

牛海綿狀腦病實驗室診斷技術之建立與監測

張國慧*、李淑慧、翁敏召、蘇杰夫、林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為了防範牛海綿狀腦病入侵我國，亟需建立國內牛海綿狀腦病實驗室診斷技術，緣此，筆者等於 2001 年出國研習本病之相關診斷技術，至今已建立本病實驗室標準診斷流程，包括實驗室生物安全、組織病理學診斷、免疫組織化學染色法、西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法等，並將這些診斷技術應用於本病之持續性監測計畫中。自 1998 年至 2001 年共監測 127 頭牛腦，檢體來源包括屠宰場或化製場、結核病陽性撲殺場、神經症狀病死牛隻及其他原因送檢之病例，檢體來自北、中、南區及離島共 10 縣市，經檢驗結果皆為陰性。

關鍵字：牛海綿狀腦病，狂牛病，普里昂，實驗室診斷技術

緒 言

牛海綿狀腦病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE)，俗稱狂牛病 (mad cow disease)，是一種引起牛致死性的傳染性神經退行性疾病。1985 年 4 月在英國首次觀察到牛有特殊的臨床症狀，並於 1986 年診斷出病原[24]，其病原是一種變性蛋白質，而非傳統的細菌或病毒等傳染性病原，但卻有感染力，稱之為變性普里昂蛋白質 (scrapie prion protein, PrP^{Sc})[18]。

目前認為 PrP^{Sc} 會將神經細胞內正常的 PrP^C 轉化成 PrP^{Sc}，而以等比級數的速度累積在神經細胞內，而造成神經細胞死亡，終使腦組織變成海綿樣，所以是一種造成動物致死性神經變性的疾病，統稱為傳播性海綿狀腦病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSE) 或普里昂疾病 (prion diseases)，許多動物皆有類似的疾病，包括在人引起庫賈氏症 (Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)、Kuru 症、Gerstmann-Straussler-Scheinker 症

候群 (GSS) 及致死性家族性失眠症 (fatal familial insomnia, FFI) 等；在牛引起 BSE；在羊引起搔癢症 (scrapie)；在貂引起傳染性貂腦病 (transmissible mink encephalopathy, TME)；在鹿與麋鹿引起慢性消耗病 (chronic wasting disease, CWD)；在貓、獅、豹引起貓科海綿狀腦病 (feline spongiform encephalopathy, FSE)，在受感染宿主會形成腦組織的海綿狀變性與神經膠細胞增生等病變[14]。

普里昂疾病之致病機序各異，目前的研究顯示，BSE 的爆發可能是牛飼料添加之肉骨粉中含有大量的羊搔癢症病原所致[3]。此外，近年的研究顯示發現導致 BSE 的病原與人類的變異型庫賈氏症 (variant CJD) 有關[6,12]，所以將 BSE 的病原設定為會傳染給人類。自從英國爆發 BSE 之後，至 2001 年止已有二十一個國家包括：奧地利、比利時、捷克、丹麥、芬蘭、法國、德國、希臘、愛爾蘭、義大利、日本、列支敦斯登、盧森堡、荷蘭、波蘭、葡萄牙、斯洛伐克、斯拉維尼亞、西班牙及瑞士等國也陸續有病例發生。尤其是 2001 年日本有三個確診病例，表示本病已由歐洲地區擴散至亞洲地

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

區，所幸國內迄今未有病例報告。

本病的發生除了會對畜牧產業造成衝擊外，亦使人民對政府的食品安全管理產生疑懼與恐慌，因此為了防範 BSE 入侵我國，確保國民健康及畜牧產業之永續發展，亟需建立國內 BSE 診斷技術及診斷實驗室，故筆者等於 2001 年 7 月 28 日至 8 月 11 日赴美國「國家普里昂疾病病理監測中心」(National Prion Disease Pathology Surveillance Center)[2]，2001 年 11 月 18 日至 23 日接受世界動物衛生組織 (World Organisation for Animal Health) 之邀請赴泰國參加「區域性牛海綿狀腦病診斷與監測研習會」，研習 BSE 相關診斷技術。目前已依世界動物衛生組織訂定之診斷標準，建立本病之實驗室生物安全、組織病理學診斷、免疫組織化學染色法、西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法等實驗室標準診斷流程並持續進行本病之監控計畫 [1,16]。本報告將已建立之牛海綿狀腦病實驗室診斷方法加以說明，並報告目前之監測結果。

