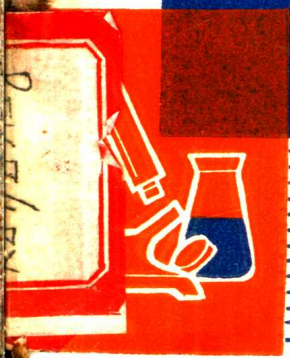


布鲁氏菌病检验手册

罗仲愚 恽肇权 编



布魯氏菌病檢驗手冊

羅仲愚 惲肇杈 編

上海科學技術出版社

內 容 提 要

本手册将目前通用的一些实验诊断方法,包括布鲁氏菌的培养、鉴定、血清学诊断和其他诊断方法,加以系统介绍,书末并附录有关操作技术。本书可供兽医和医学临床检验人员和防治工作者参考。

布 鲁 氏 菌 病 检 验 手 册

罗仲愚 恽肇权 編

上海科学技术出版社出版 (上海瑞金二路 450 号)

上海市书刊出版业营业许可証出 093 号

商务印书馆上海厂印刷 新华书店上海发行所发行

开本 787×1092 1/44 印张 1 24/44 排版字数 42,000

1965 年 11 月第 1 版 1965 年 11 月第 1 次印刷

印数 1-4,700

統一书号 16119·555 定价(科六) 0.20 元

序 言

布魯氏菌病的檢驗工作是很重要的，因为在动物与人的布魯氏菌病診斷上，实验診斷占有特殊重要位置。实验診斷方法很多，有时为了較快地取得正确結果，有必要采用两三种以上的方法，同时进行。本书編写目的，是将目前通用的一些方法，作一系統的叙述，并介紹有关菌型分类及抗原与血清标准化的資料，以便于从事兽医和医学檢驗工作人員的参考，并有利于在各项規格上的趋于統一。有些診斷法目前还不通行或尚处于試驗阶段的，本书暫不列入。

书中如有不当或錯誤之处，希望讀者多多提供意見，以便今后加以修改或补充。

編 者 1965 年 6 月于北京

目 录

序 言

第一章 布魯氏菌的培养	1
第一节 檢驗材料的采集与处理.....	1
第二节 培养基.....	2
第三节 人工培养方法.....	6
第四节 动物接种.....	7
第二章 布魯氏菌的鉴定	9
第一节 鉴别染色法.....	9
第二节 菌落形态的观察.....	10
第三节 布魯氏菌品系的鉴定.....	13
第四节 布魯氏菌属的分类.....	20
第五节 菌苗菌株与普通菌株的鉴别.....	20
第六节 布魯氏菌菌种的保藏.....	24
第三章 血清学诊断	25
第一节 凝集反应.....	25
(一) 試管凝集反应 (Wright 氏反应).....	25
(二) 平板凝集反应 (Huddleson 氏反应).....	27
(三) 全血平板凝集反应.....	29
(四) 滤紙片表面固定試驗.....	30
(五) 阴道粘液凝集試驗.....	32
第二节 补体結合反应.....	32
第三节 布魯氏菌病病畜乳汁环状試驗.....	40
第四节 琼脂扩散沉淀試驗.....	42

[2] 目 录

第四章 其他診斷方法	44
第一节 皮內变态反应	44
第二节 乳清凝集反应	45
第三节 不完全抗体測定法	45
(一) Coombs 氏反应	46
(二) Wiener 氏反应	46
第四节 調理吞噬反应	47
附 录	50
I. 牛型和羊型布魯氏菌单价特异血清的制备	50
II. Tb 噬菌体的增殖法与滴定法	51
III. 布魯氏菌在悬液中含量的計数法	53
IV. 試管凝集反应的标准化	55
V. 补体結合反应的标准化	58
VI. 乳汁环状反应抗原的标准化	58
参考文献	59

第一章 布魯氏菌的培养

第一节 檢驗材料的采集与处理

1. **家畜流产胎儿** 家畜流产胎儿为布魯氏菌病最有价值的檢驗材料,檢驗时应特別注意檢查其胃内容物、肺、脾及胎粪。采取胃内容物时,应先用燒热的刀片燙烙胃壁,消灭表面杂菌后,再用微細吸管自燒烙处刺入吸取之。吸出之内容物可直接作涂片檢查及接种培养基,或装入灭菌試管内于低溫保藏下送往實驗室。肺和脾的小块可用剪刀和镊子自胎儿体内剪取之。胎粪可在直腸内直接采取。

