

曾梦, 吴群, 韩建成, 等. 产气荚膜梭菌疫苗研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 139-145.

ZENG M, WU Q, HAN J C, et al. Advances in research on *Clostridium perfringens* vaccine [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 139-145.

产气荚膜梭菌疫苗研究进展

曾梦, 吴群, 韩建成, 杨远廷, 周汉林*

(中国热带农业科学院湛江实验站, 广东 湛江 524013)

摘要: 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 是一种在自然界及动物胃肠道内广泛存在的条件性致病菌, 对畜禽养殖造成严重的经济损失。目前, 接种疫苗是防控产气荚膜梭菌感染的主要手段, 并有助于减少抗菌药物在畜禽养殖中的使用, 减缓细菌耐药性的发展。本文综述了产气荚膜梭菌 α 、 β 、 ϵ 毒素蛋白作为疫苗抗原成分的应用, 重点阐述在灭活疫苗、类毒素疫苗、基因工程活疫苗、纳米颗粒疫苗或佐剂和多表位疫苗 5 个方面的研究进展, 以期为新型疫苗的研制提供参考。

关键词: 产气荚膜梭菌; 疫苗; 抗原; 毒素蛋白

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)04-0139-07

Advances in research on *Clostridium perfringens* vaccine

ZENG Meng, WU Qun, HAN Jiancheng, YANG Yuanting, ZHOU Hanlin*

(Zhanjiang Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524013, China)

Abstract: *Clostridium perfringens* a conditionally pathogenic bacterium that is widely present in nature and in the gastrointestinal tract of animals, causing serious economic losses to livestock and poultry breeding. Vaccination is currently the mainstay of prevention and control of *C. perfringens* and has helped to reduce the use of antimicrobials in livestock farming and to slow down the development of bacterial resistance. This paper reviews the application of *C. perfringens* α , β , and ϵ toxin proteins as antigenic components of vaccines, and summarizes the research progress in four aspects, namely, toxoid vaccine, bacterial carrier vaccine, nanoparticle vaccine or adjuvant, and multi-epitope vaccine, with a view to providing reference for the development of novel vaccines.

Keywords: *Clostridium perfringens*; vaccine; antigen; toxin protein

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 是一种普遍存在于健康人类和动物胃肠道中的条件性致病菌。当外界环境突变、饮食结构改变或抗生素治疗不当导致肠道稳态遭到破坏时, 产气荚膜梭菌通过增加菌落数量和释放毒素^[1-2]进而引发肠道黏膜损伤、组织坏死及炎症反应加剧, 严重时导致坏死性肠炎或全身感染。产气荚膜梭菌可产生 20 余种毒素和酶, 根据 α 、 β 、 ϵ 、 ι 、CPE 和 NetB 这 6 种主要的分泌毒素, 产气荚膜梭菌主要分为 7 个亚型: A 型 (α), B 型 (α 、 β 、 ϵ), C 型 (α 、 β), D 型 (α 、 ϵ), E 型 (α 、 ι), F 型 (α 、Cpe) 和 G 型 (α 、NetB)^[2], 其中 A 型是最常见的类型。这些毒素入侵机体后与位

于靶细胞质膜上的受体结合, 能够激活细胞内途径, 导致细胞病变、功能障碍/死亡和产生组织毒性^[3-4], 引起宿主气性坏疽、食物中毒、坏死性肠炎和肠毒血症等多种疾病^[5]。据报道, 由产气荚膜梭菌引起的肠毒血症是全世界反刍动物中最常见的疾病之一, 在绵羊和山羊中的患病率为 24.13%~100%^[5-6]; 在家禽中引起的坏死性肠炎 (NE) 死亡率高达 50%, 每年经济损失近 60 亿美元^[7]。使用抗菌药物对动物进行治疗不仅预后效果很差, 还导致动物源产气荚膜梭菌耐药性逐渐增强, 对公共卫生安全造成严重影响^[1]。目前, 接种疫苗和加强饲养管理是预防产气荚膜梭菌感染的唯一方法。

1 产气荚膜梭菌疫苗抗原成分

我国当前使用的产气荚膜梭菌商用疫苗以全菌灭活疫苗为主, 抗原成分为经甲醛灭活脱毒的特征明确、保存完好的稳定菌株培养过滤液^[8], 其中复杂的物质成分, 并不能针对产气荚膜梭菌的多种毒素产

收稿日期: 2024-05-05; 修回日期: 2025-02-12

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1630102024005)

第一作者: 曾梦, 女, 硕士研究生

*通信作者: 周汉林, 研究员, 主要从事畜禽健康养殖研究,

E-mail: zhouhanlin8@163.com。

生持续性的特异性抗体, 仅能为动物提供有限的体液免疫保护^[9]。有研究表明, 由纯化的产气荚膜梭菌毒素蛋白诱导的抗体反应比商业配方更强^[10-11], 且效果优于市售疫苗^[12]。这表明纯化的毒素蛋白可能是一种很好的替代疫苗免疫原, 特别是针对已被确定为产气荚膜梭菌主要致病因素的 α 、 β 和 ϵ 毒素^[2-3]。基于此, 国内外学者对降低它们的毒性和挖掘它们作为疫苗免疫原的潜力开展了大量研究, 为产气荚膜梭菌新型疫苗的研制提供了大量可供选择的免疫原。

