

微生物实验室检测技术在疫苗研制中的应用与探讨

王冠华^{1*}, 李娜²

(1. 甘肃医学院, 平凉 744000; 2. 平凉第四人民医院, 平凉 744000)

摘要: 微生物实验室检测技术在疫苗研制中扮演着至关重要的角色, 涵盖菌种筛选、生产监控、质量控制及安全性评价等多个环节。该技术通过显微镜观察、分离培养、分子生物学检测和免疫学检测等手段, 确保了疫苗研制的精确性和高效性。尽管技术在不断发展, 但仍面临标准化程度不高、设备性能不足、人员素质差异和试剂供应不稳定等挑战。为提升疫苗研制水平, 需加强检测方法研究、提高设备性能、培养专业人才和完善质量管理体系。本研究对微生物实验室检测技术在疫苗研制中的应用现状、挑战及对策进行了深入探讨, 以期期为疫苗研制领域的科研人员提供参考, 推动公共卫生事业的发展。

关键词: 微生物实验室检测技术; 疫苗研制; 菌种筛选; 质量控制; 安全性评价

0 引言

疫苗作为现代医学中预防传染病的基石, 其研制与生产是维护公共卫生安全的重要环节。疫苗的研制不仅涉及复杂的生物化学过程, 还包括对病原微生物的深入研究^[1]。在这些过程中, 微生物实验室检测技术扮演着至关重要的角色。微生物实验室检测技术不仅为疫苗的研制提供了必要的科学依据, 而且确保疫苗产品的安全性和有效性。随着生命科学和生物技术的飞速发展, 微生物实验室检测技术也在不断进步, 其在疫苗研制中的应用变得更加深入和广泛。微生物实验室检测技术在疫苗研制中的应用主要包括四个方面。一是筛选和鉴定疫苗原料菌种, 保障起始材料的安全性; 二是在生产过程中监控菌种生长和代谢, 确保生产稳定性和产品一致性; 三是对疫苗成品进行质量控制, 全面检测有效成分、杂质和稳定性; 四是对疫苗安全性进行评估, 涉及免疫原性、毒性和过敏性等方面^[2]。本文旨在深入探讨微生物实验室检测技术在疫苗研制中的应用现状、发展趋势以及面临的挑战, 将从技术原理、操作流程、检测方法创新等多个角度, 详细分析微生物实验室检测技术在疫苗研制中的关键作用, 并探讨如何通过技术创新和标准化建设, 进一步提升疫苗研制的整体水平。通过本文的研究, 期望为疫苗研制领域的科研人员提供有益的参考, 推动疫苗研制技术的进步, 为公共卫生

事业做出贡献。

1 微生物实验室检测技术概述

1.1 微生物实验室检测技术

(1) 显微镜观察技术是微生物检测领域的关键手段, 涵盖光学显微镜和电子显微镜等多种技术, 能够清晰地观察微生物的形态、内部结构以及生长动态等关键特征, 对于微生物的初步识别与分类至关重要。除此之外, 还用于监控疫苗生产过程中菌种的生长状况, 确保疫苗的品质与安全性。显微镜观察技术具有直观、简便快速等优点, 但也有其局限性^[3], 例如对操作者的经验和技能要求较高, 且无法提供关于微生物生理功能的详细信息。

(2) 分离培养技术是一种从复杂微生物群体中筛选和纯化目标菌种的重要方法, 广泛应用于疫苗原料菌种的筛选与鉴定。该技术通过选择性培养基、差速离心、平板划线等手段, 确保菌种的高纯度和强活力, 为后续研究和生产提供基础。然而, 其过程繁琐、耗时长, 且部分微生物难以在人工培养基上生长, 存在一定局限性^[4]。

(3) 分子生物学检测技术基于微生物的遗传物质(DNA或RNA), 通过多种方法实现对微生物的精确检测与分析, 包括聚合酶链反应(PCR)、基因测序、实时定量PCR和基因芯片等。该技术以其高灵敏度和特异性著称, 能精确鉴定微生物种类, 检测疫苗原料及产品中的微生物污

