

新 發 現 和 再 肆 虐 的

傳染病

續 編

Emerging and Reemerging Infectious Diseases
(Supplement)

亞 洲 醫 藥 出 版 社



新發現和再肆虐的傳染病續編

Emerging and Reemerging Infectious Diseases

(Supplement)

主 編 于恩庶 李子華 焦新安 嚴延生

副主編 端 青 邵國青 郭章慨

亞 洲 醫 藥 出 版 社

內 容 簡 介

《新發現的傳染病》和《再度肆虐人類的傳染病》兩書分別收集了 17 種和 22 種病。此外還有一些新病未收進去，已經收進的病又有許多新進展，為補充這些新資料，有必要編寫一本續編。

本續編收集的病有瘋牛病和新型克雅氏病、H5N1 型禽流感病、*Hendra* 病毒病、*Nipah* 病毒病、埃利希體病、支原體病和衣原體研究進展。還特別介紹國外諸學者對生物恐怖主義的觀點，以引起我國對這個問題的關注。

新發現和再肆虐的傳染病續編

于恩庶 李子華 焦新安 嚴廷生主編

*

亞洲醫藥出版社出版發行

香港九龍尖沙咀寶勒巷 29 號寶昌商業大廈 5 字樓

發行人 孫 婷

亞洲醫藥出版社印刷廠印刷

*

開本：787×1092 1/16 18 印張 415 千字

2000 年 8 月初版 2000 年 8 月第一次印刷

印數：1—800 冊

ISBN 962-8037-34-X 定價：I

CNY40.00

編 委 名 單

- 于恩庶 福建省衛生防疫站 主任醫師,研究員
李子華 上海醫科大學 教授
焦新安 揚州大學生物科學與技術學院 教授,院長
嚴延生 福建省流行病防治研究所 博士,室主任
端 青 軍事醫學科學院微生物學流行病學研究所 博士,主任
邵國青 江蘇省農業科學院畜牧獸醫研究所 博士,主任
郭章慨 北京兒科研究所 研究員,室主任
林繼煌 江蘇省農業科學院畜牧獸醫研究所 研究員,原副所長
溫博海 第三軍醫大學 教授,室主任
徐為燕 南京農業大學 教授
何家惠 江蘇省農業科學院畜牧獸醫研究所 研究員
劉樹國 廣州市衛生防疫站 主任醫師,教授
楊婷婷 福建省流行病防治研究所 副主任醫師

責 任 編 輯

劉岱偉

目 錄

前 言	(1)
1 瘋牛病(牛海綿狀腦病)	(2)
2 新變異型克雅氏病——人類瘋牛病.....	(23)
3 A(H5N1)和(H9N2)流感疫情與防治對策	(28)
4 新發現的兩種人獸共患病毒 <i>Hendra</i> 和 <i>Nipah</i> 病	(41)
5 埃利希體病.....	(48)
6 人類免疫缺陷病毒(HIV)的研究進展	(85)
7 2型猪鏈球菌——人獸共患病新病原菌的研究概況	(116)
8 生物恐怖主義流行態勢及防禦策略	(122)
9 猪肺炎支原體和鷄毒支原體分子生物學研究進展	(149)
10 衣原體研究進展.....	(163)

前言

在《新發現的傳染病》和《再度肆虐人類的傳染病》兩書中，分別介紹了 17 種和 22 種病，受到同行專家和讀者的歡迎，並希望能有其他一些新出現的傳染病專著。為滿足讀者的需求，特編寫了這本續編，包括 6 種上述兩書未介紹過的新傳染病，如瘋牛病、新變異型克雅氏病、H5N1 型和 H9N2 型禽流感、*Hendra* 和 *Nipah* 兩種新病毒病、豬 2 型鏈球菌病。還有艾滋病和埃利希體病在前書中雖有介紹，但不全面，特別缺少病原學方面的最新資料，在本書加以補充。另外對衣原體學進行了較全面的描述及其引起的 4 種衣原體病包括 2 種新發現的肺炎衣原體病和家畜衣原體病作了扼要介紹。支原體病近年來受到關注，本書特別選擇兩種支原體的分子生物學最新研究進展，加以綜述，其他支原體病內容，另有專著。

1999 年美國《Emerging Infectious Diseases》雜誌第 6 期全期刊登了有關生物恐怖主義流行態勢及防禦策略的有關文章，為人們敲響了警鐘。本書全面加以綜述，以資借鑒。

瘋牛病是世界人們特別關注的公共衛生問題之一，對於能否傳人，爭議相當激烈。但經過近年的研究，基本取得共識，越來越多的資料證明，瘋牛病可傳給人，兩者是同一種病，而與散發性克雅氏病完全不同，也無變異關係，稱為新變異型克雅氏病並不恰當，建議改稱為“人類瘋牛病”（詳見《中國人獸共患病雜誌》2000 年第 16 卷第 4 期述評），如同狂犬病等人獸共患病那樣，在人和動物都叫狂犬病，這有利于防治。

本書的出版，受到軍事醫學科學院、南京軍區軍事醫學研究所、福建省衛生防疫站以及江蘇省“青藍工程”資助，特此致謝。

于恩庶

2000 年 1 月

1 瘋牛病(牛海綿狀腦病)

要 目

1.1	病因學	(3)
1.1.1	朊病毒的一般特性	(3)
1.1.2	SAF 和 PrP	(4)
1.1.3	BSE 朊病毒的特性	(5)
1.1.4	TSE 病原因子的其它假說	(8)
1.2	流行病學	(8)
1.2.1	BSE 的地理分布特征	(8)
1.2.2	病因和來源	(9)
1.2.3	流行的開始	(9)
1.2.4	為什麼在 80 年代之前不發生 BSE	(9)
1.2.5	流行過程	(10)
1.3	臨床表現和診斷	(11)
1.3.1	臨床症狀	(11)
1.3.2	鑒別診斷	(11)
1.3.3	病理組織學病變及其它變化	(11)
1.3.4	診斷	(12)
1.3.5	臨床前診斷的前景	(12)
1.4	遺傳學和分子遺傳學方面的研究	(13)
1.5	預防和控制	(14)
1.5.1	英國	(14)
1.5.2	其他國家	(14)
1.6	有關傳播方面的研究	(17)
1.7	BSE 對人類健康的可能影響	(17)
1.7.1	盡可能減少人感染的危險	(17)
1.7.2	BSE 傳播方面的研究及其對人健康的影響	(18)
1.7.3	貓 SE 的發病情況	(19)
1.8	結語	(19)