材料及方法

BSE 的診斷以組織病理學為主，並至少應配合免疫組織化學染色法或西方免疫墨點法或酵素連結免疫吸附分析法等其中一種檢驗方能進行確診，茲將已建立之實驗室診斷與監測方法及實驗室生物安全要求詳述如後：

實驗室之生物安全

1. 處理 prion 疾病的實驗室至少應達到生物安全二

級的標準 (biosafety level 2, P2)。

2. 嚴禁在實驗室內飲食或抽煙。
3. 實驗室人員處理檢體時應穿著防護衣物。
4. 實驗室內所使用的消耗物品以不回收為原則，儘量使用拋棄式耗材。
5. 實驗器械或容器等以高溫高壓滅菌 134-138°C 18 分鐘，壓力為 30 lb/in²。
6. 不可高溫高壓滅菌之器械或容器等，以 1N NaOH 浸泡隔夜。
7. 廢液應加入 NaOH 處理，使液體之最終濃度為 1N，然後再滅菌或焚燬。
8. 廢棄物以高溫焚燬。
9. 工作檯面之消毒先以 1N NaOH 擦拭後，再以 1N HCl 中和，最後再用清水擦拭。地板則以漂白水來清潔。

組織病理學診斷

將採集的牛腦組織置於 10 % 中性福馬林液固定完全後，取大腦、小腦及腦幹共十個部位的腦組織，其重點部位為延腦 (medulla oblongata) 成“V”字形尖端的門 (obex) [16,22] 如圖 1，修整成約 4mm 的厚度，放入脫水包埋盒中，再浸泡於 98% 的蟻酸中 1 小時 (將具感染能力的 prion 不活化)，然後再浸泡於 10% 中性福馬林液中 2 天。再依一般例行之病理切片方法，將組織塊脫水、石蠟浸潤、石蠟包埋等步驟，製作成 3-5 μ m 厚之切片，脫蠟後以 H&E 染色及封片，於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片中的病理變化。

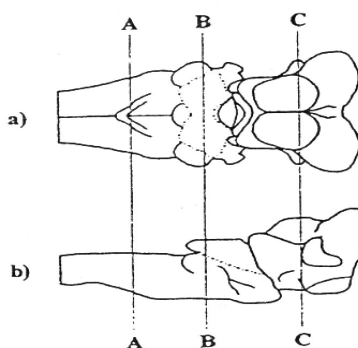


圖 1. 牛腦組織採樣時的重點部位 a)背面圖 b)側面圖

A-A：為延腦成“V”字形尖端的門 (obex)

B-B：為延腦和小腦腳的連接處

C-C：為中腦四疊體位置

免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry, IHC)

