

牛海綿狀腦病檢驗方法

一、牛海綿狀腦病 (Bovine spongiform encephalopathy, 以下簡稱 BSE) 是一種傳播性海綿狀腦病 (Transmissible spongiform encephalopathies, TSEs) 或稱普里昂病 (Prion diseases), 其致病原是變性普利昂蛋白質 (Prion), 簡稱 PrP^{Sc} (Sc 代表 scrapie) 或 PrP^{res} (protease-resistant prion), 感染宿主的腦組織會出現海綿狀變性及神經膠質細胞增生等病變。本檢驗方法係針對動物傳染病分類表之牛海綿狀腦病而定, 羊搔癢症 (Scrapie) 之檢驗亦適用。

二、檢驗方法：

(一) 生體檢查方法：

BSE 可區分為典型 (Classical form, C-type) 與非典型 (Atypical form), 其中非典型又可細分為 H 型 (H-type) 與 L 型 (L-type)。利用免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry) 或免疫化學技術 (如 ELISA、西方免疫墨點法) 偵測腦組織中的 PrP^{Sc} 是確診普里昂病的重要方法, 而典型及非典型 BSE 的區別診斷方法則須依賴西方免疫墨點法, 因非典型 BSE 之 H 型的 PrP^{Sc} 分子量大於典型 BSE, 非典型 BSE 之 L 型的 PrP^{Sc} 分子量小於典型 BSE。普里昂病組織病變及 PrP^{Sc} 的檢驗方法：

1. 組織病理學診斷 (Histopathology)。
2. 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry)。
3. 酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。
4. 西方免疫墨點法 (Western immunoblot method)。

(二) 樣本採樣部位

1. 將移除小腦後涵蓋有 A、B、C 三處的腦幹(Brainstem) (圖 1) 組織，由背側對半切開，一半供組織病理學診斷及免疫組織化學染色法，另一半供 ELISA 法和西方免疫墨點法，其中又以延腦 (Medulla oblongata) 呈 “V” 字形尖端的腦門 (Obex) 組織為所有檢測方法之重點部位 (如圖 1, A-A)，在腦門前後切取長度約 0.5~1.0 cm 腦幹。
 - (1) 供組織病理學診斷及免疫組織化學染色用之腦幹組織，放入 10% 中性福馬林固定液中進行 3 至 5 天固定。
 - (2) 供 ELISA 法和西方免疫墨點法用之腦幹組織於 -20°C 保存。
 - (3) 腦幹除採延腦腦門(圖 1 之 A-A)外，亦採延腦和小腦腳的連接處(圖 1 之 B-B)、四疊體處之中腦(圖 1 之 C-C)及小腦等材料，以供必要之鑑別時用。
2. 使用於所有檢測方法之 A-A 延腦腦門檢體均須有孤束核 (Nucleus of the solitary tract)、三叉神經脊髓徑核 (Nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve) 及迷走神經運動神經核 (Dorsal motor nucleus of the vagus nerve) 等三個部位(圖 2)。
3. 由於檢測標的為蛋白質，樣本須儘量新鮮，若樣本呈腐敗或死後自溶則會影響檢測結果。

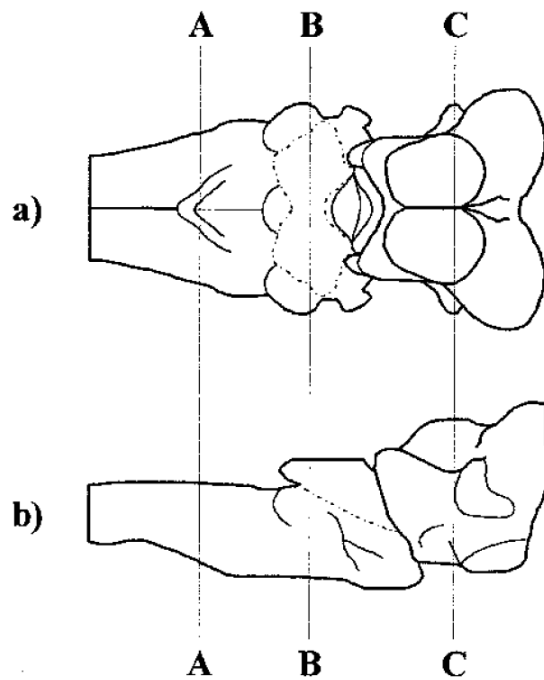


圖 1. 腦幹（移除小腦），a)背面圖，b)側面圖。

A-A：為延腦呈“V”字形尖端的腦門。

B-B：為延腦和小腦腳的連接處。

C-C：為中腦四疊體位置。

圖片引用：WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021. CHAPTER 3.4.5 Bovine Spongiform Encephalopathy.

