

# 兽医微生物学



中国农业科学院  
哈尔滨兽医研究所 编著  
中国农业出版社

主编单位 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

参加编审人员(按姓氏笔划排列)

于 力 于康震 王西川 白文彬 丛明善  
朱尽国 刘滨东 宁希德 吴文芳 吴宝成  
杨旭夫 李 成 谷守林 陈乃昌 陈章水  
金 岳 周文举 相文华 荣骏弓 徐宜为  
黄骏明

### 兽 医 微 生 物 学

中国农业科学院 编著  
哈尔滨兽医研究所

\* \* \*

责任编辑 耿增强

中国农业出版社出版(北京市朝阳区农展馆北路2号 100026)  
新华书店北京发行所发行 中国农业出版社印刷厂印刷

787mm×1092mm 16开本 45.75印张 1200千字  
1998年12月第1版 1998年12月北京第1次印刷  
印数 1~1500册 定价 130.00元

ISBN 7-109-05377-6/S·3423

(凡本版图书出现印刷、装订错误,请向出版社发行部调换)

<http://www.ccap.com.cn>

# 前 言

随着人类社会的发展和科学技术的进步,以及各学科间的相互渗透,兽医科学的社会地位、任务及其作用已有了很大改变,突破了单纯防治畜禽疾病的范围,扩展和延伸到生物学、医学、公共卫生、环境保护等领域,对保障人类的健康和经济生活正常进行具有极其重要作用。

如今,兽医科学已发展成为多学科构成的综合体,学科越分越细,它们之间的联系也越来越密切。特别是预防兽医学的范围不仅限于家畜、家禽,而且增加了经济动物、实验动物、观赏动物、伴侣动物和野生动物等。同时,人畜共患病的防治、环境卫生、食品卫生等重要课题,不仅是医学界而且也是兽医学界十分关注的大问题。客观上要求从事兽医事业的人员应当学好预防兽医学,扩大知识面,以适应工作发展的需要。为此我们编写了本书,它是兽医预防医学的基础,是一部既有基础理论,又可指导科学实验,是理论和实践相结合的参考书。

本书共分三篇六十九章,全面系统地介绍了兽医微生物的理论和实验技术。包括基础微生物学、免疫学,即侵害家畜、家禽和其它多种动物以及人畜共患病的病原(细菌、真菌、病毒及有关病原微生物)、免疫机理和实验技术的应用。在实验技术方面,突出反映了分子生物学实验技术、分析微生物的实验技术和新的免疫实验技术以及其它新的实验技术等。这些新技术、新方法和新成就,是广大读者所要了解 and 掌握的新知识,以提高自己的研究和实践水平。

本书是从事畜牧、兽医、经济动物、实验动物、兽医公共卫生等专业师生、科研技术人员以及基层兽医卫生防疫人员的良师益友和必备的参考书。

本书是由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所组织部分研究人员参加编写的,并邀请有关专家进行审查。在编写过程中,曾蒙兽医研究所的有关研究室、资料室、图书室提供所需的资料、图书,对本书的编写起到了积极作用,我们深表感谢。另外,在编写过程中,有几位同志协助编写,特以致谢。

本书在编审过程中,虽然做了反复讨论和修改,但由于我们的水平和经验有限,不妥和错漏之处在所难免,敬请读者批评指正。

**编著者**

1997年10月

# 目 录

## 绪 论

### 第一篇 细 菌

第一章 细菌的形态与结构 .....	18	第一节 假单胞菌属 .....	88
第一节 细菌的形态与排列特征 .....	18	第二节 莫拉氏菌属 .....	92
第二节 细菌的结构 .....	19	第三节 布鲁氏菌属 .....	94
第三节 细胞壁缺陷型细菌 .....	27	第四节 博代氏杆菌属 .....	101
第二章 细菌的生理 .....	29	第五节 弗朗西丝氏菌属 .....	103
第一节 细菌细胞的化学组成 .....	29	第六节 泰勒氏菌属 .....	105
第二节 细菌的物理性状 .....	30	第十章 兼性厌氧革兰氏阴性杆菌类 .....	106
第三节 细菌的营养 .....	30	第一节 埃希氏菌属 .....	106
第四节 细菌的代谢 .....	32	第二节 沙门氏菌属 .....	108
第五节 细菌的生长与繁殖 .....	38	第三节 肠杆菌属 .....	113
第三章 细菌的遗传与变异 .....	41	第四节 耶尔辛氏菌属 .....	114
第一节 遗传的机理与方式 .....	41	第五节 克雷伯氏菌属 .....	117
第二节 细菌的变异 .....	44	第六节 变形杆菌属 .....	118
第四章 外界因素对细菌生长的影响 .....	48	第七节 弧菌属 .....	119
第一节 物理因素的影响 .....	48	第八节 气单胞菌属 .....	121
第二节 化学因素的影响 .....	51	第九节 巴斯德氏菌属 .....	123
第三节 生物因素的影响 .....	56	第十节 嗜血杆菌属 .....	130
第五章 细菌的分类与命名 .....	60	第十一节 放线杆菌属 .....	133
第一节 细菌分类 .....	60	第十一章 厌氧革兰氏阴性杆菌类 .....	139
第二节 细菌的命名 .....	63	第一节 拟杆菌属 .....	139
第六章 细菌的致病性与传染 .....	65	第二节 梭杆菌属 .....	141
第一节 致病菌的侵袭力 .....	65	第十二章 革兰氏阳性球菌类 .....	143
第二节 宿主的抵抗力 .....	68	第一节 葡萄球菌属 .....	143
第三节 传染的发生、发展与结局 .....	70	第二节 链球菌属 .....	148
第七章 螺旋体类 .....	74	第十三章 形成内芽胞的革兰氏阳性杆 菌和球菌类 .....	157
第一节 密螺旋体属 .....	74	第一节 芽胞杆菌属 .....	157
第二节 疏螺旋体属 .....	75	第二节 毛样芽胞杆菌属 .....	161
第三节 钩端螺旋体属 .....	76	第三节 梭状芽胞杆菌属 .....	161
第四节 蛇形螺旋体属 .....	80	第十四章 不形成芽胞(规则的、不规则 的)革兰氏阳性杆菌类 .....	171
第八章 不运动(或稍运动)革兰氏阴性 弯曲杆菌类 .....	82	第一节 李斯特氏菌属 .....	171
第九章 需氧、微需氧革兰氏阴性杆 菌和球菌类 .....	88	第二节 丹毒丝菌属 .....	173
		第三节 棒状杆菌属 .....	175
		第四节 放线菌属 .....	178

