



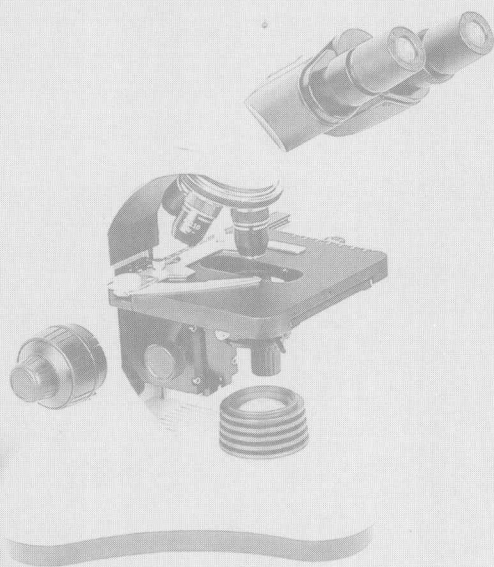
动物疫病

实 验 室 检 验 技 术

DONGWUYIBING
SHIYANSHI JIANYANJISHU

王进香 · 主编

宁夏人民出版社



动物疫病

实 验 室 检 验 技 术

DONGWUYIBING
SHIYANSHI JIANYANJISHU

王进香·主编

宁夏人民出版社

图书在版编目(CIP)数据

动物疫病实验室检验技术 / 王进香主编. —银川:宁夏人民出版社, 2008.8

ISBN 978-7-227-03859-7

I. 动... II. 王... III. 动物疾病—实验室诊断 IV.S854.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 134708 号

动物疫病实验室检验技术

王进香 主编

责任编辑 谭立群 何志明

装帧设计 晨 浩

责任印制 吴宁虎

宁夏人民出版社 出版发行

出版人 杨宏峰

地 址 银川市北京东路 139 号出版大厦 (750001)

网 址 www.nxcbn.com

电子信箱 nxcbmail@126.com

邮购电话 0951-5044614

经 销 全国新华书店

印刷装订 宁夏精捷彩色印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 29

字 数 430 千

印 数 1100 册

版 次 2008 年 9 月第 1 版

印 次 2008 年 9 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-227-03859-7/S·227

定 价 48.00 元

版权所有 翻印必究

前 言

2007年5月25日,第75届世界动物卫生组织(OIE)国际委员会大会确认中国作为主权国家加入OIE,标志着我国动物卫生事业同世界全面接轨。动物卫生工作走向世界的技术支撑是动物实验室的建设、管理及充分发挥作用。

动物实验室诊断,是采用化学、生物化学、病毒学、细菌学、动物寄生虫学、病理学等方法检查患病动物病理组织、血液、尿液、粪便等病料,确诊动物传染病、侵袭性疾病和普通病,为预防和控制动物疾病提供科学依据的根本方法和技术。随着科学技术的发展,动物实验室诊断技术在兽医工作中的地位显得日趋重要。

为了提高宁夏区、市、县三级动物实验室技术水平,宁夏动物疾病预防控制中心(原宁夏动物防疫站)于2005年5月和2006年9月编写了《动物疫病诊断监测技术》和《重大动物疫病检测技术培训教材》两书,几年来,在全区各级实验室工作中发挥了重要作用。但是,随着国家对于动物实验室工作要求的不断提高,原书已远远不能满足实际需要,为此我们按照农业部的要求,借鉴兄弟省区市的成功做法,按照目前动物实验室新的诊断方法,结合宁夏实际,组织编写了《动物实验室检验技术》一书。目的是指导兽医工作者较为系统地了解实验室检验的新技术,掌握常用的



新方法,提高实验室检验水平,增强对动物防疫工作、特别是对重大动物疫病防控的技术支撑能力,为保护畜牧业健康发展提供有力的技术保障。

全书包括常用器械及仪器设备、常用试剂的配制、动物样品的采集与运送、培养基制造技术、细菌分离培养及鉴定技术、病毒分离与鉴定技术、血清学诊断技术、分子生物学诊断技术、寄生虫学检验技术、寄生虫标本的采集、保存和观察方法等十章。

在本书编写过程中,得到各方面的大力支持,宁夏动物疾病预防控制中心解决了编写出版经费,宁夏人民出版社及时安排出版并进行精心设计和校对,在本书出版之际,我们在此一并表示诚挚地感谢!

