

## 马传染性贫血病免疫的研究 ——马传染性贫血病驴白细胞弱毒疫苗的研制与应用

马传染性贫血病（简称马传贫）是由逆转录病毒科慢病毒亚科的马传贫病毒引起的一种马属动物的传染病。传染媒介为吸血昆虫。临床症状表现为高热稽留或间歇热，贫血、出血、黄疸、浮肿和消瘦等。发热期间症状明显，无热期症状逐渐消失，急性爆发期常造成大批马死亡，耐过马可转为慢性或隐性，一经感染，病毒即长期在体内存在成为传染源。转为慢性或隐性的马可因环境条件变化而反复发病。此病在世界上广泛流行，尤其是一些主要养马国家，如拉美各国，马传贫严重地区感染率高达30—50%以上。因而，此病造成的经济损失十分严重。自60年代马传贫在我国流行以来，随着疫情扩大，马匹大量死亡削弱了农耕动力，严重影响了农业生产的发展。

控制和消灭人、畜传染病的关键措施之一，在于疫苗的预防接种。为此，早在50—60年代，美、苏、法、日等国家就试验过各种不同的疫苗，但都以失败而告终。后来，研究人员发现慢病毒感染机体后，抗原呈不定向漂移，导致病毒持续存在，认为研制预防马传贫病毒感染的有效疫苗是研究中最困难的领域之一。

70年代中期,发展了马传贫的血清学诊断方法,在疫苗研究毫无进展的情况下,各国学者停止了此项工作。80年代,法国学者 Montaghier 发现马传贫的阳性血清抗体能识别艾滋病毒的重要核心蛋白,这个事实使马传贫扮演了一个较重要角色。

我国在60年代首先选择了对马传贫病毒较钝感的驴白细胞进行体外培养,马传贫病毒经过10多年的长期培养与继代改变病毒的外界生活条件,使之发生遗传变异,终于培育出一株对马毒力弱免疫性良好的弱毒株。用它制造的疫苗,已广泛应用于实际,收到了较好效果。

### 一、马传贫驴白细胞弱毒株的培育

首先选择健康驴,从其颈脉采血,分离白细胞,体外静置培养,同时改变细胞所需的营养条件。第一代用马传贫强毒接种培养在驴白细胞上,然后依次连续传代,随着继代数的增加,病毒已逐渐适应在体外培养的驴白细胞上生长繁殖,出现细胞致病作用和特异性抗原性(见图1)。相反,对马、驴的毒力逐渐减弱,在第60代前接种马、驴还有50%以上的发病或致死。而在110代以后接种马、驴不出现传贫临床症状,证明安全(见表1,2)。

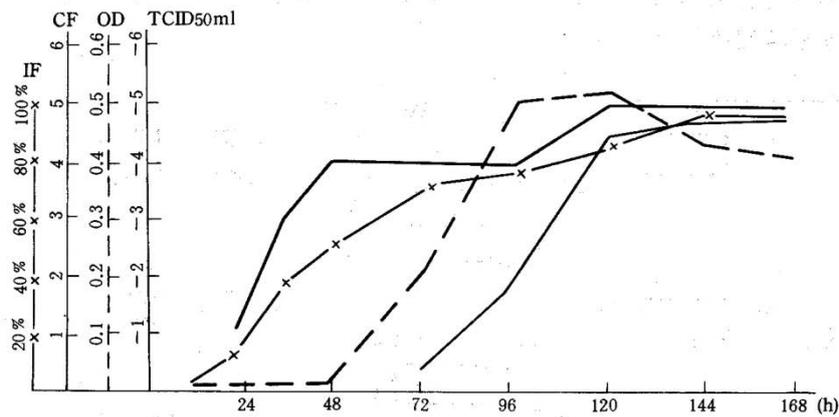


图1 驴白细胞毒在培养的驴白细胞内的增殖曲线

表1 继代毒对驴的毒力变化

继代数	接种驴头数	反应					发病率%
		●	◐	⊖	⊗	○	
1-21	3	1	2				100
22-40	9	2	2	2	1	2	67
41-60	12	3	2	2	2	3	58
61-80	6		2	1		3	50
81-100	12			1	2	9	8.3
101-129	9					9	0

表 2 继代毒对马的毒力变化

继代数	接种匹数	反应					发病率 (%)
		■	▣	▤	⊗	□	
60代前	7	1	2			4	42.8
90-100	11		1			10	9.1
101-110	8			1		7	12.5
111-120	20			1		19	5
121-130	22	1	1		1	19	9.1
131-140	22				1	21	0
141-150	2					2	0
151-160	8					8	0
161-170	8					8	0
200	4					4	0