牛海綿狀腦病(Bovine spongiform encephalopathy, BSE)俗稱瘋牛病(Mad cow disease), 其臨床和組織病理學特征是精神失常、共濟失調、感覺過敏和中樞神經系統(CNS)灰質的空泡病變。

近年來 BSE 不僅成為獸醫學的一大難題,對英國已造成巨大經濟損失,更重要的是出于人類健康和公共衛生方面的考慮,即 BSE 能否傳染給人,人的克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD,)和 BSE 是否相關。近年來,英國 CJD 的發病率似有增多趨勢,特別是連續出現 10 多例青年 CJD 患者,使人們對這一問題的擔心進一步升級^[1,2]。

1986 年 11 月,首例 BSE 經組織病理學檢查病牛大腦被確認。其后,BSE 在英國來勢迅猛,1986 年僅發現 12 例,1987 年發生 461 例,1988 年猛增至 3000 多例,此后持續上升,1992 年高達 36 000 例,至 1996 年 6 月底確診病牛數已達 161 412 頭。發病地區也由英格蘭南部擴展至英國各地。流行病學調查結果表明,BSE 的發生具有共同傳染來源,很有可能是牛于 1981~1982 年間開始暴露于被癢病病原因子污染的精飼料(即摻入綿羊臟器等肉骨粉的濃縮料)所致。牛是被癢病病原因子的牛體適應毒株感染,而該因子已在牛群中存在一段時間。同時,牛—牛間的循環傳播是促進 BSE 流行的最主要原因。除英國外,愛爾蘭共和國、瑞典、法國、德國、丹麥、葡萄牙、意大利、加拿大和阿曼等國家已有 BSE 發生,但病例數不多。

1990 年 5 月~1996 年 3 月,英國經神經病理學檢查確診的 CJD 病人計 207 例,其中 10 例與其他 CJD 病例明顯不同。英國海綿狀腦病諮詢委員會稱之為 vCJD(variant of CJD, 新型克雅氏病),并認為它可能是暴露于 BSE 病原因子所致,這在全球引起強烈反響,掀起了軒然大波。

1.1 病因學^[1~20]

BSE 是一種神經性疾病,表現為中樞神經系統發生明顯退化和海綿狀損傷,與癢病(Scrapie)很相近。病牛大腦的提取物中含有異常的原纖維,亦與癢病相關的原纖維(Scrapie associated fibrils, SAF)相似。而且,BSE 的傳染性已被證實,其病原因子是一種類癢病的傳染性因子。對於這類病原因子的本質至今沒有共識,存在多種假說。1982 年,Prusiner 等首次提出朊病毒(Prion)假說^[4,19],經十多年研究取得一系列重要進展,逐漸得到人們的認同。

1.1.1 朊病毒的一般特性

1.1.1.1 朊病毒與常規病毒的共同特性 朊病毒能通過 25~100nm 孔徑的濾膜。用易感動物可滴定其感染滴度。感染宿主后,先在脾臟和網狀內皮系統的其它部位復制,然后侵入腦,在腦內可復制至很高的滴度($10^8 \sim 10^{12}$ /每克腦組織)。一些宿主對朊病毒的易感性受遺傳控制。朊病毒具有不同生物學特性的毒株,用有限稀釋法可從“野生原種”克隆純化不同的株。能在細胞培養物內增殖,并具有細胞融合活性。

1.1.1.2 朊病毒的獨特性

(1) 物理和化學特性:對甲醛(18%)、戊二醛、 β -丙內脂(1%)、EDTA、核酸酶(核糖核酸酶 A 和 III、脫氧核糖核酸酶 I)、順鉑(cisplatin)、甲醇、乙醇、丙醇、非離子型或弱離子型去污劑、溫度(高壓蒸氣消毒 134~138℃ 18 分鐘,不完全滅活)、UV(254nm)、離子輻射(γ 射線)、超聲具有很強的抵抗力。

對乙醚、丙酮、環氧乙烷有中等敏感性。對高壓蒸汽(121℃ 60 min)、紫外線(220 nm, 237 nm)、苯酚(90%)、KSCN(1mol/L)、次氯酸鈉(5%)、尿素(6~8 mol/L)、SDS(0.1%)、過碘酸鉀(0.01 mol/L)、氯仿、高錳酸鉀、氫氧化鈉等有敏感性。

(2)生物學特性:增殖時間很長,在倉鼠、小鼠腦內為 5.2 天;潛伏期長達數月至數十年;漸進性病理變化;致死性感染,不會康復;引起變性的病理學變化(包括空泡變性、澱粉樣蛋白斑塊、神經膠質增生等),不引起炎症反應;無包涵體;不誘導干擾素,也不干擾其它病毒誘導干擾素;對干擾素不敏感;不受常規病毒干擾;DNA 雜交或轉染不能證實感染性核酸存在;不含非宿主蛋白;免疫抑制(環磷酸胺、X 射綫、抗淋巴細胞血清、脾切除、摘除胸腺)或免疫增強劑(如佐劑)不能改變疾病的發生和發展過程(潛伏期、病程和存活期);不破壞宿主 B 細胞和 T 細胞的免疫功能;不引起宿主的免疫反應;細胞培養不產生細胞病變效應。