由于我们的实际工作经验不足,占有的相关资料有限,编写水平不高,书中肯定存在这样或那样的不足甚至错误,诚请各位读者提出宝贵的修改和补充意见,以便在今后的修订中不断完善。

编 者

2008年6月30日

目 录

第一章 常用器械及仪器设备	(1)
第一节 常用器械的准备	(1)
第二节 实验室功能划分与仪器设备的配置	(5)
第三节 实验仪器设备的管理	(7)
第四节 实验主要仪器设备的使用与维护	(8)
 第二章 常用试剂的配制	(92)
第一节 试剂的规格及保管	(92)
第二节 常用溶液的配制	(94)
第三节 组织培养试剂配制	(109)
第四节 血清学试剂的配制	(117)
第五节 组织学和细胞学试剂的配制	(119)
第六节 分子生物学试剂的配制	(126)
第七节 其他	(134)
 第三章 动物样品的采集与运送	(140)
第一节 样品的采集	(140)
第二节 样品的处理	(147)
第三节 样品的记录包装与运送	(149)

第四章 培养基制造技术	(152)
第一节 培养基的分类	(152)
第二节 培养基的制备	(154)
第五章 细菌分离培养及鉴定技术	(163)
第一节 细菌培养基	(163)
第二节 细菌的培养	(184)
第三节 细菌的鉴定	(188)
第四节 细菌的药物敏感性鉴定	(232)
第五节 菌种的保存	(239)
第六节 细菌的快速鉴定方法	(245)
第六章 病毒分离与鉴定技术	(249)
第一节 病毒分离样品的实验室处理方法	(249)
第二节 实验动物与病毒分离	(251)
第三节 细胞培养技术	(255)
第四节 病毒的鉴定	(265)
第五节 病毒实验室的安全措施	(272)
第七章 血清学诊断技术	(274)
第一节 凝集类试验	(274)
第二节 沉淀类试验	(293)
第三节 中和试验	(301)
第四节 补体结合试验	(306)
第五节 标记类试验	(320)
第六节 其他血清学技术	(339)

第八章 分子生物学诊断技术	(358)
第一节 核酸探针技术	(358)
第二节 单克隆抗体技术	(365)
第三节 核酸扩增技术	(381)
第四节 核酸电泳技术	(389)
第五节 免疫印迹技术	(393)
第六节 核酸序列分析	(396)
第七节 DNA 芯片技术(DNA chips)	(401)
第九章 寄生虫学检验技术	(405)
第一节 粪便寄生虫检验技术	(405)
第二节 血液寄生虫检验技术	(411)
第三节 生殖器寄生虫检验技术	(415)
第四节 组织内寄生虫检验技术	(417)
第五节 其他器官排泄物和分泌物寄生虫检验技术	(418)
第六节 皮肤寄生虫检验技术	(420)
第七节 动物接种检验技术	(422)
第八节 寄生虫病的免疫学检验技术	(423)
第十章 寄生虫标本的采集、保存和观察方法	(435)
第一节 剖检动物时寄生虫标本的采集法	(435)
第二节 蠕虫标本的采集、保存和观察方法	(438)
第三节 昆虫和蜱螨的采集、保存和观察方法	(445)
参考文献	(453)

第一章 常用器械及仪器设备

第一节 常用器械的准备

兽医微生物检验所用的器械种类甚多（如吸管、试管、三角瓶、烧杯、培养皿、培养瓶、毛细吸管、玻片、盖玻片、橡皮塞、橡胶管、刀、剪、镊等），在选购时注意各种规格和质量，一般应能耐受多次高热灭菌。这些器皿在使用前都要根据不同的情况，经过一定的处理，洗刷干净。有的还要进行包装，经过灭菌等准备后，才能使用。现将常用器械的准备和灭菌列述如下。