注：本表及有关各表的符号说明如下：

- 接种继代毒的驴反应。
- 接种继代毒的马反应。
- 高热稽留或反复发热，由于急性或亚急性传贫而死亡者。
- ◐ 高热稽留3天以上或反复发热而有传贫床症状者。
- ◑ 热型轻微或只发生一次热不稽留，传贫症状不明显者。
- ⊗ 难以判定系由于感染传贫而起反应者。
- □ 无传贫反应。

## 二、弱毒株的稳定性

致弱的驴白细胞毒接种马、驴后，在不同时间采取含毒材料（血液或脏器）复归驴均不能发病，应用驴、马连续继代进行9次返祖，均不能恢复其原来强毒的毒力，接种弱毒株的马匹与健康马同居，经过1-2个蚊虻季节，即在有传播媒介存在的情况下混合饲养，不能感染健康马（见图2）。

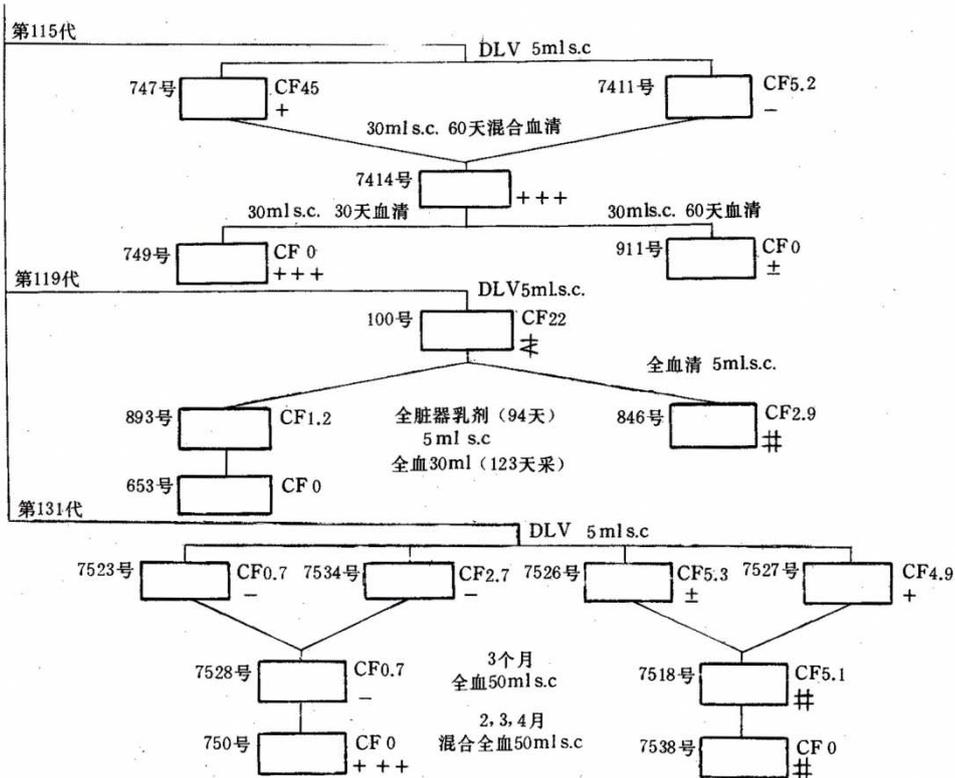


图 2 驴白细胞继代毒对马返祖试验

### 三、对马的免疫性

用弱毒株接种马、驴后，经过不同时间产生免疫性应答，无论体液免疫还是细胞免疫都有明显变化，即免疫器官中的未成熟型浆细胞和成熟型 T 细胞都出现明显的增生性反应。免疫后抗 gp35、gp90 的应答状态与机体抗感染的能力相一致（见图 3）。