已知由朊病毒引起的人和動物致死性神經系統疾病有 10 多種:人的早老痴呆症或克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、庫魯病(Kuru)、格-斯二氏綜合征(Gerstmann-Straussler Syndrome, GSS)、致死性家族性失眠症(Fatal Familial Insomnia, FFI)、綿羊和山羊癢病、牛海綿狀腦病、傳染性水貂腦病(Transmissible mink encephalopathy, TME)、鹿慢性消耗性疾病(Chronic wasting disease, CWD)、貓海綿狀腦病(Feline spongiform encephalopathy, FSE)和動物園飼養的野生牛科和貓科動物的 SE。

1.1.2 SAF 和 PrP

1.1.2.1 SAF 目前認為,SAF 是傳染性海綿狀腦病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)的致病因子而不是病理變化的產物,SAF 是 TSE 特異的。SAF 有兩種存在形式:I 型纖維和 II 型纖維。I 型纖維直徑 11~14nm,由兩根直徑 4~6nm 的原纖維相互螺旋盤繞而成,螺距為 40~80nm。II 型纖維由 4 根相同的原纖維組成,各根間間隙為 3~4nm,直徑 27~34nm,每 100~120nm 出現一狹窄區,狹窄處直徑約為 9~11nm。其優勢蛋白成分是一種抗蛋白酶 K 的蛋白質(Protease-resistant protein, PrP),又名朊病毒蛋白(Prion protein, PrP)。

1.1.2.2 PrP PrP 在一定條件下可形成小杆狀或纖維樣結構。據 Prusiner 推算,一個朊病毒含 ≤ 3 個 PrP 分子,1 根朊病毒杆(25nm $\times$ 100~200nm)約含 1000 個 PrP 分子,幾根至幾百根朊病毒杆可組成一個簇團。而 10~100 根杆(即 $10^4\sim 10^5$ PrP 分子)含 1 個 ID₅₀^[8,9,16]。

PrP 經蛋白酶 K 的消化后,其抗蛋白酶的核心部分分子量為 27~30kD,被稱為 PrP^{27~30}。隨後研究又證明,PrP^{27~30} 來源于分子量 33~35kD 的較大蛋白質,這種蛋白質被命名為 PrP^{Sc} 或 PrP^{Sc}33~35。用抗 PrP^{27~30} 抗體研究未經蛋白酶 K 處理的健康動物和癢病動物組織的抽提物發現存在兩種 PrP 異構體。兩者的分子量均為 33~35kD,分別稱為 PrP^C33~35 和 PrP^{Sc}33~35。健康動物的腦組織僅有 PrP^C33~35,癢病動物組織則兩者兼備。兩種異構體氨基酸序列相同,但物理化學特性不同。PrP^C33~35 在去垢劑提取物中不聚合為大分子纖維結構,對蛋白酶 K 高度敏感,被完全消化;PrP^{Sc}33~35 則大量聚合為大分子纖維(SAF),在溫和的去垢劑溶液(非變性去垢劑)中對蛋白酶 K 具有抗性,只被部分消化,移去其 N 末端 67 個氨基酸殘基,產生 PrP^{27~30}。PrP^{Sc}33~35 和 PrP^{27~30} 兩者均有感染性。聚合的大分子纖維被溶于強去垢劑溶液(如 SDS)中即分解為 33~35kD 的多肽,這種多肽與 PrP^C33~35 在免疫學上有交叉反應,能被蛋白酶 K 完全消化。表 1-1 比較了 PrP^C 和 PrP^{Sc} 的主要特性。

TSE。不產生特異免疫反應可能是由于 PrP^C 使宿主產生了對 PrP^{Sc} 的免疫耐性。

1.1.2.3 PrP 基因 迄今已克隆了人、25 種非人靈長類動物、倉鼠(敘利亞倉鼠、美國倉鼠、中國倉鼠)、小鼠(I/LnJ, R111S/J, MOLF/Ei)、小鼠(C57BL/6J, 129SV, NZW)、大鼠、牛、

綿羊、水貂、大捻和阿拉伯大羚羊等的 PrP 基因,并推導和測定了它們的序列。人的 PrP 基因 (PRNP)位于第 20 號染色體的短臂上,小鼠的 PrP 基因 (PrnA-p)位于第 2 號染色體上。

牛的 PrP 基因有 3 個外元和 2 個內元(圖 1-1)。其編碼 PrP 的整個 ORF 位于一個外元內,編碼區的序列已被測定,它編碼含 256 或 264 個氨基酸的蛋白質。牛和綿羊的 PrP 基因高度同源(>90%)(圖 1-2)。

表 1-1 PrP^C 和 PrP^{SC} 的主要特性比較

	PrP ^C	PrP ^{SC}
對蛋白酶的抵抗力	—	+
存在部位	細胞表面	細胞內
GPI 錨*	有	有
PIPLC** 能否使之由細胞表面游離	+	—
合成時間(1/2)	<30 分鐘	6~15 小時
半衰期	3~6 小時	>24 小時
二級結構:α-螺旋	42%	30%
β-片層	3%	43%

* GPI 錨 糖基磷酸酰肌醇錨 * * PIPLC 磷酸酰肌醇特异的磷酸脂酶 C

已發現牛 PrP 基因編碼區有兩種多態性。一是隱性的 Hind II RFLP 多態性,它由 576 號核苷酸由 C 轉變為 T 產生。另一是位于 160~309 號核苷酸間的 8 肽重復序列的拷貝數(5 或 6 個拷貝),該區域內一系列富有 G-C 成分的 24 或 27 個核苷酸編碼富含甘氨酸的 8 肽(或 9 肽)重復。這種多態性可使其兩個等位基因具有不同拷貝數的 8 肽重復序列,從而可有三個不同的基因型(6:6,5:5 和 6:5)。Hunter 等^[34,35]檢查了 193 頭健康牛的 8 肽重復基因型和 72 頭健康牛的 Hind II 基因型,前者 85%為 6:6,14%為 6:5,僅 1%為 5:5;后者 72%為 ++,26%為 +—,10%為 ——。PrP 的多態性無明顯的品種差异。

