

畜禽流行病防治丛书

CHUQIN LIUXINGBING FANGZHI CONGSHU

疯牛病及动物 海绵状脑病防制

伏小平 编著



23
06



金盾出版社

JINDUN CHUBANSHE

FENGNUBING JI DONGWU HAIMIANZHUANG NAOBING FANGZHI

内 容 提 要

本书介绍了朊病毒和朊病毒病的基础知识和研究进展。全书共五章,第一章简要介绍了朊病毒和朊病毒病的现代概念、朊病毒假说的基本内容及研究进展、朊病毒病的疾病谱和分类、发病机制以及实验室诊断技术。第二章至第五章及附录介绍了现今已发现的各种动物朊病毒病,详尽介绍了疯牛病、痒病和人新型克—雅氏病等病的病原特性、流行病学、临床症状、病理变化、诊断以及防控措施。本书是一本专业技术著作,可供畜牧兽医专业科技工作者和农业院校有关专业师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

疯牛病及动物海绵状脑病防治/伏小平编著. —北京:金盾出版社,2003.6

(畜禽流行病防治丛书)

ISBN 7-5082-2386-1

I. 疯… II. 伏… III. 动物疾病-病毒, 朊病毒-防治
IV. S852.65

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 023241 号

金盾出版社出版、总发行

北京太平路 5 号(地铁万寿路站往南)

邮政编码:100036 电话:68214039 66882412

传真:68276683 电挂:0234

封面印刷:北京精彩雅恒印刷有限公司

正文印刷:北京燕南印刷厂

各地新华书店经销

开本:787×1092 1/32 印张:5.5 字数:121 千字

2003 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

印数:1—15000 册 定价:6.00 元

(凡购买金盾出版社的图书,如有缺页、
倒页、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

英国疯牛病(即牛海绵状脑病)的严重流行以及人新型克—雅氏病的出现,震惊了全球,也使朊病毒和朊病毒病成为全世界关注的热点。

虽然作为疯牛病原型的绵羊痒病已有 200 多年的历史,而疯牛病是 1985 年才在英国出现的一种朊病毒病。迄今除英国外,该病已传到欧洲、亚洲和美洲的十多个国家。1996 年,英国宣布人新型克—雅氏病可能是食用疯牛病病牛的肉制品所致,不仅在英国引起很大震动,而且引发了一场全球性的“疯牛病危机”。这不仅是因为它危害养牛业,造成严重的经济损失,更主要的是出于人类健康和公共卫生方面的考虑。世界各国投入大量人力和物力进行研究,取得了一系列重要成果,Prusiner 因此荣获 1997 年度诺贝尔医学奖。但除少数专家外,人们至今对此疾病的了解很少,甚至一无所知;而我国曾在英国进口的绵羊中检出痒病。在这一形势下,不仅兽医学和医学工作者深感需要深入学习这方面的知识,广大群众也希望对此有所了解,而且从兽医防制的实践角度看,普及这方面的知识也是必要的。

另一方面,疯牛病的病原——朊病毒是一种特殊的病原,它引出了一种全新的疾病发生机制,其研究成果不仅对防制朊病毒病有重要意义,而且对医学、兽医学乃至整个生物学也具有深远影响。了解这方面的知识,或许对自己的专业工作有所帮助。

必须指出的是,疯牛病和朊病毒病的研究进展很快,同时

它又涉及兽医学、流行病学、病毒学、免疫学、病理学、生物化学和分子生物学等诸多学科,笔者不是这方面的专家,又受自身水平、条件、时间和精力限制,书中遗漏、不妥和错误之处在所难免,恳请同行和读者批评指正。