第五节 嗜皮菌属 .....	179	第三节 噬菌体对寄主细胞的危害 .....	264
第六节 分枝杆菌属 .....	180	第四节 噬菌体的分离与检定 .....	269
第七节 诺卡氏菌属 .....	184	第五节 噬菌体的分类 .....	271
第八节 红球菌属 .....	185	第六节 噬菌体 DNA 的分离与纯化技术 .....	274
第十五章 立克次氏体和衣原体 .....	187	第七节 噬菌体的应用 .....	276
第一节 立克次氏体 .....	187	第二十六章 痘病毒科 .....	278
第二节 衣原体 .....	192	第一节 正痘病毒属 .....	280
第十六章 支原体 .....	195	第二节 副痘病毒属 .....	285
第十七章 真 菌 .....	203	第三节 禽痘病毒属 .....	287
第一节 生物学基本特征与特性 .....	203	第四节 野兔痘病毒属 .....	289
第二节 病原性真菌 .....	209	第五节 猪痘病毒属 .....	290
第三节 产毒性真菌 .....	216	第六节 山羊痘病毒属 .....	291
<b>第二篇 病 毒</b>			
第十八章 病毒及其发展史 .....	226	第二十七章 “类非洲猪瘟病毒属” .....	294
第十九章 病毒的特性 .....	228	第二十八章 虹彩病毒科 .....	296
第一节 病毒的形态结构 .....	228	第二十九章 疱疹病毒科 .....	297
第二节 病毒的组成 .....	230	第一节 单纯疱疹病毒属 .....	299
第二十章 病毒的分类与命名 .....	234	第二节 水痘病毒属 .....	301
第一节 病毒的分类 .....	234	第三节 细胞巨化病毒属 .....	317
第二节 病毒的命名 .....	237	第四节 鼠巨化病毒属 .....	317
第二十一章 病毒的复制 .....	239	第五节 玫瑰疹病毒属 .....	317
第一节 概 况 .....	239	第六节 淋巴潜伏病毒属 .....	319
第二节 复制过程 .....	240	第七节 猴病毒属 .....	319
第三节 复制机制 .....	241	第八节 丙型疱疹病毒亚科未分属病毒 .....	319
第四节 病毒的不完全增殖和缺损病毒 .....	243	第三十章 腺病毒科 .....	327
第二十二章 病毒的遗传变异 .....	244	第一节 哺乳动物腺病毒属 .....	328
第一节 病毒的遗传 .....	244	第二节 禽腺病毒属 .....	333
第二节 病毒的变异 .....	244	第三十一章 乳多空病毒科 .....	341
第三节 病毒的重组、互补和表型混合 .....	246	第一节 乳头状瘤病毒属 .....	342
第二十三章 病毒的感染 .....	248	第二节 多瘤病毒属 .....	345
第一节 概 述 .....	248	第三十二章 圆环病毒科 .....	350
第二节 构成机体病毒感染的因素 .....	248	第三十三章 细小病毒科 .....	354
第三节 病毒感染细胞后的散播方式 .....	249	第一节 细小病毒属 .....	354
第四节 病毒感染的类型 .....	250	第二节 红病毒属 .....	362
第二十四章 病毒的免疫 .....	252	第三节 依赖病毒属 .....	362
第一节 病毒感染的非特异性免疫和抵抗 .....	252	第三十四章 嗜肝 DNA 病毒科 .....	364
第二节 病毒的特异性免疫 .....	255	第三十五章 反录病毒科 .....	366
第三节 病毒感染的免疫病理 .....	260	第一节 哺乳动物 B 型反录病毒属 .....	367
第四节 病毒引起的免疫性疾病 .....	260	第二节 哺乳动物 C 型反录病毒属 .....	368
第五节 新生动物免疫 .....	261	第三节 禽 C 型反录病毒属 .....	370
第二十五章 噬菌体 .....	262	第四节 D 型反录病毒属 .....	373
第一节 简 史 .....	262	第五节 牛白血病-人嗜 T 淋巴细胞反录 病毒属 .....	374
第二节 生物学基本特性 .....	262	第六节 慢病毒属 .....	375
		第七节 泡沫病毒属 .....	388

第三十六章 呼肠病毒科 .....	391	第一节 类病毒 .....	509
第一节 正呼肠病毒属 .....	392	第二节 卫星因子 .....	509
第二节 环状病毒属 .....	396	第三节 朊病毒 .....	510
第三节 轮状病毒属 .....	401	第五十二章 未分类病毒 .....	514
第三十七章 双RNA病毒科 .....	411	<b>第三篇 实验技术</b>	
第三十八章 副粘病毒科 .....	414	第五十三章 常用精密仪器实验技术 .....	519
第一节 副粘病毒属 .....	415	第一节 超速离心技术 .....	519
第二节 麻疹病毒属 .....	417	第二节 电子显微镜技术 .....	523
第三节 腮腺炎病毒属 .....	422	第五十四章 培养基制造技术 .....	542
第四节 肺病毒属 .....	426	第一节 制造培养基必须遵循的要求 .....	542
第三十九章 弹状病毒科 .....	429	第二节 培养基的制造 .....	542
第一节 水泡性病毒属 .....	430	第三节 培养基的分类 .....	544
第二节 狂犬病病毒属 .....	431	第四节 常用培养基的制作 .....	544
第三节 暂时热病毒属 .....	435	第五十五章 细菌培养技术 .....	545
第四十章 丝状病毒科 .....	438	第一节 细菌的接种方法 .....	545
第四十一章 正粘病毒科 .....	440	第二节 细菌的培养方法 .....	545
第一节 甲、乙型流感病毒属 .....	440	第五十六章 细菌形态的检查技术 .....	548
第二节 丙型流感病毒属 .....	448	第一节 不染色细菌标本的检查 .....	548
第三节 “类托高土病毒属” .....	449	第二节 染色细菌标本的检查 .....	549
第四十二章 布尼病毒科 .....	450	第五十七章 细菌的生化试验 .....	552
第一节 布尼安病毒属 .....	451	第一节 糖(醇)类代谢试验 .....	552
第二节 白蛉热病毒属 .....	453	第二节 氨基酸和蛋白质代谢试验 .....	554
第三节 内罗病毒属 .....	455	第三节 有机酸盐和铵盐利用试验 .....	556
第四节 汉坦病毒属 .....	456	第四节 呼吸酶类试验 .....	557
第四十三章 砂粒病毒科 .....	457	第五节 毒性酶类试验 .....	558
第四十四章 微RNA病毒科 .....	461	第六节 抑菌试验 .....	560
第一节 鼻病毒属 .....	461	第七节 其它试验 .....	561
第二节 肠病毒属 .....	463	第五十八章 细菌计数技术 .....	563
第三节 口疮病毒属 .....	466	第一节 总菌数的计数技术 .....	563
第四节 肝病毒属 .....	468	第二节 活菌计数法 .....	565
第五节 心病毒属 .....	469	第三节 细菌生长曲线的测定 .....	567
第四十五章 嵌杯病毒科 .....	470	第四节 影响细菌计数的因素 .....	568
第四十六章 星状病毒科 .....	475	第五十九章 动物实验及鸡胚培养技术 .....	569
第四十七章 冠状病毒科 .....	477	第一节 实验动物 .....	569
第一节 冠状病毒属 .....	478	第二节 动物实验技术 .....	574
第二节 凸隆病毒属 .....	488	第三节 鸡胚培养技术 .....	578
第四十八章 动脉炎病毒属 .....	491	第六十章 细菌对抗菌类药物的敏感性试验 .....	581
第四十九章 黄病毒科 .....	495	第一节 稀释法 .....	581
第一节 黄病毒属 .....	495	第二节 扩散法 .....	583
第二节 瘟病毒属 .....	498	第三节 细菌对联合抗生素的敏感性试验 .....	586
第五十章 披膜病毒科 .....	503	第六十一章 病毒组织培养技术 .....	588
第一节 甲病毒属 .....	504	第一节 组织培养原理及基础技术 .....	588
第二节 风疹病毒属 .....	507	第二节 组织培养技术 .....	591
第五十一章 亚病毒 .....	509		