利用對 prion 蛋白質特異性的單株抗體及免疫染色技術來偵測牛腦組織中的 PrP^{Sc} [9,11]。其組織切片製作方法與組織病理學診斷之步驟相同，但將切片厚度調整為 10μm，每次染色需同時染陽性對照（來源：分讓自美國肯德基州立大學之羊搔癢症病例切片）。組織切片如常規進行脫蠟後，以磷酸鹽緩衝液 (0.1M phosphate buffer solution, pH7.2, PBS) 洗 3 次，每次 5 分鐘，置於蛋白[▽] K 溶液 (1M tris/HCl, pH8.0, 2.5mL + 0.1 M CaCl₂, 0.75mL + 14.7 mg/mL proteinase K 17μL + with distilled water adjust to 50 mL) 中 37°C 15 分鐘。將切片放入不銹鋼盒中加入沸水，置於 1bar 121°C 高溫高壓滅菌器中 20 分鐘後，再以上述 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，然後置於甲醇-雙氧水溶液 (30% H₂O₂ 1.5 mL + 50 mL methanol) 中 5 分鐘以去除內源性過氧化[▽]，再以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘。取出切片，組織周圍以無塵拭紙吸乾水分，置於保溼盤中，在組織上滴滿 5% 的正常豬血清 (約 200μL)，於室溫 20 分鐘，倒掉血清。在組織上滴滿 PrP 單株抗體 (1:1000 F99/97.6.1 anti-PrP monoclonal antibody, VMRD Inc.)，置於 37°C 4 小時或隔夜，以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘。在組織上滴滿次級抗體 (biotinylated secondary antibody, DAKO ChemMate Detection Kits)，於室溫 10 分鐘，以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，在組織上滴滿受質 (peroxidase conjugated streptavidin, DAKO ChemMate Detection Kits)，置於室溫 10 分鐘。以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，再用蒸餾水洗去鹽類，在組織上滴滿呈色劑 (AEC or DAB substrate, DAKO ChemMate Detection Kits)，於室溫 5 分鐘，用蒸餾水洗。滴上蘇木精複染數秒，然後水洗，滴上封片膠，蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下鏡檢。

西方免疫墨點法 (Western immunoblot method)

採用商品化檢測套組 (Prionics®-Check, Roche Applied Science)，其原理主要是偵測腦組織中對蛋白[▽] K (proteinase K) 有抵抗性的 PrP^{Sc}，因為正常的 prion 蛋白質會被蛋白[▽] K 所消化，而不正常的 PrP^{Sc} 對蛋白[▽] K 具有抗性，只會被部分消化，所

以分子量會由 32-35kD 變為 27-30 kD[7,8,15,20]。選取延腦的問 (obex) 或腦幹或大腦灰質部的腦組織，秤重後加入 320mM 蔗糖溶液研磨成 10 倍均質乳劑，取 100μL 乳劑加 10μL 消化緩衝液及 10μL 蛋白[▽] K 混合均勻後置於 50°C 加熱 40 分鐘，然後加 10μL 消化停止液以終止反應。再加入 100μL PAGE 樣本緩衝液混合均勻，加熱至 96°C 5 分鐘。架設電泳膠片，加入電泳緩衝液於電泳槽內。將待測樣本及對照樣本各加 10μL 於電泳膠片孔內以 200 伏特電泳 30-45 分鐘。電泳膠片取出以濕式轉漬器來進行轉漬 (transfer) 至 PVDF 膜上，於 4°C 150 伏特 1 小時。然後取出膜加入以 Ponceau S 染色 2 分鐘，標示標記分子的大小，然後以 TBST (tris-buffered-saline with tween-20) 脫色。以 PVDF 阻斷緩衝液於室溫震盪 0.5-1 小時，以 1:5000 倍稀釋的單株抗體，置於震盪器上於室溫反應 1-2 小時，然後以 TBST 洗 4 次，再以 1:5000 倍稀釋的次級抗體，置於震盪器上於室溫反應 0.5-1 小時，以 TBST 洗 4 次。將膜浸泡於 Luminescence 緩衝液中震盪 5 分鐘，再加入 50μL CDP-Star 於室溫 5 分鐘，然後將膜上的水分吸乾，置於透明保護膜內於暗房中放入 X 光底片上壓片，再沖洗底片觀察結果。

