



中华人民共和国国家标准

GB/T 22910—2008

痒病诊断技术

Diagnostic techniques for scrapie

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准是参照 OIE《国际动物卫生法典》(2000 年版)及《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 年版),以及美国农业部动物病研究所和瑞士的 OIE 传染性海绵状脑病参考实验室的有关规程和技术资料,结合我国农业部动物检疫所的验证试验结果编制而成。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:王志亮、刘雨田、吴鑑三、吴晓东、于建敏、邹艳丽、王树双。

痒病诊断技术

1 范围

本标准规定了痒病临床诊断和实验室诊断的技术要求。

本标准适用于绵羊和山羊的痒病诊断。

2 临床诊断

痒病临床症状各种各样,病程短则几周,长则1年以上,终归死亡。患病母羊可发生流产。少数病例取急性经过,症状轻微,发病数日后突然死亡。病羊死后内脏常无肉眼可见的病变。当病羊出现以下全部或部分症状而又不能确定为其他疾病时,应怀疑痒病的可能:

——行为异常

病初症状不易觉察,表现为耐力下降,然后步态不稳并逐渐加重。时常欲饮水却饮得很少。此外,表现为焦躁不安、恐惧、精神错乱;呈攻击性或离群独处,呆立一旁,或摇头竖耳、凝视,或高抬腿跑步。初显症状3至4个月后,患羊感染加重而进一步消瘦,行为异常逐渐加剧。

——瘙痒

瘙痒是痒病的重要临床症状。表现为头顶、臀部和尾部开始擦痒,甚至强烈摩擦,啃咬或用后蹄搔抓身体痒感处,致使头顶、颜面、耳部、躯干体表和四肢皮肤脱毛、破损甚至撕脱。尤其胸部、肋部和后肢被毛广泛脱落。人为摩擦病羊尻部脊梁可诱导啃咬反应,或反射性伸颈摇头,咬唇和舌头运动。

——感觉或反应过敏

患羊反应过敏,对声音敏感,易受惊。有的病例的随意肌,特别是头、颈、肋腹和股部,呈现肌肉震颤,因人接近而兴奋使震颤加重,安静时则震颤变轻。

——运动失调

运动失调首先表现在转弯僵硬,后肢落地困难。随后,病羊蹒跚或倒地不起。

——体重和体况

患羊的体重和体况明显下降,并随着病程的发展而进一步恶化,最后消瘦而死亡。

3 实验室诊断

3.1 组织病理学检查

3.1.1 采样

临床症状可疑的痒病病羊经注射麻醉药物致死,按剖检术式取出全脑,包括大脑和完整脑干。

3.1.2 固定

将全脑和脑干直接放入10倍~20倍脑体积的10%中性福尔马林溶液中渗透固定5d,换液后再维持一周。固定液配法见附录A。

3.1.3 组织切片制作

3.1.3.1 组织切块

把脑组织横切3mm~5mm厚的组织块,选取以下部位组织作进一步处理:脑尾侧处延髓(闭合部与开张部),脑干的桥脑、中脑、丘脑及大脑纹状体,以上5块供检测用,保存其他部位备用。先切延髓,再切脑干。用新配制的固定液再固定一周,其间更换固定液3次。

3.1.3.2 甲酸处理组织块

将固定的组织块放入流水中漂洗24h后,移入95%~98%甲酸中作用2h,水洗2遍,每遍10min,

然后再移入新配制的福尔马林溶液中保存至少 24 h。

3.1.3.3 脱甲醛

将组织块放入流水中漂洗 24 h 以上。

3.1.3.4 脱水

依次在以下梯度酒精中分别脱水：

- a) 75%酒精中 3 h；
- b) 85%酒精中 3 h；
- c) 95%酒精 I 中 3 h；
- d) 95%酒精 II 中 3 h；
- e) 100%酒精 I 中 3 h；
- f) 100%酒精 II 中 2 h。

3.1.3.5 透明

依次在以下试剂中透明：

- a) 二甲苯 I 中 20 min；
- b) 二甲苯 II 中 20 min。

3.1.3.6 浸蜡

依次在以下试剂中浸蜡：

- a) 软蜡 40 min；
- b) 硬蜡 I (熔点 57℃~58℃) 1 h；
- c) 硬蜡 II (熔点 57℃~58℃) 1 h。

3.1.3.7 包埋

将浸过蜡的组织块放入包埋框内用熔化的新硬蜡(熔点 57℃~58℃)包埋，切面朝下放平。放冷后过夜修切成形。

3.1.3.8 切片

将石蜡组织块切成 5 μm 厚的组织薄片。每块组织连续切片 3 片~10 片，切片碎屑和废弃组织经 134℃~138℃ 高压蒸汽消毒 15 min 方能废弃或者直接焚烧处理。组织薄片用干净的粘附剂预处理过的载玻片贴片，也可用特殊处理的进口玻片贴片。