第三节 病毒的组织培养及检测技术 .....	594	第五节 相分离免疫测定法 .....	653
第四节 病毒培养物的污染(支原体)检查、 控制和消除 .....	597	第六节 胶乳免疫沉淀技术 .....	654
第六十二章 病毒的分离和提纯技术 .....	601	第七节 钢化玻片免疫测定法 .....	655
第一节 普通病毒的分离和鉴定 .....	601	第六十七章 免疫球蛋白的分离和提纯 .....	656
第二节 反录病毒的分离和鉴定 .....	602	第一节 免疫球蛋白的分离和提纯 .....	656
第三节 病毒的提纯技术 .....	603	第二节 免疫球蛋白的鉴定 .....	659
第四节 病毒组成成分的提取和鉴定 .....	605	第六十八章 细胞免疫实验技术 .....	661
第六十三章 常规血清学检验技术 .....	609	第一节 免疫反应细胞 .....	661
第一节 凝集反应试验 .....	609	第二节 细胞免疫反应 .....	662
第二节 沉淀反应试验 .....	615	第三节 细胞免疫检测方法 .....	662
第三节 补体结合试验 .....	621	第六十九章 分子生物学及分析生物学的 检验技术 .....	664
第四节 中和试验 .....	622	第一节 病原微生物 DNA 中 G+C mol% 含量的测定 .....	664
第六十四章 免疫标记技术 .....	625	第二节 核酸分子杂交技术 .....	665
第一节 免疫酶技术 .....	625	第三节 细菌质粒的提取、纯化和鉴定技术 .....	670
第二节 免疫荧光技术 .....	632	第四节 病原微生物基因导入细胞技术 .....	674
第三节 放射免疫技术 .....	638	第五节 基因体外扩增技术 .....	678
第六十五章 单克隆抗体制备技术 .....	646	第六节 基因探针技术 .....	684
第一节 单克隆抗体的制备 .....	646	第七节 病毒基因工程工具酶的使用 .....	695
第二节 杂交瘤技术 .....	648	第八节 色谱实验技术 .....	698
第六十六章 其它免疫技术 .....	650	第九节 放射测量法 .....	706
第一节 固相免疫吸附血凝技术 .....	650	第十节 生物传感器技术 .....	711
第二节 化学发光免疫测定 .....	651	第十一节 SPA 与 SPG 技术 .....	715
第三节 免疫染色法 .....	652	第十二节 细菌自动化鉴定技术 .....	719
第四节 碳免疫测定法 .....	652		

# 结 论

兽医微生物学,广义称为动物微生物学,是在生物学和微生物学等学科的基础上发展、建立起来的一门独立学科,是微生物学的重要分支、兽医学的基础学科之一。研究兽医病原微生物的生命活动规律、形态结构特征、生理生化特性、遗传变异、抗原结构、抗原性与免疫学的关系以及致病作用和诊断方法等,研究病原微生物在饲料、食品卫生、公共卫生等方面的影响,为控制、消灭动物传染病、人畜共患病提供手段。保障农牧业生产的发展,满足和提高人民日益增长的物质生活需要和人类健康。

微生物和微生物学 微生物是个体极微小的直径小于1mm的生物,它不是生物分类系统中的一个类群。微生物种类繁多,包括细菌、放线菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体、真菌和病毒,还有原生动物、某些藻类和多细胞动物等。根据其结构特点,可分为三大类,即非细胞型微生物、原核细胞型微生物和真核细胞型微生物。微生物在生物圈中分布广泛,几乎无处不有,与人类息息相关,其中的绝大多数对于人类的生活和生产有益,但也有许多病原微生物寄生于人体、动物或植物体内,引起各种疾病和植物病害,造成巨大经济损失。

微生物学于19世纪中叶发展为一门学科,是生物学的一个分支,研究微生物的生命活动规律及其在生物圈中的作用,对人类、动物、植物的有益作用及其危害,以及在工业、农业生产中的利用和影响等。

微生物学的学科分支 是按三维方法区分的:其一按微生物类群分,包括细菌学、真菌学、病毒学、藻类学和原生动物学。其二根据经济发展和社会意义分为医学微生物学、动物(兽医)微生物学(包括病原微生物、流行病学、免疫学和环境医学)、工业微生物学(包括发酵微生物学、食品加工微生物学、抗生素、酶制剂学、生化产品微生物学、沼气和能源微生物学)、农业微生物学(包括植物病理学、土壤微生物学、农产品加工微生物学)。其三为基础微生物学,包括微生物分类、鉴定学、菌种资源和保藏——微生物生态学、微生物生理和生化学、微生物遗传学。另外,还有环境微生物学以及微生物基因工程等。

微生物的发现和微生物学的发展可追溯至史前。数千年以来,人类食品的保藏和发酵工艺已有较高的发展,中国和埃及的古书中就有关于酿酒和制造馒头、面包使用“起子”的记载,其本质即为应用微生物相关知识的典型例证。在古典书籍中已有很多关于微生物知识的记载和论述,实际上,微生物的发现及其发展史,应当从发明显微镜之后发现了微生物世界开始。

1675年,荷兰学者吕文虎克(A. Vanleeuwehoek)用自制的显微镜观察和发现了许多称之为“微动体”的微小生物,包括某些细菌、真菌和原生动物。这种发现对当时热烈争论中的生命起源问题产生了巨大影响。

随着显微镜的创制成功以及不断改进,开始了微生物形态的研究——形态学时期。用显微镜观察了多种微生物,并描述了微生物的形态结构,为微生物的分类打下了基础。

1837年,肯尼亚-拉多尔(C. Cagniavd-latour)、施旺(T. Schwanh)和屈金(F. T. Kiitzing)三人各自独立地提出了酿酒中乙醇发酵是一种微生物作用的结果——酵母菌的生理功能——称为微生



物生理期,从而证实了酵母是自然界和酿造工业上发酵的原因,而且又发现蛋白质的腐败也是微生物引起的。通过实验推翻了“自然发生论”(Spontaneous generation)的谬误,为确立“疾病传染论”(germ theory of disease)奠定了初步的理论基础。

微生物致病作用的发现,在19世纪中期前后,许多学者对一些疾病及其病原进行了观察和研究。意大利人巴锡(Bassi)发现一种蚕病是由真菌引起的,也有些学者证明真菌可以引起人的皮肤感染。19世纪40年代,Sommeweis 等对产褥热的传播方式进行了观察。1850年斯诺(Snow)证明霍乱是以水为媒介发生的,巴迪(Buddy)阐述了肠伤寒的发生与微生物的关系,1849年 Pollender 和 Bayer、Davaine (1850)在炭疽死亡动物的血液中发现炭疽病病原体。此后,1855年 Brauell 以含炭疽菌的病畜血液成功地感染了绵羊和马而发病,说明了病原微生物的致病作用,为进一步确立“疾病传染论”提供了初步的理论和实验依据。

1876年,柯赫(R. Koch)经过培养证实了炭疽病的细菌病原体,而且提出了一种微生物是某种传染病病原体的三个基本条件,即 Koch 诊断细菌三原则:①在同一种病例中都出现同一种细菌,将这种细菌从寄主分离出来,能在培养基上繁殖;②将培养物接种于敏感健康寄主,重复发生同种疾病;③从试验发病的寄主中能再分离培养出同种细菌。柯赫还发现了结核分枝杆菌和霍乱弧菌。

病毒的发现 柯赫发明的固体培养基平板纯化细菌混合培养物的技术,使医学微生物学、兽医微生物学进入迅速发展时代,到1890年已经分离和研究了人和动物的一些普通传染病的病原菌。但当时还有一些常见的流行病如天花、水痘、麻疹、流感等,还不能分离到柯赫原则的病原菌,因此不能确认致病的病原体。

