



中华人民共和国国家标准

GB/T 19180—2003

牛海绵状脑病诊断技术

Diagnostic techniques for bovine spongiform encephalopathy

2003-06-04 发布

2003-12-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

牛海绵状脑病是动物传染性海绵状脑病的一种,对动物和人有着持久性危害并最终致死,世界动物卫生组织(OIE)将之列为B类动物疫病,我国将其定为一类动物疫病。

本标准是依照OIE的《诊断试验和疫苗标准手册》(2000年版)(《Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines》2000)第2.3.13章关于牛海绵状脑病的诊断技术规定制定的。本标准与该文件的差异是:

- 本标准中除症状描述(临床诊断)外,采用该文件规定的两项主要技术即组织病理学诊断和免疫组织化学诊断技术,其他推荐技术未采用;
- 由于该《手册》对上述两项技术的具体操作程序未作规定,本标准采用了OIE传染性海绵状脑病瑞士参考实验室(OIE TSE Reference Laboratory, Institute of Animal Neurology, University of Bern, Switzerland)的操作程序;
- 本标准在文字表述上按照GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则》规定和汉语习惯编写。

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。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:王志亮、刘雨田、邹艳丽、王树双。

牛海绵状脑病诊断技术

1 范围

本标准规定了诊断牛海绵状脑病(BSE)的技术要求。

本标准适用于牛海绵状脑病的诊断;也可用于其他动物的传染性海绵状脑病(TSE)的诊断。

2 临床诊断

BSE病牛临床症状各种各样,病程多为数月至一年,最终死亡。当病牛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BSE的可能。

2.1 行为异常

表现为不安、恐惧、异常震惊或抑郁;不愿接触水泥地面或进入畜栏等。

2.2 感觉或反应过敏

表现为触、视、听三觉过敏。对颈部触觉、光线的变化以及耳部声响过度敏感,这是BSE病牛重要的临床表现。

2.3 运动异常

病牛步态呈“鹅步”状,共济失调,四肢僵硬,不能持久站立。

2.4 体重和体况

体重和体况下降。

其他动物的TSE临床症状不尽相同,但确诊应依靠实验室诊断。

3 实验室诊断

发现可疑病例后,应立即进行采样,送专门实验室检测。

3.1 采样

将牛头固定,用电锯从前额两牛角根部的枕骨大孔背侧缘方向锯开,使脑部暴露。用剪刀剪开脑膜并切断所有与脑部相连的神经和血管,取出脑组织。大规模监测时,可用专用工具从枕骨大孔处,取出延脑部分即可。

3.2 固定

将完整的脑组织浸入10倍体积的固定液中固定。一周后更换固定液,再维持一周。

3.3 组织病理学诊断

3.3.1 病料处理

3.3.1.1 把固定好的脑组织取出,将大脑和小脑去除,横切脑干选取厚度为3 mm~5 mm的脑干部延髓、小脑后脚部延髓和前丘部中脑组织块。

3.3.1.2 将选取好的组织块放入新配的固定液中再固定一周,其间更换固定液三次,并用水平摇床不断摇荡,以提高固定液的渗透力。

3.3.1.3 将固定好的组织块放入流水中漂洗24 h。

3.3.1.4 放入下列不同浓度的酒精中脱水:

- a) 75%酒精中2 h;
- b) 85%酒精中2 h;
- c) 95%酒精中2 h;

- d) 95%酒精Ⅱ中 2 h;
- e) 100%酒精Ⅰ中 2 h;
- f) 100%酒精Ⅱ中 2 h。

3.3.1.5 放入下列香柏油和二甲苯中透明:

- a) 香柏油中 12 h;
- b) 二甲苯Ⅰ中 1 h;
- c) 二甲苯Ⅱ中 1 h。

3.3.1.6 按下述方法浸蜡:

- a) 软蜡中 10 min;
- b) 硬蜡中 2 h。

3.3.1.7 将浸好蜡的组织块放入包埋框中用硬蜡包埋,冷却过夜。

3.3.1.8 将石蜡块切成 5 μm 厚的切片,用干净的载玻片贴片。

3.3.1.9 烤片 24 h 以上。

3.3.2 H-E 染色

3.3.2.1 试剂配制:见附录 B。

3.3.2.2 操作步骤如下:

- a) 二甲苯Ⅰ中 10 min;
- b) 二甲苯Ⅱ中 10 min;
- c) 100%酒精Ⅰ中 2 min;
- d) 100%酒精Ⅱ中 2 min;
- e) 95%酒精Ⅰ中 2 min;
- f) 95%酒精Ⅱ中 2 min;
- g) 85%酒精中 2 min;
- h) 75%酒精中 2 min;
- i) 自来水洗 2 min;
- j) 哈里斯酸性苏木精 12 min;
- k) 自来水漂洗 2 min;
- l) 酸性酒精 10 s;
- m) 自来水漂洗 5 min;
- n) 饱和碳酸锂蓝染 30 s;
- o) 自来水漂洗 10 min;
- p) 75%酒精中 2 min;
- q) 85%酒精中 2 min;
- r) 95%酒精伊红液中复染 1 min;
- s) 95%酒精中 2 min;
- t) 100%酒精Ⅰ中 2 min;
- u) 100%酒精Ⅱ中 2 min;
- v) 二甲苯Ⅰ中 2 min;
- w) 二甲苯Ⅱ中 2 min。

3.3.3 用中性树脂封片

3.3.4 结果观察

在光学显微镜下(10 \times 10,10 \times 40)观察切片,若被检样品脑干灰质区特别是脑干部位的孤束核、迷走神经背核、三叉神经脊束核等处的神经元核周质或神经纤维网胞浆中出现双侧对称性海绵状空泡病

变,且空泡呈规则的圆形或椭圆形,周边整齐,则可判定为 BSE 感染。在正常情况下,动眼神经核和红核处的核周质也可能有少量空泡出现,但不呈双侧对称,应注意区别。

若在脑干灰质区未发现双侧对称性海绵状空泡病变,则用免疫组织化学方法做进一步诊断。

3.4 免疫组织化学诊断

3.4.1 固定病料的处理

同 3.3.1。

3.4.2 试剂配制

见附录 C。

3.4.3 操作方法

3.4.3.1 同 3.3.2.2 a)~i)。

3.4.3.2 PBS 洗三次,每次 5 min。

3.4.3.3 将蛋白酶 K 缓冲液水浴至 37℃,加入蛋白酶 K,并立即将切片放入,确保切片全部浸入,消化 15 min。

3.4.3.4 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℃(约 103 kPa)条件下高压蒸汽处理 20 min,然后自然冷却。

3.4.3.5 PBS 洗三次,每次 5 min。

3.4.3.6 甲醇-双氧水中室温处理 5 min。

3.4.3.7 PBS 洗三次,每次 5 min。

3.4.3.8 洗完后用吸水纸吸干组织块四周的液体,然后在组织切片上滴加 5% 的正常猪血清,确保组织全部覆盖,放入湿盒中室温作用 20 min。

3.4.3.9 将切片放入 1:800 稀释的兔抗牛 PrP 抗体溶液中,确保切片完全浸入,37℃ 作用 4 h。也可用 1:1000 的兔抗牛 PrP 抗体溶液 37℃ 过夜处理。

3.4.3.10 PBS 洗三次,每次 5 min。

3.4.3.11 洗完后用吸水纸吸干组织块四周的液体,然后在组织切片上滴加 DAKO 试剂盒(见第 C.6 章)中 Bottle A 的溶液,确保组织全部覆盖,放入湿盒中室温作用 10 min。

3.4.3.12 PBS 洗三次,每次 5 min。

3.4.3.13 洗完后用吸水纸吸干组织块四周的液体,然后在组织切片上滴加 DAKO 试剂盒中 Bottle B 的溶液,确保组织全部覆盖,放入湿盒中室温作用 10 min。