一、玻璃器皿的准备

（一）新购的玻璃器皿

新购玻璃器皿常附有游离碱质，不可直接使用，应先除去包装沾染的污垢后，用热肥皂水刷洗，流水冲净，再浸泡于1%~2%的工业盐酸中数小时，除去游离的碱性物质，再以流水冲净。对容量较大的器皿，如大烧瓶、量筒等，洗净后注入少许浓盐酸，转动容器使其内部表面均沾有盐酸，数分钟后倾去盐酸，再以流水冲净，倒置于洗涤架上将水空干，即可使用。

（二）用过的玻璃器皿

凡确无病原菌或未被带菌物污染的器皿，使用后可随时冲洗，吸取过

化学试剂的吸管,可先浸泡于清水中,待到一定数量后再集中进行清洗。有可能被病原菌污染的器皿,必须经过适当消毒后,除去污垢,用皂液洗刷,再用流水冲洗干净。若用皂液未能洗净的器皿,可用洗液浸泡适当时间后再用清水洗净。洗液的主要成分是重铬酸钾和浓硫酸,其作用是将有机物氧化成可溶性物质,以便冲洗。洗液有很强的腐蚀作用,使用时应特别小心,避免溅到衣服、身体和其他物品上。

1. 平皿、试管、烧杯、三角瓶、注射器、组织培养瓶等:可用高压灭菌器灭菌(0.105MPa 即 121℃ 20~30min)。

2. 吸管、载玻片、盖玻片等:可浸泡于 5% 石炭酸、2%~3% 来苏儿或 0.1% 升汞中 48h。浸泡吸管的玻璃筒底部应垫以棉花,以防投入吸管时管尖破裂。玻片和滴管也可用 2%~5% 碳酸钠煮沸消毒 5~10min,后用清水冲洗干净,拭干,保存或浸泡于 95% 酒精中备用。

3. 盛有固体培养基(如琼脂)或沾有油脂(如液体石蜡或凡士林等)的玻璃器皿:应于消毒后,趁热将内容物倒净,用温水冲洗,再以 5% 肥皂水或其他洗涤剂溶液煮沸 5min,然后以清水冲洗。

(三) 云雾状玻璃器皿的处理

凡玻璃器皿上有云雾状而不能用普通方法洗净者,可用清洁液处理。

1. 清洁液的配制法:取重铬酸钾 10g 溶于常温清水 63ml 中,配成重铬酸钾饱和溶液,再吸取此液 35ml 加入粗质浓硫酸 1000ml 中即成。

2. 处理:将有云雾状的玻璃器皿浸泡于清洁液中 24h,然后取出用清水冲洗。若仍洗不净者弃之。清洁液可重复应用多次,直至其颜色变为蓝绿色或黑色为止。

(四) 玻璃器皿的洗涤

欲洗去玻璃器皿上的油脂和污垢,其步骤如下。

1. 一般玻璃器皿

(1) 将处理过的玻璃器皿浸泡于水中,用毛刷或试管刷蘸上洗涤剂或肥皂,刷去油脂和污垢,然后用自来水或清水冲洗数次,最后用蒸馏水

冲洗。

(2)经清水冲洗后,如发现玻璃器皿上尚有油迹时,可置于 2%~5%碳酸钠溶液或 5%肥皂水中煮沸 30min,再用毛刷刷去油脂和污垢,最后用清水或蒸馏水冲洗干净。

2. 吸管 吸管不易洗涤,需要小心,绝不能粗鲁急躁,其洗涤步骤如下。

(1)将吸管从消毒剂中取出后,先用细铁丝取出管口的棉塞,若棉塞太紧不易取出时,可将铁丝尖端压扁,插入棉塞与管壁之间。轻轻一转即可将棉塞拉出。

(2)将吸管浸泡于 5%热肥皂水中,用少许纱布或棉花缠于细铁丝尖端上,以刷洗管内的油脂和污垢。铁丝尖端的纱布或棉花应随时更换。

(3)用洗洁球一吸一挤反复冲洗数次,然后用清水和蒸馏水反复冲洗数次,倒立于垫有纱布的金属丝篓或干净的搪瓷盆中干燥。

(五)玻璃器皿的干燥

洗净的玻璃器皿通常倒插于干燥架上,令其自然干燥,必要时可放于温箱或 50℃左右干燥箱中,以加速其干燥,但温度不宜太高,以免玻璃器皿破裂。干燥后以干净的纱布或毛巾拭去水迹。