由于钱伯(Chabalen)创制了细菌滤器,从而发现白喉杆菌、破伤风菌外毒素,由此才发现病毒,当时称为“滤过性病毒”。

伊凡诺夫斯基(Д. Ивановский)于1892年首次发现植物病毒——烟草花叶病毒,1898年莱夫勒(Loeffler)和弗罗施(Frosch)在德国先后发现口蹄疫病毒,同年科普曼(S. M. Copman)发表了关于种痘的专著,并从中找到以鸡胚培养病毒的方法。20世纪初,里德等证明黄热病病毒,首次认识了虫媒病毒。1915年人们发现了一类即不能侵染植物也不侵染动物,而是侵染细菌的新型病毒,并于1917年被代列耳(F. O'Herelle)确认为噬菌体。

1921 M. 诺尔(Knoll)和腊斯克(Erusk)研制的电子显微镜,为病毒形态学研究开创了一个新时代,同时通过电子显微镜的观察发现了一些新病毒。

微生物学在进入20世纪以后得到了持续旺盛的发展。主要是在生物工业(发酵工业)、医药卫生和农业生产中不断扩大成果,产生了巨大的社会效益和经济效益。另外是微生物基础理论的发展,成为普通微生物学基础理论的重要支柱之一。

20世纪初,布西等发现了乙醇发酵,开创了生物代谢过程的化学研究。通过对肌肉糖酵解和酵母糖酵解的平行研究,逐渐地认识到它们在本质上的同一性。之后又发现动物需要的维生素和某些微生物需要的“生长因子”在化学结构上的一致性,它们是多种辅酶的前体,这些辅酶又是细胞代谢和酶功能表达所必需的,从而验证了一切生命系统在代谢水平上本质的同一性。

随着分子遗传学的发展和生物高技术的应用,分子细菌学和分子病毒学相继建立,促进了细菌的质粒、核糖体、中介体及菌毛等超微结构的研究,以及病毒核酸序列和衣壳蛋白亚单位的分析,阐明了病毒核酸和蛋白亚单位的生物合成,病毒粒子的组装,病毒基因定位和病毒核酸与肿瘤的发生与遗传变异的关系。

进入20世纪80年代以后,发现了类病毒、卫星病毒和朊病毒等,为研究生物起源和遗传变异等生物学的根本问题提供了重要材料。随着科学技术的进步,特别是电子技术及生物技术的高速

发展,建立了一批适用于微生物鉴定、分类、检验等的高新技术。如分子遗传学技术、分析微生物学技术和基因工程技术等,这些技术的发展和运用,推动了兽医微生物学向着更高层次发展,不但可以按着人们的意愿获得有价值的新品种,还为生物制品更新换代提供了重要手段。

微生物是分子生物学研究的重要材料和对象。微生物学已成为当今世界生物技术研究发展最活跃、进展最快的领域,分子生物学的许多成果都是在微生物学领域最先得到突破。兽医微生物学作为微生物学的重要分支,也已经进入分子生物学的研究阶段,并在许多方面取得成果和发展,其中有些研究成果在畜牧生产中发挥了重要作用。可以预见兽医微生物学的发展和运用前景会更加广阔。

## 一、病原微生物的致病作用及新出现和重新出现的病原体

### (一)病原微生物的致病作用

病原微生物是对动物(人)、植物有致病作用并能引发疾病的微生物,包括细菌、病毒、真菌等。多数是寄生性的,有些为严格寄生,有些是兼性寄生。

病原微生物在一定条件下,侵入动物机体并定居在宿主一定部位生长繁殖。当宿主抵抗力降低时,而引起宿主一系列病理反应而形成感染发病(或隐性感染),称为条件性致病病原体;有的只能在死亡的有机物上生长,不能侵入宿主,但能以产生的外毒素导致发病称为腐生性致病菌;有些病原微生物在感染动物后,在机体内不断繁殖,并不断侵入新的宿主而且不断传播,将其物种保持和延续下去。

病原微生物的致病性是对宿主的。一种病原微生物对甲动物有致病性,但对乙动物可能完全无害。有些病原微生物致病范围很窄,具有高度的宿主专一性,如牛瘟病毒只能使牛发病。但有些病原微生物能侵害多种动物,是泛嗜性病原微生物,如狂犬病病毒能感染几乎所有哺乳动物。有些病原微生物对某种动物、植物有感染性,而无致病力,成为危险的带菌(毒)者。如恶性卡他热病毒能在绵羊体内增殖,而不致病,但其病原体一旦传染给牛可使牛感染发病。

病原微生物能够突破动物机体的防卫屏障,并具有向周围组织扩散蔓延的能力。主要通过其自身携带一些物质来实现,其中包括病原微生物的酶,荚膜的多糖、多肽和粘蛋白,以及其它结构物质。

某些革兰阳性菌能产生毒力强大的外毒素,引起特征性的中毒症状。革兰阴性菌细胞壁脂多糖在菌体裂解后,游离出来的内毒素可引起动物机体发热和血管机能紊乱。

病毒的致病作用是由于病毒在靶细胞和靶器官的增殖,直接破坏该器官组织的结构和功能而得以实现的。

### (二)新出现的和重新出现的病原微生物

进入80年代以来,人们发现一些新的和重新出现的病原微生物,对人类和动物的危害极为严重。

1. 人免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2型) 80年代初期发现人免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2型)能引起人的艾滋病。这种病毒首先在非洲引起人发病,其特点是持续性感染、死亡率高,造成灾难性的大流行,遍布于世界各国。尽管进行了许多防治对策的研究,但都未能制止流行和蔓延,造成极为严重的损失。

其它动物如猴免疫缺陷病毒(SIV)是从猕猴分离的SIV<sub>mac</sub>、鸟白眉猴的SIV<sub>sin</sub>、非洲绿猴的

SIV<sub>agm</sub>、狒狒的 SIV<sub>mno</sub>。最近又从黑猩猩中分离到一株与 HIV-1 密切相关的 SIV<sub>cpz</sub> 株。根据 *pol* 基因核苷酸序列的同源性分析表明, HIV 与 SIV 株有不同程度的相似性。HIV 的出现, 可能是 SIV 宿主范围的改变。

2. 猫免疫缺陷病毒(FIV) 目前全世界猫 FIV 的抗体阳性率为 1%~30%。FIV 的 DNA 核酸序列分析表明, FIV 基因组与其它慢病毒相似, 其 *gag* 基因编码的核心蛋白与梅迪/维斯纳病毒、山羊关节炎脑炎病毒、马传染性贫血病毒的核心蛋白有抗原性交叉反应, 说明它们有一个共同的进化祖先。最近从美洲狮分离出 FIV 样病毒, 称美洲狮慢病毒(PIV)。此外, 还有牛免疫缺陷病毒(BIV)。这些病毒所致疾病的发生和流行不如人的严重。

3. 传染性海绵状脑炎病毒 几种动物的传染性海绵状脑炎(TSE)病毒各具特点。这种病毒缺乏核酸, 是由传染性蛋白质构成; 对热和 X 射线有较强的抵抗力, 不能激发机体产生任何免疫反应; 病的潜伏期较长, 而导致机体中枢神经系统特定区域的病理变化, 因而出现中枢神经疾病的临床症状。

海绵状脑炎病毒(SEV)属于朊病毒, 可致人和动物的海绵状脑病, 其中具有代表性的是羊痒病毒(Scrapie)。还有牛海绵状脑病(BSE)和人的 C-J 氏病及库鲁病(Kuru)。

