



动物医学 专业综合实验技术

主编 崔言顺

DONGWU YIXUE ZHUANYE ZONGHE SHIYAN JISHU



动物医学 专业综合实验技术

主 编 崔言顺

副主编 王振勇

编 者 (以姓氏笔画排序)

马卫明 王振勇 王海荣

李宏梅 李建亮 杨萍萍

葛利江 崔言顺

主 审 姜世金

山东农业大学动物科学与
动物医学实验教学中心

组织编写



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

图书在版编目(CIP)数据

动物医学专业综合实验技术/崔言顺主编. --北京:
高等教育出版社, 2012. 1

ISBN 978-7-04-034236-9

I. ①动… II. ①崔… III. ①兽医学: 实验医学-高等
学校-教材 IV. ①S85-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 251055 号

策划编辑 潘超

责任编辑 王超然

封面设计 张楠

责任印制 张泽业

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街4号

邮政编码 100120

印 刷 三河市华润印刷有限公司

开 本 787×1092 1/16

印 张 10.5

字 数 240千字

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

网上订购 <http://www.landaco.com>

<http://www.landaco.com.cn>

版 次 2012年1月第1版

印 次 2012年1月第1次印刷

定 价 22.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物料号 34236-00



“动物医学专业综合实验技术”是21世纪普通高等院校动物医学、动(植)物检疫、(兽药)制药工程等动物医学类本科专业新的人才培养方案改革完善后的一门独立的、重要的必修专业课程。

本课程与动物传染病学、动物寄生虫学、动物内科学、动物外科学、动物外科手术学、动物产科学、动物卫生检验检疫学等课程同时进行,从加强实践能力培养、提高综合素质的教学目标出发,建立一个科学、合理的动物医学实验教学课程体系。学生通过本课程的学习,不仅能加深理解和巩固所学理论知识,而且更能切实掌握动物医学基本实验技能,正确使用常规仪器,学会正确记录、分析讨论实验结果,初步综合运用已学实验技术方法设计简单实验。同时对学生进行科学素养和良好的实验室工作习惯的训练,为培养具有创新精神和实践能力的高素质人才奠定良好的基础。

本课程的重新调整与完善,是对传统的单门课程设少量实验课的重大改革,是提高学生实验实践能力的重要步骤和措施。本教材的创新之处在于,将原来分散的实验课有机地结合在一起组成一门新的实验课程,减少验证性实验内容,避免重复,增加综合性、创新性和设计性实验内容,以培养学生理论密切联系实际,分析和解决问题的综合能力。

本书内容注意到科学性、实用性和可行性,文字力求简练、通俗,使用现行法规和标准,方法技术先进,条理清楚,教学实用性强。

本书由山东农业大学动物科学与动物医学实验教学中心组织编写,具体分工为:前言,崔言顺;第一章,王海荣;第二章,李宏梅;第三章,王振勇;第四章、第五章,马卫明;第六章,葛利江;第七章,崔言顺、李建亮、杨萍萍。崔言顺、王振勇、杨萍萍、李建亮对全部书稿分别进行了审校。

本书承蒙山东农业大学及其教务处、动物科技学院(动物医学院)领导大力关心和支持,崔治中教授指导,姜世金教授主审,深表谢忱!

由于这本教材尚无同类教材作参考,又是多学科交叉,编者水平有限,难免有疏漏和欠妥之处,恭望广大读者赐教。

编者

2011年7月



第一章 动物传染病学实验技术 …

- …………… 1
- 实验一 免疫接种 …………… 1
- 实验二 兔瘟的诊断及其组织灭活苗的制备 …………… 4
- 实验三 间接血凝实验检测猪瘟抗体 …………… 5
- 实验四 布氏杆菌病的检疫 …………… 7
- 实验五 结核病的检疫 …………… 13
- 实验六 胶体金检测卡的制备及猪蓝耳病抗体检测 …………… 18

第二章 动物寄生虫学实验技术 …

- …………… 21
- 实验一 原虫的观察 …………… 21
- 实验二 吸虫的观察 …………… 23
- 实验三 绦虫及绦虫蚴的观察 …… 27
- 实验四 线虫的观察 …………… 30
- 实验五 昆虫的观察 …………… 34
- 实验六 蝇成熟幼虫分泌物提取液抗菌活性测定 …………… 37

第三章 动物内科学实验技术 … 40

- 实验一 血清中钙含量的测定(微量测定法) …………… 40
- 实验二 血清中镁含量的测定(钛黄显色法) …………… 42
- 实验三 血清中无机磷含量的测定(磷钼酸法) …………… 44
- 实验四 血清中微量元素铜的测定(铜

试剂比色法) …………… 46

- 实验五 血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性的测定 …………… 48
- 实验六 血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性的测定 …………… 51
- 实验七 血清中碱性磷酸酶(ALP)活性的测定 …………… 53
- 实验八 血清乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定 …………… 55
- 实验九 血糖的测定(费林-吴宪氏法) …………… 57
- 实验十 动物有机磷农药中毒病例复制与诊疗 …………… 60

