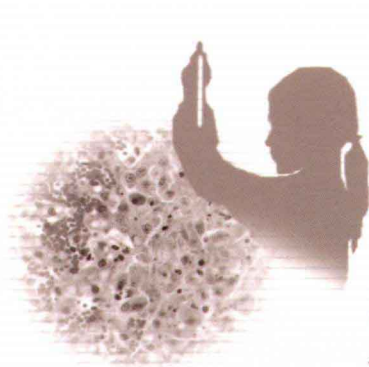


高职高专教育“十二五”规划建设教材

“国家示范性高等职业院校建设计划”骨干高职院校建设项目成果



动物

Dongwu Bingyuantí Jiāncè Jìshù

病原体检测技术

(畜牧兽医类专业用)

羊建平 张君胜 主编



中国农业大学出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

高职高专“十二五”规划建设教材

“国家示范性高等职业院校建设计划”骨干高职院校建设项目成果

动物病原体检测技术

(畜牧兽医类专业用)

羊建平 张君胜 主编

中国农业大学出版社

· 北京 ·

内 容 简 介

本教材按照高职教育理论和实训一体化的教学模式,紧扣畜牧兽医类专业人才培养标准和职业岗位需要,采用项目化的编写体例,突出教学内容的适用性和实用性,尤其在教材中增加了一些基层单位适用的新技术。

本教材共分7个项目,主要内容包括动物病原体检测基本技术、细菌检测技术、病毒检测技术、其他微生物检测技术、寄生虫检测技术、免疫学检测技术和分子生物学检测技术等。

本教材既可作为高等职业技术教育畜牧兽医类专业的教学用书,也可作为基层畜牧兽医技术人员和广大畜禽养殖户的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

动物病原体检测技术/羊建平,张君胜主编. —北京:中国农业大学出版社,2013.1

ISBN 978-7-5655-0384-9

I. ①动… II. ①羊… ②张… III. ①动物疾病-病原体-实验室诊断-高等职业教育

IV. ①S854.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 299988 号

书 名 动物病原体检测技术

作 者 羊建平 张君胜 主编

策划编辑 伍 斌 康昊婷

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2013年1月第1版 2013年1月第1次印刷

规 格 787×1 092 16开本 18.75印张 466千字

定 价 32.00元

责任编辑 韩元凤

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编 审 人 员

- | | | |
|-----|-----|---------------|
| 主 编 | 羊建平 | 江苏畜牧兽医职业技术学院 |
| | 张君胜 | 江苏畜牧兽医职业技术学院 |
| 副主编 | 徐永荣 | 江苏兴化畜牧兽医站 |
| | 高 睿 | 杨凌职业技术学院 |
| | 向双云 | 北京农业职业学院 |
| | 魏冬霞 | 江苏畜牧兽医职业技术学院 |
| 参 编 | 杨晓志 | 江苏畜牧兽医职业技术学院 |
| | 钱明珠 | 河南农业职业学院 |
| | 于世平 | 江苏兴化畜牧兽医站 |
| | 杨 松 | 辽宁医学院 |
| | 加春生 | 黑龙江农业工程职业技术学院 |
| | 张 尧 | 江苏畜牧兽医职业技术学院 |
| | 徐思炜 | 江苏畜牧兽医职业技术学院 |
| | 罗益民 | 江苏泰兴畜牧兽医技术中心 |
| | 李河林 | 杨凌绿方生物工程有限公司 |
| 主 审 | 陈鹏峰 | 中国兽医协会 |
| | 戴璐君 | 江苏泰兴畜牧兽医技术中心 |

前 言

本教材是中国农业大学出版社根据《教育部加强高职高专教育人才培养工作的意见》组织编写的“十二五”规划教材之一。也是江苏畜牧兽医职业技术学院国家示范(骨干)院校建设的核心教材之一。主要为畜牧兽医专业而编写,也可作为动物生产类、动物医学及检验类行业企业技术人员的参考书。

本教材注重培养学生的实际应用能力和基本技能训练,将畜牧兽医专业的病原体诊断与相应国家标准要求相融合。在对畜禽生产过程中岗位任务进行调研的基础上,将病原体检测的典型工作任务进行教学分解,按照认知规律、同质化原则,以岗位需求为导向,以职业技能鉴定为依据,以实际工作任务构建教学内容,按工作过程设计学习情景,将教学内容任务化,并强调学习过程的连贯性。教材划分为7大项目:①动物病原体检测基本技术;②细菌检测技术;③病毒检测技术;④其他微生物检测技术;⑤寄生虫检测技术;⑥免疫学检测技术;⑦分子生物学检测技术。每个项目下设若干个学习任务,学习任务来源于工作岗位调查,任务涵盖了畜禽生产中病原体检测的关键技能和知识点;每一个学习任务都有若干个理论与实践一体化的学习情景。