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

採用商品化檢測套組 (BSE purification kit & PLATELIA® BSE detection kit, Bio-Rad)，為目前最快速且敏感的檢測方法，乳劑之製備方法同前。取 500μL 乳劑加 500μL 蛋白[▽] K 溶液 (1 mL denaturing solution + 4μL proteinase K) 混合均勻，置於 37°C 10 分鐘。再加 500μL clarifying solution，混合均勻後離心 20,000g 5 分鐘，倒掉離心管中的液體，並倒立於吸水紙上 5 分鐘。再各加 50μL resolving buffer，置於 100°C 加熱 5 分鐘，混合均勻後加入 250μL sample diluent。取出檢測盤，於孔內分別加入 100μL 陽性對照、陰性對照及待測樣品，用膠片封盤，置於 37°C 感作 75 分鐘。以 washing solution 清洗三次，拍乾後加 100μL conjugate，再用膠片封盤，置於 4°C 感作 60 分鐘，以 washing solution 清洗五次，拍乾後加 100μL revelation solution，置於室溫下之暗室 30 分鐘，再加 100μL

stopping solution，以 450/620 nm 波長 ELISA reader 讀取結果。

監測方法

為達成世界動物衛生組織之非疫區認定條件，本所自 1998 年 7 月 1 日開始進行本病之持續性監測工作，採樣對象為 24 月齡以上出現之神經症狀病死牛隻、屠宰場或化製場逢機採樣、結核病陽性撲殺牧場每場次採樣一頭及其他原因送檢至本所檢驗之病例。採取之牛腦以腦幹為重點部位，用刀從中線對稱地將腦切割成兩半，其中一半牛腦冷凍保存於 -20℃；另一半的牛腦置於 10 % 中性福馬林液固定液。福馬林固定之牛腦以上述之組織病理學診斷方法進行檢驗；冷凍牛腦以上述之西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法進行篩檢。組織病理切片若觀察到懷疑之病變或西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法出現疑陽性結果時，則再以免疫組織化學染色法確診之。

結 果

組織病理學診斷

經 H&E 染色之組織切片於顯微鏡下進行判讀，感染 BSE 牛隻在神經病理學上主要呈三個特殊病變為：1. 腦皮質灰質部產生空洞狀退化。2. 神經元細胞壞死及數目減少。3. 神經星狀膠質細胞增多 (astrocytosis)，使腦組織呈現海綿樣變性 (spongiform change)。若發現上述病變者，則判定為陽性，但仍併用下列方法以進行確診。

免疫組織化學染色法

在顯微鏡下觀察經免疫染色之組織切片，以 DAB 染色若出現大量褐色顆粒沉積或聚集的異常

prion 蛋白質，若是以 AEC 染色則可見大量紅色顆粒沉積或聚集。

西方免疫墨點法

依據 X 光片上顯示的片段來判定，因為腦組織內正常的 prion 蛋白質會被蛋白^{Pr} K 所消化，所以經過蛋白^{Pr}處理後則會消失無法被檢出，因此陰性病例無法見到任何片段。若是腦組織內存有不正常的 PrP^{Sc}，因為其對蛋白^{Pr} K 具有抗性，無法被完全消化，只會被部分消化，所以用抗體來偵測仍可見三條分子量大小不同的蛋白質（因為所帶的醣基數量不同，所以分子量大小不同）。

酵素連結免疫吸附分析法

陰性對照之吸光值需小於 0.150；陽性對照吸光值需大於等於 1.0；若檢測樣本吸光值大於陰性對照吸光值加上 0.090 則判定為陽性。

監測結果

自 1998 年 7 月 1 日至 2001 年 12 月 31 日止，共監測 127 頭牛腦，檢體採樣來源及數量如表 1 所示，檢體來源自 24 月齡以上出現之神經症狀病死牛隻 7 件、屠宰場或化製場逢機採樣 65 件、結核病陽性撲殺牧場 48 件及其他原因送檢至本所檢驗之病例 7 件，檢驗牛隻平均年齡為 4.1 歲，來源縣市包括北、中、南區及離島共 10 縣市，分別為台北縣 21 件、新竹縣 1 件、苗栗縣 2 件、台中縣 10 件、彰化縣 28 件、台南縣 4 件、高雄縣 8 件、屏東縣 34 件、澎湖縣 7 件及金門縣 12 件，檢驗結果皆為 BSE 陰性。