BSE 是 80 年代在英国发生的一种新病, 是由 BSEV 引起的一种慢病毒病。1995 年以后在英国又有新的暴发, 引起人们的震惊。据报道, 这种病的出现是与用含痒病朊病毒的羊下水作为配合饲料长期喂饲有关, 另外报道一种寄生于痒病羊的蜱也可以传播。如今, BSE 在公共卫生方面的意义已引起病毒学家的极大关注。

4. 猪生殖与呼吸系统综合征病毒 是当前对猪危害较严重的病毒。于 1987 年在美国首次暴发, 随之在加拿大、德国、荷兰、英、法、丹麦、日本等国发生。1991 年在荷兰首次分离到病毒, 其分类地位是动脉炎病毒属的成员。对病毒形态结构、理化特性以及分子生物学等都做了较为深入研究, 并取得较大的进展。这种病毒在猪群中一旦感染发病可导致群体繁殖失败, 而造成严重经济损失。

5. 猫肠道冠状病毒(FECV) 主要引起 42~84 日龄幼猫的肠炎。它和猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)都是典型的冠状病毒, 在世界各地猫群中都有分布, 85% 家猫有其特异性抗体。FECV 与猪传染性胃肠病毒(TGEV)有交叉反应, 能引起仔猪温和型胃肠道紊乱。TGEV 虽对猫不致病, 但能在猫体内复制。

6. 其它 人的疱疹病毒 6 型、7 型, 人的丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒以及引起人腹泻的诺沃克病毒(Novwalk virus)已被列入嵌杯病毒科。在未分类病毒中的波拉病毒(Borha disease virus)是一种可导致马病的古老病毒, 但近年来发现该病毒也可以感染人。此外, 还有猫细小病毒、流感病毒(变异株)、鸡传染性贫血病毒、海洋哺乳动物和陆地食肉动物的麻疹病毒等。

7. 细菌 近年“新”发现的细菌较少。如在巴斯德氏菌属中新建立三个种: ①咬伤巴斯德氏菌, 其宿主是犬、猫, 通过抓伤而感染人; ②淋巴管炎巴斯德氏菌, 可以引起牛的淋巴管炎; ③梅尔巴斯德氏菌, 可以引起母羊流产, 仔猪败血症。还有放线杆菌属中有两个菌种: ①罗丝放线杆菌, 可引起产后母猪阴道炎; ②粘液放线杆菌, 可引起绵羊附睾炎和多发性关节炎。链球菌属中的猪肠道链球菌可引起猪肠炎。

重新出现的病原微生物是指一些过去曾发生过大流行, 后来逐渐减弱甚至有些地方已经绝迹或熄灭, 但最近又呈现大流行的病原微生物。如人的霍乱于 1991 年在秘鲁流行, 在 18 个月之内, 在西半球约有 70 个国家中发生流行, 危害较大。又如埃博拉病毒在南部非洲一些地区, 常时停时发地流行, 从 1995 年以后又有较大流行。

这些病毒和细菌的出现和重新出现,主要是由于生态学因素、社会因素、现代农业发展的影响以及病原微生物的变异等因素所致。

## 二、病原微生物的分子流行病学

流行病学是研究传染病在动物群体中发生和发展规律的学科,目的是有效地防治和消灭传染病。分子流行病学是伴随着分子生物学的发展而产生的。如今对流行病学的研究大多采用一些高新技术,提高研究质量,更有效地加速控制和消灭动物传染病和人畜共患疾病。

在病毒的分子流行病学研究方面,主要采用限制性核酸内切酶分析、寡核苷酸指纹图谱和基因体外扩增技术(聚合酶链反应,PCR)等方法。这些方法也适用于细菌,此不赘述。

在细菌分子流行病学研究上显得复杂一些,除细菌的染色体比较庞大之外,还有质粒的多种因素。一般采用三种方法,即质粒指纹图谱、染色体 DNA 酶切图谱和染色体 DNA 探针指纹图谱分析等。

携带质粒的细菌,在不同菌株之间往往含有大小和数目不等的质粒,在一定的时间和地点范围内,这种质粒的特征保持相对稳定。分子质量不同的质粒,经琼脂糖凝胶电泳后,出现具有不同的迁移谱带,据此可鉴别细菌的种和株。

通过限制性内切酶及探针技术分析染色体 DNA 酶切谱及探针指纹图谱,对细菌染色体 DNA 进行同源性比较,分析菌株遗传物质的异同,从而寻找菌株之间的相互关系。由于细菌染色体能更本质、更客观地揭示菌株之间的关系,因而近年来这方面的研究越来越受到重视,实验方法不断完善,应用日益广泛。选择适当的限制性内切酶是染色体 DNA 酶切图谱分析的重要一环,而染色体探针指纹图谱分析的关键在于寻找良好的探针。现今已建立的毒素基因、耐药基因、rRNA 基因以及单克隆随机染色体 DNA 片断等探针,更适合于流行病学调查的需要,同时采用生物素代替同位素标记探针。

### (一)质粒分析

1. 用于流行菌株的调查 许多经典的微生物学方法,对一些常见的病原菌进行流行病学调查,如生化分型、药敏试验、血清学分型、细菌素分型、细菌素敏感试验、噬菌体分型等,其中后几种方法,有些实验室尚没有条件进行。唯质粒指纹图谱法的特异性与噬菌体分型相当,优于血清学和生化分型。如美国亚特兰大传染病中心在 10 年中收集的 20 多起流行的鼠伤寒沙门氏菌株,均有其独特的指纹图谱,绝大多数与噬菌体分型相对应;另外,对表皮葡萄球菌进行质粒指纹图谱分型,其特异性更强。根据大量研究表明,质粒指纹图谱分析不但特异性好,而且分析周期短、简便、稳定,一般不需要特殊试剂和生物学材料,可以作为经典方法的补充和替代的好方法。

对从多处收集的革兰氏阴性杆菌 60 多个菌株作质粒图谱分析,发现各地流行菌株均具有特异的图谱,与同一地方分离的具有相同耐药谱而血清型和细菌素型不同的对照菌株截然不同。

对于那些至今尚未建立标准分型的细菌,质粒图谱分析则提供了可能。如美国弗吉尼亚医学院烧伤病房,在 6a 间发生两次由阴沟肠杆菌引起的暴发流行,由于缺乏可靠的实验方法,而采用质粒图谱分析作回顾性研究,证实两起暴发的疾病是由不同菌株引起的。对于缺乏血清学分型的细菌,也可以用质粒图谱分析进行流行病学追踪。

质粒图谱分析具有许多优点,为流行病学调查提供了强有力的实验手段,因此近年来得到了广泛的研究和应用。但是,值得注意的是,质粒图谱分析法并不能完全取代其它微生物学方法,它的应用受到一些因素的限制:①菌株无质粒;②有些质粒不稳定或经多次传代后丢失;③仅限于一定时间和地区范围之内。

2. 用于流行质粒的调查 质粒可通过不同的遗传转移机制在不同的细菌中传播,形成流行质粒;也可能与其它质粒、前噬菌体、染色体等 DNA 序列发生重组,形成新的复制子。已知 R 质粒的宿主范围相当广泛,可在多种菌属中传播,大部分抗生素耐药性是由 R 质粒介导的。因而对 R 质粒的传播及演化过程的追踪具有重要的流行病学意义。