2. **流产胎膜** 胎膜需要仔細檢查,凡外表不很正常的絨毛体或膜壁,均应割下作檢驗。先用常水洗淨,再将剪下小块通过数个含灭菌生理盐水的燒杯或广口瓶(一般不少于3个)。洗滌完并可剪碎作涂片并直接接种培养基。

3. **阴道分泌物** 取灭菌紗布約0.5~1克重,做成塞子,捆扎于細綫的一端。利用开腔器及长镊子将紗布塞子納入牛、羊的阴道前端近于宮口处,綫之一端留于阴門外部,于30~60分钟后,緩緩外拉細綫,帶出紗布塞子,这时塞子上已含有阴道分泌物。

4. **乳汁** 洗淨家畜的乳房及乳头,并用酒精棉花拭子消毒乳头。挤去最初数滴乳汁,然后将乳样挤入灭菌玻璃瓶或試管中,尽速送至實驗室。在實驗室中經3000轉/分

鐘離心至少 10 分鐘, 然後取沉渣和表層奶皮接種瓊脂平板。

5. 動物的肉胴 布魯氏菌在動物體內最常存在的部位是網狀內皮系統、懷孕及分娩後的子宮和乳房。此外, 下列的淋巴結可自肉胴中取出進行培養: 兩側頷下淋巴結或咽後淋巴結、小塊脾臟, 子宮上方的髂淋巴結、兩側乳上淋巴結和乳房組織、公畜的鼠蹊淋巴結、貯精囊及睪丸。如果對損害肉胴的完整無關緊要, 則除上述各部分外, 另加下列器官, 可得到更可靠的細菌檢驗結果, 即兩側耳下、肩前、股前及腠淋巴、腸系膜、肝門、縱膈及支氣管等淋巴結及肝臟和子宮。各組織取出後, 除去其附著的脂肪, 浸入 95% 乙醇中並取出燒去其表面的乙醇, 再用滅菌小剪刀剪碎或置電攪拌器中攪碎, 然後接種大量的瓊脂平面。

第二節 培養基

培養布魯氏菌一般以固體培養基較為適用, 它可使生長的菌落易于辨認, 並減少變異的發生。不過, 當培養某些液體材料如血液等, 則以液體培養基為宜, 因為它可培養較大量的病料的緣故。

培養布魯氏菌的培養基種類很多, 常用且較易于取材製備的為血清葡萄糖瓊脂 (肉湯) 和血清馬鈴薯瓊脂 (肉湯)。此外, 尚有抑制雜菌的選擇培養基及檢驗血液的血液培養基, 茲分述於後:

1. 葡萄糖血清瓊脂 此種瓊脂即指在普通的營養瓊脂中加入 5~10% 馬血清即成。具體步驟是先將各種成分置入容器中:

蛋 白 胰	10 克
氯 化 鈉	5 克
肉 膏	5 克
琼 脂	15 克
蒸 餾 水	1000 毫升

容器在蒸汽上加热使全溶解,并将 pH 校正为 7.6~7.8 以后,用滤纸过滤,放入高压灭菌器中,于 10 磅压力下消毒 15 分钟。

在溶化的营养琼脂冷却至 50°C 之后,每 100 毫升培养基加入 6 毫升事先制就的血清葡萄糖溶液。

血清葡萄糖溶液的配制是按每 5 毫升馬或牛血清加入 1 克溶解純淨的葡萄糖,并經 Seitz 氏滤器过滤。所用的血清应事先证明不含有布魯氏菌凝集素,并在 56°C 中灭活 30 分钟。培养基加入血清葡萄糖溶液后,可分装备用。

2. 血清馬鈴薯琼脂 此种培养基是以馬鈴薯浸液代替肉羹。制备方法是取生的优良馬鈴薯用水洗淨、去皮,削成薄片,以 250 克加于 1000 毫升水中,置于有盖的容器內放在 60°C 溫度下过夜,然后經滤纸过滤。滤液經补足失去之水分后,加入以下成分:

氯 化 鈉	5 克
蛋 白 胰	10 克
牛肉浸膏	5 克
葡 萄 糖	10 克
琼 脂	25 克

将各成分混匀,加热至琼脂完全溶化为止。然后加入甘油 20 毫升,并校正 pH 至 7.4。如用蒸餾水,高压灭菌后 pH 将为 6.8; 若用常水,則須重新測定 pH, 务使 pH 为 6.8。用两层脫脂棉过滤,于 10 磅压力下灭菌 20