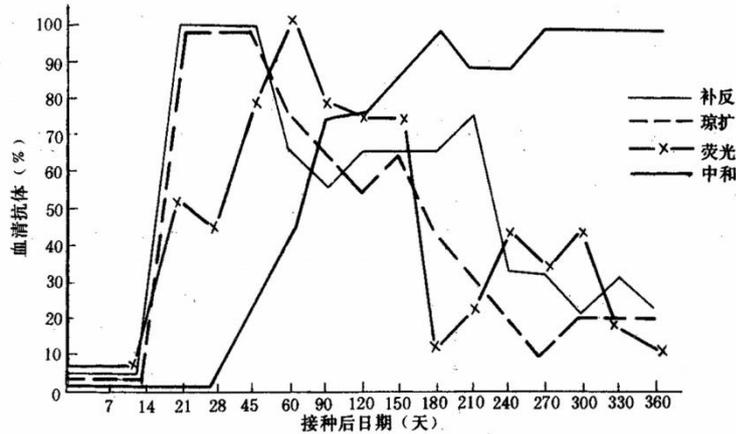


图 3 弱毒株接种马匹后的免疫应答（抗体反应）

弱毒株接种马、驴后，用同源强毒攻击后，对马 80% 以上有保护，对驴为 100% 有保护。它不仅对同源强毒有免疫力，而且对 5 个异源强毒，特别是美国的 Wyoming 株强毒也有较好的交互免疫力（见表 3, 4）。试验发现，慢病毒病产生的免疫力较晚，接种弱毒株后，驴在 2 个月，马在 3 个月后才能产生较好的免疫效果（见表 5）。免疫持续期长达 3 年以上。

表 3 驴白细胞继代毒对马的免疫试验

驴白细胞 毒代次	接种 马数	剂量及方法	攻毒的马 传贫强毒	反 应					保 护
				#	卅	+	±	-	
100	2	三次接种 5ml S.C 5ml i.M	10 <sup>-4</sup> 1ml S.C					2	2/2
105	4			1				3	3/4
105	4			1	1			2	2/4
对照	5			2	3				0/5
115	4	三次接种 5ml S.C 6-8ml (加佐剂) 0.5ml i.C	同上		2			2	2/4
	4					1		3	4/4
对照	2							2	2/2
对照	2							2	2/2
	2			2				0/2	
122	13	5ml S.C	同上		2	1		9	11/15
对照	3			3					0/3

表 4 继代毒对驴的免疫试验

代数	驴数	继代毒	传贫强毒	反 应					保护
				#	卅	+	±	-	
105	2	5ml S.C	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C					2	2/2
	2	0.5ml i.D	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C					2	2/2
对照	3		10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C	2	1				0/3
119	2	5ml S.C	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C					2	2/2
120	1	5ml S.C	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C					1	1/1
128	1	5ml S.C	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C					1	1/1
129	1	5ml S.C	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C					1	1/1
对照	2	5ml S.C	10 <sup>-2</sup> ×1ml S.C		2				0/2

表 5 疫苗对驴的免疫力产生时间测定试验

试验号	继代毒	攻击传贫强毒间隔时间(天)			
		15	30	45	60
		CF 反应	CF 反应	CF 反应	CF 反应
8	0.5ml i.D	0 卅			
14	2ml S.C	0 #			
20	对 照	0 #			
9	0.5ml i.D		0 #		
15	2ml S.C		0 ±		
25	对 照		0 #		
11	0.5ml i.D			2.9 #	
16	2ml S.C			3.7 #	
26	对 照			0 #	
12	0.5ml i.D				2.6 #
13	0.5ml i.D				3.1 -
17	2ml S.C				1.9 -
18	2ml S.C				1.7 -
27	对 照				0 #

注: CF 数字表示补反价

#### 四、用弱毒株制造的马传贫驴白细胞弱毒疫苗及其应用

从多头驴采取的混合白细胞,经赛氏液洗涤,用大牛混合血清作为培养液,采用大转瓶培养病毒,经各种指标鉴定合格后制成冻干疫苗。该疫苗经过中间试验,证明对不同品种、性别、年龄的马、骡、驴以及幼驹注射均未见到不良反应。自1978年后,在我国广大农村牧区应用该疫苗,全国共免疫注射了100多万匹马、骡、驴。注苗后疫情急剧下降,疫点减少,有效地控制了我国猖獗流行的马传贫,促进了农业生产。据农业经济专家统计,由于马匹注射了疫苗,全国减少直接经济损失达数十亿元,另外还有间接的经济效益。

## 五、讨 论

马传贫弱毒疫苗的研制成功打破了慢病毒疫苗的禁区，同时也标志着慢病毒免疫理论的突破。其意义不仅在于有效地控制了中国的马传贫，具有更大意义的是它将对在世界范围内控制和消灭马传贫起重要作用。自1983年在我国召开的国际马传贫学术讨论会以来，美国及10多个国家要求引用此疫苗防治马传贫。在1987—1989年，应古巴政府要求，将疫苗对古巴的马进行安全效力和扩大田间试验，结果证明疫苗安全有效。在古巴的试验成功，为此疫苗向其它拉美国家推广应用奠定了良好的基础。现正在与古巴、阿根廷、巴西等洽谈出口疫苗事宜。

