

动物病原菌检测技术指南

Dongwu Bingyuanjun
Jiance Jishu Zhinan

王真 王继彤 编著



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

动物病原菌检测技术指南

王 真 王继彤 编著

中国农业大学出版社

• 北京 •

内 容 摘 要

本书主要以细菌学检测的传统技术方法展开,通过样品采集、形态学观察、分离培养和鉴定以及致病性试验等常规技术和现代分子诊断技术的结合,为动物临床工作者、动物性产品和临床实验室检验的技术人员、从事动物疾病防控技术产品研发的技术人员提供技术指导。

图书在版编目(CIP)数据

动物病原菌检测技术指南/王真,王继彤编著. —北京:中国农业大学出版社,2016.7

ISBN 978-7-5655-1646-7

I. ①动… II. ①王…②王… III. ①动物疾病-病原微生物-微生物检定-指南 IV. ①S852.6-64

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 163788 号

书 名 动物病原菌检测技术指南

作 者 王 真 王继彤 编著

策划编辑 张秀环

责任编辑 张秀环

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62818525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail cbsszs @ cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2016年7月第1版 2016年7月第1次印刷

规 格 850×1168 32开本 6.125印张 150千字

定 价 20.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

前 言

本书是为兽医临床检验工作者、微生物检验技术人员和病原菌研究人员等设计的。章节内容主要以细菌学检测的传统技术展开,兼顾现代分子检测技术。本书主要内容涉及动物病料样品采集、保存运送,病原菌的形态学观察、分离培养和鉴定等基本实验室技术,兼顾常规技术和现代技术结合的性质,为动物临床工作者、动物性产品和临床实验室检验的技术人员、从事动物疾病防控技术产品研发的研究生和技术人员提供技术参考。

全书分为5章。第一章主要介绍病原菌检验用样品准备和仪器设备调试;第二章主要介绍病原菌形态学观察方法及注意事项;第三章则描述了病原菌分离培养的基本技术方法;第四章将病原菌鉴定的常规技术方法进行了详细阐述;第五章则简要描述了现代分子生物检测技术在病原菌检测方面的应用。

本书以传统的细菌学技术为主线,考虑到现代分子生物学技术发展更新较快,对后者应用的具体方法没有展开充分论述,仅进行了应用性概述。

感谢北京农学院动物疫情监测项目子项目兽医法规研究(2034115073)的支持。

由于编者水平有限、时间仓促,缺点和问题在所难免。恳请读者提出宝贵意见和建议,以便再版时修订。

编 者

2016年5月于北京

目 录

第一章 病原菌检验样品的准备和仪器调试	1
第一节 病料样品采集的原则及方法	1
一、病料采集的原则及注意事项	1
二、临床病料采取的方法	4
第二节 临床病料保存及运送	8
一、病料的保存	8
二、病料的包装、运送	9
第三节 常见传染病检验时采取的病料样品	11
一、细菌性疾病所采取的病料	11
二、分离真菌的病料	11
三、供血清学检查的样品	16
第四节 临床病料样品检验的一般程序	16
一、细菌学检验	16
二、真菌学检验	19
第五节 常用仪器的使用及器材准备	21
一、常规仪器的使用	21
二、实验器材的准备	30
第二章 病原菌的形态观察	33
第一节 标本制备	34
一、不染色标本的制备	34
二、负染色标本的制备	35
三、染色标本的制备	36

第二节 染色液的配制和染色方法	38
一、常用染料分类	38
二、各种染料储存液的配制	39
三、染色液配制及染色方法	40
第三节 细菌的形态观察	52
一、细菌的基本结构和特殊结构	52
二、细菌的形状和排列	55
三、细菌大小的测量	56
第四节 其他微生物形态	57
一、真菌	57
二、放线菌	59
三、螺旋体	60
四、霉形体	60
五、立克次氏体	60
六、衣原体	61
第三章 病原菌的分离培养	62
第一节 常用培养基及其制备	62
一、常用培养基种类	62
二、培养基制备的基本要求和一般过程	65
三、通用培养基的配制	66
四、鉴别培养基的配制	71
五、选择性培养基的配制	73
六、培养基的灭菌及保存方法	76
第二节 病原菌的分离方法	78
一、常规分离法	79
二、生物分离法	82
三、特殊分离法	83
第三节 病原菌的培养方法	85

