



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 19180—2020  
代替 GB/T 19180—2003

---

## 牛海绵状脑病诊断技术

Diagnostic techniques for bovine spongiform encephalopathy

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

---

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 19180—2003《牛海绵状脑病诊断技术》。本标准与 GB/T 19180—2003 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增补了 H·E 组织病理染色法、免疫组织化学方法和免疫印迹方法的适用范围，删除了“也可用于其他动物的传染性海绵状脑病的诊断”（见第 1 章）；
- 优化了临床症状的描述（见 4.3）；
- 优化了 H·E 组织病理染色法操作步骤（见 5.1）和免疫组织化学方法操作步骤（见 5.2）；
- 增补了免疫印迹方法（见 5.3）。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(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。

## 引 言

**牛海绵状脑病(Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)**是由朊病毒引起的牛的一种慢性致死性神经性疾病，对动物和人构成较大危害。世界动物卫生组织(OIE)将其列为严重影响国际贸易的动物疫病之一，我国将其归为一类动物疫病。我国现行《牛海绵状脑病诊断技术》(GB/T 19180—2003)系2003年6月4日由原国家质量监督检验检疫总局发布，2003年12月1日起实施。该标准仅包括临床症状、组织病理学、免疫组织化学等三种诊断方法，未包括OIE陆生动物手册指定的另一种确诊方法即免疫印迹。免疫印迹方法比免疫组织化学方法更灵敏，特异性更好。因此，免疫印迹方法是牛海绵状脑病诊断技术中一种更好的确诊方法，它能更好地服务于我国疯牛病的监测工作。

BSE分为典型BSE和非典型BSE。典型BSE是由于牛采食污染牛羊朊病毒的肉骨粉或者饲料而引起，非典型BSE为自然发生的一种散发性BSE。自然条件下，BSE经由消化道传播，未发现水平和垂直传播的证据。典型BSE的潜伏期一般为2年~8年，平均为4年~5年，多发于4~6岁的牛，2岁以下罕见，6岁以上明显减少。根据病原的分子量大小，非典型BSE又分为H型和L型。非典型BSE的平均发病年龄为11岁。BSE病程多为数月至一年，最终死亡。

大多数BSE病牛无典型临床症状，因此BSE的诊断应通过实验室检测来实现。BSE的病原是动物机体内朊蛋白的异构体，在病牛血清里检测不到BSE朊病毒抗体，所以血清学检测方法对于BSE来说是无意义的。目前，实验室诊断方法多以检测BSE病原为目的，包括免疫组织化学方法、免疫印迹方法、ELISA方法等，其中免疫组织化学方法和免疫印迹方法是OIE手册规定的BSE确诊方法。BSE病牛的中枢神经被朊病毒侵害会出现海绵状空泡变性，在中枢神经保存良好且未发生自溶的情况下，应用H·E组织病理染色法可以观察到这些病变情况。OIE手册规定H·E组织病理染色法是确诊BSE的辅助方法，在使用免疫组织化学方法诊断BSE时应同时使用H·E组织病理染色法予以辅助确诊；在使用免疫印迹方法诊断BSE时，如果样品适合进行H·E组织病理染色，那么也应同时使用H·E组织病理染色法予以辅助确诊。

# 牛海绵状脑病诊断技术

## 1 范围

本标准规定了 BSE 诊断的临床诊断、实验室诊断及综合判定技术要求。

本标准适用于 BSE 的诊断，其中临床诊断适用于 BSE 的监测和流行病学调查，H·E 组织病理染色法适用于 BSE 中枢神经系统的病理诊断，免疫组织化学方法和免疫印迹方法适用于 BSE 的病原学诊断。

## 2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSE：牛海绵状脑病(Bovine Spongiform Encephalopathy)

H·E：苏木精伊红(Hematoxylin and eosin)

HRP：辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

PBS：磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution)

PK 酶：蛋白酶 K (Proteinase K)

PVDF：聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride)

SDS：十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

TBST：等参缓冲液(Tris-HCl buffered solution with Tween)