80年代初，当第一株艾滋病毒被分离出来以后，科学家们发现，引起人类免疫缺陷综合征的病毒也属于逆转录病毒科的慢病毒亚科，但由于抗原漂移，持续感染很难研制出有效的疫苗。马传贫疫苗的研究结果，使人们对不久的将来能研制成功艾滋病疫苗增强了信心。全世界仍然在以最大的努力进行疫苗研究，到目前为止，包括对基因工程疫苗、亚单位苗、灭活苗、合成多肽苗等都进行过尝试，但无一成功。很多研究者对进一步的疫苗研究持悲观态度。1985年，法国巴斯德研究所研究人员首次报道了艾滋病毒与马传贫病毒具有抗原相关性，随后蜂拥而起的慢病毒研究证明马传贫病毒与艾滋病毒有以下很多相似的地方（见图4、表6）：（1）两病毒同属慢病毒亚科，它们都是通过血液和精液传播；（2）被感染的单核细胞成为病毒的宿主，且能将病毒传染到病人的大脑；（3）基因结构、感染复制特征；（4）电镜下的形态学特征；（5）对靶细胞、T细胞的致病性；（6）持续性感染；（7）马传贫病毒的P26和艾滋病毒的P24之间有交叉反应性；（8）对神经组织的嗜性，可引起各种神经系统疾病。这些共同的特征使马传贫作为动物模型研究艾滋病具备了良好的条件。在这种相关性研究中，最引人注目的还是已经成功的马传贫弱毒疫苗，弄清此弱毒与马传贫强毒的差异及其免疫和变异机理，对进一步决定采取何种途径或何种疫苗预防人类艾滋病，将具有十分重要的意义。因此，我们有理由相信，在当前艾滋病研究徘徊不前的情况下，进行马传贫弱毒及艾滋病毒的比较研究，将会在人类最终控制艾滋病的持久战中迈出重要的一步。

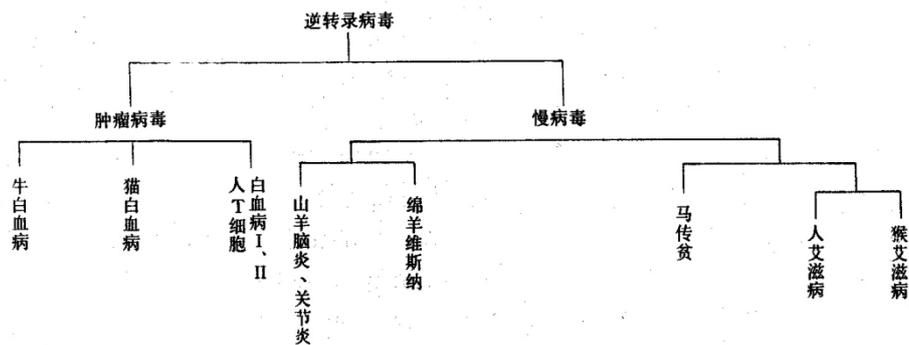


图4 逆转录病毒的进化谱系

表 6 人类免疫缺陷病毒的结构与功能和马传贫病毒的成分

人类免疫缺陷病毒			马传贫病毒
成分	基因	功能	成分
9.1KbRNA 4S RNA gp120 gp41 p66/p51 p31/ (p34) (一)	病毒基因组 I RNA <sup>lys</sup> env env pol pol (3-端) pol (5-端) gag (3-端) gag	复制引物 膜糖蛋白 膜糖蛋白 反转录酶 内核酶 整合酶 蛋白酶 (加工 gag-编码 的前体蛋白) 核心蛋白在 HIV 和 EIAV 最初均转录为一个大蛋白 前体, 即 p55	9.5KbRNA 4S RNA gp90 gp45 p70/p61 ( ) p30 ( ) (一)
p12—pp24—p16—p10		蛋白酶 (加工 gag-编码 的前体蛋白) 核心蛋白在 HIV 和 EIAV 最初均转录为一个大蛋白 前体, 即 p55	p15—p26—p11—p9
p27 p23 p20	3-orf sor art/trs	开读框架—蛋白调控病毒复制 小的开放阅读框架 mRNA 合成调节的转录后的缓 冲蛋白启动可控制大的 mRNA 前体的拼接, 实际上的 Mr = 13 KDa	(一) (一) (一)
p14	tat	基因表达的反向调节作用, 病 毒基因组 5-端的结合部位	(一)

注: sor 和 3-orf 基因对传染性和致病性并非是绝对必需的。