1.1.3 BSE 朊病毒的特性

1.1.3.1 抵抗力 BSE 朊病毒對各種理化因素有極強的抵抗力。Taylor 等^[41~45]最近報告,高壓蒸氣滅菌 134~138℃,不能使病牛腦組織中的朊病毒完全滅活;用含有效氯<16 500 ppm 的二氯異氰尿酸鈉(sodium dichloroisocyanurat)溶液處理 BSE 病牛 10%腦懸液 120 分鐘,也不能使其完全滅活;以有效氯濃度 8 250~16 500ppm 的次氯酸鈉溶液處理 30 分鐘可完全滅活;5%腦懸液以 1M NaOH 處理 30 分鐘可完全滅活,但 10%腦懸液經 2M NaOH 處理 30~60 分鐘有的分離物(BSE1)仍保持一定感染性。

病牛腦組織按常規的福爾馬林固定不能完全滅活,接種小鼠仍可使小鼠發病,只是潛伏期較接種未固定的同一材料長。用改良 McLean 氏副醛-賴氨酸-過磷酸鹽溶液(PLP)固定 BSE 感染小鼠(301V, MV 小鼠)的腦組織小塊(8mm³)5 小時,轉入蟻酸(98%~100%)內浸 1 小時,再以 PLP 泡 5 小時,也只能使感染性降低;以此材料腦內接種 11 只小鼠 10 只發病,潛伏期 273±17 天。PLP-蒸餾水-PLP 處理的對照,接種 6 只小鼠全部發病,潛伏期 115±5 天。

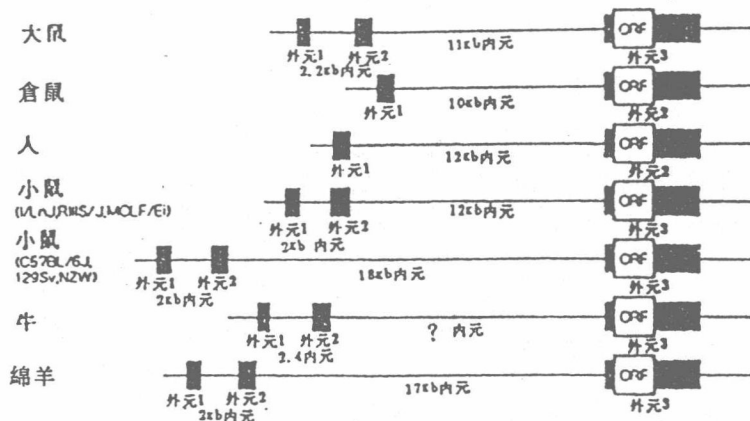


圖 1-1 朊病毒蛋白基因的構造

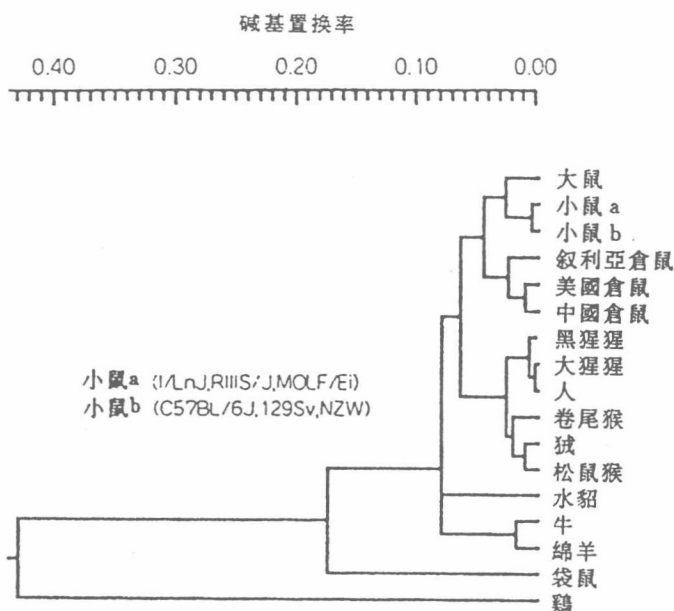


圖 1-2 朊病毒蛋白基因 ORF 的種系發生樹

1.1.3.2 宿主範圍和易感實驗動物 除牛外,迄今已發現 6 種野生牛科動物〔林羚、好望角大羚羊(*Oryx gazella*)、大角斑羚(*Taurotragus oryx*)、阿拉伯大羚羊(*Oryx leucoryx*)、大捻(*Tragelaphus strepsiceros*)、彎角大羚羊(*Oryx dammah*)〕。家貓和 3 種野生貓科動物〔美洲獅(*Felis concolor*)、獵豹(*Acinonyx jubatus*)、豹貓(*Felis prodelis*)〕亦自然感染類似 BSE 的 SE。

通過非胃腸道途徑可人工感染牛、綿羊、山羊、豬、普通簇耳狢(*Callithrix jacchus*)、長尾猴(*Macaca fascicularis*)、水豹和小鼠。感染倉鼠和雞至今未成功。實驗感染雞已觀察 3 年以上,仍健活。不感染倉鼠是 BSE 病原因子的重要特點。上述各種實驗感染動物除狢和長尾猴

外,都作了經口感染試驗,除豬外均獲成功。雖然經口感染劑量比非胃腸道途徑大得多,但潛伏期仍比非胃腸道感染長。以 BSE 病牛腦組織和 CSF 經口感染(C57B1)小鼠 10 只,7 只發病,潛伏期為 435~504 天。平均每鼠消耗腦 9.5g 和 CSF 4.5ml。而以同樣方式感染 CRH 小鼠則未成功。以 BSE 腦組織經口接種牛,1 克腦組織即可使牛感染。用牛和小鼠滴定同一 BSE 腦組織的感染性,牛測得的滴度比小鼠高 100~1000 倍。