3.1.3.9 烤片

贴好组织薄片的载玻片先在自然条件下晾干，然后放入 45℃~50℃ 的恒温箱或烤箱中烘干 4 h 以上。

3.1.3.10 脱蜡和脱二甲苯

依次在二甲苯和梯度酒精中脱蜡去二甲苯：

- a) 二甲苯 I 10 min；
- b) 二甲苯 II 10 min；
- c) 100%酒精 I 2 min；
- d) 100%酒精 II 2 min；
- e) 95%酒精 I 2 min；
- f) 95%酒精 II 2 min；
- g) 85%酒精 2 min；
- h) 75%酒精 2 min；
- i) 自来水洗 2 min。

3.1.4 苏木素(H·E)染色

有关试剂配制见附录 B。

依次按以下程序染色：

- a) 苏木素染液 15 min；
- b) 自来水漂洗 2 min；
- c) 1%盐酸酒精 10 s；
- d) 自来水漂洗 5 min；
- e) 饱和碳酸锂水溶液 30 s；
- f) 自来水漂洗 10 min；
- g) 75%酒精 2 min；
- h) 85%酒精 2 min；
- i) 95%酒精伊红液 1 min。

3.1.5 脱水、透明

依次处理的程序如下：

- a) 95%酒精 2 min；
- b) 100%酒精 I 2 min；
- c) 100%酒精 II 2 min；
- d) 二甲苯 I 2 min；
- e) 二甲苯 II 2 min。

3.1.6 封片

以适量中性树胶封片，置 38℃ 温箱干燥或自然干燥。

3.1.7 贴签

用适当大小的不干胶签贴在载玻片的磨砂端，然后用铅笔或圆珠笔将切片的编号、名称、实验时间等记录在不干胶上。

3.1.8 镜检及判定

3.1.8.1 镜检观察

在光学显微镜下观察切片，倍数分别为 10×10 、 10×20 和 10×40 。

3.1.8.2 阳性结果

灰质区神经细胞或神经纤维网浆中出现空泡变性。神经细胞胞呈规则的圆形或卵圆形，空泡内不着色或被伊红淡染，界限明显，胞核被挤压于一侧，甚至消失；有的神经细胞被单个或多个特异性空泡胀大，成为“气球样”空泡性神经细胞。特别容易出现病变的部位有延髓的迷走神经背核、舌下神经核、橄榄核、网状结构，桥脑的桥核、网状结构，中脑的红核、被盖核和丘脑内诸核等处。这些部位的神经细胞出现特异的大空泡以及丘脑、大脑纹状体空泡病变，且呈双侧对称性分布。在正常情况下，动眼神经核和红核处也可能有少量空泡出现，但不呈双侧对称，应注意区别。

3.1.8.3 阴性结果

灰质区无特征性空泡变性。

3.1.8.4 确诊

组织病理学检查只是痒病确诊的辅助方法，进行确诊时还应结合免疫组织化学方法或其他免疫学方法来进一步诊断。

3.2 免疫组织化学法检查

3.2.1 试剂配制

见附录 C。

3.2.2 采样

3.2.2.1 脑组织采样同 3.1.1。

3.2.2.2 活体采集第三眼睑淋巴组织的方法如下：在被检羊眼角滴加 2% 盐酸利多卡因局部麻醉后，

用消毒的眼科器械翻转并固定第三眼睑,采集粘膜表层淋巴组织。

3.2.3 固定

将剖检取出的全脑或活体采集的淋巴组织,直接放入10倍~20倍组织体积的10%中性福尔马林溶液中渗透固定5d,换液后再维持一周。固定液配法见附录A。

3.2.4 操作方法

3.2.4.1 每次免疫组织化学检查,都要设置阳性和阴性痒病组织切片作为免疫组织化学检测对照用。

3.2.4.2 组织切片制作法同3.1.3。

3.2.4.3 自水中取出经脱蜡、去二甲苯的切片,在磷酸盐缓冲液(PBS)中洗3次,每次5min。

3.2.4.4 甲酸(98%)作用5min,然后在PBS中洗3次,每次2min(系处理高度感染组织特别需要的)。

3.2.4.5 将蛋白酶缓冲液水浴加温至37℃,按5μg/mL加入蛋白酶K,立即放入切片确保切片全部浸入,消化15min。

3.2.4.6 在一个不锈钢饭盒中倒入刚煮沸的蒸馏水,并立即将切片放入盒中确保切片完全浸入水中,盖好盒盖,在121℃高压(约103kPa)处理20min,自然冷却至60℃以下取出。

3.2.4.7 在PBS中洗3次,每次5min。

3.2.4.8 将切片完全浸入3%双氧水甲醇溶液中室温处理5min。

3.2.4.9 在PBS中洗3次,每次5min。

3.2.4.10 在切片的组织上滴满5%正常猪血清,置湿盒中室温作用20min。

3.2.4.11 弃去正常猪血清,用吸水纸吸干组织切片四周的液体。

3.2.4.12 将抗PrP^{Sc}核心片段单克隆抗体(有商品)稀释为5μg/mL,滴加在组织切片上,确保组织完全覆盖,湿盒中37℃作用4h,或者在2℃~8℃下作用过夜。