第四章 动物外科学实验技术 … 66

- 实验一 外科炎症疗法(一) …………… 66
- 实验二 外科炎症疗法(二) …………… 68
- 实验三 创伤 …………… 71
- 实验四 植皮术 …………… 74
- 实验五 眼的检查法 …………… 75
- 实验六 肢蹄病诊断法 …………… 77

第五章 家畜外科手术学实验技术

- …………… 83
- 实验一 保定法、注射法、投药法、打结法 …………… 83
- 实验二 无菌术 …………… 86
- 实验三 局部麻醉 …………… 87
- 实验四 全身麻醉 …………… 88
- 实验五 切开、止血、缝合 …………… 90

实验六	肠吻合术	90
实验七	气管切开术、食管切 开术	91
实验八	羊瘤胃切开术、公羊尿道 切开术	92
实验九	羊多头蛔孢囊摘除术、肋骨 切除术	92
第六章 动物产科学实验技术 ... 94		
实验一	犬发情鉴定——阴道黏液涂片 法和外部检查法	94
实验二	牛、驴发情直检法和直肠 B 超 卵巢探查法	95
实验三	怀孕诊断——超声波 诊断法	97
实验四	手术助产——剖宫产	101
实验五	胎膜、胎盘及胎儿血液 循环	102
实验六	乳房炎乳和酒精阳性乳的实验 室诊断	104

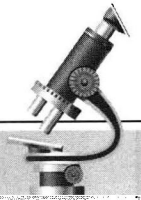
实验七	骨盆和难产助产器械的 使用	106
实验八	B 超诊断在家畜生殖方面的 应用	108

第七章 动物卫生检验检疫学实验

技术

实验一	鲜(冻)肉类的卫生 检验	110
实验二	腌腊肉品的卫生检验	116
实验三	罐头食品的卫生检验	122
实验四	乳的卫生检验	129
实验五	鲜蛋和皮蛋的卫生 检验	136
实验六	鲜(冻)鱼的卫生检验	141
实验七	蜂蜜的卫生检验	144
实验八	乳的掺假掺杂检验	151

主要参考文献



实验一 免疫接种

一、实验目的与要求

1. 结合生产实践掌握免疫接种的方法和步骤。
2. 熟悉兽医生物制品的保存、运送和用前检查方法。
3. 实验结束后撰写实验报告,内容包括:实验原理、操作方法与步骤、实验结果、讨论与分析。

二、实验内容及方法

(一) 免疫接种的方法

免疫接种的方法很多,主要有注射免疫法、经口免疫法、气雾免疫法等。

1. 注射免疫法

注射免疫法中可分为皮下接种法、皮内接种法、肌肉接种法和静脉接种法4种。

(1) 皮下接种法 对马、牛等大家畜皮下接种时,一律采用颈侧部位,猪在耳根后方,家禽在胸部、大腿内侧。根据药液的浓度和家畜的大小而异,一般用16~20号针头,长为1.2~2.5 cm。家禽则应采用针孔直径小于20号的针头。

皮下接种的优点是操作简单,吸收较皮内接种快,缺点是使用剂量多。而且同一疫苗,应用皮下接种时,其反应较皮内大。大部分常用的疫苗和免疫血清,一般均采用皮下接种。

(2) 皮内接种法 马的皮内接种采用颈侧、眼睑部位。牛、羊除颈侧外,可在尾根或肩胛中央部位。猪大多在耳根后。鸡在肉髯部位。

现用兽医生物制品用作皮内接种的,仅有羊痘弱毒菌苗、猪瘟结晶紫疫苗等少数制品,其他均属于诊断液。一般使用专供皮内注射的注射器(容量2~10 mL),0.6~1.2 cm长的螺旋针头(针孔直径19~25号),也可使用蓝心注射器(容量1 mL)和相应的注射针头。

皮内接种的优点是使用药液少,同样的疫苗皮内注射较之于皮下注射反应小。同时,真皮层的组织比较致密,神经末梢分布广泛,特别是猪的耳根皮内比其他部位容易保持清洁。同量药液皮内注射时所产生的免疫力较皮下注射为高。

皮内接种的缺点是手续比较麻烦。提高工作人员的操作技术,可以克服这一缺点。

(3) 肌肉接种法 马、牛、猪、羊的肌肉接种,一律采用臀部和颈部两个部位。鸡可在

胸肌部接种。

现有兽医生物制品,除猪瘟弱毒疫苗、牛肺疫弱毒疫苗以及在某些情况下接种血清采用肌肉接种外,其他生物制品一般都不应用此法进行接种。一般使用16~20号针头,长为2.5~3.7 cm。

肌肉接种的优点是药液吸收快,注射方法也较简便。其缺点是在一个部位不能大量注射。同时臀部接种如部位不当,易引起跛行。

(4) 静脉接种法 马、牛、羊的静脉接种,一律在颈静脉部位,猪在耳静脉部位。鸡则在翼下静脉部位。

现用兽医生物制品中的免疫血清,除了皮下或肌肉接种外,亦可采用静脉接种,特别在紧急治疗传染病患者时。疫苗、菌苗、诊断液一般不作静脉注射。马、牛、羊的静脉接种部位在左右颈侧均可,一般以右侧较方便。根据家畜的大小和注射剂量的多少,一般使用14~20号针头,长为2.5~3.7 cm。猪的静脉接种在耳朵正面下翼的两侧。一般使用19~23号针头,长为2.5~5 cm。