1.1 α 毒素蛋白

α 毒素 (CPA) 存在于所有的产气荚膜梭菌中, 是研究最多的细菌磷脂酶。Siqueira 等^[13-14] 使用先前描述的无酶活性和溶血活性的 α 毒素异构体 α AV1b 免疫实验兔产生的血清接种小鼠, 能够诱导免疫应答, 产生识别天然 CPA 的中和抗体, 可以考虑将其作为开发针对 CPA 的疫苗靶点。为降低保护性表位由于蛋白质错误地折叠而丢失的可能性, 使用无需变性、重折叠甚至纯化的无毒 rCPA 包涵体用于动物接种也是一种疫苗策略^[15]。通过对 CPA 结构域的功能研究发现, 其 C-末端结构域 (CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾) 可以诱导体液免疫反应、细胞免疫反应和产生抗毒素抗体应答, 从而提供显著的保护作用^[16], 而 CPA-N⁽¹⁻²⁴⁶⁾ 对 CPA 无保护作用^[17]。以 CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ 为免疫原不仅可以排除不必要的 CPA 结构域, 同时也简化了繁琐的生产过程。Peng 等^[18] 用 rCPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ 作为替代全 rCPA 疫苗的免疫原成分接种的家兔, 血清中的毒素中和抗体效价和 ELISA 抗体效价更高, 显示了 CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ 的保护潜力, 同时也为嵌合类毒素的位点研究提供了可供使用的 CPA 区域片段。

1.2 β 毒素蛋白

β 毒素 (CPB) 是一种由 B 型和 C 型产气荚膜梭菌产生的致死性坏死毒素, 通过靶向内皮细胞在组织损伤中起关键作用^[19]。完整表达的 β 毒素蛋白经过重折叠步骤后, 毒性可能减少或消除^[15]。Galvao 等^[20] 发现完全无毒的 rCPB 是一种高免疫保护性抗原。如何对 CPB 进行修饰, 使其能适当地刺激免疫系统获得更强的体液免疫和细胞免疫, 是保护接种动物免受 CPB 攻击的关键。插入点突变 (D81DK \rightarrow A81DA 和 C292 \rightarrow A292) 的 β 类毒素突变体具有良好的抗原性和免疫原性, 对小鼠的毒性较低且具有保护性表位^[21]。这些表位结构可以为免疫系统提供能够诱导强大免疫反应的氨基酸^[22]。单一密码子的改变并不能完全消除 CPB 的毒性, 可能会带来恢复全部活性和不可接受的风险^[8]。因此, 能够作为免疫原的无毒 β 毒素不仅要求具有保护性表位, 而且形式也要稳定。在硅分析中, β 毒素的 C 端结构域

(rCPB-C⁽¹⁴³⁻³¹¹⁾) 表现出更高的 mRNA 稳定性 (-710 024.80 J/mol)、溶解度 (-0.755) 和更好的三级结构 (-0.12)^[8]。单个 rCPB-C⁽¹⁴³⁻³¹¹⁾ 的免疫原性与使用完整蛋白 rCPB 相比更高^[23], 在接种 rCPB-C⁽¹⁴³⁻³¹¹⁾ 的绵羊中能产生较高的总体抗体和中和抗 CPB 抗体水平^[24]。由此可见, CPB-C⁽¹⁴³⁻³¹¹⁾ 结构域不仅可作为疫苗抗原独立表达, 也可作为理想抗原靶点位置用于构建重组嵌合抗原。

1.3 ϵ 毒素蛋白

ϵ 毒素 (ETX) 是一种活性较差的原生毒素, 由 B 型和 D 型产气荚膜梭菌合成。每一种 EXT 都具有细胞毒性, 其毒性仅次于肉毒梭状芽胞杆菌和破伤风梭状芽胞杆菌毒素, 被激活后引起家畜肠毒素血症^[25-26]。EXT 的 3 个结构域 (I、II、III) 由横跨整个分子的 β 链连接, I 结构域的 Tyr30、Tyr196 和 Phe199, II 结构域的 His106, III 结构域的 Tyr71、Ala168, 被认为在 ETX 的致死活性中起关键作用, 通过定点突变可获得明显低毒或无毒的重组 ETX^[27-29]。突变体 rETXH106P 是第一个无毒的潜在候选疫苗, 可为小鼠抵抗 ETX 攻击提供强有力的保护^[8,29]。随后具有 1 个突变 (CTB-rETXY196E、rETXF199E、rETXH106P 和 rETXY71A)、2 个突变 (rETXY30A/Y196A)、3 个突变 (rETXY30A/Y196A/A168F) 或 4 个突变 (rpETXY30A/Y71A/H106P/Y196A 和 rpETXY30A/H106P/Y196A/F199E) 的相应突变体已被证明在 MDCK 细胞或小鼠中无毒性或毒性较低, 并提供了针对粗制 ETX 的良好保护性免疫^[8,30-33]。虽然定点突变可以避免化学解毒, 但毒素的高效力可能使其难以完全消除毒性。有学者通过表达 EXT 的部分结构域以消除 EXT 的毒性, 研究结果表明虽然截断的 rEXT 具有反应原性, 但不能保护兔子免受粗 ETX 的攻击^[34]。随后, Jiang 等^[29] 证实 rETXY71A 的免疫原性是由与 ETX 具有结构相似性的完整结构基础提供的, 因此表达 ETX 的单个结构域作为疫苗抗原仍然是一个挑战。由此可见, 在减轻 ETX 毒性的同时保留免疫原性是有必要的。虽然这些无毒的 ETX 定点突变体具备作为疫苗候选抗原的潜力, 但需要对目标宿主物种的毒素攻击和免疫反应性进行研究, 以进一步证实这些 ETX 突变体的保护作用。