## (二)染色体分析

细菌染色体 DNA 分析方法的建立,为准确鉴定病原菌提供了新的手段,可弥补经典方法、质粒图谱法分析的不足,具有很重要的意义。

1. 染色体 DNA 限制性内切酶谱分析 提纯的染色体 DNA 经限制性内切酶消化后,产生一系列 DNA 片段,通过凝胶电泳分离形成酶切图谱。根据染色体 DNA 酶谱的相似程度,判断不同菌株的亲缘关系。同种细菌的不同菌株具有不同的酶谱,相同菌株的酶切谱相同或者非常相似。

从同一地方分离的 27 株棒状杆菌属 JK 群菌,具有相同的耐药谱。经质粒检测发现,其中两株菌携带分子质量为 20kb 质粒,其它菌株均不含有质粒。为了追踪该菌的传播方式,进行了染色体 DNA 的酶谱分析,结果表明,从同一病者身上相隔几个月分离出的菌株具有相同的酶谱,而从不同病者身上分离的菌株则出现不同的酶谱,说明此地棒状杆菌的传播方式不是通过病者—病者的途径。

挪威北部地区发生的脑膜炎,经血清学分型证明 90% 为 B15 型菌株。对 30 株 B15 菌株进行酶谱分析发现,其中有 20 个菌株具有极接近的酶谱,而另 10 株是健康带菌者或其它来源的菌株,因此其酶谱彼此不同。表明挪威北部人群中存在的 B15 型菌是不同的菌株。

过去对兰斯菲尔德(Lancefield)群链球菌的分类鉴定,主要依靠细菌素、噬菌体生物型方法,局限性较大,对动物流行性链球菌菌株通常无法区别。采用染色体 DNA 酶谱分析人和动物的链球菌流行株,结果很好,不同来源的菌株其酶谱不同,同一次暴发流行的菌株则酶谱相同。这些结果与用细菌素、噬菌体分析的结果一致,对于不能用细菌素、噬菌体等方法鉴定的菌株也能明确地区分开来。

到目前为止,有许多革兰氏阳性菌和阴性菌进行的染色体 DNA 酶谱分析证明,这种方法稳定、重复性好、敏感性高、简便易行,特别适合对同种菌中不同菌株的区别,可作噬菌体、血清学常规分型方法的补充。应注意的是,细菌染色体在酶切后形成的 DNA 片断较多,酶谱较复杂,眼观较困难,尚须改进。另外,在分析含有质粒的菌株时,还要注意区分质粒带。

2. 染色体探针指纹图谱分析 用核酸探针区别不同的菌株,杂交谱带较少,易观察、敏感度高,可以更准确地分析流行菌株。

有些学者以装配型质粒(Cosmid)作载体,随机克隆肠炎沙门氏菌染色体 DNA 片段并制备探针,分析几种沙门氏菌。从 11 个暴发区分离的 17 株伤寒沙门氏菌具有 6 种类型的探针指纹图。实验证明,不同来源的大多数都柏林沙门氏菌具有不同的探针指纹图,其中有部分菌株的质粒谱和染色体 DNA 酶谱相同;有 9 株来源不同且具有不同质粒谱的肠炎沙门氏菌中,8 株具有相同的探针指纹图。质粒谱及限制性内切酶谱无法区别的部分都柏林沙门氏菌株,用探针指纹图能区别开来,说明敏感性较高;探针指纹图相同的肠炎沙门氏菌,质粒谱不完全相同,这可能反映了质粒谱分析的局限性,即同一菌株在一定条件下可以获得或丢失质粒,经长时间和大范围传播后,则具有不同的质粒谱。

染色体酶谱的相似程度,是判断菌株亲缘关系远近的主要标准。酶切图谱相差较大,可判断为不同菌株;酶谱相同或非常相似,但具有不同的 attB、tox B 和噬菌体 DNA 探针指纹图,反映了同一菌株的变化,这种变化可能是在流行过程中发生的。

细菌在进化过程中, rRNA 基因具有高度保守性, 尽管不同种属细菌的染色体 DNA 其它顺序变化较大, 但 rRNA 基因组变化较小, 因此用 rRNA 探针进行杂交, 能对不同种属的细菌进行鉴定, 具有更广泛的应用价值。实验表明, 用大肠埃希氏菌 rRNA 探针与大肠埃希氏菌、洋葱假单胞菌和流感嗜血杆菌的染色体 DNA 杂交, 它们各自具有特征性的探针指纹图。因此, 同一 rRNA 探针可用于不同种属的细菌, 根据特征性的探针指纹图, 可以区别不同种属的菌株, 具有广阔的应用前景。

### 三、疫苗的研制及其问题

疫苗的研制和开发是免疫学的一项重要任务, 也是医学微生物学和兽医微生物学的重点研究领域。随着科学技术的发展, 研制合理的新疫苗, 用于控制、清除或选择性地根除某些传染病有着重大意义。特别是伴随畜牧业的集约化发展, 研制防制传染病的有效疫苗则更显重要。目前, 人们已通过采用现代生物技术, 特别是分子生物学技术、重组 DNA 技术、蛋白化学和相关技术, 以及免疫学的相关知识, 特别是免疫应答的机制, 包括各种淋巴细胞及其产物功能的定位等, 对于常规方法制备疫苗的失效或不安全, 或制苗病毒不能培养或难以达到有效滴度, 以及病毒具有潜在致癌性等现有疫苗存在的普遍问题, 进行了深入的实验研究; 同时还研制开发了一些新型疫苗, 如已投入使用的乙型肝炎病毒表面抗原亚单位疫苗、仔猪腹泻大肠埃希氏菌疫苗和猪伪狂犬病毒 tk 基因缺失减毒疫苗等。然而, 大多数基因工程疫苗尚处于实验研究阶段。

但是, 研制新型疫苗的关键不仅是基因工程技术的问题, 在更大程度上涉及到发病机制和免疫学问题。例如, 表达抗原的构型和抗原特异性必须同天然抗原一致, 否则会影响免疫效果, 甚至可能有害; 必须根据发病和免疫机制选择适当的疫苗类型, 如预防上呼吸道感染和腹泻必须选择局部应用的活疫苗; 在研制活疫苗时, 必须考虑适度减毒和保持免疫原性之间的平衡; 在利用病毒或细菌作为疫苗活载体时, 必须考虑插入外源基因对载体本身的毒力和免疫原性的影响; 在研制多肽或寡肽疫苗时, 必须解决更加有效的佐剂问题; 在研制流行性出血热疫苗时, 首先应考虑如何去除可能引起免疫病理作用的抗原; 在所有的疫苗中都应考虑免疫的持久性和完整性, 后者包括全身与局部免疫、体液免疫与细胞介导免疫等因素。

#### (一) 疫苗的含义和种类

1. 疫苗含义的变化 疫苗的传统概念是, 在健康的群体中进行免疫接种, 使之能预防相应病原微生物的感染。某些广泛使用的病毒性疫苗, 只有防止发病的作用, 而没有抗感染作用。典型的例子是鸡的马立克氏病(由疱疹病毒引起)疫苗, 它不能抵抗强毒株的感染, 但能防止感染鸡发生淋巴瘤; 人类使用的脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎等病毒性疫苗, 也只有抗疾病作用, 而没有抗感染的效果。因此, 预防传染病的疫苗可分为两类, 一类是抗感染疫苗, 另一类是抗疾病疫苗。严格说来, 这种分类是不确切的, 因为抗感染必将能预防疾病的发生。