编著者

2003年5月

目 录

第一章 朊病毒和朊病毒病	(1)
第一节 朊病毒(Prion)	(1)
一、朊病毒的性质	(3)
二、朊病毒的化学组成	(5)
三、朊粒(PrP)基因	(7)
四、致病朊粒(PrP ^{Sc})的形成	(9)
五、朊病毒的增殖	(11)
六、关于朊病毒假说的要点	(12)
七、朊病毒学说中有待解决的问题	(15)
八、关于海绵状脑病病因学的其他假说	(15)
第二节 传染性海绵状脑病(TSEs)	(17)
一、传染性海绵状脑病的概念	(17)
二、传染性海绵状脑病简史	(18)
三、海绵状脑病的疾病谱和分类	(21)
四、传染性海绵状脑病的诊断	(23)
第三节 转基因技术在朊病毒研究中的应用	(30)
一、打破种属屏障	(30)
二、过度表达 PrP 基因	(32)
三、缺失 PrP 基因	(32)
四、格-斯综合征(GSS)转基因小鼠模型	(33)
第二章 疯牛病(BSE)	(35)
第一节 疯牛病的病原特性	(36)
一、牛 PrP 基因的特点	(36)
二、疯牛病朊病毒的抵抗力	(36)

三、疯牛病朊病毒的宿主范围和易感实验动物·····	(37)
四、疯牛病朊病毒似只有一个毒株·····	(39)
五、疯牛病病原因子在病牛体内的分布·····	(39)
第二节 疯牛病的流行病学 ·····	(40)
一、疯牛病的传染来源·····	(40)
二、促使英国发生和流行疯牛病的其他因素·····	(42)
三、疯牛病流行病学的主要特点·····	(44)
四、疯牛病的母源传播·····	(47)
五、人和其他家畜感染疯牛病的潜在危险·····	(48)
六、疯牛病的流行曲线·····	(48)
七、对疯牛病未来流行趋势的预测·····	(50)
八、其他国家发生疯牛病的情况·····	(51)
第三节 疯牛病的发病机制 ·····	(52)
第四节 疯牛病的临床症状 ·····	(53)
第五节 疯牛病的病理变化 ·····	(55)
第六节 疯牛病的诊断 ·····	(56)
一、疯牛病的死后诊断·····	(57)
二、疯牛病的生前诊断·····	(58)
三、疯牛病的鉴别诊断·····	(59)
第七节 疯牛病的防控措施 ·····	(59)
一、英国采取的防控措施·····	(59)
二、世界卫生组织专家会议对防治传染性海绵状脑病的建议·····	(61)
三、我国对疯牛病应采取的防控措施·····	(65)
第八节 疯牛病的消毒措施 ·····	(66)
一、病牛活动场所的消毒措施·····	(66)
二、实验室的消毒措施·····	(67)

第九节 疯牛病和人新型克—雅氏病的关系	(68)
一、新型克—雅氏病病原是一种新发现的朊病毒··	(68)
二、新型克—雅氏病和疯牛病可能是同一病原····	(68)
第三章 痒病(Scrapie)	(71)
第一节 痒病的病原特征	(72)
一、痒病病原的理化特性····	(72)
二、痒病病原的抵抗力····	(72)
三、痒病的易感实验动物····	(74)
四、痒病病原在病羊体内的分布····	(75)
五、痒病病原的多样性····	(75)
六、痒病病原的体外培养····	(84)
第二节 痒病的流行病学	(85)
一、痒病的地区分布····	(85)
二、痒病的传染来源和储存宿主····	(86)
三、痒病的潜伏期和发病年龄····	(87)
四、痒病的易感动物····	(87)
五、痒病的遗传因素····	(87)
六、痒病的传播方式····	(90)
第三节 痒病的发病机制	(91)
一、痒病的体组织发病机制····	(92)
二、痒病的中枢神经系统发病机制····	(94)
第四节 痒病的临床症状	(96)
一、病羊的临床症状····	(96)
二、痒病感染实验小鼠的症状····	(97)
第五节 痒病的病理变化	(98)
第六节 痒病的诊断	(99)
一、扁桃体活检····	(99)