静脉接种的优点是可使用大剂量,奏效快,可以及时抢救病畜。缺点是手续比较麻烦,设备与技术不完备时,难以进行。此外,如所应用的血清为异种动物者,可能引起过敏反应(血清病)。

2. 经口免疫法

分饮水免疫和喂食免疫两种。前者是将可供口服的疫苗混于水中,畜、禽通过饮水而获得免疫,后者是将可供口服的疫苗用冷的清水稀释后拌入饲料,畜、禽通过吃食而获得免疫。疫苗经口免疫时,应按畜、禽头数和每头畜、禽平均饮水量或吃食量,准确计算需用的疫(菌)苗剂量。免疫前,应停水或停料半天,夏季停水或停料时间可以缩短,以保证饮喂疫(菌)苗时,每头畜、禽都能饮入一定量的水或吃入一定量的料。饮水免疫时,一定要增加饮水器,让每头畜、禽同时都能饮到足够量的水。稀释疫(菌)苗应当用清洁的水,禁用含漂白粉的自来水。混有疫(菌)苗的饮水和饲料一般不应超过室温。已稀释的疫(菌)苗,应迅速饮喂。

经口免疫法具有省时、省力的优点,适用规模化畜、禽场的免疫。缺点是由于畜、禽的饮水量或吃食量不等,因此进入每头畜、禽体内的疫(菌)苗量不同,出现免疫后畜、禽的抗体水平不均匀,较离散,不能像其他免疫法那样准确一致。

3. 气雾免疫法

此法是用气泵产生的压缩空气通过气雾发生器(即喷头),将稀释疫苗喷出去,使疫(菌)苗形成直径1~10 μm 的雾化粒子,均匀地浮游在空气之中,畜、禽通过呼吸道吸入肺内,以达到免疫。鸡感染支原体病时禁用气雾免疫,因为免疫后往往激发支原体病发生。雏鸡首免时使用气雾免疫应慎重,以免发生呼吸道疾病而造成损失。

气雾免疫的装置由气雾发生器(即喷头)及动力机械组成。可因地制宜,利用各种气泵或用电动机、柴油机带动空气压缩泵。无论采用何种方法,都要保持每平方米有2 kg以上的压力,才能达到疫(菌)苗雾化的目的。

雾化粒子大小与免疫效果有很大关系。一般粒子的直径在1~10 μm 为有效粒子。气雾发生器的有效粒子在70%以上者为合格。测定雾化粒子大小时,用一拭好的盖玻片,周围涂以凡士林油,在盖玻片中央滴一小滴机油,用拇指和食指持盖玻片,机油液面朝喷头,在距喷头10~30 cm处迅速通过,使雾化粒子吹于机油面上,然后将盖玻片液面朝下放于

凹玻片上,在显微镜下观察,移动视野,用目测微尺测量其大小(方法与测量细菌大小相同),并计算其有效粒子率。

(1) 室内气雾免疫法 此法需有一定的房舍设备。免疫时,疫(菌)苗用量主要根据房舍大小而定,可按下式计算:

$$\text{疫(菌)苗用量} = D \times A / T \times V$$

式中, D ——计划免疫剂量;

A ——免疫室容积,L;

T ——免疫时间,min;

V ——呼吸常数,即动物每分钟吸入的空气量(L),如对绵羊免疫,即为3~6 L/[min/头(只、羽)]。

疫(菌)苗用量计算好以后,即可将动物赶入室内,关闭门窗。操作者将喷头由门窗缝伸入室内,使喷头保持与动物头部同高,向室内四面均匀喷射。喷射完毕后,让动物在室内停留20~30 min。操作人员要注意自身防护,戴上大而厚的口罩,如出现症状,应及时就医。

(2) 野外气雾免疫法 疫(菌)苗用量主要以动物数量而定。以羊为例,如为1000只,每只羊免疫剂量为50亿活菌,则需50000亿,如果每瓶疫苗含活菌4000亿,则需12.5瓶,每瓶用500 mL灭菌生理盐水稀释。实际应用量往往要比需用量略高一些。免疫时,将畜群赶入四周有矮墙的圈内。操作人员手持喷头,站在畜群中,喷头与动物头部同高,朝动物头部方向喷射。操作人员要随时走动,使每一动物都有吸入机会。如遇微风,操作者应站在上风向,以免雾化粒子被风吹走。喷射完毕,让动物在圈内停留数分钟即可放出。野外气雾免疫时,操作者更应注意自身防护,要穿工作衣裤和胶靴,戴大而厚的口罩,如出现症状,应及时就医。