一、通用培养法	85
二、厌氧培养法(绝对、微量的)	85
三、二氧化碳培养法	90
四、鸡胚培养法	91
第四节 病原菌纯培养与菌种保存	97
一、获得纯培养的原则	97
二、纯培养和移植接种方法	98
三、纯培养细菌的保存方法	101
第四章 病原菌的鉴定	106
第一节 细菌生长特性的检查	106
一、生长条件的检查	107
二、生长表现的检查	110
第二节 细菌的生长曲线	115
一、生长曲线的特征	116
二、生长曲线的测定	116
第三节 细菌的计数法	117
一、平板计数法	118
二、显微镜直接计数法	120
三、比浊法	123
第四节 细菌生化特性测定	125
一、糖类代谢试验	125
二、氨基酸蛋白质代谢试验	129
三、碳源与氮源利用试验	134
四、酶类试验和其他	139
第五节 抗生素敏感试验	149
一、纸片扩散法	149
二、稀释法(最低抑菌浓度测定法)	152
三、联合药敏试验	157

第六节 病原菌毒力和毒素的测定	158
一、实验动物的接种方法	158
二、实验动物的采血方法	161
三、实验动物的观察、解剖与病料采取	162
四、病原菌毒力及其测定	163
五、病原菌毒素及其测定	166
第五章 病原菌的核酸检测技术	170
第一节 病原菌种属分子特征鉴定	170
一、基于种属特异性的核酸序列分析法	170
二、PCR 指纹图分析法	172
三、核酸杂交法	174
四、DNA 的 G+C 含量测定法	175
第二节 病原菌分子诊断技术	176
一、常规的聚合酶链式反应(PCR)检测	176
二、荧光定量 PCR 检测	179
三、分子诊断技术的临床应用	183
参考文献	185

第一章 病原菌检验样品的 准备和仪器调试

第一节 病料样品采集的原则及方法

一、病料采集的原则及注意事项

病料采取、保存、运送方法是否正确,直接影响实验室检验结果的准确性,甚至延误防疫措施的制定和执行。因此,正确的病料样品采取、保存和运送,是细菌学检验的前提之一。

鉴于细菌种类众多、特性各异,对外界环境抵抗力千差万别,且机体内有些组织样品存在多种微生物的交互作用。因此,要全面考察待检样品的代表性,病料样品采集时应注意以下原则。

1. 适时性

无论是临床诊断用病料采集,还是普通病原学检验,均应根据检测目的、检测对象和检验项目,事先设计确定采样时机。

通常,具有临床症状的患病动物进行病原分离时,应从病初的发热期或症状典型期的动物机体采样;病死动物应立即采样,夏季最好不应迟于死后 2 h,冬季不迟于死后 24 h。患病动物应在抗生素治疗前采样,可全面兼顾耐药性和敏感性病原菌的检测,同时方便检测结果分析和判定。但经抗生素治疗的患病动物也可采样检测,以便确定耐药性病原菌和其他病因。另外,应根据待检测的细菌特性,选择合适时机和时间间隔进行样品采集。采集的样品应尽快送至实验室检测,若不能及时送检应立即低温冷冻保存,以

免影响检测结果的可靠性。

2. 合理性

由于不同病原菌在机体特定组织器官内寄生或增殖的数量和时间长短不同,而病料样品采集的目的是要保障样品的代表性,因此合理采集病料样品具有非常重要的意义。

设计的病原学检验项目,应根据检测目的、病原特点及潜在体内寄生部位和时间长短等,选择合适的样品、采样时间及间隔,必要时事先做好预试验探索。

临床诊断用病料或样品的采集,应根据检测的要求,全面、系统地进行采取,尤其在疾病性质和类别无法确定时。然而,在临床实践中,除需严格规定采集各种足够数量的样品外,不同动物疾病的需检样品各异,应按疑似疾病的特点和采样要求侧重采样。通常,病原微生物寄生或繁殖的部位也是机体内病理变化最为明显的部位,采集时应在病变最明显部位采取病理变化组织和健康组织交界处的病料样品。应选取未经药物治疗、症状最典型的动物样品或以剖检后病变最明显组织为中心采集样品;如有并发症,还应兼顾采样。样品采集量以满足检测需要为度,且应适当留有余地以备必要时复检。若有突然死亡或病因不明的尸体,必须首先排除炭疽病,必要时先采集动物末梢血液涂片、染色、镜检;疑似炭疽时,不得进行剖检采样。