近几年的研究表明, 疫苗不但能预防疾病, 而且能治疗疾病。临床观察表明, 发生疱疹(HSV-1 和 HSV-2 感染)、麻风、结核、利什曼病和乙型肝炎的病人, 接种疫苗能增强机体的免疫应答, 并可明显降低感染者的发病率和死亡率。

人类艾滋病治疗性疫苗的迅速发展, 强化了疫苗的治疗作用, 而且又分为抑制发病疫苗和推迟发病疫苗。由于大多数病毒性传染病尚无特效的治疗药物, 疫苗疗法与药物配合使用, 在临床上具有实用价值。

2. 疫苗的种类及其评价 目前常用疫苗有 9 种, 即灭活死疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗、基因工程亚单位疫苗、合成肽疫苗、基因工程活载体疫苗、基因工程缺失减毒疫苗、抗独特型抗体疫苗和基因疫苗。前 3 种是沿用已久的传统疫苗制备技术, 后 6 种均为采用现代生物技术而制成。

(1)灭活死疫苗:一般是先培养相应的细菌性或病毒性强毒病原体,经化学灭活剂,破坏其感染性而保留其免疫原性,其优点是简便易行。缺点是制造成本高、需要有安全可靠的灭活指标,但对于能发生整合的反转录病毒缺乏安全性;对于人用病毒疫苗,病毒必须高度纯化,以消除因含有细胞成分而引起的不良反应。

(2)减毒活疫苗:一般通过在体外长期传代而使毒力减弱。目前使用的大多数人和动物疫苗属于这类疫苗,即所谓的“弱毒”疫苗。其优点是成本低、免疫效力高、免疫期长和免疫力坚强。活的微生物在体内繁殖,能全方位地激发针对微生物各个组分的免疫应答。

(3)亚单位疫苗:通过破碎病毒体获得的亚病毒单位成分所制备的疫苗,称亚单位疫苗或亚病毒疫苗。流感病毒的血凝素疫苗和神经氨酸酶疫苗、由乙型肝炎健康带毒者血液所制的 HBsAg 疫苗,均属于亚单位疫苗。

(4)基因工程亚单位疫苗:研制该疫苗主要有两个过程,即先将选定的免疫原或抗原决定簇的编码基因引入细菌、酵母、昆虫细胞或能连续传代的哺乳动物细胞中,然后用基因工程技术生产大量抗原,用其制备只含有免疫原的纯化疫苗。近年来已有多种乙型肝炎的基因工程亚单位疫苗问世,正在研究的种类繁多。这类疫苗的抗原为亚病毒单位,其制备工艺属于基因工程。多种细胞系统各有优缺点,可根据具体要求加以选择,例如制备病毒疫苗时选用哺乳动物细胞为宜,因这类细胞是哺乳动物病毒的自然宿主,病毒在细胞内易于形成其固有结构,纯化过程也快速易行。

(5)合成肽疫苗:合成肽疫苗是运用化学合成技术制备的一种纯度较高的精制品,其研制前提是:免疫优势决定簇已被确定,该决定簇能产生保护性免疫。当前已合成多肽的微生物包括口蹄疫病毒、乙型肝炎病毒、流感病毒、骨髓灰质炎病毒和 HIV 等。合成肽疫苗的优点是不含有微生物的核酸、疫苗稳定性高、产品纯度高、生产费用低,缺点是抗原性弱、需要研究安全有效的佐剂。

(6)基因工程活载体疫苗:这是目前基因工程疫苗的热点研究领域之一。其过程是,选择免疫原的编码基因,插入活的微生物载体并能随着微生物在宿主体内的繁殖而表达。最简单的活载体疫苗,是将编码免疫原的质粒转入无害的细菌中,但最重要的是以活细菌特别是活病毒作为载体。

细菌活载体有沙门氏菌、BCG 和大肠埃希氏菌,甚至还有原虫;病毒活载体有痘病毒、禽痘病毒、疱疹病毒、腺病毒和反转录病毒等。原则上,任何 DNA 病毒或其 cDNA 具有感染性的 RNA 病毒都可被选择作为活载体。

痘病毒是最早用作活载体的病毒,其优点是容量大,可按纳 20kb 的外源基因;缺点是宿主范围很广,具有潜在的生物危险。已有大量的外源基因被插入痘病毒并获得表达,其中狂犬病病毒糖蛋白的重组痘病毒已投入使用,通过食饵经口免疫狐狸获得成功。

禽痘病毒载体具有重要的开发潜力,已建立了流感病毒血凝素、新城疫病毒血凝素和 F 蛋白基因的重组禽痘病毒。最有意义的研究方向是将禽痘重组病毒用于哺乳动物,当用狂犬病病毒免疫原性糖蛋白基因重组禽痘病毒接种 6 种动物(猫、牛、狗、鼠、兔和大鼠)时,所有动物均产生免疫应答,其中 3 种动物(鼠、猫和狗)在攻毒后获得免疫保护;重组禽痘病毒在这些哺乳动物体内是非生产性的,即只表达基因产物并能提呈给宿主免疫系统,而无病毒复制的迹象,因此具有死疫苗那样的安全性。

疱疹病毒活载体的报道也较多,包括火鸡疱疹病毒、猪伪狂犬病病毒、牛疱疹病毒 I 型、马疱疹病 I 型、单纯疱疹病毒和人巨细胞病毒等。哈尔滨兽医研究所正在从事鸡传染性喉气管炎病毒(一种疱疹病毒)活载体的研究,该病毒是以粘膜免疫为主,因而对以粘膜免疫为主的禽传染病具有重要的价值。另外, $\alpha$ -疱疹病毒一般都具有很广的宿主范围,而鸡传染性喉气管炎病毒的宿主范围很窄,如能象禽痘病毒那样在哺乳动物体内建立非生产性感染,将具有重要的应用前景。

活载体疫苗集中了减毒疫苗和死疫苗的优点,而且能同时容纳几种病原微生物或一种微生物几个血清型的免疫原编码基因以及白细胞介素基因,制成多联或多价疫苗。活载体疫苗的缺点是,一次免疫往往免疫期不够长,而二次免疫因受到已建立的免疫应答的排斥而往往无效。在人的预防接种中,为克服这一缺点,首免用活载体疫苗,二免用亚单位疫苗,取得了良好的效果。但是这种用法在兽医实践中尚未推广使用。

(7)基因工程缺失减毒疫苗:其研究策略是,从病原体中缺失一个或几个基因,这些基因与病原体的毒力有关,但不会明显影响其复制能力,而且不破坏病原体作为疫苗株的免疫原性。基因缺失除能使毒力减弱外,也是缺失减毒株的一个标志,据此可鉴定和区别其亲本株和野毒株;另一个优点是,缺失减毒株在理论上不能返祖,具有十分广阔的开发前景。

研制缺失减毒疫苗,需要病原体有一个清晰的分子遗传学背景,包括与毒力有关的、非必需的、非主要免疫原基因的鉴定以及致病机制,即病原微生物的结构、功能以及与宿主的相互作用。

(8)抗独特型抗体疫苗:抗独特型抗体的免疫,是以抗独特型抗体作为抗原,注射机体后可产生保护性免疫。这种免疫方式目前尚处于探索研究阶段。其理论基础是分子模拟和独特型-抗独特型网络学说,近十年来在细菌、病毒和寄生虫免疫方面都进行了许多尝试,也取得了不少有价值的进展,但尚未实际应用。