(六)玻璃器皿的包装

1. 棉塞的制作:依试管口和瓶口的大小,取适量棉花卷成圆锥形棉塞,或用纱布包裹棉花制成棉塞。如直接用棉花做棉塞时,要选择纤维长的新棉花,不能用脱脂棉,制作时将棉花分成数层,互相重叠,折叠卷紧,制成长 4~5cm 的圆锥形棉塞。如用纱布包裹棉塞时,也可选用脱脂棉,制作时将纱布放于试管口和瓶口上,用适量棉花塞入纱布中,制成长 4~5cm 的圆锥形棉塞,然后用纱布包好,用线绳扎紧即可。

2. 试管的包装:将试管口塞上棉塞,以 8~10 支为一捆,用棉线在试管的中部捆扎,再用一张牛皮纸或报纸将整捆试管的棉塞端包好,纸外捆以棉线即成。

3. 吸管的包装:先用细铁丝或长针头在吸管口端塞入少许棉花(塞入的棉花应大小适宜,太小则松,吹吸时随气流上下移动而失去作用;太大则紧,阻塞气流而吹吸不便)然后用报纸条从尖端开始斜向卷曲缠绕包裹,口端多余的纸筒折向前,再以 10 支为一捆,用报纸或牛皮纸包起,外捆以棉线,置于铝制消毒筒内消毒。

4. 平皿的包装:相同大小的平皿,以 4~6 个为一捆,底朝上盖朝下叠成圆柱状,然后用报纸或牛皮卷包裹。

5. 组织培养瓶和青霉素瓶的包装:单个或数个一包,用报纸或牛皮纸包裹,外捆以棉线即可。

6. 锥形瓶和烧杯的包装:锥形瓶塞上棉塞后,用报纸逐个包扎或不用纸包扎。烧杯或锥形瓶可直接用报纸逐个包扎。

7. 注射器的包装:将注射器分开,用纱布包裹,然后用报纸或牛皮纸包裹。

(七)玻璃器皿的消毒

包扎好的玻璃器皿用前进行干热灭菌($160^{\circ}\text{C}\sim 180^{\circ}\text{C}$, 1~2h)或高压灭菌(0.105MPa 即 121°C 20~30min)。

二、细胞培养用玻璃器皿的准备

(一)清洗 无论新购买的或用过的玻璃器皿,都必须浸泡于粗硫酸或清洁液中过夜,次日取出用自来水浸泡 4~6h 后,用自来水冲洗 10 次以上或用流水冲洗 5min 以上,最后用蒸馏水或双蒸馏水冲洗 6 次或 3 次,在温箱中干燥后即可包装。

(二)包装 包装方法基本同一般玻璃器皿。细胞培养瓶可用软木塞塞上,外包以牛皮纸;青霉素瓶可直接放入消毒盒内消毒。

(三)消毒 包装好的玻璃器皿,均以干热灭菌(160°C , 1~2h)。消毒过的器皿,必须在 1 周内用完,过期应重新消毒。

三、橡胶制品的准备

橡胶制品如橡皮塞、胶头滴管、洗洁球、橡胶管等一般经肥皂水煮沸 20min 后,流水冲洗 10 次,再以蒸馏水冲洗 2 次后,用双蒸馏水浸泡于玻璃缸中备用。使用前煮沸消毒 15min,也可取出晾干包装高压灭菌消毒后使用。

四、金属用具的准备

刀、剪、镊子等金属用具使用后,应用肥皂、清水洗净擦干,防止生锈。刀、剪、镊子等金属用具使用前浸在 95%酒精内,用时取出经过火焰,待器械上酒精自行燃烧完毕即可使用(注意:防止烧伤手或燃烧盛有酒精的玻璃缸)。器械上如有动物组织碎屑,应先在 5%石炭酸中洗去碎屑,然后蘸酒精燃烧灭菌。