* 通信作者: 王冠华, 硕士, 研究方向为疫苗。E-mail: 532715116@qq.com

染, 评估疫苗的遗传稳定性, 从而确保疫苗的质量与安全^[5]。然而该技术也存在一些缺点, 如设备和试剂成本较高, 操作较为复杂, 且可能受到实验室环境污染的影响。

(4) 免疫学检测技术基于抗原与抗体之间的特异性识别与结合, 包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫荧光技术和 Western blotting 等多种方法。该技术在疫苗研发中可用于疫苗成分的精确量化、免疫原性的系统评价及不良反应的严密监控等。其优点是特异性强、灵敏度高、操作简便, 但存在交叉反应导致假阳性的可能, 且对试剂质量要求较高^[6]。

1.2 微生物实验室检测技术优点与现状

1.2.1 微生物实验室检测技术优点

微生物实验室检测技术一般具备较高的灵敏度, 能够准确捕捉到较低浓度的微生物或其成分, 对疫苗生产过程中的质量控制尤为关键。一般具有特异性, 通过设计特异性抗体或引物, 能够针对特定的微生物进行精确识别, 有效降低了假阳性结果的出现^[7]。现代检测技术如 PCR 等, 以其快速简便的操作流程, 大大提升疫苗研制的效率。这些经过长期科学验证和技术优化的检测方法, 因其高度的可靠性, 已成为疫苗研制领域不可或缺的工具。

1.2.2 微生物实验室检测技术现状

微生物实验室检测技术经历了从传统显微镜观察、分离培养到分子生物学检测、免疫学检测等多元化技术的发展^[8]。以 PCR 技术为例, 其在疫苗研制中的应用大大提高了病原微生物检测的灵敏度, 使得研发团队能够快速准确地鉴定疫苗原料中的微生物种类。在某新型流感疫苗的研制过程中, 利用 PCR 技术对候选疫苗株进行基因序列分析, 成功筛选出具有良好免疫原性的毒株, 显著缩短了疫苗研发周期。微生物实验室检测设备也在向自动化、智能化方向迈进, 如自动化液体处理系统和高通量测序仪等设备在疫苗研制中的应用, 不仅提高了检测效率, 还降低了人为误差^[9]。

2 微生物实验室检测技术在疫苗研制中的应用

2.1 疫苗原料菌种的筛选与鉴定

2.1.1 显微镜观察

显微镜观察是疫苗原料菌种筛选流程中的关键起始步骤。借助高分辨率显微镜技术, 如相差显微镜、荧光显微镜及共聚焦激光扫描显微镜等先进设备, 研究人员能够细致入微地观察菌落的各项特征, 包括形态、大小、颜色、边缘细节以及细胞内部的超微结构^[10]。这些精细特征的识别, 对于初步筛选出具有潜在疫苗研发价值的菌种, 具有至关重要的意义。通过这一过程, 能够确保所选菌种在后

续疫苗研发中的高效性和安全性。

2.1.2 分离培养

分离培养技术依托于选择性培养基以及精确调控的培养条件, 如温度、pH 值、氧气浓度等, 从环境或临床样本中筛选出目标菌种, 并成功获得纯净的单个菌落。其关键在于确保菌种纯度达到高标准。通过连续的传代培养, 能够验证菌种的遗传稳定性和培养的可重复性, 为后续的菌种鉴定及疫苗生产提供了坚实的实验基础^[11]。

2.1.3 分子生物学检测

分子生物学检测技术为菌种的精确鉴定提供了重要手段, 能有效识别菌种的特异性遗传标记, 检测潜在污染物, 从而保障疫苗原料的纯度和安全性。通过比较基因组学分析, 不仅能够揭示菌种间的亲缘关系, 还为疫苗的定向改造提供了坚实的科学基础^[12]。实时定量 PCR 技术对几个候选菌种进行基因表达分析, 研究发现菌种 JS-01 和 JS-03 的目标基因 GeneA 的 Ct 值分别为 20.5 和 22.1, 均小于阳性对照的 19.8 且阴性对照未检出, 结果为阳性; 而菌种 JS-02 的目标基因 GeneA 的 Ct 值为 35.2, 大于阳性对照的 19.8 且阴性对照未检出, 结果为阴性。由此可知, JS-02 不适合作为疫苗原料的选择。通过显微镜观察、分离培养和分子生物学检测等技术筛选出具有潜在疫苗研发价值的菌种 JS-01 和 JS-03。