气雾免疫时,如雾化粒子过大或过小,温度过高,湿度过高或过低,野外免疫时风力过大、风速过急,均可影响免疫效果。

本法具有省时、省力的优点,适于大群动物的免疫,缺点是需要的疫(菌)苗数量较多。

(二) 免疫接种用生物制品的保存、运送和用前检查

1. 保存

兽医生物制品应保存在低温、阴暗、干燥的场所。灭活菌(死苗)、致弱的细菌性菌苗、类毒素、免疫血清等应保存在2~15℃,防止冻结;致弱的病毒性疫苗,如猪瘟弱毒疫苗、鸡新城疫弱毒疫苗等,应置放在0℃以下,冻结保存。

2. 运送

要求包装完善,尽快运送,运送途中避免日光直射和高温。致弱的病毒性疫苗应放在装有冰块的广口瓶或冷藏箱内运送。

3. 用前检查

兽医生物制品在使用前,均需详细检查,如有下列情况之一者,不得使用:没有瓶签或瓶签模糊不清;没有经过合格检查的;过期失效的;制品的质量与说明书不符,如色泽、沉淀有变化,制品内有异物、发霉和有臭味的;瓶塞不紧或玻璃破裂的;没有按规定方法保存的等。不能使用的疫(菌)苗应立即废弃,致弱的活苗应煮沸消毒或予以深埋。

(三) 家畜免疫接种前及接种后的护理与观察

免疫接种前,应对家畜进行健康检查(包括体温检查)。根据检查结果,作如下处理:完全健康的家畜可进行自动免疫接种;衰弱、妊娠后期的家畜不能进行自动免疫接种,而应注

射免疫血清;疑似病畜和发热病畜应注射治疗量的免疫血清或给予其他治疗。

经自动免疫的家畜,应有较好的护理和管理条件,要特别注意控制家畜的使役,以避免过分劳累和接种疫(菌)苗后出现的暂时性抵抗力降低而产生不良后果。有时,家畜接种疫(菌)苗后可能会发生反应,故在接种后应仔细观察7~10 d。如有反应,可给予适当治疗,反应极为严重的,可予以屠宰。

(四) 免疫接种的组织及接种时的注意事项

在某一地区或农牧场进行免疫接种时的组织工作好坏,决定着免疫接种的结果和成效,其内容包括:对饲养人员讲解有关接种工作的基本原理及其在防治家畜传染病上的重要性、接种后家畜的饲养管理条件等;准备适当的场地和保定工具;准备给家畜编号的器具;编写登记表册。

接种时,应注意以下几点:工作人员需穿着工作服及胶鞋,必要时戴口罩,工作前后均应洗手消毒,工作中不准吸烟和吃东西;注射器、针头、镊子等,临用时煮沸消毒至少15 min,注射时每头家畜须调换一个针头,如针头不足,也应每吸液一次调换一个针头;针筒排气溢出的药液,应吸积于酒精棉球上,并将其收集于专用瓶内。用过的酒精棉球、碘酒棉球以及注射器内未用完的药液也应收集或注入专用瓶内,集中烧毁。

三、思考题

1. 试述免疫接种在疫病防控上的意义。
2. 常用的免疫接种法有几种,各有哪些优缺点?

实验二 兔瘟的诊断及其组织灭活苗的制备

一、实验目的和要求

1. 通过实验,要求同学掌握兔瘟的临床症状、兔瘟病的实验室诊断方法、兔瘟组织灭活苗制作的原理和方法,为从事防疫检疫工作奠定基础。
2. 实验结束后撰写实验报告,内容包括:实验原理、操作方法与步骤、实验结果、讨论与分析。

二、实验原理

兔病毒性出血症是兔的一种急性败血性传染病,兔出血症病毒(PHDV)抗原性强,组织灭活苗效果极佳,安全可靠,目前广泛使用的是肝组织甲醛灭活苗。

组织灭活苗可分加佐剂的不加佐剂的两种。含佐剂苗所产生的抗体水平较高于无佐剂苗,但产生免疫力的时间迟于无佐剂苗,而且生产程序较为复杂,成本也高。当发生兔瘟时,作为紧急接种,选用无佐剂苗更为理想,因其产生免疫力较快,可提早控制疫情,即使平时预防接种,无佐剂苗也极为有效。

三、仪器设备、材料和试剂

1. 种毒

强毒株组织毒1:10悬液1 mL肌注感染成兔,48~72 h引起发病死亡。

2. 制苗动物
- 3 月龄以上,未感染本病和未接种本病疫苗的健康兔。
3. 组织捣碎机等。
4. 甲醛生理盐水,青链霉素原液。

四、实验步骤

1. 攻毒

取中毒制成 1:10 组织悬液,每毫升各加 1 000 IU 青链霉素,4 ℃ 处理 4 ~ 6 h,取上清液皮下或肌肉注射兔子,1 mL/只,接毒后每日观察。

2. 兔出血症(RHD)的临床诊断

对发病死亡兔进行病理学检查。

3. 病料的采集、RHD 组织灭活苗的制备

无菌操作取病变典型兔的肝、脾、肾等组织作为制苗材料。不同组织器官中含毒量不同,一般只取肝、脾、肾作为病料。

取 100 g 病料加入 400 mL 灭菌生理盐水,剪碎,高速组织捣碎机匀浆,过滤,用等量 0.8% 甲醛生理盐水稀释,分装,37 ℃ 温箱内灭活 48 h,每 2 h 摇匀一次,备检。

五、结果判定

1. 人工感染后的发病高峰时间为接种后 36 ~ 72 h。
2. 临床上,RHD 以神经症状为主,在免疫压力下可表现出非典型变化。
3. 剖检以呼吸系统的严重出血和内脏实质器官的淤血肿大为特征。

六、注意事项

攻毒后动物死亡时间可能不确定,应及时收集保存病料以便检查。

七、思考题

1. 兔瘟的病变有哪些?
2. 如何制备兔瘟组织灭活苗?