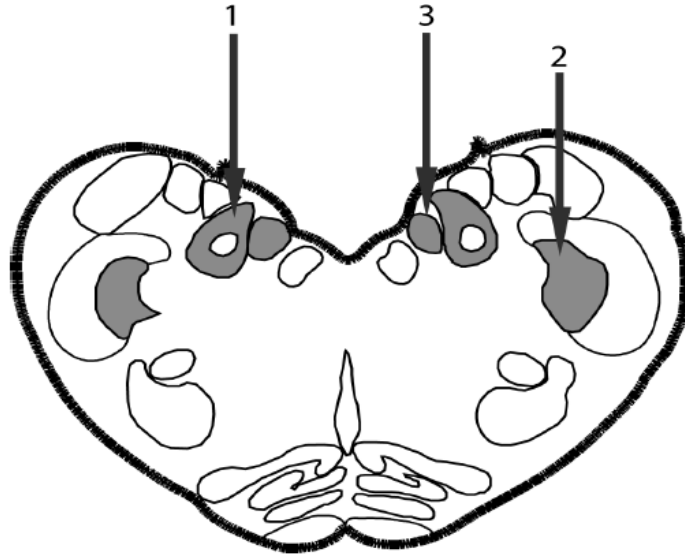


圖 2. 延腦腦門部位 (圖 1. A-A) 之橫斷面。

BSE 之組織病理學與免疫組織化學染色診斷的重點檢視區：
(1)孤束核 (Nucleus of the solitary tract)；(2)三叉神經脊髓徑核 (Nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve)；(3)迷走神經運動神經核 (Dorsal motor nucleus of the vagus nerve)。

圖片引用：WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021. CHAPTER 3.4.5 Bovine Spongiform Encephalopathy.

(三)組織病理學診斷(Histopathology)

1. 試驗步驟：

- (1) 將經過 10%中性福馬林液固定 3 至 5 天後的延腦腦門及其他部位組織進行修整成約 3 至 4 mm 的厚度，放入脫水包埋盒中。
- (2) 將包埋盒浸泡於 98%的蟻酸 (Formic acid) 中 1 小時，以降低感染性。

- (3) 以流動自來水沖洗包埋盒 1 小時後，進行組織脫水、石蠟包埋、組織切片、蘇木紫-伊紅(H&E)染色、封片等常規切片製作步驟。
- (4) 製作完成之組織切片於顯微鏡下進行判讀。

2. 檢驗結果判讀：

- (1) 於延腦腦門可見海綿狀病變 (Spongiform change)，即在神經元 (Neuron) 細胞質與神經氈 (Neuropil) 可見空泡 (Vacuole) 形成，空泡呈圓形或卵圓形且大小不一，神經元可見一至數個空泡，如圖 3。
- (2) 海綿狀空泡病變主要出現在孤束核、三叉神經脊髓徑核、迷走神經運動神經核，如圖 2。
- (3) 其他較少見的病變包括：
 - I. 神經元呈現皺縮 (Shrink)，甚至消失 (Loss)；
 - II. 神經元變性可能亦伴隨星狀細胞反應 (Astrocytic reaction)，如肥大 (Hypertrophy) / 或偶爾出現肥胖型星狀細胞 (Gemistocyte)，以及星狀細胞的增加 (Astrocytosis)。