[4] 第一章 布魯氏菌的培养

分钟,待冷却至 50°C 左右,每 100 毫升加入馬血清 10 毫升。馬血清应事先证明不含布氏杆菌凝集素,并在 56°C 中經 30 分钟灭活。培养基加入血清后即可分装备用。

3. 选择培养基 在培养严重污染的材料时,为了抑制杂菌生长,Stockmayer (1933) 介绍于琼脂中加入龙胆紫(1:250,000)及孔雀綠(1:500,000),可以达到目的。染料最后濃度視牌号而有差异。Huddleson (1943) 认为只加入結晶紫至 1:1,000,000 即可。Spink (1956) 則推荐加入結晶紫(1:700,000)抑制革兰氏阳性杂菌,另加入水合氯醛(1:800)抑制变形杆菌。Stableforth (1959) 报告将培养基的琼脂量提高至 3%, 即可有效地抑制变形杆菌。

【注】 自从发现有少数对染料敏感的布魯氏菌菌株在上述含染料的培养基上有被抑制的现象后,这类选择培养基已較少使用。

Kuzdas 及 Morse (1953) 提出含抗菌素的选择培养基可以防止杂菌生长,而对布魯氏菌并无抑制作用,現已較广泛地被采用。其制备方法是在上述二种基础培养基的任一种中加入三种抗菌素,即(1)放綫酮(actidione)、(2)杆菌肽(bacitracin)、(3)乙种多粘菌素(polymyxin B)。其步骤如下:

〔放綫酮〕 取 1 克粉剂溶于 100 毫升蒸餾水中,用 Seitz 滤器过滤或在 5 磅压力下灭菌半小时。采用后一方法,抗菌素效价略有降低。另一方法是将粉剂溶于小量丙酮中,然后稀釋,可不必再消毒。此种溶液頗稳定,在普通冰箱中也可保存 6 个月。

〔杆菌肽〕 一般为瓶装灭菌粉剂,每瓶含药 50,000 单位,須要溶于 20 毫升灭菌蒸餾水中。溶液可分装于許

多小瓶中，于冰冻状态下保存，若在半月内未曾使用，即行弃去。

〔乙种多粘菌素〕一般亦为瓶装粉剂，每瓶含药 500,000 单位。若将瓶内容物溶于 83.3 毫升灭菌蒸馏水中，它可分装至若干小容器中，在冰冻状态下保存（最好是在 0°C 以下），一般可保存 2 星期，直至应用时为止。

当基础培养基已制就正待倾注平皿之时，将上述成分按每 100 毫升培养基加入放线酮 1 毫升，杆菌肽 1 毫升，多粘菌素 0.1 毫升，充分混匀后，立即倾注平皿，待琼脂凝固后，平皿可揭开并使皿底覆盖，置于 37°C 定温箱中 2 小时或烤箱 60°C 中 10 分钟，使其干燥。最好当日制备当日使用。若能在低温保存，也可保存一星期。

Renoux (1954) 曾建议在培养基中除加入上项三种抗菌素外，另加乙基紫 (ethyl violet)，可以更有效地抑制杂菌。加入浓度为 1:800,000 (即每 100 毫升培养基加入 0.1% 乙基紫溶液 0.125 毫升)。但需注意有一部分对染料敏感的菌株在含有乙基紫的培养基中不能生长。所以当接种材料有严重污染时，可同时接种两种培养基：一种含抗菌素及乙基紫；一种仅含抗菌素。

4. 血液培养基 Castaneda (1947) 推荐在同一瓶内含有液体和固体两种培养基的培养瓶，以供血液培养之用。制备时先制就含琼脂 2~2.5% 的固体培养基及不含琼脂的液体培养基。取容量 120~160 毫升扁瓶，分装已溶化之琼脂培养基于瓶中，置高压灭菌器中消毒。消毒完毕，取出平置案上使琼脂沿瓶之一侧凝固 (如图 1 之甲)。液体培养基加入枸橼酸钠使最后浓度为 2%。灭菌冷却后，以无菌手续加入培养瓶中 (约 15~20 毫升)。培养瓶在使用前应于 37°C 中孵育数日以测定是否无菌。瓶