实验三 间接血凝实验检测猪瘟抗体

一、实验目的和要求

1. 掌握间接血凝实验检测猪瘟抗体的方法。
2. 实验结束后撰写实验报告,内容包括:实验原理、操作方法与步骤、实验结果、讨论与分析。

二、实验原理

猪瘟是猪的一种高度接触性传染病。由黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(*Pestivirus*)的猪

瘟病毒引起。猪是该病的唯一自然宿主,感染后除对猪中胚组织特别是造血和血管组织造成损害、引起败血症外,还可引起妊娠母猪流产、胎儿畸形、慢性营养性消耗、白细胞和血小板减少等免疫系统受损,继发或并发细菌或其他病毒感染等。近年来,随着国外工厂化养猪技术的引进和我国科学养猪技术的进步,养猪业的发展日趋规模化,但猪瘟时有发生和流行。在过去相当长的时期,每年因各种疾病死亡的猪占养猪总数的8%~10%,其中有1/3~2/3死于猪瘟。因此,猪瘟的诊断和检疫技术非常重要,尤其是猪场迫切需要。而猪瘟抗体水平的检测一方面反映猪群对猪瘟的抵抗力,另一方面可以帮助养殖者选择合适的免疫时机进行免疫。

常用的检测猪瘟抗体水平的方法有酶联免疫吸附实验和间接血凝实验两种。

间接血凝(IHA)实验具有操作简便、快速、灵敏度高、特异性强等特点,在基层就可以开展。其原理是:抗原与抗体分子相遇,在一定的条件下形成抗原-抗体复合物,但这种复合物的分子团很小,肉眼看不见。可将抗原吸附(致敏)在经过处理的红细胞表面,这种经过猪瘟抗原处理的红细胞与猪瘟抗体相遇,红细胞便可以出现清晰的凝集现象。

三、仪器设备、材料和试剂

1. 猪瘟 IHA 抗原、阳性血清、阴性血清、被检猪血清和稀释液。
2. 96 孔微量反应板、25 μL 和 50 μL 微量移液器。

四、实验步骤

1. 加稀释液

在 V 型板上每排的 1~8 孔加 50 μL 稀释液。

2. 加待检血清

在每排第 1 孔加待检血清 50 μL ,混匀后,从第 1 孔到第 8 孔依次做倍比稀释,将待检血清稀释成 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64 等 6 个稀释度。

3. 加对照血清

在第一排的第 8 孔加 50 μL 的阳性血清,第 9 孔加 50 μL 的阴性血清,第 10 孔加 50 μL 稀释液(做空白对照)。

4. 加诊断液

给 V 型板上各加样孔均加猪瘟诊断液 25 μL 。

5. 加样完毕后,将 V 型板置于微量振荡器上振荡 1 min。

6. 在 V 型板上加盖玻璃板,室温下静置 1.5~2 h,观察红细胞凝集情况,即可判定结果。

五、结果判定

1. 先观察对照孔

先看阴性对照孔,红细胞沉淀到底部成为一个小圆点,周边很干净,倾斜流动成为一条线。视为-。

再看阳性对照,至少第一孔出现完全凝集,即红细胞均匀地分布在孔的周围,中心无小红点,倾斜时成片向下滑动。视为+。

2. 在对照孔合格的前提下,观察各待检血清孔,以红细胞呈现“++”凝集的待检血清最大稀释度为其抗体效价。

如何判别++的凝集:应有一半红细胞沉淀,一半的红细胞凝集。

+++ :血细胞凝集,布满孔底,边缘不整齐,有时卷曲成荷叶状。++ :血细胞呈薄层,面积小,中心致密,边缘松散,呈锯齿状凝集。+ :血细胞集中在中央,周围有小点凝集。出现“++”以上凝集者判为阳性。