小鼠的基因型對 BSE 潛伏期有明顯影響。不僅不同基因型小鼠潛伏期相差很大,同一基因型不同品系小鼠間潛伏期也明顯不同,而且 F1 雜種小鼠的潛伏期長于其兩親本小鼠。同一基因型不同品系間的潛伏期差異在首次小鼠-小鼠傳代時即消失。這與癢病病原因子明顯不同,同一基因型不同品系小鼠的癢病潛伏期相近,F1 雜種小鼠的潛伏期介于兩親本之間。

以多種非胃腸道途徑大劑量感染豬 10 頭,2 頭于幼齡死于繼發感染,其余 8 頭中 7 頭感染成功,潛伏期 17~37 月。經口感染豬至今已觀察 6 年仍健活,感染后 2 年撲殺臨床健康的試驗豬作組織學檢查未見 BSE 樣病理變化,接種小鼠也為陰性。

用實驗感染 BSE 的綿羊、山羊和豬及自然感染 SE 的林羚、大捻和家貓的腦懸液感染幾種近交系小鼠,各品系小鼠的潛伏期與由 BSE 牛直接感染的相應品系小鼠十分相近。這說明 BSE 分離物經各種動物傳代后,其生物學特性未改變,供體動物的種對小鼠實驗 BSE 的特征無明顯影響,雖然它們的 PrP 序列與牛不同。

Goldmann 等^[30,31]實驗證明綿羊對 BSE 的易感性受 PrP 密碼子 171 的基因型限制。以 BSE 腦懸液腦內或經口感染 23 只 NPU 雪維特綿羊,7 只發生 BSE,發病羊均為(Gln/Gln)171 純合子。發現 PrP 基因密碼子 136 的基因型修飾羊對 BSE 的應答。腦內感染發病羊 4 只,(Val/Ala)136 和(Aal/Aal)136 的各 2 只,前兩只的潛伏期為 724 和 880 天,后兩只的潛伏期為 440 和 487 天,前者比后者長約 70%。肌肉接種發病羊 3 只,2 只為 136 純合子[(Val/Vla)136 或(Aal/Ala)136],潛伏期分別為 538 和 734 天,1 只為(Val/Ala)136 雜合子,潛伏期 994 天,雜合子比純合子潛伏期長。此情形與 NPU 雪維特綿羊感染癢病 CH1641 毒株的情況相同,而和感染癢病 SSBP/1 分離物不同。

至今未作過犬和馬的人工感染試驗。據說犬有自然感染病例,但未見正式報道。

1.1.3.3 BSE 朊病毒似只有一個毒株 英國迄今已分離到 7 個 BSE 分離物(BSE1~7)。這些分離物是 1987~1990 年從相距很遠的不同地區采集的 7 頭 BSE 病牛的腦分離的。它們感染一組不同基因型和同一基因型不同品系近交系小鼠的結果(潛伏期和病理變化)十分相似,證明這些病牛感染的是同一毒株。這說明英國 BSE 病原因子只有一個株或為數很少的株。此外,自然感染 BSE 牛的臨床和神經組織病理學變化無明顯改變也是 BSE 只有一個毒株或很少數毒株的佐證。

BSE 的這些分離物與早先和同期由綿羊癢病分離的癢病分離物生物學特征不同。以 Sinc^{S7}和 Sinc^{P7}小鼠連續傳代分別獲得的 BSE310C 和 310V 毒株與所有源于綿羊和山羊的癢病毒株也不一樣。現普遍認為 BSE 起源于癢病。BSE 病原因子的主要株和癢病的分離物(或毒株)生物學特性不同,說明高溫化制和隨後經牛傳代已選育出適應于牛的變異株。實驗性牛癢病的病理變化與自然 BSE 不同也支持這一觀點。

1.1.3.4 BSE 病原因子在病牛體內的分布 BSE 朊病毒在病牛體內的分布很局限,至今僅在病牛的腦、頸部脊髓、脊髓末端及視網膜檢出感染性。經口實驗感染的牛,在感染后 6~

18 個月(包括 6 和 18 月),回腸遠端始終有感染性。以病牛的腦脊髓液、脾(觀察期 994 天,下同)、精液(967 天)、骨骼肌(889 天)、血液棕黃色層(904 天)、胎盤(811 天)、骨髓(780 天)、腸系膜淋巴結、股前淋巴結和肝臟腦內或腹腔內接種小鼠,未發現這些材料有感染性。以病牛的乳、乳房、脾、胎盤、胴體、腸系膜淋巴結和乳房上淋巴結經口感染小鼠,觀察 571~699 天,接種小鼠健活。于接種后 12~18 月撲殺未發病的原代接種小鼠,以其脾和脊髓腦內接種盲傳仍為陰性。但同期撲殺的經口感染 BSE 牛腦的小鼠脾則可使繼代小鼠感染,說明小鼠感染后,脾臟可在某一段時間內帶毒。除腦、脊髓、視網膜外,至今已檢查了自然感染病牛包括外周神經在內的 40 多種組織,都未檢出感染性。由此可見,BSE 病原因子在牛體內的分布和癢病病原因子在綿羊和山羊體內分布明顯不同。

Taylor 等^[41,42]以 6 頭不同泌乳期 BSE 病牛的乳,腦內(0.02ml)和腹腔內(0.1ml)接種 R^{III}/FaDK 吮乳小鼠,同時以被檢乳替代飲水經口感染(每日 10ml,連續 40 天)。觀察 702 天,實驗鼠存活 300 天以上的計 275 只,全部未發生神經症狀。實驗小鼠平均每鼠實際消費牛乳 300ml,按體重計,相當於成年人(體重 70kg)每日飲用約 500ml BSE 病牛的乳持續 6.75 年。