2.2 疫苗生产过程监控

2.2.1 菌种监控

在疫苗生产过程中, 菌种监控是确保产品质量的首要环节, 涉及对菌种生长特性、遗传稳定性和生产能力的全面检测。实验室采用的监控手段包括定期显微镜观察以监测菌落形态和生长速度, 利用分子指纹图谱技术分析菌种遗传指纹, 以及实时定量 PCR 技术监测特定基因表达水平。一旦监控过程中发现菌种生长缓慢、形态改变或生产能力下降, 将立即采取措施, 如重新筛选菌种、优化培养条件或进行基因工程改造^[13]。

2.2.2 培养基检测

培养基为菌种提供必要的营养和环境条件, 其成分的准确性和稳定性直接关系到疫苗生产的成败^[14]。实验室采用离子色谱技术测定无机离子浓度, 如磷酸盐、铵离子等, 采用高效液相色谱(HPLC)分析有机成分, 包括氨基酸、糖类和脂肪酸, 以及采用质谱分析(MS)技术进行全面的成分定量分析和复杂分子结构鉴定。这些技术的综合应用使研究人员能够及时发现并调整培养基中的成分偏差, 确保满足菌种在不同生长阶段的需求^[15]。在流感疫苗生产中, HPLC 技术被用于监控和调整培养基成分, 通过

优化某种氨基酸的含量, 提升疫苗株的生长性能和产量稳定性。这些精确的检测和调整措施显著提升了疫苗生产效率和质量, 为疫苗的稳定性 and 安全性提供了有力保障。

2.2.3 发酵液检测

在疫苗生产过程中, 发酵液的检测至关重要, 它涵盖了菌体密度、代谢产物、酶活性、pH 值、溶氧量等多个关键参数的实时监控。借助流式细胞术、高效液相色谱、质谱等先进技术, 能对发酵过程进行精确调控, 从而保障疫苗的品质与产量^[16]。表 1 展示了疫苗生产过程中不同时间节点下菌体密度和关键代谢产物浓度的监测数据。发酵过程在 12 h 后达到了菌体密度和代谢产物浓度的顶峰, 这一时间点被认为是收获疫苗成分的最佳时机。

2.3 疫苗质量控制与安全性评价

2.3.1 疫苗成分检测

利用 HPLC、MS、毛细管电泳等技术, 对疫苗中的有效成分进行定量分析, 确保其含量符合药典规定。通过免疫分析技术, 如 ELISA, 检测疫苗中的抗原含量和纯度。疫苗成分的精确检测是质量控制的关键^[17]。表 2 展示了通过 HPLC 对疫苗中有效成分进行定量分析的结果, 所有样品中的有效成分 A 和 B 的含量均符合药典规定, 表明疫苗成分的质量控制合格。

表 3 动物实验中疫苗安全性评价结果

动物模型	接种剂量 / μg	观察期 /d	体重变化 /g	临床症状	病理变化
小鼠	5	14	+2.5	无	无明显异常
大鼠	10	28	+15.0	无	无明显异常
兔子	20	21	+0.5	轻微腹泻	轻微肠炎
非人灵长类	50	90	+300.0	无	无明显异常

2.4 疫苗研发中的微生物检测技术新进展

高通量测序技术的应用, 使得对疫苗原料菌种的基因组进行全方位、迅速的分析成为现实。单细胞分析技术的引入, 使研究人员能够在单个细胞层面上深入研究菌种的生长、代谢及免疫原性, 为疫苗的精确定设计开辟了新的研究路径。生物信息学与机器学习技术的融合, 为疫苗研发过程中的数据处理和分析提供了强大支持, 助力科研人员快速识别和验证新的疫苗候选株, 推动了疫苗研发工作的快速发展。

