

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20245387

· 综述 ·

产气荚膜梭菌毒素疫苗研究进展

王 东^{1,2}, 张思雨^{1,2}, 丁雅文^{1,2}, 曾 瑾^{1,2}

(宁夏大学 1. 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室; 2. 生命科学学院, 宁夏回族自治区 银川 750021)

[摘要] 产气荚膜梭菌是一种引起人类和动物肠道感染和组织坏死的重要食源性病原体, 致死因子是其产生的多种外毒素。合理使用抗菌药物及健康养殖需求的增加使疫苗预防更为重要。然而, 传统的产气荚膜梭菌外毒素疫苗可能存在效果不稳定及残留毒素和甲醛等问题, 引发了人们对这些疫苗安全性的担忧。该文系统介绍了产气荚膜梭菌的传统类毒素疫苗、基因工程重组疫苗及基于反向疫苗学和免疫信息学设计的表位肽疫苗最新研究进展, 为研发制备有效、安全的新型产气荚膜梭菌毒素疫苗提供新思路。

[关键词] 产气荚膜梭菌; 毒素; 流行病学; 类毒素疫苗; 重组疫苗

[中图分类号] R186 R378

Research progress in *Clostridium perfringens* toxin vaccines

WANG Dong^{1,2}, ZHANG Si-yu^{1,2}, DING Ya-wen^{1,2}, ZENG Jin^{1,2} (1. Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in Western China; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

[Abstract] *Clostridium perfringens* is an important foodborne pathogen that causes intestinal infections and tissue necrosis in both human and animals. A variety of exotoxins it produces are lethal. The increasing demand for rational use of antimicrobial agents and healthy farming make the implementation of vaccination critically important. However, traditional *Clostridium perfringens* exotoxin vaccines may have problems such as inconsistent efficacy, residual toxins and formaldehyde, raising concerns about the safety of these vaccines. This article systematically introduces the latest research progress in traditional toxoid vaccine, genetically engineered recombinant vaccines, and epitope peptide vaccines designed based on reverse vaccinology and immunoinformatics for *Clostridium perfringens*, providing new ideas for the development and preparation of effective and safe novel *Clostridium perfringens* toxin vaccines.

[Key words] *Clostridium perfringens*; toxin; epidemiology; toxoid vaccine; recombinant vaccine

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)作为重要的人兽共患致病菌, 在世界范围内被广泛关注, 可引起患者肠毒血症、坏死性肠炎、气性坏疽, 甚至猝死。C型产气荚膜梭菌对新生幼畜的影响尤其严重^[1-2]。“饲料禁抗令”颁布后, 产气荚膜梭菌引起的家畜患病率明显增加^[3-4]。近年来, 产气荚膜梭菌病的频发给当地农牧民带来了沉重的经济负担。该菌的致病因子是其分泌的多种致死性毒素, 对易

感动物进行类毒素疫苗接种是经济、有效的防控措施。传统梭菌类毒素疫苗通过收获经高浓度甲醛灭活后的强毒株分泌的毒素制备而成, 存在效力不稳定、风险高、不良反应大等缺点, 严重影响产气荚膜梭菌病的防控。本文总结产气荚膜梭菌传统类毒素疫苗、基因工程重组疫苗及基于反向疫苗学和免疫信息学设计的表位肽疫苗的最新研究进展, 为研发新型产气荚膜梭菌疫苗提供理论参考。

[收稿日期] 2023-12-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32360882); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2023BCF01038); 宁夏自然科学基金重点项目(2022AAC02019)

[作者简介] 王东(2000-), 男(回族), 宁夏回族自治区吴忠市人, 硕士研究生在读, 主要从事动物病原生物学研究。

[通信作者] 曾瑾 E-mail: zengjin@nxu.edu.cn

1 产气荚膜梭菌的生物学特性及流行病学情况

产气荚膜梭菌分布广泛,多见于土壤、粪便及人畜肠道中^[3],其分泌的多达 18 种外毒素是其致病因子,其中 α 、 β_1 、 β_2 、 ϵ 、 ι 等是主要的致死性毒素。这些毒素单独或协同作用,累及胃肠道、软组织和其他多种器官,引起神经元功能障碍(神经毒素),甚至导

致病患死亡^[5-6]。但何种条件下会诱发产气荚膜梭菌分泌毒素,毒素间如何协同作用等问题均是该菌研究中的难题。依据其产生的主要致死性毒素与其抗毒素的中和试验,2017 年在美国安娜堡举行的“第十届梭状芽胞杆菌分子生物学及其发病机制”国际会议上将产气荚膜梭菌的分类扩展为 A~G 七个血清型^[7]。七种血清型的产气荚膜梭菌引起的多种疾病均是一种或多种毒素协同作用的结果。见表 1。