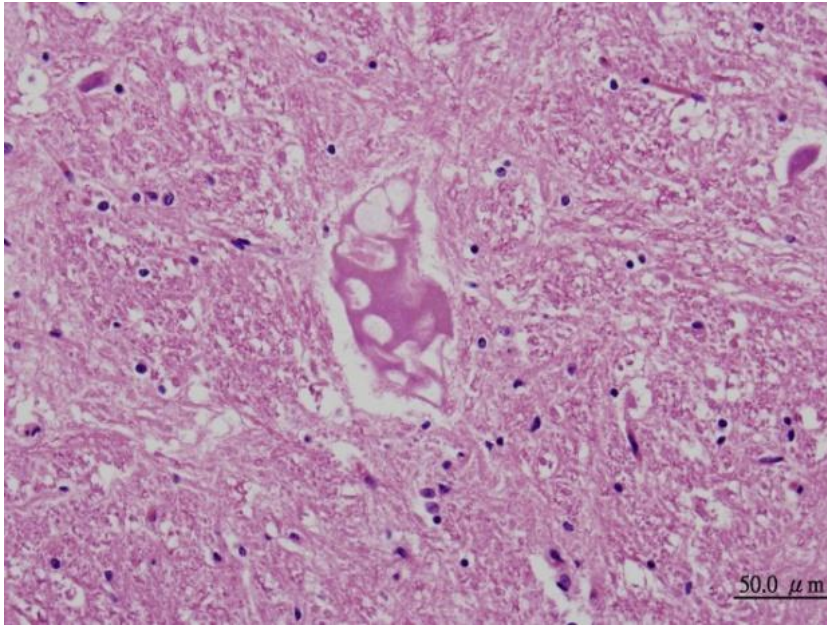


圖 3. 海綿狀病變。神經元細胞質出現數個大小不一空泡。

(四) 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry, IHC)

1. 檢驗試劑：

(1) 市售普利昂蛋白質 (Prion protein, PrP) 之鼠源單株抗體如下：

I. Clone: F99/97.6.1 (VMRD inc.)。

II. Clone: F89/160.1.5 (Thermo Fisher Scientific inc.)。

III. Clone: 6H4 (PRIONICS)。

(2) 市售針對鼠源抗體之免疫組織化學染色偵測系統 (IHC detection system)。

(3) 呈色受質 (Chromogenic substrate): AEC 或 DAB substrate 呈色劑。

2. 操作步驟：

(1) 每次進行 IHC 染色須同時染陽性對照切片及陰性對照切片。

- (2) 依據標準免疫組織化學染色法進行，並依市售針對鼠源抗體之免疫組織化學染色偵測系統之廠牌說明書操作。
- (3) 抗原修復採熱誘導抗原修復 (Heat-induced epitope retrieval) 方法。

3. 檢驗結果判讀：

- (1) 陽性對照切片必須出現陽性訊號，若無陽性訊號則必須重新進行染色。
- (2) 在顯微鏡下觀察，DAB 呈色的陽性訊號為褐色/棕色沉積物；AEC 呈色的陽性訊號為紅褐色沉積物 (圖 4)。
- (3) 陽性訊號的沉積物有多種形態，例如顆粒樣沉積 (Granular type)、緻密聚集樣沉積 (Coalescing type)、自膠質細胞核向外延伸形成的星狀樣沉積 (Glial/stellate type)、線狀沉積 (Linear tract type)、神經元內沉積 (Intraneuronal type) 及膠質細胞細緻點狀沉積 (Intraglial type)，詳如參考文獻 (三)。
- (4) 陽性訊號亦有出現類似類澱粉樣斑塊 (Amyloid plaque-like) 沉積，尤其在非典型 L 型 BSE 案例，詳如參考文獻 (四)。

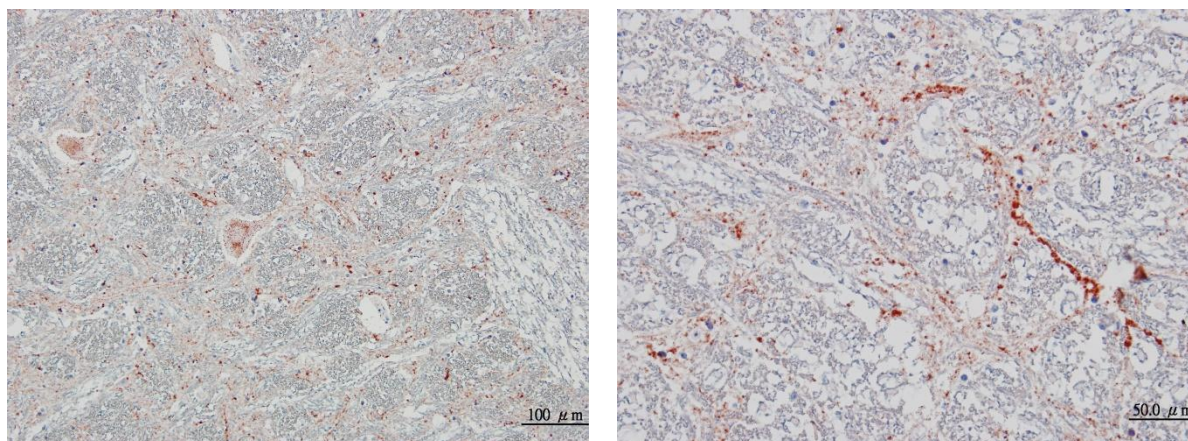


圖 4. BSE IHC 陽性結果形態。AEC Chromogen 呈色。

(五) 酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1. 檢驗試劑：ELISA 檢測依 WOAH 之推薦，參考 TSEglobalNet