本教材按照“以能力为目标,以学生为主体,以教师为主导,以项目为载体”的要求,教材内容以“教、学、做”一体化的体例安排,贯穿于教材始终。每个学习任务有任务知识准备,教师根据教学活动提前布置任务,同学搜集资料,作出任务计划。任务实施过程中通过技能训练与操作对知识进行理解和加深。任务结束有任务知识拓展,可供同学对相关知识进一步学习。通过任务的计划、实施、完成,使相应的理论知识和技能逐渐递增,改变了以往的教学模式,可以有效提高学习效率。

近年来畜牧行业中不断发生重大疫情,国家加强动物疫病的防疫、检疫、诊断法规,为了使学生学习了解更多的行业知识,在项目二、三、四、五的知识拓展中加入了部分疾病的国家标准。

本教材是在多年教学实践和探索基础上,通过学习和领会“高等学校教学质量和教学改革工程”的精神,与多所院校及行业企业合作开发基于工作任务和工作过程的课程。在教材编写的过程中得到中国兽医协会、杨凌职业技术学院、北京农业职业学院、河南农业职业学院、黑龙江农业工程职业技术学院、辽宁医学院、江苏泰兴畜牧兽医技术中心、江苏兴化畜牧兽医站、杨凌绿方生物工程有限公司等单位工作在生产教学第一线的行业人员和教师的大力支持,在此一并表示感谢。

动物病原体检测技术教材内容广泛,包括微生物学、寄生虫学、免疫学、分子生物学等多方面的基础理论知识及实践技能。如何做到面向现代科技、面向畜牧业发展、面向畜牧兽医专业专科学生就业需求设置内容,安排好教材内容的深度和广度,一直是我们努力研究的问题。由于编者水平有限,教材不免有不当之处,恳请使用的师生和读者提出批评和建议。

羊建平 张君胜

2012年8月

目 录

项目一 动物病原体检测基本技术	1
任务 1-1 认识动物病原体	1
任务 1-2 病原体检测常用仪器的使用	11
任务 1-3 病原体检测常用器械的准备	23
任务 1-4 病料的采集、保存及运送	36
项目二 细菌检测技术	44
任务 2-1 细菌大小测定	44
任务 2-2 细菌标本片的制备与染色	46
任务 2-3 细菌常用培养基的制备	56
任务 2-4 细菌的分离培养及培养性状的观察	62
任务 2-5 细菌的生理生化试验	72
任务 2-6 抗菌药物敏感性试验(纸片扩散法)	81
任务 2-7 环境及动物体表细菌检测技术	87
任务 2-8 细菌致病性检测技术	95
任务 2-9 认识重要的动物病原细菌	102
项目三 病毒检测技术	114
任务 3-1 病毒的形态学检查	114
任务 3-2 病毒的鸡胚接种	118
任务 3-3 病毒的血凝和血凝抑制试验	126
任务 3-4 认识主要的动物病毒	131
项目四 其他微生物检测技术	144
任务 4-1 真菌形态检测技术	144
任务 4-2 真菌的分离培养技术	150
任务 4-3 放线菌的形态观察	154
项目五 寄生虫检测技术	161
任务 5-1 动物寄生虫病剖检技术	161
任务 5-2 粪便中寄生虫及其虫卵的检测技术	188
任务 5-3 动物体表寄生虫检测技术	205

2 动物病原体检测技术

任务 5-4 血液中寄生虫检测技术	212
任务 5-5 旋毛虫检测技术	222
项目六 免疫学检测技术	228
任务 6-1 认识免疫器官及抗原和抗体	228
任务 6-2 变态反应检测技术	244
任务 6-3 凝集试验法检测技术	251
任务 6-4 沉淀试验检测技术	257
任务 6-5 酶联免疫吸附检测技术	264
任务 6-6 免疫金检测技术	268
项目七 分子生物学检测技术	272
任务 7-1 反转录聚合酶链式反应检测猪瘟病毒	272
任务 7-2 了解核酸杂交技术和生物芯片技术	283
参考文献	290

项目一 动物病原体检测基本技术

任务 1-1 认识动物病原体

【目标】

1. 熟悉搜集动物病原体检测相关技能和知识的途径,理解病原体的概念和分类,了解动物病原体的危害性和研究历史;
2. 熟知动物病原体检测实训室安全条例,掌握意外事件的预防和处理方法;
3. 清楚学习动物病原体检测技术的目的和方法。