1.1.4 TSE 病原因子的其它假說 一些學者對朊病毒假說仍持有異議,提出并堅持自己的觀點。其中主要有:①非尋常病毒說(unconventional virus hypothesis),②擬病毒假說(Virino hypothesis),③聯合學說(unified theory)等,但目前尚缺乏直接實驗證據。

1.2 流行病學^[1,2,10,11,21~23]

1.2.1 BSE 的地理分布特征 BSE 大規模的流行只見于英國,幾個地區同時流行,并呈現廣泛傳播的趨勢。該病主要發生在奶牛群,以英格蘭東南部病例較多,這種地區間的差別是因為奶牛飼養密度不同。另一方面,受侵害的不同牛群發病率水平不盡一致,如蘇格蘭的病例很少,這種差別可由不同地區動物臟器化制工藝的不同得以解釋。表 1-2 是截止 1994 年 3 月已報道的 BSE 病例數。

表 1-2 各國經組織學確認的 BSE 病例數

國別	病例數	國別	病例數
英國	123904	福克蘭群島	1
北愛爾蘭	1257	丹麥	1
愛爾蘭	80	德國	2
瑞士	64	葡萄牙	1(4)*
法國	6	加拿大	1
阿曼	2		

* 没有得到官方確認的數字(截止 1994 年 3 月)

愛爾蘭有一些 BSE 病例報道,其中有些病例證實與英國進口的活畜或肉骨粉有關,另一些沒有關係。在愛爾蘭,也有綿羊癢病,但尚不清楚該地區 BSE 是否起源于當地產的肉骨粉。阿曼和福克蘭群島的 BSE 病例發生在從英國進口的奶牛中,丹麥發生的一例是進口的一頭蘇

格蘭種高原牛，而法國和瑞士暴發的 BSE 沒有充足的證據與進口牛有關。瑞士的情況有些讓人迷惑，第一個病例報道于 1990 年 11 月，發病牛 6 歲，是荷斯坦黑白花奶牛雜交后代，其出生和飼養都在瑞士，該牛吃肉骨粉，但肉骨粉來源不清楚。瑞士曾直接從英國進口肉骨粉（如在 1986 年），還可能經過其他國家進口英國肉骨粉，BSE 的發生歸咎于當地綿羊和山羊癢病不大可能。在法國，其 BSE 有可能與本國呈地方性流行的綿羊癢病有關，而另一方面法國從英國進口了大量肉骨粉，如 1989 年英國 50% 的肉骨粉出口法國。

1.2.2 病因和來源 1986 年 11 月英國首次確認 BSE，回顧性研究顯示，早在 1985 年 4 月就已發生了一些 BSE 病例。更早些時候，一些獸醫師就報道了類似病症，但已無法確認。

1987 年，英國 Weybridge 中央獸醫實驗室的 Wilesmith 等人開始一項流行病學研究，結果表明，BSE 與使用各種藥品或農藥，如疫苗、昆蟲噴霧劑、抗蠕蟲藥、除莠劑、殺蟲劑等無關，而且與進口肉牛或種牛的遷移無關。隨後的證據表明，癢病因子很可能是 BSE 的病因，特別重要的發現是 BSE 跟綿羊的存在沒有聯系^[47~51]。

BSE 不是遺傳性疾病，但本病在大多數英國奶牛群及其雜交后代中都發生，因此牛對該病的先天性易感因素未被排除。

唯一能得到認定的共同因素是飼喂濃縮料。在所有病例中，商品犢牛顆粒料、餅粕或蛋白質補充料被混合成配合的日糧來飼喂，這方面可獲得確切的記錄。除了一例可能經母畜傳播的報道外，每個病例都是原發病例，沒有證據表明牛與牛之間能直接傳播。在調查的專用飼料中有兩類動物來源的產品，一類是牛羊脂油，如含脂的成分；另一類是肉骨粉，如油脂熔煉產物中的含蛋白剩餘物。后者被證實是 BSE 的傳播媒介。

BSE 食源性病因的假設已得到另外幾個重要流行特征的證明。這包括奶牛群和肉牛群的 BSE 的發病率不同，這一現象可通過不同的飼養方式得到解釋。另外約 85% 肉牛群的 BSE 病例發生在購進的小牛中，這些牛很可能來源于奶牛群。病例一對照研究表明，含肉骨粉的犢牛專用飼料經統計是與 BSE 發病率有顯著聯系的危險因素。

1.2.3 流行的開始 流行病學模型表明，大約在 1981 年或 1982 年冬季，牛開始暴露于類癢病因子，來自患癢病羊的化制產品被認為是流行的起因。研究者普遍認為，牛不斷暴露于一個或多個共同的癢病病毒株，這些毒株越過牛羊種間屏障，導致 BSE 流行。相反，研究認為 BSE 流行不可能是由于出現新的對牛致病的癢病病毒變異株，那樣的話整個國家就應該同時出現變異株，因為在英國各地 BSE 幾乎是同時發生的。新近的流行病學研究揭示，牛不斷暴露于類癢病因子的牛體適應毒株，該因子在牛群中已存在一段時間。感染劑量的增加導致迄今不被注意的病例變為可檢測的發病病例。現有證據表明，不論什麼因素導致疾病開始流行，在牛群中再循環利用感染牛的臟器等生物產品（如肉骨粉）就會促進 BSE 的流行。

綿羊癢病被認為很可能就是 BSE 流行的來源。牛對癢病易感，美國研究人員 1979 年用癢病羊的大腦組織注入牛體內，結果牛發病，另外的研究取得相似的結果。但癢病經口傳播給牛的試驗沒有獲得成功。

在英國，癢病呈地方性流行已有數百年，其發病水平高于其他國家。加之其綿羊總數大于牛群，而其采用的化制處理的溫度遠低于完全殺死癢病因子的溫度。英國大多數化制工廠在大氣壓下進行化制生產，其濕熱階段溫度約為 100℃ 左右（或稍高些），而癢病因子對該溫度有很強抵抗力。