第二节 实验室功能划分与仪器设备的配置

诊断检测实验是涉及多学科的一项综合性工作,根据检测目的不同,可能需要进行细菌学、病毒学、免疫学、分子生物学、生物化学等各方面的工作。因而,诊断检测实验室应至少设有病理学诊断室、血清学诊断室、病原学诊断室和分子生物学诊断室。如有条件,还可将上述实验室进一步细化,如将病原学实验室分为细菌学诊断室、病毒学诊断室、寄生虫学诊断室等。同时,应设立相对独立的共用仪器室,以利于共用仪器的使用与管理。另外,应设相对独立的业务接待室和样品处理室,专门负责外来病例、样品的登记、处理、保存与管理等。

诊断室应按照其工作领域、诊断功能来配置仪器。在选用仪器时,应根据实际工作的需要,在充分了解其同类产品的性能和特点后加以选定;有的产品,除主要部件外,还有系列的配件和附件,以充分发挥其功能或扩展其功能。如一台功能齐全的倒置显微镜,它可包括普通光源功能、相

差功能、恒温功能、显微拍照功能和显微摄像功能等;再比如离心机应有足够转头。在购置仪器时,一方面应考虑有足够的配件,否则会降低仪器性能。另一方面从经济角度考虑不应盲目地求全,而应有目的地选择。有的仪器自动化程度比较高,操作方便,但价格昂贵,可根据实验室的工作量来确定。若工作量不饱和,应适当选用自动化程度稍低但能达到检验目的的产品。有的大型仪器利用率很低,而在社会上可以有偿使用的,则不提倡购置,以免投入不必要的维护管理成本。

除各室必备的加样器(移液器)、冰箱(柜)及各种易耗品外,各诊断室配备的主要仪器设备如下。

病理学诊断室应配备的主要仪器有:石蜡切片机、冷冻切片机、磨刀机、显微镜(带荧光功能)等。

血清学诊断室应配备的主要仪器有:酶标仪(酶联检测仪)、酸度计、洗板机、台式高速冷冻离心机、培养箱(生化型)、微量振荡器、多道加样器、旋涡混合器等。

病原学诊断室应配备的主要仪器有:恒温培养箱、CO₂培养箱、普通生物显微镜、倒置显微镜、超净工作台、酸度计、离心机、旋涡混合器、超声裂解仪等。

分子生物学诊断室应配备的主要仪器有:PCR仪、电泳仪、超净工作台、离心机、紫外透射仪。有条件还可配置凝胶成像分析系统等。

共用仪器室应配备的主要仪器有:纯水机、电子天平、制冰机、超高速离心机、分光光度计等。

洗涤消毒室应配备的主要仪器有:高压灭菌锅、电热鼓风干燥箱、超声波清洗机等。

第三节 实验仪器设备的管理

实验仪器是完成各项检验工作必备的基本条件之一,其运行的精确度、稳定性和安全性直接影响实验能否正常进行和结果的准确性及重复性。

实验仪器根据其精密程度和价格昂贵与否,通常大致分为贵重仪器和一般仪器。重要大型仪器要求重点管理;贵重仪器应放置在洁净、防尘、防潮的环境中使用;一般仪器可放置在要求不太严格的环境中。

超速和高速离心机、高级显微镜、液相及气相色谱仪等存放的相对湿度不应高于 60%,使用电压应稳定在 220~240V 之间。由于我国城市普遍存在电压波动幅度大的问题,此类仪器本身对电压的自调能力有限,所以,应根据说明书的要求配备稳压电源。稳压电源的输出电流应与仪器相符或略高。

冰箱不能摆在受阳光直接照射的地方,其周边应留有供空气充分流动的空间,以利于散热;高压消毒器、蒸馏水器应与其他仪器分开放置和使用,以免在使用时排出的水气损害这些仪器的元件。

实验仪器应有维护的措施和定期维护,以保证其正常运行。超净工作台每年至少应检测一次,项目包括风力、气流、无菌程度;超高速离心机应定期作干燥运转和检查真空泵油是否出现云雾状。其他生化仪器,都应按说明书的要求进行维护。仪器使用后应及时清理和还原,不能留在下次使用之前再清理。