【技能】

一、搜集动物病原体检测相关技能和知识的途径

1. Internet 搜索引擎

使用谷歌、百度、搜狗等常用引擎,搜索动物病原体的相关信息。

2. 数据库

通过维普资讯(<http://www.cqvip.com/>)、万方数据库知识服务平台(<http://g.wanfangdata.com.cn/>)、中国知网(<http://www.cnki.net/>)等查阅动物病原体相关文献。

3. 电子图书

通过超星图书馆(<http://book.chaoxing.com/>)等下载、阅读相关动物病原体的知识和技术。

4. 网站

关于动物病原体检测技术的网站很多,列举部分如下(网址仅供参考):

- (1)<http://www.cav.net.cn> 中国畜牧兽医信息网
- (2)<http://www.agri.gov.cn> 中国农业信息网
- (3)<http://www.caaa.cn> 中国畜牧业信息网
- (4)<http://www.caav.org.cn> 中国畜牧兽医学会
- (5)<http://www.cadc.gov.cn> 中国兽医网

- (6)<http://www.chinabreed.com> 中国养殖网
- (7)<http://www.cnaho.com> 畜牧兽医在线
- (8)<http://www.ipd.org.cn> 中国疾病预防控制中心
- (9)<http://www.cahi.org.cn> 中国动物卫生监督网
- (10)<http://www.1350135.com/html/jibing> 中国猪病网
- (11)<http://www.epizoo.org/ch> 中国动物卫生与流行病学网
- (12)<http://www.parasitology.com.cn> 寄生虫学信息网

5. 期刊

包含动物病原体相关知识和技术的期刊非常多,如《畜牧兽医》、《中国畜禽传染病》、《中国兽医杂志》、《中国兽医科学》、《中国兽医学报》、《动物医学进展》、《江苏农业科学》、《国外兽医学——畜禽传染病》、《兽医大学学报》、《中国预防兽医学报》等中文核心期刊。

6. 参考图书

洪秀华的《临床微生物检测》,科学技术出版社,2005;黄敏的《微生物学与微生物学检测》,人民军医出版社,2006;张西臣的《动物寄生虫病学》(第3版),科学出版社,2010;李舫的《动物微生物》,中国农业出版社,2006;张宏伟的《动物寄生虫》,中国农业出版社,2006;崔治中的《兽医免疫学》,中国农业出版社,2004;石佑恩的《病原生物学》(第2版),人民卫生出版社,2002等。

二、病原体检测实训室守则

在病原体检测过程中,操作稍有疏忽就有可能引起疫病流行,甚至发生感染。为此,在实训时必须遵守以下规定。

1. 防止病原微生物的散布

(1)在实训时必须穿工作服,当接触或操作危险材料时,须穿戴胶靴、围裙、手套及眼镜,用后应立即消毒清洗,方可再用。操作时勿以手指或其他器物等接触口唇、眼、鼻和面部,手和面部有伤口时,应避免危险材料的接触。

(2)使用危险材料应进行无菌操作,盛装危险材料的器皿要牢固,以免操作过程中破裂,造成污染。用过的尸体、内脏、血液以及废弃的培养基、生物制品等,须严格消毒或深埋。用过的棉球、纱布等污物,放在固定容器中,统一处理,不得随意抛弃。

(3)接种环(针)用前用后必须于火焰中烧灼灭菌。

(4)含有微生物培养物的试管不可平放在桌面上,以防止液体流出。

(5)实验室内禁止饮食、吸烟及用嘴湿润铅笔及标签等物。

(6)操作危险材料时勿谈话或思考其他问题,以免分散注意力而发生意外。

(7)菌种或种毒不得带出实验室,若要索取,应严格按规章办理。

(8)实训完毕,将操作台面用消毒液消毒,自身的手也须消毒和洗刷干净后方可离开实验室。

2. 防火

一切易燃品应远离火源。不可将酒精灯倾向另一酒精灯引火,以免发生爆炸。电炉、电热板、煤油炉、煤气等用完后应立即关灭。

3. 节约

- (1) 使用药品、试剂、染色剂、镜油、拭镜纸等应节约。
- (2) 吸管插入试管中时,要轻放到底才松手,以免戳破试管。
- (3) 平皿一般应倒放,以免拿时皿底掉下摔破。
- (4) 金属器皿用完消毒后,应立即擦干,防止生锈。

4. 标记

所用各种试剂、染色剂、培养物、动物等,均需标记明确。要经高压消毒或蒸汽消毒的标签,应用深黑色铅笔书写,不可用毛笔、钢笔、圆珠笔书写,以免消毒后模糊不清。

5. 记录

实训前应对本次实训目的、有关内容和操作技术进行预习;实训时在老师指导下进行,并遵守实训程序,均不可潦草应付或不动手;实训时应做好记录,特别是实训内容、方法及结果应详细记录,认真做好作业。