表 1 产气荚膜梭菌主要致死性毒素相关信息

毒素	生物学活性	编码基因位置及大小	蛋白特性	菌株血清型	所致疾病
产气荚膜梭菌 α 毒素 (CPA) ^[5,7]	胆固醇依赖性溶血素成孔毒素;磷脂酶 C 活性;溶血性;坏死性	染色体,1 200 bp	含锌离子酶,370 个氨基酸,42.5 kDa	所有类型	骨骼肌坏死、皮下水肿和肺气肿等气性坏疽;多器官衰竭、休克和死亡;出血性、坏死性肠炎
产气荚膜梭菌 β_1 毒素 (CPB1) ^[5,7]	β 型成孔毒素;致死性毒素;坏死性;神经毒性	大毒力质粒,1 011 bp	原毒素含 336 个氨基酸,分泌过程中去除 27 个氨基酸信号肽;成熟毒素为 35 kDa	B,C	人和家畜的出血性痢疾、坏死性肠炎及肠毒血症
产气荚膜梭菌 β_2 毒素 (CPB2) ^[5,7]	致死性毒素;坏死性	大毒力质粒,798 bp	成熟毒素为 235 个氨基酸,28 kDa	所有类型	出血性、坏死性肠炎;小肠出血性黏膜溃疡
产气荚膜梭菌 ϵ 毒素 (ETX) ^[5,7]	致死性毒素	大毒力质粒,1 119 bp	以 33 kDa 的低活性毒素原分泌,蛋白酶去除 N 端 13 个、C 端 29 个氨基酸后,成为毒性增加 1 000 倍的 27 kDa 成熟毒素	B,D	坏死性结肠炎;羊软肾病;可作用于中枢神经系统、肺和心脏
产气荚膜梭菌 ι 毒素 (ITX) ^[5,7]	致死性毒素;破坏细胞骨架	共轭大质粒上两个独立基因, <i>iap</i> 1 365 bp, <i>ibp</i> 2 622 bp	酶活性 Ia 亚基和结合 Ib 亚基组成的二元毒素,无活性的 Ib 亚基(100 kDa)在胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶去除 20 kDa N 端片段后具备活性	E	多种动物的肠道疾病
产气荚膜梭菌肠毒素 (CPE) ^[5,6]	致死性成孔毒素	染色体或质粒,957 bp	319 个氨基酸,35 kDa	C,D,E	腹泻和腹部绞痛;抗菌药物相关性腹泻;散发性腹泻;婴儿猝死综合征
产气荚膜梭菌坏死性肠炎 B 样毒素 (NetB) ^[5,7]	致死性成孔毒素	质粒,1 371 bp	322 个氨基酸,33 kDa	G	鸡群的坏死性肠炎

产气荚膜梭菌引起的人和多种动物的肠毒血症、坏死性肠炎、气性坏疽、全身性疾病,甚至猝死,都难以预防和治疗,因而在世界范围内被广泛关注^[8-10]。据美国疾病预防控制中心(CDC)统计,产气荚膜梭菌病是美国第二大常见的食源性疾病,占食源性疾病总发病率的 26%^[5];我国居民饮食结构多以熟食为主,由产气荚膜梭菌所引起的食源性感染事件较少,但也有食源性感染相关疾病暴发的事件报道^[11]。

产气荚膜梭菌病在畜禽养殖生产中的危害性更令人关注,患病动物往往短时间内迅速发病,出现休克乃至死亡^[12]。现代养殖业为预防高密度养殖动物罹患传染性疾病,常在饲料中添加抗菌药物。我国农业农村部第 194 号公告要求自 2020 年起在饲料中全面禁止添加含有促生长类药物饲料添加剂^[13],将抗菌药物类生长促进剂从动物饲料中撤出,产气荚膜梭菌所引发的坏死性肠炎的患病率明显增加^[4,14]。据报道,该菌引起的疾病在猪群中发病率可达 5.8%~9.7%(病死率 67.2%),牛发病率

7.2%~7.7%(病死率 98.3%),羊发病率 > 3.1%,家禽发病率 > 50%(病死率 10%~40%)^[15-19]。仅 C 型产气荚膜梭菌每年给全球家禽业造成约 60 亿美元的生产损失和控制成本^[20]。

2 产气荚膜梭菌病的治疗与预防

人类感染产气荚膜梭菌时,往往通过给予大剂量的青霉素 G、高压氧和单克隆抗体,或通过手术切除受累组织来治疗。但这些治疗方法仅是一种替代方案,对人类不完全有效。20 世纪末,产气荚膜梭菌引起的一种名为“Pigbel 病”的坏死性肠炎曾在东南亚部分地区常见,特别是在巴布亚新几内亚高地,该病曾是当地儿童死亡的常见原因之一,直到普及相关疫苗的接种后才得到控制^[21]。

对于农场动物,上述治疗措施成本高,且因病畜死亡非常快而难以实施。一般情况下,动物养殖场通过严格的清洁和消毒程序可以防止产气荚膜梭菌

污染养殖环境,减轻感染压力。养殖业虽然可以通过使用抗菌药物保证更经济的健康动物生产,但不加选择地长期使用抗菌药物可能导致产气荚膜梭菌分离株耐药性迅速发展^[22]。一项针对产气荚膜梭菌的广泛基因组调查分析发现,在产气荚膜梭菌的基因组和质粒中发现了多种抗菌药物耐药基因,相继鉴定出可能对四环素类、杆菌肽、氯霉素、大环内酯类和林可酰胺类耐药的基因^[23-24]。因此,疫苗是一种预防产气荚膜梭菌引起的多种疾病无可替代的高效工具。疫苗通过多种机制发挥作用,以细菌病原体为目标的疫苗,在保持充足免疫水平的前提下,不仅减少了病原体引起的感染,还避免引起细菌对抗菌药物的耐药性。