2 产气荚膜梭菌疫苗研究进展

2.1 灭活疫苗

我国当前使用的产气荚膜梭菌商用疫苗以全菌灭活疫苗为主, 普遍存在抗原成分复杂和有效抗原含量较低等不足, 诱导的抗体滴度较低, 保护效力的持续

时间较短^[9,20,35]。Galvao 等^[20]在巴西开展的一项研究表明,接种了商用三价灭活疫苗的牛血清中抗 α 毒素、 β 毒素和 ϵ 毒素的最低抗体滴度仅达到巴西农业、牲畜和食品供应部(MAPA)要求的37.5%、75%和100%,且均未达到国际法的最低滴度标准。全菌灭活疫苗主要诱发体液免疫,经评估,产气荚膜梭菌商业疫苗在牛中产生的保护性体液反应持续不到1年^[36],在山羊中产生的保护性体液反应的持续时间甚至更短^[35]。Saadh 等^[37]使用新型生产工艺制备的灭活疫苗,有效提高了 α 毒素含量,并可有效地诱导高于国际标准(120%)的中和抗体反应;与接种牛相比,疫苗在兔的免疫反应中增强了1.80倍且差异显著。尽管通过对产气荚膜梭菌疫苗的工艺和配方进行改善,能加强其产生的抗体水平和保护效果,但仍缺乏产生细胞免疫或黏膜免疫应答以及产生持续性的特异性抗体的能力^[37]。同时灭活后的滤液中难以完全去除甲醛,有可能使接种动物产生轻微的炎症反应及短暂的食欲降低^[13]。未来如何减少灭活疫苗接种的不良反应,有效增加免疫保护力仍是一个亟待解决的问题。

2.2 类毒素疫苗

相较于由甲醛灭活的细菌培养上清液作为抗原成分的灭活疫苗, Augusto 等^[36]认为使用纯化的毒素蛋白(类毒素)作为免疫原可以有效地刺激机体产生相应的抗体。Oliveira 等^[38]使用纯化的 ϵ 类毒素(添加氢氧化铝佐剂)配制的疫苗,在山羊和牛这2个物种中都可诱导强烈且持久的体液应答,且6个月后的抗毒素滴度高于0.20 IU/mL,而接种商业疫苗的动物有72%在相同时间的抗毒素滴度低于0.10 IU/mL^[39]。Tariq 等^[40]使用当地流行毒素型的产气荚膜梭菌培养液制备的单价油佐剂疫苗攻毒后的保护率仅有85%,二价和多价疫苗的保护力分别为95%和98%,而多价细菌+类毒素梭菌疫苗攻毒后的保护率可达到100%,表明类毒素作为疫苗抗原具有独到的保护效果。接种单价疫苗的动物对同源/异源毒素的感染往往也不能提供完全的保护^[41]。接种rCPA的小鼠在1倍绝对致死量(LD₁₀₀)的原毒素刺激下,保护率仅为80%(24/30),而rCPB2-CPB1和rCPA联合给药于2×LD₁₀₀攻毒剂量则有100%(30/30)的保护^[41]。Jiang 等^[42]发现,只有在使用 α 毒素和NetB衍生抗原的组合时,才能在鸡NE模型中观察到显著的保护水平。Du 等^[32]设计了在ETX三个结构域均发生突变的rpETXY30A/Y71A/H106P/Y196A(rpETXm41)和rpETXY30A/H106P/Y196A/F199E(rpETXm42)两种ETX突变体。免疫保护试验结果表明二者均可诱导小鼠和绵羊的保护性免疫反应,其

中rpETXm41的免疫原性明显高于rpETXm42, rpETXm41免疫小鼠的抗体滴度显著高于rpETXm42免疫小鼠(至少1.5倍)。有研究表明, mETXF199E和mETXH106P分别免疫小鼠对rETX具有相同的保护作用^[43],以此推测rpETXm42的免疫原性的降低可能是受F199E与Y30A/H106P/Y196A组合的影响^[32]。Zeng 等^[15]构建了由CPA、CPB1和CPB2完整毒素构建的三价嵌合体,但在小鼠、猪和牛中诱导的抗毒素滴度均较低,仅为1~6 IU/mL。这可能是由于使用完整毒素构建的嵌合体分子构象不合适,导致保护性表位改变或被掩盖。因此,在构建重组毒素嵌合体时,可以考虑剔除与产生保护性免疫应答无关的部分^[17]。已被鉴定的毒素保护区CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾和CPB-C⁽¹⁴³⁻³¹¹⁾以及突变体ETXH106P,可能是较为理想的重组抗原组成部分。