仪器应由专业人员修理,无关的人员不得随意拆卸、置换仪器的零件或元件。实验仪器的管理最终要落实到制度上。一个有效、严格的管理制度,应包括以下几个方面。

1. 贵重仪器管理责任到人,建立岗位责任制和挂牌上岗制度;
2. 重要仪器应悬挂使用操作规程并附有简单故障排除办法;

3. 事故报告制度和损坏报修制度;
4. 重要仪器使用原始记录;
5. 各种仪器的定期维护制度、标明上次检修时间和检修期限;
6. 仪器的调试核准制度;
7. 重要仪器建立档案管理制度;
8. 仪器报废确认制度。

第四节 实验主要仪器设备的使用与维护

一、光学显微镜

显微镜是人类认识物质微观世界的重要工具,是现代科学研究工作不可缺少的仪器之一。显微镜自 1666 年问世以来已有 300 多年的历史了,其间随着科学技术不断发展,显微镜的品种不断增加,结构和性能逐步得到完善和提高。

光学显微镜的分类:根据不同的使用用途,光学显微镜可分为普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、倒置显微镜、体视显微镜、偏光显微镜、万能研究用显微镜等 10 多种,目前,世界上许多国家都可以生产光学显微镜,牌名、种类繁多,其中德国、日本等国家制造的显微镜品质、数量占优势,但价格昂贵。

普通光学显微镜主要供常规检验、教学,用于观察切片、涂片等。暗视野显微镜用于观察细微物体的存在、运动、外形轮廓。荧光显微镜用于荧光染色观察。倒置显微镜用于从透明的容器底部向上观察,如培养细胞的观察。体视显微镜用于立体结构的观察。相差显微镜用于观察透明结构。偏光显微镜用于区分双折射物质的细微结构。万能研究用显微镜结构复杂,集以上多种功能于一体。

对于现代的光学显微镜,包括各种简单的常规检验用显微镜、万能研

究以及万能照相显微镜等,首先要认识其构造及各部件的功能,同时要掌握正确的调试、使用和维护方法,才能在实际应用中面对各种要求采用不同的显微镜检方法,充分发挥显微镜应有的功能,提高常规检验工作效率,同时又能获得明确的结果。

(一)光学显微镜的原理和构造

随着科学技术的发展,显微镜检方法由最传统的明视野、暗视野发展出了相差法、偏光方法;荧光方法也由透射光激发进展为落射光激发,使荧光效率大为提高;微分干涉相衬方法基于偏光方法,而巧妙地利用了微分干涉棱镜,使之能应用于医学与生物学的样品,又能应用于金相样品的分析与检验。下面以德国 ZEISS 公司生产的 Axioplan 万能研究用显微镜,简单介绍万能显微镜的基本组成部件。

1. 显微镜主机体(Stand):显微镜的主机体设计成金字塔形,而底座的截面呈 T 字形,使显微镜的整体相当稳固。显微镜的光学部件和机构调节部件、光源的灯室、显微照相装置、电源变压稳压器等,都可安装在主机体上或主机体内。

2. 显微镜的底座(base):底座和主机体通常组成一个稳固的整体。底座内通常装有透射光照明光路系统(聚光、集光和反光)部件,光源的滤光片组,粗/微调焦机构,光源的视场光阑也安装在底座上。

3. 透射光光源(tranilluminator):透射光光源由灯室、灯座、卤素灯、集光与聚光系统及其调整装置组成。

4. 透射光光源与反射光光源的转换开关(toggle switch):这是新一代 AXIO 系列显微镜特有的装置,透射光和反射光可通用。当具有透/反两用的配置时,利用这一转换开关能方便而又迅速地使透射光和反射光互相转换。在纯透射光的配置中,这一开关就改为电源开关。

5. 电源开关(mains switch)与亮度调节旋钮(brightness control):电源开关用来接通或切断显微镜所需用的交流电源。电源开关旋钮也可调节照明光源的亮度,使所观察的视域可随时获得适当的亮度,可调范围为