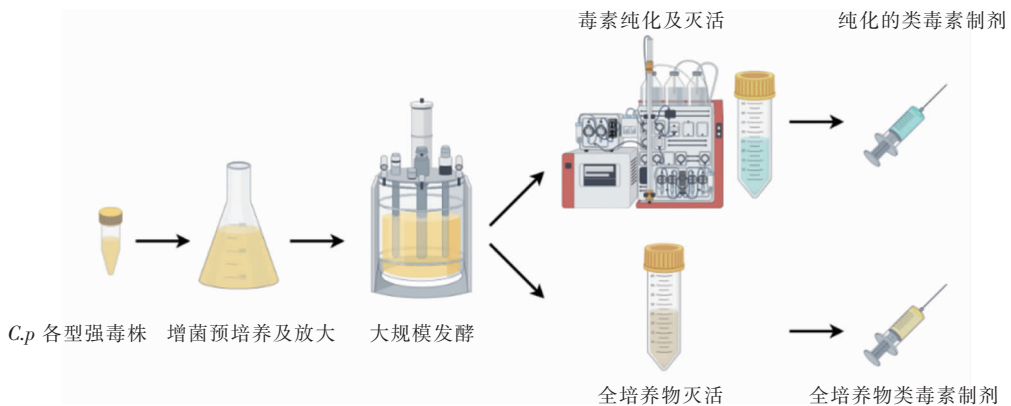
3 产气荚膜梭菌类毒素疫苗研究进展

3.1 传统类毒素疫苗生产中存在的问题及原因

目前国内外养殖企业通常通过免疫接种 B、C、D 型产气荚膜梭菌强毒株的粗类毒素疫苗来预防该菌在

家畜、家禽养殖场中的暴发,避免家畜、家禽因产气荚膜梭菌感染引起的坏死性肠炎、发育迟缓和急性猝死^[25-28]。当前商品化的兽用疫苗是 α 、 β 和 ϵ 类毒素或多价类毒素制剂^[26,29],尚无商业化的 ι 、CPE 或 NetB 类毒素疫苗。C 型产气荚膜梭菌暴发可给农业部门带来严重的经济损失,未接种疫苗的畜群的病死率超过 50%^[30-32]。随着农场养殖动物数量的增加及动物饲料“禁抗令”的实施,产气荚膜梭菌所引发的坏死性肠炎的患病率明显增加,相应的产气荚膜梭菌疫苗的需求也会逐年增加^[26]。

包括产气荚膜梭菌在内的致病性梭状芽孢杆菌类毒素疫苗的生产方法是在含有动物源性原材料、葡萄糖或其他可发酵碳水化合物的复杂培养基中,在最适的 pH 范围(5.5~8.0)^[33-34]内,厌氧条件下培养不同株型的产气荚膜梭菌强毒株,收获发酵产生的含有菌体分泌的外毒素的培养物,然后使用终浓度为 0.2% 的甲醛对培养物进行化学灭活,或者通过层析法纯化毒素后再灭活,获得丧失生物学活性的类毒素作为疫苗^[26],见图 1。



注:本图通过 Figdraw®绘制。

图 1 产气荚膜梭菌类毒素疫苗制备流程

然而,产气荚膜梭菌菌体自身的特殊性,使其疫苗本身和生产过程存在诸多问题。首先,产气荚膜梭菌类毒素疫苗效力的稳定性较低。中国兽医药品监察所应用血清中和法分别对 2006—2014 年生产的羊三联四防类疫苗进行免疫效力抽检,结果显示 B、C、D 型产气荚膜梭菌疫苗不合格比率分别为 55.56% (15/27)、63.64%(21/33)和 39.39%(13/33),综合不合格比率高达 72.73%(24/33)^[25]。这是该类毒素疫苗最常出现且难以解决的问题。究其原因,产气荚膜梭菌类毒素疫苗的生产菌株是选育的可分泌大量外毒素的强毒株,由于该菌的多个致死性外毒

素基因位于菌体的大质粒上,培养过程中常出现质粒丢失,造成生产用种子的退化^[35-37];且不同株型分泌的免疫原毒素不同,发酵生产后的配比也会造成疫苗效力不同;更重要的是,产气荚膜梭菌外毒素的分泌条件十分苛刻,培养基成分等因素也可对类毒素疫苗的制备产生影响^[38-39]。在实际的科研和生产中也发现,一些支持生长型的培养基,如果不添加动物源性肽,则无法检测到毒素的产生。张思雨等^[40]分别使用硫乙酸盐(FT)增菌培养基及 BHI 产毒培养基培养 C 型产气荚膜梭菌强毒株(C59-2)时发现,两种培养状态下菌体形态特性、活跃 RNA,以及

α 、 β 毒素的分泌量差异极显著,并与 ICR 小鼠的致死率正相关。因产气荚膜梭菌分泌的毒素是疫苗的免疫原,其种类和含量的不稳定必然造成疫苗不同批次间质量的差别。其次,类毒素疫苗的灭活对疫苗的安全性至关重要。由于产气荚膜梭菌具有产生芽孢的特性,在类毒素疫苗灭活过程中需要使用高剂量的甲醛进行灭活。在《中华人民共和国兽药典:三部(2010 年版)》中明确规定含梭状芽孢杆菌的制品中,甲醛残留量不应超过 0.2%,其它生物制品的甲醛不超过 0.08%^[41]。尽管产气荚膜梭菌类毒素疫苗生产过程中经过长时间脱毒处理,但仍然存在残留毒性的风险,可能给免疫动物带来危险。最后,产气荚膜梭菌培养物中不仅有所需的免疫原毒素,还存在其它毒素和培养中原有的蛋白质,可能造成疫苗中含有多种未知的致敏源。