在疫苗研发领域, 微生物检测技术的新进展不仅包括高通量测序、单细胞分析、生物信息学与机器学习技术的应用, 还有基因组编辑技术、蛋白质组学技术和代谢组学技术。基因组编辑技术, 尤其是 CRISPR/Cas9, 在疫苗研发中变得越发重要。它能精确修改微生物基因组, 移除致病基因并提升疫苗免疫原性, 例如已用于开发更安全的流感疫苗。同时生物信息学通过分析大量基因组数据, 助力

表 1 发酵过程中菌密度和代谢产物浓度的监测数据

时间点 /h	菌密度 / (CFU/mL)	代谢产物 A/ (mg/L)	代谢产物 B/ (mg/L)
0	1.0×10^6	10.2	5.1
6	3.2×10^8	45.6	23.4
12	6.5×10^8	80.1	40.2
24	8.9×10^8	95.3	48.5

表 2 疫苗中有效成分的定量分析结果

样品编号	有效成分 A/ ($\mu\text{g/mL}$)	有效成分 B/ ($\mu\text{g/mL}$)	总蛋白 / (mg/mL)
V-01	50.2	20.5	1.2
V-02	48.7	19.8	1.1
V-03	51.6	21.2	1.3

2.3.2 安全性评价

疫苗的安全性评价是疫苗质量控制中至关重要的环节, 它直接关联到疫苗的使用安全性和公众健康。评价过程涉及严格的动物实验, 使用小鼠、大鼠、兔子和非人灵长类等多种动物模型来模拟疫苗在人体内的反应, 并通过观察动物接种疫苗后的行为、生理反应、病理变化及长期生存状况来初步判断疫苗的安全性^[18]。细胞毒性试验利用体外培养的细胞系检测疫苗成分对细胞的影响, 以及过敏原性检测通过免疫学方法和动物模型评估疫苗的潜在过敏原性。表 3 为动物实验中疫苗安全性评价的结果。

快速筛选疫苗候选株和预测其免疫原性, 为疫苗设计优化提供理论支持。

3 微生物实验室检测技术在疫苗研制中的挑战与对策

3.1 微生物实验室检测技术在疫苗研制中的挑战

当前微生物实验室在疫苗研制过程中面临的挑战主要包括检测方法标准化程度不高, 导致不同实验室间检测结果的一致性和可比性较低, 缺乏统一的操作规程和质控标准, 增加了质量控制的不确定性。高端检测设备的缺乏或性能不足限制了检测技术的应用范围和精度, 特别是在高通量、高灵敏度的检测需求上现有设备难以满足^[19]。检测人员专业素质参差不齐, 影响了检测结果的准确性和可靠性。市场上检测试剂和标准品的质量不稳定、供应不可靠, 也为疫苗研制带来了额外的风险。这些问题共同构成了微生物实验室检测工作的挑战, 需要通过提高标准化水

平、升级设备性能、加强人员培训和稳定供应链等措施来解决。

3.2 微生物实验室检测技术在疫苗研制中的对策

加强检测方法的研究与推广, 通过国际合作和技术交流, 推动检测方法的标准化和规范化, 提高检测结果的准确性和可比性。提高检测设备性能, 投资于高端检测设备的研发和引进, 同时加强对现有设备的维护和升级, 确保检测设备的高性能和稳定性。提升检测人员素质, 建立完善的培训体系, 定期举办专业知识和技能培训, 鼓励参与国内外学术交流, 提升创新能力^[20]。建立完善的疫苗研制质量管理体系, 构建涵盖全过程的质控体系, 并加强对检测试剂和标准品的管理。通过折线图进行可视化分析, 图1展示了各项挑战与对策之间的关联, 以及对策实施后的预期改进。