三、病原体检测实训室意外事件的预防和处理

学生进行病原体检测实训时必须认真细致,如不小心就有遭遇意外危险的可能,如剖检感染动物和检验细菌标本时受感染,不慎吸入菌液或腐蚀性毒物,发生烫伤或割伤等。为避免临时慌张,熟悉预防与处理方法实为必要。

(一) 意外事件的预防

1. 重要设备及精密仪器的使用

如恒温箱培养箱、冰箱(柜)、干燥箱、离心机、高压蒸汽灭菌器、显微镜等应注意保护,使用前应熟悉使用方法及注意事项,并经常检查。如有损坏,立即修理,以免发生危险。

2. 对有毒及传染性物质的操作

(1) 强酸、强碱及活菌液应以移液管、滴定管、注射器、量筒计量,如用吸管吸取时,可将吸管的吸口塞以棉花,或用细软橡皮管(球)套于管端,以免吸取液直接接触吸球。

(2) 研磨病料或接种细菌时,应于接种橱、无菌室或超净工作台中进行。

(3) 使用或反应过程中产生氯、溴、氧化氮、卤化氢等有毒气体或液体的实训,都应该在通风橱内进行,有时也可以用气体吸收装置吸收产生的有毒气体。

(4) 剧毒化学试剂在取用时决不允许直接与手接触,应戴防护目镜和橡皮手套,并注意不让剧毒物质掉到桌面。在操作过程中,经常冲洗双手,仪器用完后,立即洗净。

3. 废品及污物的处理

(1) 细菌污染的废物、检验标本、培养物以及污染的玻璃器皿等,应放入盛有消毒药的桶内过夜,再用高压蒸汽灭菌,或用水煮沸后,再清洗。污染用具(如吸管、玻片等)置盛有 5% 苯酚溶液的消毒缸中,消毒后再行洗涤;试管、平皿等需高压灭菌或煮沸灭菌后再行洗涤。

(2) 实训工作服应经常消毒洗涤,实验台(桌)工作后以 3% 来苏儿或 0.2% 过氧乙酸湿布擦抹消毒,这对抵抗力较强的病毒作用效果较好。

4. 易燃物品的管理

醚、醇、二甲苯等易燃物品必须远离可能发生燃烧的地方。实训室中应该有防火设备,如灭火器、沙土等。

5. 水、电、门、窗的安全

实训结束后,及时清理实验台,各种器材放回原处或指定地点,摆放整齐,对实验室进行清扫,关好门、窗、水、电和煤气等。工作人员每天离开实验室前必须检查一次水、电、门、窗。闲人不能随便出入实验室,尤其是细菌室和病毒室,下班后需由负责人关锁。

(二)意外事件的处理

1. 火险

如遇起火,先切断电源或关闭煤气开关,移走易燃药品,向火源撒沙子或用石棉布覆盖火源。衣服着火可就地靠墙滚转。

2. 烧伤

烧伤时可涂 5%鞣酸、2%苦味酸、龙胆紫溶液、风油精等。

3. 创伤

不慎弄伤皮肤,先除尽血污,用蒸馏水洗净,涂以碘酒或红汞,再用纱布包扎。

4. 灼伤

(1)强酸或其他酸性化学药品所致的灼伤,先以大量清水洗涤,再用 5%碳酸氢钠或 5%氢氧化铵液洗涤中和。若重伤者经初步处理后,立即送医院。

(2)强碱或其他碱性化学药品所致的灼伤,先以大量清水洗涤,再用 1%硼酸溶液冲洗,最后用水洗。

(3)石炭酸灼伤以酒精洗涤。

(4)眼灼伤应以大量清水冲洗,然后,如为碱灼伤用 5%硼酸溶液洗涤,如为酸灼伤用 5%碳酸氢钠溶液洗涤,最后再滴入橄榄油或液体石蜡 1~2 滴。

5. 误吸入菌液

误吸入葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌等,立即以大量热水漱口,再以 3%过氧化氢或 0.1%高锰酸钾漱口;如吸入其他细菌,除用上法处理外,可适当选用抗菌药物防治。

6. 触电

如遇触电事故,首先切断电源,然后在必要时进行人工呼吸,并及时送医院抢救。

【知识】

一、病原体的概念和分类

(一)概念

自然界中绝大多数生物对人类和动物是无害的和有益的,仅有少数生物是有害的,在有害的生物中,能够引起人和/或动物疾病的低等生物通常称为病原生物(或称病原体)。病原体主要包括病原微生物和寄生虫。能够引起动物和/或人畜共患病的病原体称动物病原体。