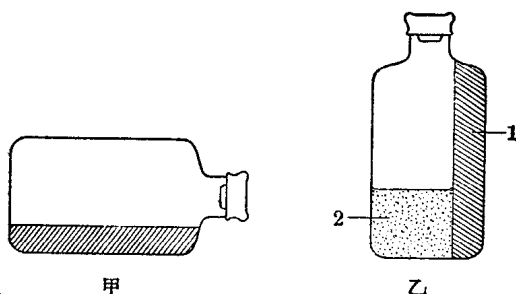


图 1 同一瓶內含有固、液体培养基示意图

1-固体培养基; 2 液体培养基

塞以橡皮塞較好,可便于注射針头刺入。

第三节 人工培养方法

所有自檢驗材料中取得的培养物及實驗室中保存之需要 CO_2 的菌株,都要在含有 10% CO_2 的大气的容器中培养。 CO_2 最好从貯气筒中直接供給。若无此条件,可用下法取得:即在容器中按每升体积加入重碳酸鈉 0.4 克及濃盐酸 0.35 毫升,使起作用而产生 CO_2 。两种試剂应如此置放:即当容器封閉后,将容器略傾斜,盐酸即可与药粉接触而起作用。如为玻皿,化学反应亦可任其在器底进行,因化合物对玻璃无損害。容器可用實驗室中的厌气培养瓶,若无此种培养瓶,可用适宜的广口瓶代替。瓶內装入一含有 CO_2 指示剂的小管;瓶口关闭后,須用胶泥将外緣封固。

对容器中 CO_2 含量多少的指示溶液的制备,是于 100 毫升蒸餾水中加入重碳酸鈉 0.1 克及 0.5% 溴麝香藍 2 毫升。使用时将液体加入小試管中 1 毫升即足。在置入盛有培养物的容器內以后,显现的顏色約需 1 小时

才稳定。下列顏色的变动范围可供操作者参考:

0% CO ₂	藍 色
5% CO ₂	藍 綠 色
10% CO ₂	綠 色
15% CO ₂	綠 黃 色
20% CO ₂	黃 色

布魯氏菌菌落一般在培养物接种后第3日开始出現,平皿多在第4日作常規檢查,此时菌落約2~3毫米寬,邊緣圓滑,常常不止一个菌落;若将平皿对着光源观察,則表現半透明并呈蜜黃色。以后菌落变大,轉为棕色,仍为半透明。若在第4日未曾发现菌落生长,应在第8至第10日再檢查,如仍无生长,則可弃去。

布魯氏菌菌落的鉴定,可取菌落少許与适当稀釋的抗布魯氏菌血清在玻片上混合形成悬液,如为布魯氏菌,当即发生凝集。此种血清可用已知布魯氏菌靜脉注射于健康家兔而制备之(見后)。所制出之血清,如不經吸收,将可凝集任何布魯氏菌光滑型培养物。若遇初次分离出現变异菌落时,則会发生一些困难,凝集反应往往不明显,甚或完全不发生凝集。有些粗糙菌落會出現自发的非特异性凝集現象。若取阴性血清与阳性血清对比,則这种現象可以查出。

第四节 动物接种

豚鼠是測定动物組織、分泌物和排泄物中含有少量布魯氏菌的最滿意的实验动物。如果病料污染很少,可接种于腹腔內。病料若是大量乳汁或已腐敗的組織,則可行皮下或肌肉接种。

先将組織块剪成小块,用灭菌細沙和盐水在乳鉢中

[8] 第一章 布魯氏菌的培養

研細或用組織研磨器磨細。每份材料須用豚鼠至少 2 只，一只在接種後 3 星期殺死，另一只在 6 星期後殺死。在殺死時須採血作凝集反應。

當剖檢時，任何眼觀變化如淋巴結腫大，肝壞死，脾腫大或發生結節、睪丸膿腫及副睪丸炎，四肢關節腫脹等等，均須小心檢查。凡有病灶的脾、淋巴結或其他組織，都應磨碎接種於血清葡萄糖琼脂。若有陽性血清凝集反應，即便未獲細菌生長，亦足以判為陽性結果。

有些含雜菌較多的檢驗物如乳汁、干酪、奶油等，即接種選擇培養基亦不易得到滿意的結果，此時豚鼠接種成為分離病菌的唯一方法。

第二章 布魯氏菌的鑑定

第一节 鑒別染色法

1. **Козловский 氏染色法** Козловский 于 1936 年介紹此法, 适于膿汁、阴道分泌物、胎膜、胎儿胃内容物等之檢查。其步驟如下:

- (1) 涂片按一般方法在火焰上固定。
- (2) 用 2% 沙黃水溶液染色, 并加热至出現气泡为止。
- (3) 用水冲洗。
- (4) 用 1% 孔雀綠水溶液或 1% 煌綠水溶液, 或 1% 美藍溶液复染半到一分钟。
- (5) 水洗, 干燥。