## 3 临床诊断

### 3.1 易感动物

牛科和猫科动物，包括各种牛、各种羊和各种猫科动物。

### 3.2 临床症状

#### 3.2.1 行为异常

表现为不安、恐惧、异常震惊或沉郁；不自主运动，如磨牙、震颤；不愿经过有缝隙的地面或进入畜栏等。

#### 3.2.2 感觉或反应过敏

表现为视、听、触三觉过于敏感。对光线的明暗变化、外部声响以及颈部触摸过度敏感，这是 BSE 病牛的特征性临床表现。

### 3.2.3 运动异常

病牛步态呈“鹅步”状，共济失调，四肢伸展过度，有时倒地，难以站立。

### 3.2.4 体重和体况下降

病牛的体重和体况下降，表现出异常消瘦，体质虚弱。

### 3.3 病理变化

剖检无明显病变。

### 3.4 结果判定

易感动物出现上述临床症状，又不能确定为其他疾病时，可判定为疑似 BSE。  
确诊应采集易感动物的脑组织进行实验室诊断。

## 4 实验室诊断

### 4.1 H·E组织病理染色法

#### 4.1.1 实验室生物安全要求

实验操作应在生物安全 II 级以上的实验室进行。涉及有毒挥发性试剂的操作应在通风橱中进行，如甲醛、甲酸、二甲苯、氯仿等。

#### 4.1.2 仪器设备

显微镜、切片机、电锯/钢锯、骨钳、眼科剪、直开镊(长约 25 cm)、手术刀、切片刀、烤箱、脱水筐、染色缸、包埋模具、载玻片、盖玻片、玻璃棒、染色架、量筒(量程分别为 100 mL、1 000 mL、5 000 mL)、通风橱。

#### 4.1.3 试剂

4.1.3.1 蒸馏水。

4.1.3.2 10% 中性福尔马林固定液(见附录 A 中 A.1)。

4.1.3.3 无水乙醇。

4.1.3.4 二甲苯。

4.1.3.5 氯仿。

4.1.3.6 软蜡(熔点 56 °C)。

4.1.3.7 硬蜡(熔点 60 °C)。

4.1.3.8 苏木素染液(H·E染液, 见 A.2)。

4.1.3.9 1%盐酸酒精(见 A.3)。

4.1.3.10 饱和碳酸锂水溶液(见 A.4)。

4.1.3.11 95%酒精伊红溶液(见 A.5)。

4.1.3.12 中性树脂。

4.1.3.13 无机试剂原料均为分析纯。

#### 4.1.4 采样

将牛头固定，用电锯从前额两牛角根部向枕骨大孔背侧缘方向锯开，使脑部暴露。剪开脑膜并切断所有与脑部相连的神经和血管，取出整脑，包括大脑、小脑和完整脑干。大规模监测采样时，可用专用采样勺（国家牛海绵状脑病参考实验室提供）从枕骨大孔处取出延脑部组织即可。采样勺取样时，先上下左右四个方向剪开脑硬膜，再用戴一次性乳胶手套的手指绕延脑转一转以切断脑神经和血管，然后紧贴

颅腔壁插入采样勺，插入深度约 5 cm~7 cm。用力将采样勺的手柄往上翘，再往下切断脑组织，然后左右切断脑组织，最后将切下的脑组织往外抠出。



## 4.1.5 固定

将所有组织直接放入 10 倍体积的 10%中性福尔马林固定液中渗透固定 96 h,换新配制的固定液再固定 48 h。

## 4.1.6 组织切片制作

## 4.1.6.1 取材

把大脑、小脑、脑干组织分离开,分别横切成 3 mm~5 mm 厚的组织块,选取以下部位组织做进一步处理,包括大脑、小脑、脑桥、丘脑、四叠体、脑门、延髓。适当修剪这七块用于检测的组织边角以适用脱水筐大小,剩余组织继续固定以备用。用脱水筐装好检测用的组织块,并用铅笔做好标记,盖好脱水筐盖。投入新配制的 10 倍体积的固定液再固定 72 h。

## 4.1.6.2 甲酸处理

将装有组织块的脱水筐移入 98%甲酸中作用 1 h,自来水冲洗 20 min,然后再移入新配制固定液中处理 3 h。

## 4.1.6.3 脱甲醛

将装有组织块的脱水筐放入染色缸中,用缓慢流动的自来水漂洗 24 h。

## 4.1.6.4 脱水

将装有组织块的脱水筐放入染色缸中,依次在以下梯度酒精中分别脱水:

- a) 75%酒精浸泡 2 h。
- b) 85%酒精浸泡 2 h。
- c) 95%酒精 I 浸泡 2 h。
- d) 95%酒精 II 浸泡 2 h。
- e) 100%酒精 I 浸泡 2 h。
- f) 100%酒精 II 浸泡 2 h。

## 4.1.6.5 透明

4.1.6.5.1 氯仿 I 浸泡 25 h 或者二甲苯 I 浸泡 40 min。

4.1.6.5.2 氯仿 II 浸泡 3 h 或者二甲苯 II 浸泡 30 min。

## 4.1.6.6 浸蜡

依次在以下石蜡中浸蜡,温度为 60 °C:

- a) 软蜡 I 浸泡 40 min。
- b) 软蜡 II 浸泡 1 h。

c) 硬蜡浸泡 1 h。

#### 4.1.6.7 包埋

4.1.6.7.1 若包埋模具为金属条结构的，则先组装好包埋模具，放置在光滑平整的金属台面上，再将熔化的新硬蜡倒入包埋模具里，直至倒满，然后将浸好蜡的组织块放入其中（待切片的一面朝下，并放平整）。如果一个模具里可以放置多个组织，则两个组织之间距离应大于 1.5 cm。冷却过夜，用切片刀修

切成形，获得平整的石蜡组织块，然后给每个组织块贴上标签。

4.1.6.7.2 如果包埋模具为凹型的用于单个组织包埋的模具（常见包埋机所用模具），则先将模具加热至 70 °C，放置在同样温度的金属台面上，然后滴满熔化的新硬蜡，再将浸好蜡的组织块放入其中（待切片的一面朝下，并放平整），用去除盖子的脱水筐（尺寸与包埋模具匹配）放于其上，最后将整个包埋模具（包括组织等）平移至冷台上。待冷却好后，将脱水筐从包埋模具中取出，获得平整的石蜡组织块，然后给每个组织块贴上标签。

#### 4.1.6.8 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，切片刀、碎屑和废弃组织应焚烧处理。组织薄片用干净的粘附剂预处理过的载玻片贴片（组织应贴在磨砂面 / 标记面的同侧，以便给玻片做标记），然后用铅笔在载玻片上做好标记。

#### 4.1.6.9 烤片

贴好组织薄片的载玻片先在自然条件下晾干，然后放入烘烤箱中 50 °C 烘烤 4 h 以上。

#### 4.1.7 组织染色

##### 4.1.7.1 脱蜡和脱二甲苯

取烘烤好的玻片整齐放入染色架上，依次在以下试剂中脱蜡和脱二甲苯：

- 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.

##### 4.1.7.2 H·E 染色

4.1.7.2.1 苏木素染液 15 min.

4.1.7.2.2 自来水漂洗 2 min.

4.1.7.2.3 1% 盐酸酒精 10 s.

4.1.7.2.4 自来水漂洗 5 min.

4.1.7.2.5 饱和碳酸锂水溶液 30 s.

4.1.7.2.6 自来水漂洗 10 min.

4.1.7.2.7 75%酒精 2 min。

4.1.7.2.8 85%酒精 2 min。

4.1.7.2.9 95%酒精伊红液 1 min。

4.1.7.3 脱水和透明

4.1.7.3.1 95%酒精 2 min。

4.1.7.3.2 100%酒精 I 2 min。

4.1.7.33 100%酒精 II 2 min。  
4.1.7.34 二甲苯 I 2 min。

4.1.7.35 二甲苯 II 2 min。

#### 4.1.7.4 封片

用干净玻璃棒取一滴中性树胶，滴加在玻片的组织上，再用干净的盖玻片进行封片，放置在平整的台面上使其自然干燥。

#### 4.1.7.5 镜检及判定

4.1.7.5.1 分别在倍数为  $10\times 10$ 、 $10\times 20$  和  $10\times 40$  的光学显微镜下观察切片。

4.1.7.5.2 阳性结果。灰质区出现空泡变性，特别是神经纤维网浆和神经细胞内有规则的圆形或卵圆形空泡，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。容易出现空泡病变的部位是中脑和延髓的核群，且呈双侧对称性分布。

4.1.7.5.3 阴性结果。灰质区无特征性空泡变性。

4.1.7.5.4 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。组织病理学诊断只是疯牛病确诊的辅助方法，确诊时应结合免疫组织化学或免疫印迹诊断方法。

#### 4.2 免疫组织化学方法

##### 4.2.1 实验室生物安全要求

见 4.1.1。

##### 4.2.2 仪器设备

见 4.1.2。另外，还需要高压锅（温度能达到  $134\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）、水浴锅、恒温箱、冰箱（含冷冻和冷藏）、电磁炉、金属锅（烧水用）、陶瓷锅（直径不少于  $18\text{ cm}$ ）、湿盒（在玻片盒的底部铺上湿的吸水纸便成了湿盒）、微量移液器（量程分别为  $0.5\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \mu\text{L}\sim 50\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ 、 $50\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ ）。

##### 4.2.3 试剂

4.2.3.1 蒸馏水。

4.2.3.2 10% 中性福尔马林固定液（见 A.1）。

4.2.3.3 无水乙醇。

4.2.3.4 二甲苯。

4.2.3.5 氯仿。

4.2.3.6 软蜡（熔点  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）。

4.2.3.7 硬蜡(熔点60 °C)。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/015100204244011300>