表 1. 牛海綿狀腦病監測檢體採樣來源及數量

年 份	1998	1999	2000	2001	合計
來 源					
屠宰場或化製場	2	15	13	35	65
結核病陽性撲殺場	7	26	9	6	48
神經症狀病死牛	1	1	5	0	7
其他原因送檢病例	0	6	0	1	7

討 論

由於 prion 這種病原相當特殊，對熱、紫外線、輻射照射及消毒劑均有很強的抵抗性，以一般常用的物理或化學方法並無法將其破壞，而且目前世界動物衛生組織已將 BSE 設定為人畜共通傳染病，所以 BSE 診斷實驗室的建立是相當重要的。實驗室內除了必備的儀器設備外，仍需備有能高達 136℃ 以上的高溫高壓滅菌器。此外，雖然目前的證據顯示 PrP^{Sc} 病原不會藉由空氣吸入而感染，但是在操作檢體時，例如研磨、震盪、離心等可能會產生極小的懸浮微粒 (< 5µm)，這些含有病原的懸浮粒子極易藉由空氣流動飄游到四處，所以在處理此病原時應視同會藉由空氣傳染，而做好所有的防護措施。

目前 BSE 的診斷除了前述的四種方法外，陸續可能還有許多更新的檢驗技術與檢驗套組會不斷地被開發出來，但目前大多仍處於研究階段未能普遍地被應用於診斷。例如在檢驗技術方面，有些實驗室應用基因轉殖鼠 (transgenic mice) 來進行人工動物接種試驗，大幅縮短原先接種小白鼠所需的 292 天潛伏期[4]，但因實驗動物的飼養較費人力，且需在符合生物安全三級的陰壓動物舍飼養，所以目前仍只應用於研究領域。另外在腦脊髓液的檢驗方面，由 BSE 的確診病例發現，藉由雙向電泳分析法 (two dimensional gel electrophoresis) 可偵測出指標性蛋白質 apolipoprotein E，但目前尚無法應用於臨床診斷。因為這種蛋白質不具特異性，只可作為神經退行性變化的非特異性指標。同樣地，從腦脊髓液中偵測 14-3-3 蛋白質的方法，或是藉由腦脊髓液與血清偵測 S-100 蛋白質也因特異性低，同樣不適用於 BSE 的診斷[10,13,19]。

至於活體檢驗部分，目前只有利用免疫組織化學染色法應用於羊搔癢症之扁桃腺與眼瞬膜進行活體檢驗。但是根據實驗接種牛的結果發現，不僅在潛伏期，甚至在臨床發病期都無法從淋巴組織偵測到具有感染力的 prion，而不能應用於 BSE 的診斷[23]，所以目前仍有許多學者正在積極地研發其他活體生前的檢驗方法。亦有學者藉由電子化學分析法 (electrochemical analysis) 偵測感染 prion 動物尿液中的代謝物，但是這種方法的敏感性和特異性

較低，目前仍不建議用作單一的診斷法[21]。

在檢驗套組方面，目前除了前述商品化的免疫西方墨點法與酵素連結性免疫吸附法檢驗套組之外，較新的檢驗套組同樣是利用 ELISA 的原理，只是改用冷光 (chemiluminescence) 來呈色以提高其敏感性與特異性[5]。新的檢驗技術不斷地推陳出新，但因許多新的檢驗方法缺乏真實之黃金診斷標準 (true gold standard)，且會隨著潛伏期的不同對前述檢驗方法的敏感性也有所不同，若是要應用在診斷仍需再評估。根據世界動物衛生組織的建議，在發生率低的地區或是非疫區的監控仍是以組織病理學診斷與免疫組織化學染色為主[17]。

日本於 2001 年 9 月發現亞洲地區首宗 BSE 病例，而澳洲也在 2001 年 12 月發現病例。根據英國非官方的報告 (海關出口統計資料)，指出英國曾在 1989 至 1996 年間輸入台灣 4,598 噸的飼料，其中可能包括肉骨粉，而且目前全世界已有二十一個國家 (地區) 為 BSE 疫區，所以為防範 BSE 入侵我國，我國應落實並加強各種相關防範措施，尤其是加強檢疫措施、防範走私、加強監測工作之執行、加強反芻獸飼料之使用管制及其宣導等。