在病原微生物中,有一些是特定致病的,如炭疽杆菌和猪瘟病毒,动物初次感染一定数量时就会出现相关疾病的症状和体征。但是并不是每一种微生物都是特定致病的,有相当一部分属于动物的正常微生物群,一般情况下并不致病,当动物免疫功能降低(如肿瘤、过度劳役等)或正常微生物进入非正常寄居部位时(如手术后),或由于某种原因(如抗菌药物的应用)正常微生物群的组成发生改变时,它们就会引起动物疾病,这些微生物称机会致病微生物或条件

致病微生物。与此相似,当机体的免疫力降低时,在通常情况下只能引起动物隐性感染的寄生虫可以引起明显的临床症状和体征,这些寄生虫称机会致病寄生虫。

(二)分类

病原体包括病原微生物和寄生虫两大类。病原微生物可分为非细胞型微生物、原核细胞型微生物和真核细胞型微生物;寄生虫可分为寄生蠕虫、寄生原虫和寄生节肢动物。

1. 病原微生物

病原微生物种类繁多,根据其细胞结构和化学组成的不同,分为原核细胞型微生物、真核细胞型微生物和非细胞型微生物 3 种类型。

(1)原核细胞型微生物 细胞核分化程度低,仅有原始的核物质(DNA),无核仁、核膜等结构,具有两类核酸,缺乏完整的细胞器(除核糖体以外无其他细胞器),以非有丝分裂的方式进行二分裂增殖。此类微生物包括细菌、放线菌、螺旋体、支原体、衣原体和立克次氏体。

①细菌 具有细胞壁、细胞膜和核质等基本结构,细胞质中有与遗传有关的核质和质粒,有些细菌还有鞭毛、菌毛、芽孢和荚膜等特殊构造。根据细菌形态的不同,细菌可分为球菌、杆菌和螺旋菌(包括弧菌和螺菌)。大多数细菌对人和动物无害,只有少量的细菌能引起人和动物的疾病。

②螺旋体 是一类细长、柔软、富有弹性、弯曲成螺旋状的原核细胞型微生物,能利用细胞壁和细胞膜间的轴丝活泼运动。除了它的特殊形态和利用轴丝运动外,螺旋体与细菌的基本结构相当。

③支原体 是一种没有细胞壁的原核细胞型微生物,因无细胞壁故形状不规则,支原体与一般细菌的另一个不同点是细胞膜不是脂质双层蛋白质镶嵌结构,而是三层结构,内、外层由蛋白质和糖类组成,中层为磷脂(或糖脂)和胆固醇。

④立克次体 是一种只能在细胞内寄生的原核细胞型微生物,除细胞内寄生外,与革兰氏阴性细菌相似。

⑤衣原体 是一类介于细菌和病毒之间的细胞内寄生的原核细胞型微生物。它类似于革兰氏阴性细菌,但有独特的发育周期和形态(原体和始体)。其不同于细菌而类似于病毒的特点主要是:细胞内寄生,在所寄生的细胞内可出现包涵体,对干扰素敏感等。

以上各种原核细胞型微生物由于本质上十分相似,在细菌分类系统的专著《伯杰系统细菌学手册》中把它们统归于广义的“细菌”中。

(2)真核细胞型微生物 细胞核的分化程度较高,有核膜、核仁和染色体,胞质内有完整的细胞器。真菌属于此类型微生物。

(3)非细胞型微生物 体积微小,没有典型的细胞结构,亦无代谢必需的酶系统,只能在活细胞内生长繁殖。病毒属于此类型微生物。

1970 年以来,还陆续发现了比病毒更小、结构更简单的亚病毒因子,包括卫星病毒、类病毒和朊蛋白 3 类。卫星病毒现在只有丁型肝炎或 Delta 因子一种,类病毒为植物病毒,朊蛋白可导致人和动物的海绵状脑病。亚病毒的发现使人们对病原微生物的认识进入了一个新阶段,使人们对病毒的特征和起源有了崭新的思考。

2. 寄生虫

所有寄生虫均属动物界,与动物医学有关的寄生虫主要隶属于扁形动物门吸虫纲、绦虫纲;线形动物门线虫纲;棘头动物门棘头虫纲;节肢动物门蛛形纲、昆虫纲;环节动物门蛭纲;还

有原生动物亚界原生动物门等。

(1)寄生蠕虫 蠕虫是一类寄生于人和动物的多细胞软体动物,可借身体肌肉的伸缩作蠕形运动。蠕虫包括线虫、吸虫、绦虫和棘头虫。

(2)寄生原虫 原虫是一类寄生于人和动物的单细胞真核原生生物,能独立完成运动、摄食、代谢和生殖等生命活动,进行有性和/或无性生殖,在整个生命周期或生命周期的某一阶段有鞭毛、伪足或孢子。常见的动物寄生原虫有弓形虫、疟原虫、阿米巴原虫和隐孢子虫等。