3. 无菌性

要确定待测病料或样品中特定病原微生物的存在状态,必须保障采样过程中所采集的病料或样品没有被其他微生物污染,否则样品检验的结果混杂、无法判断真正的病原菌。

通常,在临床或现场采样过程中,无菌采样很难保证。其原因是动物体表、消化道、呼吸道、泌尿生殖道等与外界相通的体腔,采样周围环境的地面、流动的空气、采样者的呼吸、手臂和活动时搅

动的空气、采样用的器械、器皿表面或内部等,都存在大量的微生物,极容易污染采集的样品,影响检验结果。

因此,病原微生物检验用样品采集时,除供病理组织学检验外,必须尽最大可能地进行无菌操作采样,即采样的所用器械、器皿或其他物品必须经过灭菌处理;尸体解剖用具与灭菌处理的病料采集用具不得混用。尸体剖解时,应首先尽最大可能地通过无菌操作,按次序分层暴露出待采集的组织样品,然后先无菌采集样品后再进一步检查大体病变状况和性质,以免人为污染待采样品。

一般说来,一件器械只采取一种病料,否则必须经消毒处理方可用于另一种病料采集。不同的样品应存放于不同器皿。

某些组织器官,如消化道、鼻腔和上呼吸道、浅表的泌尿生殖道等黏膜和动物皮肤,其表面本身就有大量微生物聚集,同时也是病原微生物排出的通道。采集时,应在其他样品采集完成后再进行该类样品的采集,且应防止周围环境对此类样品的污染以及样品间的交叉污染,采集后单独存放。

4. 生物安全防护

据近年汇总的病原体相关数据,人和动物病原体共计 1 415 种,其中 868 种可导致人兽共患病,比例高达 61%。另据统计,近年来新发的 175 种人类传染病中,有 132 种是人兽共患性的,占 75%。由此可见,强化动物病料或样品采集时的生物安全意识,最大限度地降低动物体内的病原体传染给人类,具有重要的意义。

鉴于样品采集时多在临床现场,动物饲养密度高、环境复杂,操作者直接接触病原体或潜在病原体存在的样品或病料,操作人员被感染的机会将大大提高。因此,采样过程中,采样人员应做好生物安全防护,必须穿上便于消毒灭菌的工作服、胶靴,佩戴口罩、手套,必要时加穿防护服、眼罩。

此外,采样时既要保护采样人员,又要防止病原外泄,还要防止样品受到污染。

二、临床病料采取的方法

1. 临床及病原学检验材料的采取

(1) 皮肤

无菌取有病变的皮肤 10 cm²,并带有一块正常皮肤,放入灭菌溶液中;疑似炭疽时,割取整个耳朵,用 5% 石炭酸浸湿的纱布包好,放入灭菌塑料袋中;如系癣类,应在活性病灶的边缘刮取皮肤并拔毛根部放入灭菌生理盐水中;采集水疱液、脓汁等液体材料可经表面消毒后用无菌注射器抽取,但当脓液黏稠时可先向脓汁内注射灭菌生理盐水 1~2 mL,然后消毒表皮后切开脓腔吸取液体,放入灭菌试管中。

(2) 粪便、尿液及分泌物

粪便样品采集时,为防止表面接触土壤、饲料等,应先用灭菌器械剥离表面,采集中心处粪样放入灭菌试管;鼻腔、口腔、阴道分泌物,可用灭菌棉棒蘸取,迅速放入灭菌试管,必要时可用其他工具采集较大的液量;尿液采集时,可在家畜排尿时直接接收于清洁的容器内,必要时,亦可人工导尿。

(3) 乳汁

采取乳汁时,将取乳者的手和动物的乳房清洗消毒后挤乳,至少弃去最初三股乳汁,然后无菌收集 10 mL 乳汁装入灭菌瓶内。

(4) 血液

采血应在动物发病初体温升高或发病期,未经药物治疗前采集。活体动物采取全血时,先于灭菌注射器内吸取抗凝剂如灭菌的 5% 枸橼酸钠溶液 1 mL,再静脉采血 9 mL,混匀后注入灭菌容器内。若死后采血,须先用酒精或酒精棉火焰烧烤右心房表面,再用灭菌注射器插入抽取。采取血清材料一般只能在活体动物上操

作,静脉采血 10~20 mL,注入灭菌试管或小瓶中,摆成斜面,待血液凝固,析出血清后,吸取血清装入另一灭菌试管或小瓶中,向每毫升血清中加入 0.5% 石炭酸水溶液 1 滴,可以在一定时间内防腐。常用抗凝剂见表 1-1。