二、脑脊髓液 14-3-3 蛋白检查	(99)
三、组织病理学检查	(100)
四、痒病相关纤维检查	(100)
五、动物试验	(100)
第七节 痒病的防制措施	(101)
第四章 传染性水貂脑病(TME)	(102)
第一节 传染性水貂脑病的病原特性	(102)
一、传染性水貂脑病病原的抵抗力	(102)
二、传染性水貂脑病的易感实验动物	(103)
三、传染性水貂脑病病原的变异	(104)
第二节 传染性水貂脑病的流行病学	(105)
一、传染性水貂脑病的传染来源和传播途径	(105)
二、传染性水貂脑病的潜伏期	(107)
三、传染性水貂脑病的流行特点	(107)
第三节 传染性水貂脑病的临床症状	(108)
第四节 传染性水貂脑病的病理变化	(108)
第五节 传染性水貂脑病的诊断	(110)
一、组织病理学检查	(110)
二、动物试验	(110)
第六节 传染性水貂脑病的防制措施	(110)
一、无痒病国家和地区的防制措施	(110)
二、引进水貂时的预防措施	(111)
三、引入水貂后的预防措施	(111)
四、不使用含有可疑肉骨粉(MBM)的饲料	(111)
五、防止浣熊和臭鼬进入貂场	(111)
第五章 其他动物的传染性海绵状脑病	(112)
第一节 猫海绵状脑病(FSE)	(113)

一、猫海绵状脑病的流行病学	(113)
二、猫海绵状脑病的临床症状	(113)
三、猫海绵状脑病的病理变化	(114)
四、猫海绵状脑病的诊断	(115)
五、猫海绵状脑病的防制措施	(115)
第二节 人工饲养野生动物的海绵状脑病(TSE)	
.....	(116)
一、野生动物海绵状脑病的流行病学	(116)
二、野生动物海绵状脑病的临床症状	(120)
三、野生动物海绵状脑病的病理变化	(121)
四、野生动物海绵状脑病的诊断	(121)
五、野生动物海绵状脑病的防制措施	(121)
第三节 欧洲盘羊的痒病.....	(122)
第四节 慢性消耗性疾病(CWD)	(123)
附录 人类海绵状脑病概述.....	(124)
第一节 库鲁病(Kuru)	(124)
一、库鲁病的病原	(125)
二、库鲁病的流行病学	(126)
三、库鲁病的临床症状	(128)
四、库鲁病的病理变化	(130)
五、库鲁病的诊断	(131)
第二节 克罗伊茨费尔德—雅各布氏病(CJD)	(131)
一、克—雅氏病的病原	(132)
二、克—雅氏病的流行病学	(133)
三、克—雅氏病的临床症状	(138)
四、克—雅氏病的病理变化	(140)
五、克—雅氏病的诊断	(144)

六、克—雅氏病的防制措施	(146)
第三节 格斯特曼—斯特劳斯纳综合征(GSS)	(146)
一、格—斯综合征的流行病学	(147)
二、格—斯综合征的临床症状	(147)
三、格—斯综合征的病理变化	(148)
四、格—斯综合征的诊断	(148)
第四节 致死性家族性失眠症(FFI)	(149)
一、致死性家族性失眠症的病原	(149)
二、致死性家族性失眠症的流行病学	(151)
三、致死性家族性失眠症的临床症状	(152)
四、致死性家族性失眠症的病理变化	(153)
五、致死性家族性失眠症的诊断	(154)
第五节 新型克罗伊茨费尔德—雅各布氏病(vCJD)	
.....	(155)
一、新型克—雅氏病的流行病学	(155)
二、新型克—雅氏病的临床症状	(157)
三、新型克—雅氏病的病理变化	(157)
四、新型克—雅氏病的诊断	(158)
五、疯牛病病原引起人新型克—雅氏病的可能性	
.....	(159)
六、新型克—雅氏病的防制措施	(162)
参考文献	(163)

第一章 朊病毒和朊病毒病

英国牛海绵状脑病 (Bovine spongiform encephalopathy, BSE) 也即疯牛病的严重流行以及人新型克—雅氏病 (Variant of Creutzfeldt-Jakob disease, vCJD) 的出现, 震惊了全球, 也使朊病毒和朊病毒病成为全世界关注的热点。朊病毒病 (Prion disease) 即传染性海绵状脑病 (Transmissible spongiform encephalopathies TSE), 是一类呈现神经组织病理损害的疾病。长期以来, 由于这类疾病的病因一直未明, 也曾有人提出过不少假说。直到 1982 年美国学者普努西纳 (S. B. prusiner) 提出“蛋白质传染性颗粒” (proteinaceous infectious particle) 病因学说, 也即朊病毒 (prion) 学说以来, 研究人员针对这种特殊致病因子 (不同于所有的传染病病原体, 如细菌、病毒、寄生虫等), 采取以绵羊痒病 (Scrapie) 为模型, 用绵羊、仓鼠、小鼠等作实验动物, 展开了多方面的研究, 取得了重要进展。尽管有诸多问题尚待解决, 但接受和认同“prion”学说的人不断增多, 普努西纳由于提出了一种全新的疾病机制理论以及在这一研究领域的杰出贡献, 荣获了 1997 年度的诺贝尔医学奖。