用此法染色, 布魯氏菌呈鮮紅色, 其他菌类被染成綠色或藍色。

2. **改良 Ziehl-Neelsen 氏法** Stamp 等(1950)介紹此法, 其用途与上法相似。操作方法如次:

- (1) 干燥涂片在火焰上固定。
- (2) 用稀釋 (1:10) Ziehl-Neelsen 氏石碳酸复紅液染色 10 分钟 (1 克硷性复紅, 10 毫升乙醇, 5% 石碳酸水溶液 90 毫升)。
- (3) 用水冲洗。
- (4) 用稀釋 (0.5%) 醋酸处理不超过 30 秒钟。
- (5) 彻底冲洗。

(6) 用 1% 美藍輕度復染(20 秒鐘)。

用此種染色法，布魯氏菌染為紅色，背景藍色。

8. 改良 Köster 氏法 Christofferson 等於 1941 年介紹此法，操作步驟如下：

(1) 塗片乾燥，在火焰上固定。

(2) 用新配制的 2 份飽和沙黃水溶液與 5 份 1N 氫氧化鉀混合液染色一分鐘。

(3) 用水沖洗。

(4) 用 0.1% 硫酸於 10~20 秒鐘內處理 2 次。

(5) 用水沖洗。

(6) 用 1% 石碳酸美藍復染 2~3 秒鐘。

用此種染色法，布魯氏菌染為橘紅色，背景藍色。

第二節 菌落形態的觀察

布魯氏菌菌落形態的變化，隨著毒力、抗原性、免疫原性和生化特性的變化而不同。光滑型菌落通常有致病性和抗原性；粗糙型菌落毒力較低，不具有平滑型所有的抗原性和免疫原性。布魯氏菌菌落形態的觀察，除了在生產菌苗和診斷抗原外，在鑑定分離出的菌株時也很重要。一般說來，新分離出的菌株，多屬光滑型，粗糙型者很少。非光滑型的細菌不能用單價血清或噬菌體來鑑定。但有時菌株在動物體內為光滑型，在人工培養時又發生了變化。當培養物中光滑型與粗糙型相混合時，很不易作出圓滿的鑑定。所以在鑑定某一菌株之先，宜尽可能地從培養物中選取光滑型菌落進行。

觀察菌落形態的方法，有下列幾種：

1. 直接觀察 這是 Henry 氏 (1933) 推薦的傾斜折光的方法，此法需要以下用具：(1) 一只帶有毛面聚光

鏡的显微鏡灯；(2)一架低倍的实物显微鏡及透明玻璃載物台；(3)一只小的圓形凹面反光鏡(可摘自普通显微鏡的載物台下方)。在檢查时，将凹面反光鏡置于显微鏡灯与实物显微鏡之間(如图2)，待檢的琼脂平面揭开放在玻璃載物台上。各物放在适宜位置，使灯光集合在反光鏡表面，以45度角度反射至琼脂平面。所用的琼脂培养基应不含顏色及不透明的物质。

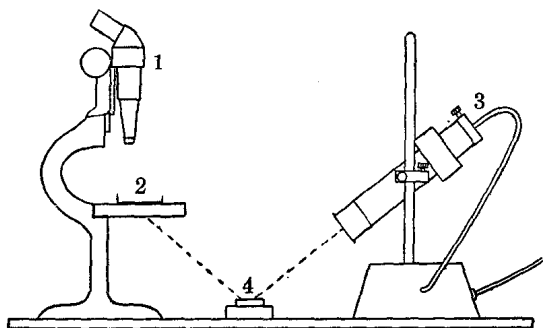


图2 傾斜折光法的裝置示意图

1-显微鏡($\times 15$)； 2-玻璃載物台上有平皿；
3-显微鏡灯； 4-反光鏡。

菌落类型的細微区别在甘油葡萄糖血清琼脂上較为清楚，故以此种培养基为合宜。接种前平板需要干燥，細菌涂布琼脂平面时，应使菌落在某一部分密集而在其他部分十分分散。在密集部位，菌落間的差异可以明显看出，而在分散部分即不易看出。平皿一般在孵育4天后进行檢查。

光滑型菌落一般較小、圓形、閃光，呈藍色或藍綠色。粗糙型表面呈干燥顆粒状，为黃白色(图3)。粘液型菌落可能透明，灰白色，但有特殊的粘性。中間型菌落最不