综上所述,以无毒性或毒力降低的毒素突变体、重组嵌合体作为疫苗的有效抗原成分,不仅节约研发成本和减少繁杂的生产步骤,也能有效避免生产过程中毒素灭活时可能存在的毒性残留和甲醛残留的风险^[30],并为其他产气荚膜梭菌疫苗的研制提供大量可供选择的优秀免疫原。联合使用疫苗尤其是多价疫苗能提供高水平的保护力^[44],但在多价疫苗的研制中,应该充分考虑各种组分之间的相互作用以及它们对联合疫苗安全性和有效性的影响^[45],也是今后产气荚膜梭菌疫苗研究的一项关键任务。

2.3 基因工程活疫苗

基因工程活疫苗(GELV)是一种有效的疫苗递送方法,通常使用非致病微生物如干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)等益生菌作为载体,对提高疫苗的安全性起关键性作用^[46]。携带抗原的干酪乳杆菌在胃肠道内不仅可以发挥益生菌的天然特性和诱导体液免疫反应,还可以有效地促使抗原刺激肠道相关淋巴组织,提高特异性分泌型IgA的产生,诱导局部的黏膜免疫反应^[47],对在畜禽中引起许多胃肠道感染的产气荚膜梭菌尤为适用^[48]。免疫LC- α 的肉鸡与对照组相比,诱导的抗 α 抗体应答显著,肠道病变的严重程度和频率都有所降低^[49]。Alimolaei 等^[50]对小鼠灌胃LC-pT1NX- β 能够诱导高水平的IgA和IgG抗体产生,并刺激细胞诱导 γ 干扰素(IFN- γ)的产生,促进Th1型细胞因子的反应。

为最大程度地发挥细菌表面展示系统持续表达抗原和刺激宿主免疫系统的优势^[51],有学者通过添加树突状细胞(DC)靶向多肽序列(FYPSYHSTPQRP)对类毒素进行修饰,促进抗原提呈细胞捕获类毒素蛋白以获得更好的免疫反应^[52]。在获得性免疫反应中,Th1型和Th2型细胞之间的平衡或比例对于健康的免

疫反应非常重要^[53]。Th1 细胞亚群促进炎症反应,清除细胞内病原体,并转换免疫球蛋白;Th2 型细胞免疫反应产生特异性抗体^[54]。Alimolaei 等^[55]使用添加 DC 靶向肽序列修饰的 ϵ 类毒素构建的 LC-pT1NX- ϵ 免疫小鼠,小鼠血清中 IFN- γ 、白介素 (IL) -4 和 IL-10 细胞因子表达量增加,其中 IFN- γ 水平显著升高,表明诱导的 Th2 型细胞因子水平高于 Th1 型。pPG-2- α - β 2- ϵ - β 1/L. casei 393 免疫兔的脾细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞百分率显著增加,同时产生的 IFN- γ 和 IL-4 水平均显著高于对照组,证明存在 Th1 型和 Th2 型混合免疫应答^[56]。总体而言,利用益生菌作为疫苗载体递送异源分子,不仅可以避免靶抗原纯化的困难,对诱导黏膜、体液和细胞介导的免疫反应也更为有效。未来仍需加强对免疫机制的了解以及选择合适的外源抗原表达手段,通过试验来证明 GELV 在保护动物免受自然感染方面的功效,并建议在反刍动物中使用的最佳时间和剂量。

2.4 纳米颗粒疫苗或佐剂

纳米颗粒技术为疫苗和免疫疗法的程序特异性免疫反应打开了新的窗口。Hoseini 等^[57]采用常用的偶联(共价结合)和物理吸附(静电相互作用)2种方法,将 NetB 和 α 毒素的免疫原性部分组成的嵌合蛋白固定在介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNPs)上,多次口服给药时,2种 MSNPs 疫苗均能够刺激黏膜和全身免疫系统。然而,纳米粒子在应用过程中也存在一定的问题,如与抗原之间的偶联过程复杂而繁琐,可能导致抗原失活,交联剂或偶联剂的毒性使疫苗无法使用^[58]。Wan 等^[59]将一些表面带电荷的离子(二甲基二十八烷基溴化铵,DDAB)引入聚乳酸-羟基乙酸纳米颗粒(PLGANPs),使其可以温和地吸附 rETXY196E-C 抗原,尽量减少抗原失活的概率。3次免疫 rETXY196E-C/PLGA NPs 载体疫苗的小鼠,体内特异性 IgG 抗体效价达 10^5 ,IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 等细胞因子的表达量也显著增加。rETXY196E-C/PLGA NPs 能有效保护小鼠免受 100 倍半数致死量(LD₅₀)剂量 GST-ETX 的侵害,但暂未开展对其他异源毒素保护力的相关研究。