(3)寄生节肢动物 节肢动物是动物界中种类最多的一类,大多数营自由生活,只有少数危害动物而营寄生生活。主要是蛛形纲蜱螨目和昆虫纲的节肢动物。

二、病原体研究简史

在动物病原体的认识方面,远古时期就有所记载。古罗马的百科全书中提到沼泽地中会滋生许多人们肉眼看不见的微小生物体,这些微小生物体会漂浮于空气中,并通过鼻子嘴巴进入人体导致人生病。我国《左传》记载人们驱逐疯狗以防御狂犬病传染。6世纪贾思勰所著的《齐民要术》中,记载了治疗动物疥癣的方法,认识到其传染性。到16世纪我国用人的痘痂接种以预防天花。但是事实上,虽然我们的祖先对病原体有一些初步的认识,在19世纪后半叶之前,人类不明白患病的缘由,往往将传染病归咎于一些有机物质腐烂分解后产生的无生命媒质,即所谓的“瘴毒”,医生们只有忠告人们不要接近腐烂的鸟兽尸体和粪便,实在无法避免时,就用樟脑或者其他香料来覆盖其恶臭。是谁揭示了传染病的元凶?人们对病原体的认识程度是与微生物学的发展密切相连的。

1795年,荷兰人列文虎克(Antonvan Leeuwenhoek)用自己制造的显微镜观察到微生物,绘图并叙述公之于世。此后200年间,人们对微生物的形态、排列、大小等有了初步的认识,但仅限于形态学方面,进展不大。其主要原因之一是自然发生论起着主要作用。自然发生学说认为“生物可以无中生有,破布中可以生出老鼠”。既然生命是无中生有,自然发生,那么人对微生物是无法控制的,研究也就没有意义。为了击败自然发生论,人类斗争了近200年,从自然发生说到确定生源论,是来之不易的,这是科学实训的一次重大胜利。

1862年,法国伟大的微生物学家巴斯德(Louis Pasteur)巧妙地设计制造出了形态独特的曲颈瓶进行肉汤煮沸实验,才真正击败自然发生说。巴斯德将肉汤放进曲颈瓶中,他将肉汤煮沸,把汤里和瓶内微生物全部杀死,然后置于原处观察,结果肉汤保持无菌状态,经久不坏。巴斯德实训成功之妙在于S形的瓶颈,瓶颈做成S形,但仍然开着口,空气可以进入瓶内,但是微生物不能通过瓶颈低弯处。这样,巴斯德实训证明空气不存在“生命力”,“生物来源于生物”。精神的枷锁解除了,人们充分地认识到微生物的价值,那时有了更好的显微镜,有机化学和无机化学也在迅速地发展,加上人们在疾病控制方面的需求,推动了动物病原体学的发展。

历史上首位确定病原体存在的,是19世纪50年代的匈牙利的产科医生塞麦尔维斯(Ignaz Semmelweis),他发现产妇患产褥热是由产褥热病原体引起的,并开创了产科消毒术,但不幸的是在当时,他的观点不被接受,他甚至被送往精神病院;在极端失望中,他为了证明自己的观点,于1865年在给一具死于产褥热的尸体做尸检时,故意切下自己的食指并因此身亡,同年巴斯德发现了蚕病细菌。

19世纪60年代,巴斯德在研究陈年的葡萄酒和啤酒变酸时,发现酒精发酵是一种由微生

物引起的反应过程,并发明了巴氏消毒法,这使得酒商们可以通过加热等方法防止酒的变质。此后他在对家蚕软化病研究后,提出了传染病是由微生物引起的观点,认为其由身体的实际接触而不断传播,这一传染病的起源学说启迪后人研究并取得许多成果。另外,巴斯德研究了鸡霍乱,发现将病原菌减毒可诱发免疫性,以预防鸡霍乱病,研究了炭疽病和狂犬病,并首次制成狂犬疫苗,证实其免疫学说,为人类防病、治病做出了重大贡献。

