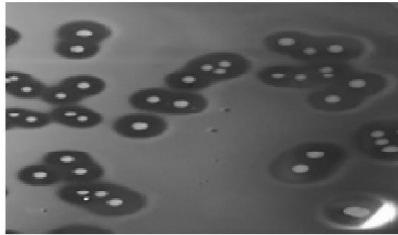


图2