在疫苗递送系统中,可生物降解的聚合物纳米颗粒不仅在捕获或结合抗原和充当运载工具方面表现出卓越的能力^[60],事实上,大多数纳米材料还具有内在的佐剂特性。Wan 等^[59]发现当 PLGANPs 作为佐剂时,虽然其抗原释放时间明显弱于铝佐剂,但皮下免疫 rETXY196E-C+PLGA 的存活率(100%)以及诱导产生的 IL-4 和 IL-6 水平均高于 rETXY196E-C+铝佐剂(存活率 80%),这可能归功于 PLGANPs 不仅具有易于被免疫细胞摄取的尺寸和形状,并且能增强

抗原提呈细胞的摄取、活化和成熟。Fathi 等^[61]研究了使用壳聚糖纳米颗粒作为佐剂对五价梭菌类毒素疫苗(含有 D 型、C 型和 B 型产气荚膜梭菌,腐败梭菌,诺维氏梭菌)免疫原性的影响,发现含有壳聚糖的疫苗由于体液免疫反应被显著复制,比不含壳聚糖的疫苗能激发高 2~3 倍的体液免疫,产生的免疫球蛋白更多。PLAGNPs 和壳聚糖纳米颗粒佐剂可以刺激体液和细胞免疫反应,有助于增强免疫系统和改善类毒素疫苗免疫原性弱的问题,在产气荚膜梭菌类毒素疫苗中开创了疫苗领域的新思路。后续应使用广泛的产气荚膜梭菌抗原测试具有潜力的纳米颗粒的佐剂性,以及对不同的免疫方式和不同动物模型进行进一步评估,挖掘更多安全有效的纳米颗粒佐剂,以提高纳米疫苗的保护水平。

2.5 多表位疫苗

在过去几年中,产气荚膜梭菌的许多毒素被确定为候选疫苗,但有关于它们的结构和抗原表位的研究较为缺乏。生物信息学在预测蛋白质结构、功能、表位预测和疫苗设计方面发挥着重要作用,联合计算免疫学方法对于在分子水平上了解抗原结构和细菌-抗体相互作用具有重要意义^[62]。Unni 等^[63]预测了可能用于构建成功的产气荚膜梭菌疫苗的表位,尽管并未提出任何疫苗结构,但抗原表位的研究增强了对抗原的结构和功能、抗原与抗体之间的反应以及免疫学等许多其他方面的认识。Wang^[64]使用多种生物学方法检测了产气荚膜梭菌 NetF 毒素蛋白潜在的 B 细胞和 T 细胞表位,在 279 个残基中鉴定出 83 个可能与抗原相互作用的 B 细胞表位残基,T 细胞表位显示出与 MHCII 类分子有较强结合能力。抗原性和过敏性评估结果强调 NetF 蛋白具有免疫原性和非过敏性^[64],与之前的研究结果一致^[65],这些特性表明它是一种优秀的疫苗候选抗原。多表位疫苗与可能在免疫系统中引起异常反应或可能产生有害影响的传统疫苗不同,其设计时会丢弃非必要的成分^[64],并突出安全的、抗原性的和免疫优势的表位^[66]。Aldakheel 等^[67]利用疫苗信息学和计算免疫学方法,对产气荚膜梭菌的蛋白抗原性和毒力因子进行筛选,首次提出并构建的一种基于高抗原性蛋白的 B 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞和辅助 T 细胞表位的多表位疫苗,能够与免疫系统中的受体产生强烈的相互作用;B 细胞和 IFN- γ 表位分析表明,疫苗模型结构在体液和细胞免疫反应方面得到了增强,可能具有在宿主体内启动体液免疫和细胞免疫的能力。上述研究中构建的多表位疫苗仅通过各种生物信息学技术对功效和稳定性进行了评估,仍需开展相关动物试验进一步验证多表位疫苗在产气荚膜梭菌疫苗开发中的可行性。

3 总结与展望

产气荚膜梭菌产生的多种毒素是引起畜禽相关疾病的主要因素^[10]，因此针对产气荚膜梭菌毒素设计有效的疫苗对于控制和预防相关疾病至关重要。大量毒力降低或无毒力的纯化毒素蛋白均显示出优异的免疫原潜力，作为类毒素疫苗或其他新型疫苗的抗原成分，不仅可以产生相应的抗体并增强体液免疫，联合细菌载体更是显示出刺激和调节肠道黏膜免疫的独特优势^[47]。在探索毒素蛋白中具有保护性表位的靶分子方面，生物信息学和计算免疫学方法发挥着极大的作用，有效减少疫苗研制耗费的时间和资金，加快了多表位疫苗的研发进程。此外，纳米颗粒的发展为运载毒素蛋白和疫苗佐剂添加等方面也带来了广阔的思路。总之，在防治产气荚膜梭菌感染方面，需要综合运用多种方法，从多个方向进行长期的探索和研究，以期找到更有效、更安全的防控策略。