(<https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/index.html>) 之商品化檢測套組。

2. 操作步驟：檢測步驟依商品化檢測套組之使用說明書操作。

3. 檢驗結果判讀：

(1) 檢測結果呈陰性反應，判定為陰性案例。

(2) 檢測結果呈陽性反應或疑陽性反應，須再以西方免疫墨點法或免疫組織化學染色法進行確認檢驗，兩種檢驗法中只要有一種呈陽性反應，即判定為陽性案例。

(六) 西方免疫墨點法 (Western immunoblot method)

1. 檢驗試劑：西方免疫墨點法檢測依 WOAH 之推薦，參

考 TSEglobalNet

(<https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/index.html>) 之商品化檢測套組。

2. 操作步驟：檢測步驟依商品化檢測套組之使用說明書操作。
3. 檢驗結果判讀：檢測結果係依 PrP^{res} 的分子量予以區別，若受測樣本的無糖基化帶（Nonglycosylated band, NG）位置比典型 BSE 的無糖基化帶為高，則判為非典型 H 型，若比典型 BSE 低，則判為非典型 L 型，如圖 5。西方免疫墨點法之結果，如參考文獻（五）。

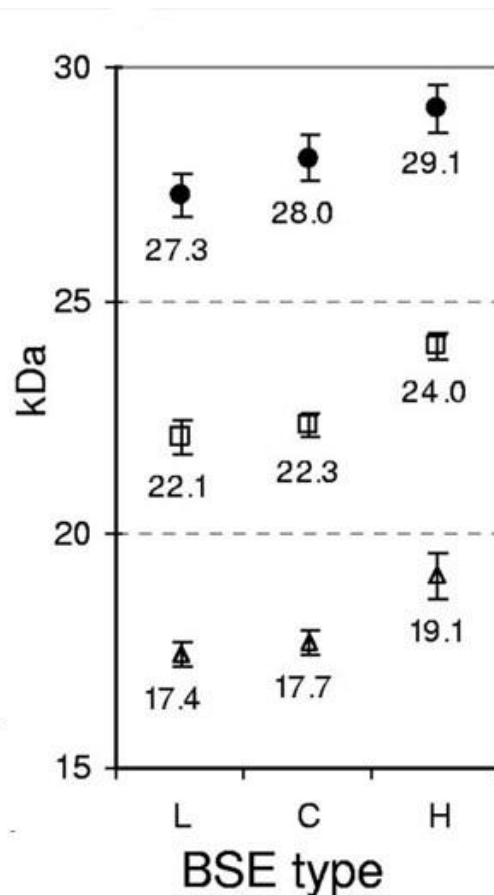


圖 5. 典型 (C)、非典型 H 型 (H) 及非典型 L 型 (L) 之西方免疫墨點法示範圖。圖示分別代表雙醣基化帶 (圓形)、單醣基化帶 (方形) 及無醣基化帶 (三角形)。

三、結果判定：

ELISA 檢測結果呈疑陽性病例，須再以西方免疫墨點法或免疫組織化學染色法進行複驗。

- (一) 西方免疫墨點法可進一步鑑別案例為典型或非典型 BSE。
- (二) 若僅免疫組織化學染色法陽性病例或綜合結果無法鑑別典型或非典型 BSE，則送國際參考實驗室判定。

四、參考文獻：

- (一) WOA. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021. CHAPTER 3.4.5 BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY
- (二) TSEglobalNet - International Reference Laboratory for TSE.
<https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/index.html>
- (三) Casalone C, Caramelli M, Crescio MI, Spencer YI, Simmons MM. BSE immunohistochemical patterns in the brainstem: a comparison between UK and Italian

cases. *Acta Neuropathol.* 111:444-9. 2006.

- (四)Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3065-3070. 2004.
- (五)Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, Acutis PL, Polak MP, Gavier-Widen D, Buschmann A, Caramelli M, Casalone C, Mazza M, Groschup M, Erkens JH, Davidse A, van Zijderveld FG, Baron T. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol.* 45:1821-9. 2007.