3. 抗体效价与抗感染的关系

抗体效价在1:16以上为免疫合格,有抗猪瘟疫病毒感染的能力,低于1:16时应接种猪瘟疫疫苗。

六、注意事项

1. 猪瘟 IHA 抗原冷藏保存,在加样前一定要混匀。
2. 每位同学需作稀释液对照 1 孔。
3. 阳性对照倍比稀释 8 孔,阴性对照 1 孔不必稀释。

七、思考题

1. 简述间接血凝检测猪瘟抗体实验的原理。
2. 简述间接血凝检测猪瘟抗体实验的操作步骤。

实验四 布氏杆菌病的检疫

一、实验目的与要求

1. 初步掌握布氏杆菌病的细菌学检查、血清学诊断及变态反应等检疫方法。
2. 实验结束后撰写实验报告,内容包括:实验原理、操作方法与步骤、实验结果、讨论与分析。

二、实验内容及方法

家畜布氏杆菌病的检疫,即通过流行病学调查、临诊检查、细菌学检查、血清学诊断及变态反应等方法,检出畜群中的患畜。实验诊断的材料可采取胎儿、胎衣、阴道分泌物、乳汁、血液、血清、动物尸体以及脓肿中脓汁等。

细菌学检查

(一) 染色检查

病料以绒毛叶渗出液、胎儿的胃内容物、肺、阴道分泌物、脓肿中的脓汁及培养物等制成抹片,除用革兰氏染色法染色外,应用鉴别染色法进行显微镜检查。布氏杆菌为球杆菌,大小为(0.5~0.7) μm \times (0.6~1.5) μm ,无鞭毛,不产生芽孢,不呈两极浓染,病料抹片呈密集菌丛,成对或单个排列,短链较少,革兰氏染色阴性。它虽然不是抗酸性细菌,但可以抵抗脱色用的弱酸,例如0.5%乙酸。这种特性结合布氏杆菌鉴别染色技术用于诊断有一定实际意义。下面列出两种较常用的方法。

1. 改良 Ziehl - Neelsen 法

适于作胎膜和流产胎儿内容物染色。流产数日内取阴道拭子制作抹片,也可用此法染色。

(1) 抹片晾干,在火焰上固定。

(2) 用 Ziehl - Neelsen 石炭酸复红原液的 1:10 稀释液染 10 ~ 15 min(原液为碱性复红 1 g,溶于 10 mL 无水乙醇中,加入 5% 石炭酸溶液 90 mL)。

(3) 水洗后,用 0.5% 乙酸脱色 15 ~ 30 s。

(4) 充分水洗后,用 1% 美蓝复染 20 ~ 60 s。

(5) 水洗、干燥、镜检。

布氏杆菌染成红色,背景为蓝色。在胎膜抹片中经常看到布氏杆菌在染成蓝色的组织细胞中集结成团。此法对诊断绵羊地方流行性流产、胎儿弯杆菌病及其他传染病也有价值。用此法染色时,胎儿弯杆菌和衣原体也染成红色,但可以从形态上区别。

2. 改良 Koster 法

(1) 抹片自然干燥,用火焰固定。

(2) 用新配制的番红(Safranin)和氢氧化钾混合液(番红饱和水溶液 2 份与 1 mol/L 氢氧化钾 5 份混合)染 1 min。

(3) 水洗后,用 0.1% 硫酸脱色 10 s(或在 10 ~ 20 s 内用 0.1% 硫酸处理两次)。

(4) 水洗后,用 1% 美蓝复染(3 s)。布氏杆菌呈橘红色,背景为蓝色。

(二) 培养

布氏杆菌在普通培养基上虽可生长,但更适宜的是肝汤培养基,有些菌株需要有血清或吐温-40(Tween-40)才能生长,所以血清葡萄糖琼脂或吐温葡萄糖琼脂被认为是较好的常规培养基。此外,有的以胰蛋白胨(tryptose)琼脂、胰蛋白酶消化大豆(trypticase-soy)琼脂及 AlbimiBrucellaagar(ABA)为最常用的基础培养基。在这些常用培养基内每 100 mL 中加入放线酮(cycloheximide)10 mg,杆菌肽(bacitracin)2 500 IU,乙种多黏菌素(polymyxin B)600 IU 及乙基紫(最终浓度为 1/80 万)。也可在常用培养基内加入结晶紫(最终浓度为 1/20 万至 1/70 万),或乙基紫(最终浓度为 1/80 万)制成选择培养基。

未经污染的材料接种于血清琼脂或肝汤琼脂上进行培养。为了抑制杂菌生长,特别是有可能被污染的材料可接种于选择性培养基上。同时接种两份,一份置于含有 10% 二氧化碳的密封容器中,以利于在初分离时需要二氧化碳的布氏杆菌生长。

(三) 动物实验

在实验动物中,豚鼠用于布氏杆菌的分离检查最为适宜。将布氏杆菌注射于豚鼠皮下或腹腔后,将发生慢性疾病,表现为脾肿、肝与肾有炎性坏死小病灶。注射 3 ~ 4 周后可在脾和淋巴结中找到细菌。小鼠、家兔、大鼠也用作实验动物。