然而，在现代生物学技术迅速发展的背景下，虽然产气荚膜梭菌疫苗研究已取得部分重要进展，但当前全球产气荚膜梭菌感染的防控仍存在许多亟待解决的问题。众所周知，产气荚膜梭菌相关疾病发病急、死亡率高，但目前并无治疗产气荚膜梭菌致死性毒素中毒的特效药物。显然，抗菌药物治疗不仅预后效果差，并导致多重耐药菌株的相继出现和流行^[1]，进一步增加了临床诊断、免疫预防 and 有效控制的难度。当前产气荚膜梭菌免疫失败，究其原因可能与以下几个主要因素有关：首先，在过去的几十年间，并未有新的产气荚膜梭菌灭活疫苗问世，已有疫苗的抗原成分和质量并不能起到良好的免疫保护效果，可能与传统疫苗株的抗原成分的质量和对流行菌株的毒素基因型或多种毒素匹配不足有关；其次，产气荚膜梭菌灭活疫苗产生体液免疫的持续时间有限，且无法诱导产生黏膜免疫反应，不能有效抑制毒素蛋白对胃肠道产生的毒害作用；第三，相关研究对市场销售的传统疫苗质量评估和检测结果显示，在使用环节不能按时给动物接种疫苗，动物体内抗体效价未达到国标要求，实际效果堪忧，在一定程度上也导致了免疫失败及产气荚膜梭菌疫情的发生。

鉴于上述情况，为获得更好的免疫防控效果，今后在疫苗的研发和使用上需尽可能地围绕以下几个关键问题：一是要充分了解我国畜禽产气荚膜梭菌的流行情况，尽可能地选择产生高滴度毒素的野外分离菌株作为亲本株，开发具有自主知识产权的产气荚膜梭菌新型疫苗。无论是灭活疫苗、类毒素疫苗、细菌载体疫苗，还是多表位疫苗，均需要平衡好疫苗安全性和免疫效力，尽快实现疫苗抗原成分的迭代升级，扩

大疫苗的保护范围，更好地应对产气荚膜梭菌众多毒素蛋白造成的危害。二是充分发挥现有产气荚膜梭菌商品疫苗的保护作用，在加强流行病学监测、流行毒株致病性分析和疫苗免疫保护效果评价的前提下，制定和调整免疫程序，确定最佳保护效力的疫苗接种方案。由于产气荚膜梭菌是一种条件性致病菌，要严格做好畜禽日常的饲养和管理，降低疾病发生的可能性。近年来，产气荚膜梭菌耐药率呈上升趋势，多重耐药菌株不断出现，给世界公共卫生安全和畜禽健康养殖带来了严重威胁。如何提升疫苗的抗原性及免疫效力，研发出高效、稳定、安全的产气荚膜梭菌新型疫苗，将成为未来产气荚膜梭菌疫苗研究中最受关注的领域。

参考文献：

- [1] 吴克, 王娟, 杨增岐. 动物源产气荚膜梭菌致病因子和耐药性研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2024, 60 (3): 84-89.
- [2] KIU R, HALL L J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7 (1): 141-155.
- [3] NAVARRO M A, MCCLANE B A, UZAL F A. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins [J]. Toxins (Basel), 2018, 10 (5): 212.
- [4] REVITT-MILLS S A, ROOD J I, ADAMS V. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting [J]. Microbiol Aust, 2015, 36 (3): 114.
- [5] UZAL F A, SONGER J G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats [J]. J Vet Diagn Invest, 2008, 20 (3): 253-265.
- [6] GRECO G, MADIO A, BUONAVOGLIA D, et al. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy [J]. Vet J, 2005, 170 (3): 346-350.
- [7] LEE K W, LILLEHOJ H S, KIM W, et al. Research note: first report on the detection of necrotic enteritis (NE) B-like toxin in biological samples from NE-afflicted chickens using capture enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Poult Sci, 2021, 100 (7): 101190.
- [8] OYSTON P, PAYNE D W, HAVARD H L, et al. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice [J]. Microbiology (Reading), 1998, 144 (Pt 2): 333-341.
- [9] 巴图宝力代, 曹政. 羊梭菌病防控技术 [J]. 兽医导刊, 2021 (19): 38-39.
- [10] FERREIRA M R A, MOREIRA G M S G, DACUNHA C E P, 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.
- [11] LOBATO F C, LIMA C G, ASSIS R A, et al. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ruminants [J]. Vaccine, 2010, 28 (38): 6125-6127.
- [12] MOREIRA G M, SALVARANI F M, DA C C, et al.

- Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against *Clostridium perfringens* alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22816.
- [13] SIQUEIRA F F, SILVA R, DO C A, et al. Immunization with a nontoxic naturally occurring *Clostridium perfringens* alpha toxin induces neutralizing antibodies in rabbits [J]. *Anaerobe*, 2018, 49: 48–52.
- [14] SIQUEIRA F F, ALMEIDA M O, BARROCA T M, et al. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (plc) reveals high genetic diversity [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 159 (3/4): 397–405.
- [15] ZENG J, DENG G, WANG J, et al. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β 2- β 1 fusion toxin in mice, sows and cows [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (33): 5459–5466.
- [16] UZAL F A, FREEDMAN J C, SHRESTHA A, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9 (3): 361–377.
- [17] JEWELL S A, TITBALL R W, HUYET J, et al. *Clostridium perfringens* alpha-toxin interaction with red cells and model membranes [J]. *Soft Matter*, 2015, 11 (39): 7748–7761.
- [18] PENG X, PENG G, LI X, et al. Immunization of rabbits with recombinant *Clostridium perfringens* alpha toxins CPA–C and CTB–CPA–C in a bicistronic design expression system confers strong protection against challenge [J]. *Protein Expr Purif*, 2020, 167: 105550.
- [19] NAGAHAMA M, OCHI S, ODA M, et al. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7 (2): 396–406.
- [20] GALVAO C C, BARBOSA J D, OLIVEIRA C, et al. Measurement over 1 year of neutralizing antibodies in cattle immunized with trivalent vaccines recombinant alpha, beta and epsilon of *Clostridium perfringens* [J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 13 (9): 594.
- [21] NIJLAND R, HEERLIEN R, HAMOEN L W, et al. Changing a single amino acid in *Clostridium perfringens* beta-toxin affects the efficiency of heterologous secretion by *Bacillus subtilis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73 (5): 1586–1593.
- [22] SORIA–GUERRA R E, NIETO–GOMEZ R, GOVEA–ALONSO D O, et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development [J]. *J Biomed Inform*, 2015, 53: 405–414.
- [23] RODRIGUES R R, ALVES F M, DONASSOLO R A, 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.
- [24] RODRIGUES R R, FREITAS M J, ALVES F M, et al. Immunization of sheep with a recombinant vaccine containing immunogenic nontoxic domains of *Clostridium perfringens* alpha and beta toxins [J]. *Microb Pathog*, 2023, 182: 106269.
- [25] UZAL F A, VIDAL J E, MCCLANE B A, et al. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases [J]. *Open Toxinology J*, 2010, 2: 24–42.
- [26] CHEN Y, CHEN M, ZHANG Y, et al. Broad-spectrum neutralization of pore-forming toxins with human erythrocyte membrane-coated nanosponges [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7 (13): e1701366.
- [27] MORCRETTE H, BOKORI–BROWN M, ONG S, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin vaccine candidate lacking toxicity to cells expressing myelin and lymphocyte protein [J]. *NPJ Vaccines*, 2019, 4: 32.
- [28] IVIE S E, MCCLAIN M S. Identification of amino acids important for binding of *Clostridium perfringens* epsilon toxin to host cells and to HAVCR1 [J]. *Biochemistry*, 2012, 51 (38): 7588–7595.
- [29] JIANG Z, CHANG J, WANG F, et al. Etx–Y71A as a non-toxic mutant of *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces protective immunity in mice and sheep [J]. *Vaccine*, 2020, 38 (42): 6553–6561.
- [30] YAO W, KANG J, KANG L, et al. Immunization with a novel *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant rETX (Y196E) –C confers strong protection in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 (1): 24162.
- [31] BOKORI–BROWN M, HALL C A, VANCE C, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A–Y196A as a recombinant vaccine candidate against enterotoxemia [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (23): 2682–2687.
- [32] DU J, WANG T, XU L, et al. *Clostridium perfringens* epsilon prototoxin mutant rPETX (Y30A/Y71A/H106P/Y196A) as a vaccine candidate against enterotoxemia [J]. *Vaccine*, 2023, 41 (32): 4762–4770.
- [33] 杜吉革, 张秀坤, 朱真, 等. 重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素三点突变体的融合表达及其免疫活性分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52 (7): 28–34.
- [34] COLE A R, GIBERT M, POPOFF M, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11 (8): 797–798.
- [35] SIMPSON K M, CALLAN R J, VAN METRE D C. Clostridial abomasitis and enteritis in ruminants [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2018, 34 (1): 155–184.
- [36] AUGUSTO D O C J, DUARTE M C, ANTUNES D A R, et al. Humoral responses in cattle to commercial vaccines containing *Clostridium perfringens* epsilon toxoid and *C. botulinum* types C and D toxoids last less than a-year [J]. *Anaerobe*, 2019, 59: 72–75.
- [37] SAADH M J, LAFI F F, DAHADHA A A, et al. Immunogenicity of a newly developed vaccine against *Clostridium perfringens* alpha-toxin in rabbits and cattle [J]. *Vet World*, 2022, 15 (7): 1617–1623.
- [38] OLIVEIRA R C, DE OLIVEIRA J C, ALVES G G, et al. Cattle and goats' humoral response to vaccination with *Clostridium perfringens* type D purified epsilon toxoids [J]. *Anaerobe*, 2021, 72: 102465.
- [39] BLACKWELL T E, BUTLER D G, BELL J A. Enterotoxemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoids [J]. *Can J Comp Med*, 1983, 47 (2): 127–132.
- [40] TARIQ M, ANJUM A A, SHEIKH A A, et al. Preparation and evaluation of alum precipitate and oil adjuvant multivalent vaccines against *Clostridium perfringens* [J]. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2021, 27 (4): 475–482.
- [41] HUSSAIN K, IJAZ M, DURRANI A Z, et al. Molecular typing of *Clostridium perfringens* toxins (α , β , ϵ , ι) and type 'A' multidrug resistance profile in diarrheic goats in Pakistan [J]. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2018, 24 (2): 251–255.