參 考 文 獻

1. 李淑慧、張國慧、翁敏召、蘇杰夫、林士鈺。1998 年至 2000 年台灣地區牛海狀腦病監控。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告年報。36: 1-6, 2000。
2. 李淑慧、張國慧。研習牛海綿狀腦病診斷技術。行政院農業委員會所屬各機關出國報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。2001。
3. Balter M. Origins of BSE. Intriguing clues to a scrapie-mad cow link. Science 292: 827-9, 2001.
4. Barlow RM, Middleton DJ. Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. Vet Rec 126: 111-112, 1990.
5. Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, Bottcher S, Struckmeyer T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbriggen A, Stack M, Moser M, Oesch B, Kubler E. Validation of a luminescence immunoassay for the detection of

- PrP^{Sc} in brain homogenate. *J Virol Methods* 101: 79-84, 2002.
6. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the etiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.
 7. Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farrelly SS, Stack MJ. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J Comp Pathol* 125: 64-70, 2001.
 8. Doherr MG, Oesch B, Moser M, Vandevelde M, Heim D. Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 145: 672, 1999.
 9. Graber HU, Meyer RK, Fatzer R, Vandevelde M, Zurbriggen A. In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Med Assoc* 42: 453-459, 1995.
 10. Green AJE, Jackman R, Marshall TA, Thompson EJ. Increased S-100b in the cerebrospinal fluid of some cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 145: 107-109, 1999.
 11. Haritani M, Spencer YI, Wells GAH. Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol* 87: 86-90, 1994.
 12. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 1997.
 13. Jones V, Martin TC, Keyes P, Dawson M. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet Rec* 139: 360-363, 1996.
 14. Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 1250: 187-93, 1998.
 15. Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandevelde M, Moser M. Application of Prionics® Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol, Supp* 16: 189-195, 2000.
 16. Office International des Epizooties (OIE). Bovine Spongiform Encephalopathy. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Fourth Edition. Part 2, Chapter 2.3.* 13, 2000.
 17. Office International des Epizooties (OIE). Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy. In: *International Animal Health Code. Part 3, Appendix 3.8.3.* 2001.

18. Prusiner SB, Kingsbury DT. Prions-infectious pathogens causing the spongiform encephalopathies. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol* 1: 181-200, 1985.
19. Robey WG, Jackson R, Walter RL, Brackett CA, Harrington CA, Killian WR. Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed BSE symptomatic cattle. *Vet Rec* 143: 50-51, 1998.
20. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathologica* 98: 437-443, 1999.
21. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 276: 31479-82, 2001.
22. Wells GAH, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec* 125: 521-524, 1989.
23. Wells GAH, Hawkins SAC, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI, Chaplin MJ, Stack MJ, Dawson M. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec* 142: 103-106, 1998.
24. Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121: 419-420, 1987.

Establishment of the Laboratory Diagnostic Techniques and Monitoring of Bovine Spongiform Encephalopathy in Taiwan

Kuo-Hui Chang*, Shu-Hwae Lee, Min-Chao Weng, Jei-Fu Su, Shih-Yuh Lin

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive of Yaun

SUMMARY To prevent bovine spongiform encephalopathy (BSE) from entering our country, we have established the BSE laboratory diagnostic techniques, including the laboratory biosafety, histopathology, immunohistochemistry, Western immunoblot assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. We have also applied those techniques to the continuous surveillance program of BSE. A total of 127 cattle brains were collected from the abattoirs, rendering plants, and *M. tuberculosis*-contaminated farms located in 10 counties of Taiwan during 1998 to 2001. Cattle developed central nervous signs or showed other symptoms were also included. All the brains were examined and present negative results.

Keywords: bovine spongiform encephalopathy, mad cow disease, prion, laboratory diagnostic techniques

*Corresponding Author
National Institute for Animal Health