3.4.3.14 PBS 洗三次,每次 5 min。

3.4.3.15 将切片在蒸馏水中放 1 min~2 min。

3.4.3.16 洗完后用吸水纸吸干组织块四周的液体,然后在组织切片上滴加 DAKO 试剂盒中 Bottle C 的溶液,确保组织全部覆盖,放入湿盒中室温作用 5 min~10 min。

3.4.3.17 将切片在蒸馏水中放 1 min~2 min。

3.4.3.18 以专用封片剂封片。

3.4.4 结果判定

在光学显微镜下(10×10,10×40)观察切片,结果判定如下:

- a) 阳性结果:在阳性对照切片染色结果正确的条件下,若被检样品脑干灰质区特别是脑门部位的迷走神经背核、孤束核和三叉神经脊束核等处出现双侧对称性紫红色染色颗粒,则该样品判定为 BSE 阳性。
- b) 阴性结果:若被检样品脑干灰质区未出现紫红色染色颗粒,则判为 BSE 阴性。

附录 A
(规范性附录)
固定液

10%福尔马林生理盐水固定液的配制

氯化钠 8.5 g
蒸馏水 900 mL
40%福尔马林 100 mL
混匀即可。



B.1 哈里斯酸性苏木精染色液

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,快速加入苏木精无水乙醇溶液中,再去火,立即加入氧化汞煮沸,迅速冷却后加入冰乙酸,过滤使用。

B.2 酸性酒精

在 100 mL 的 70% 或 80% 酒精中加入 0.5 g 冰醋酸。

B.3 碳酸锂饱和水溶液

碳酸锂 2 g 加 100 mL 蒸馏水,充分溶解。

B.4 95%酒精伊红液

伊红 0.5 g 加入 100 mL 95% 酒精中配制。

附 录 C
(规范性附录)
免疫组织化学诊断的试剂配制

C.1 蛋白酶 K 缓冲溶液

C.1.1 配方

1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)	2.5 mL
0.1 mol/L CaCl ₂	0.75 mL
蒸馏水	47 μL

C.1.2 配法

先将 Tris-HCl、CaCl₂ 和蒸馏水混匀。用前在 37℃ 水浴中加入蛋白酶 K(17 μL)。

C.2 甲醇-双氧水(使用前 1 min 配)

甲醇	1 mL
H ₂ O ₂ (30%)	10 μL

C.3 0.1 mol/L PBS(pH7.4)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	0.14 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
加水 800 mL 溶解,调 pH 至 7.4,加水至 1 000 mL	

C.4 5% 正常猪血清(NSS)

0.1PBS(pH7.4)	20 mL
NSS	2 mL

C.5 兔抗牛 PrP 抗体(或 PrP 单克隆抗体)

1 : 800 的稀释溶液(或 PrP 单克隆抗体)	
PBS(pH7.4)	50 mL
兔抗牛 PrP 抗体	62.5 μL
1 : 1000 的稀释溶液(或 PrP 单克隆抗体)	
PBS(pH7.4)	50 mL
兔抗牛 PrP 抗体	50 μL

C.6 DAKO ChemMate™ Detection Kit/AEC

BottleA:生物素标记的抗鼠和抗兔免疫球蛋白
BottleB:亲和素辣根过氧化物酶结合物
BottleC:AEC/H₂O₂ 底物溶液

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
牛 海 绵 状 脑 病 诊 断 技 术
GB/T 19180—2003

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 14 千字
2003年11月第一版 2003年11月第一次印刷
印数 1—1 000

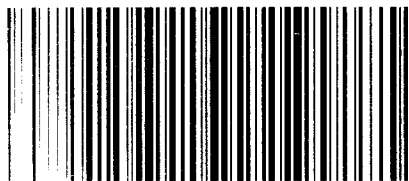
*

书号: 155066·1-19980 定价 10.00 元

网址 www.bzchs.com

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 19180-2003