1.2.4 為什麼在 80 年代之前不發生 BSE 為回答這一問題，必須查看在認為 BSE 流行已經開始的那個時期，在化制(或臟器加工)中發生了什麼變化。其一，流水生產肉骨粉的比例由 1972 年的 0% 上升到 1988 年 75%，而以往是分批加工處理為主。不過該變化較緩慢，不可能據此假定化制產品在 1981 或 1982 年突然暴露于牛而引發 BSE；其二，同時期內，用于提高羊脂產量的溶劑抽提過程減少了，而此變化很突然，用溶劑生產的肉骨粉的比例在 1980～1983 年期間，幾乎從 100% 降為約 50%，大致符合預計的流行起始時間。

使用溶劑涉及到兩個步驟，第一步是溶劑抽提，如用 70℃ 有機溶劑抽提幾個小時；其二，直接利用蒸發去除殘余的溶劑。在滅活病原因子方面，濕熱比干熱效果好。溶劑抽提減少，利用蒸汽相應減少，被認為是導致英國 BSE 暴發的主要因素。其他因素還包括，癢病因子是可能的傳染源；綿羊總數的增加和其癢病發病率的升高。這都導致癢病羊化制產品的增加。

1.2.5 流行過程 1986 年 BSE 在英國被確認后，報道的病例數較少。到 1988 年 6 月，BSE 被注意之后，病例數急劇增加，從每月 60 例升到每周 50～60 例。1990 年 2 月，已診斷的 BSE 有 1 萬個病例。至同年底，該數字超過兩萬，1 年后在全英國(英格蘭、蘇格蘭、威爾士)差不多已確認 5 萬病例。在 1993 年早些時候，就達到驚人的每周 900 例以上(圖 1-3)。

截止 1994 年 1 月，英國約 29 000 個農場確認 11.5 萬病例。奶牛群至少有 1 例確診 BSE 的牛群占 48.9%，而在肉牛群，該比例為 11.9%。約 40% 牛群至少發生 1 例 BSE。發病高峰時的成年牛發病率為 1%。群內發病率由 1988 年上半年的 1.8% 上升到 1992 年上半年的 2.7%。

1989 年 6 月后，BSE 的發病率的增加是飼喂感染牛的臟器等制成的肉骨粉(MBM)所致。在實行限制性使用肉骨粉措施之前，這種循環就已經開始。而感染的再循環，實質是致病因子在易感染牛中的連續傳代，導致潜伏期的縮短直至恒定。在 1989 年至 1991 年期間，與暴露危險牛數相比，3 或 4 歲牛發病率確實增加。然而在 1988 年禁止飼喂肉骨粉，結果是抵抗潜伏期縮短。禁止飼喂的效果，首先在年輕世代的牛中顯現，尤其在 4 歲齡以下的年輕牛中變得越來越明顯。

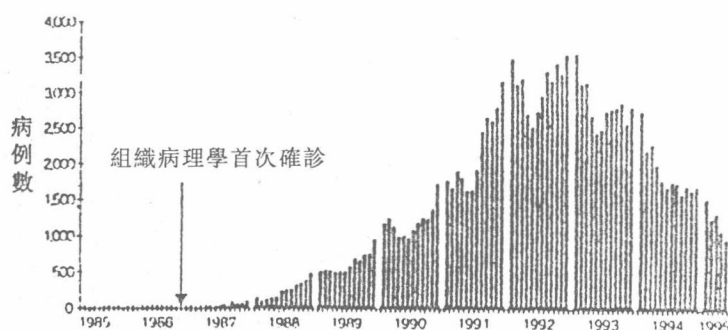


圖 1-3 BSE 流行曲綫

感染牛臟器再循環的另一后果是傳染性物質的擴增和感染劑量加大，這可能縮短潜伏期，正如缺乏種間屏障的后果一樣。這兩種因素不可避免地造成 BSE 流行。

將不同地區分離的 BSE 毒株 L₂ 接種小鼠，其潜伏期和其他特性很相似，表現為一個或同

一來源毒株。儘管這些分離株是在流行早期分離的,但都已是感染牛臟器再循環的結果。而且流行后期收集的毒株在小鼠上的表現也很相似。因此,可以認為,在流行暴發之前,BSE 已跨過種間屏障,此後沒發生進一步適應新的宿主類型的變異。另一方面,化制加工的選擇壓力,使耐高溫的毒株存活,這恰恰也能說明 BSE 缺少明顯變異的正確性。

1.3 臨床表現和診斷^[1,2,10,11]

1.3.1 臨床症狀 起初確認的 BSE 病例,其臨床症狀與最早報道的及後來描述的實質上並沒有兩樣。整個流行期間 BSE 的各種臨床症狀出現的頻率保持恒定。這說明 BSE 病原因子的特征和宿主應答反應均沒有發生變化。

BSE 的臨床症狀表現為神經症狀和全身症狀相結合,神經症狀可歸納為以下 3 種:

①行為變化:主要表現為恐懼,狂暴(故稱“瘋牛病”)和神經質。

②姿勢和運動異常:最常見為後肢運動失調、震顫、倒地不起。

③感覺變化:主要表現為對聲音和觸摸過敏。

87%的病例均表現出以上 3 種神經症狀,這與病牛發生彌漫性中樞神經系統病變有關。

BSE 病牛最常見的全身症狀是體重下降,產奶量減少,但許多病牛食欲良好。病理上確診為 BSE 的病牛并不只表現全身症狀,神經症狀總是出現。最早出現的神經症狀為離群,不願進入擠奶間,對擠奶反應為猛踢。最早出現的運動異常是後肢步態的微細變化及轉向困難。在這個階段也常見病牛磨牙、震顫。幾個星期後病情惡化,病牛臥地不起,直至死亡。從最初症狀出現到病牛死亡或急宰,此病常持續幾個星期或 12 個月。牛開始發病年齡常為 3~5 歲,最早的 22 個月,最遲的到 17 歲。