被称为“细菌学之父”的德国科赫于 19 世纪 70 年代在研究炎症时观察到一个有趣的现象,他在玻璃片上滴了几滴从死于炭疽的牛身上采集的血液,用显微镜进行观察,看到在血液中有的一些形如小杆的物质。那么,这些物质是否为引起炭疽的病菌呢?科赫将木片浸在死于炭疽的羊血中,再把木片插入健康的老鼠身体,结果这些老鼠都患上了炭疽。为了证明这些小杆的物质是活的,科赫将它们隔离在一个悬滴中,结果观察到了繁殖现象。就这样,科赫确定了引起炭疽的元凶就是这些小小的杆菌。在发现了炭疽菌后,科赫又对结核与霍乱作了细致的研究,找到了引起结核与霍乱的病原菌,并提出了证明某种微生物是否为某种疾病病原体的基本原则——科赫法则。另外,科赫在微生物基本操作技术方面的贡献更是为微生物学的发展奠定了技术基础,这些技术包括:①配制培养基;②利用固体培养基分离纯化微生物的技术;③创立了许多显微镜技术,如细菌鞭毛染色法、悬滴培养法、显微摄影技术等。这些技术仍是当今微生物学研究的重要基本技术。

疟疾俗称“打摆子”,是世界上流行最广的传染病之一。在热带和亚热带,疟疾一年四季均可发生。据世界卫生组织(WHO)估计,目前全世界仍有成千上万的疟疾病例。在 19 世纪末,法国科学家拉弗朗(Charles Louis Alphonse Laveran)致力于对疟疾的研究。他通过对健康和患病士兵的新鲜血液的对比,做出了一个重要假说:疟疾是通过一种原生动物——疟原虫传播的。当时的许多医学家坚持认为,在水、空气和土壤中,一定存在一种引起疟疾的所谓疟疾细菌。然而,拉弗朗的研究表明,传染病的病原体并不只有细菌一种,这一发现给医学界带来了极大的震惊。

1892 年,伊凡诺斯基公布了第一个证明病原体的过滤性的证据,烟草花叶病毒。他将含病原体的烟草花叶叶汁通过一个烛形过滤器,该烛形过滤器能阻隔细菌,结果发现,滤液仍具有感染性。1898 年德国科学家 F. Loeffler 和 P. Frosch 发现了首个动物病毒口蹄疫病毒。1901 年,美国科学家 Walter Reed 首先分离出黄热病毒。1935 年斯坦来(W. Stanley)得到烟草花叶病毒的结晶。1937 年鲍登(F. Bordon)等证实该结晶为核蛋白,具有感染能力。20 世纪 30 年代电子显微镜的发明,突破了光学显微镜的限制,为微生物学等学科提供了重要的观察工具。1939 年考雪(G. Kausche)等第一次用电子显微镜观察到了棒状的烟草花叶病毒。这些发现不仅为病毒病的诊治指明了途径,而且表明了具有一种比细菌更小的病原体的存在。

近年来,随着化学、物理学、生物化学、遗传学、细胞生物学、免疫学和分子生物学等学科的发展,使病原体学得到了突飞猛进的发展。新的病原体不断被发现。部分病原体的全基因组的研究已取得进展,使人们能发现病原体的致病基因和特异 DNA 序列,这对于诊断感染性疾病、研制新抗菌药物和疫苗等都有重要意义。病原体学诊断技术也有了快速发展。

经过多年的研究,科学家逐渐发现,不同的传染病有着各种不同的病原体,如细菌、疟原虫、病毒等,要防止与根除传染病对人类的危害,就必须了解病原体的性状,因此一门研究病原生物的科学就应运而生了。

三、病原体检测技术的发展

进入 21 世纪以来,感染性疾病仍然是危害动物养殖的重大隐患,尤其是第三世界国家。目前的现状是造成感染性疾病的病原体种类日益复杂,常见病原体的威胁不仅没有消除,而且出现了一些耐药性菌株,如葡萄球菌、肠球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等,加之一些新病原体的出现,给临床诊断和治疗带来了很大的困难。1996 年英国暴发的疯牛病引起了全球性灾难和恐慌,近年又接连发生禽流感暴发、口蹄疫暴发等。严峻的现实给病原体的检测提出了更高的要求,准确快速的检测和确认病原体是防止感染性疾病发生和流行的最重要因素。

1. 传统病原体检测技术

传统的病原体检测方法主要通过临床剖检、病料采集、病原学检测、显微镜直接观察法检测,从动物的组织、血液、排泄物、分泌物中检测病原体,是最普通的病原体检测方法。传统的病原体检测方法具有所需设备简单、成本相对较低的优点,但其操作繁琐,检测周期长,且灵敏度较低,并且对于有些病原体无法给出正确鉴定。

2. 生化方法

生化方法检测病原体实际上是测定病原体特异性酶。由于各种病原体所具有的酶系统不完全相同,对许多物质的分解能力亦不一致。因此,可利用不同底物产生的不同代谢产物来间接检测该微生物内酶的有无,从而达到检测特定微生物的目的。