第一节 朊病毒 (prion)

1982 年, 美国学者普努西纳选用羊痒病为动物模型, 对朊病毒进行了系统研究。他把感染了羊痒病的实验动物 (主要是仓鼠、小鼠和绵羊), 取脑组织制成匀浆, 从脑匀浆中提取蛋

白质,提取到用现有手段测不出其中有核酸。将这种蛋白质稀释到 $1/1\,000$ 亿 (10^{-11}) 仍有一定的感染力。他认为这种提纯蛋白质就是羊痒病的病原,被称为 Prion,意为“蛋白质传染性颗粒”(proteinaceous infectious particle),率先提出了 Prion 的学说。

普努西纳提出 Prion 学说以后,译名五花八门,如 1985 年有学者译为蛋白侵染子或感染性蛋白;1989 年出版的《英中医学辞海》译为朊病毒。译为朊病毒易被人们误解为它是病毒的一种,但 Prion 不是病毒,既无 DNA,也无 RNA;译为蛋白侵染子或感染性蛋白也不够确切;1997 年有学者译为朊毒体,虽然既能说明与病毒的区别,也能反映 Prion 是一类全新的致病微生物,但译为朊毒体仍不确切;也不宜译为传染性蛋白质,因随着 Prion 研究的不断深入,发现正常动物体中就有这一类蛋白质。

1997 年,我国知名学者廖延雄通过对众多译名的比较,分析了 Prion 的含义:Pr 是蛋白质,i 是传染性,on 是语尾,意为粒子,而将其译为“朊粒”。认为当动物体中正常朊粒的结构异常时,就会成为致病朊粒,它能引起反刍动物、人类和猫科动物的神经系统疾病,对此统称为朊粒病。

正常细胞具有的朊粒用 PrP^c 表示。Pr 代表 Prion,P 代表 Protein, PrP 代表朊粒这种蛋白质,C 代表正常细胞 (Cellular) 具有的。正常朊粒也可用 PrP^{Sen} 表示,Sen 代表敏感 (Sensitive),因为正常朊粒对蛋白酶(包括蛋白酶 K 在内)敏感,易被其消化降解。

致病朊粒用 PrP^{Sc} 或 PrP^{res} 表示。Sc 是指 Scrapie(痒病)的前 2 个字母,因为致病朊粒最早是从痒病病羊中分离出的;而 res 是 resistant(有抵抗力的)的前 3 个字母,因为致病朊粒对

蛋白酶 K 的降解有一定的抵抗力。不同朊粒病的致病朊粒,除可用 PrP^{Sc} 表示外,还可用各自的病来表示。如 PrP^{Kuru} 是人类库鲁病的致病朊粒, PrP^{CJD} 是人类克—雅氏症的致病朊粒, PrP^{BSE} 是疯牛病的致病朊粒, PrP^{Sc} 是绵羊痒病的致病朊粒等。值得注意的是 PrP^{Sc} 在广义上既可泛指致病朊粒也可指任何一种朊粒病的致病朊粒;在狭义上,则仅指羊痒病的致病朊粒。至于 PrP^{Sc} 在文中是广义还是狭义,必须视文字内容而定。