3.2 异源表达的基因工程重组毒素蛋白的免疫效果 传统产气荚膜梭菌类毒素疫苗生产中的诸多问

题已成为制约此类疫苗生产和使用的瓶颈,异源表达的 α 毒素等重组蛋白成为产气荚膜梭菌疫苗最有希望的替代品,为传统类毒素疫苗存在的问题提供解决方案^[29,42-43]。异源重组蛋白表达条件一旦优化,即可稳定生产重组毒素。经过突变处理的重组毒素几乎没有任何毒性,因此不需要使用甲醛进行减毒处理,使生产过程更简单安全。此外,与通过培养产气荚膜梭菌法制备类毒素疫苗相比,大肠埃希菌等异源表达体系的培养过程价廉、高效,生产工艺已趋于成熟^[44]。

重组 α 、 β 和 ϵ 等毒素的单一或多价疫苗具有良好的免疫原性,而非突变重组毒素可能仍具有天然毒素的活性,不适合直接用作接种疫苗^[29],因此,国内外大量的研究和策略多集中在定点诱变^[45]、仅表达 N 端或 C 端蛋白结构域^[46-48],或使用融合基因形成嵌合毒素等^[49]方向,试图获得无毒且免疫原良好的重组毒素蛋白用于疫苗接种。见表 2。

表 2 重组毒素蛋白在模型动物中的免疫原性

重组蛋白/重组菌株培养物	剂量	动物模型	攻毒挑战剂量	存活率	引用文献
rGST-CPA-C(247~370)	10 μ g	小鼠(Balb/c)	25 μ g	83.3%(5/6)	[50]
rGST-CPA-C	0.36 pmol	小鼠(Balb/c)	15 μ g	100%(6/6)	[51]
rCPAE	30 μ g	小鼠(Balb/c)	5 \times LD ₅₀	100%(12/12)	[52]
rCPA-C(281~370)	10 μ g	小鼠(Balb/c)	1 μ g or 10 ⁸ CFU	100%(10/10)	[53]
rCPIB	30 μ g	小鼠(Balb/c)	5 \times LD ₁₀₀	83%(10/12)	[54]
rETX ^{H106P}	10 μ g	小鼠(Balb/c)	100 \times LD ₅₀	100%(3/3)	[55]
rETX ^{H106P}	10 ⁹ CFU	小鼠(Balb/c)	2 \times LD ₁₀₀	100%(10/10)	[43]
rETX ^{Y196E}	100 μ g	家兔(Japanese White rabbits)	2 \times LD ₁₀₀	100%(4/4)	[56]

注:rGST-CPA-C(247~370)为与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合的重组产气荚膜梭菌 α 毒素 C 末端结构域;rCPAE 为 CPA-C(284~398)重组产气荚膜梭菌 α 毒素 C 末端结构域+CPE-C 型(197~312)重组产气荚膜梭菌肠毒素 C 末端结构域;rCPIB 为 CPI-C(466~665)重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素 C 末端结构域+CPB1-C 型(143~311)重组产气荚膜梭菌 β 毒素 C 末端结构域;rETX^{H106P}为 H106 氨基酸突变的重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素;rETX^{Y196E}为 Y196 氨基酸突变的重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素。

定点诱变通过改变毒素蛋白毒性必需的氨基酸残基来生产无毒且具免疫原性的重组蛋白。有报道^[57]显示,rCPA^{H212R}能够保护 81%(17/21)的接种小鼠, rETX^{H106P}也被证实为小鼠肠毒症模型的安全抗原^[43,55],这些结果表明毒素是否具有活性与关键位点氨基酸残基息息相关。 ϵ 毒素作为强致死性毒素,吸引了众多梭菌毒素研究者的关注,但由于其结构为两条平行 β 链穿过三个结构域连接而成,仅表达其识别功能区较困难,因此,通过诱变关键氨基酸残基构建 ϵ 毒素重组蛋白来消除其毒性可作为疫苗研究的主要策略。而对于 α 、 β 、 ϵ 毒素等 N 端和

C 端结构域分别为毒性和识别功能区的毒素,其 C 端结构域具有负责与受体细胞结合的类似功能,并常常包含主要的保护性表位位点,因此可仅表达 C 端结构域以达到免疫效果^[52-53]。

尽管定点突变后的毒素蛋白具有无毒特性,可作为产气荚膜梭菌疫苗研发的潜在候选抗原,但每种抗原的独立生产过程和单独纯化意味着该技术可能不适用于兽医行业,而且这些抗原具有与产生保护性免疫反应(中和抗体)无关的部分,因此,开发含有两种或两种以上抗原的重组嵌合体一直是人们关注的焦点。Zeng 等^[58]研究评估了两种重组蛋白组