3. 生物电化学方法

生物电化学方法是指通过电极测定生物量产生或消耗的电荷提供分析信号的方法。微生物在代谢过程中,培养基的电化学性质如电流、电位等会发生相应变化,所以可通过分析这些电化学参量的变化,实现对微生物的快速测定。

4. 免疫检测方法

免疫检测的基本原理是抗原抗体反应。不同的微生物有其特异的抗原,并能激发机体产生相应的特异性抗体。在免疫检测中,可利用单克隆抗体检测微生物的特异抗原,也可利用微生物抗原检测体内产生的特异抗体,两种方法均能判断机体的感染状况。

5. 分子生物学检测技术

随着分子生物学及分子遗传学的发展,使人们对病原体的认识逐渐从外部结构特征转向内部基因结构特征,病原体的检测也相应地从生化、免疫方法转向基因水平的检测。分子生物学检测技术是利用遗传学、病理学、免疫学、生物化学、基因组学、蛋白质组学和生物信息学的理论和方法,探讨疾病发生和发展的分子机制,通过检测病原体的特定基因或基因表达产物来检测病原体。我国分子诊断技术起步较晚,目前只是零星开展一些项目,未形成规模,也缺乏标准化,质量控制还不够成熟,在准确性、稳定性和复杂性方面还存在问题。

病原体的检测方法多种多样,各有优缺点,可以采用多种方法联合使用的策略来提高检测灵敏度和检测效率。随着计算机技术的不断发展,临床病原菌检测将向着高度自动化和开发简便的快速检测技术两个方向发展。随着各学科的交叉发展,会出现越来越多的新的检测技术。

四、动物病原体检测技术的性质和学习要求

1. 课程性质

动物病原体检测技术是高职畜牧兽医类各专业的核心技术课程,在各专业课程体系中具有重要地位。本课程以动物解剖生理、动物病理和动物药理等课程为基础,也是学习猪病防治技术、禽病防治技术、牛羊病防治技术、宠物疾病防治技术、动物防疫和检疫技术、人畜共患病防治技术等专业课程的重要前导课程。

2. 课程任务

动物病原体检测技术的任务是利用病原体学及免疫学的知识检测动物病原体,对疾病的诊断和治疗提供科学的依据,并采取有效的预防措施,保障动物与人的健康,畜牧生产、动物性食品的安全卫生,保护生态环境免受破坏。通过本课程的学习,掌握病原体检测技术所必需的理论知识和相应的应用能力;熟悉常见的病原微生物与寄生虫的特性及检测的方法;理解病原体与动物体和环境间的相互关系;建立无菌观念,并在消毒、灭菌、隔离、预防、治疗等临床实践中加以具体应用。

3. 课程内容

病原体检测技术是由病原体基本理论知识和病原体检测实训两部分组成。病原体基本理论知识包括动物病原微生物学、动物寄生虫学、动物免疫学 3 个部分。病原体检测实训包括病原微生物检测技术、动物寄生虫检测技术、免疫学检测技术及分子生物学检测技术等。病原体检测技术是理论与实践并重的学科,只掌握理论知识缺乏实践技能无法开展病原体检测相关的工作,实践技能又是建立在扎实的理论基础知识之上,所以学习的过程中要做到理论与实践并举。

4. 学习要求

动物病原体检测技术采用理实一体化教学,实训室是主要的教学场所。在实训室内,学生通过实训观察和技术操作,进一步理解、巩固和掌握理论课内容,掌握病原体的检测、鉴定等基本技术,为今后工作打下坚实的基础。

(1)实训前应做好预习,明确每次实训的目的、内容、理论依据,尽量避免或减少错误发生。

(2)认真听取指导老师的课前讲解、示教,观摩实训课中图片、多媒体等电化教材。

(3)在实训中认真操作,独立思考,仔细观察并做好记录。有关基本技能的训练,要按照操作程序反复练习,以达到一定的熟练程度。

(4)在病原体检测的实训中,尤其是在微生物学检测的实训过程中,学生应建立无菌概念,掌握无菌操作技术。

(5)实训报告要强调科学性,实事求是地记录、绘制。如实训结果与理论不符,应认真分析和探讨其原因,培养自己的分析能力和解决问题的能力,不断提高实训质量。

【案例】

1. 2011 年 8 月 25 日,据中国之声《央广新闻》报道,中秋将至,许多朋友会向国外的亲朋好友带去一些月饼,捎上几句问候,但是,很多旅客在他国入境时遭遇了尴尬,所携带的月饼被禁止入境,并引起了不必要的麻烦。为什么小小的月饼不让入境呢?这是由该国检验检疫部门规定的。比如澳大利亚的检验检疫局的规定,为了防止禽流感 and 口蹄疫的传入,旅客不得携