病料内含菌量少而能检出的可靠方法就是接种豚鼠。如果病料污染较轻,可接种于豚鼠腹腔内,如果病料系乳汁或腐败组织,可做皮下或肌肉注射。接种乳汁时,取 20 mL 乳样离心,将其沉淀物和乳皮层混合,接种两只豚鼠,每只接种一半混合物。每种病料至少接种豚鼠两只,一只在接种后 3 周剖杀,另一只在 6 周剖杀。剖杀前需采血作凝集反应,滴度 1:5 以上者为阳性。剖检豚鼠时,须注意肉眼可见病灶,如淋巴结肿大,肝的坏死灶,脾肿大或发生结节,睾丸及附睾脓肿,四肢关节肿胀等。脾和接种部位的淋巴结以及其他有病灶的组织均应剪碎,接种于不含抑菌染料或抗生素的固体培养基上。最好用血清葡萄糖琼脂。若剖杀前的血清凝集反应为阳性,即使剖检时的培养为阴性,也可诊断为布氏杆菌病。

血清学诊断

应用血清学方法检出血清中有抗体存在,则说明被检动物为布氏杆菌病患畜。动物感染布氏杆菌以后首先出现的是凝集抗体,再过一段时间才出现补体结合抗体,最后产生变态反应。补体结合反应是高度特异性的,其阳性反应与感染的符合率,比血清凝集实验与感染的符合率高。此种方法用来鉴别注苗后和自然感染所引起的血清学反应很有价值,如4~8个月犍牛注射19号菌苗和山羊注射Revl号菌苗,经过6个月后退体结合反应为阴性,而血清凝集反应仍为阳性或可疑。

我国的家畜布氏杆菌病检疫应用的免疫生物学方法主要是凝集实验,补体结合实验及变态反应实验。

1. 试管凝集反应

本实验按《家畜布氏杆菌病试管凝集反应技术操作规程及判定标准》进行。

(1) 材料

抗原:由兽医生物药品厂生产供应。使用时用0.5%石炭酸生理盐水作1:20稀释,长霉或出现凝集块的抗原不能使用。

被检血清:必须新鲜,无明显蛋白凝固,无溶血现象和腐败气味。

阳性血清和阴性血清:由兽医生物药品厂生产供应。

稀释液:0.5%石炭酸生理盐水,用化学纯石炭酸与氯化钠配制,经高压灭菌后备用。检疫羊的稀释液用0.5%石炭酸10%氯化钠溶液。

(2) 操作步骤 被检血清稀释度:一般情况,牛、马和骆驼用1:50、1:100、1:200和1:400四个稀释度;猪、山羊、绵羊和狗用1:25、1:50、1:100和1:200四个稀释度。大规模检疫时也可用两个稀释度,即牛、马和骆驼用1:50和1:100;猪、羊、狗用1:25和1:50。

以羊、猪为例介绍稀释血清和加入抗原的方法:每份被检血清用5支小试管(8~10 mL),第1管加入稀释液2.3 mL,第2管不加,第3、4、5管各加入0.5 mL,用1 mL吸管取被检血清0.2 mL,加入第1管中,混匀(一般吸吹3~4次)。吸取混合液分别加入第2管和第3管各0.5 mL,将第3管混匀,吸0.5 mL加入第4管,第4管混匀吸取0.5 mL加入第5管,第5管混匀后弃去0.5 mL。如此稀释后从第2管起血清稀释度分别为1:12.5、1:25、1:50和1:100。然后将1:20稀释的抗原由第2管起,每管加入0.5 mL,血清最后稀释度由第2管起依次为1:25、1:50、1:100和1:200。

试管凝集实验也可用简便方式进行,即以0.2 mL吸管将被检血清以0.08、0.04、0.02及0.01 mL分别加入4支小试管内,然后每管加入1:40稀释的抗原1 mL,充分摇匀,这样4管血清的最后稀释度分别为1:25、1:50、1:100、1:200。

牛、马和骆驼的血清稀释和加抗原的方法与前述者一致,不同的是仅第1管加稀释液2.4 mL及被检血清0.1 mL。加抗原后从第2管到第5管血清稀释度依次为1:50、1:100、1:200和1:400。

每次实验须作3种对照,阴性血清对照须将血清稀释到其原有滴度,其他步骤同上。抗原对照即将当时使用的已稀释抗原0.5 mL加稀释液0.5 mL。

每次实验须制备比浊管,作为记录结果的依据,配制方法即以当时使用的已稀释抗原加等量稀释液,按表1-1比例配制。

表 1-1 比浊管配制方法

管号	抗原稀释液/mL	实验用稀释液/mL	清亮度/%	标记
1	0.0	1.0	100	++++
2	0.25	0.75	75	+++
3	0.5	0.5	50	++
4	0.75	0.25	25	+
5	1.0	0.0	0	-

全部试管充分振荡后,置 37~38℃温箱中,22~24 h 后用比浊管对照检查记录结果。出现 50% 以上凝集的最高稀释度就是这份血清的凝集价,因此 50% 亮度的比浊管很重要。

(3) 结果判定 牛、马和骆驼血清凝集价为 1:100 以上,猪、羊和狗 1:50 以上者,判为阳性。牛、马和骆驼血清凝集价为 1:50,猪、羊和狗为 1:25 者判为可疑,可疑反应的家畜经 3~4 周重检,牛、羊重检时仍为可疑,判为阳性。猪和马重检时仍为可疑,但农场中未出现阳性反应及无临床症状的家畜,判为阴性。