合 rCPA + rCPB2B1 和三价嵌合体 rCPAB2B1 在猪、牛血清和初乳中产生中和抗体的能力。使用产气荚膜梭菌毒素 C 型的培养上清液测定每种中和抗体(CPA、CPB1 和 CPB2)的滴度,以滴定中和抗体水平。rCPA + rCPB2B1 制剂在猪、牛血清中诱导中和滴度分别为 3、8 IU/mL,在初乳中诱导滴度为 1、6 IU/mL。三价嵌合体 rCPAB2B1 在猪、牛血清中诱导的中和滴度分别为 2、6 IU/mL,初乳中的中和滴度为 1、2 IU/mL,相对于两种重组蛋白组合 rCPA + rCPB2B1,三价嵌合体 rCPAB2B1 在猪、牛血清和初乳中诱导的中和滴度较低。然而,这些嵌合体是使用完整的毒素构建的。此外,三价嵌合体 rCPAB2B1 产生的较低滴度中和抗体表明重组蛋白可能存在不适当的构象、掩蔽或改变保护性表位。

3.3 基于反向疫苗学和免疫信息学的疫苗新思路

近年发展起来的结构疫苗学、免疫信息学、噬菌体展示技术、反向免疫学等新型疫苗设计技术可以重新解构抗原表位、设计重组蛋白,还可以解决重组蛋白异源表达容纳免疫原较少及抗原表位暴露不足等问题^[59]。全球已建立了多个门户网站供科研工作者筛选所需的疫苗、抗体药物、肿瘤免疫、移植免疫、超敏反应等表位肽信息,包括国际免疫遗传学信息系统(International Immunogenetics Information System, IMGT)、免疫表位信息门户(Immune Epitope DataBase, IEDB)、免疫多态性数据库(Immuno Polymorphism Database, IPD)等^[60-62]。其中,IEDB 在美国国家过敏和传染病研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID)的资助下,已发展成为全球最大的免疫表位信息门户,成功研发了脑膜炎奈瑟菌及呼吸道合胞病毒等抗原表位疫苗^[63-65]。经新型疫苗设计技术设计、评价、筛选的表位肽构建的嵌合体可具有一系列毒素蛋白的免疫原性,无需分别筛选并表达不同的无毒突变毒素蛋白,只需一个设计良好的异源表达体系就可以产生多表位重组蛋白,从而简化后期的生产过程^[66]。这对于解决产气荚膜梭菌这种能分泌多种致死性外毒素的病原菌具有重要价值^[67]。

2021 年 Aldakheel 等^[68]报道了利用免疫信息学方法设计产气荚膜梭菌多表位疫苗的研究。作者采用减法蛋白质组学排除产气荚膜梭菌中非特异性、与人类同源性高的蛋白质,选择了免疫学评分高、无过敏性、无毒的 B 细胞和 T 细胞表位,以及诱导机体产生 IFN- γ 的表位,经柔性连接子相连,组装成多表位肽疫苗,同时将霍乱毒素 B 亚单位作为

分子内佐剂,后对该多表位肽疫苗进行了分子对接以验证疫苗与受体的相容性,并在计算机中进行评估。作者认为设计获得的多表位嵌合蛋白含有辅助性 T 细胞表位、B 淋巴细胞表位和细胞毒性 T 细胞表位,因此可能具有在宿主体内启动体液和细胞免疫的能力;当该疫苗口服、舌下含服或鼻内使用时,可能会增强黏膜的免疫反应,通过在黏膜和系统环境中产生宿主防御性 T 细胞和 B 细胞来防止产气荚膜梭菌进入宿主体。然而作者似乎忽视了产气荚膜梭菌的致病因子和免疫原均是菌体分泌的多种致死性外毒素这一事实。

Wang^[69]通过生物学分析潜在的 B 细胞和 T 细胞表位获得了产气荚膜梭菌 NetF 蛋白的无毒无过敏感性的免疫蛋白。肠毒素、 $\beta 2$ 毒素、 $\beta 1$ 毒素单克隆抗体表位信息也为产气荚膜梭菌后续的疫苗研究提供借鉴^[70-72]。Katalani 等^[73]通过免疫信息学对产气荚膜梭菌的免疫原性表位进行了设计评估。考虑到产气荚膜梭菌的致病因子为外毒素,故针对 NetB、 α 毒素和金属肽酶蛋白(NAM)三种致病因子设计三价免疫原融合蛋白,用于预防产气荚膜梭菌导致的神经内分泌瘤;又因为整个蛋白质在折叠过程中不可避免存在变化,融合蛋白中有价值的表位可能会丢失,因此,作者通过 PORTER、I-TASSER 服务器对表位的 6 种不同排列组合进行预测,选择了连接子周围变化最小、三维结构模型预测质量最高的序列进行表达,最终的免疫原融合蛋白可有效中和 $2 \times LD_{50}$ 剂量的产气荚膜梭菌粗毒素提取物。Katalani 等^[74]则对 NetB、 α 毒素和 NAM 的融合蛋白的免疫给药途径做了更细致的研究,发现注射给药的抗原提供的保护作用优于口服给药途径。此外,Asadollahi 等^[75]基于免疫信息学的设计的 mRNA 疫苗也具有巨大的免疫潜力,为开发合适的产气荚膜梭菌 RNA 疫苗奠定了理论基础。可见,利用免疫信息学设计毒素蛋白表位肽,并通过重组蛋白表达和动物试验免疫学评价进行验证,有望筛选获得具有良好免疫原性、无不良反应的梭菌毒素疫苗候选株,从而更有效预防产气荚膜梭菌病。

4 结论与展望

综上所述,鉴于产气荚膜梭菌传统类毒素疫苗生产和应用中的不利因素,生产实践中迫切需要无不良反应的高免疫效果的新型疫苗。近年来,大量研究显示可通过碱基突变、毒性结构域去除、嵌合表