- [42] JIANG Y, MO H, WILLINGHAM C, et al. Protection against necrotic enteritis in broiler chickens by regulated delayed lysis *Salmonella* vaccines [J]. Avian Dis, 2015, 59 (4): 475-485.
- [43] LI Q, XIN W, GAO S, et al. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia [J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9 (11): 2386-2392.
- [44] SCHUDEL A, WILSON D, PEARSON J E. Office international des epizooties international standards for bluetongue [J]. Vet Ital, 2004, 40 (4): 676-681.
- [45] 杨晓明. 联合接种和联合疫苗研究进展 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41 (01): 120-126.
- [46] QIN J, WANG X, KONG J, et al. Construction of a food-grade cell surface display system for *Lactobacillus casei* [J]. Microbiol Res, 2014, 169 (9/10): 733-740.
- [47] IQBAL S, ZEBELI Q, MANSMANN D A, et al. Repeated oronasal exposure to lipopolysaccharide induced mucosal IgA responses in periparturient dairy cows [J]. PLoS One, 2014, 9 (7): e103504.
- [48] UZAL F A, MCCLANE B A. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections [J]. Vet Microbiol, 2011, 153 (1/2): 37-43.
- [49] SHAMSHIRGARAN M A, GOLCHIN M, SALEHI M, et al. Evaluation the efficacy of oral immunization of broiler chickens with a recombinant *Lactobacillus casei* vaccine vector expressing the Carboxy-terminal fragment of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* [J]. BMC Vet Res, 2023, 19 (1): 13.
- [50] ALIMOLAEI M, GOLCHIN M, EZATKHAH M. Orally administered recombinant *Lactobacillus casei* vector vaccine expressing beta-toxoid of *Clostridium perfringens* that induced protective immunity responses [J]. Res Vet Sci, 2017, 115: 332-339.
- [51] SUN L, LU Y, ZHAO N, et al. Construction of constitutive expression of *Eimeria tenella* eukaryotic initiation factor U6L5H2 on the surface of *Lactobacillus plantarum* and evaluation of its immunoprotective efficiency against chicken coccidiosis [J]. Mol Biochem Parasitol, 2022, 252: 111527.
- [52] MOHAMADZADEH M, DUONG T, SANDWICK S J, et al. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106 (11): 4331-4336.
- [53] HALONEN M, LOHMAN I C, STERN D A, et al. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort [J]. J Immunol, 2009, 182 (5): 3285-3293.
- [54] BAUDINO L, AZEREDO D S S, NAKATA M, et al. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies [J]. Springer Semin Immunopathol, 2006, 28 (2): 175-184.
- [55] ALIMOLAEI 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.
- [56] ZHAO L, GUO Z, LIU J, et al. Recombinant *Lactobacillus casei* expressing *Clostridium perfringens* toxoids α , β 2, ϵ and β 1 gives protection against *Clostridium perfringens* in rabbits [J]. Vaccine, 2017, 35 (32): 4010-4021.
- [57] HOSEINI Z S, HAJIZADE A, RAZMYAR J, et al. Mesoporous silica nanoparticles-based formulations of a chimeric proteinous vaccine candidate against necrotic enteritis disease [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 128: 112316.
- [58] IRVINE D J, HANSON M C, RAKHRA K, et al. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy [J]. Chem Rev, 2015, 115 (19): 11109-11146.
- [59] WAN W, LI Y, WANG J, et al. PLGA nanoparticle-based dissolving microneedle vaccine of *Clostridium perfringens* epsilon toxin [J]. Toxins (Basel), 2023, 15 (7): 461.
- [60] RENU S, MARKAZI A D, DHAKAL S, et al. Oral deliverable chitosan-*Salmonella* subunit nanovaccine for layer chickens [J]. Int J Nanomedicine, 2020 (15): 761-777.
- [61] FATHI N M, RAHMAN M M, HEMMATY M. Effectiveness of chitosan nanoparticles in development of pentavalent clostridial toxoid vaccine in terms of clinical pathology elements and immunological responses [J]. Arch Razi Inst, 2020, 75 (3): 385-395.
- [62] KAZI A, CHUAH C, MAJEED A, et al. Current progress of immunoinformatics approach harnessed for cellular- and antibody-dependent vaccine design [J]. Pathog Glob Health, 2018, 112 (3): 123-131.
- [63] UNNI P A, ALI A, ROUT M, et al. Designing of an epitope-based peptide vaccine against walking pneumonia: an immunoinformatics approach [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46 (1): 511-527.
- [64] WANG Y. Bioinformatics analysis of NetF proteins for designing a multi-epitope vaccine against *Clostridium perfringens* infection [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2020, 85: 104461.
- [65] MEHDIZADEH G I, PARREIRA V R, NOWELL V J, et al. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis [J]. PLoS One, 2015, 10 (4): e0122684.
- [66] TAHIR U Q 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.
- [67] ALDAKHEEL F M, 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):