鉴于猪血清常有个别出现非特异性凝集反应,在实验时须结合流行病学判定结果。如果出现个别弱阳性(例如凝集价为 1:100~1:200),但猪群中均无临床症状(流产、关节炎、睾丸炎),可以考虑此种反应为非特异性,经 3~4 周可采血重检。

检疫后应将结果通知畜主,通知单样式如表 1-2:

表 1-2 检疫结果通知单

登记号码		采血日期: 年 月 日			畜主姓名			
		收到日期: 年 月 日						
通知号码		检验日期: 年 月 日			住 址			
畜别	畜号	血清凝集价					判定	备注
		1:200	1:400	1:25	1:50	1:100		

2. 平板凝集反应

该实验反应按《家畜布氏杆菌病平板凝集反应技术操作规程及判定标准》进行。

(1) 操作步骤 最好用平板凝集实验箱。无此设备可用清洁玻璃板,划成 4 cm² 方格,横排 5 格,纵排可以数列,每一横排第一格写血清号码,用 0.2 mL 吸管将血清以 0.08、0.04、0.02、0.01 mL 分别加于每排 4 个小方格内,吸管须稍倾斜并接触玻璃板,然后垂直于每格血清上滴加 1 滴抗原(1 滴等于 0.03 mL,如为自制滴管,须事先测定准确),或用 0.2 mL 吸管每格加 0.03 mL。用牙签或细金属棒将血清抗原混合均匀。一份血清用一根牙签,以 0.01、0.02、0.03 和 0.04 mL 的顺序混合。混合完毕将玻板均匀加

温至 30 ℃ 左右(无凝集反应箱可使用灯泡或酒精火焰),5 ~ 8 min 后观察实验结果。

每批次平板凝集实验须以阴、阳性血清作为对照。

(2) 结果判定

按下列标准记录反应结果:

++++: 出现大凝集片或小粒状物,液体完全透明,即 100% 凝集。

+++ : 有明显凝集片和颗粒,液体几乎完全透明,即 75% 凝集。

++ : 有可见凝集片和颗粒,液体不甚透明,即 50% 凝集。

+ : 仅仅可以看见颗粒,液体浑浊,即 25% 凝集。

- : 液体均匀浑浊,无凝集现象。

平板凝集反应的血清量 0.08、0.04、0.02 和 0.01 mL 加入抗原后,其效价相当于试管凝集价的 1:25、1:50、1:100 和 1:200。

判定标准与试管凝集反应相同。结果通知单只在血清凝集价的格内分别换成 0.08(1:25)、0.04(1:50)、0.02(1:100)和 0.01(1:200)。

3. 虎红平板凝集实验

这种实验是快速玻片凝集反应。抗原是布氏杆菌加虎红制成。它与试管凝集及补体结合反应效果相当,且在犊牛菌苗接种后不久,以此抗原做实验呈现阴性反应,对区别菌苗接种与动物感染有帮助。

(1) 材料 目前国内只有中国医学科学院流行病学微生物学研究所生产供应布氏杆菌虎红平板实验抗原,可按说明书使用,阴、阳性血清同于试管凝集反应的阴阳性血清。

(2) 操作步骤 被检血清和布氏杆菌虎红平板凝集抗原各 0.03 mL 滴于玻璃板的方格内,每份血清各用一支火柴棒混合均匀。在室温(20 ℃)4 ~ 10 min 内记录反应结果。同时以阳、阴性血清作对照。

(3) 结果判定 在阳性血清及阴性血清实验结果正确的对照下,被检血清出现任何程度的凝集现象均判为阳性,完全不凝集的判为阴性,无可疑反应。

4. 全乳环状反应

这是用乳汁进行的凝集反应,命名为 ABR(abortus bang ring)。环状反应用于乳牛及乳山羊布氏杆菌病检疫,以监视无病畜群有无本病感染。也可用于个体动物的辅助诊断方法。可由畜群乳桶中取样,也可由个别动物乳头取样。按《乳牛布氏杆菌病全乳环状反应技术操作规程及判定标准》进行。

(1) 材料

抗原:由兽医生物药品厂生产供应。全乳环状反应抗原有两种,一为苏木紫染色抗原,呈蓝色;另一种为四氮唑染色抗原,呈红色。

被检乳汁须为新鲜全脂乳。凡腐败、变酸和冻结的不适于本实验用(夏季采集的乳汁应于当天内检验,如保存于 2 ℃,7 d 内仍可使用)。患乳房炎及其他乳房疾病的乳汁、初乳、脱脂乳及煮沸乳汁也不能作环状反应用。

(2) 操作步骤 取新鲜全乳 1 mL 加入小试管中,加入抗原 1 滴(约为 0.5 mL)充分振荡混合,置 37 ~ 38 ℃ 水浴中 60 min,小心取出试管,勿使振荡,立即进行判定。

(3) 结果判定 判定时不论哪种抗原,均按乳脂的颜色和乳柱的颜色进行判定。

强阳性反应(+++):乳柱上层的乳脂形成明显红色或蓝色的环带,乳柱呈白色,分界清楚。