达和抗原表位区筛选表达的方式获得对动物具有高度保护效果的重组毒素蛋白。而产气荚膜梭菌的致病因子为多种外毒素,非常适合利用结构疫苗学筛选不同毒素的免疫保护性表位肽,排除抗原性不佳、有潜在毒性和致敏性的肽段,甚至可以将多个毒素的抗原表位肽构建为重组蛋白作为免疫原,制备有效、安全和广谱疫苗^[26,61]。利用现代疫苗学方法和基因工程技术研发新型梭菌毒素疫苗对解决传统类毒素疫苗生产和应用中的瓶颈问题具有重要意义。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Songer JG. *Clostridia* as agents of zoonotic disease[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 140(3/4): 399–404.
- [2] Grass JE, Gould LH, Mahon BE. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(2): 131–136.
- [3] Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 141.
- [4] 范雪梅,林瑞庆,翁亚彪,等. 饲料禁抗背景下鸡球虫病和坏死性肠炎的综合防控[J]. *养禽与禽病防治*, 2020(10): 11–15.
Fan XM, Lin RQ, Weng YB, et al. Comprehensive prevention and control of chicken coccidiosis and necrotizing enteritis under the background of feed ban[J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2020(10): 11–15.
- [5] Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins [J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(5): 212.
- [6] Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational applications[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(3): 73.
- [7] Rood JI, Adams V, Lacey J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 5–10.
- [8] Diancourt L, Sautereau J, Criscuolo A, et al. Two *Clostridium perfringens* type E isolates in France[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(3): 138.
- [9] Keokilwe L, Olivier A, Burger WP, et al. Bacterial enteritis in ostrich (*Struthio camelus*) chicks in the Western Cape Province, South Africa[J]. *Poult Sci*, 2015, 94(6): 1177–1183.
- [10] Kim HY, Byun JW, Roh IS, et al. First isolation of *Clostridium perfringens* type E from a goat with diarrhea[J]. *Anaerobe*, 2013, 22: 141–143.
- [11] 张辉,包红朵. 产气荚膜梭菌耐药及防控研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1846–1851.
Zhang H, Bao HD. Research progress of antimicrobial resistance and bio-control of *Clostridium perfringens* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(6): 1846–1851.
- [12] Kozieł N, Kukier E, Kwiatek K. *Clostridium perfringens* – epidemiological importance and diagnostics [J]. *Med Weter*, 2019, 75(5): 265–270.
- [13] 姬书会,邱孜博. 我国畜牧业中滥用抗生素的危害和对策[J]. *中国畜禽种业*, 2022, 18(12): 59–62.
Ji SH, Qiu ZB. The harm and countermeasures of the abuse of antibiotics in China's animal husbandry [J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2022, 18(12): 59–62.
- [14] 王蕾蕾,许金新. 饲料“禁抗令”施行后养殖业面临的挑战及对策[J]. *中国动物保健*, 2021, 23(9): 3, 5.
Wang LL, Xu JX. After the implementation of the feed “ban”, the challenges and countermeasures faced by the aquaculture industry after the implementation of the “ban” on feed [J]. *China Animal Health*, 2021, 23(9): 3, 5.
- [15] 孔庆娟,刘马峰,任家琰. 魏氏梭菌引起家畜“猝死症”的研究进展[J]. *畜禽业*, 2010(8): 20–23.
Kong QJ, Liu MF, Ren JY. Research progress on *Clostridium weissini* causing “sudden death syndrome” in livestock [J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2010(8): 20–23.
- [16] 范学政,李文平,秦玉明,等. 产气荚膜梭菌及其公共卫生危害[J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(9): 57–64.
Fan XZ, Li WP, Qin YM, et al. Review of *Clostridium perfringens* and its hazards to public health [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2021, 55(9): 57–64.
- [17] Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, et al. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis [J]. *Avian Pathol*, 2011, 40(4): 341–347.
- [18] Jenkins MC, Parker C, O'Brien C, et al. Correlation between *Clostridium perfringens* alpha- and NetB-toxin and chick mortality in commercial broiler farms during different anticoccidial control programs [J]. *Avian Dis*, 2020, 64(3): 401–406.
- [19] Giannitti F, Rioseco MM, García JP, et al. Diagnostic exercise: hemolysis and sudden death in lambs [J]. *Vet Pathol*, 2014, 51(3): 624–627.
- [20] Gu CQ, Lillehoj HS, Sun ZF, et al. Characterization of virulent *netB* + *tpeL* + *Clostridium perfringens* strains from necrotic enteritis-affected broiler chicken farms [J]. *Avian Dis*, 2019, 63(3): 461–467.
- [21] Lawrence GW, Lehmann D, Anian G, et al. Impact of active immunisation against enteritis necroticans in Papua New Guinea [J]. *Lancet*, 1990, 336(8724): 1165–1167.
- [22] Yadav JP, Kaur S, Dhaka P, et al. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* from India: a scoping review [J]. *Anaerobe*, 2022, 77: 102639.
- [23] Anju K, Karthik K, Divya V, et al. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry [J]. *Anaerobe*, 2021, 67: 102298.
- [24] Gulliver EL, Adams V, Marcelino VR, et al. Extensive genome analysis identifies novel plasmid families in *Clostridium perfringens* [J]. *Microb Genom*, 2023, 9(4): mgen000995.