这种译名比较恰当,既可与病毒区别,又包含了两种朊粒。

当然,在国家科技名词编译工作尚未确定译名前,仍用 *Prion* 及惯用译名——朊病毒,所引起的疾病惯称为朊病毒病。

一、朊病毒的性质

朊病毒既具有传统概念上的病毒的某些特性,又具有许多与传统概念上的病毒乃至所有病原微生物明显不同的异常特性。

1. 朊病毒与传统病毒的相同特性

(1) 能通过纳米(nm)孔径滤膜 朊病毒能通过 25~100nm 孔径的滤膜。

(2) 可测定感染滴度 朊病毒可用人工感染宿主动物试验来测定其感染滴度。

(3) 可在组织中增殖 朊病毒感染宿主后,先在脾脏和网状内皮系统等特定部位复制,然后侵入脑,在脑组织中可增殖到很高的滴度。

(4) 其感染性受遗传控制 某种宿主对朊病毒的易感性受遗传因素的控制。

(5) 不同的毒株有不同的宿主 生物学特性不同的朊病

毒毒株,其毒力、致病性和宿主范围可能不同。

(6)能在细胞培养物中增殖 朊病毒在细胞培养物中也能增殖,并具有细胞融合特性。

2. 朊病毒与传统病毒的不同特性

(1)不含有核酸 目前尚未证实朊病毒含有核酸(包括DNA和RNA)。

(2)发病的潜伏期长 动物感染后潜伏期很长,可达数月甚至数十年。

(3)引起病畜渐进致死性病程 动物感染后,引起宿主发生渐进性、致死性病程,产生局限于脑神经细胞的空泡变性、出现淀粉样蛋白斑块、神经元丧失、神经胶质和星状细胞增生等病理变化,不引起炎症反应。

(4)不形成包涵体 在宿主组织中不形成包涵体,不含非宿主蛋白,所含的蛋白质与宿主同源。

(5)不诱生干扰素 也不干扰其他病毒诱生干扰素,对干扰素不敏感。

(6)不产生免疫反应 不诱发宿主特异性免疫应答反应。

(7)对理化因子有高强抵抗力 对各种理化因素,如甲醛、戊二醛、 β -丙内酯、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、核酸酶的作用及高温处理、紫外线照射和射线(如 γ 射线)照射、超声波处理等,有很强的抵抗力。

可以看出,朊病毒的性质及其致病机制等特性都是很独特的。有的学者认为,在微生物学分类中,应该将朊病毒单独分成一类,而不能将其与类病毒一样归属于亚病毒。因为朊粒有正常的和致病的,朊病毒既能传染又能遗传,比通常的病毒更小,其分子量只有27~30kDa,为具有感染性的蛋白颗粒构成的一类微生物。

二、朊病毒的化学组成

自 1936 年发现痒病具有传染性以来,人们就力图分离、纯化痒病病原因子,以阐明其本质。随着生物化学技术和分子生物学技术的进步和应用,这方面的工作有了重大进展。

早期用差速离心技术,发现痒病病原因子是一种大分子物质,可被超速离心沉淀。稍后,先用温和的清洁剂促使脑组织匀浆溶解,然后再进行密度梯度离心,这样可使具有感染性的、电镜可见的某些大分子物质一起集中于某些组分内。继而进一步改进纯化方法,利用其抗蛋白酶 K 的特性,先用蛋白酶 K 除去敏感的组织蛋白,然后再进行超速离心和密度梯度离心。如此纯化获得的具有高度感染性的组分含有大分子的纤维和一种优势蛋白成分。这种大分子纤维即为痒病相关纤维(scrapie associated fibrils, SAF);而优势蛋白成分是一种抗蛋白酶 K 的蛋白质(protease-resistant protein, PrP),又称为朊病毒蛋白(prion protein, PnP)。

1. 痒病相关纤维(SAF)

痒病相关纤维有两种存在方式,即 I 型纤维和 II 型纤维。I 型纤维直径为 11~14nm,有两根直径 4~6nm 的原纤维互相呈螺旋盘绕而成,螺距为 40~80nm。II 型纤维直径为 29~34nm,有 4 根相同的原纤维组成,各根原纤维间间隙为 3~4nm,每 100~120nm 出现一狭窄区,狭窄处直径为 9~11nm。这种纤维具有如下特性:

①无论是自然感染动物还是实验感染痒病的动物,电镜检查其脑和脊髓抽提物均可观察到 SAF,而健康的对照动物为阴性。

②传统病毒(如 semliki 森林病毒 M 突变株、嗜神经逆转录病毒等)诱生的动物海绵状脑病的脑抽提物中无 SAF。

③皮下或腹腔感染痒病动物的脾脏和淋巴结中虽无病理改变,但其抽提物中可以检出 SAF,因为这些组织是痒病病原因子复制或从外周组织进入中枢神经系统的途径。

④被感染动物脑组织出现病变和发病之前,脑组织和脾脏抽提物中即存在 SAF,且出现 SAF 的时间与这些组织开始具有感染性的时间相吻合。

⑤SAF 纯化程度越高,抽提物的感染滴度越大。

⑥其他动物传染性海绵状脑病的脑抽提物中都已证实有 SAF 的存在。可见,痒病相关纤维是传染性海绵状脑病的致病因子,而不是病理改变的产物。

2. 抗蛋白酶蛋白

痒病脑组织与病料离心纯化过程中获得的与 SAF 同样具有感染性的优势蛋白质,经蛋白酶 K 消化后,其抗蛋白酶的核部分分子量为 27~30kDa,称为 PrP^{Sc}27~30。研究证明,PrP^{Sc}27~30 来源于分子量 33~35kDa 的较大的蛋白质,这种蛋白质习惯地称为 PrP^{Sc}或 PrP^{Sc}33~35。其特点是:

①PrP^{Sc}27~30 是纯化物中最丰富的一种大分子物质,其浓度和感染滴度呈正比。

②PrP^{Sc}27~30 在感染动物组织中出现的动态变化与组织感染性的动态变化相一致。PrP^{Sc}27~30 被水解、变性和选择性修饰的动力学也和感染性滴度降低的动力学相一致。

③以抗 PrP 抗体亲和层析柱纯化 PrP^{Sc},PrP^{Sc}感染性保留,而以抗 PrP 抗血清可中和 PrP^{Sc}的感染性。

④在细胞培养系统中,只在产生感染性细胞克隆中能检出 PrP^{Sc},而不产生感染性的细胞克隆则无 PrP^{Sc}。

综上所述,PrP^{Sc}是朊病毒病的主要成分,是人和动物传染性海绵状脑病(TSEs)特异的。

3. 正常朊粒与朊病毒感染组织朊粒的区别

用抗 PrP^{27~30} 抗体研究未经蛋白酶 K 处理的正常动物和痒病感染动物组织的抽提物,发现存在两种结构不同但分子量均为 33~35kDa 的蛋白质。正常动物脑组织及其他细胞中发现的这类蛋白质被称为 PrP^c 33~35,痒病感染组织中发现的蛋白质被称为 PrP^{Sc} 33~35。正常动物组织细胞中仅有 PrP^c 33~35,而痒病感染组织中则既有 PrP^c,又有 PrP^{Sc}。PrP 由宿主自身的基因编码,人和动物 PrP 基因的结构和其编码蛋白质的序列是高度保守的,并且具有较高的同源性,达 80% 以上。这种蛋白质互为异构体,氨基酸序列相同,但物理化学性质不同。PrP^c 33~35 在去污剂提取物中未发现有大分子纤维结构(SAF),对蛋白酶 K 高度敏感,可被完全消化。PrP^{Sc} 33~35 则含有大量聚合的大分子纤维,对蛋白酶 K 具有抗性,只被部分消化,移去其 N 末端 67 个氨基酸残基,产生 PrP^{Sc} 27~30,PrP^{Sc} 33~35 和 PrP^{Sc} 27~30 两者均具有感染性。朊病毒感染不产生特异性免疫反应,可能是由于 PrP^c 是宿主蛋白,因而产生了对 PrP^{Sc} 的免疫耐受性。

三、朊粒(PrP)基因

在纯化 PrP 和测定其部分氨基酸序列的基础上,构建核苷酸探针,用以从痒病感染仓鼠、小鼠脑组织建立的基因文库(DNA 文库)中选择 cDNA 克隆,再用这些 cDNA 克隆检查各种来源的 RNA。试验表明,正常动物的脑和其他组织中也检测出 PrPmRNA,在含大量传染因子的脑和其他组织中,这种 mRNA(信使核糖核酸)的量并不增加;基因组克隆发现 PrP 基因是单一拷贝基因,从而证明 PrP(PrP^{Sc})是由大多数细胞的一种正常的内源基因编码。