3.2.4.13 在PBS中洗3次,每次5min。

3.2.4.14 洗完后用吸水纸吸干组织切片四周的液体,然后在组织切片上滴加适量工作浓度的生物素标记的抗鼠抗体(有商品),确保组织完全覆盖,湿盒中室温作用10min。

3.2.4.15 在PBS中洗3次,每次5min。

3.2.4.16 洗完后用吸水纸吸干组织切片四周的液体,然后在组织切片上滴加适量工作浓度的亲和素辣根过氧化物酶结合物(有商品),确保组织完全覆盖,湿盒中室温作用10min。

3.2.4.17 在PBS中洗3次,每次5min。

3.2.4.18 在蒸馏水中放置2min。

3.2.4.19 洗完后用吸水纸吸干组织切片四周的液体,然后在组织切片上滴加适量工作浓度的AEC(3-氨基-9-乙基咪唑)底物显色液(有商品),确保组织完全覆盖,湿盒中室温作用5min~10min。

3.2.4.20 用Mayer氏苏木素液复染脑组织1min,淋巴组织30s。

3.2.4.21 在蒸馏水中放置2min。

3.2.4.22 专用封片剂封片。

3.2.5 结果判定

在光学显微镜下(倍数为10×10、10×20和10×40)观察切片,结果判定如下:

- a) 阳性结果:在阳性和阴性对照片染色结果正确的条件下,若组织切片灰质区(特别是脑门部的迷走神经背核、孤束核等处)或淋巴组织的生化中心出现特异性铁锈红色染色颗粒,则将该样品判为痒病阳性;
- b) 阴性结果:若组织切片灰质区(特别是脑门部的迷走神经背核、孤束核等处)或淋巴组织的生化中心未见特异性铁锈红色染色颗粒,则将该样品判为痒病阴性。

附 录 A
(规范性附录)

10%中性福尔马林固定液的配制

10%中性福尔马林固定液的配制:

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	900 mL
40%甲醛	100 mL

把以上材料混匀溶解即可使用。

附 录 B

(规范性附录)

组织病理学检查(H·E染色)试剂配制

B.1 苏木素染色液

B.1.1 配方

苏木精	1.0 g
无水乙醇	10 mL
蒸馏水	200 mL
氧化汞	0.5 g
冰乙酸	8 mL
钾明矾	20.0 g

B.1.2 配法

先将苏木精溶于无水乙醇,然后将钾明矾和蒸馏水煮沸溶化,去火并迅速加入苏木精无水乙醇溶液中,立即加入氧化汞并煮沸,迅速冷却后加入冰乙酸,过滤后使用。

B.2 1%盐酸酒精

在100 mL的70%或80%酒精中加入0.5 mL或1 mL的浓盐酸。

B.3 碳酸锂饱和水溶液

在100 mL的70%或80%酒精中加入0.5 mL或1 mL的浓盐酸。

B.4 碳酸锂饱和水溶液

碳酸锂2 g加100 mL蒸馏水,充分溶解。

B.5 95%酒精伊红溶液

伊红0.5 g加入100 mL 95%酒精中溶化。

附 录 C

(规范性附录)

免疫组织化学检查的试剂配制

C.1 蛋白酶 K 缓冲溶液

C.1.1 配方

Tris/HCl(1 mol/L,pH8.0)	2.5 mL
CaCl ₂ (0.1 mol/L)	0.75 mL
加蒸馏水至	50 mL

C.1.2 配法

用前加蛋白酶 K(14.7 mg/mL)17 μL 使终浓度达 5 μg/mL。

C.2 3%双氧水-甲醇(使用前 5 min 配制)

甲醇	50 mL
H ₂ O ₂ (30%)	1.5 mL

C.3 10×0.1 mol/L PBS(pH7.4)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

加水 800 mL 溶解,调 pH 到 7.4,加水至 1 L。使用时作 10 倍稀释。

C.4 5%正常猪血清(NSS)

0.1 mol/L PBS (pH7.4)	4 mL
NSS	200 μL

C.5 Mayer 氏苏木素液

C.5.1 配方

苏木精	1 g
钾明矾	50 g
碘酸钠	0.2 g
水合氯醛	50 g
枸橼酸	1 g
蒸馏水	1 000 mL

C.5.2 配法

将苏木精、钾明矾及碘酸钠依次加入水中,略加热并搅拌,待全部溶解后过夜。再加入水合氯醛及枸橼酸并加热煮沸 5 min。冷却后过滤备用。如不急用可以不煮沸而在室温下待其成熟后使用,染液可以贮存较长时间。