- [25] 巴图宝力代, 曹政. 羊梭菌病防控技术[J]. 兽医导刊, 2021(19): 38-39.
Batu BLD, Cao Z. *Clostridial* disease prevention and control technology in sheep[J]. *Veterinary Orientation*, 2021(19): 38-39.
- [26] Zaragoza NE, Orellana CA, Moonen GA, et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(9): 525.
- [27] Duke T, Poka H, Myers S, et al. Pigbel in the 21st century: still here, and still in need of an effective surveillance system[J]. *P N G Med J*, 2013, 56(3-4): 136-140.
- [28] Schäfer K, Wyder M, Gobeli S, et al. Detection of *Clostridium perfringens* type C in pig herds following disease outbreak and subsequent vaccination[J]. *Vet Rec*, 2012, 171(20): 503.
- [29] Ferreira MRA, Moreira GMSG, Cunha CEPD, et al. Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(11): 340.
- [30] 瞿佳铭, 汤毅. 引发猪血便的几种常见疾病的鉴别诊断与防治[J]. 中国猪业, 2020, 15(4): 59-61, 64.
Qu JM, Tang Y. Differential diagnosis and prevention of several common diseases that cause pig blood and feces[J]. *China Swine Industry*, 2020, 15(4): 59-61, 64.
- [31] 魏伟. 羊产气荚膜梭菌病综合防治[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(18): 139-140.
Wei W. Comprehensive prevention and control of *Clostridium perfringens* in sheep[J]. *Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version)*, 2019(18): 139-140.
- [32] Kiu R, Caim S, Alexander S, et al. Probing genomic aspects of the multi-host pathogen *Clostridium perfringens* reveals significant pangenome diversity, and a diverse array of virulence factors[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2485.
- [33] Brandi IV, Mozzer OD, Jorge EV, et al. Growth conditions of *Clostridium perfringens* type B for production of toxins used to obtain veterinary vaccines[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014, 37(9): 1737-1742.
- [34] Sakurai J, Duncan CL. Effect of carbohydrates and control of culture pH on beta toxin production by *Clostridium perfringens* type C[J]. *Microbiol Immunol*, 1979, 23(5): 313-318.
- [35] Mehdizadeh Gohari I, A Navarro M, Li JH, et al. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens* [J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 723-753.
- [36] Chen JM, McClane BA. Role of the Agr-like quorum-sensing system in regulating toxin production by *Clostridium perfringens* type B strains CN1793 and CN1795[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(9): 3008-3017.
- [37] Gurjar A, Li JH, McClane BA. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(11): 4860-4869.
- [38] Gohari IM, Li JH, McClane BA. Identifying the basis for VirS/VirR two-component regulatory system control of *Clostridium perfringens* beta-toxin production[J]. *J Bacteriol*, 2021, 203(18): e0027921.
- [39] Ohtani K. Gene regulation by the VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*[J]. *Anaerobe*, 2016, 41: 5-9.
- [40] 张思雨, 王玉炯, 曾瑾. C型产气荚膜梭菌外毒素致小鼠肠道损伤的转录组分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(10): 3570-3581.
Zhang SY, Wang YJ, Zeng J. Transcriptome analysis of intestinal injury induced by *Clostridium perfringens* type C exotoxin in mouse[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(10): 3570-3581.
- [41] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 三部(2010年版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: part three (2010 edition)*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- [42] Efremenko E, Aslanli A, Lyagin I. Advanced situation with recombinant toxins: diversity, production and application purposes[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4630.
- [43] Alimolai M, Golchin M, Daneshvar H. Oral immunization of mice against *Clostridium perfringens* epsilon toxin with a *Lactobacillus casei* vector vaccine expressing epsilon toxoid[J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 40: 282-287.
- [44] Yang D, Park SY, Park YS, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis[J]. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(7): 745-765.
- [45] 杜吉革, 彭小兵, 张秀坤, 等. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素突变体的表达及免疫保护力评价[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(6): 13-20.
Du JG, Peng XB, Zhang XK, et al. Expression and evaluation of protective efficacy of *Clostridium perfringens* ϵ toxin mutant[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(6): 13-20.
- [46] Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, et al. Non-toxic perfringolysin O and α -toxin derivatives as potential vaccine candidates against bovine necrohaemorrhagic enteritis[J]. *Vet J*, 2016, 217: 89-94.
- [47] Goossens E, Verherstraeten S, Valgaeren BR, et al. The C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin as a vaccine candidate against bovine necrohemorrhagic enteritis[J]. *Vet Res*, 2016, 47(1): 52.
- [48] Ferreira MRA, Dos Santos FD, da Cunha CEP, et al. Immunogenicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin recombinant bacterin in rabbit and ruminants[J]. *Vaccine*, 2018, 36(50): 7589-7592.
- [49] Uppalapati SR, Kingston JJ, Murali HS, et al. Heterologous protection against alpha toxins of *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* induced by binding domain recombinant chimeric protein[J]. *Vaccine*, 2014, 32(25): 3075-3081.
- [50] Neeson BN, Clark GC, Atkins HS, et al. Analysis of protection afforded by a *Clostridium perfringens* alpha-toxoid against heterologous *Clostridial* phospholipases C[J]. *Microb Pathog*, 2007, 43(4): 161-165.
- [51] Ginter A, Williamson ED, Dessy F, et al. Molecular variation between the alpha-toxins from the type strain (NCTC 8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with disease in man and animals[J]. *Microbiology (Reading)*, 1996, 142 (Pt 1): 191-198.