(9)基因疫苗:90年代初诞生了一种新的免疫学方法——基因免疫(Genetic immunization),它是将编码抗原的裸露DNA通过物理方法直接转入到动物体中,利用抗原基因在动物体内表达出的抗原唤起机体的免疫应答,相应的疫苗叫做“基因疫苗”(Genetic vaccine)。

这种疫苗的优点在于:①安全性好,其载体可以是非复制型质粒或腺病毒、疱疹病毒等的DNA,因此没有引起病原性感染的危险;②基因免疫只对表达的抗原而不对载体产生免疫应答,可在一个载体上构建能表达多种抗原的多联或多价疫苗;③同基因工程亚单位疫苗相比,基因免疫只需构建高效表达的质粒,省去了抗原提取和纯化等繁琐的后处理工艺,因此价格便宜。

基因疫苗尚在发展之中,其免疫机制尚不清楚,免疫保护期尚待确定,因此,它作为疫苗的应用前景还难以确定。然而,对于基因免疫的机制进行研究将有重要的理论价值。

3. MHC 提呈肽与疫苗 近年来的研究发现,抗原特异性T细胞只有在MHC-I和MHC-II类糖蛋白递呈给它时,才能对巨噬细胞加工过的抗原肽产生免疫应答,这对于疫苗的研制具有重要的指导意义。

MHC肽的结合沟槽中,绝大部分是多形氨基酸残基,由其决定这类受体的同种异型结合特异性。几乎所有的有核细胞都表达MHC-I类抗原,细胞内寄生物作为外源性蛋白在细胞质中加工,产生的肽段被输送到内质网中,然后与MHC-I的重链和 $\beta_2$ 微球蛋白异二聚体形成稳定的三分子聚合物,并在细胞表面表达。相反,MHC-II类分子只在有限的细胞类型中表达,其中包括抗原递呈细胞(APC)。APC摄取抗原蛋白后,在溶酶体中降解,产生的肽段与MHC-II结合而表达在细胞的表面。

同种异型MHC分子虽然都能递呈各种各样的肽,但各自有所偏爱,此现象叫做MHC限制性。MHC-I结合肽大多为1~8个氨基酸长,其结合沟是一个多袋状闭端结构,同种异型结合有三个锚位,大部分结合发生在肽末端保守的结合位和沿着肽骨架延伸的氢键网络,只有少数侧链参与,这种结合机制能使递呈能力和免疫应答放大。MHC-II结合肽为10~34个氨基酸长,呈巢式结构,与MHC-II类肽结合沟的开端相匹配。用一系列合成肽在体外测定其与MHC的结合情况,发现与MHC-II特异结合的每个锚位有4~7个不同的氨基酸;而用噬菌体表达肽文库中的肽进行测定,发现有四个锚位,每个锚位有2~4个不同的氨基酸可供选择。



作为疫苗,人们希望能用肽链进行免疫,并激发 T 细胞对病原体天然蛋白产生应答。部分亲水性肽链具有这种功能性表位,将 B 细胞表位或 CTL 表位与 Th 细胞表位偶联起来,有可能作为候选疫苗。合成肽疫苗的一个关键问题是,任何抗原决定簇只能被少部分人群所识别,在有许多 HLA 型的混杂人群中尤其如此。但也发现,有些抗原没有这种 MHC 限制性,如疟原虫孢子蛋白位点和 HIV-1 囊膜的 T<sub>1</sub> 位点。另一个关键问题是细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)位点常位于高变区,这对于 T 细胞识别十分不利。例如,HIV-1 两个毒株的囊膜 325 位氨基酸的变异,可完全改变 CTL 的特异性。

HIV 的变异,可发生在 CTL 特异性识别的部位或 MHC 特异性结合的部位。如果 CTL 识别部位发生突变,感染者若有足够的 Th 细胞,可诱导新的针对突变病毒的 CTL。可见,如果病毒识别 MHC 部位发生突变,由于感染者不会产生新的 MHC 分子,因此该 T 细胞表位将不再被该个体的 CTL 所识别,使变异株逃避宿主的免疫应答。

另外,天然亚单位疫苗含有一些诱导加强感染抗体、免疫抑制或自身免疫病的表位,通过重组 DNA 技术选择性组合某些决定簇,可增强免疫原性并避免有害作用,使人工疫苗比天然亚单位疫苗更加有效和安全。

4. 保护性免疫应答的性质 一种疫苗的效力,主要取决于它所诱导免疫应答的性质及其持久性。对于人类自然感染或使用疫苗后的免疫应答状况,目前了解尚少,多数资料来自病毒与动物宿主模型系统的研究。

对鼠流感模型的研究,确定了免疫保护性应答的四个阶段。①防止感染:通过中和试验和过继性转移研究发现,抗体对单个表面抗原(如血凝素)上特殊表位的识别,是防止感染的唯一机制;有时,针对囊膜病毒融合部位的抗体也具有抗感染作用。中和抗体通常识别三级或四级结构上的不连续(构型)表位,有时识别线性表位或经二硫键联结的环状功能区。②限制病毒复制:在使用疫苗后 24~48h,几种非特异性应答可限制病毒的复制,这包括干扰素、补体和各种细胞,后者包括自然杀伤细胞和具有吞噬活性的细胞。③清除感染:抗体介导的抗体依赖性细胞毒性细胞(ADCC)或补体依赖性的溶细胞作用,可降低病毒的滴度。但是,只有存在效应 T 细胞时才能完全清除病毒感染。效应性 T 细胞,尤其是 MHC-I 限制性的 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 细胞毒 T 细胞,在许多实验系统中可降低病毒的滴度或清除病毒感染。这些 CTL 可直接从宿主获得,也可经过培养或克隆得到;经培养或克隆的 MHC-II 限制性 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞也可有细胞毒活性,但直接取自宿主的 CD<sub>4</sub> 细胞尚未证实有这种活性。④产生记忆细胞:任何免疫应答都能产生记忆性 T 细胞和 B 细胞。在鼠流感模型中,病毒在肺中复制,4~6d 达到高峰,以后逐渐下降,10~12d 不能检出感染性病毒;CTL 在 4~5d 时出现,7~8d 达到高峰,14d 后消失;记忆性 CTL 在第 14 天达到高峰,在小鼠的一生中持续存在;IgM 的抗体分泌细胞(ASC)约在第 6 天出现,IgM 和 IgA 的 ASC 约在第 10 天出现;记忆性 B 细胞和 ASC 的高峰出现在第 10 周和第 15 周之间,随后这两类 B 细胞逐渐而缓慢地减少,但至少可持续 80 周。尽管 ASC 的半衰期较短,但在提呈抗原时,抗原可存留在淋巴组织的树突状细胞上,使记忆性 B 细胞能不断地补充 ASC。

疫苗通常是在机体接触致病因子之前接种,它应激活 B 细胞、Th 细胞和 CTL 细胞后才能诱导保护性免疫。若感染因子的抗原性稳定,则中和抗体就是最重要的保护性因素,由疫苗诱生的记忆细胞和 CTL 细胞起到“安全网”的作用。如果主要中和表位经常发生变异,微生物将避开已存在的抗体而复制,在这种情况下,活化的记忆细胞迅速产生 CTL 应答,在新的子代病毒尚未形成或释放之前快速地破坏感染细胞,在免疫保护中起着决定性的作用。对于经常发生变异的病毒来说,大多数病毒抗原可提供能与 MHC 分子结合的多肽,并为 T 细胞受体所识别,这对于形成 T 细胞介导的