表 1-1 常用抗凝剂

抗凝剂名称	使用方法	抗凝原理	注意事项
草酸盐	草酸铵 1.2 g、草酸钾 0.8 g、福尔马林 1.0 mL、蒸馏水加至 100 mL,每毫升血加草酸盐合剂 0.1 mL(即相当草酸铵 1.2 mg,草酸钾 0.8 mg)。根据取血量将计算好的草酸盐剂量加入玻璃容器内烤干备用。如取 0.5 mL 于试管,烘干后每管可使 5 mL 血不凝固	与血液中的钙离子结合,形成不溶解的草酸钙而阻止血液凝固	草酸盐有毒性,不能作输血用的抗凝剂,不能用于血液蛋白质、钙离子、钾离子的测定
枸橼酸钠	常配成 3%~5% 水溶液。也可直接加粉剂,每毫升血加 3~5 mg	与血液中的钙离子形成离子化的可溶性化合物而阻止血液凝固	毒性较低,可作为输血用血液的抗凝剂,但若用量过大,易引起低钙血症。不宜作血液生化检验
肝素	纯的肝素 10 mg 能抗凝 65~125 mL 血液(按 1 mg 等于 125 U,10~20 U 能抗 1 mL 血液计)。一般可配成 1% 肝素生理盐水溶液,用时取 0.1 mL 于试管内,100℃ 烘干,每管能抗凝 5~10 mL 血液	与生物活性蛋白质作用,影响凝血酶系统从而阻止血液凝固	临床过量应用引起血性疾病,可用鱼精蛋白质解救,禁用于出血素质和伴有凝血迟缓的各种疾病

续表 1-1

抗凝剂 名 称	使用方法	抗凝原理	注意事项
乙二胺 四乙酸 二钠 (EDTA)	每 0.8 mg 可抗凝 1 mL 血液	对血液中钙离子 有很大的亲和 力,能与钙离子 络合而使血液 抗凝	抗凝血在室温下 可保存 9 h,在冰 箱内保存 24 h,对 血沉值无影响,但 不能用于血钙、血 钠的测定

不同的动物静脉采血的部位略有不同:猪少量用血可取耳静脉,量大时须取前腔静脉;羊少量用血采耳静脉,量大时采颈静脉;马、牛一般从颈静脉采血;禽类少量血从翅静脉采,量大时取心血;犬类多采前肢静脉血;兔子少量血取耳静脉,量大时采前肢静脉;鼠类少量血取耳静脉,量大时取尾静脉。另外,幼龄动物及体型小巧的动物取身体上较粗大的静脉血。

(5) 实质器官

应在刚解剖尸体时同时采取。剖开腹腔时应使用灭菌器械逐层暴露脏器并同时采集样品,常采取的脏器有肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、心脏等,但此时胸腹腔淋巴结、胸腹水等样品常应同时采集。若暴露时间过久,应先用烧红的铁片烧烙表面,或用酒精火焰消毒后,在烧烙的深部取小块实质器官(约 5 cm²)放入灭菌试管或平皿内。或直接用铂耳取些病料涂布于平板上。

病料采集时,如患畜疑为炭疽,可在左侧第 17、18 肋间,髂结节水平上切口,用镊子夹出脾脏,并剪一小块,放入平皿内,切口用消毒药棉花堵塞好。

(6) 胃肠及其内容物

选取病变部位肠管 5~10 cm,用线扎紧其两端后剪断。也可将肠管剪一小口,用灭菌棉拭子擦取肠管黏膜及其内容物。肠管

或棉拭子须置于单独的灭菌容器中。

(7)胆汁

可采取整个胆囊,也可采取胆汁数毫升,置于灭菌容器内。

(8)脑和脊髓

脑组织可纵切两半,脊髓可横切两半,一半做病原学检验,另一半做病理组织学检查。或将整个头部割下,包入浸透 0.1% 升汞液的纱布中,外面再用浸过上述消毒液的油布包裹,装入木箱或铁桶中。