- [52] Shreya D, Uppalapati SR, Kingston JJ, et al. Immunization with recombinant bivalent chimera r-Cpae confers protection against alpha toxin and enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A in murine model[J]. Mol Immunol, 2015, 65(1): 51–57.
- [53] Nagahama M, Oda M, Kobayashi K, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens* [J]. Microbiol Immunol, 2013, 57(5): 340–345.
- [54] Das S, Majumder S, Kingston JJ, et al. Generation and characterization of recombinant bivalent fusion protein r-Cpib for immunotherapy against *Clostridium perfringens* beta and iota toxemia[J]. Mol Immunol, 2016, 70: 140–148.
- [55] Li Q, Xin WW, Gao S, et al. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia[J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(11): 2386–2392.
- [56] Peng XB, Li XN, Peng GR, et al. Recombinant unpurified rETX^{H106P}/CTB-rETX^{Y196E} protects rabbits against *Clostridium perfringens* epsilon toxin[J]. J Vet Med Sci, 2021, 83(3): 441–446.
- [57] Schoepe H, Neubauer A, Schlapp T, et al. Immunization with an alphatoxin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alphatoxin[J]. Anaerobe, 2006, 12(1): 44–48.
- [58] Zeng J, Deng GC, Wang J, et al. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β - β 1 fusion toxin in mice, sows and cows[J]. Vaccine, 2011, 29(33): 5459–5466.
- [59] Soto LF, Romaní AC, Jiménez-Avalos G, et al. Immunoinformatic analysis of the whole proteome for vaccine design: An application to *Clostridium perfringens* [J]. Front Immunol, 2022, 13: 942907.
- [60] Barker DJ, Maccari G, Georgiou X, et al. The IPD-IMGT/HLA database[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1): D1053–D1060.
- [61] Dhanda SK, Mahajan S, Paul S, et al. IEDB-AR: immune epitope database-analysis resource in 2019[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W502–W506.
- [62] Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, et al. IPD—the immunology polymorphism database[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41: D1234–D1240.
- [63] Shukla P, Pandey P, Prasad B, et al. Immuno-informatics analysis predicts B and T cell consensus epitopes for designing peptide vaccine against SARS-CoV-2 with 99.82% global population coverage [J]. Brief Bioinform, 2022, 23(1): bbab496.
- [64] Yousaf M, Ismail S, Ullah A, et al. Immuno-informatics profiling of monkeypox virus cell surface binding protein for designing a next generation multi-valent peptide-based vaccine[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1035924.
- [65] Tahir Ul Qamar M, Ahmad S, Fatima I, et al. Designing multi-epitope vaccine against *Staphylococcus aureus* by employing subtractive proteomics, reverse vaccinology and immunoinformatics approaches [J]. Comput Biol Med, 2021, 132: 104389.
- [66] Rodrigues RR, Alves Ferreira MR, Donassolo RA, et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools [J]. Anaerobe, 2021, 69: 102326.
- [67] Allemailem KS. A comprehensive computer aided vaccine design approach to propose a multi-epitopes subunit vaccine against genus *Klebsiella* using pan-genomics, reverse vaccinology, and biophysical techniques[J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(10): 1087.
- [68] Aldakheel FM, Abrar A, Munir S, et al. Proteome-wide mapping and reverse vaccinology approaches to design a multi-epitope vaccine against *Clostridium perfringens* [J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(10): 1079.
- [69] Wang YH. Bioinformatics analysis of NetF proteins for designing a multi-epitope vaccine against *Clostridium perfringens* infection[J]. Infect Genet Evol, 2020, 85: 104461.
- [70] Neumann T, Krüger M, Weisemann J, et al. Innovative and highly sensitive detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin based on receptor interaction and monoclonal antibodies [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(4): 266.
- [71] Zeng J, Song FY, Yang Y, et al. The generation and characterization of recombinant protein and antibodies of *Clostridium perfringens* beta2 toxin [J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 5708468.
- [72] 马玲玲. 产气荚膜梭菌 Beta1 毒素单克隆抗体的制备及间接 ELISA 方法的建立[D]. 银川: 宁夏大学, 2021.
- Ma LL. Preparation of monoclonal antibody against *Clostridium perfringens* Beta 1 toxin and establishment of indirect ELISA [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.
- [73] Katalani C, Nematzadeh G, Ahmadian G, et al. In silico design and *in vitro* analysis of a recombinant trivalent fusion protein candidate vaccine targeting virulence factor of *Clostridium perfringens* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 146: 1015–1023.
- [74] Katalani C, Ahmadian G, Nematzadeh G, et al. Immunization with oral and parenteral subunit chimeric vaccine candidate confers protection against necrotic enteritis in chickens [J]. Vaccine, 2020, 38(46): 7284–7291.
- [75] Asadollahi P, Kalani BS. Novel toxin-based mRNA vaccine against *Clostridium perfringens* using *in silico* approaches [J]. Toxicon, 2024, 238: 107584.

(本文编辑: 翟若南)

本文引用格式: 王东, 张思雨, 丁雅文, 等. 产气荚膜梭菌毒素疫苗研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(7): 910–917. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20245387.

Cite this article as: WANG Dong, ZHANG Si-yu, DING Ya-wen, et al. Research progress in *Clostridium perfringens* toxin vaccines [J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(7): 910–917. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20245387.