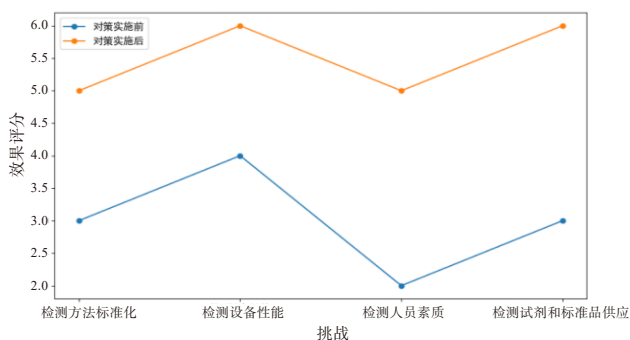


图1 疫苗研制中微生物检测技术的挑战与对策折线图

4 总结

微生物实验室检测技术在疫苗研制中发挥着至关重要的作用。从疫苗原料菌种的筛选与鉴定, 到生产过程的监控, 再到疫苗成品的质量控制和安全性评价, 该技术为疫苗研制的各个环节提供了精确、高效的检测手段。随着生命科学和生物技术的不断发展, 微生物实验室检测技术也在不断进步, 其在疫苗研制中的应用日益深入和广泛。该技术在疫苗研制过程中仍面临标准化程度不高、检测设备性能不足、检测人员素质参差不齐以及检测试剂和标准品供应不稳定等挑战。为应对这些挑战, 需加强检测方法的研究与推广、提高检测设备性能、提升检测人员素质, 并建立完善的疫苗研制质量管理体系。通过这些措施有望进一步提升微生物实验室检测技术在疫苗研制中的应用水平, 为全球公共卫生事业做出更大贡献。

参考文献

[1] 杜彦霆. 新型貉细小病毒双重PCR检测方法的建立及灭活疫苗的研制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.

[2] 刘松涛. 我国部分省区猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及灭活疫苗的研制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.

[3] 张阳阳, 万强, 牛得权, 等. 基于响应面分析的高抗原活性猪水肿病大肠杆菌疫苗培养基的研制及效果评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4141-4153.

[4] 柳海燕, 侯景, 刘青娥, 等. 虚实结合的疫苗工程综合性实验教学模式探索[J]. 丽水学院学报, 2023, 45(5): 112-119.

[5] 夏芯, 朱雅文, 周利, 等. 疫苗新型佐剂的作用机制和研发进展综述[J]. 中国疫苗和免疫, 2023, 29(4): 474-482.

[6] 郭晓, 仝泽辉, 杜宗敏. 鼠疫减毒活疫苗研究现状与展望[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 567-581.

[7] 姚梦玮, 李玉迁, 徐庆胜, 等. 基于蛋白质组学技术探讨麻疹减毒活疫苗191株抑制三阴性乳腺癌细胞增殖的可能机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(7): 568-576.

[8] 张鹏云. 副猪格蓝菌ELISA抗体检测试剂盒的研制[D]. 南京: 南京农业大学, 2022.

[9] 谷志鹏. 狂犬病病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及其生物传感器检测方法研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2022.

[10] 尹伟, 胡琪, 李新章, 等. 病原微生物检测技术方法研究进展[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2023, 38(2): 40-48.

[11] 宁雅婷, 杨启文, 陈新飞, 等. 临床微生物快速检测新技术发展现状与前景[J]. 协和医学杂志, 2021, 12(4): 427-432.

[12] 代航, 刘莎, 叶强, 等. 高等级病原微生物实验室在生物医药领域的应用研究[J]. 中国药事, 2024, 38(3): 298-306.

[13] 王玉静, 陆梓涔, 陈俊煜, 等. 高通量测序技术的发展及其在临床检测中的应用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2021, 60(5): 811-820.

[14] 王栋. 高级别生物安全实验室检测特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.

[15] 朱玉梅, 夏子涵, 李金莉, 等. 多色探针熔解曲线分析技术检测广泛耐药肺结核的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2023, 45(4): 406-411.

[16] 王玲玲. 微生物检验: 疾病预防控制的隐形卫士[J]. 家庭科学, 2024, (12): 53.

[17] 陈亚黎, 裴文静, 范金鹏, 等. 不同采样法对洁净室表面微生物检测效果的比较研究[J]. 生物化工, 2023, 9(1): 43-45, 56.

[18] 张荣. 微生物检测技术在食品检验中的应用价值研究[J]. 食品安全导刊, 2022, (24): 147-149.

[19] 孙志刚, 刘静, 王奕凯, 等. 微生物检测技术在动物细菌性疫病诊断中的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2024, 44(4): 111-118.

[20] 苏华彬, 刘蒙达, 南文龙, 等. 荧光免疫层析技术原理及其在病原微生物检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2024, 41(1): 67-71.