(9)流产胎儿

可将流产胎儿送往实验室,也可用吸管或注射器吸取胎儿胃内容物放在试管内包装送检。

(10)长骨

取长骨时不要破坏两端,除去肌肉腱外,用纱布包好。

(11)玻片送检

血液制成涂片,脓汁、胸水等可制成抹片,肝、脾、肾、淋巴结、肺、脑脊髓等实质器官制成触片,坏死组织、致密结节制成压片(压在两玻璃之间,使玻璃向相反方向水平磨压)。

每种病料至少做 2、3 张玻片,做好的标本涂面相对,中间用火柴棒隔开,用线扎住包好,送检。

2. 病理组织检验材料

所取病料要全面而且有代表性。当怀疑是某一系统疾患时,应对该系统诸脏器组织全面取材。取材时,应选新鲜典型病变部位连同邻近的健康组织一并采取。取组织块为 3~5 cm 的方块,在未固定好之前,防止用水冲洗,以免改变其固有的细微结构,盛放的容器应大些,以免挤压变形。

3. 中毒材料

对中毒动物,可导出胃内容物、粪便、尿液、血液,死亡动物采

取胃和肠内容物,以及胃壁、肠段、尿液、肾、膀胱、心、肝、血液、淋巴结等组织器官。另外,还要采取可疑的剩余饲料。

对重度死后的中小型动物,最好把整个胃封装送检。常见中毒材料的采取量:胃及胃内容物 250~500 g,剩余饲料 500~1 000 g,肠管和肠内容物 250 g 左右,粪便 250 g 左右,尿液 200~500 mL,实质脏器个 100~250 g,血液 50~100 mL,被毛 10 g,饲用饮水 1 000 mL,土壤 100 g。

第二节 临床病料保存及运送

一、病料的保存

采取的新鲜病料最好不用任何保存剂,立即送到检验室。若不能及时送到,尤其在暑天,则应参考下述方法加入适当的保存剂并置低温处。

1. 细菌检验材料

供细菌培养用的液体病料,同容器一起放入 4℃ 冰箱内。棉拭样品,由于多数病原菌在干棉拭子上只能生存几小时,故应将棉拭子投入营养培养基中。实质脏器,若 1~2 d 内能送到实验室,可放在有冰的保温瓶或冰箱内,也可放入灭菌液体石蜡或 30% 甘油缓冲液中。中性纯甘油 30 mL、NaCl 0.5 g、磷酸钠 1 g 加中性蒸馏水至 100 mL,混合后高压灭菌,即成 30% 甘油缓冲液。真菌样品,因在室温密闭潮湿容器内能使污染的腐生真菌繁殖,可置于棉塞试管中或用灭菌布、纸包装。注意细菌检验材料保存温度 2~8℃ 为宜。

2. 病毒检验材料

低温是保存病毒的重要条件,采取的材料应尽快冷藏或冷冻。

需要注意的是,多种病毒悬液经缓慢反复冻融会因形成大量结晶而破坏病毒结构使之灭活,因此应尽快冻结并防止反复融化。亦可将含有病毒的组织块放在 50% 甘油缓冲液中,置于 4~8℃ 冰箱中保存。含病料的棉拭子可投置于装有运输培养基的试管中保存。如可选用含有 10% 牛乳蛋白或 0.5% 水解乳蛋白的无菌 Hank's 液。为控制病料中杂菌污染,可在培养基中按每毫升加入 1 000 IU 的双抗(青霉素和链霉素)及多黏菌素 B。

3. 血清学检验材料

检查抗体用的血液,不加抗凝剂,待凝血后,分离血清放入小青霉素瓶或灭菌离心管内。血清学检验材料宜于低温下保存。为了防腐,每毫升血清中加入 5% 石炭酸溶液 1 滴,并混匀。

4. 病理组织检验材料

将采取的组织块立即浸入 10% 福尔马林溶液中固定,24 h 后再换液 1 次。冬季为防冻结可用 95% 酒精固定。亦可将上述固定好的组织块保存于甘油和 10% 福尔马林混合液中。脑、脊髓组织需用 10% 中性福尔马林溶液(配法:10% 福尔马林溶液中加入碳酸镁 5%~10%)固定。固定液的用量均以高过淹没组织块为宜。

5. 中毒材料

一般不加任何防腐剂。为防止腐败分解,应将待检材料放入冰箱内。如果一定要加防腐剂,只可加酒精,并须注明,同时也要把酒精随待检材料一起送检,以作对照。

二、病料的包装、运送

1. 病料样品的包装

送检病料要求包装严密,冷藏。将盛有病料的容器加盖子,用蜡封闭。容器上贴上标签,注明病料名称、采取时间、地点、保存方