BSE 和綿羊癢病在臨床症狀上有許多相同點,兩者之間最明顯的區別在於患 BSE 的病牛偶爾才出現瘙癢症狀。

1.3.2 鑒別診斷 BSE 病牛最初出現的症狀易與牛低鎂血症混淆,但後者病程較短。另外 BSE 與神經型酮病也極易混淆。一般說來,許多能引起神經症狀并有一定病程的疾病都需作鑒別診斷。除了低鎂血症和酮病外,其它較重要的疾病還有大腦李斯特氏菌病、狂犬病、白化木乃伊症、鉛中毒、中樞神經系統腫瘤及其他占位性病變、黑麥草蹣跚症、偽狂犬病(Aujesky's disease)以及大腦皮層壞死症。

在疑似 BSE 的牛腦部病理組織檢查中,研究者發現多種中樞神經系統病變,其中還有以前未見報道的腦炎,伴有神經元染色體溶解和神經元壞死。

所有已報道的 BSE 病例中,約 85%被病理組織學檢查確診。但在 1993 年間,也發現較大比例的假陽性牛。主要發生在幼年牛和老齡牛。做病理組織學檢查費用高,因此,迫切需要能進行活體檢驗且準確性高的診斷技術。

1.3.3 病理組織學病變及其它變化 BSE 病牛的病理組織學變化局限于中樞神經系統。Wells 等及後來的研究人員均已作了詳細描述,BSE 病牛的主要病理組織學變化特征是:

①在神經元突起和神經元胞體中形成兩側對稱的神經元空泡。前者形成灰質神經纖維網的小囊形空泡(即海綿狀變化),後者形成大的空區,并充滿整個神經元核周體。

②神經膠質增生,膠質細胞肥大,常規 HE 染色即可檢出;如果用免疫學方法標記神經膠

質纖維酸蛋白(EFAP),就更能特异性檢出膠質細胞肥大。

③神經元變性、消失。

④大腦澱粉樣變性,用偏振光觀察可見稀疏的嗜剛果染料的空斑,呈特征性的二向色性。但這在 BSE 病牛中只占 5%,而綿羊癢病超過 50%。空斑可用抗朊病毒蛋白(prion protein, PrP)抗體進行免疫染色檢測。

空泡主要發現在延髓、中腦的中央灰質部分、下丘腦的室旁核區以及丘腦和中隔區,而在小腦、海馬回、大腦皮層和基底神經節通常空泡形成較少。這種損傷形式高度一致。這也說明 BSE 致病因子在感染途徑、發病因素等發病機理方面保持穩定一致。

除了病理組織學損傷外,在臨床上感染 BSE 的病牛腦抽提液中發現了特征性的原纖維,這與羊群中出現的與綿羊癢病相關的原纖維相似。這一重要的病理組織學特征,證實 BSE 是一種類綿羊癢病的疾病。

1.3.4 診斷 因為沒有可檢測出的免疫反應,用免疫學或血清學試驗無法診斷 BSE 病牛。到目前為止,還未發現同 BSE 因子感染相一致的特征性生化異常或肉眼病變。用電化學方法檢測尿樣的價值還有待考證。與綿羊癢病一樣,BSE 診斷主要依靠識別其臨床症狀和病理組織學方法檢查腦部病變進行死后確診。

已有大量研究評價 BSE 的組織學診斷法,即從第四腦室尾側(中央管從這裡起始)常規採取門腦髓作切片檢查,在此部位能看到三叉神經的單束神經核和棘束神經核。以這兩種神經核的空泡變化,即主要是神經纖維網的海綿狀變化為依據,能鑒定被臨床診斷為 BSE 病牛的 99.6%。雖然空泡有時在健康牛的神經元核周體尤其是紅核中也能看到,而易被錯誤地認為是 BSE 因子的病理損傷,但是它沒有神經元變性損傷。有時在組織發育等某些條件形成的人造空腔,也極易與 BSE 因子損傷引起的病理變化混淆,但這主要影響蛋白質。

臨床印象診斷或不能確診的組織學診斷可以通過電鏡觀察綿羊癢病相關的原纖維(SAF),或通過免疫化學或免疫細胞化學方法檢測抗蛋白酶 K 的朊病毒蛋白予以確診。SAF 及其與朊病毒蛋白的關係已有描述。簡要地說,PrP^{Sc}(PrP-Scrapie)是正常細胞 PrP(或 PrP^C)經修飾后具有抗蛋白酶活性的一種蛋白質。PrP^{Sc}的這種抗蛋白酶活性使其能和 PrP^C 區分開。海綿狀腦炎感染動物的腦組織用去污劑和蛋白酶處理后,其抽提物中的凝集 PrP^{Sc}與 SAF 具有同樣的診斷價值。

檢查 BSE 病牛的腦干時常能檢出 SAF。這種方法與組織學檢查相比有一個優點,即從部分自溶的腦組織中也能檢測出陽性。不過,SAF 只能從新鮮的或冰凍的病料中提取,而不能從已固定的腦組織中提取。

用抗 PrP 抗體通過免疫化學方法或免疫組織化學方法都能證實 PrP^{Sc}的存在。前者亦可用未經固定的組織進行聚丙烯酰胺凝膠電泳,然后作免疫轉印。后者需要組織切片,尤其是腦干切片。使用一種特殊的固定液,如 PLP(高碘酸-賴氨酸-多聚甲醛)經高壓蒸汽處理或微波爐加熱能增強信號,這與綿羊癢病診斷方法一樣。通過這種方法也能檢查福爾馬林固定的感染腦組織。在這種情況下固定的材料只有幾天時間,能得到較好的結果,至少對綿羊癢病來說是這樣。

1.3.5 臨床前診斷的前景 由于感染牛缺乏可測出的免疫反應,到目前為止在臨床症狀開始出現前診斷此病還不可能。因此,尋找一種實用的臨床前診斷方法是一個優先的研究課